



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104278008 B

(45)授权公告日 2020.08.21

(21)申请号 201310292339.9

(22)申请日 2013.07.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104278008 A

(43)申请公布日 2015.01.14

(73)专利权人 北京宏冠再生医学科技有限公司
地址 100080 北京市海淀区海淀大街3号1
幢15层1301-A1519-1室

(72)发明人 邓宏魁 赵扬 侯萍萍 李艳琴
张旭 刘纯 关景洋 郦宏刚
赵挺 叶俊青 杨炜烽 刘康
葛建 徐君 张蓄

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021
代理人 张国梁

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

(56)对比文件

- CN 102027105 A,2011.04.20,
- CN 102260646 A,2011.11.30,
- CN 102260646 A,2011.11.30,
- CN 102027105 A,2011.04.20,
- CN 102242146 A,2011.11.16,
- WO 2012087965 ,2012.06.28,
- CN 101684457 A,2010.03.31,
- WANG Y等.A cyclic AMP analog"-8-Br-cAMP"enhances the induction of pluripotency in human fibroblast cells..《Stem Cell Rev》.2011,第7卷(第2期),331-341.
- Yan Shi等.Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts by Oct4 and Klf4 with Small-Molecule Compounds..《Cell Stem Cell》.2008,568-574.

审查员 温婧

权利要求书2页 说明书42页
序列表4页 附图13页

(54)发明名称

一种通过小分子化合物处理来制备多潜能干细胞的方法、试剂盒和用途

(57)摘要

本发明涉及一种通过小分子化合物处理来制备多潜能干细胞的方法、试剂盒和用途。在发明中,使分化的细胞与TGF-beta受体抑制剂, GSK3-beta抑制剂和cAMP激活剂接触,由此所述分化的细胞发生细胞命运重编程,产生诱导多潜能干细胞。有利地,所述接触步骤后获得的细胞产物还可以与SAH水解酶抑制剂接触,所述cAMP激活剂可替换为HDAC抑制剂和/或组蛋白去甲基化酶抑制剂,所述分化的细胞还与至少一种选自HDAC抑制剂、RA受体激活剂和组蛋白去甲基化酶抑制剂的化合物接触。本发明能够不使用外源转录因子产生诱导多潜能干细胞(小分子诱导的多潜能干细胞),其具备多向分化的潜能和胚胎干

细胞类似的基本特征,可用于疾病模型、药物研发和再生医疗相关研究和应用。



1. 一种制备诱导多潜能干细胞的方法,所述方法包括使分化的细胞与TGF-beta受体抑制剂,GSK3-beta抑制剂、cAMP激活剂和SAH水解酶抑制剂接触,由此所述分化的细胞发生细胞命运重编程,产生诱导多潜能干细胞,其中不包括使所述分化的细胞与选自Oct4、Sox2、Klf4和C-Myc中任何一个外源转录因子接触的步骤。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述分化的细胞还与至少一种选自HDAC抑制剂,RA受体激活剂和组蛋白去甲基化酶抑制剂的化合物接触。

3. 权利要求1或2所述的方法,其中所述TGF-beta受体抑制剂包括616452,Repsox (E-616452),SB431542,A8301,GW788388,SD208,SB525334,LY364947,D4476,SB505124;所述GSK3-beta抑制剂包括CHIR99021,TD114-2,BIO,Kenpaullone,TWS119,CBM1078,SB216763,3F8 (TOCRIS),AR-A014418,FRATide,Indirubin-3'-oxime,L803;所述cAMP激活剂包括Forskolin,IBMX,Rolipram,8BrcAMP,Prostaglandin E2 (PGE2),NKH 477,dibutyryl-cAMP (DBcAMP),Sp-8-Br-cAMPs。

4. 权利要求2所述的方法,其中所述HDAC抑制剂包括VPA,Scriptaid,Apicidin,LBH-589 (Panobinostat),MS-275,SAHA (Vorinostat),Scriptaid,Trichostatin (TSA),Psammaplin A,LAQ824 (NVP-LAQ824,Dacinostat),butyrate,VPA,4-Phenylbutyrate (4PB),M 344,splitomicin,SRT1720,resveratrol,Sirtinol,APHA,CI-994,Depudecin,FK-228,HC-Toxin,ITF-2357 (Givinostat),MGCD-0103,Niltubacin,PXD-101 (Belinostat),Pyroxamide,Tubacin,EX-527,BATCP,Cambinol,MOCPAC,PTACH,MC 1568,NCH 51,TC-H 106。

5. 权利要求1或2所述的方法,其中所述SAH水解酶抑制剂包括DZNep,Nep A,Adox,DZA,DZAri,NepC,NepD,2'-Deoxy-neplanocin A,Ara-NepA,NepF,Acyclo-NepA,6'-Homoepplanocin A,6'-C-methylneplanocin (R),6'-C-methylneplanocin (S),DHCA,DHCDA,DDFA (MDL28842),(\pm)-6' β -Fluoroaristeromycin,(\pm)-6' α -Fluoroaristeromycin,5'-Deoxy-2-fluoroadenosine,2' β -Fluoro-2' -3' -dideoxyadenosine,5',5',6',6' -Tetrahydro-6' -deoxyhomooadenosine,Pyrazofurin,Adenosine dialdehyde,3-Deaza-isoformycin,(S) DHPA,4' -Thioadenosine (SAdo),SIBA,DZSIBA。

6. 权利要求2所述的方法,其中所述RA受体激活剂包括TTNPB,Ch55,Retinol,AM580,ATRA,13-cis RA,4-Hydroxyphenylretinamide,BMS189/453,CD437,9-cis-RA,Methoprene acid,Targetin (LGD1069),BMS188,BMS649,CD666,Diazepinylbenzoic Acids;所述组蛋白去甲基化酶抑制剂包括Tranlycypromine,LSD1-C76,S2101,LSDi-2d,CBB1007,RN-1,LSD1抑制剂。

7. 权利要求1或2所述的方法,其中用于制备所述诱导多潜能干细胞的化合物包括下述任一组的化合物组合:

CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA,
CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+TTNPB,
CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+4PB+Tranlycypromine,
CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranlycypromine,
CHIR99021+616452+Forskolin+NepA+VPA+Tranlycypromine,
CHIR99021+616452+Forskolin+Adox+VPA+Tranlycypromine,

CHIR99021+616452+Forskolin+DZA+VPA+Tranlycypromine,
CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranlycypromine+TTNPB,
CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranlycypromine+AM580,
CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranlycypromine+Ch55,或
TD114-2+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranlycypromine。

8. 权利要求1或2所述的方法,其中所述分化的细胞来源于哺乳动物,其中所述分化的细胞包括成纤维细胞,皮肤细胞,脂肪细胞,肝细胞,胃细胞,角质细胞或血液细胞。

9. 权利要求1或2所述的方法,其中所述分化的细胞来源于小鼠。

10. 权利要求1或2所述的方法,其中所述分化的细胞是成纤维细胞或脂肪细胞。

11. 用于诱导多潜能干细胞的组合物或试剂盒,其包括权利要求1-10任一项中定义的化合物组合。

12. 权利要求11所述的组合物或试剂盒,其不包括外源转录因子Oct4、Sox2、Klf4和C-Myc中的任何一个。

13. 权利要求11-12中任一项所述的组合物或试剂盒用于制备多潜能干细胞的用途。

一种通过小分子化合物处理来制备多潜能干细胞的方法、试剂盒和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种通过小分子化合物处理来制备多潜能干细胞的方法、试剂盒和用途。在发明中,使分化的细胞与TGF-beta受体抑制剂,GSK3-beta抑制剂和cAMP激活剂接触,由此所述分化的细胞发生细胞命运重编程,产生诱导多潜能干细胞。本发明能够不使用外源转录因子产生诱导多潜能干细胞(CiPS细胞),其具备多向分化的潜能和胚胎干细胞类似的基本特征,可用于疾病模型、药物研发和再生医疗相关研究和应用。

背景技术

[0002] 多潜能干细胞(Pluripotent stem cells),例如胚胎干细胞(Embryonic stem cells,ESC)拥有无限增殖的能力,并且能够分化为三胚层的所有细胞类型。除胚胎干细胞外,胚胎瘤细胞(Embryonal carcinoma cells)和胚胎生殖(Embryonic germ cells)细胞也拥有类似的多潜能性。多潜能干细胞对于基础科学及人类健康的研究有着重要的意义。通过研究多能潜能干细胞可以了解发育过程中的复杂事件,建立疾病模型,进行药物筛选,甚至可以直接用于疾病的治疗。

[0003] 2006年8月,日本京都大学中山伸弥教授(Shinya Yamanaka)所领导的实验室,首次证明通过逆转录病毒载体向已经分化的小鼠体细胞中过表达四个基因(Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc)就可以获得拥有多潜能性的细胞,称为诱导的多潜能干细胞(Induced pluripotent stem cells,iPSCs)。在该实验中获得 iPSCs 拥有胚胎干细胞类似的特征,具有碱性磷酸酶活性(AP)以及小鼠ESC特异的SSEA-1表面标志,内源开始表达Oct4、Nanog、Sox2、Gdf3等标志性基因,并且在其Nanog及Oct4的启动子区组蛋白H3的低甲基化和高乙酰化。另外,同胚胎干细胞类似,获得的 iPSCs 可以在体外被诱导分化为外、中、内三胚层的终末端分化的细胞。但是,该实验通过Fbx15基因作为报告体系,得到的 iPSCs 并不完全具有胚胎干细胞的全能性,内源Oct4等基因启动子区的DNA甲基化并未完全擦除,也不能通过囊胚注射的方法获得嵌合小鼠(Takahashi et al,2006)。而后,在2007年,多家实验室通过采用新的报告基因的筛选体系(基因Oct4或Nanog的promoter),得到了完全重编程的 iPSCs,这些 iPSCs 的内源Oct4及Nanog启动子区的DNA甲基化完全擦除,并且通过囊胚注射制备得到嵌合小鼠。这些 iPSCs 来源的细胞可以整合到嵌合鼠的生殖系统中,产生完全由该 iPSCs 来源的后代小鼠(Wernig M et al,2007;Okita K et al,2007;Maherali N et al,2007)。但是这些 iPSCs 都是通过将逆转录病毒或者慢病毒载体整合到体细胞的基因组中,过表达特定外源基因来获得的。此类载体的插入可能会导致基因组的插入突变,如果外源基因沉默不完全,还会影响后续的 iPSCs 的分化,尤其是原癌基因C-Myc的使用,甚至会导致肿瘤的形成(Nakagawa M et al,2007;)

[0004] 在此之后也陆续报道了其它的一些诱导 iPSCs 的方法,包括使用不同的载体将四个外源基因(Oct4、Sox2、Klf4和C-Myc)转入细胞内,例如使用piggyBac转座子(Woltjen K et al,2009),腺病毒载体(Stadtfield M et al,2008)和质粒载体(Yu J et al,2009)的方

法。在2009和2010年也分别有相关的研究组报道了,通过直接向细胞内转入四个外源基因的蛋白质(Kim D et al,2009;Zhou H et al,2009)或者mRNA(Warren L et al,2010)来实现诱导多潜能干细胞的方法。另外有报道证明通过转入直接调控干性基因表达的小RNA(Anokye-Danso F et al,2011;Miyoshi N et al,2011)也可以实现体细胞的重编程。但是总体而言这些方法存在着对靶细胞进行基因水平的操作从而增加了其基因组发生突变的可能性,或者方法本身操作难度大难以进行重复和应用的诸多缺点。

[0005] 由于小分子化合物本身存在结构相对稳定,细胞相容性好,性价比高,无免疫原性,并且非常易于操作及标准化等一系列特点,使其在体细胞重编程的应用中有着巨大的优势。相关的研究发现在没有外源基因c-Myc的情况下,单独依靠Oct4、Sox2和Klf4三个因子也可以获得诱导多能干细胞,但是重编程的效率会大大的降低(Nakagawa M et al,2007;Wernig M et al,2008)。随后的研究发现,组蛋白去乙酰化酶抑制剂Valproic acid(VPA)可以在Oct4、Sox2和Klf4的三因子的水平上,提高重编程的效率大约50倍左右(Huangfu D et al,2008)。进一步的研究发现,通过抑制TGF- β 信号通路例如使用Repsox、SB431542等小分子或者TGF- β 蛋白的抗体即可以替代外源Sox2的使用,从而对于人和小鼠的体细胞如胚胎成纤维细胞,在Oct4和Klf4两个因子的作用下就能够实现重编程,虽然效率会明显降低(Ichida J et al,2009)。之后相关研究也发现一系列提高重编程效率的小分子如GSK3 β 抑制剂CHIR99021,TGF β 抑制剂616452等(Nakhaei-Rad S et al,2011)。除此之外,研究发现通过调控细胞组蛋白及DNA甲基化相关靶点可以影响重编程过程,例如调控组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂BIX01294,H3K4组蛋白去甲基化酶抑制剂tranylcypromine等被发现可以促进体细胞重编程。同时发现使用DNA甲基转移酶的抑制剂AZA可以促进部分重编程的细胞向完全重编程的细胞转变(Mikkelsen T S et al,2008)。DZNep作为SAH水解酶的抑制剂,可以抑制对SAM依赖的甲基化过程(Chiang P K,1998),相关研究发现使用DZNep对人的胚胎干细胞进行处理可以促进失活的X染色体去掉组蛋白H3K27me3的修饰,使其向更加原始的状态转变(Perez S V D et al,2012)。

[0006] 2010年,本实验室首次报道,向小鼠的成纤维细胞中,只转入一个重编程因子Oct4的情况下,通过VPA、CHIR99021、616452和Tranylcypromine(VC6T)的小分子组合的处理,可以获得完全重编程的iPSCs(Li Y et al,2010)。并且随后的一些研究也找到了一些可以实现或者提高单独Oct4重编程效率的小分子,例如蛋白精氨酸甲基转移酶抑制剂AMI-5(Yuan X et al,2010),三磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1的抑制剂PS48等(Zhu S et al,2010)。但是至今为止还从未有相关的报道使用不依赖外源转录因子,完全由化学小分子处理的方法获得多潜能干细胞的研究。

[0007] 参考文献:

[0008] 1.Takahashi K,Yamanaka S.Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.Cell 2006;126:663-676.

[0009] 2.Wernig M et al.In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES cell-like state.Nature.2007;448:318-324.

[0010] 3.Keisuke O et al.Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.Nature 2007;448:313-317.

- [0011] 4.Maherali N et al.Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution.Cell stem cell 2007; 1(1):55-70.
- [0012] 5.Nakagawa M et al.Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.Nature biotechnology 2007;26(1): 101-106.
- [0013] 6.Woltjen K et al.piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells.Nature,2009,458(7239):766-770.
- [0014] 7.Stadtfield M et al.Induced pluripotent stem cells generated without viral integration.Science,2008,322(5903):945-949.
- [0015] 8.Yu J et al.Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences.Science,2009,324(5928):797-801.
- [0016] 9.Kim D et al.Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins.Cell stem cell,2009,4(6):472.
- [0017] 10.Zhou H et al.Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins.Cell stem cell,2009,4(5):381.
- [0018] 11.Warren L et al.Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA.Cell stem cell,2010,7(5):618-630.
- [0019] 12.Anokye-Danso F et al.Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency.Cell stem cell,2011,8(4): 376-388.
- [0020] 13.Miyoshi N et al.Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs.Cell stem cell,2011,8(6):633-638.
- [0021] 14.Wernig M et al.c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts.Cell stem cell,2008,2(1):10-12.
- [0022] 15.Huangfu D et al.Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds.Nature biotechnology, 2008,26(7):795-797.
- [0023] 16.Ichida J K et al.A Small-Molecule Inhibitor of Tgf- β Signaling Replaces Sox2 in Reprogramming by Inducing Nanog.Cell stem cell,2009,5(5): 491-503.
- [0024] 17.Nakhaei-Rad S et al.New windows to enhance direct reprogramming of somatic cells towards induced pluripotent stem cells.Biochemistry and Cell Biology,2011,90(2):115-123.
- [0025] 18.Mikkelsen T S et al.Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis.Nature,2008,454(7200):49-55.
- [0026] 19.Chiang P K.Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase.Pharmacology&therapeutics,1998,77(2):115-134.

[0027] 20.Perez S V D et al.Derivation of new human embryonic stem cell lines reveals rapid epigenetic progression in vitro that can be prevented by chemical modification of chromatin.Human molecular genetics,2012,21(4):751-764.

[0028] 21.Li Y et al.Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene,Oct4,and small molecules.Cell research,2010,21(1):196-204.

[0029] 22.Yuan X et al.Combined Chemical Treatment Enables Oct4-Induced Reprogramming from Mouse Embryonic Fibroblasts.Stem Cells,2011,29(3):549-553.

[0030] 23.Zhu S et al.Reprogramming of Human Primary Somatic Cells by OCT4 and Chemical Compounds.Cell stem cell,2010,7(6):651-655.

发明内容

[0031] 本发明一方面提供了一种诱导多潜能干细胞的小分子化合物配方,和使用该配方从体细胞诱导出多潜能干细胞的方法。

[0032] 本发明一方面提供一种制备诱导多潜能干细胞的方法,所述方法包括使分化的细胞与TGF-beta受体抑制剂,GSK3-beta抑制剂和cAMP激活剂接触,由此所述分化的细胞发生细胞命运重编程,产生诱导多潜能干细胞。

[0033] 在本发明的一些实施方案中,所述接触步骤后获得的细胞产物可进一步与SAH水解酶抑制剂接触。

[0034] 在本发明的一些实施方案中,所述cAMP激活剂可替换为HDAC抑制剂和/或组蛋白去甲基化酶抑制剂。

[0035] 在本发明的一些实施方案中,所述分化的细胞还与至少一种选自HDAC抑制剂,RA受体激活剂和组蛋白去甲基化酶抑制剂的化合物接触。在所述实施方案中,本发明提供制备诱导多潜能干细胞的方法,包括使分化的细胞与TGF-beta受体抑制剂,GSK3-beta抑制剂和cAMP激活剂,以及至少一种选自HDAC抑制剂,RA受体激活剂和组蛋白去甲基化酶抑制剂的化合物接触,由此所述分化的细胞发生细胞命运重编程,产生诱导多潜能干细胞。在本发明一些实施方案中,所述接触步骤后获得的细胞产物可进一步与SAH水解酶抑制剂接触。在本发明的一些实施方案中,所述cAMP激活剂可替换为HDAC抑制剂和/或组蛋白去甲基化酶抑制剂。

[0036] 在本发明中使用的小分子化合物没有特别的限制,只要能够实现相应的抑制或激活功能即可。

[0037] 本领域已有大量文献报道了这样的分子,并且本领域技术人员仍然在不断开发这样的分子,本发明涵盖实现相应的抑制或激活功能的所有分子。本发明还涵盖通过替代方案实现相应的抑制或激活功能,这样的方案是本领域已知的,例如可通过RNA干扰的形式实现对相应信号途径的抑制。在本发明的一些实施方案中,这样的分子独立地包括但不限于下述具体列举的分子。例如,可用于本发明的TGF-beta受体抑制剂包括616452,Repsox(E-616452),SB431542,A8301,GW788388,SD208,SB525334,LY364947,D4476,SB505124。例如,可用于本发明的GSK3-beta抑制剂包括CHIR99021,TD114-2,BIO,Kenpaullone,TWS119,CBM1078,SB216763,3F8(TOCRIS),AR-A014418,FRATide,Indirubin-3'-oxime,L803。例如,

可用于本发明的cAMP激活剂包括Forskolin (FSK), IBMX, Rolipram, 8BrcAMP, Prostaglandin E2 (PGE2),

[0038] NKH477, dibutyryl-cAMP (DBcAMP), Sp-8-Br-cAMPs。例如, 可用于本发明的HDAC抑制剂包括Apicidin, LBH-589 (Panobinostat), MS-275, SAHA (Vorinostat), Scriptaid, Trichostatin (TSA), Psammaplin A, LAQ824 (NVP-LAQ824, Dacinostat), butyrate, VPA, 4-Phenylbutyrate (4PB), M344, splitomicin, 4-PBHA, APHA, CI-994, Depudecin, FK-228, HC-Toxin, ITF-2357 (Givinostat), LACI-824, MGCD-0103, Niltubacin, PXD-101 (Belinostat), Pyroxamide, SuberoHA, Tubacin, EX-527, BATCP, MOCAP, PTACH, MC1568, NCH51, TC-H106, medda_cmpd_6j, suramin_analog, trapp_cmpd_12J, NVP-LAQ824。例如, 可用于本发明的SAH水解酶抑制剂包括DZNep, Nep A, Adox, DZA, DZAri, NepC, NepD, 2'-Deoxy-neplanocin A, Ara-NepA, NepF, Acyclo-NepA, 6'-Homoepplanocin A, 6'-C-methylneplanocin (R), 6'-C-methylneplanocin (S), DHCA, DHCA, DDFA (MDL28842), (\pm)-6' β -Fluoroaristeromycin, (\pm)-6' α -Fluoroaristeromycin, 5'-Deoxy-2-fluoroadenosine, 2'- β -Fluoro-2'-3'-dideoxyadenosine,

[0039] 5', 5', 6', 6'-Tetrahydro-6'-deoxyhomoadenosine, Pyrazofurin, Adenosinedialdehyde, Adox (Mol Cancer Ther. 2009 Jun; 8 (6): 1579-88.), 3-Deaza-isoformycin, (S) DHPA, 4'-Thioadenosine (SAdo), SIBA, DZSIBA。例如, 可用于本发明的RA受体激活剂包括TTNPB, Ch55, Retinol, AM580, ATRA, 13-cis-RA, 4-Hydroxyphenylretinamide, BMS189453, CD437, 9-cis-RA, Methoprene acid, LGD1069 (bexarotene), BMS649 (S R11237), CD666, Diazepinylbenzoic Acids。例如, 可用于本发明的SAM依赖的甲基化抑制剂包括Hydralazine, Procainamide, Psammaplin A, RG108, Temozolomide, Zebularine, 5-aza-2-deoxycytidine (Decitabine), 5-aza-C, 5-Fluoro-2'-deoxycytidine, DHAC, EGCG, Nanaomycin A, SGI-1027, (R)-(-)-1-Methyl-3-pyrrolidinol, (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Caffeic acid, Chlorogenic acid, (1S, 2S)-trans-N-Boc-2-aminocyclopentanol, UNC0638, EPZ004777 (EPZ), EPZ-5676, BIX01294, UNC0638, UNC0224, UNC0321, Chaetocin, AMI-5, AMI-7, SGC0946。例如, 可用于本发明的组蛋白去甲基化酶抑制剂包括Tranylcypromine (Parnet), LSD1-C76, S2101, LSD-2d。DZNep是SAH水解酶抑制剂, 可以抑制SAM依赖的细胞甲基化的过程。不受任何理论限制, 认为DNA甲基化酶DNMT1, DNMT3a和DNMT3b均为SAM依赖的甲基化酶。在小分子组合中加入DZNep这个小分子, 显著降低了Oct4启动子上的DNA甲基化水平(图16A), 提示DZNep对于小分子诱导的体细胞重编程的作用可能通过DNA去甲基化发挥作用。此外, H3K9甲基化酶(例如G9a)同样为SAM依赖的甲基化酶。在小分子组合中加入DZNep这个小分子, 显著降低了Oct4启动子上组蛋白H3K9甲基化水平(图16B), 提示DZNep对于小分子诱导的体细胞重编程的作用可能通过了组蛋白H3K9去甲基化发挥作用。

[0040] 在本发明的一些实施方案中, 用于制备所述诱导多潜能干细胞的化合物可以选自下述任一组:

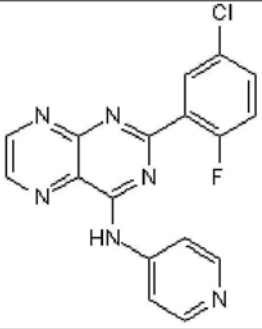
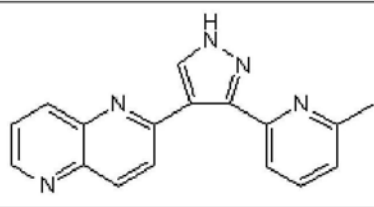
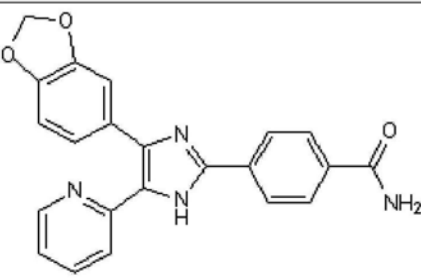
[0041] CHIR99021+616452+Forskolin,

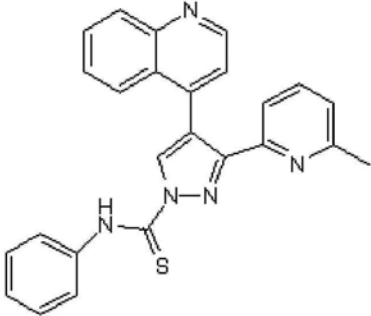
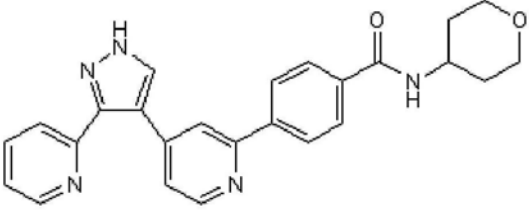
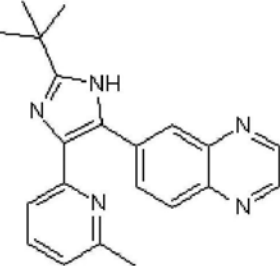
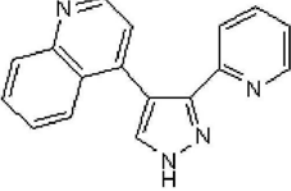
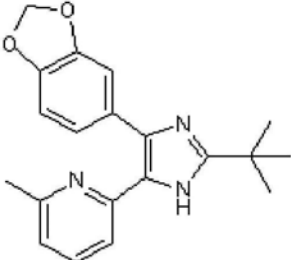
[0042] CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep,

[0043] CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA,

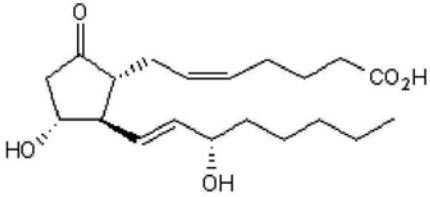
- [0044] CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+TTNPB,
[0045] CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+Tranlylcypromine,
[0046] CHIR99021+616452+Forskolin+VPA+Tranlylcypromine,
[0047] CHIR99021+616452+DZNep+VPA+Tranlylcypromine,
[0048] CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+4PB+Tanyl,
[0049] CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranlylcypromine,
[0050] CHIR99021+616452+DBcAMP+DZNep+VPA+Tranlylcypromine,
[0051] CHIR99021+616452+IBMX+DZNep+VPA+Tranlylcypromine,
[0052] CHIR99021+616452+Rolipram+DZNep+VPA+Tranlylcypromine,
[0053] CHIR99021+616452+Forskolin+NepA+VPA+Tranlylcypromine,
[0054] CHIR99021+616452+Forskolin+Adox+VPA+Tranlylcypromine,
[0055] CHIR99021+616452+Forskolin+DZA+VPA+Tranlylcypromine,
[0056] CHIR99021+616452+Forskolin+Decitabine+EPZ+VPA+
[0057] Tranlylcypromine,
[0058] CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranlylcypromine+
[0059] TTNPB,
[0060] CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranlylcypromine+
[0061] AM580,
[0062] CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranlylcypromine+
[0063] Ch55,
[0064] TD114-2+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranlylcypromine,
[0065] CHIR99021+616452+Forskolin+VPA+Tranlylcypromine+2M5+
[0066] D4476+Butyrate+UNC0638+Scriptaid,
[0067] CHIR99021+616452+Forskolin
[0068] +VPA+Tranlylcypromine+TTNPB+PGE2+5-aza-C,
[0069] CHIR99021+616452+Forskolin+VPA+Tranlylcypromine+TTNPB+
[0070] PGE2+Decitabine,或
[0071] CHIR99021+616452+Forskolin+VPA+Tranlylcypromine+Decitabine+
[0072] EPZ。
[0073] 上述化合物是本领域技术人员已知的,其中一些化合物的结构如下所示。
[0074] 例如,本发明可以使用下述TGF-beta受体抑制剂:

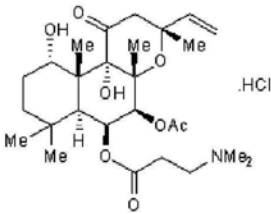
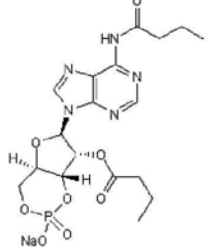
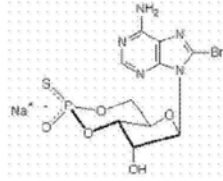
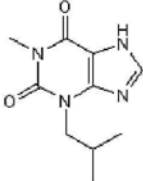
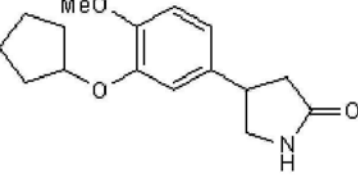
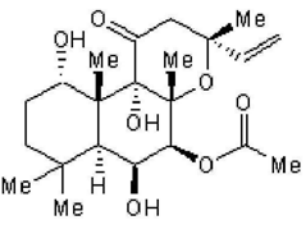
[0075]

| | |
|----------|---|
| SD208 |  <chem>Nc1cccnc1N2C=NC3=C(N2)N=CN=C3c4cc(Cl)cc(F)c4</chem> |
| Repsox |  <chem>Cc1ccncc1N2C=NC3=C(N2)N=CN=C3c4c[nH]n4</chem> |
| SB431542 |  <chem>Nc1ccc(cc1N2C=NC3=C(N2)N=CN=C3c4ccc(OCOC4)cc5cccnc5)cc2cccnc2</chem> |

| | |
|-----------------|---|
| A8301 |  |
| GW788388 |  |
| [0076] SB525334 |  |
| LY364947 |  |
| SB505124 |  |

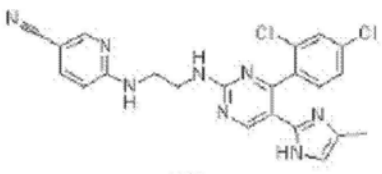
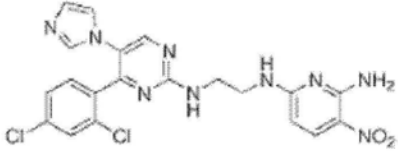
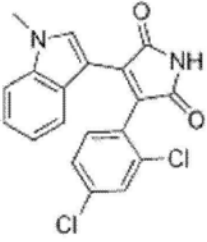
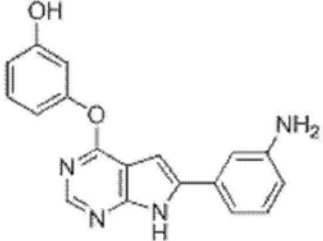
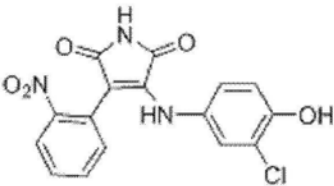
[0077] 例如,本发明可以使用下述cAMP激活剂:

| | |
|-------------------------|--|
| [0078] Prostaglandin E2 |  |
|-------------------------|--|

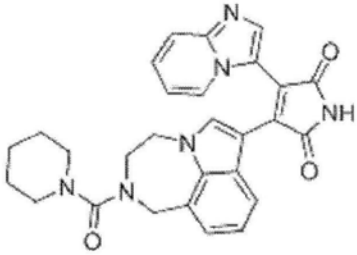
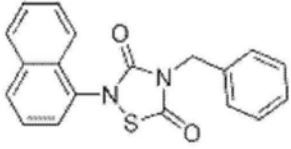
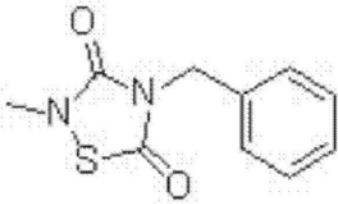
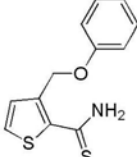
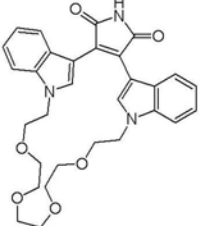
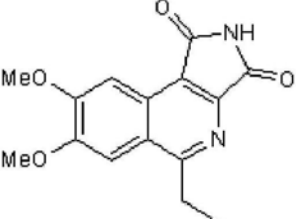
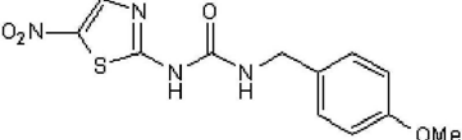
| | |
|----------------|--|
| NKH 477 |  |
| dibutyryl-cAMP |  |
| Sp-8-Br-cAMPs |  |
| [0079] IBMX |  |
| Rolipram |  |
| Forskolin |  |

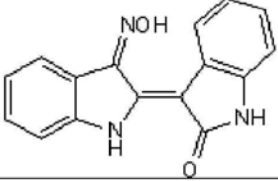
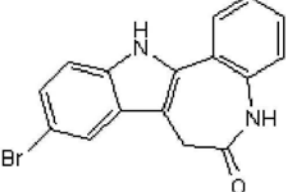
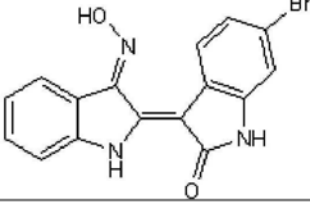
[0080] 例如,本发明可以使用下述GSK3-beta抑制剂:

[0081]

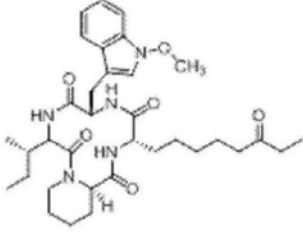
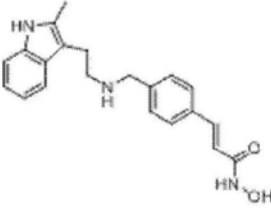
| | |
|-----------|--|
| CHIR99021 |  <p>HCl CHIR-99021 (CT99021) HCl结构式 分子量: 501.8</p> |
| CHIR98014 |  <p>CHIR-98014结构式 分子量: 486.31</p> |
| SB216763 |  <p>SB 216763结构式 分子量: 371.22</p> |
| TWS119 |  <p>TWS119结构式 分子量: 318.33</p> |
| SB415286 |  <p>SB 415286结构式 分子量: 359.72</p> |

[0082]

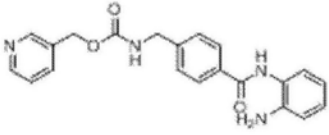
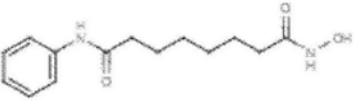
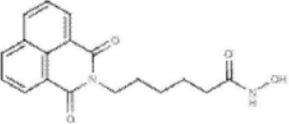
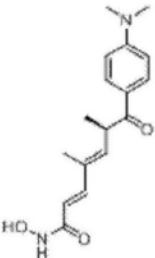
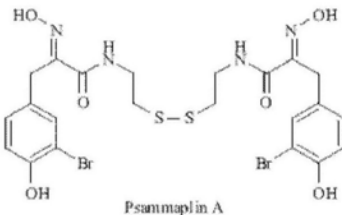
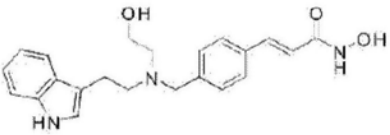
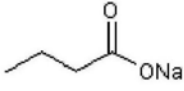
| | |
|-------------|--|
| LY2090314 |  <p>LY2090314结构式 分子量: 494.54</p> |
| Tideglusib |  <p>Tideglusib结构式 分子量: 334.39</p> |
| TDZD-8 |  <p>TDZD-8结构式 分子量: 222.26</p> |
| CBM1078 |  |
| TD114-2 |  |
| 3F8 |  |
| AR-A 014418 |  |

| | | |
|--------|--------------------|---|
| | FRATide | Ser-Gln-Pro-Glu-Thr-Arg-Thr-Gly-Asp-Asp-Asp-Pro-His-Arg-Leu-Leu-Gln-Gln-Leu-Val-Leu-Ser-Gly-Asn-Leu-Ile-Lys-Glu-Ala-Val-Arg-Arg-Leu-His-Ser-Arg-Arg-Leu-Gln |
| | Indirubin-3'-oxime |  |
| | L803 | Lys-Glu-Ala-Pro-Pro-Ala-Pro-Pro-Gln-pSer-Pro |
| [0083] | Kenpaullone |  |
| | BIO |  |

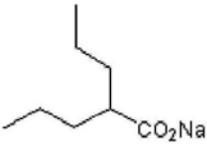
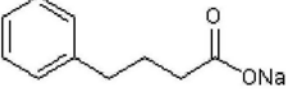
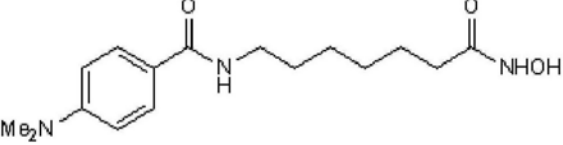
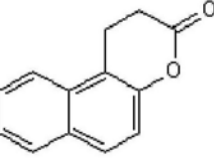
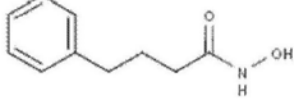
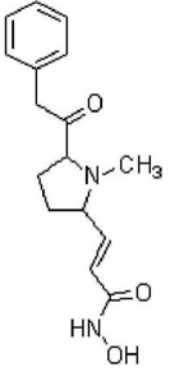
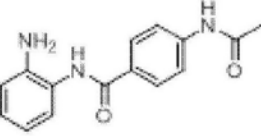
[0084] 例如,本发明可以使用下述HDAC抑制剂:

| 名称 | 结构 | 参考资料 |
|------------------------|---|---|
| [0085] Apicidin |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| LBH-589 (Panobinostat) |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| | | Chemical phylogenetics of |

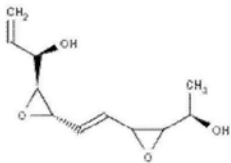
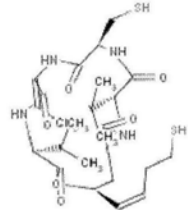
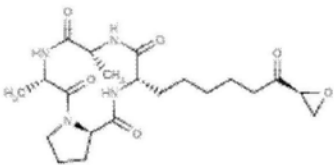
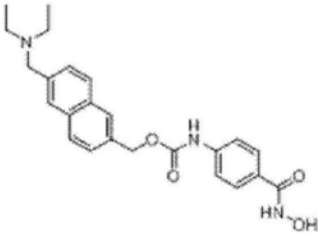
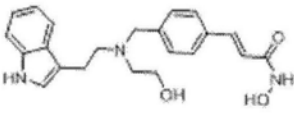
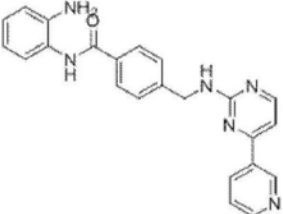
[0086]

| | | |
|---------------------------------|---|---|
| MS-275 |  | histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| SAHA (Vorinostat) |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| Scriptaid |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| Trichostatin (TSA) |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| Psammaplin A |  Psammaplin A | |
| LAQ824 (NVP-LAQ824, Dacinostat) |  | Peter Atadja, et al. Cancer Res 2004;64:689-695. |
| butyrate |  | Tocris |

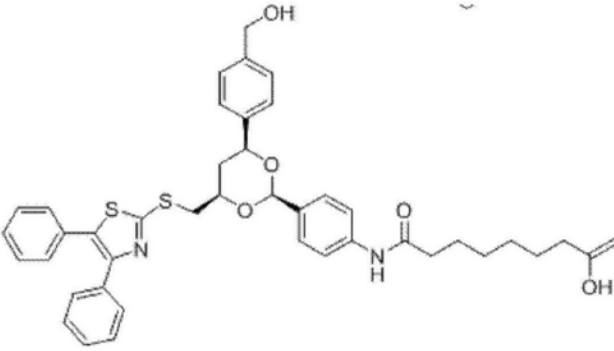
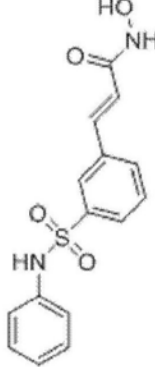
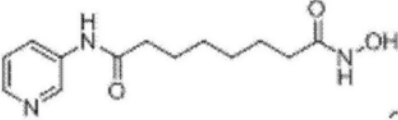
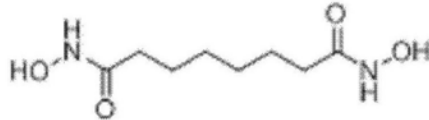
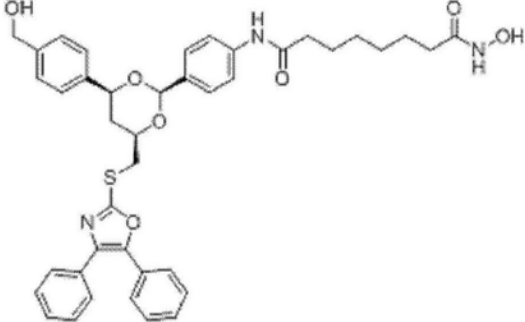
[0087]

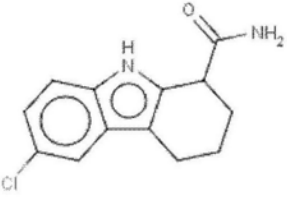
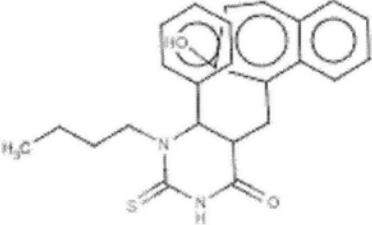
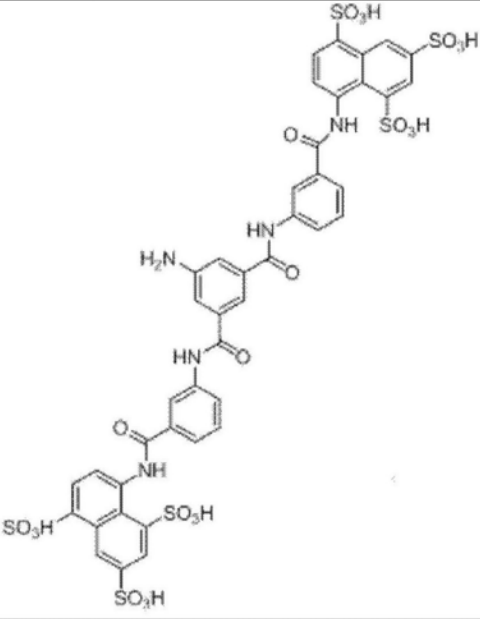
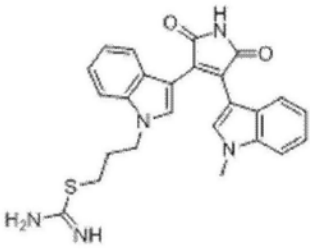
| | | |
|------------------|---|---|
| VPA |  | Tocris |
| 4-Phenylbutyrate |  | Tocris |
| M 344 |  | Tocris |
| splitomicin |  | Tocris |
| 4-PBHA |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| APHA |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| CI-994 |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |

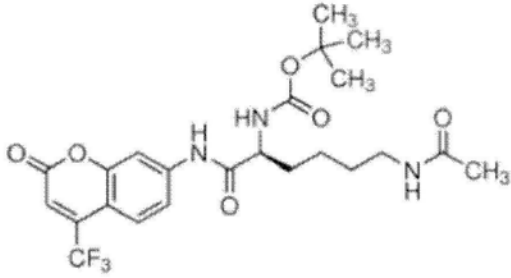
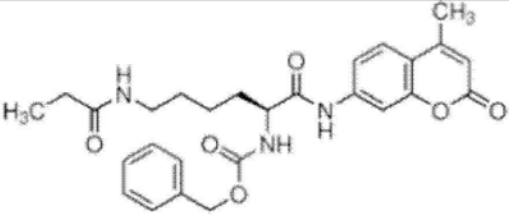
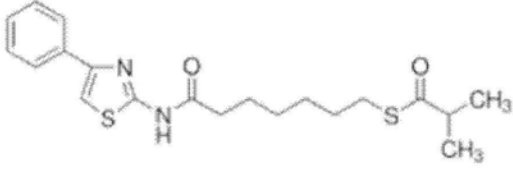
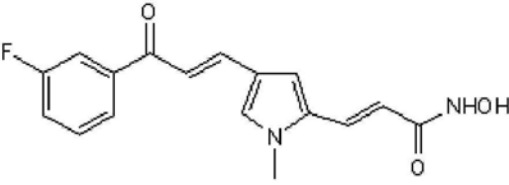
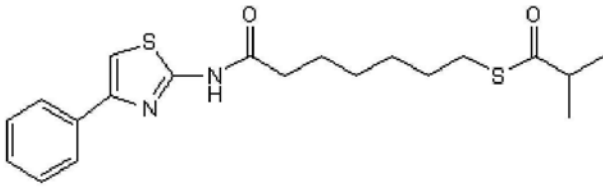
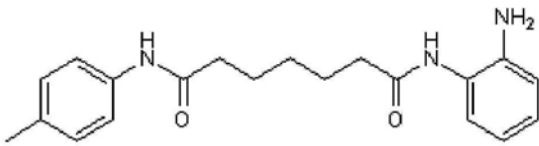
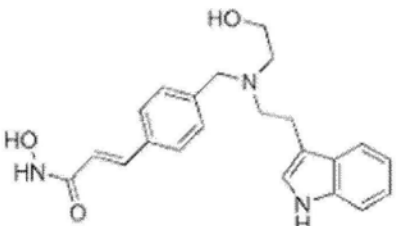
[0088]

| | | |
|--------------------------|---|---|
| Depudecin |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| FK-228 |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| HC-Toxin |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| ITF-2357 (Givinostat) |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| LACI-824 |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| MGCD-0103 |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |

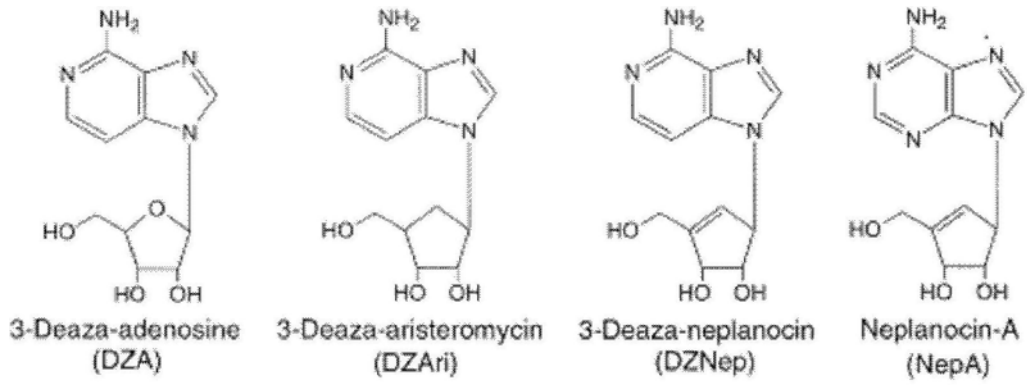
[0089]

| | | |
|----------------------|--|---|
| Niltubacin |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| PXD-101 (Belinostat) |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| Pyroxamide |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| SuberoHA |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |
| Tubacin |  | Chemical phylogenetics of histone deacetylases. Nat Chem Biol. 2010 Mar;6(3):238-243. |

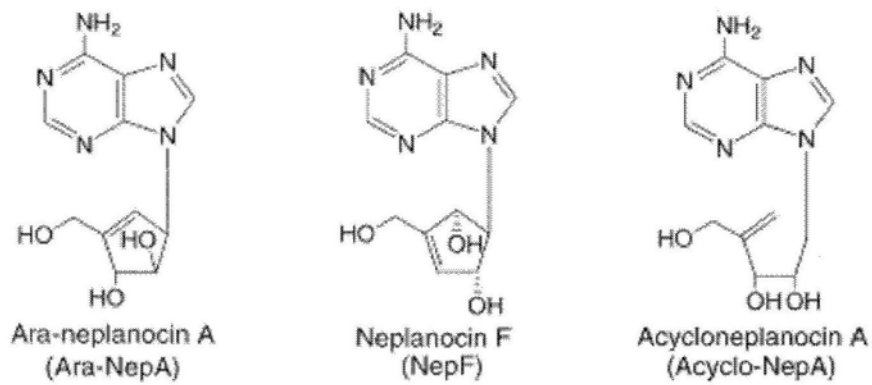
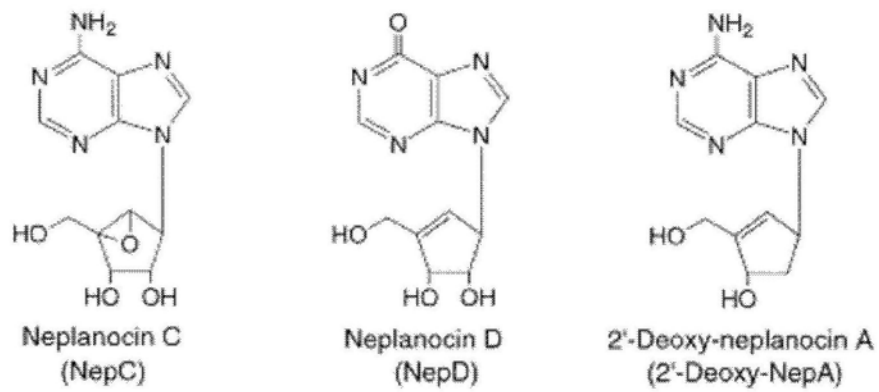
| | | |
|------------------------------|---|--|
| EX-527 |  | Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage |
| medda_cm pd_6j |  | Novel cambinol analogs as sirtuin inhibitors: synthesis, biological evaluation, and rationalization of activity |
| [0090] suramin_analog |  | Structure-activity studies on suramin analogues as inhibitors of NAD ⁺ -dependent histone deacetylases (sirtuins) |
| trapp_cmp d_12J |  | Adenosine mimetics as inhibitors of NAD ⁺ -dependent histone deacetylases, from kinase to sirtuin inhibition |

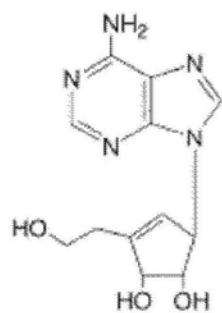
| | | |
|------------------------------|--|---------------|
| BATCP |  | Sigma-Aldrich |
| MOCPCAC |  | Sigma-Aldrich |
| [0091] PTACH |  | Sigma-Aldrich |
| MC 1568 |  | Tocris |
| NCH 51 |  | Tocris |
| TC-H 106 |  | Tocris |
| [0092] NVP-LAQ 824 (LAQ-824) |  | selleckchem |

[0093] 例如,本发明可以使用下述SAH水解酶抑制剂:

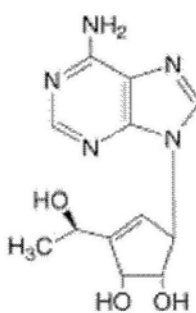
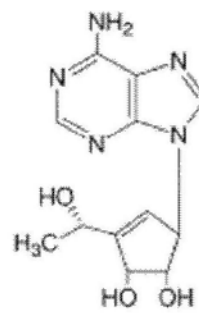
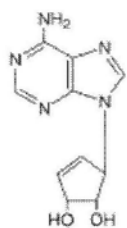
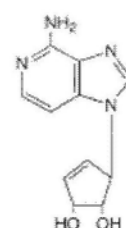


[0094]

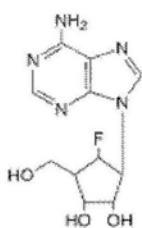




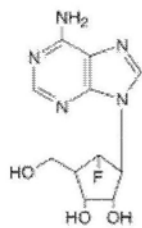
6'-Homoneplanocin A

6'-C-methylneplanocin (*R*)6'-C-methylneplanocin (*S*)9-(*Trans*-2',*trans*-3' dihydroxycyclopent-4'-enyl)-
adenine
(DHCA)9-(*Trans*-2',*trans*-3' dihydroxycyclopent-4'-enyl)-
3-deazaadenine
(DHCDA)

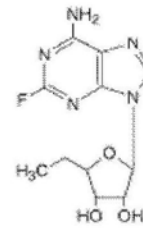
[0095]



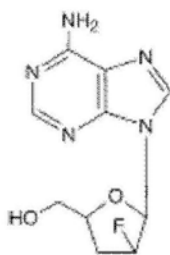
(±)-6'-β-Fluoroaristeromycin



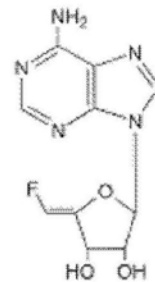
(±)-6'-α-Fluoroaristeromycin

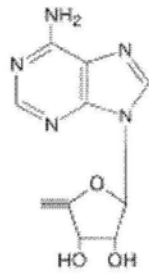


5'-Deoxy-2-fluoroadenosine

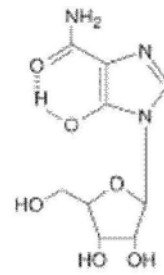


2'-β-Fluoro-2'-3'-dideoxyadenosine

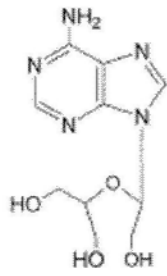
4',5'-Didehydro-5'-deoxy-5'-β-fluoroadenosine
(DDFA; MDL 28842)



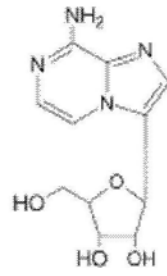
5',5',6',6'-Tetrahydro-6'-deoxyhomoadenosine



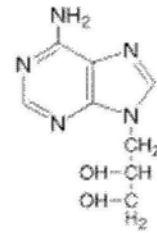
Pyrazofurin



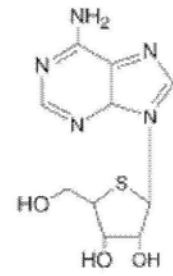
Adenosine dialdehyde
(Ado dialdehyde)



3-Deaza-isoformycin

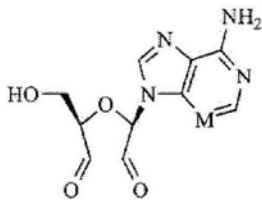


(S)DHPA

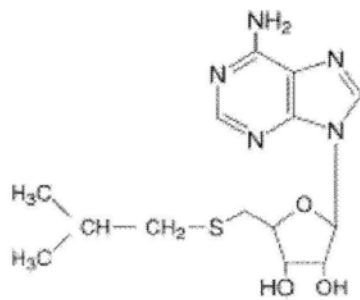


4'-Thioadenosine
(SAdo)

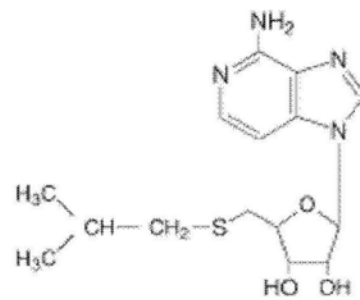
[0096]



Adox



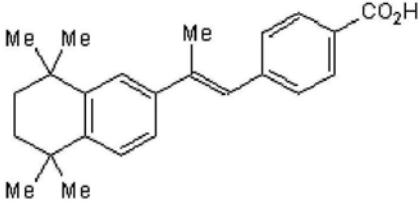
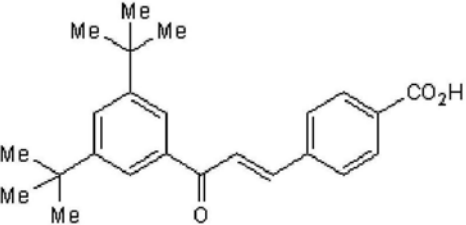
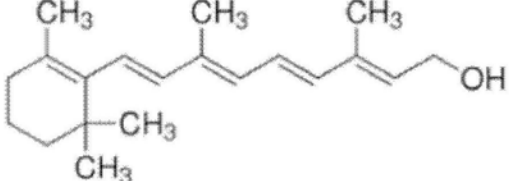
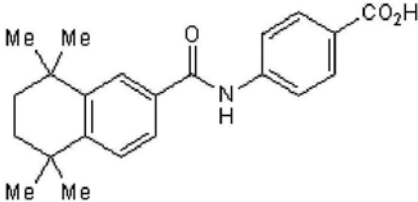
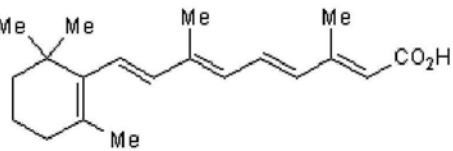
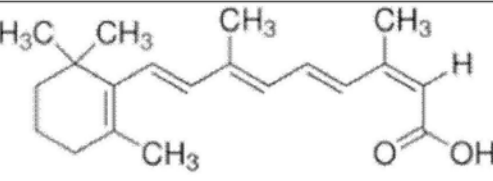
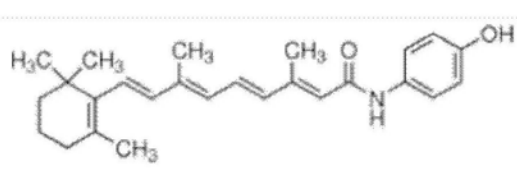
SIBA



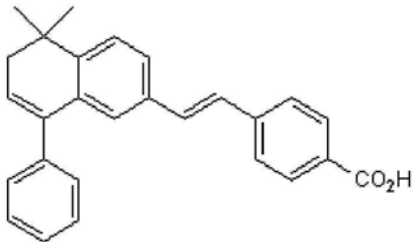
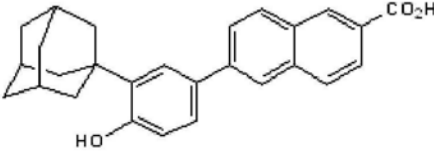
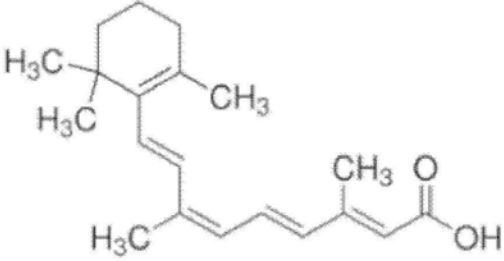
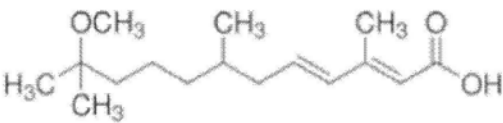
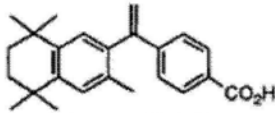
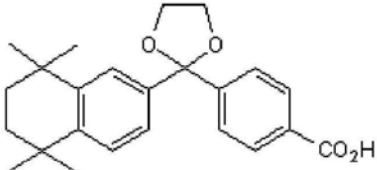
DZSIBA

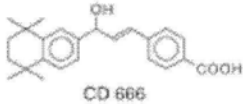
[0097] 例如,本发明可以使用下述RA受体激活剂:

[0098]

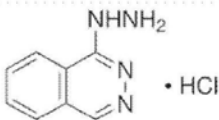
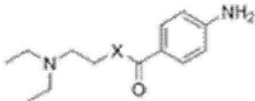
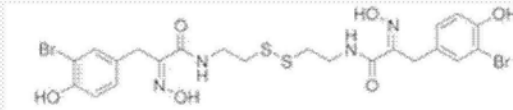
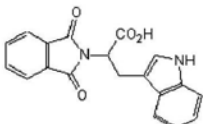
| 名称 | 结构 | 参考资料 |
|--|--|---------------|
| TTNPB |  | Tocris |
| Ch55 |  | Tocris |
| Retinol |  | Sigma-aldrich |
| AM580 |  | Tocris |
| ATRA |  | Tocris |
| 13-cis RA (13-cis-Retinoic acid) |  | Sigma-aldrich |
| 4-Hydroxy phenylretin amide (Retinoic |  | Sigma-aldrich |

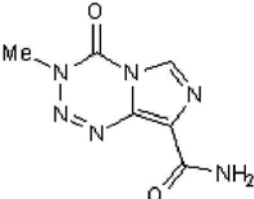
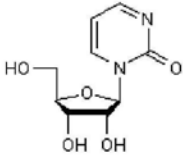
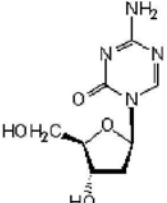
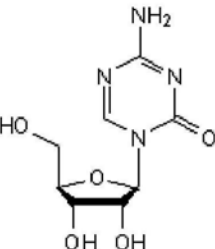
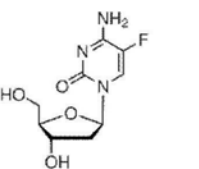
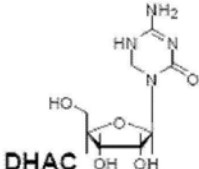
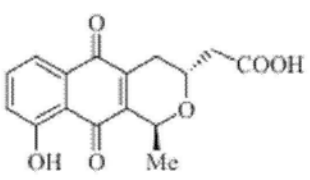
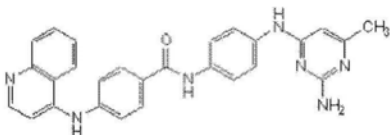
[0099]

| | | |
|---|--|---|
| acid p-hydroxy anilide) | | |
| BMS18945 3 (BMS453) |  | Tocris |
| CD437 |  | Tocris |
| 9-cis-RA (9-cis-retin oic acid) |  | Sigma-aldrich |
| Methopren e acid |  | Sigma-aldrich |
| Targretin (LGD1069, bexaroten e) |  Targretin™ LGD1069 | Cancer Res1996; 56: 5566-70 Cancer Res. 2006 Dec 15;66(24):12009-18. |
| BMS649 (SR 11237) |  | Tocris |

| | | |
|--------|--|--|
| [0100] | <p>CD666</p>  <p>CD 666</p> | <p>Mol. Pharmacol. (1997) 51, 972 - 982.</p> |
| | <p>Diazepinyl benzoic Acids</p> | <p><i>J. Med. Chem.</i>, 1997, 40 (26), pp 4222-4234</p> |

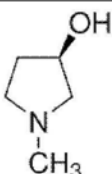
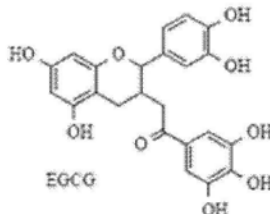
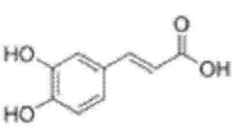
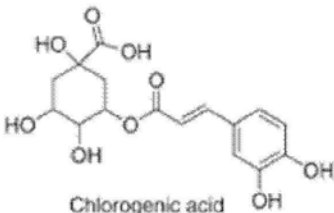
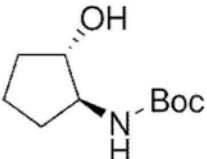
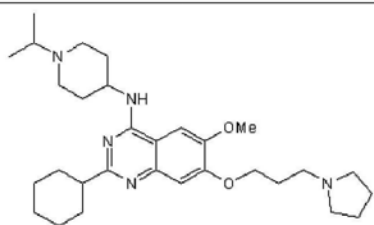
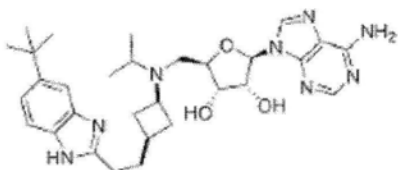
[0101] 例如,本发明可以使用下述SAM依赖的甲基化抑制剂:

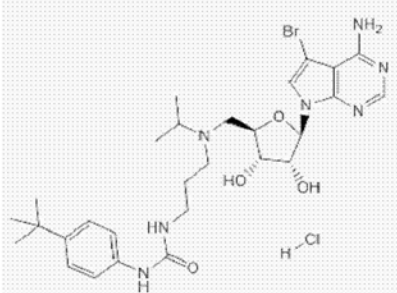
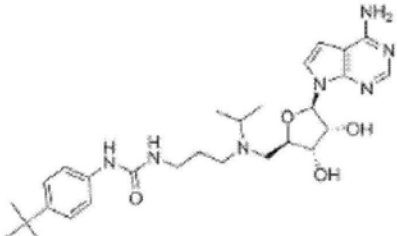
| 名称 | 结构 | 参考资料 |
|--------------------|---|------|
| [0102] Hydralazine |  <p>• HCl</p> | |
| Procainamide |  <p>Procaine (X=O) Procainamide (X=NH)</p> | |
| Psammaplin A |  | |
| RG108 |  | |

| | | |
|---------------------------------------|--|---|
| Temozolomide |  | Tocris, Sigma-aldrich |
| Zebularine |  | |
| 5-aza-2-deoxycytidine (Decitabine) |  | |
| 5-aza-C (5-Azacytidine) |  | Tocris |
| 5-Fluoro-2'-deoxycytidine |  | |
| DHAC |  | |
| Nanaomycin A |  | Tanaka, H., et al., J. of Antibiotics , 28, 12 (1975) |
| SGI-1027 |  | Millipore, calbiochem |

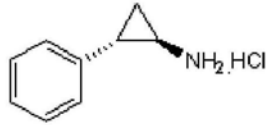
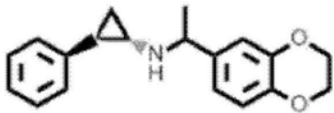
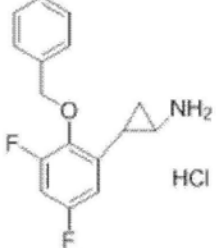
[0103]

[0104]

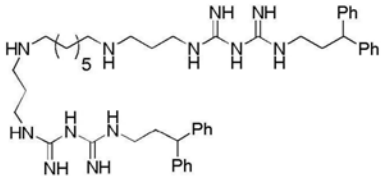
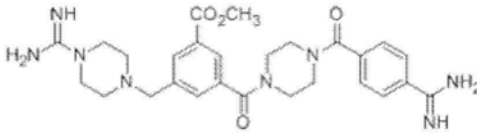
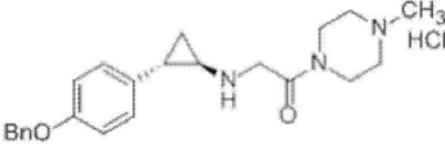
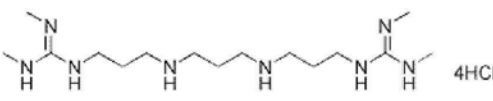
| | | |
|--|--|---------------|
| (R)-(-)-1-Methyl-3-pyrrolidinol |  | Sigma-aldrich |
| (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) |  | |
| Caffeic acid |  | |
| Chlorogenic acid |  | |
| (1S,2S)-trans-N-Boc-2-aminocyclopentanol |  | Sigma-aldrich |
| UNC0638 |  | Tocris |
| EPZ-5676 |  | Selleckchem |

| | | | |
|--------|-----------|--|-------------|
| [0106] | SGC 0946 |  | Tocris |
| | EPZ004777 |  | Selleckchem |

[0107] 例如,本发明可以使用下述组蛋白去甲基化酶抑制剂:

| 名称 | 结构 | 参考资料 |
|------------------------|---|-----------------------|
| [0108] Tranlycpro mine |  | Tocris |
| LSD1-C76 |  | XcessBio |
| S2101 |  | Millipore, Calbiochem |

[0109]

| | | |
|----------|--|---|
| LSDi-2d |  | Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 8; 104(19):8023-8. |
| CBB1007 |  | Millipore, Calbiochem |
| RN-1 |  | Millipore, Calbiochem |
| LSD1 抑制剂 |  | Millipore, Calbiochem |

[0110] 发明人令人惊讶地发现能够完全由化学小分子处理而不依赖外源转录因子获得多潜能干细胞。因此,在本发明的一些实施方案中,所述方法不包括使所述分化的细胞与选自Oct4、Sox2、Klf4和C-Myc中的一个或多个外源转录因子接触的步骤。在本发明的优选实施方案中,不使用任何外源转录因子。

[0111] 本发明中能够应用的分化的细胞不受特别限制,其中所述分化的细胞例如可以是来源于哺乳动物如小鼠的体细胞。例如,所述分化的细胞可以是成纤维细胞,皮肤细胞,脂肪细胞,肝细胞,胃细胞,角质细胞或血液细胞。优选地所述分化的细胞可以是成纤维细胞。基于现有技术的充分教导并结合本发明的示例性说明,本领域技术人员不需要过度实验即能够容易地选择所述细胞。

[0112] 本发明的方法在适合产生诱导多潜能干细胞的条件下进行,所述条件包括例如培养基、培养温度、培养时间等。基于现有技术的充分教导并结合本发明的示例性说明,本领域技术人员不需要过度实验即能够容易地确定这样的培养条件条件,关键在于例如选择抑制或激活哪些信号途径。

[0113] 本发明还一方面涉及用于诱导多潜能干细胞的组合物或试剂盒,所述组合物和试剂盒包括本发明上述定义的组合。本发明的化合物可以组合在一起用于产生诱导多潜能干细胞,所述组合可以是上述化合物中方便一起使用的任何两种或多种化合物的组合。本发明的组合物可以包括本发明中使用的化合物或其组合,以及载体、稀释剂、缓冲剂以及培养基等。所述组合的化合物可以例如以添加到培养基中一起在合适的阶段提供给分化的细胞和/或培养中的细胞,用于产生诱导多潜能干细胞。本发明涵盖了混合物,所述混合物可以包括一种或多种所述化合物、培养基以及其中培养的细胞。本发明的化合物可以以试剂盒的形式方便地提供。所述试剂盒可以包括不同的容器,分别根据例如方便不同阶段使用而存放不同的化合物和/或组合物。所述试剂盒还可以包括如何使用各组分的说明书。根据本

申请的描述,本领域技术人员能够容易地制备这样的试剂盒。在一些实施方案中,本发明的试剂盒、混合物或组合物不包括外源转录因子Oct4、Sox2、Klf4和C-Myc中的任何一个。在一些实施方案中,本发明的试剂盒、混合物或组合物不包括任何外源转录因子。

[0114] 本发明另一方面涉及通过本发明所述的方法或组合物或试剂盒制备的诱导多潜能干细胞及其用途。

[0115] 本发明另一方面涉及本发明所述的化合物组合、组合物或试剂盒用于制备多潜能干细胞的用途。

[0116] 本发明另一方面涉及cAMP激活剂和/或SAH水解酶抑制剂用于诱导细胞重编程的用途。

[0117] 在本发明的一些实施方案中,替换和/或添加更多的化合物是有利的,其可以例如提供更廉价的替代方案,提供产生诱导多潜能干细胞的效率等。

[0118] 本发明的小分子化合物组合可以包括例如含有GSK3-beta抑制剂和TGF-beta受体的抑制剂,在一个方案中,小分子化合物的配方含有HDAC抑制剂,cAMP激活剂,SAH水解酶抑制剂,H3K9甲基化抑制剂和RA受体激活剂。在一个实施例中,含有的HDAC抑制剂,cAMP激活剂,SAH水解酶抑制剂和RA受体激活剂可以是CHIR99021,616452,VPA,Forskolin,DZNep和TTNPB的组合。

[0119] 在本发明中,所述化合物可以分阶段使用,例如1) 第一阶段,可以将小分子化合物组合(除去DZNep或其它SAH水解酶抑制剂)加入含有bFGF的“重编程培养基”,并处理体细胞例如约8至20天;2) 第二阶段,用含有DZNep或其它SAH水解酶抑制剂的小分子化合物组合加入“重编程培养基”,处理第一阶段的诱导产物约8至20天;3) 第三阶段,撤去之前的诱导培养基,换用2i培养基处理第二阶段的诱导产物,约8-20天。根据现有技术的充分教导并结合本申请的示例性说明,本领域技术人员能够容易地使用本发明的方法并对所述方法进行适当调整。

[0120] 本发明得到的多潜能干细胞(小分子诱导的多潜能干细胞),表达多潜能型干细胞特异的标志基因,例如oct4,nanog,Rex1,Utf1等,和类似胚胎干细胞的表达谱。并且拥有和胚胎干细胞类似的表现遗传修饰的特征。此外小分子诱导的多潜能干细胞拥有正常的核型和基因组的完整性。在注射入小鼠皮下后,小分子诱导的多潜能干细胞能自发分化形成具有三个胚层多种组织和细胞类型的畸胎瘤。在把小分子诱导的多潜能干细胞注射入囊胚或八细胞胚胎之后,可以形成正常发育的嵌合小鼠;小分子诱导的多潜能干细胞可整合入嵌合鼠的各个组织器官,甚至分化为生殖细胞,生出二代的种系传递小鼠。通过这些结果证明,通过小分子化合物诱导出的多潜能干细胞(小分子诱导的多潜能干细胞)具备了多向分化的潜能,具备了和胚胎干细胞类似的基本特征,可用于疾病模型,药物研发和再生医疗的相关研究和应用。

附图说明

[0121] 图1小分子重编程过程示意图

[0122] 图2用CHIR99021、616452、Forskolin和DZNep处理,得到小分子诱导的多潜能干细胞。(A-E)用小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)诱导重编程。(F-J)用小鼠成体成纤维细胞(MAFs)诱导重编程。A图和F图是原代小分子诱导的多潜能干细胞克隆明场图和GFP荧光图;B图和G

图是小分子诱导的多潜能干细胞传代明场图和GFP荧光图。C图和H图是免疫组化图。D图和I图是嵌合鼠图。E图是在小鼠胚胎成纤维细胞上4次独立诱导实验的小分子诱导的多潜能干细胞数目统计。J图是基因组PCR检测pOct4-GFP在嵌合鼠各组织内的插入情况。

[0123] 图3小分子的同通路替代诱导重编程。A图是cAMP信号通路小分子DBcAMP、IBMX、Rolipram可以替代同通路的Forskolin诱导重编程。B图是SAH水解酶抑制小分子Nep A、Adox、DZA可以替代同通路的DZNep诱导重编程。C图是干扰Ahcy基因可以替代DZNep功能。D图是可以替代DZNep的条件。其中, Dot1L抑制剂 (EPZ) 和DNMT抑制剂 (Decitabine), DNMT抑制剂 (5-aza-C), G9a抑制剂 (UNC0638) 和HDAC抑制剂 (Scriptaid) 可以替代DZNep。E图是GSK3beta抑制小分子TD114-2可以替代同通路的CHIR99021诱导重编程。F图是HDAC抑制小分子4PB、Scriptaid可以替代同通路的VPA诱导重编程。

[0124] 图4小分子TTNPB可以提高重编程效率, 加快诱导周期。A图是TTNPB在VC6TFZ和C6FZ条件下促进重编程。B图是TTNPB加快重编程诱导周期。C图是RA信号通路小分子Ch55、Retinol、AM580可以替代同通路的TTNPB诱导重编程。(D-H) 鉴定VC6TFZ+TTNPB诱导得到的小分子诱导的多潜能干细胞。D图是免疫组化图。E图是RT-PCR。F图是嵌合鼠。G图是传递二代鼠。H图是基因组PCR检测外源基因插入。

[0125] 图5小分子诱导的多潜能干细胞集落的形态图。A图是小鼠胚胎成纤维细胞诱导的小分子诱导的多潜能干细胞集落的原代和传代形态图。B图是新生小鼠成纤维细胞诱导的小分子诱导的多潜能干细胞集落的原代和传代形态图。C图是成体小鼠成纤维细胞诱导的小分子诱导的多潜能干细胞集落的原代和传代形态图。D图是脂肪组织来源的干细胞 (ADSCs) 诱导的小分子诱导的多潜能干细胞集落的原代和传代形态图。E图是野生型小鼠胚胎成纤维细胞 (WT MEFs) 诱导的小分子诱导的多潜能干细胞集落的原代和传代形态图。

[0126] 图6小分子诱导的多潜能干细胞的生长曲线和小鼠胚胎干细胞 (ESCs) 相似。

[0127] 图7小分子诱导的多潜能干细胞的免疫组化鉴定图。A图是小鼠胚胎成纤维细胞诱导的小分子诱导的多潜能干细胞的免疫组化图。B图是新生小鼠成纤维细胞诱导的小分子诱导的多潜能干细胞的免疫组化图。C图是成体小鼠成纤维细胞诱导的小分子诱导的多潜能干细胞的免疫组化图。D图是脂肪组织来源的干细胞 (ADSCs) 诱导的小分子诱导的多潜能干细胞的免疫组化图。E图是野生型小鼠胚胎成纤维细胞 (WT MEFs) 诱导的小分子诱导的多潜能干细胞的免疫组化图。

[0128] 图8小分子诱导的多潜能干细胞的内源干性基因RT-PCR鉴定。

[0129] 图9小分子诱导的多潜能干细胞芯片分析鉴定。

[0130] 图10小分子诱导的多潜能干细胞表观遗传学鉴定。A图是Nanog和Oct4启动子区域DNA甲基化检测。B图是Oct4、Sox2和Nanog启动子区域组蛋白甲基化或乙酰化修饰检测。

[0131] 图11小分子诱导的多潜能干细胞畸胎瘤三胚层分化检测。A图克隆CiPS-30的畸胎瘤, 从左至右分别是呼吸上皮 (内胚层)、肌肉 (中胚层)、神经上皮和色素上皮 (外胚层)。B图是克隆CiPS-140的畸胎瘤, 从左至右分别是呼吸上皮 (内胚层)、胰腺外分泌 (内胚层)、脂肪组织 (中胚层)、神经上皮 (外胚层)。C图是克隆CiPS-340的畸胎瘤, 从左至右分别是肠样上皮 (内胚层)、呼吸上皮 (内胚层)、肌肉 (中胚层) 和表皮 (外胚层)。D图是克隆ADSC-CiPS-10的畸胎瘤, 从左至右分别是呼吸上皮 (内胚层)、软骨 (中胚层)、肌肉 (中胚层) 和表皮 (外胚层)。

[0132] 图12A图是CiPS-34得到的嵌合鼠。B图是CiPS-45的得到的嵌合鼠胚胎的生殖脊嵌合检测。C图是CiPS-34得到的嵌合鼠的二代鼠。D图是基因组PCR检测pOct4-GFP在嵌合鼠各组织内的插入情况。E图是 MNF-CiPS-1得到的嵌合鼠。F图是MNF-CiPS-1得到的嵌合鼠。G图是MAF-CiPS-62得到的二代鼠。H图是MAF-CiPS-63得到的二代鼠。I图是CiPS-WT1得到的嵌合鼠。J图是CiPS-WT2得到的嵌合鼠。K图和L图是基因组PCR检测外源基因和pOct4-GFP在嵌合鼠各组织内的插入情况。M图是小分子重编程得到的细胞系获得的小鼠存活情况,和病毒因子(有外源Myc)得到的细胞系获得的小鼠存活情况。N和O, 8-细胞注射和囊胚注射总结表。

[0133] 图13检测小分子诱导的多潜能干细胞外源基因插入情况。A图和B图是基因组PCR检测外源基因插入。C图是Southern Blot检测外源基因插入。探针设计在病毒载体元件Psi上。

[0134] 图14小分子诱导的多潜能干细胞基因组情况。A图是克隆C-IPS-30的核型。B图是小分子诱导的多潜能干细胞染色体数目分布图。C图是克隆CGH分析(Comparative genomic hybridization)。

[0135] 图15小分子在其他重编程体系上的作用。A图是Forskolin在SKM(Sox2、Klf4、c-Myc)体系上可以替代Oct4的作用,得到iPSCs。B图是Forskolin和DZNep在单O(Oct4)体系上,可以提高重编程效率。

[0136] 图16DZNep在表观遗传学水平上调控Oct4启动子区域。A图是DZNep下调Oct4启动子区域甲基化水平。B图是DZNep下调Oct4启动子区域组蛋白H3K9二甲基化水平。

具体实施方式

[0137] 以下通过实施例进一步举例说明本发明。本领域的普通技术人员可以理解本发明并不限于所述实施例,并且本领域的普通技术人员可以基于说明书的教导对实施例进行修改。这些修改同样包含在本发明由后附的权利要求所定义的本发明的范围内。

[0138] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0139] 1. 小鼠品系

[0140] 转基因鼠品系:TgN(GOFGFP)11Imeg(OG)购自RIKEN BioResource Center。其他小鼠品系ICR,129S2/SvPasCr1Vr(129) and C57BL/6NCr1Vr(C57)均购自维通利华。

[0141] 2. 细胞培养

[0142] 原代小鼠胚胎成纤维细胞(MEF,分离方法见K.Takahashi,S.Yamanaka,2006),新生鼠成纤维细胞(MNF,分离方法见U.Lichti,J et al.,2008),成体鼠成纤维细胞(MAF,分离方法见A.Seluanov et al.,2010;J.L.McQualter et al.,2009)以及成体鼠脂肪干细胞(ADSC,分离方法见P.A.Tat et al.,2010)均来自ICR,C57×129,ICR×OG,129×OG and C57×OG转基因小鼠。使用的新生鼠是出生后2-3天,成体鼠是7周大小。小鼠胚胎成纤维细胞,新生小鼠成纤维细胞,成体小鼠成纤维细胞,小鼠脂肪干细胞细胞培养基为含10%胎牛血清(FBS,Invitrogen)的Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM/High Glucose, Hyclone)培养基。小鼠胚胎干细胞系(R1和TT2),iPS和小分子诱导的多潜能干细胞细胞培养基为:80%KnockOut DMEM(Invitrogen),10% Knockout serum replacement(KSR)(Invitrogen),10%FB S,2mM L-glutamine,1%non-essential amino acids,0.1mM

beta-mercaptoethanol, 1% penicillin-streptomycin (均购自Invitrogen) 以及1000U/mL Lif (Millipore); 或者2i培养基 (加入2i (3 μ M CHIR99021 and 1 μ M PD0325901) 的普通ESC培养基)。小鼠胚胎干细胞系R1和小分子诱导的多潜能干细胞培养在丝裂霉素C处理后的小鼠胚胎成纤维细胞饲养层细胞上, 培养基每天换液。ESC, iPS and 小分子诱导的多潜能干细胞细胞均使用trypsin-EDTA (Invitrogen) 传代。

[0143] 3. 小分子诱导的多潜能干细胞诱导

[0144] 小鼠胚胎成纤维细胞, 新生小鼠成纤维细胞, 成体小鼠成纤维细胞及小鼠脂肪干细胞 (初始细胞) 接种密度为50,000细胞每6孔板孔或300,000细胞每100mm培养皿。接种后第二天 (day0), 换液为含有小分子组合的小分子诱导的多潜能干细胞诱导培养基开始进行诱导。小分子诱导的多潜能干细胞诱导培养基为: 80% KnockOut DMEM (Invitrogen), 10% Knockout serum replacement (KSR) (Invitrogen), 10% FBS, 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 0.1mM beta-mercaptoethanol, 1% penicillin-streptomycin 以及 20-100ng/ml bFGF (Origene); 诱导重编程的小分子组合: VPA (0.5mM, Sigma), CHIR99021 (10-20 μ M, WUXI APPTEC), 616452 (5-10 μ M, WUXI APPTEC), Forskolin (10-50 μ M, Enzo) 和 Tranylcyromine (5-10 μ M, Enzo)。诱导培养基每4天换液一次。第12天 (day12), 将细胞用PBS洗并随后在37 $^{\circ}$ C, 0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen) 条件下消化3-5分钟。细胞中和计数后 (收率约为300,000-1,000,000细胞每6孔板孔) 重新接种, 接种密度为300,000-500,000细胞每6孔板孔, 培养基为含有小分子组合的小分子诱导的多潜能干细胞诱导培养基。DZNep在第16或20天加入。在第28-36天, 换为2i培养基。再8-12天后, ES细胞样, GFP阳性并能在2i条件下培养的克隆计数为原代小分子诱导的多潜能干细胞克隆 (图1, 图5)。对于没有OG报告体系的野生型小鼠胚胎成纤维细胞, ES细胞样并能在2i条件下培养的克隆计数为原代小分子诱导的多潜能干细胞克隆。这些原代小分子诱导的多潜能干细胞克隆将被挑出传代并进行进一步鉴定。同时, 小分子诱导的多潜能干细胞也能在经过第12天消化重新接种的条件下得到。

[0145] 4. 碱性磷酸酶和组化染色, RT-PCR和基因组PCR检测, 体外分化和畸胎瘤形成, 核型分析

[0146] 碱性磷酸酶和组化染色 (图7), RT-PCR (图8) 和基因组PCR检测 (图13A, B), 体外分化和畸胎瘤形成 (图11) 具体方法详见 (Li et al., 2010)。组化染色所用抗体为: 一抗: SSEA-1 (1:200, Millipore), OCT4 (1:200, Abcam), SOX2 (1:200, Santa Cruz), REX1 (1:200, Santa Cruz), NANOG (1:40, R&D), UTF1 (1:200, Abcam), KLF4 (1:200, Santa Cruz), SALL4 (1:200, Santa Cruz); 二抗: Rhodamine-labeled donkey anti-mouse IgG (H+L) (1:100, Jackson ImmunoResearch), Rhodamine-labeled donkey anti-rabbit IgG (H+L) (1:100, Jackson ImmunoResearch), Rhodamine-labeled donkey anti-goat IgG (H+L) (1:100, Jackson ImmunoResearch)。DAPI用于染细胞核。RT-PCR检测引物序列详见 (Li et al., 2010)。基因组PCR检测引物序列见表1。核型分析具体实施方式详见 (L. Longo et al. 1997) (图14A, B)。

[0147] 表1. 小分子诱导的多潜能干细胞的基因组PCR检测引物序列

[0148]

| | | |
|--------------------------|----------------------------|-------------|
| pLL-Oct4-Tg-S | GAA GGA TGT GGT CCG AGT | SEQ ID NO:1 |
| pLL-Oct4-Tg-A (pLL-Tg-A) | GCA GCG TAT CCA CAT AGC GT | SEQ ID NO:2 |

| | | |
|--------------------------|----------------------------|--------------|
| pLL-Sox2-Tg-S | CAT GGG TTC GGT GGT CAA | SEQ ID NO:3 |
| pLL-Sox2-Tg-A (pLL-Tg-A) | GCA GCG TAT CCA CAT AGC GT | SEQ ID NO:4 |
| pLL-cMyc-Tg-S | TAC ATC CTG TCC GTC CAA GC | SEQ ID NO:5 |
| pLL-cMyc-Tg-A (pLL-Tg-A) | GCA GCG TAT CCA CAT AGC GT | SEQ ID NO:6 |
| pLL-Klf4-Tg-S | ACC ACT GTGACT GGGACG | SEQ ID NO:7 |
| pLL-Klf4-Tg-A (pLL-Tg-A) | GCA GCG TAT CCA CAT AGC GT | SEQ ID NO:8 |
| Fu-tet-hOct4-Tg-S | ACCTCCATAGAAGACACCG | SEQ ID NO:9 |
| Fu-tet-hOct4-Tg-A | TAGCCCCACTCCAACCTG | SEQ ID NO:10 |
| Fu-tet-hSox2-Tg-S | ACCTCCATAGAAGACACCG | SEQ ID NO:11 |
| Fu-tet-hSox2-Tg-A | CTCCGACAAAAGTTTCCACTCG | SEQ ID NO:12 |
| Fu-tet-hKlf4-Tg-S | ACCTCCATAGAAGACACCG | SEQ ID NO:13 |
| Fu-tet-hKlf4-Tg-A | GAAGAGGAGGCTGACGCT | SEQ ID NO:14 |
| Fu-tet-hcMyc-Tg-S | ACCTCCATAGAAGACACCG | SEQ ID NO:15 |
| Fu-tet-hcMyc-Tg-A | GGGTCCGAGATGAAACTC | SEQ ID NO:16 |

[0149] 5.Real-time PCR检测

[0150] 整孔细胞总RNA的提取使用RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)。单克隆细胞RNA的提取使用RNeasy Micro Kit (QIAGEN)。RNA反转录为cDNA使用TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen Biotech)。PCR在ABI Prism 7300 Sequence Detection System上用Power SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 体系完成。数据分析采用delta-delta Ct法(图10B)。

[0151] 6.嵌合鼠实验和嵌合鼠各组织器官的基因组PCR检测

[0152] 7-10个小分子诱导的多潜能干细胞显微注射到小鼠8细胞胚胎中(交配后2.5天(2.5dpc)雌鼠中分离得到)或者10-15个小分子诱导的多潜能干细胞显微注射到小鼠囊胚中(3.5dpc雌鼠中分离得到),培养一天后,囊胚或8细胞胚胎分别移植到2.5dpc或0.5dpc CD-1假孕雌鼠体内(每个输卵管或子宫角内6-8个胚胎)并在体内发育形成嵌合鼠。嵌合鼠通过毛色鉴定,并进一步通过与ICR鼠配种以实现种系传递来评估。EasyPure Genomic DNA Extraction Kit (Transgen)提取嵌合鼠不同组织的基因组DNA。PCR检测体系为30sec94℃, 30sec63℃, 30sec72℃共33个循环(图12)。引物序列为0G-S:AACCACTACCTGAGCACCC (SEQ ID NO:17)和0G-A:ACCTCTACAAATGTGGTATG (SEQ ID NO:18)。

[0153] 7.DNA芯片分析(DNA microarray)

[0154] 从鼠的成纤维细胞,小分子诱导的多潜能干细胞和ES细胞提取得到总mRNA。DNA芯片分析具体方法详见(Li et al.,2010)。RNA序列数据库用Illumina mRNA-seq Prep Kit (Illumina)构建。芯片分析中每一个样品的中值采用分级群聚。热图(Heatmaps)用R (Bioconductor)软件生成(图9)。

[0155] 8.DNA甲基化分析

[0156] 用MethylCode™Bisufite Conversion Kit (Invitrogen)完成全基因组DNA亚硫酸钠转化。引物序列见表5。PCR扩增片段克隆进pEASY-blunt载体(Transgene)。每个样品随机挑取10个克隆进行测序分析(图10A)。

[0157] 表2.DNA甲基化分析引物序列

| | | | |
|--------|---------|--------------------------------|--------------|
| [0158] | Oct4-S | GGAGTGGTTTTAGAAATAATTG | SEQ ID NO:19 |
| | Oct4-A | TCCAACCCTACTAACCCTATCACC | SEQ ID NO:20 |
| | Nanog-S | GATTTTGTAGGTGGGATTAATTGTGAATTT | SEQ ID NO:21 |
| | Nanog-A | ACCAAAAAACCCACACTCATATCAATATA | SEQ ID NO:22 |

[0159] 9. 比较基因组杂交 (Comparative genomic hybridization, CGH) 分析

[0160] 全基因组DNA提取后杂交到NimbleGen3x720K mouse whole-genome tiling arrays, 使用C57BL/6小鼠的胚胎成纤维细胞DNA作为参考 (Gene BioDesign) (图14B)。

[0161] 10. 流式细胞分析

[0162] 将培养的细胞用胰酶消化成单细胞, 并在含3%FBS的PBS中重悬。FACS分析仪器为FACSCalibur instrument (BD Biosciences), 主要通过内源表达的Oct4-GFP来实现分选。数据用FCS Express4 (De Novo) 进行分析。

[0163] 11. 染色质免疫沉淀 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)

[0164] ChIP实验按照相关操作手册用EZ-Magna ChIP A/G Kit (Millipore) 实施。所用抗体: Anti-H3K27me3 (Abcam, ab6002), anti-H3K9me2 (Millipore, 07-441), anti-H3K4me3 (Abcam, ab8580) and anti-H3K9ac (Abcam, ab4441)。在免疫沉淀反应后, DNA用qRT-PCR进行分析 (图10B)。引物序列见下表3。

[0165] 表3. CHIP实验所用引物序列

| | | | |
|--------|---------|----------------------------|--------------|
| [0166] | Oct4-S | CTGTAAGGACAGGCCGAGAG | SEQ ID NO:23 |
| | Oct4-A | CAGGAGGCCTTCATTTTCAA | SEQ ID NO:24 |
| | Nanog-S | CTATCGCCTTGAGCCGTTG | SEQ ID NO:25 |
| | Nanog-A | AACTCAGTGTCTAGAAGGAAAGATCA | SEQ ID NO:26 |
| | Sox2-S | TTTATTCAGTCCCAGTCCAA | SEQ ID NO:27 |
| | Sox2-A | TTATTCCTATGTGTGAGCAAGA | SEQ ID NO:28 |

[0167] 12. DNA印迹 (Southern blot)

[0168] Southern blot用DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, 11585614910) 实施。将从小分子诱导的多潜能干细胞或者小鼠胚胎成纤维细胞提取的20 μ g基因组DNA用EcoRI和XbaI内切酶消化。DNA探针基于慢病毒psi序列设计。此序列在pLL3.7- Δ U6载体及Fu-tet载体上都存在, 因此可在病毒感染后与外源基因共同插入到靶细胞基因组中 (图13C)。

[0169] 上述实验的小分子诱导的多潜能干细胞的诱导条件和小分子重编程条件获得各iPS细胞株的鉴定的总结见下表1和表2。

[0170] 表1可实现小分子重编程条件

[0171]

| 可以实现小分子重编程的条件 | 起始细胞数 | 最终诱导iPS克隆数 |
|---|---------|------------|
| CHIR99021+616452+Forskolin | 100,000 | 1 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep | 50,000 | 3 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA | 40,000 | 8 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+TTNPB | 28,000 | 42 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+Tranylcypromine | 90,000 | 1 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+VPA+Tranylcypromine | 50,000 | 1 |
| CHIR99021+616452+DZNep+VPA+Tranylcypromine | 300,000 | 1 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+4PB+Tranylcypromine | 20,000 | 2 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranylcypromine | 40,000 | 12 |
| CHIR99021+616452+DBcAMP+DZNep+VPA+Tranylcypromine | 40,000 | 1 |
| CHIR99021+616452+IBMX+DZNep+VPA+Tranylcypromine | 40,000 | 1 |
| CHIR99021+616452+Rolipram+DZNep+VPA+Tranylcypromine | 40,000 | 1 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+NepA+VPA+Tranylcypromine | 50,000 | 32 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+Adox+VPA+Tranylcypromine | 50,000 | 28 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+DZA+VPA+Tranylcypromine | 50,000 | 10 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+Decitabine+EPZ+VPA+Tranylcypromine | 30,000 | 14 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranylcypromine+TTNPB | 40,000 | 20 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranylcypromine+AM580 | 40,000 | 25 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranylcypromine+Ch55 | 40,000 | 19 |
| TD114-2+616452+Forskolin+DZNep+VPA+Tranylcypromine | 40,000 | 40 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+VPA+Tranylcypromine+2M5+D4476+Butyrate+UNC0638+Scriptaid | 300,000 | 6 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+VPA+Tranylcypromine+TTNPB+PGE2+5-aza-C | 250,000 | 5 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+VPA+Tranylcypromine+TTNPB+PGE2+Decitabine | 250,000 | 8 |
| CHIR99021+616452+Forskolin+VPA+Tranylcypromine+Decitabine+EPZ | 30,000 | 14 |

[0172]

表 2 小分子重编程条件获得各 iPS 细胞株的鉴定

| 克隆编号 | 起始细胞类型 | 小鼠品系 | 可以实现小分子重编程的条件 | 胚胎干细胞样形态并且 OG 阳性 | 基因组鉴定 | 碱性磷酸酶染色 | RT-PCR | 免疫荧光染色 | 芯片分析 | 畸胎瘤 | 核型 | DNA 甲基化 | 嵌合鼠 | 种系传递 |
|---------|-----------|----------------|------------------|------------------|-------|---------|--------|--------|------|-----|----|---------|-----|------|
| CiPS-6 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | VC6TFMB+Z | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | - | √ | No |
| CiPS-11 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | VC6TFMB+Z | √ | √ | √ | √ | √ | √ | - | - | √ | - | - |
| CiPS-21 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | VC6TFDBS+Z | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| CiPS-25 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | VC6TFMDBSPR+Z | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | - |
| CiPS-30 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | VC6TFMDBSPR+Z | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | - | - |
| CiPS-34 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | VC6TFMP+Z | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| CiPS-36 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | VC6TFMDB+Z | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | No |
| CiPS-39 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | VC6TFMDB+Z | √ | √ | √ | √ | √ | - | - | √ | - | √ | - |
| CiPS-42 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | FC6+Z | √ | √ | √ | √ | √ | - | √ | - | - | - | - |
| CiPS-43 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | FC6+Z | √ | √ | √ | √ | √ | - | √ | - | - | - | - |
| CiPS-44 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | FC6+Z | √ | √ | √ | √ | √ | - | - | - | - | √ | - |
| CiPS-45 | 小鼠胚胎成纤维细胞 | OG (C57) x ICR | FC6+Z (w/o bFGF) | √ | √ | √ | √ | √ | √ | - | √ | √ | √ | - |

[0176]

V, VPA; C, CHIR99021; 6, 616452; T, tranylcypromine; F, Forskolin; Z, DZNeP; P, PGE2; R, RG108; S, SRT1720; M, 2-Me-5HT; D, D4476; B, Sodium Butyrate; N, TTNPB; w/o, without

√是完成相应鉴定; no 是作了相应实验, 尚未得到结果; -是没有进行实验。

[0177] 结论:使用小分子化合物的组合对体细胞进行处理,可以将其诱导成为具有多潜能性的干细胞(CiPS细胞),该多潜能性干细胞可应用于疾病模型,药物研发和再生医疗。

[0178] 参考文献:

[0179] 1.K.Takahashi,S.Yamanaka,Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.Cell 126,663 (2006) .

[0180] 2.U.Lichti,J.Anders,S.H.Yuspa,Isolation and short-term culture of primary keratinocytes,hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice.Nat.Protoc.3,799 (2008) .

[0181] 3.A.Seluanov,A.Vaidya,V.Gorbunova,Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents.J.Vis.Exp.e2033 (2010) .

[0182] 4.J.L.McQualter et al.,Endogenous fibroblastic progenitor cells in the adult mouse lung are highly enriched in the sca-1 positive cell fraction.Stem Cells 27,623 (2009) .

[0183] 5.P.A.Tat,H.Sumer,K.L.Jones,K.Upton,P.J.Verma,The efficient generation of induced pluripotent stem(iPS) cells from adult mouse adipose tissue-derived and neural stem cells.Cell Transplant.19,525 (2010) .

[0184] 6.Y.Li et al.,Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene,Oct4,and small molecules.Cell Res.21,196 (2011) .

[0185] 7.L.Longo,A.Bygrave,F.G.Grosveld,P.P.Pandolfi,The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism.Transgenic Res.6,321 (1997) .

序列表

IB131204序列表

| | | |
|--------|---------------------------------------|----|
| | <110> 北京大学 | |
| | <120> 一种通过小分子化合物处理来制备多潜能干细胞的方法、试剂盒和用途 | |
| | <130> IB131204 | |
| | <160> 28 | |
| | <170> PatentIn version 3.3 | |
| | <210> 1 | |
| | <211> 18 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 1 | |
| | gaaggatgtg gtccgagt | 18 |
| | <210> 2 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 2 | |
| | gcagcgtatc cacatagcgt | 20 |
| | <210> 3 | |
| | <211> 18 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 3 | |
| [0001] | catgggttcg gtggtcaa | 18 |
| | <210> 4 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 4 | |
| | gcagcgtatc cacatagcgt | 20 |
| | <210> 5 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 5 | |
| | tacatcctgt cegtccaagc | 20 |
| | <210> 6 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 6 | |
| | gcagcgtatc cacatagcgt | 20 |
| | <210> 7 | |
| | <211> 18 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 7 | |
| | accactgtga ctgggacg | 18 |
| | <210> 8 | |

| | | | |
|--------|-------------------------|----|--|
| | <211> 20 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> 人工序列 | | |
| | <400> 8 | | |
| | gcagcgtatc cacatagcgt | 20 | |
| | <210> 9 | | |
| | <211> 19 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> 人工序列 | | |
| | <400> 9 | | |
| | acctccatag aagacaccg | 19 | |
| | <210> 10 | | |
| | <211> 18 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> 人工序列 | | |
| | <400> 10 | | |
| | tagccccact ccaacctg | 18 | |
| | <210> 11 | | |
| | <211> 19 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> 人工序列 | | |
| | <400> 11 | | |
| | acctccatag aagacaccg | 19 | |
| [0002] | <210> 12 | | |
| | <211> 22 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> 人工序列 | | |
| | <400> 12 | | |
| | ctccgacaaa agtttcact cg | 22 | |
| | <210> 13 | | |
| | <211> 19 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> 人工序列 | | |
| | <400> 13 | | |
| | acctccatag aagacaccg | 19 | |
| | <210> 14 | | |
| | <211> 18 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> 人工序列 | | |
| | <400> 14 | | |
| | gaagaggagg ctgacgct | 18 | |
| | <210> 15 | | |
| | <211> 19 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> 人工序列 | | |
| | <400> 15 | | |
| | acctccatag aagacaccg | 19 | |
| | <210> 16 | | |
| | <211> 18 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> 人工序列 | | |

| | | |
|--------|---|----|
| | <400> 16 gggtcgcaga tgaaactc | 18 |
| | <210> 17 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| | <400> 17 aaccactacc tgagcaccc | 19 |
| | <210> 18 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| | <400> 18 acctctacaa atgtggtatg | 20 |
| | <210> 19 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| | <400> 19 ggagtggttt tagaaataat tg | 22 |
| | <210> 20 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| [0003] | <400> 20 tccaacccta ctaaccctacc acc | 23 |
| | <210> 21 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| | <400> 21 gattttgtag gtgggattaa ttgtgaattt | 30 |
| | <210> 22 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| | <400> 22 accaaaaaaaa cccacactca tatcaatata | 30 |
| | <210> 23 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| | <400> 23 ctgtaaggac aggccgagag | 20 |
| | <210> 24 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 | |
| | <400> 24 caggagcct tcattttcaa | 20 |

| | | |
|--------|------------------------------|----|
| | <210> 25 | |
| | <211> 19 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 25 | |
| | ctatcgctt gagccgttg | 19 |
| | <210> 26 | |
| | <211> 26 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 26 | |
| | aactcagtgt ctagaaggaa agatca | 26 |
| [0004] | <210> 27 | |
| | <211> 21 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 27 | |
| | tttattcagt tcccagtcca a | 21 |
| | <210> 28 | |
| | <211> 22 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <400> 28 | |
| | ttattcctat ggtgagcaa ga | 22 |

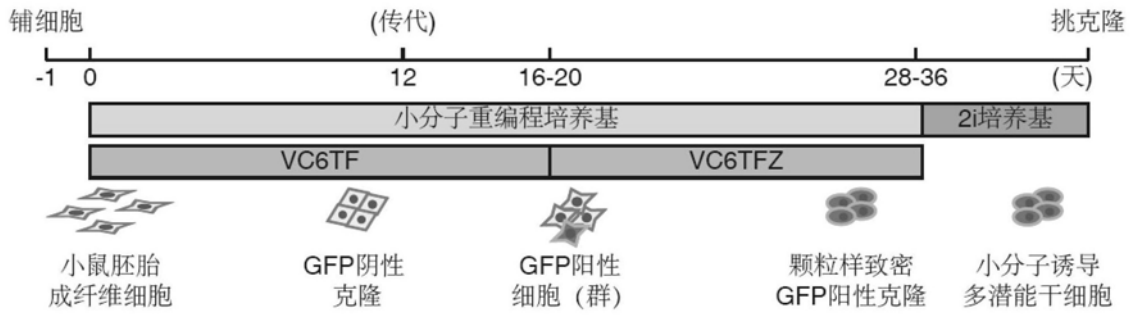


图1

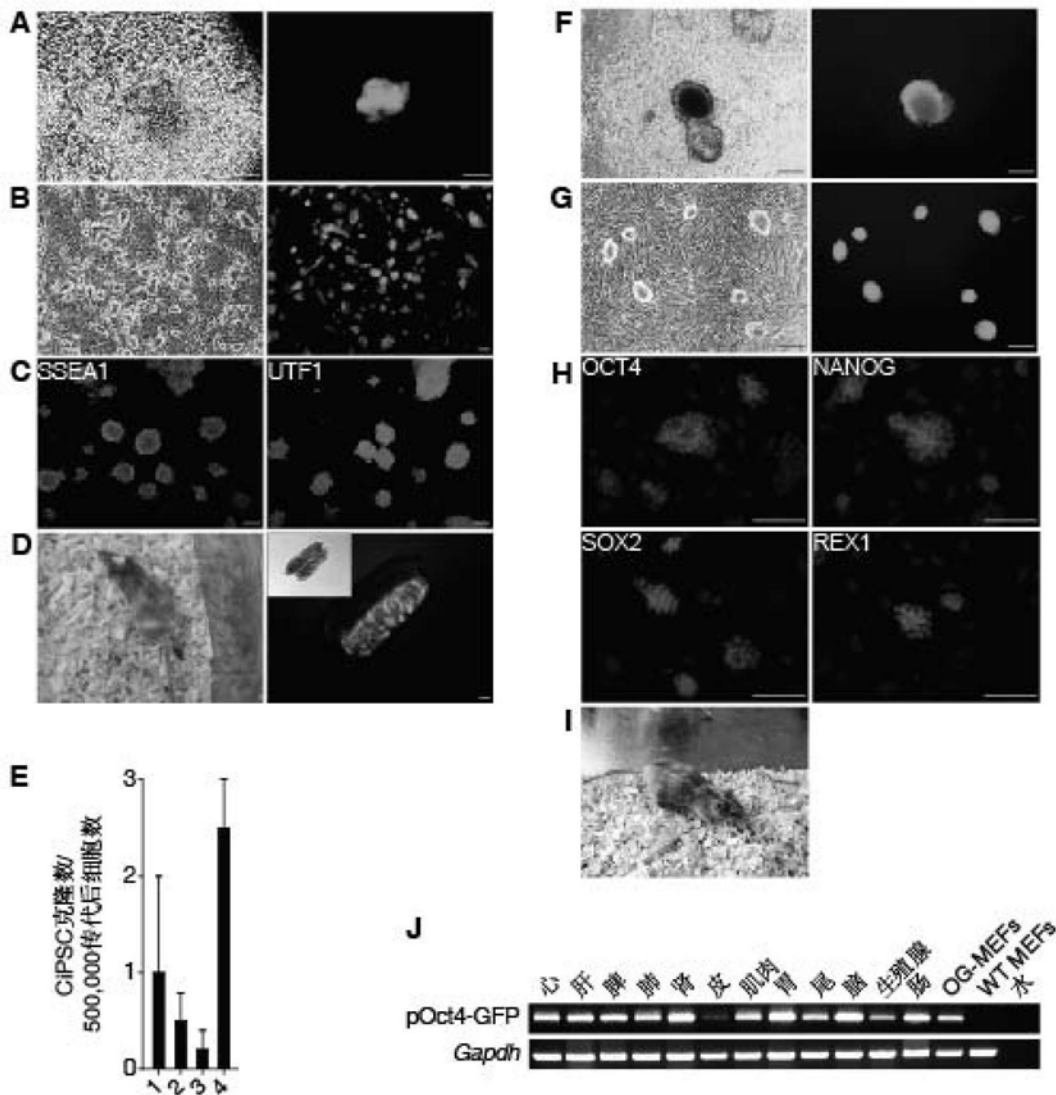


图2

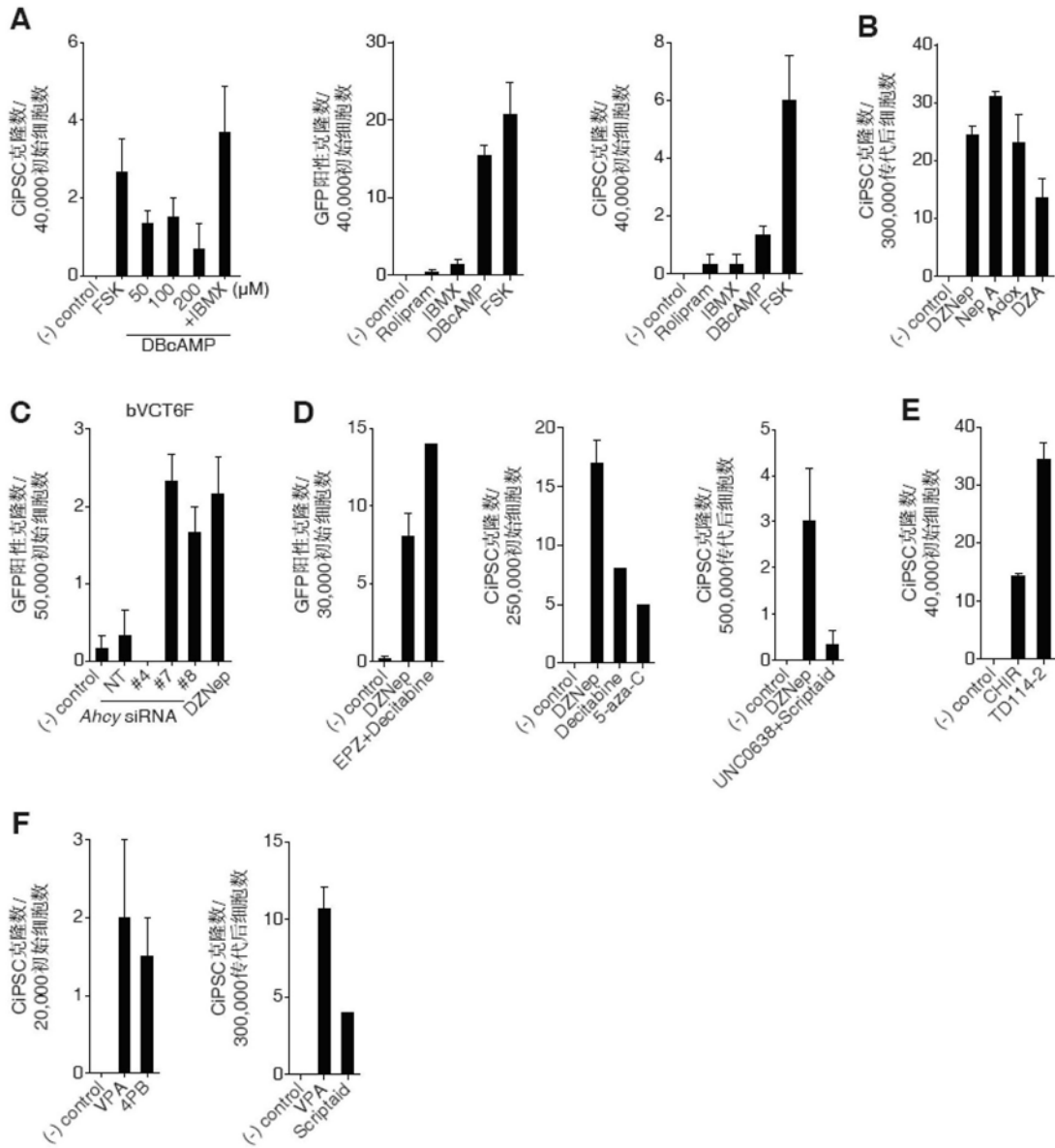


图3

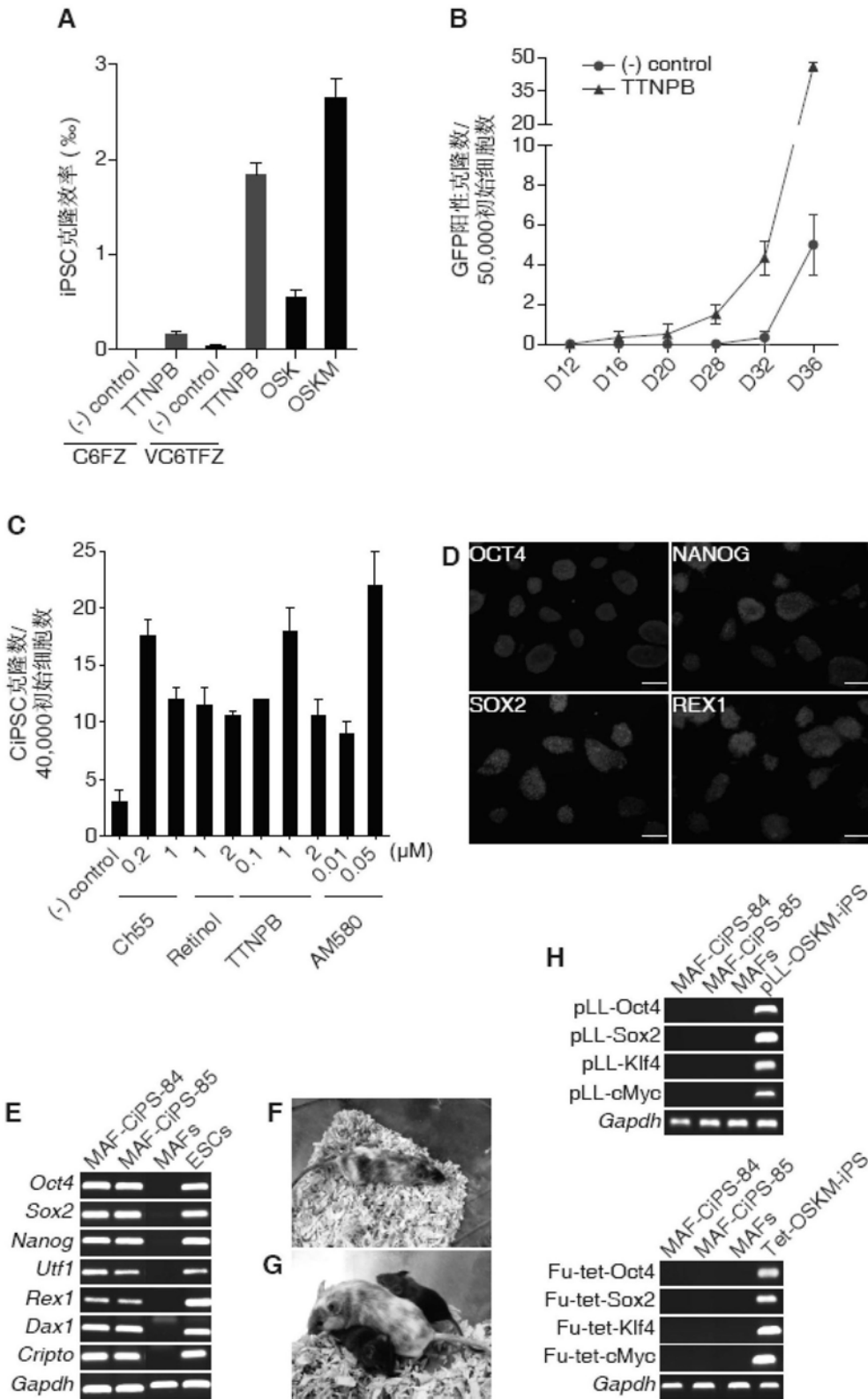


图4

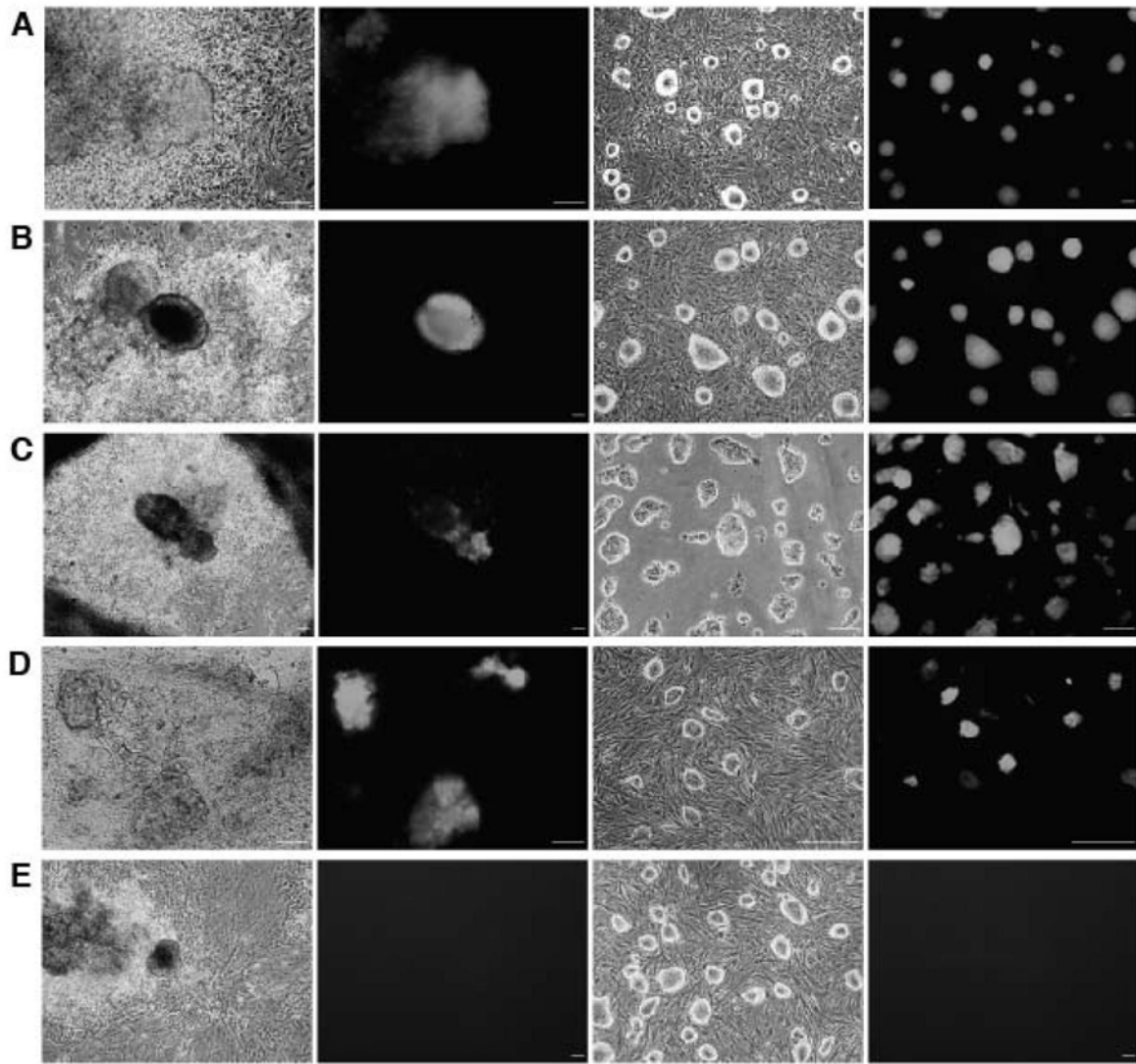


图5

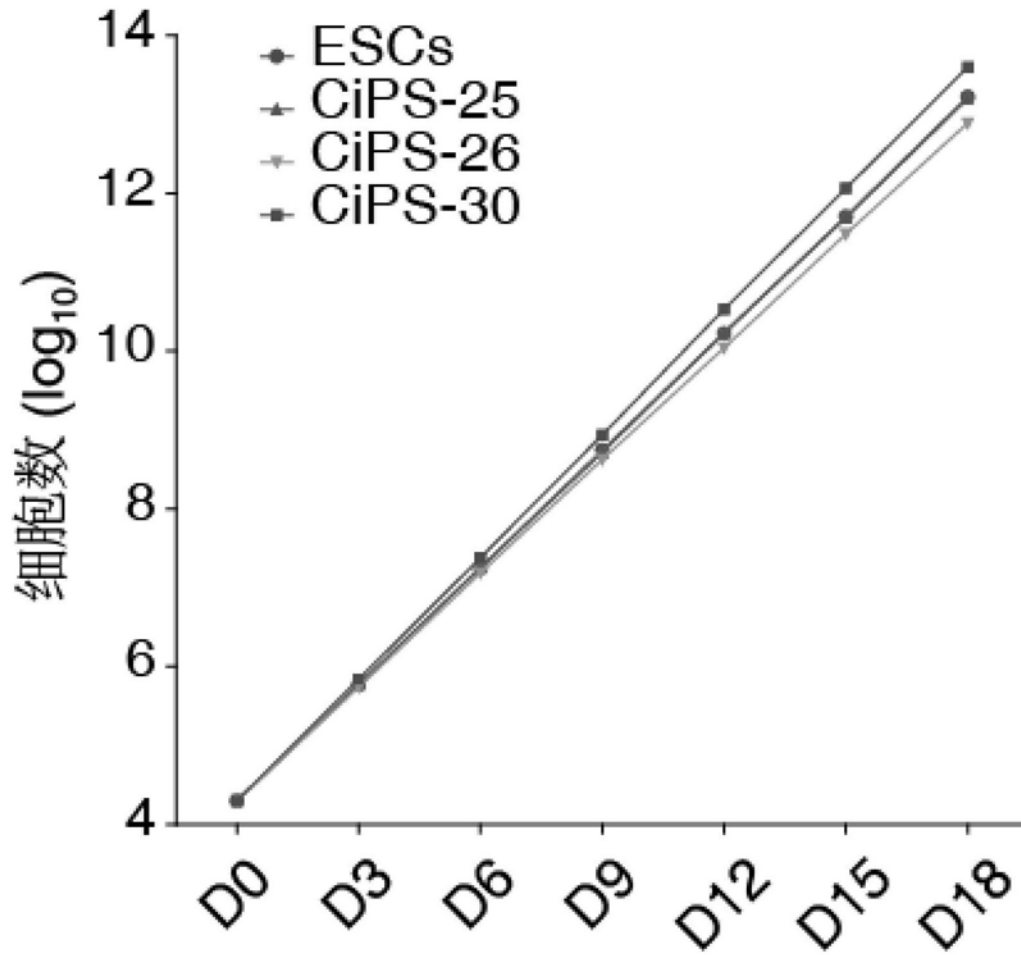


图6

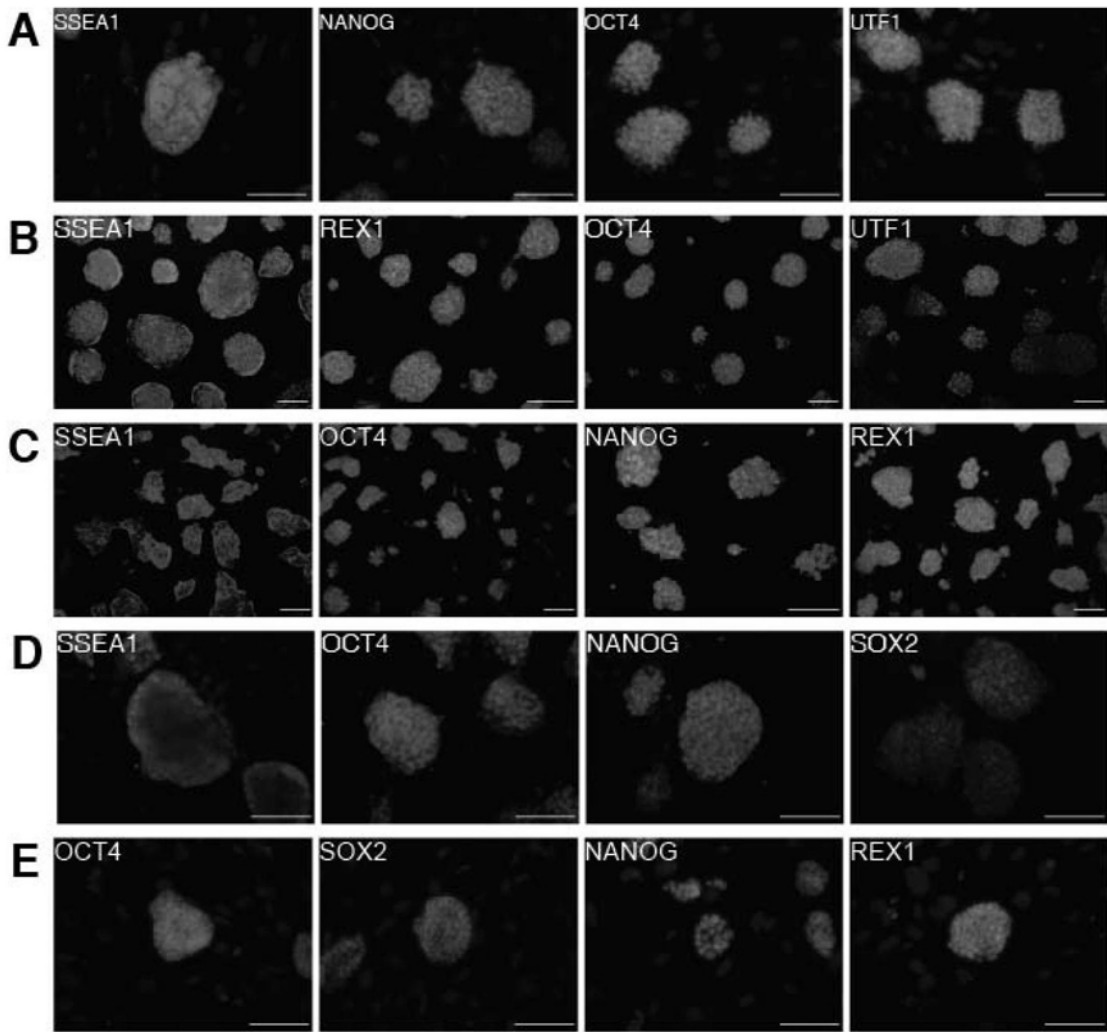


图7

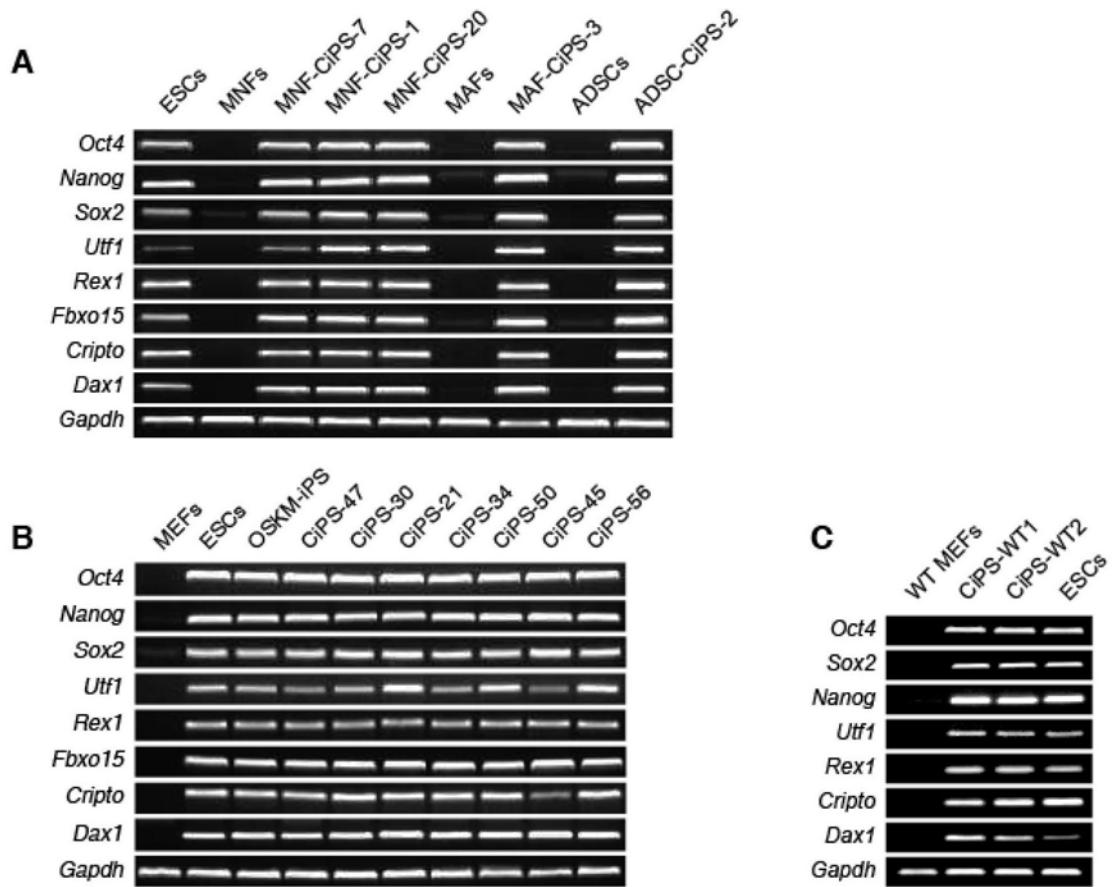


图8

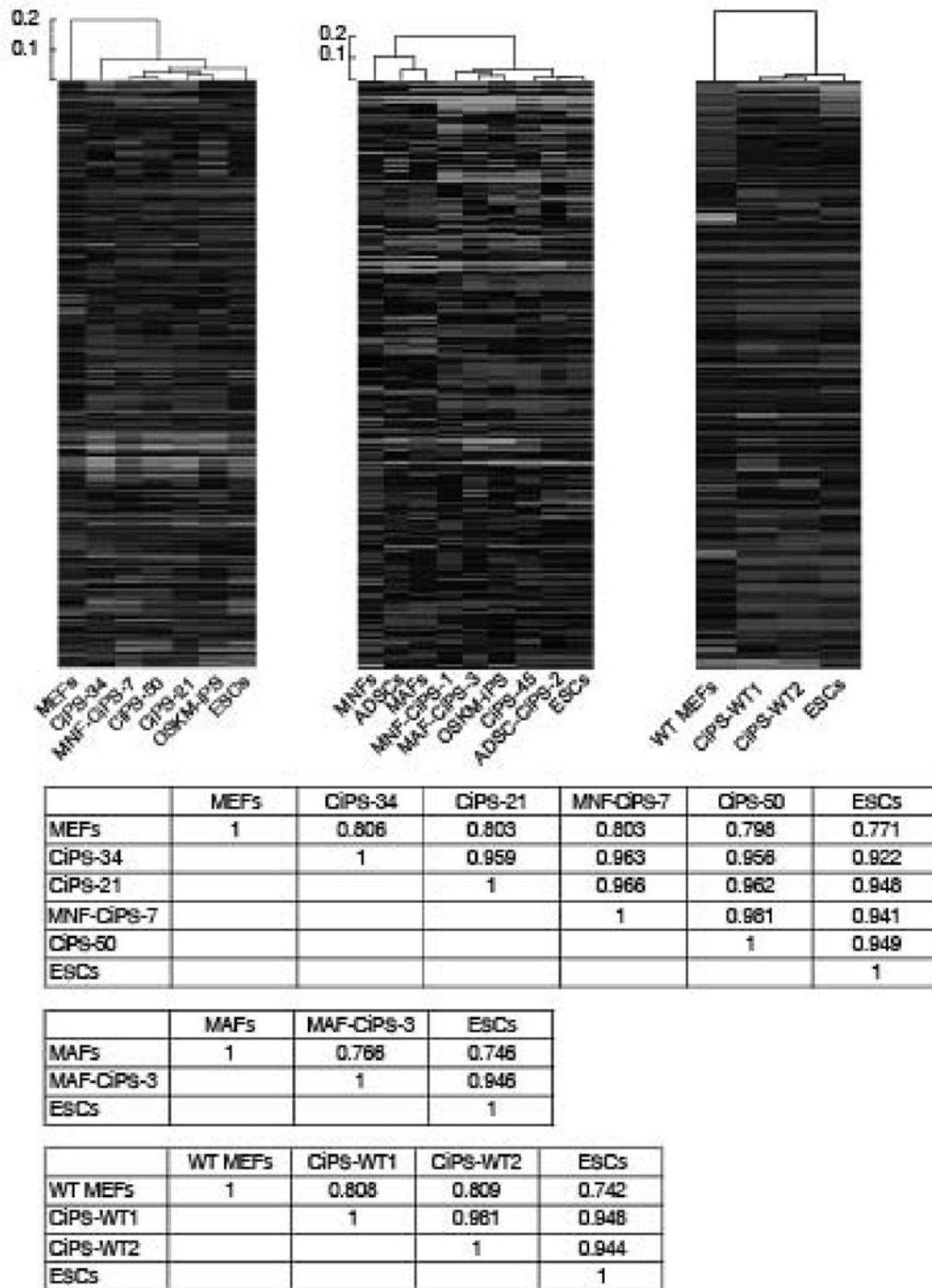


图9

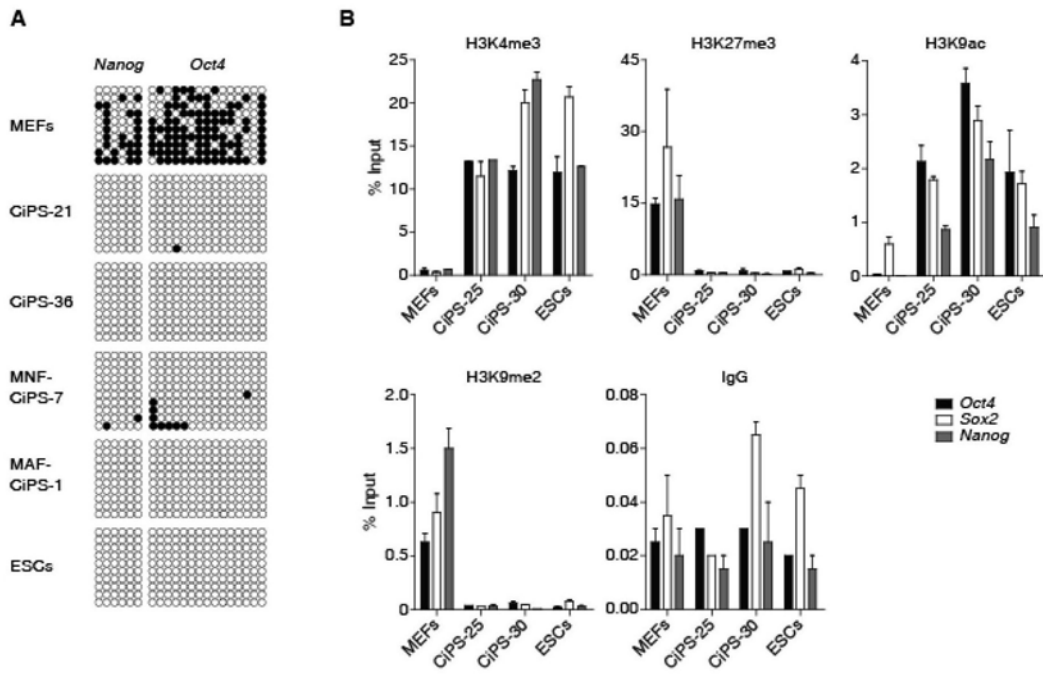


图10

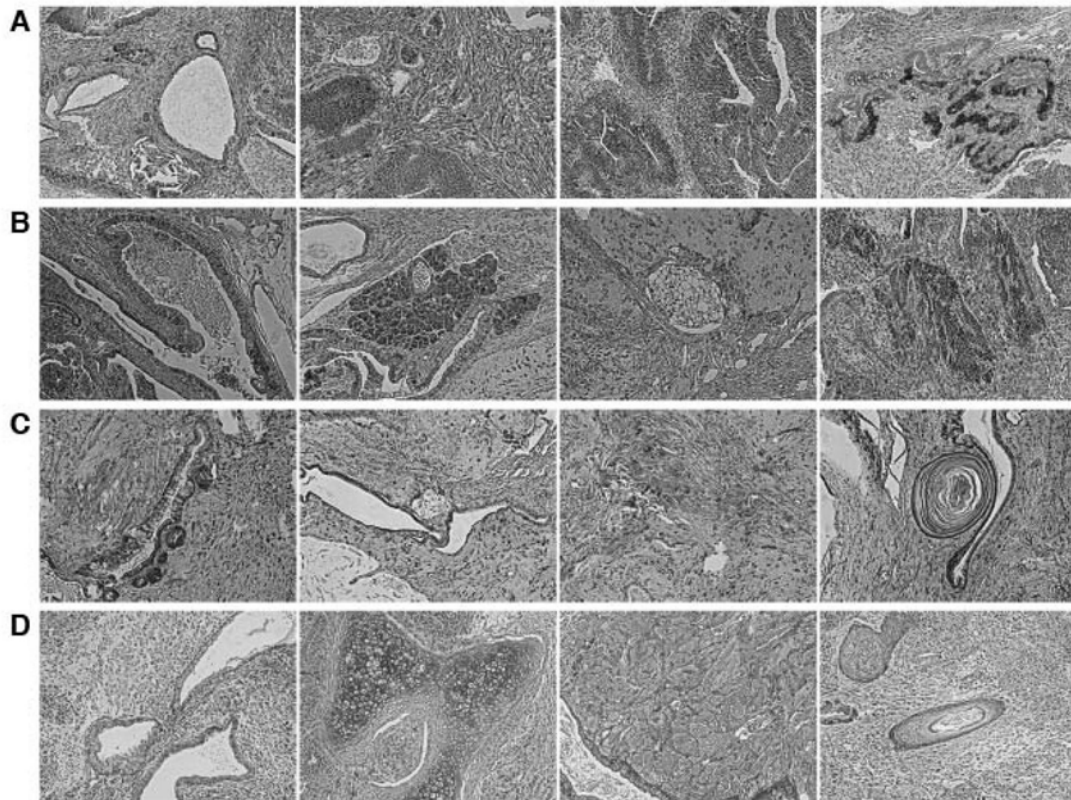


图11

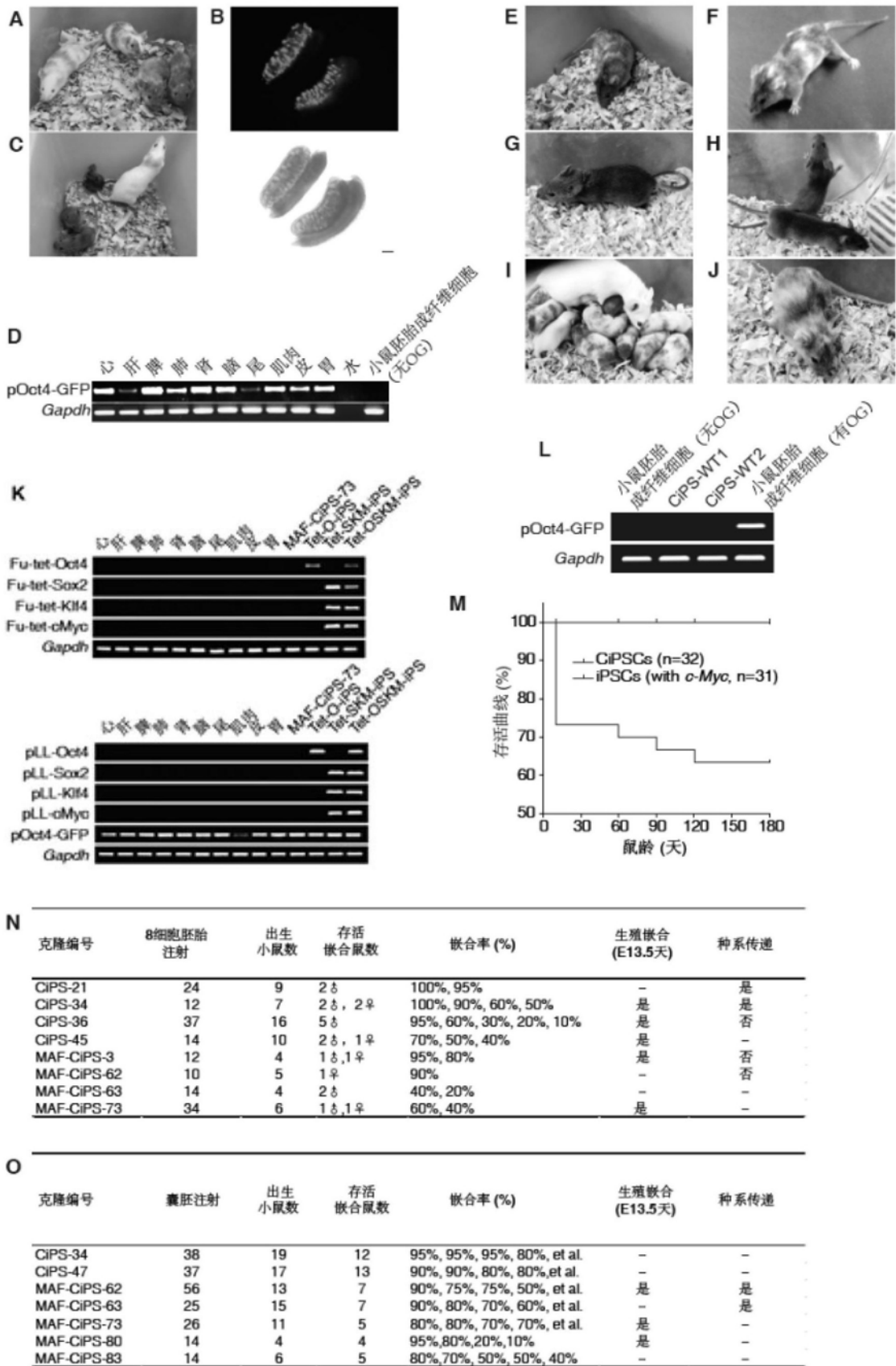


图12

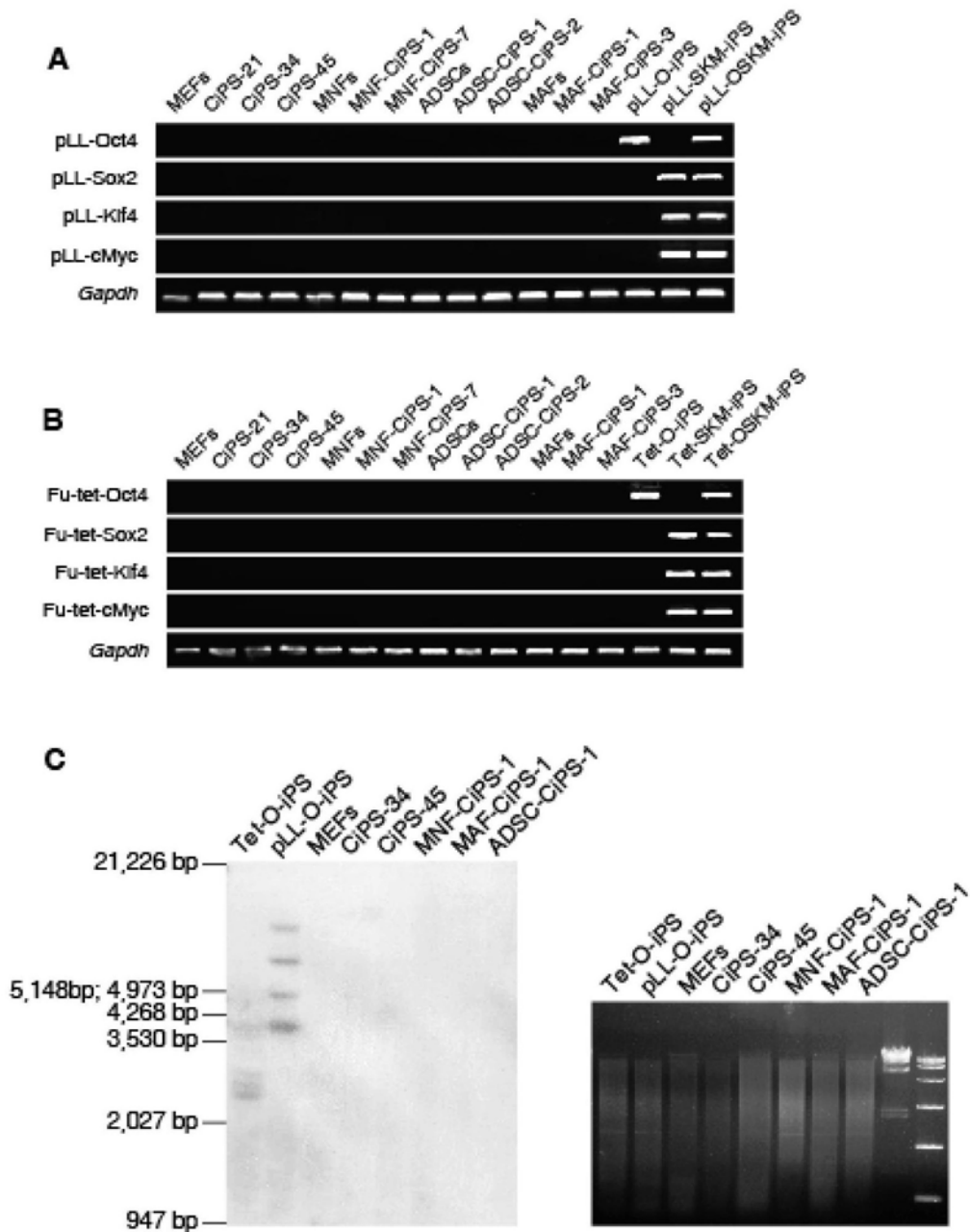


图13

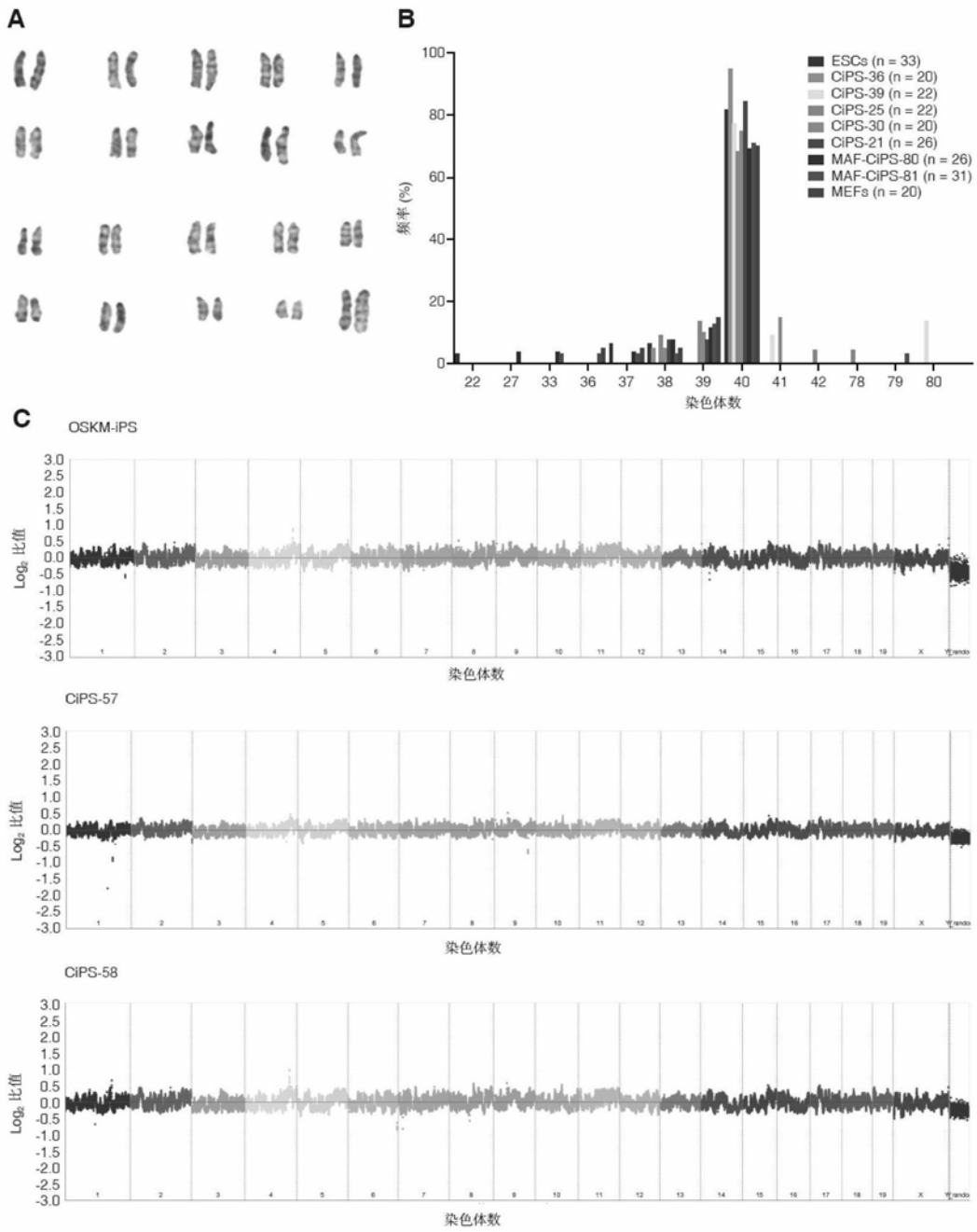


图14

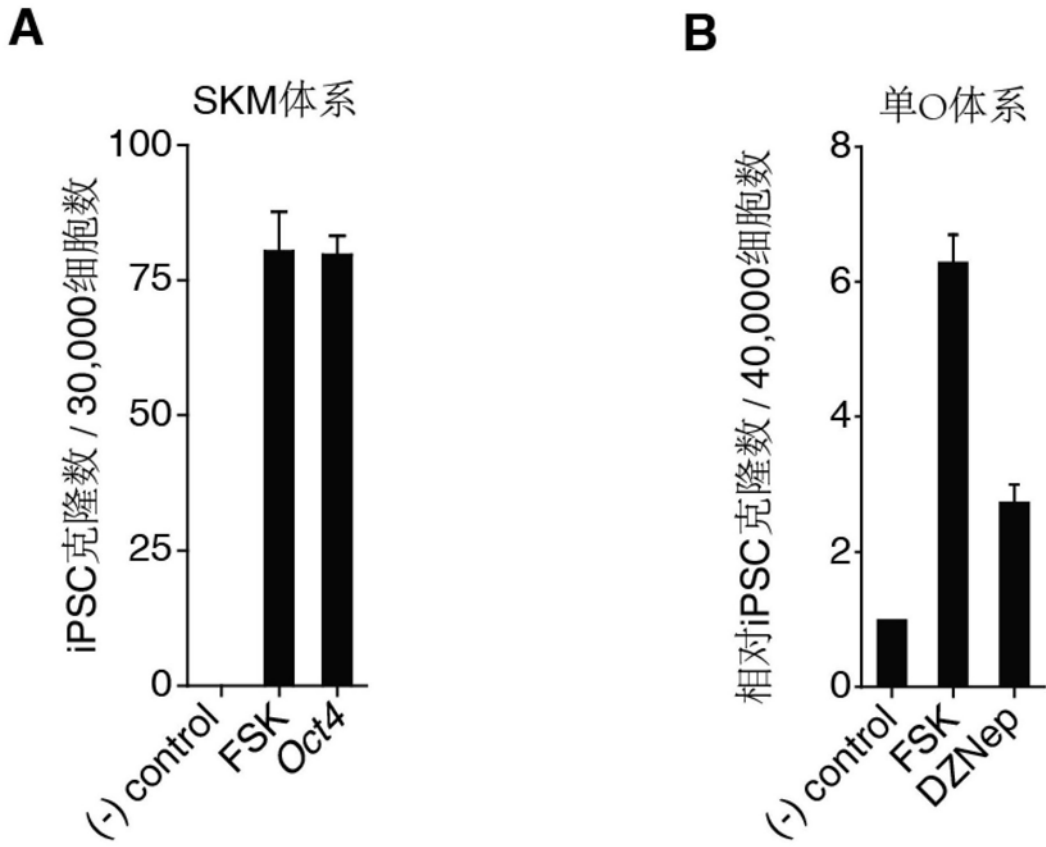


图15

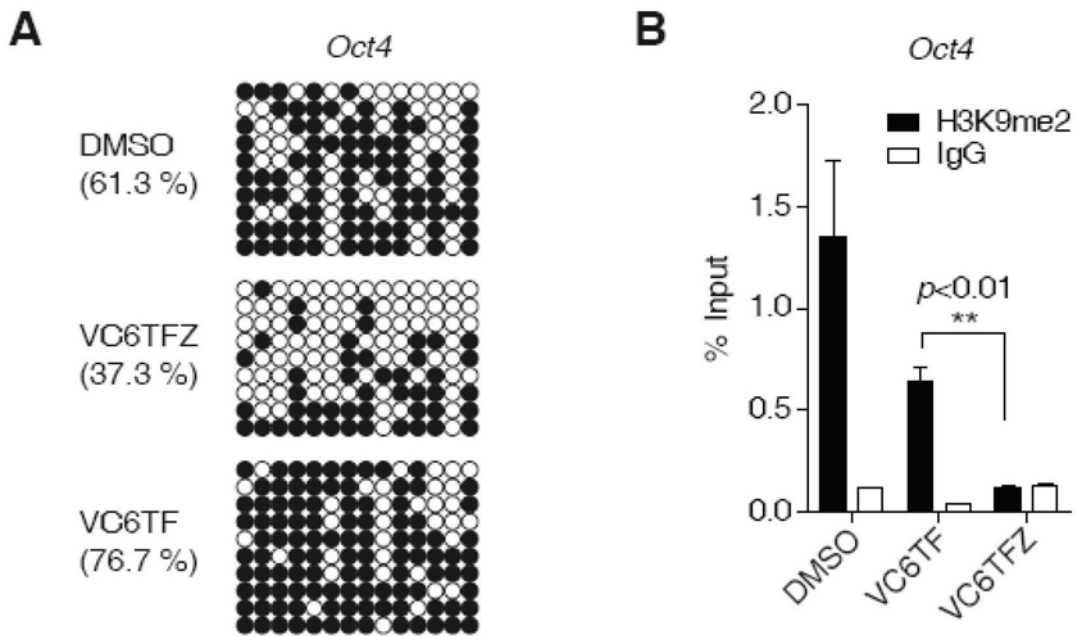


图16