(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105925535 A
(43)申请公布日 2016.09.07

(21)申请号 201610282035.8
(22)申请日 2010.06.04
(30)优先权数据
61/184,546 2009.06.05 US
61/240,116 2009.09.04 US
(62)分案原申请数据
201080024535.2 2010.06.04
(71)申请人 细胞动力国际有限公司
地址 美国威斯康星
(72)发明人 M·布朗 E·R·多明格斯
R·莱亚里什 E·努韦瑟
D·拉杰什 A·麦克
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 李程达
(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书60页 附图16页

(54)发明名称

重编程T细胞和造血细胞的方法

(57)摘要

公开了涉及产生诱导的多能干细胞(iPS细胞)的方法和组合物。例如,可以从$CD34^+$造血细胞、例如人$CD34^+$血液祖细胞或T细胞产生诱导的多能干细胞。还提供了多种iPS细胞系。在一些实施方式中,本发明提供了具有包含T细胞受体的遗传重排的基因组的新的诱导的多能干细胞。

CN 105925535 A

1.用于从T细胞产生人诱导的多能干细胞的体外方法,包括下列步骤:

(a)获得包含T细胞的细胞群体,其中包含T细胞的细胞群体的来源是获自受试者的外周血,所述受试者的细胞未经过外部施用的G-CSF动员;和

(b)从所述细胞群体的T细胞产生iPS细胞以提供iPS细胞群体,其中从所述群体的T细胞产生iPS细胞包括将重编程因子导入所述T细胞,其中所述重编程因子是包含Sox家族蛋白和Oct家族蛋白的重编程蛋白。

2.权利要求1的方法,其中所述细胞群体的来源是大约1至大约5ml的血液样品。

3.权利要求1或2的方法,其中所述细胞群体是经冷冻保存的。

4.权利要求1-3任一项的方法,其中包含T细胞的细胞群体是在体外在激活T细胞的条件下制备的。

5.权利要求4的方法,其中包含T细胞的细胞群体在存在抗-CD3抗体的情况下培养。

6.权利要求1-5任一项的方法,其中包含T细胞的细胞群体在体外使用一种或多种细胞因子培养,以扩增其中的T细胞群体,优选地,所述细胞因子包括IL-2。

7.权利要求1-6任一项的方法,其中所述细胞群体包含大约90%至大约99%的T细胞。

8.权利要求1-7任一项的方法,其中所述细胞群体包含至少$1x10^3$个T细胞,至少$5x10^3$个T细胞,或大约$1x10^6$至大约$2x10^6$个T细胞。

9.权利要求1-8任一项的方法,其中重编程蛋白可操作地连接于蛋白转导结构域。

10.权利要求9的方法,其中所述重编程因子由一个或多个表达盒编码并包含Sox家族蛋白和Oct家族蛋白,优选地,其中所述一个或多个表达盒包含至少多顺反子转录单位。

11.权利要求10的方法,其中所述多顺反子转录单位包含:(i)重编程基因和可选择或可筛选标志物;或(II)内部核糖体进入位点(IRES)或编码至少一个蛋白酶切割位点和/或自我切割肽的序列以进行多顺反子转录。

12.权利要求1-11任一项的方法,其中从所述群体的T细胞产生iPS细胞进一步包括:就胚胎干细胞的一种或多种特性选择iPS细胞。

13.权利要求1-12任一项的方法,其中所述方法还包括使iPS细胞分化为分化的细胞。

14.权利要求13的方法,其中所述分化的细胞包括:心肌细胞、造血细胞、神经元、成纤维细胞或上皮细胞。

15.权利要求1-14任一项的方法,其中iPS细胞群体基本上不含整合的、外源的病毒元件。

重编程T细胞和造血细胞的方法

[0001] 本申请是申请号为201080024535.2的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 本申请涉及2009年6月5日提交的美国申请号61/184,546和2009年9月4日提交的美国申请号61/240,116,它们的全部公开内容无所放弃地通过引用方式特别全文并入本文。

1.发明领域

[0004] 本发明大体上涉及分子生物学和干细胞领域。更具体而言,本发明涉及体细胞、尤其是T细胞和造血细胞的重编程(reprogramming)。

[0005] 2.相关技术描述

[0006] 一般而言,干细胞是未分化的细胞,其能够产生成熟的功能性细胞的演替。例如,造血干细胞可以产生任意的不同类型的末端分化的血液细胞。胚胎干(ES)细胞源自胚胎,其是多能的,因此具有发育成任意器官或组织类型,或至少潜在地发育成完整胚胎的能力。

[0007] 诱导的多能干细胞(induced pluripotent stem cell),通常简称为iPS细胞或iPSC,是一类人工地从非多能细胞(通常为成年体细胞)衍生而来的多能干细胞。人们相信,在很多方面,诱导的多能干细胞与天然多能干细胞例如胚胎干细胞是相同的,例如在以下方面:某些干细胞基因和蛋白的表达、染色质甲基化的式样、加倍时间、类胚体(embryoid body)的形成、畸胎瘤的形成、活嵌合体的形成以及潜能和分化能力,但是其与天然多能干细胞的相关性的完整程度仍待确定。

[0008] IPS细胞首先于2006年从小鼠细胞中产生(Takahashi等人,2006),于2007年从人类细胞中产生(Takahashi等人,2007a;Yu等人,2007)。这在干细胞研究中被认为是重要的进展,因为这可以允许研究人员获得多能干细胞而不必争议性地使用胚胎,多能干细胞在研究中具有重要意义并且具有潜在的治疗性应用。

[0009] 在人类中,iPS细胞通常是从皮肤成纤维细胞产生。然而,对于皮肤生物活组织的需求和在体外扩增成纤维细胞数个传代的需要使其成为用于产生患者特异性干细胞的麻烦的来源。此外,以前的用于重编程人的体细胞的方法是不方便的,因为它们需要从人类受试者直接获得体细胞,或将细胞维持于费力的细胞培养系统中。因此,需要开发用于从替代性来源诱导多能干细胞的简单、方便和易达的方法。在开发本发明时,本发明人考虑到血液样品可以作为来源,因为血液可以从患者或健康个体中收集,储存并转移,例如,从中心单位分配至一个或多个远的地区。然而,据本发明人所知,在本申请之前,没有关于从来自这样的临床可达来源的T细胞产生多能干细胞的报道,这说明对于开发此类技术的显著需求。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明克服了本领域中的主要缺点:提供了通过重编程而衍生自T细胞和/或造血祖细胞的诱导的多能干细胞。本方法能够从临床可达的T细胞来源、例如3ml全血样品产生iPS细胞,避免了动员造血细胞的需要。在其它实施方式中,可以从血液样品获得造血细胞,例如人类或哺乳动物$CD34^+CD45^+CD43^+$造血前体细胞,并转化为iPS细胞。可以从外周血的血

液样品获得造血前体细胞，例如通过富集$CD34^+$细胞或消除非$CD34^+$细胞谱系。在一些实施方式中，可以从血液样品、例如冷冻或冷冻保存的血液样品获得$CD34^+$造血细胞：在获得血液样品之前不动员受试者中的$CD34^+$造血祖细胞而获得。通过这种方式，可以从多种血液样品、包括存在于血库中的外周血样品产生iPS细胞。

[0012] 因此，提供了用于从T细胞和/或造血祖细胞产生诱导的多能干细胞的方法，包括下列步骤：(a)获得包含T细胞和/或造血祖细胞的细胞群体；和(b)从所述细胞群体的T细胞和/或造血祖细胞产生iPS细胞以提供iPS细胞群体。细胞群体的示例性来源可以包括但不限于：血液样品、血液成分、骨髓、淋巴结、胎儿肝脏或脐带。细胞群体的来源可以包括血液样品或源自血液样品的细胞，其中所述血液样品获自在获得血液样品之前不外部动员受试者中的造血祖细胞(例如，通过向受试者外部施用造血生长因子)的受试者。

[0013] 细胞群体可以获自冷冻保存的血液样品，或者细胞群体的来源或细胞群体可以经过冷冻保存。在实施例中证明了冷冻保存的血液样品可以用作T细胞的来源以成功地重编程为iPS细胞。

[0014] 本发明的一些方面的具体特点是通过使用小体积的血液样品而实施本发明的一些方面的能力。血液样品的适当的体积可以是大约1至大约5ml，大约1至10ml，大约1至15ml，或更具体为大约3ml。

[0015] 可以通过外部施用的G-CSF诱导造血干细胞/祖细胞、例如$CD34^+$细胞，以诱动进入外周血，以在外周血来源中富集。在本发明的一些方面中发现：来自未动员的供体的外周血细胞能够实现成功的重编程，因此，无需通过外部施用的生长因子动员骨髓细胞。因此，在具体的方面，细胞群体的来源可以是这样的受试者：其细胞未经过一种或多种外部施用的造血生长因子、例如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员。如在本文中可相互替换使用的术语“外部的(extrinsic)”或“外部的(external)”是指从生物体外施用动员剂(mobilizing agent)，而不是使用已经通过源自生物体内的内在因子在一定程度上被动员了的$CD34^+$细胞。

[0016] 为了提供适合于重编程的T细胞群体，可以在激活T细胞的条件下在体外制备包含T细胞的细胞群体，例如在存在抗-CD3抗体的情况下进行，或在体内进行(并因此具有针对特定抗原的特定TCR，例如黑素瘤的癌症抗原，例如GP-100)。这也可以包括使用本领域已知的四聚体、疫苗和/或体外肽刺激。也可以在体外以一种或多种细胞因子(例如IL-2)培养细胞群体以扩增其中的T细胞群体。T细胞可以是人类T细胞。在具体的方面，T细胞可以是$CD4^+$，$CD8^+$T细胞，或其组合。T细胞的非限制性实例包括T辅助1(TH1)细胞、T辅助2(TH2)细胞、TH17细胞、细胞毒性T细胞、调节性T细胞、天然杀伤T细胞、幼稚T细胞、记忆T细胞、γδT细胞和任意T细胞。

[0017] 在一些方面，细胞群体包含大约80％至大约99％、大约90％至大约99％、大约97％至大约99％或任何中间范围的T细胞，这可以对应于至少、大约或至多$1x\ 10^3$，$2x\ 10^3$，$3x\ 10^3$，$4x\ 10^3$，$5x\ 10^3$，$6x10^3$，$7x\ 10^3$，$8x\ 10^3$，$9x\ 10^3$，$1x\ 10^4$，$2x\ 10^4$，$3x\ 10^4$，$4x\ 10^3$，$5x\ 10^4$，$6x10^4$，$7x\ 10^4$，$8x\ 10^4$，$9x\ 10^4$，$1x\ 10^5$，$2x\ 10^5$，$3x\ 10^5$，$4x\ 10^5$，$5x\ 10^5$，$6x10^5$，$7x\ 10^5$，$8x\ 10^5$，$9x\ 10^5$，$1x\ 10^6$，$2x\ 10^6$T细胞或其中任意范围。例如，本发明人证明了在96孔板中以少至大约$1-5x\ 10^3$T细胞/孔重编程(图6A-6B)。

[0018] 为了提供造血前体细胞的群体，可以在引起$CD34^+$细胞的富集或扩增的条件下制

备包含造血细胞的细胞群体。具体地，本发明发现：无需动员骨髓细胞以获得足够的用于重编程的$CD34^+$细胞。例如，可以使用磁激活的细胞分选(MACS)或荧光激活的细胞分选(FACS)来富集$CD34^+$造血细胞；在一些实施方式中，可以使用Indirect CD34MicroBead Kit或Direct CD34MicroBead Kit(均可获自Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)与MACS从样品、例如外周血样品富集$CD34^+$造血细胞。本领域已知还有另外的方法用于从外周血获得经动员的$CD34^+$造血祖细胞，包括Gratwohl等人(2002)描述的方法。但是，在一些优选实施方式中，可以从未暴露于一种或多种造血生长因子的受试者获得$CD34^+$造血前体细胞；因此，$CD34^+$造血前体细胞可有利地获自未经一种或多种外部施用的生长因子动员的供体的血液样品，包括通常存在于血库中的血液样品。在其它实施方式中，可以通过消除成熟的造血细胞、例如T细胞、B细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞和/或红细胞而富集样品中的$CD34^+$细胞。对于谱系消除，可以以抗体混合物(例如CD2、CD3、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123、CD235a中的一项或多项)温育细胞悬浮液，然后其可用于除掉上述谱系阳性细胞(例如Karanu等人,2003)。谱系细胞消除试剂盒(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)也是商业上可获得的，并且可用于此目的。在一些实施方式中，可以使用SCF、Flt3L和/或IL-3细胞因子的组合，使用例如Akkina等人(1996)描述的方法或StemPro™-34培养基(可获自Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)，扩增并增殖$CD34^+$细胞，然后转化为iPS细胞。

[0019] 本发明人预想到：通过本发明描述的方法实质上可以将任意造血祖细胞或$CD34^+$造血细胞重编程为iPS细胞。在一些实施方式中，可以通过本文提供的方法将获自或衍生自外周血样品的造血前体细胞转化为iPS细胞。造血前体细胞可以表达CD34和CD45，或CD34，CD45，和CD43。在一些情况下，可能需要从干细胞、例如人类胚胎干细胞(hESC)产生造血前体细胞；在这些实施方式中，可以产生在髓样祖细胞中高度富集的$CD34^+CD43^+CD45^+$造血细胞，例如，按照Choi等人(2009)的描述，通过共培养hESC与OP9饲养细胞来进行。在一些情况下，造血前体细胞对于CD34可以是阴性的(例如Guo等人,2003)；但预想到这些造血前体细胞可以分化为iPS细胞。

[0020] 为了从细胞群体的T细胞和/或造血祖细胞产生iPS细胞，方法可以包括将一种或多种重编程因子导入T细胞和/或造血祖细胞。在一些方面，重编程因子可以是重编程蛋白，包括Sox家族蛋白和Oct家族蛋白，其中一种或多种或每一种可以可操作地连接于用于细胞进入的蛋白转导结构域。在本发明的另一个实施方式中，重编程因子可以由一个或多个表达盒编码，并且可以包括例如，Sox家族蛋白和Oct家族蛋白。Sox和Oct被认为对于确定ES细胞性质的转录调节层级具有重要意义。例如，Sox可以是Sox1、Sox2、Sox3、Sox15或Sox18，特别是Sox2；Oct可以是Oct4。另外的因素可以增强重编程效率，例如Nanog、Lin28、Klf4、c-Myc、SV40大T抗原或Esrrb；重编程因子的特定组合可以是包含Sox2、Oct4、Nanog和任选包含Lin-28的组合；或包含Sox2、Oct4、Klf和任选包含c-Myc的组合。

[0021] 在具体的实施方式中，一个或多个表达盒可以包含一个或多个多顺反子转录单位。多顺反子单元可以包含可操作地连接的编码区的不同组合，例如(i)至少两种重编程基因，例如Sox-Oct、c-Myc-Klf或Nanog-Lin28；备选地，(ii)连接于可选择或可筛选标记物的重编程基因。方面(i)可以是优选的，因为本发明人发现：使用具有2种重编程因子/载体(Sox2和Oct4、cMyc和Klf4、或Nanog和Lin28)而没有任何荧光标志物的双顺反子载体(载体

图谱显示于图11A-11C)，而不是使用具有1个重编程因子和1个荧光标志物的4个单独的双顺反子载体(此类载体的图谱显示于图10)，使用前一种载体的重编程效率显著改善，并且iPS集落较早出现(～第10-14天而非第20-24天)。

[0022] 为了在同一多顺反子转录单位中共表达多个基因，多顺反子转录单位可以包含内部核糖体进入位点(IRES)或编码至少一种蛋白酶切割位点和/或自我切割肽的序列以进行多顺反子转录。例如，自我切割肽是病毒2A肽。

[0023] 在另一个实施方式中，一个或多个表达盒包含于选自下列的重编程载体中：病毒载体，游离载体或转位子。更具体而言，载体可以是逆转录病毒载体，例如鼠白血病病毒(MLV)、莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)、Akv-MLV、SL-3-3-MLV或其它密切相关的病毒。病毒载体还可以是慢病毒载体。在一些方面，转录调节元件可以包含长末端重复区(LTR)以介导病毒基因的整合。

[0024] 在备选方面，载体可以是游离载体，例如基于EBV的载体，或基于转位子的载体。

[0025] 在其它实施方式中，可以通过脂质体转染、核转染、电穿孔、颗粒轰击、磷酸钙、多聚阳离子或多聚阴离子或适合用于将外源元件导入细胞的任何方法导入重编程因子。

[0026] 在另外一些方面，可以基于一个或多个胚胎干细胞特性来选择iPS细胞，例如未分化的形态、胚胎干细胞特异性标志物、粘附性质、多能性、多谱系分化潜力或本领域已知的任何特征。例如，基于未分化的形态来选择子代细胞是特别方便的。胚胎干细胞特异性标志物可以是选自SSEA-3,SSEA-4,Tra-1-60或Tra-1-81,Tra-2-49/6E,GDF3,REX1,FGF4,ESG1,DPPA2,DPPA4和hTERT的一种或多种特异性标志物。可以在重编程之后的多个时间点执行该选择步骤以确保细胞处于多能状态并且不返回至分化状态。就与表面的粘附性质而言，iPS细胞也不同于T细胞和造血祖细胞，该性质也可用于方便的分离方法中。

[0027] 在具体的方面，可以基于基本上不表达导入的外源元件、例如包含于表达盒中的载体遗传元件或报告基因来选择iPS细胞，因为随着细胞变成多能性的，重编程的细胞能够使外源导入的物质沉默。因此，除了形态特征之外，基本上丧失整合性载体遗传元件或报告分子表达例如荧光，是细胞被重编程的指示。例如，可以基于导入的报告分子基因，通过荧光激活的细胞分选(FACS)、CAT测定或发光测定来选择报告分子表达的沉默。外源元件的“基本上丧失”或“基本上不含外源元件”意思是iPS细胞群体的少于1％,0.5％,0.1％,0.05％或任意中间百分率的细胞包含外源元件。iPS细胞群体可以基本上不含整合的、外源的病毒元件。

[0028] 为了iPS细胞的临床施用，方法还可以包括使iPS细胞分化为分化的细胞，例如，心肌细胞、造血细胞、肌细胞、神经元、成纤维细胞、胰腺细胞、肝细胞或上皮细胞。在另一个方面，可以公开从如上文所述的iPS细胞群体分化而来的分化的细胞、组织或器官。组织可以包括神经、骨、肠、上皮、肌肉、软骨或心脏组织；器官可以包括脑、脊髓、心脏、肝、肾、胃、肠或胰腺。在一些方面，分化的细胞、组织或器官可用于组织移植、药物筛选或发育研究以替代胚胎干细胞。

[0029] 在另一个方面，也可以公开根据如上所述的方法产生的诱导的多能干细胞。还可以提供诱导的多能干细胞，其包含含有T细胞受体基因的V、D和J区段的不完整组的基因组(相对于胚胎干细胞，其可以是人类细胞)。在具体的方面，诱导的多能干细胞可以基本上不含整合的、外源病毒元件。

[0030] 本发明的方法和/或组合物的上下文中所讨论的实施方式可以就本文描述的任何其它方法或组合物来应用。因此，涉及一种方法或组合物的实施方式也可以应用于本发明的其它方法和组合物。

[0031] 提及核酸时，如本文使用的术语“编码(encode)”或“编码(encoding)”用于使本发明易于被技术人员所理解，但是这些术语可以分别与“包含(comprise)”或“包含(comprising)”相互替换地使用。

[0032] 如本文说明书中使用的“一种(a)”或“一种(an)”可以指一个或多个。如本文权利要求中所使用，当与词语“包含”一起使用时，词语“一种(a)”或“一种(an)”可以指一个或多个。

[0033] 除非明确指明仅指替代物或者替代物是相互排斥的，否则权利要求中使用的术语“或”可用于指“和/或”，虽然本公开内容支持仅指替代物和“和/或”的定义。如本文使用的“另一个”可以指至少第二个或更多个。

[0034] 在本申请全文中，术语“大约”用于表示某数值包括用于测定该数值的设备、方法的误差的内在差异，或者存在于研究受试者之间的差异。

[0035] 本发明的其它内容、特征和优势将通过以下详细描述变得明显。但是应该理解，虽然详细描述和具体实施例指明了本发明的优选实施方式，但是仅是为了解释目的而提供，因为本发明精神和范围内的多种改变和修饰对于阅读了该详细描述的本领域技术人员将是明显的。

附图说明

[0036] 以下附图构成本说明书的一部分，包括这些附图是为了进一步说明本发明的某些方面。通过参考一个或多个这些附图并联合本文提供的具体实施方式的详细描述将更好地理解本发明。

[0037] 图1：T-细胞重编程过程的概览，开始于激活的T细胞，并产生具有hESC样形态的iPSC集落。在Olympus IX71显微镜下分别以10倍和20倍物镜获得T细胞和iPSC集落图像。

[0038] 图2A-2C：来自人T细胞的诱导的多能干细胞的衍生和表征。图2A：输入细胞的CD3表面表达的流式细胞术分析。(i)来自代表性供体的PBMC群体的第-3天非激活的PBMC和第0天激活的T细胞上的CD3表面表达。(ii)对代表性供体中的转导后72小时的转导细胞群体(GFP^+)设门的CD3表达，以显示$CD3^+$细胞的优先转导。(iii)10个供体真空采血管产生的样品的平均的上述度量(i-ii)的直方图。图2B：代表性的白细胞去除术(“TiPS L-2”)和Vacutainer©(“TiPS V-1”)衍生的TiPS系中的hESC多能性标记物OCT4、Tra-1-81、SSEA-3和SSEA-4的流式细胞术分析。图2C：使用靶向TCRβ基因座的V-J区内的保守区的多重PCR引物，分析T细胞受体(TCR)β链重排。多克隆的起始T细胞群体由电泳图谱上的正确片段大小范围内的扩增子峰的钟形曲线表示。成纤维细胞(非T细胞)iPS细胞(″Fib-iPS″)在TCRβ基因座上缺少种系重排，并作为阴性对照。克隆衍生的TiPS系(来自2个白细胞去除术系和1个Vacutainer©系的代表性数据，分别是“TiPS L-1”，“TiPS L-2”；和“TiPS V-2”)显示出确定大小的一个特征峰。DNA片段分析是在ABI 3730DNA分析仪上进行的。

[0039] 图3A-3D：来自人T细胞的诱导的多能干细胞的表征。图3A：就hES细胞标志物基因DNMT38，LEFTB，NODAL，REX1，ESG1，TERT，GDF3和UTF1的表达，通过RT-PCR分析来自白细胞去

除术(“TiPS L-1和L-2”)和Vacutainer©(“TiPS V-2”)的代表性的TiPS细胞系。GAPDH用作每个样品的阳性上样对照。图3B:通过PCR分析基因组DNA确认转基因的整合。使用针对目标重编程基因(“RG”)的正向引物和针对IRES的反向引物。OCT4正向和反向引物用作PCR反应阳性对照,如载体图谱所示。图3C:TiPS细胞系的RT-PCR分析显示了外源转基因的沉默,GAPDH作为每个样品的阳性对照。hESC系H1和成纤维细胞衍生的iPSC系(Fib-iPS)作为阳性细胞对照,激活的供体的T细胞作为阴性细胞对照。图3D:TiPS克隆表达人胚胎干细胞特异性多能标志物,如流式细胞术分析所示。

[0040] 图4A-4E:TiPS细胞系的体内和体外分化潜力。图4A:畸胎瘤的形成显示了体内分化潜力。注射进入SCID/beige小鼠的TiPS细胞在5-12周时形成畸胎瘤。苏木精和伊红染色显示了与从三个原始胚层的衍生一致的组织,包括:具有杯状细胞的简单上皮,其表示胃肠或呼吸组织(内胚层)、软骨(中胚层)和视网膜色素上皮(外胚层)。使用Olympus IX71显微镜,使用40倍物镜获得来自TiPS L-2细胞系的代表性图像。图4B:体外分化为神经元。将TiPS L-2细胞诱导为神经元分化,作为聚集体,然后使用Alexa Fluor 594二抗就神经元标志物βIII-微管蛋白进行染色;以Hoechst对比染色细胞核。使用20倍物镜获得图像。调节对比度,使用Image J软件合并图像。图4C:通过细胞聚集方法进行TiPS细胞的心脏诱导。细胞聚集体在第14-15天含有跳动的心脏肌钙蛋白T(cTNT)阳性的心肌细胞。显示了来自代表性样品的流式细胞术数据。使用10倍物镜获得图像。图4D:体外分化为造血祖细胞。通过无血清类胚体(EB)分化程序,在两个TiPS系中分化12天而产生的造血祖细胞(HPC),与hESC系(H1)和成纤维细胞衍生的iPSC系(Fib-iPS)进行对比。通过流失细胞术,通过将EB分离为单个细胞并以荧光团缀合的针对CD34,CD45,CD43,CD31,CD41和CD235a的单克隆抗体进行染色来定量HPC。图4E:通过将EB分化和个体化的细胞置于无血清的MethoCult培养基而进行造血克隆形成性(CFU)检验,所述培养基中含有细胞因子SCF,G-CSF,GM-CSF,IL-3,IL-6和EPO。温育14天之后,根据形态学标准将集落测评为红细胞(CFU-E/BFU-E)、巨噬细胞(CFU-M,数据未显示)、粒细胞(CFU-G,数据未显示)、粒细胞-巨噬细胞(CFU-GM)和粒细胞-红细胞-巨噬细胞-巨核细胞(CFU-GEMM)。也标示出了总CFU计数(CFU)。使用Olympus CKX41显微镜以2倍物镜获取图像。

[0041] 图5:iPSC克隆追踪。从畸胎瘤样品分离基因组DNA并与它们的亲代细胞系就TCRβ链的重排进行比较。显示了来自细胞系TiPS V-1的代表性数据。衍生的畸胎瘤具有亲代细胞系的克隆性重排。使用靶向TCRβ基因座的V-J区内的保守区的多重引物进行PCR分析。在ABI 3730DNA分析仪上进行DNA片段分析。背景≤1000RFU。

[0042] 图6A-6B:以96-细胞形式重编程T细胞。图6A:以双顺反子载体SO(Sox2和Oct4)和CK(c-Myc和Klf4)感染供体A的T细胞并铺板于MEF。进行活细胞抗-Tra1-60标记以检测iPS细胞集落。图6B:以双顺反子载体SO(Sox2和Oct4)和NL(Nanog和Lin28)感染供体A的T细胞并铺板于MEF。进行活细胞抗-Tra1-60标记以检测iPS细胞集落。输入细胞数显示为“输入数目(Input#)”以表示起始材料中的T细胞数。

[0043] 图7:DNA指纹分析。在所分析的8个STR基因座上检测的所有15个等位基因多态性而言,短串联重复(STR)分析显示TiPS细胞系与亲代的激活的T细胞是相同的。显示了来自2个TiPS系(TiPS L-1和TiPS L-2)的代表性数据。

[0044] 图8:碱性磷酸酶(AP)染色。TiPS系TiPS L-1和TiPS L-2是AP阳性的。在HP

Scanjet G3110计算机扫描仪上获取图像。

[0045] 图9:TiPS细胞系显示出正常核型。TiPS细胞系“TiPS L-1”和“TiPS L-2”在MEF上生长6个传代,系“TiPS V-1”和“TiPS V-2”分别在Matrigel上生长总共18个传代中的8个传代,总共34个传代中的30个传代。使细胞进行G显带分析,没用检测到克隆性异常。

[0046] 图10.用于重编程实验的MMLV逆转录病毒构建体的载体图谱。“RG”表示重编程基因。

[0047] 图11A-11C:用于重编程实验(具有改善的重编程)的双顺反子MMLV逆转录病毒构建体的载体图谱。图11A:MMLV-Oct4-IRES-Sox2的载体图谱(简写为“Oct4-Sox2”)。图11B:MMLV-cMyc-IRES-Klf4的载体图谱(简写为“cMyc-Klf4”)。图11C:MMLV-Nanog-IRES-Lin28的载体图谱(简写为“Nanog-Lin28”)。

具体实施方式

[0048] 1.绪论

[0049] 通过病毒转移确定的因子例如SOX2,OCT4,NANOG和LIN28或SOX2,OCT4,c-Myc和KLF4,在体外重编程体细胞为未分化的多能状态(Yu等人,2007;Takahashi等人,2007b),已经开启了使用多种细胞类型产生患者特异性人iPSC的方式(Loh等人,2009;Aasen等人,2008)。通过短暂表达基因或通过使用适当转录因子的蛋白质转导,通过衍生iPSC,进一步发展了该想法。到目前为止,人类中的主要的iPSC研究着眼于以成纤维细胞作为细胞来源。虽然成纤维细胞由于其商业可获得性和基因递送的容易性而提供了作为起始材料的数种优点,但它们对于大规模临床衍生iPSC系是亚最佳的,这是因为需要侵入性皮肤活组织检查,并且难以从原代组织建立稳定的系。未动员的外周血可能是用于重编程的理想细胞来源,因为容易获得患者样品(Maherali and Hochedlinger,2008)。另外,在世界范围内的生物贮库中储存了来自活的和死亡的供体的大量的冷冻的血液样品(Kleeberger等人,1999)。

[0050] 本发明通过从T细胞和/或造血前体细胞产生诱导的多能干细胞而克服了与目前的重编程技术相关的数个主要问题。如本发明所发现:可以从1ml全血的等量物获得更丰富的和易处理的血液细胞来源以从T淋巴细胞衍生iPSC。这些T细胞衍生的iPSC(“TiPS”)与hESC以及成纤维细胞衍生的iPSC系具有共同的基本特征。另外,它们保留它们的特征性T细胞受体(TCR)基因重排,该性质可用于例如,作为遗传追踪标志物或用于再分化实验以研究人类T细胞发育。

[0051] 在本发明之前,本发明人对于重编程T细胞或造血祖细胞的成功的可能性是非常不确定的,有数个原因:首先,不确定血液样品中的T细胞和/或造血前体细胞是否以足以进行重编程的量存在。第二,尚未研究过由T细胞受体基因的V(D)J重组造成基因丧失在重编程中的可能的效应。第三,目前已经被重编程的多数细胞类型是粘附性细胞。T细胞是非粘附性的,并且以悬浮方式培养。直至本发明,尚不清楚进行重编程的T细胞可以转变为适合于粘附性iPS细胞的粘附培养条件。因此,本发明的方法是首次从T细胞或造血前体细胞产生iPS细胞。T细胞可以容易地从多种来源获得,例如小体积的血液样品。类似的,造血前体细胞例如“$CD34^+/CD43^+/CD45^+/CD38^-$”或“$CD34^-,CD133^+/CD38^-$”造血前体细胞可以从外周血样品富集。

[0052] 本发明的特别的优点在于:T细胞受体的重排的和减少的V、D、J基因区段,其可以在重编程的子代细胞中保留。这作为T细胞衍生的iPS细胞的不同克隆群体的特定特征或"条形码",也可以辅助那些未经历V(D)J重组的来自多能干细胞的iPS细胞的分化。另外,T细胞与iPS细胞之间的粘附性质的差异带来了自动化分离上的优势。类似的,造血前体细胞与iPS细胞之间的粘附性质的差异可用于分离。通过将重编程的T细胞或造血祖细胞转移到适合于粘附的培养条件,例如将经辐射的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)置于T细胞的培养容器的底部,衍生自T细胞或造血祖细胞的iPS细胞可以粘附至底部,而T细胞和/或造血祖细胞保留在悬浮液中。以下描述了本发明的进一步的实施方式和优点。

[0053] II.定义

[0054] "重编程"是这样的方法:相对于没有进行重编程的相同条件,其赋予细胞可测的增加的形成至少一种新细胞类型的能力的子代(无论是在培养物中还是在体内)的能力。更具体而言,重编程是赋予体细胞多能潜力的方法。意思是,在足够的增殖之后,可测比例的子代具有新细胞类型的表型特征(如果在重编程之前基本上没有此类子代能够形成);或者,具有新细胞类型的特征的比例比重编程之前是可测的增加。在某些条件下,具有新细胞类型的特征的子代比例可以是至少大约1%、5%、25%或更高,按次序以渐增为优选。

[0055] T细胞的"激活剂"或激活T细胞的条件是指:激活T细胞的刺激物,并且包括抗原,其可以呈递于抗原呈递细胞上或其它的表面;多克隆激活剂,其结合很多T细胞受体(TCR)复合物而与特异性无关,并包括凝集素,例如伴刀豆球蛋白-A(Con-A)和植物凝集素(PHA)以及试剂,例如特异性结合TCR或CD3蛋白上的不变的框架表位的抗体;和超抗原(superantigen),其刺激大量的T细胞,并且包括例如,肠毒素,例如葡萄球菌肠毒素。

[0056] 术语"T淋巴细胞"和"T细胞"相互替换地使用,是指:表达T细胞抗原受体(TCR)的细胞,所述受体当与一种或多种MHC分子或一种或多种非经典的MHC分子一起显示于抗原呈递细胞表面或基质上时,能够识别抗原。

[0057] "$CD4^+$T细胞"是指在其表面表达CD4并且与细胞介导的免疫应答相关的T细胞子集。它们的特征在于刺激之后的分泌谱,其可以包括分泌细胞因子,例如IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4和IL-10。"CD4"是55kD的糖蛋白,其最初定义为T淋巴细胞上的分化抗原,但也存在于其它细胞上,包括单核细胞/巨噬细胞。CD4抗原是免疫球蛋白超基因家族的成员,并且被指是II类MHC(主要组织相容性复合体)限制性免疫应答中的联合识别元件。在T淋巴细胞上,它们定义了辅助/诱导子集。

[0058] "$CD8^+$T细胞"是指在其表面表达CD8的T细胞子集,是I类MHC限制性的,并作为细胞毒性T细胞发挥作用。"CD8"分子是存在于胸腺细胞和细胞毒性和抑制性T淋巴细胞上的分化抗原。CD8抗原是免疫球蛋白超基因家族的成员,并且是I类主要组织相容性复合体限制性相互作用中的联合识别元件。

[0059] "造血祖细胞"或"造血前体细胞"是指定向于造血谱系但能够进一步造血分化的细胞,其包括造血干细胞、多潜能造血干细胞(成血细胞)、髓样祖细胞、巨核细胞祖细胞、红细胞祖细胞和淋巴样祖细胞。造血干细胞(HSC)是多潜能干细胞,其产生所有的血液细胞类型,包括髓样(单核细胞和巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性细胞、嗜曙红细胞、红细胞、巨核细胞/血小板、树突细胞)和淋巴样谱系(T细胞、B细胞、NK细胞)。造血祖细胞可以表达CD34。造血祖细胞可以共表达CD133并且对于CD38之表达是阴性的。在一些实施方式中,某些人类

造血细胞可以不表达CD34，但这些细胞也可以通过本文公开的方法转化为iPS细胞。造血前体细胞包括$CD34^+/CD45^+$造血前体细胞和$CD34^+/CD45^+/CD43^+$造血前体细胞。$CD34^+/CD43^+/CD45^+$造血前体细胞可以就髓样前体细胞高度富集。造血细胞的多个谱系，例如$CD34^+/CD43^+/CD45^+$造血前体细胞，可以通过本文公开的方法转化为iPS细胞。造血细胞可以包括原始造血细胞的多个子集，包括：

[0060] $CD34^-/CD133^+/CD38^-$(原始造血前体细胞)、

[0061] CD43(+)CD235a(+)CD41a(+/-)(红细胞-巨核细胞生成性的)、

[0062] lin(-)CD34(+)CD43(+)CD45(-)(多潜能)，以及

[0063] lin(-)CD34(+)CD43(+)CD45(+)(偏髓样的)细胞、CD133+/ALDH+(醛脱氢酶)(例如Hess等人2004;Christ等人,2007)。预想到：可以按照本文的描述将任意这些原始造血细胞类型或造血前体细胞转化为iPS细胞。

[0064] “载体”或“构建体”(有时称作基因递送或基因转移“介质”)是指大分子或分子复合物，其包含要被递送(体外或体内)进入宿主细胞的多核苷酸。载体可以是线性或环形分子。

[0065] “质粒”是通常类型的载体，是分离自染色体DNA的染色体外DNA分子，其能够独立于染色体DNA而复制。在一些情况下，其是环形的和双链的。

[0066] “表达构建体”或“表达盒”意思是能够指导转录的核酸分子。表达构建体至少包括启动子或功能上等同于启动子的结构。还可以包括另外的元件，例如增强子和/或转录终止信号。

[0067] 当用于与细胞或生物体中的蛋白、基因、核酸或多核苷酸相关时，术语“外源的”是指通过人工或天然方法被导入该细胞或生物体中的蛋白、基因、核酸或多核苷酸；或者，当用于与细胞相关时，是指通过人工或天然方法被分离然后被导入其它细胞或导入生物体的细胞。外源核酸可以来自不同的生物体或细胞，或者其可以是天然存在于生物体或细胞中的核酸的一个或多个另外的拷贝。外源细胞可以来自不同的生物体，或者其可以来自相同的生物体。通过非限制性举例来讲，外源核酸位于与天然细胞中的染色体位置不同的染色体位置上，或者其两侧是不同于天然状态下的核酸序列。

[0068] 术语“对应于”在本文中用于意指多核苷酸序列与参考多核苷酸序列的全部或一部分是同源的(即相同的，非严格进化相关)；或，多肽序列与参考多肽序列是相同的。与此对比，术语“互补于”在本文中用于意指互补性序列与参考多核苷酸序列的全部或一部分是同源的。举例解释：核苷酸序列"TATAC"对应于参考序列"TATAC"并且互补于参考序列"GTATA"。

[0069] “编码”特定蛋白的“基因”、“多核苷酸”、“编码区”、“序列”、“区段”、“片段”或“转基因”是指：在体外或体内时，当被置于合适的调节序列控制下时，转录并任选也被翻译成基因产物例如多肽的核酸分子。编码区可以以cDNA、基因组DNA或RNA形式存在。当以DNA形式存在时，核酸分子可以是单链的(即正义链)或双链的。编码区的边界由5'(氨基)末端的起始密码子和3'(羧基)末端的翻译终止密码子来确定。基因可以包括但不限于，来自原核或真核mRNA的cDNA，来自原核或真核DNA的基因组DNA序列，以及合成的DNA序列。转录终止序列通常位于基因序列的3'端。

[0070] 术语“细胞”在本文中以其在本领域中最宽的含义使用，是指作为多细胞生物体的

组织的结构单元的活体，其由膜结构环绕，所述膜结构将其与外界隔离，其具有自我复制的能力，并且具有遗传信息和用于表达它的机制。如本文使用的“细胞”可以是天然存在的细胞或人工修饰的细胞(例如，融合细胞、遗传修饰的细胞等)。

[0071] 如本文使用的术语“干细胞”是指能够自我复制和具有多能性的细胞。通常而言，干细胞能够使受损的组织再生。本文的干细胞可以是但不限于，胚胎干(ES)细胞或组织干细胞(也称作组织特异性干细胞，或成体干细胞)。任何具有上述能力的人工产生的细胞(例如本文使用的融合细胞、重编程细胞等)都可以是干细胞。

[0072] “胚胎干(ES)细胞”是源自早期胚胎的多能干细胞。ES细胞首先于1981年建立，从1989年开始，其也被用于产生敲除小鼠。在1998年建立了人ES细胞，目前正开始应用于再生医学。

[0073] 与ES细胞不同，组织干细胞具有有限的分化潜力。组织干细胞存在于组织中的特定位置，并且具有未分化的细胞内结构。因此，组织干细胞的多能性通常较低。组织干细胞具有较高的核质比并且具有极少的细胞内细胞器。多数组织干细胞具有低的多能性、长的细胞周期和超出个体寿命的增殖能力。基于细胞所来源的位点例如皮肤系统、消化系统、骨髓系统、神经系统等，组织干细胞被分成多个类别。皮肤系统中的组织干细胞包括表皮干细胞、毛囊干细胞等。消化系统中的组织干细胞包括胰腺(普通)干细胞、肝脏干细胞等。骨髓系统中的组织干细胞包括造血干细胞、间质干细胞等。神经系统中的组织干细胞包括神经干细胞、视网膜干细胞等。

[0074] “诱导的多能干细胞”通常简写为iPS细胞或iPSC，是指通过导入被称作重编程因子的某些因子以人工方式从非多能细胞制备的一类多能干细胞，所述非多能细胞通常是成年体细胞或末端分化的细胞，例如成纤维细胞、造血细胞、肌细胞、神经元、表皮细胞等。

[0075] “多能性”是指干细胞具有分化成构成一种或多种组织或器官或特别是三个胚层中的任一个的所有细胞的潜力：内胚层(胃内层、胃肠道、肺)、中胚层(肌肉、骨骼、血液、泌尿生殖器)或外胚层(表皮组织和神经系统)。如本文使用的“多能干细胞”是指能够分化成源自三个胚层中的任一个的细胞的细胞，例如，全能细胞或诱导的多能细胞的直接后代。

[0076] 就核酸分子而言的“可操作地连接”意指按照允许核酸分子转录的方式连接的两个或更多个核酸分子(例如待转录的核酸分子、启动子和增强子元件)。就肽和/或多肽分子而言，“可操作地连接”意指按照产生单一多肽链、即融合多肽(其具有融合物的每个肽和/或多肽成分的至少一个性质)的方式连接的两个或更多个肽和/或多肽分子。特别地，融合多肽是嵌合的，即，由异源分子组成。

[0077] “同源性”是指两个多核苷酸或两个多肽之间的同一性百分率。一个序列与另一个之间的对应性可以通过本领域已知的技术来确定。例如，同源性可以这样确定：通过比对序列信息并使用容易获得的计算机程序而直接比较两个多肽分子之间的序列信息。备选地，同源性可以这样确定：在同源区形成稳定双链体的条件下使多核苷酸杂交，然后以单链特异性核酸酶消化，并测定消化片段的大小。当使用如上所述的方法测定，至少大约80％、特别是至少大约90％、最特别是至少大约95％的核苷酸或氨基酸各自在确定长度的分子上匹配时，两个DNA或两个多肽序列彼此是“实质上同源的”。

[0078] III.干细胞的一般背景

[0079] 在本发明的一些实施方式中，公开了通过将重编程因子导入体细胞中而重编程体

细胞、尤其是T细胞的方法。这些细胞的子代可以在如下所述的多个方面与胚胎干细胞相同，但基本上不含外源遗传元件。理解胚胎干细胞的特征可以辅助选择诱导的多能干细胞。从干细胞重编程研究中获知的重编程因子可用于这些新方法。还考虑到这些诱导的多能干细胞可以潜在地用于替换胚胎干细胞以用于治疗性和研究性应用，因为使用后者具有伦理方面的阻碍。

[0080] A.干细胞

[0081] 多数情况下(如果不是全部)干细胞是发现于多细胞生物体中的细胞。其特征在于通过有丝细胞分裂进行自我更新的能力以及分化为多种特化细胞类型的能力。两种主要类型的哺乳动物干细胞是：发现于胚泡的胚胎干细胞，和发现于成体组织中的成年干细胞。在发育中的胚胎中，干细胞能够分化成所有的特化胚胎组织。在成年生物体中，干细胞和祖细胞作为身体的修复系统，补充特化细胞，但也维持再生器官例如血液、皮肤或肠组织的正常周转。

[0082] 由于干细胞可以通过细胞培养而生长并转化为具有与多种组织例如肌肉或神经的细胞一致的特征性特化细胞，所以已经建议其用于医学治疗。尤其是，通过治疗性克隆产生的胚胎细胞系、自体同源胚胎干细胞，以及来自脐带血或骨髓的高度可塑性的成年干细胞被认为是有前景的候选物。最近，成年细胞重编程为诱导的多能干细胞已经具有替代胚胎干细胞的巨大潜力。

[0083] B.胚胎干细胞

[0084] 胚胎干细胞系(ES细胞系)是源自胚泡或更早的桑葚胚时期的胚胎的内细胞群(ICM)的外胚层组织的细胞培养物。胚泡是早期胚胎——在人类中是大约4至5天，由50-150个细胞组成。ES细胞是多能的，在发育过程中产生三个主要胚层：外胚层、内胚层和中胚层的所有衍生物。换言之，当给予特定细胞类型的足够和必需的刺激时，它们可以发育为成体的200种以上的细胞类型中的每一种。它们对胚胎外的膜或胎盘没有贡献。

[0085] 到目前为止，几乎所有的研究都是使用小鼠胚胎干细胞(mES)或人类胚胎干细胞(hES)进行的。二者都具有实质性的干细胞特征，但是它们需要差异极大的环境以维持未分化状态。小鼠ES细胞可以生长于明胶层上，并且需要白血病抑制因子(LIF)的存在。人ES细胞可以生长于小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养层上，通常需要碱性成纤维细胞生长因子(bFGF或FGF-2)的存在。如果没有最佳培养条件或遗传操作(Chambers等人，2003)，胚胎干细胞将迅速分化。

[0086] 人类胚胎干细胞还可以根据数种转录因子和细胞表面蛋白的存在来确定。转录因子Oct4、Nanog和Sox2构成核心调节网络，其确保引起分化的基因的阻抑和多能性的维持(Boyer等人，2005)。最常使用的鉴定hES细胞的细胞表面抗原包括糖脂SSEA3和SSEA4以及硫酸角质素抗原Tra-1-60和Tra-1-81。

[0087] 经过20年的研究之后，没有经批准的使用胚胎干细胞的治疗或人类试验。ES细胞是多能细胞，其需要特定的信号以进行正确的分化——如果直接注入体内，ES细胞将分化成很多不同类型的细胞，引起畸胎瘤。使ES细胞分化为可用的细胞并避免移植排斥仅仅是胚胎干细胞研究仍然面临的障碍中的一小部分。很多国家目前禁止ES细胞的研究或新的ES细胞系的产生。由于胚胎干细胞具有无限扩增和多能性的组合能力，胚胎干细胞仍然是损伤或疾病之后的再生医学和组织替换的理论潜在来源。比较而言，解决这些问题的一种方

案是通过直接重编程在体细胞中诱导多能状态。

[0088] IV.重编程因子

[0089] 用于诱导的重编程因子对于iPS细胞的产生具有关键意义。以下因子或其组合可用于本发明公开的方法中。在一些方面，重编程载体中将包括编码Sox和Oct(特别是Oct3/4)的核酸。例如，一个或多个重编程载体可以包含编码Sox2、Oct4、Nanog和任选Lin28的表达盒，或编码Sox2、Oct4、Klf4和任选c-Myc的表达盒，或编码Sox2、Oct4和任选Esrrb的表达盒，或编码Sox2、Oct4、Nanog、Lin-28、Klf4、c-Myc和任选SV40大的T抗原的表达盒。编码这些重编程因子的核酸可以包含在同一表达盒中、不同表达盒中、同一重编程载体中，或不同重编程载体中。

[0090] Oct4和Sox基因家族的一些成员(Sox1、Sox2、Sox3和Sox15)已经被鉴定为参与诱导过程的关键性转录调节子，其缺失会使诱导不能进行。另一方面，另外的基因，包括Klf家族的一些成员(Klf1、Klf2、Klf4和Klf5)、Myc家族的一些成员(c-Myc、L-Myc和N-Myc)、Nanog和Lin28已经被鉴定为增强诱导效率。

[0091] Oct4(Pou5f1)是八聚合体(octamer，"Oct")家族转录因子之一，在维持多能性方面具有关键作用。$Oct4^{+}$细胞例如卵裂球和胚胎干细胞中Oct4的缺失会导致自发的滋养层分化，因此Oct4的存在产生胚胎干细胞的多能性和分化潜力。"Oct"家族中的多个其它基因，包括Oct4的近亲Oct1和Oct6，不能引发诱导，因此证明了Oct-4在诱导过程中的专有性。

[0092] 与Oct4类似，Sox基因家族与维持多能性相关，虽然其与多潜能(multipotent)和单能干细胞相关，而Oct4与此相反，Oct4专有性地在多能干细胞中表达。虽然Sox2是用于重编程诱导的最初基因，但是发现Sox家族中的其它基因也在诱导过程中同样起作用。Sox1以类似于Sox2的效率产生iPS细胞，基因Sox3、Sox15和Sox18也产生iPS细胞，虽然效率较低。

[0093] 在胚胎干细胞中，Nanog以及Oct4和Sox2是促进多能性所需的。因此，当Yamanaka等人报道"Nanog对于诱导不是必需的、但Thomson等人报道可以使用Nanog作为因子之一来产生iPS细胞时，是令人惊奇的。

[0094] Lin28是一种mRNA结合蛋白，其在胚胎干细胞和胚胎癌细胞中表达，与分化和增殖相关。Thomson等人证明其是产生iPS的一个因子，虽然其不是必需的。

[0095] Klf基因家族的Klf4最初由Yamanaka等人鉴定，并由Jaenisch等人确认为用于产生小鼠iPS细胞的因子，并由Yamanaka等人证明是用于产生人类iPS细胞的因子。然而，Thompson等人报道:Klf4对于人类iPS细胞的产生不是必需的，事实上其不能产生人类iPS细胞。发现Klf2和Klf4是能够产生iPS细胞的因子，相关的基因Klf1和Klf5同样也是，虽然效率较低。

[0096] Myc基因家族是牵涉于癌症的原癌基因。Yamanaka等人和Jaenisch等人证明c-Myc是牵涉于小鼠iPS细胞之产生中的因子，Yamanaka等人证明其是牵涉于人类iPS细胞之产生中因子。然而，Thomson等人和Yamanaka等人报道c-Myc对于产生人类iPS细胞不是必需的。将"Myc"基因家族用于诱导iPS细胞对于iPS细胞最终作为临床治疗具有麻烦，因为25％的移植了c-Myc诱导的iPS细胞的小鼠产生致命性畸胎瘤。N-Myc和L-Myc已经被鉴定为以类似的效率进行诱导(替代c-myc)。SV40大抗原可用于减少或防止当表达c-Myc时可能发生的细胞毒性。

[0097] 本发明中使用的重编程蛋白可以被具有大约相同的重编程功能的蛋白同源物替

代。编码这些同源物的核酸也可用于重编程。保守性氨基酸置换是优选的，即，例如，作为极性酸性氨基酸的天冬氨酸/谷氨酸；作为极性碱性氨基酸的赖氨酸/精氨酸/组氨酸；作为非极性或疏水性氨基酸的亮氨酸/异亮氨酸/甲硫氨酸/缬氨酸/丙氨酸/甘氨酸/脯氨酸；作为极性或不带电的亲水性氨基酸的丝氨酸/苏氨酸。保守性氨基酸置换还包括基于侧链的分组。例如，具有脂肪族侧链的一组氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸；具有含酰胺侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺；具有芳香族侧链的一组氨基酸是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸；具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。例如，可以合理预期：将亮氨酸替换为异亮氨酸或缬氨酸、将天冬氨酸替换为谷氨酸、将苏氨酸替换为丝氨酸、或类似地将氨基酸替换为结构上相关的氨基酸将不会对得到的多肽的性质产生大的影响。可以通过测定多肽的比活性容易地确定氨基酸替换是否产生功能性多肽。

[0098] V.T细胞和/或造血前体细胞的重编程

[0099] 为了从目前本领域通常使用的皮肤成纤维细胞之外的备选来源提供iPS细胞，提供了用于重编程包含T细胞的细胞群体的方法。在一些实施方式中，激活并扩增T细胞以提供显著数目的T细胞用于重编程。

[0100] A.T细胞

[0101] 术语“T细胞”是指如本领域中定义的T淋巴细胞并意在包括胸腺细胞、未成熟T淋巴细胞、成熟的T淋巴细胞、静止的T淋巴细胞或激活的T淋巴细胞。T细胞可以是$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、$CD4^+CD8^+$T细胞或$CD4^-CD8^-$细胞。T细胞也可以是T辅助细胞，例如T辅助1(TH1)或T辅助2(TH2)细胞或TH17细胞，以及细胞毒性T细胞、调节性T细胞、自然杀伤T细胞、幼稚T细胞、记忆T细胞或γδT细胞(Wilson等人，2009；Wynn，2005；Ladi等人，2006)。彼此差别在于至少一种标志物例如CD4的T细胞，在本文中被称作T细胞的“子集”。

[0102] 辅助T细胞(效应T细胞或Th细胞)是适应性免疫系统的“中间者”。一旦被激活，它们迅速分裂并分泌被称作细胞因子的小的蛋白，所述细胞因子调节或辅助免疫应答。取决于大小、接收到的细胞因子信号，这些细胞分化为TH1、TH2、TH3、TH17、THF或其它子集中的一种，它们分泌不同的细胞因子。$CD4^+$细胞与II类MHC相关。

[0103] 细胞毒性T细胞(TC细胞或CTL)破坏被病毒感染的细胞和肿瘤细胞，并且也被指参与移植排斥。这些细胞也被称作$CD8^+$T细胞(与I类MHC相关)，因为它们在其表面表达CD8糖蛋白。通过SLOB与T调节性$CD4^+CD25^+FoxP3^+$细胞的相互作用，这些细胞可以被灭活为无变应性状态，这预防了自身免疫疾病，例如实验性自身免疫性脑脊髓炎。

[0104] 记忆T细胞是感染消退之后长期持续的抗原特异性T细胞的子集。在重新暴露于它们的同种抗原(cognate antigen)之后，它们迅速扩增为大量的效应T细胞，从而为免疫系统提供针对过往感染的“记忆”。记忆T细胞包括两个子集：中心记忆T细胞(TCM细胞)和效应记忆T细胞(TEM细胞)。记忆细胞可以是$CD4^+$或$CD8^+$。

[0105] 调节性T细胞(Treg细胞)，以前被称作抑制性T细胞，对于维持免疫耐受是关键性的。它们类似于表达常规αβTCR的CD4+细胞。它们可以进一步表征为CD25和Foxp3蛋白的共表达。它们的主要作用是在将近免疫反应的末期关闭T细胞介导的免疫力，并且抑制那些逃脱了胸腺中的阴性选择过程的自身反应性T细胞。已经描述了$CD4^+$调节性T细胞的两个主要

类别，包括自然产生的Treg细胞和适应性Treg细胞。自然产生的Treg细胞（也称作$CD4^+CD25^+FoxP3^+$Treg细胞）产生于胸腺中，而适应性Treg细胞（也称作Tr1细胞或Th3细胞）可以在正常免疫应答过程中起源。通过被称作FoxP3的细胞内分子的存在可以将自然产生的Treg细胞与其它T细胞区别开。FOXP3基因的突变可以阻止调节性T细胞发育，引起胎儿自身免疫疾病IPEX。

[0106] 自然杀伤T细胞（NK T细胞）是异质的T细胞群体，其特征在于共表达αβ或γδTCR和多种NK受体，包括CD16，CD56，CD161，CD94，CD158a和CD158b。NK T细胞具有在激活后迅速分泌大量细胞因子的能力。NK T细胞克隆分泌1型、2型或这两种类型的细胞因子，其可以影响Th0细胞向Th1或Th2细胞的分化。NK T细胞被描述为：在小鼠中是表达不变的TCR Vα14的细胞，在人类中是表达不变的TCR Vα24的细胞。最近，也已经认识到了表达多种TCR的NK T细胞。$CD3^+CD56^+$细胞代表NK T细胞群体的一种。NK T细胞可以是$CD4^+CD8^+$，$CD4^-CD8^-$，$CD4^-CD8^+$或$CD4^+CD8^-$。

[0107] γδT细胞（伽玛德尔塔T细胞）代表在它们的表面具有独特的T细胞受体（TCR）的T细胞的小的子集。大多数T细胞具有由被称作α-和β-TCR链的两个糖蛋白链构成的TCR。然而，在γδT细胞中，TCR由1个γ-链和1个δ-链组成。该组T细胞相对于αβT细胞较不常见（全部T细胞的5％），但是在肠道粘膜中其丰度最高，在被称作上皮内淋巴细胞（IEL）的淋巴细胞群体内。激活γδT细胞的抗原性分子仍然是未知的。但是，γδT细胞不是MHC限制性的，并且似乎能够识别整个蛋白，而不需要抗原呈递细胞上的MHC分子呈递肽。一些识别IB类MHC分子。人Vγ9/Vδ2T细胞构成外周血中的主要γδT细胞群体，它们是独特的，因为它们特异性且迅速对小的非肽微生物代谢物HMB-PP（异戊烯焦磷酸前体）作出应答。存在于来自健康供体的外周血中的T细胞的百分率估计如下：$CD3^+$＝70.78％±4.71；$CD3^+CD4$＝38.97％±5.66；$CD3^+CD8$＝28.955％±7.43；$CD3^+CD56^+$＝5.22％±1.74；$CD3^-CD56^+$＝10.305％±4.7；$CD3^+CD45RA$＝45.00％±7.19；$CD3^+CD45RO^+$＝27.21％±7.34。

[0108] T细胞可以是T细胞的纯化的群体，或者备选地，T细胞可以在与不同类型的细胞、例如B细胞和/或其它外周血细胞的群体中。T细胞可以是T细胞的子集、例如$CD4^+$T细胞的纯化的群体，或者，它们可以是包含T细胞的不同子集的T细胞的群体。在本发明的另一个实施方式中，T细胞是已经在培养物中维持了延长的时间段的T细胞克隆。T细胞克隆可以转化至不同程度。在具体的实施方式中，T细胞是在培养物中无限增殖的T细胞克隆。

[0109] 在本发明的优选实施方式中，T细胞是原代T细胞。术语“原代T细胞”意指包括获自个体的T细胞，与在培养物中维持了延长的时间段的T细胞不同。因此，原代T细胞特别是获自受试者的外周血T细胞。原代T细胞的群体可以主要由T细胞的一个子集组成。备选地，原代T细胞的群体可以由T细胞的不同子集组成。

[0110] T细胞可以来自之前储存的血液样品，来自健康个体，或备选地，来自被某病况影响的个体。所述病况可以是感染性疾病，例如由病毒感染、细菌感染或任何其它微生物感染引起的病况，或过度增生性疾病，例如癌症，例如黑素瘤。在具体的实施方式中，T细胞来自感染了人免疫缺陷病毒（HIV）的个体。在本发明的另一个实施方式中，T细胞来自患有自身免疫疾病或T细胞病症或对其易感的受试者。T细胞可以来源于人、鼠或任何其它哺乳动物物种。

[0111] B.造血祖细胞

[0112] 由于造血干细胞和造血祖细胞的显著的医学潜在意义，已经进行了实质性工作以试图改善从胚胎干细胞分化造血祖细胞的方法。在成人中，主要存在于骨髓中的造血干细胞产生活跃分裂的造血($CD34^+$)祖细胞的异质群体，所述祖细胞分化为血液系统的所有细胞。虽然预期到$CD34^+$内皮细胞可以被转化为iPS细胞，但是在一些实施方式中，使用非内皮细胞的造血细胞可能是理想的；例如，在一些情况下，使用不表达CD31或VE-钙粘蛋白的造血祖细胞或造血前体细胞可能是理想的。其它标志物，例如CD43和/或CD45标志物，也可用于辅助鉴定造血祖细胞(例如，Kadaja-Saarepuu等人，2008；Vodyanik等人，2006)。造血细胞包括原始造血细胞的多个子集，包括：

[0113] CD43(+)CD235a(+)CD41a(+/-)(红细胞-巨核细胞生成性的)，

[0114] lin(-)CD34(+)CD43(+)CD45(-)(多潜能)，和

[0115] lin(-)CD34(+)CD43(+)CD45(+)(偏髓样的)细胞。在成人中，造血祖细胞增殖并分化，引起每日产生数千亿成熟的血液细胞。造血祖细胞也存在于脐带血中。在体外，人胚胎干细胞可以分化为造血祖细胞。也可以从外周血样品扩增或富集造血祖细胞。造血细胞可以来源于人、鼠或任何其它哺乳动物物种。

[0116] C.细胞群体的来源

[0117] 造血干细胞(HSC)通常产生于骨髓中，但可被迫使进入血液，该过程被称作动员(mobilization)，在临床上用于收获外周血中大量数目的HSC。所选的一种动员剂是粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。

[0118] 可以通过血液成分去除法，在无扰状态，或在外部施用造血生长因子例如G-CSF动员之后，收集在外周血中循环的$CD34^+$造血干细胞或祖细胞。在动员之后收集的干或祖细胞的数目大于在无扰状态下在血液成分去除法之后获得的数目。在本发明的具体方面，细胞群体的来源是这样的受试者：其细胞未经外部施用的因子动员，因为无需富集造血干细胞或造血祖细胞。

[0119] 用于本文描述的方法中的细胞的群体可以是哺乳动物细胞，例如人类细胞，非人灵长类细胞，啮齿类细胞(例如小鼠或大鼠)，牛细胞，羊细胞，猪细胞，马细胞，绵羊细胞，犬细胞，猫细胞，或其混合物。非人灵长类细胞包括猕猴细胞。细胞可以获自动物，例如人类患者，或者它们可以来自细胞系。如果细胞是获自动物，则它们可以用作，例如，未分离的细胞(即，混合的群体)；它们可以已经在培养物中建立，例如，通过转化；或者它们可以已经经历初步纯化方法。例如，可以基于细胞表面标志物的表达通过阳性或阴性选择操作细胞群体；在体外或在体内以一种或多种抗原刺激；在体外或在体内以一种或多种生物修饰剂处理；或这些中的任意或全部项的组合。在示例性实施方式中，细胞群体经历阴性选择以消除非T细胞和/或特定T细胞子集。阴性选择可以基于多种分子的细胞表面表达来进行，包括：B细胞标志物，例如CD19和CD20；单细胞标志物CD14；NK细胞标志物CD56。备选地，细胞群体可以经历阴性选择以消除非$CD34^+$造血细胞和/或特定的造血细胞子集。阴性选择可以基于多种分子的细胞表面表达来进行，例如，抗体的混合物(例如，CD2，CD3，CD11b，CD14，CD15，CD16，CD19，CD56，CD123和CD235a)，其可用于分离其它细胞类型，例如通过MACS或柱分离。

[0120] 细胞的群体包括外周血单核细胞(PBMC)、含有混合群体的全血或其级份，脾细胞，骨髓细胞，肿瘤浸润性淋巴细胞，通过白细胞去除术获得的细胞，生物活组织检查样品，淋巴结，例如从肿瘤引流的淋巴结。合适的供体包括经免疫的供体、非免疫的(原态)供体、经

处理的或未经处理的供体。“经处理的”供体是已经暴露于一种或多种生物修饰剂的供体。“未经处理的”供体是未暴露于一种或多种生物修饰剂的供体。

[0121] 获得包含T细胞的细胞群体的方法是本领域熟知的。例如，可以根据本领域已知的方法获得外周血单核细胞(PBMC)。此类方法的实例见实施例部分并由Kim等人(1992)；Biswas等人(1990)；Biswas等人(1991)讨论。

[0122] 从细胞群体获得造血前体细胞的方法也是本领域熟知的。可以使用多种细胞因子扩增造血前体细胞，例如hSCF、hFLT3和/或IL-3(Akkina等人，1996)，或者可以使用MACS或FACS富集$CD34^+$细胞。如上所述，也可使用阴性选择技术来富集$CD34^+$细胞。

[0123] 也可以从受试者获得细胞样品，然后就所需的细胞类型富集之。例如，可以根据本文的描述从血液分离PBMC和/或$CD34^+$造血细胞。可以使用逆流离心法(淘析)从PBMC中富集T细胞。也可以使用多种技术从其它细胞分离细胞，例如，使用结合于所需的细胞类型的细胞表面上的表位的抗体来分离和/或激活，例如，一些T细胞分离试剂盒使用缀合于珠子的抗体激活细胞，然后使用相同的珠子进行柱分离。可以使用的另一种方法包括：使用针对细胞表面标志物的抗体进行阴性选择，以选择性富集特定细胞类型而不通过受体的介入激活细胞。

[0124] 骨髓细胞可以获自髂嵴、股骨、胫骨、脊骨、肋骨或其它骨髓腔。可以从患者取出骨髓并通过多种分离和洗涤程序分离。用于分离骨髓细胞的已知程序包括以下步骤：a)将骨髓悬浮液离心分离为3个级份，并收集中间级份，或棕黄层；b)在单独的液体、通常为Ficoll(Pharmacia Fine Chemicals AB的商标)中再离心来自步骤a)的棕黄层级份1次，收集含有骨髓细胞的中间级份；和c)洗涤来自步骤b)的收集的级份以回收可输送的骨髓细胞。

[0125] 如果希望使用富含T细胞的细胞群体，则可以通过白细胞去除术和机械血液成分去除法，使用连续流动细胞分离器，从混合的细胞群体获得此类细胞群体。例如，可以通过任意已知的方法从棕黄层分离T细胞，包括在Ficoll-Hypaque™梯度上分离，在Percoll梯度上分离，或通过淘析。

[0126] D.T细胞激活

[0127] 在一些方面，T细胞被试剂激活，所述试剂结合T细胞受体以激发用于T细胞激活的信号级联。例如，可以使用CD3抗体。为了使T细胞扩增为大量的数目和增殖性状态以用于重编程，也可以使用细胞因子，例如IL-2。

[0128] 幼稚T细胞可以生存很多年而不分裂。这些小的静止细胞具有致密的染色质和贫乏的细胞质并合成极少的RNA或蛋白质。在激活后，它们必须重新进入细胞周期并迅速分裂以产生大量的子代，所述子代将分化为武装的效应T细胞。它们的增殖和分化由被称作白介素-2(IL-2)的细胞因子介导，该细胞因子是由激活的T细胞本身产生的。

[0129] 在存在所需的共刺激信号的情况下，与特定抗原的最初相遇会激发T细胞进入细胞周期的G_1期；同时，其还诱导IL-2以及IL-2受体的α链的合成。IL-2受体具有3条链：α、β和γ。静止T细胞表达由β和γ链组成的该受体，其以中等亲和性结合IL-2，允许静止T细胞对非常高浓度的IL-2作出应答。α链与β和γ链的结合会产生具有针对IL-2的高得多的亲和性的受体，允许细胞对非常低浓度的IL-2作出应答。然后，IL-2与高亲和性受体的结合激发越过细胞周期的静止期的进程。通过这种方式激活的T细胞能够在1天内分裂2-3次，持续数天，允许1个细胞产生由数千个子代组成的克隆，所述子代都携带相同的针对抗原的受体。

IL-2还促进这些细胞分化为武装的效应T细胞。

[0130] 虽然不同类别的T细胞的具体激活机理稍有差别，但对于多数而言，$CD4^+$T细胞采用“双信号模式”。$CD4^+$T细胞的激活通过T细胞受体与T细胞上的CD28的啮合进行，分别通过APC上的主要组织相容性复合物肽和B7家族成员进行。二者对于产生有效免疫应答都是必需的；在不存在CD28共刺激的情况下，单独的T细胞受体信号传导导致无反应性。CD28和T细胞受体下游的信号传导途径涉及很多蛋白。

[0131] 第一信号是通过T细胞受体与另一细胞上的主要组织相容性复合物(MHC)呈递的短肽的结合而提供的。这确保了只有那些具有特异于该肽的TCR的T细胞被激活。伴侣细胞通常是专职的抗原呈递细胞(APC)，在原始应答的情况下，通常是树突细胞，虽然B细胞和巨噬细胞也可以是重要的APC。由I类MHC分子呈递至$CD8^+$T细胞的肽的长度是8-9个氨基酸；由II类MHC分子呈递至$CD4^+$T细胞的肽更长，因为II类MHC分子的结合裂口的末端是开放的。

[0132] 第二信号来自共刺激，其中APC上的表面受体是由数量相对少的刺激物诱导的，通常是病原体的产物，但有时是细胞的分解产物，例如坏死体或热激蛋白。幼稚T细胞组成型表达的仅有的共刺激受体是CD28，所以这些细胞的共刺激来自APC上的CD80和CD86蛋白。在T细胞激活后也表达其它受体，例如OX40和ICOS，但它们的表达很大程度上依赖于CD28。第二信号许可T细胞对抗原作出应答。如果没有它，T细胞变得无反应性，并且其将来的激活也变得更难。该机制防止对自身的不适当应答，因为自身肽通常不与适宜的共刺激呈递。

[0133] 在一些方面，当涉及共刺激时，抗-CD3和抗-CD28二者可用于T细胞激活。在备选方面，可以应用抗-CD3的交联，例如结合于平板的抗-CD3。如果可溶性抗-CD3用于激活PBMC中的T细胞，该可溶性抗-CD3抗体可以与PBMC中的APC结合，然后其将抗体呈递至T细胞。如果在纯化的T细胞的群体中仅使用可溶性抗-CD3抗体，因为上述原因，将导致无反应性。本发明的一些实施方式包括在存在抗-CD3(OKT3)和IL2的情况下培养T细胞，这是有利的和方便的，因为无需使用昂贵和麻烦的珠子或结合于平板的抗体；在加入OKT3和IL2之后，PBMC的细胞环境将辅助激活T细胞。然后，T细胞由于优先扩增而相对于PBMC培养物中的其它细胞类型变得过密。

[0134] T细胞受体以数个蛋白的复合物存在。实际的T细胞受体由两个单独的肽链组成，其是由独立的T细胞受体α和β(TCRα和TCRβ)基因产生的。复合物中的其它蛋白是CD3蛋白：CD3ε γ 和CD3εδ异二聚体，以及，最重要的，CD3ζ同二聚体，其具有总共6个ITAM基序。CD3ζ上的ITAM基序可以被Lck磷酸化，继而募集ZAP-70。Lck和/或ZAP-70也可以将很多其它分子(同样重要的CD28、LAT和SLP-76)上的酪氨酸磷酸化，这允许信号传导复合物在这些蛋白周围聚集。

[0135] 磷酸化的LAT募集SLP-76至膜，在那里其可以引来PLCγ、VAV1、Itk和潜在地，PI3K。PLCγ和PI3K二者都作用于膜的内小叶上的PI(4,5)P2，以产生活性中间体二酰基甘油(DAG)、肌醇-1,4,5-三磷酸(IP3)和磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3)。DAG结合并激活T细胞上的一些PKC，例如PKCθ，该过程对于激活转录因子NF-κB和AP-1具有重要意义。IP3由PLCγ从膜释放，并迅速扩散以激活ER上的受体，这诱导钙的释放。然后，释放的钙激活钙神经素，钙神经素激活NFAT，然后其转位至细胞核。NFAT是转录因子，其激活多向性的一组基因的转录，最特别是IL-2，其是促进激活的T细胞的长期增殖的细胞因子。

[0136] 根据本发明的方法，将核酸分子导入活跃增殖(即扩增)的T细胞。可以通过将T细

胞与多种试剂(例如提供原始刺激信号的试剂与针对T细胞的共刺激信号的组合)接触来刺激T细胞以使其扩增。可用于刺激T细胞以使其扩增的试剂是本领域熟知的,并且在下文中描述。被刺激而增殖的T细胞的特征在于细胞扩大、簇集和培养基的酸化。因此,T细胞增殖可以通过例如检查T细胞的尺寸或测定其体积(例如使用库耳特计数器)来证明。静止T细胞具有大约6.8微米的平均直径。在最初激活和刺激之后,T细胞的平均直径将在第4天时增加至超过12微米,并在约第6天时开始降低。此外,可以通过本领域已知的标准技术测定T细胞增殖,例如通过氚标记的胸苷摄取。

[0137] 本发明的方法涉及,在将核酸分子导入增殖中的T细胞之前将增殖中的T细胞与至少一种刺激剂接触。术语"刺激剂"意在包括向T细胞提供信号的试剂,从而,相对于导入核酸分子之前不将T细胞与刺激剂接触的情况,当在将核酸分子导入T细胞之前将T细胞与刺激剂接触时,被转染进入T细胞的核酸分子中包含的基因的表达水平较高。

[0138] 在本发明的具体实施方式中,刺激剂是向T细胞提供原始激活信号的试剂。表述"原始激活信号"意在包括通常通过TCR/CD3复合物激活的信号,其诱导T细胞的激活。T细胞的激活意在包括T细胞的修饰,从而T细胞在接收到第二信号、例如共刺激信号之后被诱导以增殖并分化。在具体的实施方式中,原始激活信号由接触T细胞受体或与T细胞受体相关的CD3复合物的试剂提供。在优选实施方式中,试剂是针对CD3的反应性抗体,例如单克隆抗体OKT3(可获自美国典型培养物保藏中心,Rockville,Md.;No.CRL 8001)。在本发明的另一个实施方式中,刺激剂是刺激T细胞上的CD2复合物的试剂,例如抗体的组合,例如T11.3+T11.1,或T11.3+T11.2(见,例如Meuer等人,1984)。

[0139] 在方法的另一个实施方式中,刺激剂是淋巴因子,例如IL-2。淋巴因子特别与另一试剂组合使用,例如向T细胞提供原始激活信号的试剂,用于刺激T细胞。因此,在本发明的优选实施方式中,在以核酸分子转染T细胞之前,将T细胞与向T细胞提供原始激活信号的试剂(例如,抗-CD3抗体)和有效量的IL-2的组合接触,从而核酸分子在T细胞中表达。

[0140] 在本发明的优选实施方式中,T细胞被刺激T细胞中的原始激活信号和共刺激信号的试剂组合所激活。术语"共刺激试剂"意在包括向T细胞提供共刺激信号的试剂,从而已经接收到原始激活信号的T细胞(例如激活的T细胞)被刺激而增殖或分泌细胞因子,例如IL-2、IL-4或干扰素-γ。在具体的实施方式中,共刺激试剂与T细胞表面上的CD28或CTLA4分子相互作用。在更具体的实施方式中,共刺激信号是CD28或CTLA4的配体,例如B-淋巴细胞抗原B7-1或B7-2。词语"刺激形式的CD28的天然配体"意在包括B7-1和B7-2分子,其片段或其修饰,它们能够向T细胞提供共刺激信号。刺激形式的CD28的天然配体可以这样鉴定:例如,将激活的外周血淋巴细胞与一定形式的CD28的天然配体接触,并进行标准的T细胞增殖检验。因此,刺激形式的CD28的天然配体能够刺激T细胞的增殖。刺激形式的CD28/CTLA4的天然配体描述于例如PCT公开号WO 95/03408。

[0141] 可用于在将核酸分子导入T细胞之前激活T细胞的其它试剂包括:刺激参与T细胞激活和/或共刺激的一个或多个细胞内信号转导途径的试剂。在本发明的具体实施方式中,刺激剂是钙离子载体,例如离子霉素或A23187。备选地,刺激剂可以是刺激蛋白激酶C的试剂,例如佛波酯。优选的佛波酯是佛波醇12,13-二丁酸酯。在本发明的更优选的实施方式中,将T细胞与钙离子载体与佛波酯的组合接触,然后以核酸分子进行转染。刺激剂也可以是激活蛋白酪氨酸激酶的试剂。刺激蛋白酪氨酸激酶的优选试剂是过钒酸(O'Shea等人,

1992)。

[0142] 在本发明的另一个实施方式中，刺激剂是多克隆激活剂。多克隆激活剂包括与T细胞的细胞膜表面上表达的糖蛋白结合，并且包括凝集素，例如植物凝血素(PHA)、伴刀豆球蛋白(Con A)和美洲商陆有丝分裂原(PWM)。

[0143] 通过向克隆提供特异性激活信号，可以选择性地仅转染T细胞群体中的T细胞的某个克隆。T细胞克隆的特定激活可以通过例如使用抗原呈递细胞呈递的特定抗原来实现。

[0144] 可以使用的其它刺激剂包括超抗原。如本文定义的术语“超抗原”意在包括细菌肠毒素，或能够刺激T细胞增殖的其它细菌蛋白。超抗原包括葡萄球菌肠毒素(SE)，例如SEA、SEB、SEC、SED和SEE。超抗原也可以是病毒来源的，例如逆转录病毒超抗原。

[0145] 本发明的范围内还包括能够刺激T细胞的另外的试剂，无论是单独还是与其它试剂组合，其可使用本领域已知的或本文描述的T细胞刺激检验法来鉴定。对于在将核酸分子导入T细胞之前刺激T细胞，可以使用上文描述的试剂的任意组合。

[0146] 可以使用溶液中的刺激剂，或附着于固体表面的刺激剂。所述固体表面可以是例如，组织培养皿或珠的表面。取决于刺激剂的性质，可以通过本领域熟知的方法进行与固体表面的连接。例如，可以使用商业上可获得的交联剂(Pierce,Rockford Ill.)将蛋白质化学地交联于细胞表面，或者通过在4℃过夜温育而固定于塑料。如果使用数种试剂刺激T细胞，则一些试剂可以在溶液中而一些试剂可以附着于固体支持物。在优选实施方式中，以偶联于固相的抗-CD3抗体和可溶性抗-CD8抗体的组合刺激T细胞。

[0147] 加入至T细胞的刺激剂的具体剂量将随着刺激剂的类型而变化。通常而言，所用的刺激剂的剂量与本领域中描述的它们用于刺激T细胞以增殖和分泌细胞因子的剂量相同。

[0148] 在本发明的优选实施方式中，本发明的方法进一步包括在转染T细胞之后，在体外刺激T细胞以使其扩增。可以在存在IL-2的情况下按照实施例部分的描述在体外刺激T细胞以使其扩增。在具体的实施方式中，也可以将T细胞与提供原始激活信号的试剂、例如抗-CD3和提供共刺激信号的试剂、例如抗-CD28抗体一起温育。

[0149] 在更优选的实施方式中，T细胞是原代T细胞。因此，T细胞可以获自受试者，根据本发明的方法转染，并在体外扩增。在本发明的另一实施方式中，转染和扩增的T细胞被重新施用至受试者。可能优选的是，在施用至受试者之前，进一步纯化T细胞，例如通过梯度离心。

[0150] E.V(D)J重组

[0151] 本发明人发现T细胞受体中的V(D)J重组不抑制T细胞重编程。在一些方面，源自T细胞的iPS细胞的特定重组可作为独特的“条形码”以追踪iPS细胞并鉴定iPS细胞的不同群体。在其它方面，也可以提供具有V、D、J基因区段的不完整的组(与具有V、D、J基因区段的原始的组的胚胎干细胞相比)的iPS细胞。这些iPS细胞的V、D、J基因区段的排列在克隆群体内可以是相同的，但是在不同克隆群体之间可以是不同的。在具体方面，也可以使用本方法重编程γ/δTCR^{+}T细胞。源自T细胞的该群体之一的iPS克隆可以是有利的，因为它们可以具有更密切类似于种系构型的基因组，因此可以能够重新分化为更稳健的T细胞总汇(repertoire)或例如其它分化的细胞。

[0152] V(D)J重组是发生于脊椎动物中的遗传重组机制，其随机选择并组装编码在免疫系统中具有重要意义的特定蛋白的基因区段。这种位点特异性重组反应产生T细胞受体

(TCR)和免疫球蛋白(Ig)分子的多种总汇,它们对于识别来自细菌、病毒和寄生虫入侵者和来自功能紊乱的细胞例如肿瘤细胞的多种抗原是必需的。

[0153] 多数T细胞受体由α链和β链组成。T细胞受体基因类似于免疫球蛋白基因:二者在它们的β链中含有多个V、D和J基因(以及在它们的α链中含有V和J基因),所述基因在淋巴细胞的发育过程中重排以向该细胞提供独特的抗原受体。

[0154] 在T细胞发育过程中,T细胞受体(TCR)链进行与免疫球蛋白基本上相同顺序的有序的重组事件。D-至-J重组首先发生于TCR的β链。该过程可以包括$D_\beta1$基因区段与6个$J_\beta1$区段之一的连接,或$D_\beta2$基因区段与6个$J_\beta2$区段之一的连接。DJ重组之后是(如上所述)V_β-至-$D_\beta J_\beta$重排。新形成的复合体中的V_β-D_β-J_β基因之间的所有基因被删除,引入了恒定域基因(V_β-D_β-J_β-C_β)的初级转录本被合成。mRNA转录剪接掉任何插入序列并允许TCR C_β链的全长蛋白的翻译。

[0155] TCR的α链的重排在β链重排之后,并类似于就Ig轻链所描述的V-至-J重排(见上文)。β-和α-链的组装导致在多数T细胞中表达的αβ-TCR的形成。

[0156] VI.重编程因子的表达和转导

[0157] 在本发明的一些方面,从包含于一种或多种载体、例如整合载体或游离载体中的表达盒表达重编程因子。在另外的方面,可以将重编程蛋白通过蛋白转导直接导入体细胞(见美国申请号61/172,079,通过引用方式并入本文)。

[0158] A.整合载体

[0159] 在本发明中,可以通过将某些编码重编程蛋白的核酸基因转染进入非多能细胞、例如T细胞或造血前体细胞而产生iPS细胞。在目前的实践中,通常通过整合病毒载体例如逆转录病毒来实现转染。转染的基因可以包括主转录调节子Oct4(Pouf51)和Sox2,虽然有人提出其它基因会增强诱导效率。在关键时期之后,少数的转染细胞可以开始变成在形态上和生物化学上与多能干细胞类似,可以通过形态学选择、加倍时间或通过报告基因和抗生素感染来进行分离。

[0160] 在2007年11月,来自两个独立研究团队的研究实现了里程碑:从成年人成纤维细胞中产生了iPS(Yu等人,2007;Yamanaka等人,2007)。根据之前在小鼠模型中使用的相同原理,Yamanaka使用相同的4个关键基因Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc通过逆转录病毒系统(但是c-Myc是致瘤性的)成功地将人成纤维细胞转化为多能干细胞。Thomson及同事使用的是Oct4、Sox2、NANOG和一种不同的基因LIN28,使用了慢病毒系统,避免了使用c-Myc。更近期以来,已经从iPS细胞产生了能育的小鼠,由此证明了这些细胞形成基本上任何或所有的分化的细胞类型的潜力(Boland等人,2009)。

[0161] 如上所述,已经使用逆转录病毒或慢病毒载体(用于重编程基因的离原位的表达)实现了从人皮肤成纤维细胞诱导多能干细胞。重组逆转录病毒例如莫洛尼鼠白血病病毒具有以稳定方式整合进入宿主基因组的能力。它们含有逆转录酶,其允许整合进入宿主基因组。慢病毒是逆转录病毒的亚类。由于它们整合进入非分裂以及分裂中的细胞的基因组的能力,它们广泛适应于作为载体。当病毒进入细胞以产生DNA时,RNA形式的病毒基因组被逆转录,然后通过病毒整合酶被插入基因组中的随机位置。因此,T细胞的成功重编程可以使用基于整合的病毒方法,如实施例部分所示。

[0162] B.游离载体

[0163] 这些重编程方法也可以使用染色体外复制载体(即游离载体),其是能够游离地复制以使iPS细胞基本上不含异源载体或病毒元件的载体(见,美国申请号61/058,858,通过引用方式并入本文;Yu等人,2009)。有多种DNA病毒,例如腺病毒、猿猴空泡病毒40(SV40)或牛乳头瘤病毒(BPV)或含有出芽酵母ARS(自主复制序列)的质粒在哺乳动物细胞中在染色体外或游离地复制。这些游离质粒内在地不具有与整合载体相关的所有那些缺点(Bode等人,2001)。例如,如上文定义的亲淋巴疱疹病毒或EB病毒(EBV)的载体可以在染色体外复制并辅助将重编程因子递送至体细胞。

[0164] 例如,本发明中使用的基于质粒的方法可以提取用于成功复制和维持基于EBV元件的系统而不破坏系统在临床环境中的易处理性能所必需的稳健元件,如下文详细描述。基本的EBv元件是OriP和EBNA-1或它们的变体或功能等同物。该系统的另一个优点是,这些异源元件将在导入细胞之后丢失,产生基本上不含异源元件的自我持续的iPS细胞。

[0165] 使用基于质粒或基于脂质体的染色体外载体,例如基于oriP的载体,和/或编码EBNA-1的衍生物的载体允许大的DNA片段被导入细胞并维持在染色体外,每个细胞周期复制一次,有效在子代细胞中分配,并且实质上不引发免疫应答。特别地,EBNA-1,基于oriP的表达载体的复制所需的唯一病毒蛋白,不引发细胞免疫应答,因为其产生有效的机制绕过在I类MHC分子上呈递其抗原所需的过程(Levitskaya等人,1997)。此外,在一些细胞系中,EBNA-1能够反式作用以增强克隆的基因的表达,诱导克隆的基因的表达多达100倍(Langle-Rouault等人,1998;Evans等人,1997)。最后,此类基于oriP的表达载体的制备是价廉的。

[0166] 其它染色体外载体包括其它基于亲淋巴疱疹病毒的载体。亲淋巴疱疹病毒是在淋巴母细胞(例如,人B淋巴母细胞)中复制的疱疹病毒,并在其自然生命周期的一部分变为质粒。单纯疱疹病毒(HSV)不是"亲淋巴"疱疹病毒。示例性的亲淋巴疱疹病毒包括但不限于:EBV、卡波氏肉瘤疱疹病毒(KSHV)、松鼠猴疱疹病毒(HS)和马雷克病病毒(MDV)。还考虑到其它来源的基于游离体的载体,例如酵母ARS、腺病毒、SV40或BPV。

[0167] 为了防止由于病毒基因递送发生的潜在问题,今年两个小组报告了一项合作:成功进行了基于转位子以在人类细胞中产生多能性而不使用病毒载体的方法(Woltjen等人,2009;Kaji等人,2009)。使用衍生自病毒的2A肽序列以产生引入了重编程因子的多顺反子载体,通过piggyBac转位子载体递送进入细胞,在人和小鼠成纤维细胞中产生了稳定的iPS细胞。然后除掉2A-连接的重编程因子,其在稳定的iPS细胞系中是不需要的。这些策略在本发明的一些方面中可类似地用于重编程T细胞或造血前体细胞。

[0168] C.蛋白转导

[0169] 避免向靶细胞中导入异源遗传修饰的一种可能的方式是直接将重编程蛋白导入细胞,而不是依赖于从递送的基因进行转录。之前的研究已经证明:可以通过将蛋白缀合于介导蛋白转导的短肽、例如HIV tat和聚精氨酸而在体外和体内将多种蛋白递送进入细胞。最近的研究证明:可以通过直接递送重组重编程蛋白,将鼠成纤维细胞完全重编程为多能干细胞(Zhou等人,2009)。关于使用蛋白转导重编程细胞的方法的更详细的信息已经公开于美国申请号61/172,079,其通过引用方式并入本文。

[0170] 在本发明的一些方面,可以使用蛋白转导结构域将重编程蛋白直接导入T细胞。蛋白转导可用于增强重编程蛋白向细胞的递送。例如,源自HIV Tat蛋白的TAT蛋白的区域可

以融合于靶蛋白，从而允许靶蛋白进入细胞。使用这些转导结构域的融合物的优点是：蛋白进入是迅速的，浓度依赖性的，并且似乎对于不同细胞类型均有效。

[0171] 在本发明的另一方面，也可以使用细胞核定位序列来促进重编程蛋白进入细胞核。已经就多种蛋白描述了细胞核定位信号(NLS)。蛋白质转位到细胞核的机制是通过：含有细胞核定位信号的靶蛋白与核胞浆转运蛋白(karyopherin)的α亚基结合。其后是：靶蛋白：核胞浆转运蛋白复合物通过核孔转运至细胞核。然而，重编程蛋白通常是转录因子，其可能具有内源性细胞核定位序列。因此，细胞核定位序列可能不是必需的。

[0172] 重编程蛋白直接导入体细胞可用于本发明，重编程可操作地连接于蛋白转导结构域(PTD)的蛋白：通过产生包含此类结构域的融合蛋白或通过经由每个分子上的官能团化学连接重编程蛋白与PTD。

[0173] 可以使用标准重组核酸方法来表达本文中使用的一种或多种可转导的重编程蛋白。在一个实施方式中，编码可转导蛋白的核酸序列被克隆进入核酸表达载体，例如，其具有用于转录和翻译的合适的信号和加工序列和调节序列。在另一个实施方式中，可以使用自动化有机合成方法合成蛋白。

[0174] 另外，有数种方法也可辅助蛋白向细胞的转运，其中一种或多种可以单独使用或与使用蛋白转导结构域的方法组合，包括但不限于：微注射、电穿孔，以及使用脂质体。这些方法中多数可能需要纯化的蛋白制备物。向表达构建体中引入亲和标签通常会促进重组蛋白的纯化，其使得纯化步骤迅速且有效率。

[0175] VII.载体构建和递送

[0176] 在一些实施方式中，重编程载体可以被构建为包含除了如上所述的编码重编程因子的核酸序列之外的另外的元件。以下公开了这些载体成分和递送方法的详细信息。

[0177] A.载体

[0178] 本领域技术人员将完全具备通过标准重组技术构建载体的能力(参见，例如Maniatis等人,1988and Ausubel等人,1994，二者通过引用方式并入本文)。

[0179] 载体还可以包含其它成分或功能，它们进一步调节基因递送和/或基因表达，或为靶向的细胞提供有益特征。此类其它成分包括例如，影响与细胞的结合或影响靶向细胞的成分(包括调节细胞类型或组织特异性结合的成分)；影响细胞对载体核酸的摄取的成分；影响摄取之后多核苷酸在细胞内的定位的成分(例如调节细胞核定位的试剂)；以及影响多核苷酸表达的成分。

[0180] 此类成分也可以包括标志物，例如可检测和/或选择标志物，其可用于检测或选择那些已经摄取并表达由载体递送的核酸的细胞。此类成分可以作为载体的天然特征提供(例如使用某些病毒载体，其具有介导结合和摄取的成分或功能)，或者可以修饰载体以提供此类功能。大量的此类载体是本领域已知的，并且通常可获得。当载体被维持在宿主细胞中时，载体可以作为自主结构在有丝分裂过程中由细胞稳定复制，并入宿主细胞的基因组中，或维持在宿主细胞的细胞核或细胞质中。

[0181] B.调节元件

[0182] 载体中包括的真核细胞表达盒特别包含(以5'至3'的方向)：与蛋白编码序列可操作地连接的真核细胞转录启动子、剪接信号(包括插入序列)以及转录终止/多腺苷化序列。

[0183] i.启动子/增强子

[0184] “启动子”是控制序列，其为核酸序列的区域，在该区域控制转录的启动和速率。其可以包含可与调节性蛋白和分子例如RNA聚合酶和其它转录因子结合的遗传元件，以启动核酸序列的特定转录。词语“可操作地定位”、“可操作地连接”、“在……控制下”和“在……转录控制下”意思是启动子相对于核酸序列而言处于正确的功能位置和/或方向，以控制该序列的转录启动和/或表达。

[0185] 适合用于本发明的编码EBNA 1的载体中的启动子是这样的启动子：其指导编码EBNA 1蛋白的表达盒之表达，以产生足够稳定水平的EBNA 1蛋白，以稳定维持含有EBV oriP的载体。也使用用于有效表达编码重编程因子的表达盒的启动子。

[0186] 启动子一般包含这样的序列：其作用是定位RNA合成的起始位点。这样的序列的最有名的实例是TATA盒，但是一些启动子缺少TATA盒，例如哺乳动物末端脱氧核苷酸基转移酶基因的启动子，以及SV40晚期基因的启动子，起始位点本身之上的离散元件辅助固定起始位置。另外的启动子元件调节转录启动的频率。通常而言，这些元件位于起始位点上游30-110bp的区域，虽然已经表明很多启动子也包含位于起始位点下游的功能元件。为了使编码序列“在启动子的控制之下”，人们将转录阅读框的转录起始位点的5’端置于所选的启动子的下游(即置于其3’端)。处于上游的“启动子”刺激DNA的转录并促进所编码的RNA的表达。

[0187] 启动子元件之间的间隔通常是灵活可变的，所以，当元件被倒置或彼此相对发生移动时，能够保持启动子的功能。在tk启动子中，启动子元件之间的间隔可以增至相隔50bp，此后发生活性的下降。取决于启动子，似乎单个元件可以协调发挥作用或独立地激活转录。启动子可以与增强子联用或者不与之联用，增强子是指参与核酸序列的转录激活的顺式调节序列。

[0188] 启动子可以是与核酸序列天然结合的启动子，其可以通过分离位于编码区段和/或外显子上游的5’非编码序列来获得。此类启动子可以被称作“内源性的”。类似地，增强子可以是与核酸序列天然结合的增强子，位于该序列的下游或上游。可替代地，通过将编码核酸区段置于重组或异源启动子(即在其天然环境中通常不与核酸序列结合的启动子)控制下将会产生某些益处。重组或异源增强子是指在其天然环境中通常不与核酸序列结合的增强子。此类启动子或增强子可以包括其它基因的启动子或增强子，以及分离自任意其它病毒或原核或真核细胞的启动子或增强子，以及“天然不存在”的启动子或增强子，即含有不同转录调节区的不同元件，和/或改变表达的突变。例如，在构建重组DNA时最常使用的启动子包括β-内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖和色氨酸(trp)启动子系统。除了通过合成方式产生启动子和增强子的核酸序列之外，还可以使用重组克隆和/或核酸扩增技术来产生序列，包括PCR™，并联合本文公开的成份(参见美国专利号4,683,202和5,928,906，每篇通过引用并入本文)。此外考虑到，也可以使用非细胞核细胞器例如线粒体、叶绿体等内的指导序列转录和/或表达的控制序列。

[0189] 通常而言，使用有效指导DNA区段在所选的用于表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生物中的表达的启动子和/或增强子具有重要意义。分子生物学领域技术人员一般知晓用于蛋白表达的启动子、增强子和细胞类型的组合之使用(参见例如Sambrook等人1989，通过引用并入本文)。所使用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、可诱导的和/或可用于在合适条件下指导所导入的DNA区段的高水平表达的启动子，这在大规模生产重组蛋白

和/或肽中具有优势。启动子可以是异源的或内源的。

[0190] 另外，任何启动子/增强子组合(按照例如真核细胞启动子数据库EPDB，通过epd.isb-sib.ch/访问互联网)也可用于驱动表达。使用T3、T7或SP6细胞质表达系统是另一个可能的实施方式。如果提供合适的细菌聚合酶(作为递送复合物的一部分或作为另外的遗传表达构建体)，真核细胞可以支持从某些细菌启动子进行细胞质转录。

[0191] 启动子的非限制性实例包括早期或晚期病毒启动子，例如SV40早期或晚期启动子，细胞巨化病毒(CMV)立即早期启动子，劳斯肉瘤病毒(RSV)早期启动子；真核细胞启动子，例如β肌动蛋白启动子(Ng，1989；Quitsche等人，1989)、GADPH启动子(Alexander等人，1988，Ercolani等人，1988)、金属硫蛋白启动子(Karin等人，1989；Richards等人，1984)；以及级联应答元件启动子，例如环式AMP应答元件启动子(cre)、血清应答元件启动子(sre)、佛波酯启动子(TPA)和最简TATA盒附近的应答元件启动子(tre)。还可以使用人类生长激素启动子序列(例如，描述于Genbank的人类生长激素最简启动子，登记号X05244的核苷酸283-341)或小鼠乳腺肿瘤启动子(可以从ATCC，Cat.No.ATCC 45007获得)。具体实例可以是磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子。

[0192] ii.蛋白酶切割位点/自我切割肽和内部核糖体结合位点

[0193] 在一些方面，根据本发明，编码标志物或重编程蛋白的基因可以通过编码蛋白酶切割位点(即，包含蛋白酶识别位点的序列)的序列(可能有多个)或至少一个自我切割肽而彼此连接。

[0194] 根据本发明的一些实施方式，能够切割“连接构成多顺反子信息的基因的序列编码的切割位点”的蛋白酶是由本发明的多核苷酸编码的。更特别地，编码蛋白酶的基因是至少一个多顺反子信息的一部分。

[0195] 适宜的蛋白酶切割位点和自我切割肽是技术人员已知的(见，例如，Ryan等人，1997；Scymczak等人，2004)。蛋白酶切割位点的优选实例是马铃薯Y病毒组NIa蛋白酶的切割位点(例如，烟草蚀纹病毒蛋白酶)、马铃薯Y病毒组HC蛋白酶、马铃薯Y病毒组P1(P35)蛋白酶、byovirus Nla蛋白酶、byovirus RNA-2-编码的蛋白酶、口蹄疫病毒属L蛋白酶、肠道病毒属2A蛋白酶、鼻病毒属2A蛋白酶、细小RNA 3C蛋白酶、豇豆花叶病毒组24K蛋白酶、蠕传多角体病毒属24K蛋白酶、RTSV(水稻东格鲁球状病毒)3C样蛋白酶、PY\IF(欧防风黄点病毒)3C-样蛋白酶、凝血酶、因子Xa和肠激酶的切割位点。由于其高毒的切割严格性，可以使用TEV(烟草蚀纹病毒)蛋白酶切割位点。

[0196] 示例性自我切割肽(也称作“顺式作用水解元件”CHYSEL；见deFelipe(2002))源自马铃薯Y病毒属和心病毒属2A肽。特别的自我切割肽可以选自衍生自FMDV(口蹄疫病毒)的2A肽，马鼻炎A病毒、Thoseàasigna病毒和猪捷申病毒。

[0197] 特定的起始信号也可用于多顺反子信息中的编码序列的有效翻译。这些信号包括：ATG起始密码子或邻近序列。可能需要提供异源翻译控制信号，包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将容易地能够确定这一点并提供必要的信号。熟知的是，起始密码子必须与所需的编码序列的读卡框在同一框内，以确保整体插入序列的翻译。异源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。可以通过加入合适的转录增强元件来增强表达效率。

[0198] 在本发明的一些实施方式中，内部核糖体进入位点(IRES)元件用于产生多基因的

或多顺反子信息。IRES元件能够绕过5'甲基化Cap依赖性翻译的核糖体扫描模式，并在内部位点启动翻译(Pelletier and Sonenberg,1988)。已经描述了来自微小核醣核酸病毒家族的两个成员(灰质和脑心肌炎)的IRES元件(Pelletier and Sonenberg,1988)，以及来自哺乳动物信息的IRES(Macejak and Sarnow,1991)。IRES元件可以连接于异源开放阅读框。多个开放阅读框可以一起转录，每个由IRES分开，产生多顺反子信息。通过IRES元件，每个开放阅读框可靠近核糖体以进行有效翻译。使用单个启动子/增强子可以有效表达多个基因，以转录单一信息(见，例如美国专利号5,925,565和5,935,819，各自通过引用方式并入本文)。

[0199] iii.多克隆位点

[0200] 载体可以包括多克隆位点(MCS)，其是包含多个限制性酶位点的核酸区域，所述酶中的任意种可用于根据标准重组技术来消化该载体(参见，例如Carbonelli等人,1999,Levenson等人,1998,和Cocea,1997,通过引用并入本文)。"限制性酶消化"是指以仅在核酸分子的特定位置发挥作用的酶催化性切割核酸分子。很多这样的限制性酶是商业上可以获得的。本领域技术人员普遍理解此类酶的使用。通常，使用在MCS内切割的限制性酶将载体线性化或片段化，以使外源序列连接进入载体。"连接"是指在两个核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程，所述两个核酸片段可以是彼此连续的或不连续的。涉及限制性酶和连接反应的技术是重组技术领域技术人员熟知的。

[0201] iv.剪接位点

[0202] 多数经转录的真核RNA分子将经历RNA剪接以从初级转录本中除掉内含子。含有基因组真核序列的载体可能需要供体和/或受体剪接位点以确保转录本的正确加工以表达蛋白(参见，例如Chandler等人,1997,通过引用并入本文)。

[0203] v.终止信号

[0204] 本发明的载体或构建体一般将包括至少一个终止信号。"终止信号"或"终止子"包含参与通过RNA聚合酶特异性终止RNA转录本的DNA序列。因此，在一些实施方式中涉及结束RNA转录本产生的终止信号。终止子可能是体内所必需的以实现想要的信使水平。

[0205] 在真核系统中，终止子区域还可以包含特定的DNA序列，其允许新转录本的位点特异性切割，从而暴露多腺苷化位点。这会向专职的内源聚合酶发出信号，使其将一串大约200个残基A(多聚A)添加到转录本的3'末端。经此多聚A尾巴修饰的RNA分子表现得更加稳定并且更有效地被翻译。因此，在其它涉及真核细胞的实施方式中，优选地，终止子包含用于RNA切割信号，更优选地，终止子信号促进信使的多聚腺苷化。终止子和/或多聚腺苷化位点元件可用于增强信使水平，并使从盒读入其它序列的读取最小化。

[0206] 考虑到用于本发明的终止子包括如本文描述的或本领域普通技术人员已知的任意已知的转录终止子，包括但不限于，例如，基因的终止序列，例如牛生长激素终止子或病毒终止序列，例如SV40终止子。在一些实施方式中，终止信号可以是可转录或可翻译序列的缺失，例如由于序列截短所造成的。

[0207] vi.多腺苷化信号

[0208] 在表达时，尤其是真核表达时，通常会包括多腺苷化信号以进行转录本的正确的多腺苷化。人们认为多腺苷化信号的性质对于本发明的成功实施不是关键性的，可以使用任意此类序列。优选的实施方式包括SV40多腺苷化信号或牛生长激素多腺苷化信号，它们

在多种靶细胞中是方便的且已知它们的作用是很好的。多腺苷化可以增强转录本的稳定性或者可以促进细胞质转运。

[0209] vii.复制起始点

[0210] 为了在宿主细胞中繁殖载体，载体可以包括一个或多个复制起始位点(通常称作“ori”)，例如，对应于如上文描述的EBV的oriP的核酸序列，或在分化重编程中具有相似或提高的功能的遗传工程化的oriP，其为特定的核酸序列，在该核酸序列处，复制被起始。备选地，可以使用如上所述的其它染色体外复制性病毒的复制起始点或自主复制序列(ARS)。

[0211] viii.选择和可筛选标志物

[0212] 在本发明的一些实施方式中，可以通过在表达载体中加入标志物而在体外或体内鉴定含有本发明的核酸构建体的细胞。此类标志物将赋予细胞可鉴定的变化，允许容易地鉴定含有表达载体的细胞。一般地，选择标志物是赋予允许进行选择的性质的标志物。阳性选择标志物是这样的标志物：它的存在允许就其进行选择，而阴性选择标志物是这样的标志物：它的存在阻止其被选择。阳性选择标志物的实例是药物抗性标志物。

[0213] 通常，加入药物选择标志物会辅助转化子的克隆和鉴定，例如，赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、zeocin和组氨醇抗性的基因是有用的选择标志物。除了赋予允许基于条件的施用来区分转化子的表型的标志物以外，也考虑到其它类型的标志物，包括可筛选标志物，例如GFP，其基础是显色反应。备选地，可以使用可筛选的酶作为阴性选择标志物，例如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。本领域技术人员也将知晓如何使用免疫标志物，可能联合FACS分析。所用的标志物不被认为是重要的，只要其能够与编码基因产物的核酸同时表达。选择和可筛选标志物的另外的实例是本领域技术人员熟知的。本发明的一个特征包括使用选择和可筛选标志物以便在分化重编程因子已经在那些细胞中执行了所需的改变的分化状态之后选择不含载体的细胞。

[0214] C.载体递送

[0215] 在本发明中，将重编程载体导入体细胞中可以使用任何合适的用于核酸递送以转化细胞的方法，如本文所描述或如本领域普通技术人员已知的。此类方法包括但不限于，DNA的直接递送，例如通过离体转染(Wilson等人，1989，Nabel等人，1989)，通过注射(美国专利号5,994,624、5,981,274、5,945,100、5,780,448、5,736,524、5,702,932、5,656,610、5,589,466和5,580,859，每篇通过引用并入本文)，包括微注射(Harland and Weintraub，1985；美国专利号5,789,215，通过引用并入本文)；通过电穿孔(美国专利号5,384,253，通过引用并入本文；Tur-Kaspa等人，1986；Potter等人，1984)；通过磷酸钙沉淀(Graham and Van Der Eb，1973；Chen and Okayama，1987；Rippe等人，1990)；通过使用DEAE-葡聚糖，然后通过聚乙二醇(Gopal，1985)；通过直接的声波载入(sonic loading)(Fechheimer等人，1987)；通过脂质体介导的转染(Nicolau and Sene，1982；Fraley等人，1979；Nicolau等人，1987；Wong等人，1980；Kaneda等人，1989；Kato等人，1991)和受体介导的转染(Wu and Wu，1987；Wu and Wu，1988)；通过微弹轰击(PCT申请号WO 94/09699和95/06128；美国专利号5,610,042；5,322,783，5,563,055，5,550,318，5,538,877和5,538,880，每篇通过引用并入本文)；通过以碳化硅纤维搅拌(Kaeppler等人，1990；美国专利号5,302,523和5,464,765，每篇通过引用并入本文)；通过农杆菌介导的转化(美国专利号5,591,616和5,563,055，每篇通过引用并入本文)；通过PEG介导的原生质体转化(Omirulleh等人，1993；美国专利号4,

684,611和4,952,500,每篇通过引用并入本文);通过干燥/抑制介导的DNA摄取(Potrykus等人,1985),以及任意此类方法的组合。通过应用诸如此类的技术,可以稳定地或瞬间地转化细胞器、细胞、组织或生物体。

[0216] i.脂质体介导的转染

[0217] 在本发明的一些实施方式中,核酸可以包载在脂复合物例如脂质体中。脂质体是囊泡结构,其特征在于磷脂双层膜和内部水性介质。多层脂质体具有被水性介质分开的多个脂层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们会自发形成。在形成封闭结构并将水和溶解的溶质包载在脂双层之间以前,脂成分会经历自我重排(Ghosh and Bachhawat,1991)。还考虑到核酸与Lipofectamine(Gibco BRL)或Superfect(Qiagen)的复合。所使用的脂质体的量可以根据脂质体的性质以及所使用的细胞而变化,例如,考虑到大约5μg至大约20μg载体DNA/1-10x 10^6个细胞。

[0218] 在体外进行脂质体介导的核酸递送和外源DNA的表达已经是非常成功的(Nicolau and Sene,1982;Fraley等人,1979;Nicolau等人,1987)。也已经证明了脂质体介导的外源DNA递送和在培养的鸡胚胎、HeLa和肝细胞瘤细胞中表达的可行性(Wong等人,1980)。

[0219] 在本发明的一些实施方式中,脂质体可以与血凝病毒(HVJ)复合。已经表明这会促进与细胞膜的融合并促进脂质体包载的DNA进入细胞(Kaneda等人,1989)。在其它实施方式中,脂质体可以与细胞核非组蛋白染色体蛋白(HMG-1)复合或与之结合使用(Kato等人,1991)。在其它实施方式中,脂质体可以与HVJ和HMG-1二者复合或与之结合使用。在其它实施方式中,递送介质可以包含配体和脂质体。

[0220] ii.电穿孔

[0221] 在本发明的一些实施方式中,通过电穿孔法将核酸导入细胞。电穿孔包括将细胞悬浮液和DNA暴露于高压放电。可以通过机械击伤使受体细胞变得更加易于转化。同样,所使用的载体数量可以根据所使用的细胞的性质而变化,例如,考虑到大约5μg至大约20μg载体DNA/1-10x 10^6个细胞。

[0222] 通过电穿孔法转染真核细胞已经是相当成功的做法。已经以人类κ-免疫球蛋白基因转染了小鼠pre-B淋巴细胞(Potter等人,1984),也已经按照这种方式以氯霉素乙酰转移酶基因转染了大鼠肝细胞(Tur Kaspa等人,1986)。

[0223] iii.磷酸钙

[0224] 在本发明的其它实施方式中,使用磷酸钙沉淀法将核酸导入细胞中。已经使用该技术以腺病毒5DNA转染了人类KB细胞(Graham and Van Der Eb,1973)。同样,按照这种方式,已经以新霉素标志物基因转染了小鼠L(A9)、小鼠C127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3和HeLa细胞(Chen and Okayama,1987),并且以多种标志物基因转染了大鼠肝细胞(Rippe等人,1990)。

[0225] iv.DEAE-葡聚糖

[0226] 在其它实施方式中,使用DEAE-葡聚糖、然后以聚乙二醇将核酸递送进入细胞中。按照这种方式,将报告分子质粒导入了小鼠骨髓瘤和红白血病细胞(Gopal,1985)。

[0227] v.声波载入

[0228] 本发明的另外的实施方式包括通过直接声波载入法来导入核酸。已经通过声波载入法以胸苷激酶基因转染了LTK^-成纤维细胞(Fechheimer等人,1987)。

[0229] vi.受体介导的转染

[0230] 另外，可以通过受体介导的递送介质将核酸递送进入靶细胞。这利用了“靶细胞内发生的受体介导的细胞内吞作用选择性摄取大分子”这一优势。鉴于多种受体的细胞类型特异性分布，该递送方法增加了本发明的另外的特异性程度。

[0231] 一些受体介导的基因靶向囊泡包括细胞受体特异性的配体和核酸结合试剂。其它的包括细胞受体特异性配体，待递送的核酸与之可操作地连接。有数种配体已被用于受体介导的基因转移(Wu and Wu,1987;Wagner等人,1990;Perales等人,1994;Myers,EPO 0273085)，其建立起了该技术的可行性。已经描述了另一种哺乳动物细胞类型情况下的特异性递送(Wu and Wu,1993;通过引用并入本文)。在本发明的一些方面，将配体选择为对应于在靶细胞群体上特异性表达的受体。

[0232] 在其它实施方式中，细胞特异性核酸靶向囊泡的核酸递送介质成分可以包括与脂质体联合的特异性结合配体。待递送的核酸装在所述脂质体内，并且所述特异性结合配体官能地掺入所述脂质体的膜中。因此脂质体将特异性与靶细胞的受体结合并将内容物递送进入细胞。已经表明此类系统是功能性的，使用了这样的系统：例如，其中表皮生长因子(EGF)用于通过受体介导的核酸递送，递送进入显示出EGF受体上调的细胞中。

[0233] 在其它实施方式中，靶向递送介质的核酸递送介质成分可以是脂质体本身，其特别包含一种或多种指导细胞特异性结合的脂或糖蛋白。例如，已经将乳糖酰基神经酰胺，半乳糖末端神经节苷脂，掺入脂质体，并且观察到肝细胞对胰岛素基因摄取的增加(Nicolau等人,1987)。考虑到可以按照类似方式将本发明的组织特异性转化构建体特异性递送进入靶细胞中。

[0234] vii.微弹轰击

[0235] 微弹轰击技术可用于将核酸导入至少一个细胞器、细胞、组织或生物体(美国专利号5,550,318;美国专利号5,538,880;美国专利号5,610,042;和PCT申请WO 94/09699;每篇通过引用并入本文)。该方法依赖于将DNA包被的微弹加速至高速的能力，以允许它们穿过细胞膜并进入细胞而不杀死细胞(Klein等人,1987)。本领域已知有多种微弹轰击技术，其中很多可用于本发明。

[0236] 在这种微弹轰击方法中，可以使用至少一个核酸包被一个或多个颗粒并通过推进力将其递送进入细胞。已经开发了数种用于加速小颗粒的装置。一种此类装置利用高压放电以产生电流，继而提供驱动力(Yang等人,1990)。所使用的微弹由生物惰性物质组成，例如钨或金颗粒或珠子。示例性的颗粒包括那些包含钨、铂、特别是金的颗粒。考虑到在一些情况下DNA沉淀到金属颗粒上对于通过微弹轰击将DNA递送进入受体细胞而言不是必需的。另一方面，也考虑到颗粒可以包含DNA而不是被DNA包被。DNA包被的颗粒可以增强通过颗粒轰击递送的DNA的水平，但是就其本身而言不是必需的。

[0237] 为了进行轰击，将悬浮液中的细胞浓缩于纤维或固体培养基上。可替代地，可以将未成熟的胚胎或其它靶细胞排列于固体培养基上。将待轰击的细胞置于微弹阻停板下合适的距离。

[0238] VIII.iPS细胞的选择

[0239] 在本发明的一些方面，在将一种或多种重编程因子导入体细胞之后，培养这些细胞以进行扩增(任选地，就载体元件、例如阳性选择或可筛选标志物的存在而进行选择，以

浓缩转染的细胞)。重编程载体可以在这些细胞中表达重编程因子,并随着细胞分裂而复制和分割。备选地,通过补充含有重编程蛋白的培养基,重编程蛋白可以进入这些细胞及其子代。这些重编程因子将重编程体细胞基因组,以建立自我持续的多能状态,同时或在除掉存在的载体的阳性选择之后,外源遗传元件将逐渐丧失,或者,无需加入重编程蛋白。

[0240] 可以基于胚胎干细胞特性从源自这些T细胞或造血前体细胞的子代选择这些诱导的多能干细胞,因为预期它们与多能胚胎干细胞是实质上相同的。也可以使用另外的阴性选择步骤以加速或辅助选择基本上不含外源遗传元件的iPS细胞:其是通过测试重编程载体DNA的不存在,或使用选择标志物,例如报告分子。

[0241] A.就胚胎干细胞特性进行选择

[0242] 之前的研究中成功产生的iPSC在以下方面与天然分离的多能干细胞(例如小鼠和人胚胎干细胞,分别是mESC和hESC)是显著相似的,由此确认了iPSC相对于天然分离的多能干细胞的性质、真实性和多能性。因此,可以基于下列一个或多个胚胎干细胞特征来选择根据本发明公开的方法产生的诱导的多能干细胞。

[0243] i.细胞生物学特征

[0244] 形态学:iPSC在形态上类似于ESC。每个细胞可以具有圆形、双核仁或大的核仁和贫乏的细胞质。iPSC的群落也可以与ESC类似。人类iPSC形成具有明显边界的、平坦的、紧密聚集的群落,这与hESC类似;小鼠iPSC形成与mESC类似的群落,不如hESC的群落平坦,比hESC的群落聚集度更高。

[0245] 生长特征:加倍时间和有丝分裂活性是ESC的要素,因为干细胞必须自我更新(作为其定义的一部分)。iPSC在有丝分裂活性、自我更新活性、增殖和分裂速率方面可以与ESC相同。

[0246] 干细胞标志物:iPSC可以表达在ESC上表达的细胞表面抗原性标志物。人类iPSC表达hESC特异性的标志物,包括但不限于SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-49/6E和Nanog。小鼠iPSC表达SSEA-1但不表达SSEA-3也不表达SSEA-4,这与mESCs是类似的。

[0247] 干细胞基因:iPSC可以表达在未分化的ESC中表达的基因,包括Oct4、Sox2、Nanog、GDF3、REX1、FGF4、ESG1、DPPA2、DPPA4和hTERT。

[0248] 端粒酶活性:端粒酶是维持细胞分裂不受Hayflick极限(~50次细胞分裂)限制所必需的。hESC表达高端粒酶活性,以维持自我更新和增殖,iPSC也显示出高端粒酶活性并表达hTERT(人端粒酶逆转录酶),其为端粒酶蛋白复合物中的必要成分。

[0249] 多能性:iPSC将能够以类似于ESC的方式分化为完全分化的组织。

[0250] 神经的分化:iPSC可以分化成神经元,表达βIII-微管蛋白、酪氨酸羟化酶、AADC、DAT、ChAT、LMX1B和MAP2。儿茶酚胺相关的酶的存在可以指示iPSC(类似于hESC)可以分化成为多巴胺能神经元。在分化之后,干细胞相关的基因将会被下调。

[0251] 心脏的分化:iPSC可以分化为心肌细胞,其自发开始跳动。心肌细胞表达cTnT、MEF2C、MYL2A、MYHCβ和NKX2.5。在分化之后,干细胞相关的基因将会被下调。

[0252] 畸胎瘤形成:注射进入免疫缺陷型小鼠的iPSC可能在一定时间之后(例如9周)自发形成畸胎瘤。畸胎瘤是含有源自三个胚层即内胚层、中胚层和外胚层的组织的多谱系肿瘤;这与其它肿瘤不同,其它肿瘤通常仅是一种细胞类型。畸胎瘤的形成是多能性的标志测定。

[0253] 类胚体:培养中的hESC自发形成球状胚胎样结构,其被称作“类胚体”,其由具有有丝分裂活性的和分化中的hESC的核心和来自所有三个胚层的完全分化的细胞的外围组成。iPSC也可能形成类胚体并具有外周分化的细胞。

[0254] 胚泡注射:hESC天然地驻留于胚泡的内细胞群(成胚区)内,在成胚区中分化为胚胎;而胚泡的壳(滋养层)分化为胚胎外的组织。中空的滋养层不能形成活的胚胎,因此,成胚区中的胚胎干细胞必须分化并形成胚胎。通过微量吸液将iPSC注射进入滋养层以产生被转移进入雌性受体的胚泡,这可能导致产生嵌合的活的小鼠幼崽:具有10%-90%的嵌合性,遍布其身体掺入了iPSC衍生物的小鼠。

[0255] ii.表观遗传学的重编程

[0256] 启动子去甲基化:甲基化是甲基被转移至DNA碱基,通常是甲基被转移至CpG位点(邻近的胞嘧啶/鸟嘌呤序列)中的胞嘧啶分子。基因的广泛甲基化会通过抑制表达蛋白的活性或募集干扰表达的酶而对表达产生干扰。因此,基因的甲基化会通过阻止转录而有效地使其沉默。多能性相关的基因(包括Oct4、Rex1和Nanog)的启动子可能在iPSC中被去甲基化,显示出其启动子活性以及多能性相关的基因在iPSC中的活性启动和表达。

[0257] 组蛋白去甲基化:组蛋白是在结构上定位于DNA序列的紧凑的蛋白,其可以通过多种染色质相关的修饰发挥其活性。与Oct/4、Sox2和Nanog相关的H3组蛋白可以被去甲基化以激活Oct4、Sox2和Nanog的表达。

[0258] IX.iPS细胞的培养和分化

[0259] 使用所公开的方法将重编程因子导入体细胞之后,可以将这些细胞在足以维持多能性的培养基中培养。可以使用为了培养灵长类多能干细胞(更具体而言胚胎干细胞)而开发的多种培养基和技术来培养本发明中产生的诱导的多能干(iPS)细胞,如美国专利申请20070238170和美国专利申请20030211603中所描述。认识到,在本发明中可以使用如本领域技术人员已知的用于培养和维持人类多能干细胞的另外的方法。

[0260] 在一些实施方式中,可以使用非确定条件,例如,多能细胞可以培养于成纤维细胞饲养细胞上或已经暴露于成纤维细胞饲养细胞的培养基中,以维持干细胞在未分化状态。备选地,可以使用确定的、饲养物非依赖性培养系统,例如TeSR培养基(Ludwig等人,2006;Ludwig等人,2006)将多能细胞培养并维持于基本上未分化状态。饲养物非依赖性培养系统和培养基可用于培养并维持多能细胞。这些方法允许人胚胎干细胞保持为基本上未分化的状态,而无需小鼠成纤维细胞“饲养层”。如本文所描述,可以对这些方法进行多种改变以降低所需的成本。

[0261] 例如,与人类胚胎干(hES)细胞一样,可以将iPS细胞维持在以下培养基中:80% DMEM(Gibco#10829-018或#11965-092),20%未经热灭活的确定的胎牛血清(FBS)(或人AB血清),1%非必需氨基酸,1mM L-谷氨酰胺和0.1mMβ-巯基乙醇。或者,可以将iPS细胞维持在以下无血清培养基中:80%Knock-Out DMEM(Gibco#10829-018),20%血清替代物(Gibco#10828-028),1%非必需氨基酸,1mM L-谷氨酰胺和0.1mMβ-巯基乙醇。在临使用前,可以加入人bFGF至终浓度为大约4ng/mL(WO 99/20741),或者可以使用斑马鱼bFGF,见实施例。

[0262] 多种基质成分可用于培养和维持人多能干细胞。例如,胶原IV、纤连蛋白、层连蛋白和玻连蛋白的组合可用于包被培养表面,作为提供用于多能细胞生长的固体支持物的方

法，如Ludwig等人(2006a;2006b)所描述，其通过引用方式全文并入本文。

[0263] Matrigel™也可用于提供用于细胞培养和维持人多能干细胞的基底。Matrigel™是由小鼠肿瘤细胞分泌的胶样蛋白混合物，并且可以通过商业途径从BD Biosciences(New Jersey,USA)获得。该混合物类似于存在于很多组织中的复杂的细胞外环境，并且被细胞生物学家用作细胞培养的基底。

[0264] 与ES细胞一样，IPS细胞具有可以通过免疫组化或流式细胞术鉴定或确认的特征性抗原：使用针对SSEA-1、SSEA-3和SSEA-4的抗体(Developmental Studies Hybridoma Bank,National Institute of Child Health and Human Development,Bethesda Md.)，以及针对TRA-1-60和TRA-1-81的抗体(Andrews等人,1987)。可以通过将大约0.5-10x10^6个细胞注射进入8-12周龄的雄性SCID小鼠的后腿肌肉中来确认胚胎干细胞的多能性。产生畸胎瘤证明三个胚层中的每一个的至少一种细胞类型。

[0265] 多种方法可用于本发明中以使iPS细胞分化为细胞谱系，包括但不限于：造血细胞、单核细胞(例如心肌细胞)、神经元、成纤维细胞和表皮细胞，和源自其中的组织或器官。iPS细胞的造血分化的示例性方法可以包括，例如，美国申请号61/088,054和No.61/156,304中公开的方法，二者通过引用方式全文并入本文，或基于类胚体(EB)的方法(Chadwick等人,2003;Ng等人,2005)。纤连蛋白分化方法也可用于血液谱系分化，如Wang等人,2007所例示。iPS的心脏分化的示例性方法可以包括类胚体(EB)方法(Zhang,等人,2009)、OP9基质细胞方法(Narazaki,等人,2008)，或生长因子和/或化学方法(见，例如，美国专利公开号20080038820、20080226558、20080254003和20090047739，都通过引用方式全文并入本文)。

[0266] X.实施例

[0267] 包括了以下实施例以说明本发明的优选实施方式。本领域技术人员应该认识到，以下实施例中公开的技术代表本发明人发现的在实施本发明时效果良好的技术，因此可以被认为是构成其实施的优选模式。但是，根据本公开文本，本领域技术人员应该认识到，可以不脱离本发明的精神和范围而对所公开的具体实施方式作出很多改变，并且仍然获得相同或相似的结果。

[0268] 实施例1：将白细胞采集物处理成PBMC的等份试样

[0269] 通过以下方法产生白细胞采集物样品(leukopak)：使8升外周血通过离心力场循环，以在得到的大约125ml体积中浓缩单核细胞并限制红细胞的数量。进一步按照下列方式处理leukopak：以酒精拭子擦拭leukopak袋的一个末端，并以保险刀片切割以引流进入瓶中。以Hank溶液进行稀释，以使体积为大约500ml，然后等份分装进入容积为50ml的16-29支管中，每管30ml。将管在400g离心30分钟，无制动且无加速。吸取白色液体并将新的50ml管填充一半，并以25ml PBS最后加满。再重复该程序2次，总共洗涤3次。在最后1次洗涤之前以血细胞计数器对细胞进行计数。产量为30-60个管的细胞，1x10^8个细胞/管。

[0270] 为了处理全血，将血液采集于含有抗凝剂的管或CPT管中。提供了处理通过CPT管获得的血液样品的简要方法：从上层(血浆)将大约7-8ml转移至50ml无菌管中。以无钙的PBS稀释至50ml。倒置以混匀。在300RCF离心15分钟。除掉大约95％的上清液，不要碰到沉淀物。将上清液转移至另外的50ml管中。通过轻叩管轻轻地使沉淀物重悬。加入20ml无钙的PBS。倒置以混匀。将一半(大约10ml)转移至15ml的管中。在300RCF将两个管离心15分钟。除掉尽可能多的上清液，不要碰到沉淀物。将沉淀物重悬进入50ml管中的2ml的适合于T细胞

的培养基(基于AIM-V的培养基)或CD34培养基(基于Stem Pro的培养基)中,如下文所描述,并使用cedex细胞计数器进行活细胞计数。

[0271] 如果样品被收集进入含有抗凝剂例如EDTA的管中,则处理步骤包括:裂解红细胞,然后通过Ficoll梯度从血液样品中分离PBMC。首先以等体积的无钙镁的PBS稀释样品。根据生产商的说明书,使用ACK缓冲液(Invitrogen)裂解红细胞。洗涤不含红细胞的细胞悬浮液并在Ficoll梯度上分层,如之前就leukopak样品所描述。再次使用无钙镁的PBS洗涤从棕黄层获得的PBMC,并重悬于适合于T细胞的培养基(基于AIM-V的培养基)或CD34培养基(基于Stem Pro的培养基)中。

[0272] 实施例2:T细胞激活和扩增

[0273] 外周血单核细胞(PBMC)获自Biological Specialty Corp(Colmar,PA)供体#33231(“供体A”)。使用“淋巴细胞分离培养基”(Cellgro)处理白细胞包(leukocyte pack)以产生PBMC,如上文所述,然后将其冷冻为等份试样并储存于液氮中。解冻等份试样并在新鲜制备的AIM-V培养基+pen/strep/谷氨酰胺(AIV-V/ps/s/g培养基)(Invitrogen)+300IU/ml rhIL2(Peprotech)和10ng/ml可溶性抗-CD3抗体(OKT3克隆,eBiosciences)中扩增。激活数日之后,通过CEDEX细胞计数验证指数生长。在培养物中3天之后,就T细胞表型测定细胞,然后以重编程因子转导。在一个实验中,在铺板前或转导后未验证到T细胞表型。该T细胞激活实验重复了数次,始终产生相同的结果——在激活后和转导后T细胞占培养物的90%或更高。确认了T细胞被重编程因子转导。

[0274] T细胞激活和扩增程序的详细信息(表1)。解冻PBMC瓶以收集75x 10^6个细胞(大约3瓶)。将每个PBMC瓶中的内容物加入到7ml AIM-V/p/s/g培养基中。将细胞悬浮液在1200rpm离心4分钟。将沉淀物重悬于10ml AIM-V+p/s/g。调整细胞浓度至1x10^6个细胞/ml,总共28ml,和2x10^6个细胞/ml,总共25ml。将IL2(300IU/ml)和OKT3(10ng/ml)加入到细胞悬浮液中并混匀。将来自每个浓缩物的细胞以1.5ml/孔铺板于24孔组织培养板中并在37℃温育。使用总共18个孔的1x10^6细胞/ml(1.5ml/孔)和16孔的2x10^6细胞/ml(1.5ml/孔)。验证细胞计数并记录为第0天。将第0天的细胞计数与第3天和第4天的计数进行对比以验证指数扩增。

[0275] 表1.T细胞激活和扩增

[0276]

PBMC (T-细胞)	细胞数目	培养基	细胞因子	抗体
24 孔板	1-2 x 10^6 细胞/孔	AIM-V +1X pen/strep/谷氨酰胺	300 IU/ml IL2	10 ng/ml OKT3 (抗-CD3) –从 PBS-/-中的 1 ug/ul 贮液中制备新鲜的 10 ng/ul 管

[0277] 实施例3:逆转录病毒的产生

[0278] 按照之前的描述构建逆转录病毒载体Nanog RFP、Lin28RFP、Oct4eGFP和Sox2eGFP

(见,美国申请号61/088,054,通过引用方式并入本文)。类似地构建逆转录病毒载体c-Myc RFP、Klf4RFP、Oct4eGFP和Sox2eGFP。为了抵抗c-Myc表达带来的可能的毒性效应,可以构建逆转录病毒载体SV40大的T基因(SV40LT)-RFP,并用于一些组合中(Yu等人,2009)。

[0279] 293T细胞制备程序的详细信息(表2):在转染前大约24小时接种细胞。计算产生用于所进行的实验的足够体积的病毒上清液所需的细胞数目。吸掉培养基并以5ml PBS洗涤293T细胞,然后吸掉。加入1ml 0.05%胰蛋白酶/EDTA/10cm平板,并均匀分配。将平板在室温温育2-5分钟,以手或通风柜的壁稳固叩打以使细胞移动,并加入4ml D10F。研磨293T细胞(吸液3-4次)以确保单细胞悬浮液并转移进入15ml锥形管中。取出300ul 293T细胞并在CEDEX细胞计数器上计数。在D10F培养基中调整细胞浓度至$5x10^5$个细胞/ml。将10ml细胞悬浮液铺板于实验所需的每个10cm平板($5x10^6$细胞/板)。

[0280] 表2.293T细胞的制备

[0281]

293T	细胞数目	病毒上清液产量	培养基
10cm平板	5x 10^6	5ml	D10F

[0282] 用于生产逆转录病毒的短暂转染:将293T细胞以$5x10^6$个细胞/10cm培养皿进行接种,并过夜温育。次日,使用PEI(Sigma)亲脂性试剂和OptiMEM(Invitrogen),以10ug MMLV逆转录病毒载体,3ug Gag/pol,1ug NFkB和1ug VSVg转染细胞。以40ul PEI温育500ul OptiMEM 5分钟。在单独的管中,将10ug逆转录病毒载体+3ug Gag/pol+1ug NFkB+1ug VSVg加入到500ul OptiMEM中。将PEI/OptiMEM混合物加入到DNA/OptiMEM混合物中,总共大约1ml,并温育25分钟。在温育过程中,以10ml PBS-/-洗涤受体293T平板,并加入4ml不含FBS的DMEM。将DNA/PEI混合物逐滴直接加入至293T细胞中。4小时后,将培养基更换为5ml DMEM/10%FBS/50mM HEPES并温育。转染48小时后,显示293T细胞的荧光以确认高效率转染。收集培养基(5ml/平板)作为含病毒的上清液。通过0.8um孔径的滤纸过滤上清液并收集以用于随后的转导。

[0283] 验证T细胞扩增和表型的详细信息(在重编程之前大约1天):T细胞应该代表细胞群体的大多数,因为加入了细胞因子和抗体。通过以抗-CD3、抗-CD4和抗-CD8流式细胞术抗体进行表面染色来进行验证。另外,进行细胞计数。注意到在解冻后有迟滞,但是从d0开始,细胞数目增加;记录该细胞计数并与次日的细胞计数进行比较以验证加倍情况。

[0284] 实施例4:T细胞的逆转录病毒转导(第0天)

[0285] 在IL2和OKT3激活和扩增3天之后,细胞群体中包含97%-99%的T细胞。将这些T细胞以$1x10^6$个细胞/孔重悬于体积为2ml的DMEM(Invitrogen)+10%FBS(Hyclone)+含逆转录病毒的培养基,300IU/ml rhIL2(重组人IL-2)和4ug/ml聚凝胺。含逆转录病毒的培养基这样制备:以MMLV装配元件以及已知的参与重编程的数种转录因子之一转染293T细胞。在分别制备各病毒之后,将培养基组合为两个不同的混合物,并暴露于T细胞;第一组包含表达转录因子Sox2,Oct4,c-Myc和Klf-4的病毒;第二组使用表达Sox2,Oct4,Nanog和Lin28的病毒。单独地,将细胞暴露于6钟病毒之一,作为对照转导。将细胞培养基更换为含有病毒的培养基,将细胞在32℃在1000g离心1.5h(旋转感染)。然后,将细胞在37℃温育4小时。温育之后,小心地吸掉1ml培养基,并更换为新鲜的DMEM+10%FBS。轻轻地研磨细胞以混合并确保均匀重悬。研磨之后,温育培养物18小时,从开始旋转感染时计时。18小时之后,收获细胞,

重悬于新鲜的病毒上清液+DMEM+10％FBS+IL2+聚凝胺，重铺板于新鲜的24孔板中，并按照上文描述进行第二次旋转感染。

[0286] 收获逆转录病毒和转导T细胞的程序的详细信息(第0天)：除了重编程因子之外，每个逆转录病毒携带荧光蛋白标签。由此来确认高效率转染。在转染后48小时通过荧光显微镜显示293T细胞。收集293T培养基(～5ml/平板)，离心以除掉碎片，将含病毒的上清液经由0.8um注射器过滤器过滤并置于单独的15或50ml锥形管中。病毒在4℃储存0-5天。激活T细胞并且连续每天进行计数以确认它们在感染之时(第3天)指数生长。收获细胞、离心、重悬于含病毒的上清液中，并以$1x10^6$细胞/孔接种于24孔板中。对于每个病毒贮液，每个孔所使用的体积描述于表3(总体积＝2ml)。进行6个单独的对照转导以确认各个病毒贮液的感染力。对于后续的转导，将$1x10^6$个细胞重悬于500μl病毒贮液之一中，使用D10F和300IU/ml IL2+4ug/ml聚凝胺将总体积调节至2.0ml。所有的重编程试验都按照一式两份或一式三份进行。未转导的细胞用作阴性对照。

[0287] 表3.用于重编程T细胞的病毒上清液

[0288]

	重编程基因	病毒的体积
第 1 组	OCT4	500 μl
	SOX2	500 μl
	NANOG	500 μl
	LIN28	500 μl
	或	
第 2 组	OCT4	500 μl
	SOX2	500 μl
	C-MYC	500 μl
	KLF-4	500 μl

[0289] 将平板在1000g在32℃旋转感染1.5小时，加速设定为～4，制动设定为～4。旋转之后，将平板转移至温育箱中温育4小时。温育4小时之后，将平板小心地转移至通风柜，同时保证不推挤平板(保持细胞沉降在孔的底部)。将平板在通风柜中静置5分钟。使用P1000移液管从孔的顶端小心地吸取1ml培养基/病毒。加入1ml新鲜D10F和300IU IL2后，将平板在37℃温育18小时。将任何未使用的病毒上清液储存于4℃，以用于第二轮感染。

[0290] 第二次转导T细胞的程序的详细信息(第1天)：从最初旋转感染开始(第0天)之后24小时，将所有孔中的细胞逐一收集在无菌加盖的FACS管中，并在1200rpm离心4分钟。对于每个管/孔，使用玻璃抽吸器上的新鲜的10ul非过滤尖头吸取上清液。将细胞重悬于合适的病毒、IL2和聚凝胺中，如上文所述。将细胞铺板于同一平板的未使用过的孔中或新的24孔板中(来自第一次转导的孔不再使用)。然后进行旋转感染，重复上文所述的步骤。

[0291] 用于验证T细胞扩增的程序的详细信息(第1天)：在留下的未转导的孔的样品上进行Cedex细胞计数。此时，细胞相对于d0正进行数目上的指数增加。记录该细胞计数并与前

一天的计数进行比较以确认加倍情况。该孔保持作为阴性对照以及用于任何将来的测试。视需要通过更换一半培养基+300IU IL2/ml喂养该孔中的细胞。

[0292] 实施例5:将转导的T细胞铺板于MEF

[0293] MEF铺板:将MEF铺板于明胶包被的6孔板或10cm培养皿,1-3天之后,导入转导的细胞或iPS集落(转导前1天铺板MEF可能是最佳的)。

[0294] 验证T细胞扩增和转导效率:激活2-3天之后,通过以抗-CD3、抗-CD4和抗-CD8表面染色通过流式细胞术来验证T细胞性质,并在转导后验证,以确认成功转导的细胞群体。在第0、2、3和4天进行CEDEX细胞计数以确认指数扩增,并由此确认MMLV逆转录病毒感染的顺从性(amenability)。

[0295] 将转导的T细胞铺板于MEF:在最初转导成功之后第3天,通过如上所述的荧光显微镜和流式细胞术验证效率评估。以两种细胞浓度($5x10^6$和$2x10^6$)将转导的细胞加入到10cm培养皿MEF平板中的按照50:50组合的D10F:不含FGF的hES(不加IL2或其它细胞因子)培养基中。温育细胞并隔日喂养。

[0296] 铺板经辐射的MEF的程序的详细信息:在导入转导的细胞之前1-3天,铺板MEF。计算所需的10cm平板的数目(500k转导的细胞/10cm平板;转录因子(第1组或第2组)、未转导的对照、仅c-Myc的对照、仅MEF的对照—5平板+)。使用0.1%明胶包被10cm平板至少1小时,然后吸掉。将15ml经辐射的MEF细胞悬浮液(~7.5x 10^4细胞/ml)加入到每个10cm平板中。次日,检查细胞以确保MEF已经附着。

[0297] 将转导的T细胞转移至经辐射的MEF上的程序的详细信息(第3天):使用荧光显微镜验证转导。使用流式细胞仪验证转导并测定转导效率。最少20%的效率被认为是进行重编程所需的(铺板至MEF上等)。进行GFP/RFP分析和表面染色以确认T细胞的转导不依赖于其它细胞群体。将100ul细胞收集于FACS管中,并在1200rpm离心4分钟。吸掉上清液,将细胞重悬于5ml FACS缓冲液中并再次离心。将沉淀物重悬于150ul FACS缓冲液中,并以抗-CD3、抗-CD4或抗-CD8流式细胞术抗体染色。在流式细胞仪上分析细胞,以验证$CD3^+$细胞(T-细胞)被转导以及被转导的子集是什么。从经辐射的MEF平板中吸掉培养基并加入7.5ml DMEM+10%FBS。收集$5x10^5$转导的T细胞,在1200rpm离心4分钟,并重悬于7.5ml不含bFGF的hES培养基。将T细胞逐滴加入至经辐射的MEF平板中。不加IL2或其它细胞因子。然后,将MEF平板在37℃温育。

[0298] 实施例6:铺板于MEF的转导的细胞的维持和喂养

[0299] 第5-9天:对于每个重编程10cm平板,以补充了100ng/ml斑马鱼FGF的hES培养基(CM)进行一半培养基的更换。开发了新的喂养策略以使细胞悬浮液损失最小化,同时使更换培养基的阳性效应最大化。简而言之,使用5个10cm培养皿盖(对于所有后续喂养也再次利用)作为支架使培养皿倾斜。从温育箱中小心地取出培养皿,不碰到任何疏松粘附的细胞。将平板以一定角度置于预设的盖上,但不要使MEF/细胞暴露。使细胞沉降10分钟。沉降之后,除掉盖,从平板底部的培养基水平线的最顶端小心/缓慢地吸掉7.5ml。通过收集由此取出的培养基、在1200rpm离心4分钟、重悬于1ml培养基中并在CEDEX上计数,验证了细胞损失小于1%。然后以圆周运动逐滴加入7.5ml新鲜的培养基,小心操作,不要碰到细胞,将培养皿放回至温育箱中。该方法的目的在于使细胞损失最小化,同时允许常规地进行培养基更换。第9-30天:对于每个重编程10cm平板,以补充了100ng/ml斑马鱼bFGF的MEF条件化的

hES培养基(MEF-CM)进行一半培养基的更换。

[0300] 维持和饲养方案的程序的详细信息(第5-30天):第5-9天:对于每个重编程10cm平板,以补充了100ng/ml斑马鱼FGF的hES培养基(CM)进行一半培养基的更换。收集5个10cm培养皿盖用于所有后续喂养,作为支架使培养皿倾斜。从温育箱中取出10cm重编程培养皿,将平板以一定角度置于盖上,但不要使MEF/细胞暴露(培养基应该仍然覆盖整个表面,汇聚在底部,且不洒出)。使细胞沉降10分钟。沉降之后,除掉每个盖,从平板底部的培养基水平线的最顶端小心/缓慢地吸掉7.5ml上清液。收集上清液或吸掉的培养基、在1200rpm离心4分钟、重悬于1ml培养基中并在CEDEX上计数。经验证细胞损失小于1%。以圆周运动逐滴加入7.5ml新鲜的培养基,小心操作,不要碰到细胞,放回至温育箱中。每隔一天对重编程平板进行喂养方案。第9-30天:对于每个重编程10cm平板,以补充了100ng/ml斑马鱼bFGF的MEF条件化的hES培养基(MEF-CM)进行一半培养基的更换。如第5-9天一样,以该培养基进行喂养。

[0301] 实施例7:鉴定和挑取iPS集落

[0302] 激活和扩增的T细胞显示出特征性细胞形态和簇集行为。通过最初转导后72小时的GFP和RFP表达来测定逆转录病毒转导效率,在~3周的进程中,转基因沉默并显示出hES细胞表型。在第23天开始出现良好确定的iPS细胞集落。通过荧光显微镜验证GFP和RFP沉默,使用移液管枪头在解剖通风柜中挑取集落。然后将集落碎片转移至经辐射的MEF的新鲜的6孔板。计数集落的数目以估计给定的输入铺板细胞数目下的重编程效率。从此刻开始,每日喂养克隆集落,并人工再传代一次,然后按照下文的详述进行扩增。

[0303] 程序的详细信息:形态上讲,iPS细胞集落是密集的,并且包含小的、致密的具有增大的细胞核和2个不同核仁的细胞。集落的边界通常是确定的。在iPS集落中,表达自整合的病毒DNA的GFP和RFP是沉默的。一些好的真正的集落在转导后~20天时丧失荧光,一些在它们被挑取和转移后、感染后~35-40天时丧失荧光。在此处观测的集落中,所有的集落都不具有GFP和RFP的表达(虽然在附近的单个细胞中观察到一些表达)。这在细胞类型之间可能是不同的,尤其是与成纤维细胞相比。为了人工挑取,将移液管枪头以"tic tac toe板"方式在集落上直接拖曳,以将其破碎为3-6个碎片,以增加从周围的MEF和T细胞释放干细胞的概率。除非形成多个集落,否则不进行挑取,以避免使总集落的计数混淆,即,如果剩下小块的集落,其可能重新沉降并被误计数为新的克隆。然后将细胞直接转移至含有MEF和hES培养基及100ng/ml斑马鱼bFGF的6孔板的接收孔中。然后监视1-2周增殖、形态和荧光的丧失,以确认克隆确实被完全重编程。挑取后1天不喂养,之后每日喂养。在挑取和铺板的集落粘附并显示出特征性ES样形态之后,按照上文描述,再次人工挑取这些ES样集落至一组新的经辐射的6孔MEF板上,并每日喂养。随着孔变为汇合,使用1mg/ml的胶原酶将细胞按照正常的iPS细胞系传代(Yu等人,2007)。在多个传代将iPS细胞冷冻,在每一组进行测试解冻。

[0304] 克隆性iPS集落在d23-30形成21个集落(均来自第一组因子,如d30),7个来自高转导的细胞接种密度($2x10^6$/10cm培养皿),14个来自低密度($5x10^5$/10cm培养皿)。喂养培养皿,直至确认不再生长出另外的集落。获得、冷冻并扩增iPS系。

[0305] 实施例8:从人外周血T淋巴细胞衍生诱导的多能干细胞

[0306] 使含有$1x10^6$细胞的富含激活的T细胞的群体经历两轮(在第0和1天)逆转录病毒转导:使用4个单独的载体,每个编码一种重编程因子(SOX2,OCT4,c-Myc或KLF4),重编程因子连接于荧光标志物基因(代表性的载体图谱显示于图10)。通过荧光显微镜和流式细胞术

在第3天测定转导效率。就CD3的染色显示转导的群体为99%+/-1%$CD3^+$(图2A)。

[0307] T细胞非常适合于作为重编程的起始材料,因为它们在全血中含量富足(在健康成人中为~$6.5x10^5$-$3.1x10^6$/ml)(Lichtman and Williams,2006)并且易于使用已经完善建立的程序进行培养(Johnson等人,2009;Morgan等人,2006)。为了促进T细胞增殖和有效率的逆转录病毒转导,从白细胞去除术或标准静脉穿刺术(**Vacutainer©**CPT管)分离外周血单核细胞(PBMC),以重编程为iPS细胞(图1)。使用抗-CD3抗体激活来自未经动员的供体的PBMC,并在存在IL-2的情况下在无血清培养基中扩增(图2A)。这引起成熟的$CD3^+$T-细胞的优先扩增,其由平均第3天的纯度为90%+/-7%的$CD3^+$组成(图2A)。

[0308] 然后以重编程因子转导主要偏向于T细胞的群体。将含有转导的T细胞的细胞群体置于补充了100ng/ml碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的hESC培养基中的经辐射的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上。从第23天开始观察到iPSC集落。通过将具有hESC样形态的集落数目除以转导细胞的输入数目来估计T细胞的重编程效率,测定为大约0.01%,类似于已经公布的成纤维细胞和$CD34^+$细胞的重编程效率(Yu等人,2007;Loh等人,2009)。

[0309] 从白细胞去除术样品(来自西班牙成年男子,该系被称作"TiPS-L")和全血**Vacutainer©**样品(来自高加索人成年男子,该系被称作"TiPS-V")产生TiPS。在每种情况下,使用等于1ml全血中T细胞的量的输入细胞数目实现了重编程。在MEF上扩增显示出hESC形态的集落,并且使用mTeSR培养基和Matrigel包被的平板在无饲养物的条件下成功维持了克隆。

[0310] 使用流式细胞术(图2B)和碱性磷酸酶染色(图8),通过hESC多能性标志物SSEA-3,SSEA-4,Tra-1-81和OCT4验证多能性。

[0311] 还进行了DNA指纹谱以验证TiPS与起始的供体T细胞具有相同的遗传背景,并鉴定细胞系的交叉感染(图7)。STR(短串联重复)分析显示:iPS克隆来自供体的遗传物质。供体PBMC和iPS系是男性特异性的,并且在所分析的8个STR基因座上就15个等位基因多态性而言是彼此相同的(下表4)。

[0312] 表4.通过多态性确认细胞性质

[0313]

基因座	重复#	TiPS1ee	PBMC 供体A	Fib-iPS
D16S539	5,8-15	11,12	11,12	10,13
D7S820	6-14	8,10	8,10	9,12
D13S317	7-15	8,12	8,12	11,13
D5S818	7-15	12,13	12,13	12,13
CSF1PO	6-15	12,12	12,12	11,13
TPOX	6-13	9,11	9,11	8,9
釉基质	NA	X,Y	X,Y	X,X
TH01	5-11	7,9	7,9	8,9.3
vWA	11,13-21	16,18	16,18	16,19

[0314] 通过多重PCR检测TCRβ链重排确认了TiPS系是T细胞来源的(图2C)。T细胞在TCRβ链中具有单一的生产性的V-J重排,并且应该在变为TiPS细胞之后保留此特征性基因序列;使用组合了针对最常见的β链重排的多个引物的主混合物(master mix),通过PCR扩增显示

了独特大小的一个带，通过在ABI 3730DNA分析仪上进行片段分析电泳图测定了序列。衍生自成纤维细胞的iPS细胞“Fib-iPS”用作阴性对照。

[0315] TiPS克隆表达人胚胎干细胞标志物基因DNMT38、LEFT8、NODAL、REX1、ESG1、TERT、GDF3和UTF1(图3A)。从H1hES细胞、Fib-iPS(衍生自成纤维细胞)、来自原始供体的T细胞中分离总RNA，使用RT-PCR分析TiPS克隆TiPS1ee和TiPS1b。进一步的表征证明了转基因整合进入宿主基因组中，并且它们在成功重编程之后沉默(图3B-3C)。在以上所有测验中，TiPS类似于hESC系H1和衍生自成纤维细胞的iPSC系对照。重编程基因的内源和外源(转基因)表达显示出完全的重编程，如转基因表达之沉默所证明(图3C)。GAPDH用作A+B中的扩增对照。分离并通过PCR分析基因组DNA，以确认重编程基因的整合：使用的是针对目标基因的正向引物和针对IRES的反向引物(图3B)。OCT4正向和反向引物用作PCR反应对照。

[0316] TiPS克隆表达人胚胎干细胞特异性多能标志物，如通过流式细胞术分析(图3D)、碱性磷酸酶染色和通过G带染色体分析进行的核型分析所证明。在多次传代之后，这些系在核型上是正常的，在培养物中繁殖了超过30个传代同时保持正常的核型(图9)。

[0317] 最后，测评了TiPS细胞系以确定它们的体内和体外分化潜力。TiPS克隆形成畸胎瘤，其含有与衍生自所有三个原始胚层一致性的组织(图4A)。还测定了细胞系在体外在多种定向分化程序中分化为外胚层和中胚层谱系的能力。这些克隆能够产生神经元，跳动的心脏肌钙蛋白T阳性心肌细胞和多潜能的粒细胞-红系-巨噬细胞-巨核细胞(GEMM)造血细胞(图4B-4E)。

[0318] TiPS分化为多种细胞类型。通过以下方法使TiPS分化为心肌细胞。TiPS克隆形成类胚体(EB)，并且通过HGF/bFGF介导的心脏诱导分化为心肌细胞(图4C)。在第14天观察到跳动的心肌细胞聚集物。TiPS还分化为血液(图4E)。使用BMP-4、VEGF、Flt-3配体、IL-3、GM-CSF和FGF-2的组合从EB衍生出造血祖细胞(HPC)。使用集落形成单位(CFU)检验法测定了衍生自TiPS1ee的HPC的功能能力。在第12天观察到CFU-GM、BFU-E和CFU-GEMM集落。

[0319] 总之，从衍生自未动员的供体的外周血的T细胞成功产生了iPS细胞。起始材料的量能适应来自标准真空管的1ml起始材料。TiPS反映了宿主材料的性质。TiPS也具有正常人ES细胞和衍生自其它细胞来源的iPS细胞的标志性特征。TiPS进一步分化为多种细胞类型，包括跳动的心肌细胞聚集物和血液细胞。

[0320] 没有观察到TiPS克隆与hESC系或衍生自成纤维细胞的iPSC系之间的分化潜力上的显著性差异(图4D-4E)。可以测试iPSC基因组中的TCR基因重排的持续性对于随后的分化的潜在效应。

[0321] 事实上，TCR重排被证明在一些情况下是有利的，例如对于iPSC克隆追踪，如通过检测衍生物畸胎瘤中的亲代系克隆性TCRβ链重排所证明(图5)。此外，在重分化为T细胞之后，TiPS细胞可以越过常规的胸腺发育顺序中的关键步骤，这是由于它们的预先重排的TCR基因的表达引起的TCR等位基因排除机制所造成的。该现象可用于T细胞发育研究。

[0322] 应该注意：当使用逆转录病毒重编程程序时，插入性诱变和细胞功能的其它潜在打乱是可能的(Mirxhwll等人，2004)。使用游离的重编程方法的最近进展可以解决这些问题，正在努力通过这些备选方法重编程T细胞(Yu等人，2009；Zhou等人，2009)。此外，用于此类游离地重编程的TiPS细胞的潜在的治疗性应用的有趣的实例是作为来源以分化无整合的携带特异于肿瘤相关抗原的内源性TCR基因的造血干细胞(van Lent等人，2007)。

[0323] 之前关于重编程小鼠中的末端分化的B淋巴细胞的报告需要添加或敲低与细胞性质相关的转录因子，并使用脱氧环化素可诱导的表达系统(Hanna等人，2008)。最近，公开了重编程鼠T细胞的描述，其需要敲除p53基因以成功产生iPSC(Hong等人，2009)。涉及操作抗增殖途径的实验(Li等人，2009；Marion等人，2009；Kawamura等人，2009；Utikal等人，2009)提供了关于重编程机理的认识，并且可能显著增强重编程效率。然而，上述操作没有一个是成功地通过病毒重编程人T细胞所需要的。另外，我们的数据联同重编程成人$CD34^+$造血祖细胞中使用的方法(Loh等人，2009；Ye等人，2009)现在提供了主要是人的系统，以检测在小鼠系统中的最近的发现，这使输入细胞的分化阶段与重编程效率关联起来(Eminli等人，2009)。

[0324] 发现了从小的、临床上有利的体积的未动员的人外周血衍生iPSC。T细胞代表了用于重编程的丰富的细胞来源，可以通过最小侵入方式从大量的供体收集并通过已完善建立的程序来培养。在实验中发现，TiPS具有与hESC系和衍生自成纤维细胞的iPSC系类似的特性和分化潜力。另外，TiPS提供了新的模型，用于研究iPSC克隆追踪，T细胞发育和iPSC技术的治疗性应用。

[0325] 材料和方法

[0326] 细胞生长培养基和碱性成纤维细胞生长因子——使用之前描述的方法(Yu等人，2007)维持iPSC系。在所有的实验中，以斑马鱼bFGF替代人bFGF，如之前所描述(Ludwig等人，2006a)。

[0327] 成纤维细胞iPSC系——使用获自ATCC(Manassas，VA)的IMR90细胞，按照之前的描述(Yu等人，2007)产生对照的成纤维细胞衍生的iPSC系，称作“Fib-iPS”。

[0328] T-细胞激活和扩增——从以“淋巴细胞分离培养基”(Cellgro，Manassas，VA)处理的HLA-A2阳性男性西班牙成人供体(“供体L”)白细胞包(Biological Specialty Corp，Colmar，PA)获得外周血单核细胞(PBMC)。另外，通过标准的静脉采血术在**Vacutainer©** CPT™管(BD Biosciences，San Jose，CA)中从血清型未知的高加索男性供体(“供体V”)收集全血样品，并根据生产商的推荐通过离心收集PBMC。根据Helsinki声明和Biological Specialty Corporation(Colmar，PA，USA)的机构审查委员会的批准在书面知情同意的情况下获得血液样品。在新鲜制备的补充了pen/strep/谷氨酰胺(Invitrogen)+300IU/ml rhIL2(Peprotech，Rocky Hill，NJ)和10ng/ml可溶性抗-CD3抗体(eBioscience，OKT3clone，San Diego，CA)的AIM-V培养基(Invitrogen，Carlsbad，CA)中扩增T细胞(Chatenoud，2005；Berger等人，2003)。通过CEDEX(Roche Innovatis，Bielefeld，Germany)在培养3天后进行细胞计数以验证增殖，并在该时刻测定T细胞表型，然后以重编程因子进行转导。

[0329] 用于生产逆转录病毒的短暂转染——使用聚乙烯亚胺(“PEI”)亲脂性试剂(40ug/10cm平板)，以10ug逆转录病毒载体(莫洛尼鼠白血病病毒)骨架[其编码4种重编程基因中的各1种和荧光标志物基因(GFP或RFP)]，3ug Gag-Pol，1ug质粒(其编码NFkB的衍生物)和1ug水泡口炎病毒G蛋白转染10cm平板中的70-80％汇合的293T细胞，以此来产生逆转录病毒。4小时后，将培养基更换为5ml DMEM(Invitrogen)+10％FBS(Hyclone，Waltham，MA)和50mM HEPES(Invitrogen)。转染后48小时收集病毒上清液，离心，并通过0.8um孔径的过滤器。

[0330] 通过旋转感染进行逆转录病毒转导——通过在1000g在32℃在4种逆转录病毒上清液的混合物+4ug/ml聚凝胺(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)和300IU/ml rhIL-2中离心1.5小时而“旋转感染”1x10^{6}激活的供体细胞/孔。旋转感染之后,更换平板中的一半培养基,并过夜温育。次日,通过离心收获细胞并再次进行旋转感染。

[0331] T细胞扩增和转导效率的验证——通过以抗-CD3抗体(BD,克隆HIT3a)进行表面染色、通过流式细胞术在激活后3天验证T细胞性质,并在转导后验证哪些细胞群体被成功转导。在Accuri流式细胞仪(Ann Arbor,MI)上运行样品。在第0、3和4天进行CEDEX细胞计数以确认扩增,并由此确认对于MMLV逆转录病毒的易感性(数据未显示)。

[0332] 将转导的T细胞铺板于MEF——在最初转导后72小时,通过荧光显微镜和流式细胞术验证转导成功和效率评估,如上所述。将5x10^{5}转导的细胞加入到10cm平板中,在所述平板中事先1-3天在50/50的D10F:无zbFGF(或另外的细胞因子)的hESC的组合中接种了MEF。温育细胞并通过每隔一天更换一半培养基而以hESC培养基+100ng/ml zbFGF(第一周)或MEF条件化培养基+100ng/ml zbFGF(之后)喂养细胞。为了避免饲养过程中的细胞损失,将平板以一定角度稍微倾斜10分钟,以允许细胞沉降,并从培养基水平线缓慢除掉培养基。

[0333] iPSC集落鉴定和挑取——具有良好确定边界和典型的hESC形态的集落大约在第23天开始出现。通过荧光显微镜验证GFP和RFP沉默,计数集落的数目以估计给定的输入铺板细胞数目下的重编程效率。人工收获集落、转移至MEF,并根据已经确立的程序扩增(Maherali and Hochedlinger,2008;Thomson等人,1998)。通过将推定的iPSC集落总数目除以转导细胞的输入数目来估计重编程效率。在集落收获(第25-30天)之后停止计数,以避免包括进入假阳性的在收获后重接种的集落。

[0334] DNA指纹——将TiPS细胞系和供体的PBMC送至威斯康星大学的组织相容性/分子诊断实验室(Madison,WI)进行短串联重复序列(STR)分析。从TiPS细胞样品DNA测定8个STR基因座的基因型。

[0335] 核型分型——由WiCell研究所(Madison,WI)进行G带分析。

[0336] T-细胞受体β链重排分析——根据生产商的说明书从供体T细胞、TiPS细胞系和成纤维细胞(非T细胞)衍生的iPSC细胞系(用作阴性对照)分离基因组DNA(使用Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit)。另外,从冷冻的畸胎瘤样品和亲代细胞系分离DNA:首先将组织和细胞样品溶解于含有Tris,NaCl,EDTA,SDS和蛋白酶K的缓冲液(Invitrogen)。然后以饱和的NaCl和乙醇沉淀DNA,重悬于水中以进行PCR分析。使用特异于多数克隆性TCRβ链重排的多重引物试剂盒(Invivoscribe Technologies,San Diego,CA)进行PCR(van Dongen等人,2003)。在威斯康星大学的生物技术中心DNA测序核心设备(Madison,WI)上使用ABI 3730DNA分析仪进行毛细电泳和PCR产物片段分析。使用Peak Scanner软件(ABI,Foster City,CA)分析数据。

[0337] 碱性磷酸酶(AP)染色——根据生产商的说明书,使用Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III(Vector Laboratories,SK-5300,Burlingame,CA),对生长于MEF上的汇合的细胞进行AP染色。

[0338] 用于转基因和hESC标志物基因表达的RT-PCR——根据生产商的说明书,使用RNeasy Mini Kit(Qiagen,Germantown,MD)分离总RNA。根据产品说明书,使用寡聚-dT引物(如之前在Yu等人,2009;Takahashi等人,2007中所描述)使用SuperScript III First

Strand Synthesis Kit(Invitrogen)合成第一链cDNA。按照1:2稀释cDNA并使用GoTaq Green Master Mix(Promega,Madison,WI)使用Mastercyler(Eppendorf,Hauppauge,NY)进行PCR反应。

[0339] 病毒整合之PCR分析——根据生产商关于培养的细胞的说明书,使用DNeasy Blood and Tissue Kit(Qiagen)从1-5x10^{6}iPSC分离基因组DNA。使用GoTaq Green Master Mix(Promega),使用基因组DNA(5ul)进行PCR反应以测定病毒整合情况。使用仅检测转基因、不检测内源基因的特异性引物组。针对内源性OCT4的引物作为反应的阳性对照。使用之前描述的引物(Yu等人,2009;Takahashi等人,2007)进行反应。

[0340] 流式细胞术:iPSC系的细胞内和表面多能性标志物表征——收获维持于Matrigel上的TiPS,并就Tra-1-81(BD Pharmingen或Stemgent,San Diego,CA,均为克隆Tra-1-81)、SSEA-3(BD Pharmingen,克隆MC631)和SSEA-4(BD Pharmingen,克隆MC813-70)的存在与否进行染色。在以2%多聚甲醛固定并以PBS+0.1%皂角苷通透化的细胞上进行细胞内OCT4(BD,克隆40/Oct-3)的染色。过夜染色细胞并在次日在Accuri流式细胞仪上分析。

[0341] 造血分化和集落形成单元测定——使未分化的TiPS适应于在Matrigel包被的平板上的无饲养物的条件,并使用mTeSR培养基(Stem Cell Technologies,Vancouver BC,Canada)维持。使用TrypLE(Invitrogen)收获集落并置于低附着平板中的无血清的类胚体(EB)基础培养基[含有IMDM,NEAA,谷氨酰胺(Invitrogen)和20%BIT-9500(Stem Cell Technologies)和ROCK抑制剂H1152]中,以促进聚集物形成。聚集物形成之后,将细胞置于补充了下列生长因子和细胞因子的EB基础培养基中,持续12天:rhBMP-4(R&D Systems,Minneapolis,MN),rhVEGF,zbFGF,rhFlt-3配体,rhIL-3和rhGM-CSF(Invitrogen)。收获细胞并通过流式细胞术就CD31,CD34,CD43,CD45,CD41和CD235a的表面染色测定每个iPSC克隆产生的表型。将个体化的细胞置于MethoCult培养基(Stem Cell Techonologies)中,根据生产商的说明书测定集落形成单元。

[0342] 测定畸胎瘤的形成——将培养于MEF上的经表征的iPSC以肌内方式注射进入SCID/beige小鼠(Harlan Laboratories,Madison,WI)的后肢。每个细胞系注射3只小鼠,每个接受1个6孔板的细胞。在注射前向细胞悬浮液中加入1/3总体积的Matrigel(BD Biosciences)。在第5-12周形成肿瘤,并处理以进行苏木精和伊红染色,由McArdle癌症研究实验室(University of WI-Madison)进行组织学分析。所有的动物实验根据相关的国家和国际规程进行,得到Cellular Dynamics International Animal Care and Use Committee的批准。

[0343] 心脏分化——通过细胞聚集方法诱导心脏形成。简而言之,使用胶原酶IV(Invitrogren)收获生长于MEF上的TiPS细胞,使用柠檬酸钠将生长于Matrigel上的细胞分离为单细胞悬浮液。允许细胞悬浮液在超低附着瓶中在存在重组人肝细胞生长因子(HGF)和/或zbFGF的情况下形成聚集物。另外,向Matrigel来源的细胞悬浮液中加入ROCK抑制剂H1152。在第14-15天分离跳动的聚集物并就心脏肌钙蛋白T(cTnT)(Abcam,Cambridge,MA,克隆1C11)染色。

[0344] 神经元分化——按照之前的描述(Ebert等人,2009)进行TiPS细胞的神经分化。简而言之,使用胶原酶IV部分分离生长于MEF上的TiPS,并在补充了B27补充物(Invitrogen),bFGF(100ng/ml)和上皮生长因子(100ng/ml,Chemicon,Billerica,MA)的Stemline Neural

Stem Cell Expansion Medium(Sigma-Aldrich)中以聚集物的形式悬浮培养。使用McIlwain组织切碎机将培养物进行每周传代。为了诱导神经分化，使球体在神经诱导培养基(DMEM/F12+N2补充物,Invitrogen)中生长1周，然后铺板于聚-鸟氨酸/层粘连蛋白(Sigma-Aldrich)-包被的盖玻片中的补充了cAMP(1uM,Sigma-Aldrich)、抗坏血酸(200ng/ml,Sigma-Aldrich)、脑衍生的神经营养因子和胶质细胞系衍生的神经营养因子(二者均为10ng/ml,R&D Systems)的相同的神经诱导培养基中，再持续3周。按照之前的描述(Zhang等人,2001)，通过免疫荧光染色分析神经元标志物βIII-微管蛋白的表达。

[0345] 实施例9:从冷冻保存的人外周血患者样品进行T细胞的逆转录病毒重编程

[0346] 本实施例呈现了用于“10个供体”实验的程序。在该实验中，在10个患者样品上进行了重编程试验，这10个患者样品中的每一个都成功地重编程。图6A-6B显示了96孔板中的MEF上的IPS集落的Tra-1-60染色(使用小数目的输入T细胞)。这证明了T细胞方法的效率。

[0347] 本实施例用于有效地逆转录病毒地重编程人外周血T淋巴细胞的一组程序(如下文详述的程序1-11)，尤其是实现基于莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)的人外周血T淋巴细胞重编程的多个步骤和时限。本实施例着眼于使用冷冻保存的细胞和包含双基因MMLV载体Oct4-Sox2和c-Myc-Klf4或Nanog-Lin28的新鲜制备的病毒上清液。本实施例中的程序可适用于其它载体系统，并且也可用于非冷冻保存的样品。

[0348] 1.制备程序

[0349] 在订购和/或收到外周血样品之前，建立并维持粘附性293T细胞的活跃生长的培养物和非粘附性Jurkat细胞的单独培养物。使293T细胞繁殖以满足用于生产病毒的需要。生产病毒需要使用数种载体和辅助质粒，如以下的“制备MMLV重编程病毒载体”部分所描述。在进行该步骤之前准备这些DNA样品是必要的。最后，还推荐在“制备MMLV重编程病毒载体”之前准备过量供应的MEF条件化培养基。

[0350] 2.制备和冷冻保存外周血单核细胞(PBMC):

[0351] 以下描述了用于从**Vacutainers®**CPT™管中的人外周血分离人外周血单核细胞(PBMC)和冷冻保存PBMC的程序。该程序旨在促进iPS细胞的衍生。采集血液进入单独的(SST)管中，将该管送至适当的服务实验室以进行感染性疾病测试。将血液样品收集于CPT **Vacutainer©**并送至发明人。在收到样品之后，将它们储存于4℃的适当的生物限制性设备中。在数据库中记录供体信息，并向该供体分配识别符号或编号。根据安全委员会的要求，也记录下感染性疾病测试数据(显示阴性)的收据。

[0352] 收到血液样品之后，通过Sorvall Legend RT离心机(如果有的话，使用生物限制性适配器)在4℃在600x g离心25分钟而从CPT **Vacutainer©**分离PBMC，将沉淀物重悬于10ml冷的PBS(用于冷冻保存)或RPMI+P/S(用于活细胞培养物)。使用Cedex仪器计数细胞。或者，使用台盼蓝和血细胞计数器进行一式三份计数。计数样品并记录每毫升的活细胞数目以及存活率百分率。在4℃在400x g离心15分钟并吸掉上清液以除掉残余的凝固因子。

[0353] 分离之后，制备用于冷冻保存的PBMC:将沉淀物以大约$10x10^6$细胞/ml重悬于冷的CryoStor10，并转移至预冷的冷冻管。通常而言，从1个8ml CPT**Vacutainer©**的产量是$15-20x10^6$个细胞，并且分装到2个冷冻管中。将冷冻管置于预冷的Mr.Frosty罐中，然后将所述罐转移至-80℃冷冻过夜。次日，将冷冻管转移至液氮贮库进行长期保存。

[0354] 3.制备MMLV重编程病毒载体:

[0355] 为了保持最佳病毒活性，推荐在使用之前将病毒上清液储存于4℃，储存小于4天。本程序描述了通过短暂转染基于MMLV的重编程双顺反子载体Oct4-Sox2，cMyc-Klf4和Nanog-Lin28(载体图谱见图11A-11C)而生产含逆转录病毒的培养基。旨在通过使用2个或3个这些载体的组合以96孔板的形式通过逆转录病毒转导人T细胞来促进iPS细胞的衍生。

[0356] 在数天(或周)的时间内繁殖并扩增293T细胞。扩大程度将取决于如下所述的短暂转染方法所需的细胞数目，以及所产生的含有病毒的上清液的对应体积。以下提供了计算这些数值的公式。

[0357] 用于生产病毒的制备物。MMLV重编程载体被称作Oct4-Sox2，cMyc-Klf4或Nanog-Lin28，对应于载体质粒的名称(如图11A-11C所示)，在本文中分别称作OS，CK和NL。可以通过使用OS+CK，OS+NL或所有三个载体的组合(OS+CK+NL)来进行重编程。在启动本程序之前，必须准备过量的每种载体质粒DNA，以及如下所述的辅助质粒。还推荐准备对照MMLV质粒(Sox2-GFP)。

[0358] 确定将接受病毒的含有靶细胞的孔的数目(n)，以及每个孔将接受病毒的何种组合。例如，将10个不同的供体T细胞样品接种于96孔板中，每个接种7个孔，并按照下文描述进行激活。它们总共占据70个孔：每个供体的2个孔将接受OS+CK重编程病毒(nOS+CK＝20)；2个孔将接受OS+NL重编程病毒(nOS+NL＝20)；2个孔将接受对照Sox2-GFP病毒(nGFP＝20)；剩余1个孔将代表非转导对照。

[0359] 通过以下公式计算每个载体所需的上清液培养基的体积(V)：V＝(n)x(剂量)x F；其中剂量＝施用于每个孔的病毒的毫升数(通常为0.05ml)，F代表上清液沉淀(在以下的浓缩病毒步骤中)之后达到的浓缩因子(通常为50倍)。就以上实例而言，接受OS病毒n_{OS+CK}+n_{OS+NL}的孔的总数目是40。假设剂量＝0.05ml，F＝50，计算V_{OS}＝(n_{OS+CK}+n_{OS+NL})x(剂量)x F＝40x(0.05)x 50＝100ml。计算V_{CK}＝(n_{OS+CK})x(剂量)x F＝20x(0.05)x 50＝50ml。计算V_{NL}＝(n_{OS+NL})x(剂量)x F＝20x(0.05)x50＝50ml。计算V_{GFP}＝(n_{GFP})x(剂量)x F＝20x(0.05)x 50＝50ml。

[0360] 使用以下公式计算每个病毒所需的293T细胞平板数(P)：(P)x(Y)＝V，其中V是V_{OS}，V_{CK}，V_{NL}或V_{GFP}(从以上计算获得)，Y是给定平板形式的上清液产量。关于Y值见下表。如果P算出来不是整数，则向上近似至最近的整数。如果必要的话，准备过量的293T平板。

[0361] 解方程P_{OS}＝V_{OS}÷(Y)。对于以上实例：V_{OS}＝100ml，选择15cm形式用于较大的产量/平板，因此Y＝14.5。P_{OS}＝100÷14.5＝6.8个平板。向上近似至P_{OS}＝7个平板。V_{CK}＝V_{NL}＝V_{GFP}＝50ml，因此就P_{CK}、P_{NL}或P_{GFP}解方程：50÷14.5＝3.4个平板；向上近似至各为4个平板。P_{CK}＝P_{NL}＝P_{GFP}＝4个平板。

[0362]

293T	接种密度	病毒上清液产量(Y)	培养基
10cm平板	5x 10^6	4.5ml	D10F
15cm平板	13.5x 10^6	14.5ml	D10F

[0363] 以PBS洗涤293T细胞，并加入足够的胰蛋白酶以覆盖单层。在室温温育10分钟，然后通过叩击培养皿的边缘使细胞移动。将细胞收集于50ml的管中。以小体积的D10F洗涤每个平板。收集并合并洗涤培养基和细胞。彻底混合并转移300ul的等份试样至Cedex杯中并计数细胞。或者，使用台盼蓝和血细胞计数器。在350x g离心10分钟。吸掉上清液并将沉淀

物重悬于新鲜的D10F。计算$P_{OS}+P_{CK}+P_{NL}+P_{GFP}$，通过计算每种病毒所需的293T细胞的平板数(P)计算总平板数。使用下表的接种密度，将所需数目的293T细胞接种于每个平板。在D10F中在37℃/5%CO_2温育大约24小时。如果培养物过度汇合或汇合不足，则转染效率降低，因此病毒产量也降低。在显微镜下显示细胞以确保汇合度是最佳的(大约90%-95%)。

[0364] 进行计算以确定对于每组293T细胞平板的转染需要各多少MMLV或对照质粒(μg_{OS}，μg_{CK}，μg_{NL}或μg_{GFP})。为了简化计算，推荐将每个质粒DNA样品的浓度调整至1.0或2.0mg/ml。从下表中选择合适的数值(见"载体"一列)，并乘以P_{OS}，P_{CK}，P_{NL}或P_{GFP}。然后除以质粒DNA浓度(C_{OS}，C_{CK}，C_{NL}或C_{GFP})，以确定所需的体积(μl_{OS}，μl_{CK}，μl_{NL}或μl_{GFP})。

[0365]

	PEI (1 μg/μl)	载体或对照质粒	2843 (Gag/Pol)	1238 (NFkB)	2842 (VSVG)
10 cm 平板	40 μl	10 μg	3 μg	1 μg	1 μg
15 cm 平板	108 μl	27 μg	8.1 μg	2.7 μg	2.7 μg

[0366] 可选地：调整每个质粒DNA浓度(C)至1μg/μl。就以上实例而言，假设C=1；$P_{OS}=7$，因此$\mu g_{OS}=(27\mu g)x\ 7=189\div C_{OS}=189\mu l_{OS}$。就同一实例而言，$P_{CK}=P_{NL}=P_{GFP}=4$，因此$\mu g_{CK}=(27\mu g)x\ 4=108\div C_{CK}=108\mu l_{CK}$，$\mu g_{NL}=(27\mu g)x\ 4=108\div C_{NL}=108\mu l_{NL}$，$\mu g_{GFP}=(27\mu g)x\ 4=108\div C_{GFP}=108\mu l_{GFP}$。

[0367] 为了确定所有平板所需的每种辅助质粒的总量(μg_{GagPol}，μg_{NFkB}，μg_{VSV})或转染试剂的总量(μl_{PEI})，从上表中选择适当的数值(Gag/Pol，NFkB，VSVG或PEI栏)，并乘以总数值($P_{OS}+P_{CK}+P_{NL}+P_{GFP}$)。然后除以质粒DNA浓度($C_{OS}$，$C_{CK}$，$C_{NL}$或$C_{GFP}$)以确定所需的体积。就以上实例而言，$P_{OS}+P_{CK}+P_{NL}+P_{GFP}=7+4+4+4=19$并假设C=1；则$\mu g_{GagPol}=(8.1\mu g)x\ 19=153.9\div C_{GagPol}=153.1\mu l_{GagPol}$，$\mu g_{NFkB}=(2.7\mu g)x19=51.3\div C_{NFkB}=51.3\mu l_{NFkB}$，$\mu g_{VSV}=(2.7\mu g)x\ 19=51.3\div C_{VSVG}=51.3\mu l_{VSV}$，$\mu l_{PEI}=108\mu l\ x\ 19=2.052ml$。

[0368] 以10cm平板形式进行的转染：管1_{OS}：取等份的(P_{OS} x 0.5)ml OptiMEM，然后逐滴加入(P_{OS} x 40)μl PEI并混匀。不要触碰边缘。在室温温育5分钟。管2_{OS}：取等份的(P_{OS} x 0.5)ml OptiMEM至第二支管。准备适当比例的质粒混合物(10:3:3:1)。从上表中选择合适的数值(μg_{OS}，μg_{GagPol}，μg_{NFkB}和μg_{VSVG})，并乘以P_{OS}以获得所需的质粒数量。然后除以C_{OS}，C_{GagPol}，C_{NFkB}或C_{VSVG}以确定所需的体积(μl_{OS}，μl_{GagPol}，μl_{NFkB}和μl_{VSVG})。将这些体积加入至管2_{OS}：$\mu l_{OS}+\mu l_{GagPol}+\mu l_{NFkB}+\mu l_{VSVG}$并混匀。重复这些步骤：以NL或CK或Sox2-GFP质粒替代OS质粒。准备对应的一组管：管1_{NL}和2_{NL}，或管1_{CK}和2_{CK}，或管1_{GFP}和2_{GFP}。替代合适的P和C值以计算用于管2混合物的合适的体积。为了制备DNA/PEI混合物，将每个管#1与相应的管#2组合，混匀，并在室温温育20分钟。以5ml PBS洗涤每个293T平板2次。向每个平板中加入4ml OptiMEM。向每个平板中直接逐滴加入1ml质粒DNA/PEI混合物。在37℃/5%CO_2温育4-6小时。吸掉培养基，然后以5ml PBS洗涤每个平板。向每个平板中加入5ml D10F+50mM HEPES培养基。在37℃/5%CO_2温育过夜。将Sox2-GFP感染的细胞(对照)转移至荧光显微镜。应该可以检测到荧光。在37℃/5%CO_2再温育24小时。

[0369] 以15cm平板形式进行的转染：管1_{OS}：取等份的(P_{OS} x 1.0)ml OptiMEM，然后逐滴加入(P_{OS} x 108)μl PEI并混匀。不要触碰边缘。在室温温育5分钟。就本实例而言，$P_{OS}=7$：

取等份的7ml OptiMEM至管1_{OS}并加入1.96ml PEI。管2_{OS}:取等份的(P_{OS} x 1.0)ml OptiMEM至第二管。就本实例而言,P_{OS}=7:取等份的7ml OptiMEM至管2_{OS}。制备适当比例的质粒混合物(10:3:3:1)。从上表选择适当的数值(μg_{OS},μg_{GagPol},μg_{NFkB}和μg_{VSVG}),乘以P_{OS}以获得所需的质粒数量。然后除以C_{OS},C_{GagPol},C_{NFkB}或C_{VSVG},以确定所需的体积(μl_{OS},μl_{GagPol},μl_{NFkB}和μl_{VSVG})。将这些体积加入至管2_{OS}:$\mu l_{OS}+\mu l_{GagPol}+\mu l_{NFkB}+\mu l_{VSVG}$并混匀。

[0370] 就本实例而言,P_{OS}=7,并假设对于所有质粒而言C=1:μg_{OS}=27μg x 7个平板=108÷C_{OS}=108μl_{OS},μg_{GagPol}=8.1x 7=56.7÷C_{GagPol}=56.7μl_{GagPol},μg_{NFkB}=2.7x 7=18.9÷C_{NFkB}=18.9μl_{NFkB},μg_{VSVG}=2.7x 7=18.9÷C_{NFkB}=18.9μl_{VSVG}。将这些体积加入至管2_{OS}并混匀。通过以NL或CK或Sox2-GFP质粒替代OS质粒而重复这些步骤。准备对应的一组管:管1_{NL}和2_{NL},或管1_{CK}和2_{CK},或管1_{GFP}和2_{GFP}。替代合适的P和C值以计算用于管2混合物的合适的体积。为了制备DNA/PEI混合物,将每个管#1与相应的管#2组合,混匀,并在室温(RT)温育20分钟。以10ml PBS洗涤每个平板2次。向每个平板中加入13ml OptiMEM。向每个平板中直接逐滴加入2ml质粒DNA/PEI混合物。在37℃/5%CO_2温育4-6小时。吸掉培养基,然后以15ml PBS洗涤每个平板。向每个平板中加入15ml D10F+50mM HEPES培养基。在37℃/5%温育过夜。将Sox2-GFP感染的细胞(对照)转移至荧光显微镜。应该可以检测到荧光。在37℃再温育24小时。

[0371] 收获病毒上清液。再次将Sox2-GFP转染的细胞转移至荧光显微镜。大多数细胞应该发射绿色荧光,并且荧光应该在整个平板上是均一的。生产病毒的细胞也应该显示出细胞形态上的值得注意的变化。从每组转染细胞汇集含有病毒的上清液培养基(注意:上清液含有感染性病毒)。通过0.45um或0.8um的过滤器过滤病毒上清液以除掉细胞和碎片(注意:使用醋酸纤维素或PES低蛋白结合过滤器。不要使用硝酸纤维素过滤器)。MMLV具有有限的保质期;将病毒上清液储存于4℃,不要超过4天。可选地:可以将上清液储存于-80℃,然而,冷冻-解冻循环将引起功能活性的损失。使用至少一种下列度量立即进行处理以测定病毒效价:a)对于增殖中的Jurkat细胞或T细胞的功能活性;和/或b)定量每毫升上清液中存在的病毒RNA。以下描述了MMLV载体的质量控制检验。

[0372] 为了实现96孔模式下的T细胞的高转导效率,浓缩病毒具有重要意义。然而,浓缩的病毒也是不稳定的。此外,T细胞培养物处于最高增殖性(以及因此最容易被感染)的时间窗是窄的。因此,协调靶细胞的制备和浓缩步骤具有重要意义。当已经满足了QC检验时,进行靶PBMC的T细胞的激活,并浓缩病毒上清液以进行重编程。

[0373] 4.进行病毒活性的质量控制检验

[0374] 本程序描述了用于测定以下列MMLV载体转导细胞的转导效率的方法:Oct4-Sox2和c-Myc-Klf4,或Oct4-Sox2和Nanog-Lin28,或Sox2-GFP对照载体。这些测定旨在用于促进iPS细胞的衍生。

[0375] 针对病毒活性的质量控制检验:注意:由于病毒的相对不稳定性,所以,准备好在收集病毒上清液的当日启动一个(或所有)下列QC检验具有重要意义。可以将病毒储存于-70℃,然而,冷冻-解冻循环和/或储存大于3周会引起活性损失。在获得可接受的QC检验结果之后,应该使PBMC复苏。

[0376] 根据生产商的说明书(Clontech),使用每种病毒上清液的等份试样,进行定量实时RT-PCR。备选地(或另外),收集增殖中的Jurkat细胞并使用Cedex计数。将细胞以$1x10^6$/

ml重悬于含有4ug/ml聚凝胺的R10F中。接种100ul细胞/孔至96孔板中。向3个孔中加入50ul病毒，并通过在板的数个行中进行连续稀释来滴定病毒。温育48小时，然后收集细胞进行FACS分析。参见用于细胞内Oct4免疫标记和流式细胞术的程序。备选地(或另外)，收集感染的Jurkat细胞进行半定量PCR分析。如果病毒制备物通过了QC，则继续进行下一个步骤：T细胞的转导。

[0377] 5.复苏供体PBMC并激活T细胞：

[0378] 只有仔细协调病毒上清液的生产和递送与靶细胞的激活时，才能实现以MMLV载体进行人T细胞的有效重编程。本文中公开了成功的激活：来自PBMC的混合群体的$CD3^+$细胞的增殖中出现细胞因子诱导的迸发，导致在培养48-72小时之间肉眼可见的“母细胞”集落的形成。为了以基于MMLV的重编程载体使用该激活程序，重要的是注意：MMLV上清液是不稳定的。因此，应该在控制良好的时间表下制备病毒，从而使新鲜的病毒在形成母细胞集落前1天被施用至T细胞培养物。本程序描述了如上所述的冷冻保存的细胞的复苏，以及母细胞集落的诱导。可以使用PBMC的替代性来源。

[0379] 培养基和细胞因子的制备。在加入病毒之前，必须将细胞激活48小时。因此，该步骤被称作第-2天。重编程开始于第0天。向AIM-V培养基中加入工作浓度的Pen/Strep/谷氨酰胺。储存于4℃，别超过2周。推荐准备小体积的IL2的等份试样，并储存于-20℃。解冻1个等份试样以用于此处。解冻1个等份试样之后，将其储存于4℃，别超过2周。OKT3(1mg/ml抗-CD3)应该储存于4℃。在1ml AIMV培养基中稀释1μl至1μg/ml的中间稀释度。

[0380] 供体PBMC的复苏和T细胞的激活。PBMC被解冻之日被称作第-2天。从贮库中取出PBMC并在37℃水浴中迅速解冻。以等体积的温的RPMI培养基稀释细胞(和冷冻培养基)。轻微混合并转移至15ml的管中。缓慢以RPMI稀释至10ml的总体积。彻底混匀，取出300μl的等份，并使用Cedex算法使用1微米的阈值大小计数细胞。或者，以台盼蓝染色细胞并以血细胞计数器计数。注意：通常会损失50％的存在于原始PBMC样品中的细胞(冷冻保存之前)。然而，剩余的细胞应该是>90％活的。将细胞在350x g离心10分钟，吸掉上清液，并以$2x10^6$活细胞/ml的密度重悬于温的AIM-V+Pen/Strep/谷氨酰胺中。加入300IU/ml IL2和10ng/ml OKT3抗体。混匀细胞，以100μl/孔分装于平底的96孔组织培养板中，在37℃，5％CO_2中温育。如果可能的话，避免使用边缘的孔，因为在这些孔中蒸发更加值得注意。48小时后(第0天)，使用20倍物镜(或更高的放大倍数)通过亮视野显微镜观察细胞。注意：细胞分裂和细胞簇集(初生母细胞集落形成)的迹象应该是可检测到的。

[0381] 6.浓缩病毒上清液：

[0382] 本程序描述了通过浓缩收集自293T细胞(在以重编程载体Oct4-Sox2+cMyc-Klf4或Nanog-Lin28转染之后；代表性的载体图谱显示于图11A-11C)的逆转录病毒上清液而增加MMLV载体效价的两个单独方法。其旨在促进通过逆转录病毒转导T细胞而衍生iPS细胞。推荐：根据如上所述的MMLV载体的质量控制检验来测定病毒上清液的效价。

[0383] 对于大体积的病毒，推荐LentiX方法。该方法需要过夜温育，因此其应该在第-1天开始。或者，对于30ml或更少的病毒制备物，可以在第0天使用Amicon方法。

[0384] 可以将未经浓缩的MMLV上清液(根据上述程序制备)于4℃储存4天而不显著丧失活性。使用任一方法(见下文)浓缩上清液之后，应该把病毒保存在冷的条件下(在冰上)并尽快使用。如果在完成该程序之后，靶细胞还没准备好被转染，则将浓缩的病毒储存于-80

℃。

[0385] 通过LentiX方法浓缩病毒(在第-1天)。注意:对于大规模的病毒浓缩(上清液体积>30ml),推荐该方法。将上清液转移至50ml的管中并根据生产商的推荐加入Lenti-X浓缩剂。将3体积的澄清的病毒上清液与1体积的Lenti-X浓缩剂混合。通过轻轻倒置使其混匀。在4°过夜温育。18-24小时后,在第0天,将样品在1,500Xg在4℃离心45分钟。离心之后,将会看到白色沉淀物。小心地除掉上清液,注意不要触到沉淀物。可以使用移液枪头或通过在1,500Xg轻轻离心而除掉残余上清液。将沉淀物轻轻重悬于1/50最初体积的冷的D10F中。沉淀物最初有点粘,但它应该迅速变为悬浮液。立即将病毒施加至靶细胞。

[0386] 通过Amicon过滤方法浓缩病毒(在第0天)。使用该方法浓缩30ml或更少的病毒上清液制备物。通过加入10ml PBS并将设备在1000x g离心3分钟或直至所有PBS都通过过滤器来洗涤AmiconY100,000MW筒。将15ml病毒上清液施加至Amicon筒并在2000x g旋转20分钟。通常而言,这将产生大约10倍的浓缩(就体积而言)。将样品再旋转5-10分钟以更加浓缩病毒。可以重复该过程以使体积减少至多达1/50(最终体积为大约300μl)。以每种病毒载体上清液重复该过程(平行地)。推荐:不要试图一次处理超过4个Amicon筒。在长时间延迟中,上清液将主动滴过筒并导致重量在相对的转子臂上的不均匀分布。这可能引起离心机失衡。收集滞留物。立即将病毒施加至靶细胞。

[0387] 7.转导激活的T细胞(在第0天):

[0388] 该程序是用于以浓缩的基于MMLV的重编程载体转导人外周血T淋巴细胞。该程序描述了以基于MMLV的重编程载体Oct4-Sox2、c-Myc-Klf4、Nanog-Lin28或Sox2-GFP或其组合在96孔板中转导T细胞。推荐如上所述的质量控制检验以测定使用该程序之前的病毒活性。

[0389] 转导之日代表重编程程序的起始(称作第0天)。该时间点发生于以96孔形式解冻并激活PBMC之后48小时(如程序5.复苏供体PBMC并激活T细胞中所述)。应该根据程序3、4和6事先准备浓缩的MMLV载体。

[0390] 在位相显微镜下观察细胞。应该有初生母细胞集落形成的迹象。

[0391] 可选地:收集细胞并计数。通常而言,PBMC的数目在激活24小时内(第-2天至第-1天)显著下降至大约25-50,000个细胞/孔。在24-48小时之间(第-1天至第0天),细胞数目通常保持不变。在第0天至第1天,ATP含量增加,出现初生母细胞集落形成。第0天的细胞数目通常是1-2x10^5/孔。在第0天至第1天,母细胞集落应该是明显的,并且细胞数目显著增加。

[0392] 可选地:收集细胞进行FACS分析以表征T细胞。之前在多个PBMC供体上进行的试验显示:在第0天有>90%的细胞显示出抗-CD3表面标记。CD4+和CD8+细胞的分布是不同的。通常而言,CD4+细胞是CD8+细胞的2倍。

[0393] 将等体积的每种浓缩病毒汇集并加入8μg/ml聚凝胺和300单位/ml的IL-2。制备足够的该混合物以用于待感染的给定的孔的数目。

[0394] 沿用程序3:将10个不同的供体T细胞样品接种于7个孔中,每个都使用96孔形式,并激活;它们总共占据70个孔。每个供体的2个孔将接受OS+CK重编程病毒(n_{OS+CK}=20);2个孔将接受OS+NL重编程病毒(n_{OS+NL}=20);2个孔将接受对照Sox2-GFP病毒(n_{GFP}=20);剩余1个孔将代表非转导对照。组合(50μl_{OS}+50μl_{CK})x n_{OS+CK}=2ml;加入2μl聚凝胺和1.2μl IL-2。

[0395] 组合(50μl_{OS}+50μl_{NL})x n_{OS+NL}=2ml;加入2μl聚凝胺和1.2μl IL-2。组合(50μl_{GFP}+

50D10F)x n_{GFP}＝2ml;加入2μl聚凝胺和1.2μl IL-2。组合2ml D10F,2μl聚凝胺和1.2μl IL-2用于假感染。

[0396] 向未受打扰的每个孔中加入100μl病毒混合物。以移液管轻轻地混匀细胞。通过加入100μl D10F+300IU/ml IL2+8μg/ml聚凝胺进行假感染。以移液管轻轻地混匀细胞。使用合适的生物限制性适配器,将96孔板在1000x g在32℃离心90分钟。将板转移至37℃/5% CO_2温育箱中过夜温育。

[0397] 铺板经辐射的MEF(第0天或第1天),准备通过MEF共培养物进行重编程(根据程序8)。

[0398] 在第1天——最初暴露于病毒后24小时,检查细胞形态。母细胞集落应该在显微镜下清楚可见。任选地:收集细胞,离心,重悬于无病毒的D10F培养基中并在Cedex上计数。或者,使用台盼蓝和血细胞计数器。

[0399] 小心地从每个孔中取出100μl培养基,不要碰到细胞。对于多个孔,使用多通道移液管,小心不要使枪头太靠近每个孔的底部。将该培养基丢弃在含有10%漂白剂的烧杯或碟中。将培养基更换为100ul新鲜的D10F+HEPES+IL2(300u/ml)。次日,重复更换培养基的步骤(第2天)。

[0400] 验证T细胞扩增并测定转导效率(第2天),根据以下的程序9进行。

[0401] 8.铺板经辐射的MEF(在第0天或第1天):

[0402] 本部分描述了用于将小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)铺板于明胶包被的孔中的方法,其旨在簇集iPS细胞的衍生。

[0403] 铺板经辐射的MEF以产生条件化培养基(CM)。在预期使用之前2-3天订购MEF。根据程序3中用于T细胞重编程的实例,计算在6孔板中维持重编程共培养物大约20次“喂养”所需的MEF-CM的量。每次喂养需要除掉并更换1.25ml/孔。

[0404] 使用10个供体样品(转导的T细胞)x两个实验条件(SO+CK以及SO+NL)x 3个孔/条件＝60个孔。SO是指具有Sox2和Oct4的双顺反子载体,CK是指具有cMyc和Klf4的双顺反子载体,NL是指Nanog和Lin28,都不含任何荧光标志物(载体图谱显示于图11A-11C)。计算所需的MEF-CM的体积(60x 20x 1.25ml＝1.5升)。

[0405] 计算产生足够体积的MEF-CM所需的T75培养瓶-MEF培养物的数目(注意:从1个培养瓶反复收集将产生大约120ml MEF-CM.)。沿用以上的实例,为了产生1.5升MEF-CM:1500ml÷120ml/培养瓶＝12.5个培养瓶。向上近似为13个培养瓶。

[0406] 加入12ml无菌0.1%明胶/T75培养瓶。在温育箱(37℃/5% CO_2)中温育至少1小时。吸掉明胶并加入20ml高密度经辐射的MEF(～2.1x 10^5个细胞/ml)。过夜温育(37℃/5% CO_2)。显示细胞,以确保MEF已附着。铺板24小时之后,吸掉培养基并更换为20ml hES培养基/培养瓶。24小时之后,从每个培养瓶收集～20ml MEF-CM。将步骤6.8和6.9再重复5天。将MEF-CM冷冻于-20℃(仅在使用IPS培养物之前加入4ng/ml zbFGF并过滤,然后过滤。

[0407] 铺板经辐射的MEF(第0天或第1天)以重编程共培养物。在预期使用之前2-3天订购MEF。应该在加入转导的细胞之前1或2天铺板MEF以重编程共培养物。根据程序3中用于T细胞重编程的实例,计算接受10个供体样品x 3个孔/供体x 3个实验条件(SO+CK,SO+NL,GFP对照)所需的MEF的孔的数目＝90个孔。计算所需的6孔板的数目:90÷6＝15个板。加入2ml无菌0.1%明胶/孔(6孔形式)。可选地:以100μl明胶/孔包被96孔板。在温育箱(37℃/5%

CO_2)中温育至少1小时。吸掉明胶并向每个孔中加入2.5ml经辐射的MEF细胞悬浮液(6孔形式)。可选地:对于96孔形式,吸掉明胶并向每个孔中加入200μl MEF细胞悬浮液。过夜温育(37℃/5%CO_2)。显示细胞以确保MEF已附着。

[0408] 9.进行质量控制检验以测定转导效率(在第2天)

[0409] 该程序描述了用于测定人外周血T细胞的MMLV转导的质量控制检验。该检验旨在检测在细胞暴露于浓缩的包含Oct4-Sox2,c-Myc-Klf4,Oct4-Sox2和Nanog-Lin28的组合的MMLV载体48小时之后,靶向的T细胞群体中是否存在转基因或重编程因子。

[0410] 根据上述程序激活人T细胞。48小时后,根据程序7感染激活的T细胞。使用Cedex或血细胞计数器计数细胞。

[0411] 沿用程序3中的实例(并在程序7中继续使用),从每个孔中取出100μl上清液培养基,不要触碰激活的细胞。所有的孔应该剩余大约100μl。混匀并从两个Sox2-GFP感染的孔之一收集剩余的100μl细胞,并将细胞直接转移至Cedex杯。以200μl PBS洗涤每个孔;收集并合并洗液至Cedex杯。视需要调整最终体积至300μl。对于10个供体T细胞样品中的每一个,重复混匀和洗涤步骤。

[0412] 使用T细胞算法(大小阈值=1微米)在Cedex上计数细胞。记录细胞密度(注意:应该有2-4x10^5个/孔)。或者,彻底混匀来自1个孔的细胞并取出10μl,与10μl台盼蓝混匀,然后在血细胞计数器上计数。(注意:这种计数方法不如Cedex精确;然而,其使用的细胞较少)。

[0413] 测定转导的T细胞的转导效率。可选地:使用荧光显微镜以显示经Sox2-GFP病毒转导的细胞。使用多通道移液管,混匀并从1个孔的来自每个供体样品的Sox2-GFP感染的T细胞(10个孔)中收集剩余的100μl细胞。将细胞转移至96孔V底收集板中的对应的孔中。混匀并从来自每个供体样品的对照孔(未感染的)(10个孔)收集剩余的100μl细胞。以75μl PBS洗涤每个孔;收集并合并洗液至收集板中的对应孔中。将收集板在350x g离心10分钟。使用多通道移液管,小心地除掉上清液,不要碰到每个孔中的沉淀物。将上清液丢弃在含有10%漂白剂的烧杯或碟中。重悬沉淀物并以150μl FACS缓冲液/孔洗涤沉淀物。将收集板在350x g离心10分钟。小心地除掉上清液,不要碰到每个孔中的沉淀物。将沉淀物重悬于含有2-5μg/ml抗-CD3-APC的FACS缓冲液中。在室温在黑暗中温育45分钟。

[0414] 将收集板在350x g离心10分钟。小心地除掉上清液,不要碰到每个孔中的沉淀物。重悬沉淀物并以150μl FACS缓冲液/孔洗涤沉淀物。重复离心步骤。

[0415] 重悬沉淀物并以100μl/孔含有1μg/ml碘化丙啶的FACS缓冲液洗涤沉淀物。使用Accuri分析细胞。通过估计表达GFP^+的活细胞的百分率来测定转导效率。通过对GFP^+群体设门来测定GFP^+细胞的百分率(其为$CD3^+$)。

[0416] 10.转导的T细胞与MEF的共培养(第3-30天):

[0417] 本程序描述了用于在小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上共培养经重编程因子转导的人T细胞的程序。该程序描述了在粘附性MEF上共培养转导的T细胞,和重新喂养这些细胞的方法。

[0418] 1.根据程序8准备MEF条件化的培养基。在进行以下的步骤4之前准备好该试剂。

[0419] 2.铺板经辐射的MEF以进行重编程(根据程序8)。接收并铺板2.5ml MEF/孔(以6孔形式)或200μl/孔(以96孔形式)。24-72小时之后,将培养基替换为2ml hES:D10F培养基(对

于6孔形式)或100μl/孔(对于96孔形式)。

[0420] 3.在T细胞暴露于逆转录病毒之后2天,进行质量控制检验以测定转导效率(见文件#100405.RDL.09)。对于T细胞重编程,该时间点被称作第2天。如果转导效率是足够的,则继续进行步骤4。

[0421] 4.收集转导的T细胞(根据程序7)并根据该程序确认激活和转导是成功的。

[0422] 对于6孔MEF平板:转移0.5-4x10^5细胞(体积为25-100ul)/孔。在整个表面逐滴加入。可选地:在MEF平板上在3个孔中滴定输入细胞数目。对于96孔MEF平板,转移1-8x10^4细胞(体积为10-25ul)/孔(注意:如果可能的话,避免使用边缘的孔)。可选地:在MEF平板上在多个孔中滴定输入细胞数目。

[0423] 以下实例是根据Doc#100405_RDL_03中的描述;有10组源自10个血液供体样品的激活的T细胞培养物。每个供体样品排列于96孔板的7个孔,激活T细胞。2个孔以SO+CK MMLV载体感染;2个孔以SO+NL MMLV载体感染。

[0424] 收集来自每个供体的SO+CK感染的T细胞并将细胞汇集于FACS管或15ml锥形管中。收集来自每个供体的SO+NL感染的T细胞并汇集于单独的管中。可选地:为了精确计算接种密度(即,有多少T细胞被递送至MEF平板),混匀细胞,取出10μl等份试样,与10μl台盼蓝混合并以血细胞计数器计数细胞。使用合适的生物限制性装置和离心机适配器将样品在350x g离心10分钟。小心地除掉上清液并将该培养基丢弃在含有10%漂白剂的烧杯或碟中。将细胞重悬于400μl hES:D10F(总共大约4-8x10^5个细胞)。混匀并将200μl细胞(2-4x10^5个细胞)逐滴加入到MEF平板(6孔形式)上的1个孔中。

[0425] 以hES:D10F培养基2倍稀释剩余的细胞,然后将200μl细胞(1-2x10^5个细胞)逐滴加入同一MEF平板上的第二个孔中。以hES:D10F培养基2倍稀释剩余的细胞,然后将200μl细胞(大约0.5-1x10^5个细胞)逐滴加入同一MEF平板上的第三个孔中。在37°/5%CO_2过夜温育。

[0426] 5.维持:喂养时间表(第4天至第30天)。2天后(第4天),使用以下方法将每个孔中50%的培养基更换为hES培养基+100ng/ml斑马鱼FGF(生长培养基):从温育箱中取出6孔板。将平板的一端置于丢弃的/未使用的10cm培养皿盖上,允许培养基流至孔的一侧(注意:在该角度,培养基应该仍然覆盖MEF的全部单层,并且不洒出孔外)。使细胞沉降10分钟。从MEF平板取走每个盖,小心地/缓慢地从培养物的表面吸掉50%的培养基。小心不要吸掉细胞。保留盖子用于后续喂养。可选地:收集吸出液,在350x g离心4分钟,重悬于1ml培养基并在Cedex上计数。验证细胞损失小于1%。以圆周运动逐滴加入1.25ml新鲜的生长培养基,不要碰到细胞。将平板放回至温育箱中。为了更换96孔板共培养物中的培养基,使用多通道移液管并将枪头插入至孔底的大约一半处。从培养物表面缓慢吸掉100ul。小心操作,不要吸掉细胞(注意:相对于6孔共培养物形式,T细胞将表现得更稳定,因为在该形式下培养基不容易被搅动)。逐滴加入100ul新鲜的培养基(hES培养基+100ng/ml zFGF),不要碰到细胞。将平板放回至温育箱中。

[0427] 在第6天,重复如上所述的第4天的喂养方法。在第8天,以生长培养基+20%MEF条件化培养基重新喂养细胞(如上所述)。在第8天(每48小时)重复喂养步骤。在此期间目测检查孔以监视集落之形成。

[0428] 11.表达Tra1-60的集落的鉴定和挑取:

[0429] 本程序描述了用于鉴定和挑取在重编程条件下在MEF共培养物上生长的Tra1-60$^+$

集落的规程。在合适的条件下，在将重编程因子导入原代人细胞之后，将产生iPS细胞的集落。本程序使用针对Tra1-60的抗体以荧光标记在MEF共培养物中出现的推定的iPSC集落。通过比较荧光标记的模式和集落的形态，为集落分配定性测定多能性的评分。该评分系统促进了推定的iPS细胞的选择性扩增，以进行进一步表征。

[0430] 以重编程因子转导之后，在MEF上共培养人的细胞15-30天。在该时间段内，应该目测检查细胞的集落形成情况。当集落可见但不过度生长时，计数或估计存在的总的集落数目。

[0431] 如果重编程载体不包括荧光报告分子，则进行下一步：在挑取集落之前1或2天，将经辐射的MEF接种于一组明胶包被的6孔板或96孔板上(根据程序8)或10cm培养皿上。

[0432] 如果重编程因子包括荧光报告分子，则应该在荧光显微镜下监视初生的集落。记录荧光和非荧光集落。重编程事件通常使荧光报告分子沉默。然而，在一些情况下，细胞可能仍然保留荧光。因此，避免使用具有与报告分子的荧光谱重叠的荧光谱的荧光抗体(如下)具有重要意义。

[0433] 如下所述进行抗-Tra1-60活细胞标记程序：以DMEM/F12(无血清)培养基洗涤待染色的孔2次。在生长培养基(hES)中稀释一抗至工作浓度。使用0.22um的无菌滤纸过滤稀释的抗体。向细胞中加入稀释的一抗。加入足够的体积以覆盖单层。在37℃和5％CO_2中温育45分钟至1小时。以DMEM/F12培养基洗涤细胞2次。注意：如果使用荧光标记的一抗，则将培养基更换为新鲜的hES并对细胞进行照相。否则：在生长培养基(hES)中稀释二抗。使用0.22um的无菌滤纸过滤稀释的二抗。向细胞中加入稀释的抗体。在37℃和5％CO_2中温育30分钟。以DMEM/F12洗涤细胞1次，并将培养基更换为新鲜的hES+CM，并使用荧光显微镜获取照片。

[0434] 如果有多个集落，则在获得并观察数码图像之后分配评分。对于仅少数集落，在样品处在显微镜下的时候对每个集落进行评分。根据以下描述使用亮视野显微镜分配“形态”评分：1＝集落被描述为部分重编程；集落具有弥散的边界，和/或在边界处有分化的细胞；和/或具有可辨别的细胞质和细胞核的成纤维细胞样分化的细胞。2＝集落是明显的，足以人工挑取；这可以包括非分化的细胞的集落(具有低细胞质:细胞核比率)，其具有被分化的区域打断的半连续的致密边界，或具有被分化细胞的晕轮包围的完全连续的致密边界的集落(“煎蛋”形态)。3＝具有经典形态的集落；具有致密边界；无分化细胞，细胞具有低细胞质:细胞核比率。

[0435] 根据以下描述，在荧光显微镜下显示每个集落的同时分配“Tra1-60”分数：0＝无标记；1＝微弱或有斑点；2＝异质或不规则标记模式；极少或无确定边界迹象；3＝均一标记，具有确定边界。

[0436] 鉴定并挑取Tra1-60阳性集落。以墨水标记平板以鉴定具有最高得分的集落。“3-3”的得分是理想的，然而，优先挑取和成功繁殖具有低于理想状态的形态的集落(例如，那些可能被评分为“2-3”或“2-2”的集落)。

[0437] 为了从6孔板(或10cm培养皿)中挑取集落，将细胞转移至挑取通风柜。在以解剖显微镜显示集落的同时，人工将移液管枪头在培养皿表面上沿着集落边界拖曳(按照“tic tac toe板”的模式)。这将会使集落破碎为3-6个碎片，将其从周围的MEF释放出来。将集落片段吸入移液管枪头(注意：需要小心，保持在最初的孔中的移动的片段可能重新附着并产生次级集落。这可能混淆集落计数和重编程效率的评估)。将片段直接转移至含有MEF和hES

培养基+100ng/ml斑马鱼bFGF(生长培养基)的6孔板中的接受孔中。

[0438] 为了从96孔形式挑取集落，鉴定仅含有1个具有良好形态和Tra1-60标记分数的单一集落的孔。从孔中吸出培养基。加入分散酶并在37℃温育7分钟。通过轻轻地上下吸液使集落移动。将集落片段转移至15ml的管中，并以hES培养基稀释。在350x g离心10分钟。吸掉上清液，然后重悬于生长培养基。

[0439] 将片段直接转移至6孔板中的接受孔中的生长培养基中的MEF。集落片段应该附着至新的MEF并形成多个新的集落。24小时后，将培养基更换为新鲜的生长培养基。监视增殖和形态，直至细胞变为汇合。每天将培养基更换为新鲜的生长培养基。

[0440] 实施例10:材料

[0441] 实施例1-9中使用的材料列举于表5-7

[0442] 表5——试剂

[0443]

试剂	供应商	目录号
DMEM	Invitrogen	11965
DMEM/F12	Invitrogen	11330
FBS	Hyclone	SH30070.03
AIM-V	Invitrogen	12055-091
Pen/Strep/L-谷氨酰胺	Invitrogen	10378-016
Opti-MEM	Invitrogen	31985
KOSR	Invitrogen	10828
NEAA	Invitrogen	11140
B-巯基乙醇(BME)	Invitrogen	M7522
L-谷氨酰胺	Invitrogen	21051-024
zbFGF	in house	无
rhIL2	Peprotech	200-02
OKT3 (抗-CD3)，功能级别	eBiosciences	16-0037-81
高密度的经辐射的用于 CM 的 MEF	Wi-Cell	无
经辐射的 MEF	Wi-Cell	无

[0444]

通过白细胞去除术或新鲜分离的血液样品获得的PBMC	Biological Specialty Corporation	213-14-04
1M HEPES	Invitrogen	15630
0.05% 胰蛋白酶/EDTA	Invitrogen	25300
PBS (无 Ca 和 Mg)	Invitrogen	14190
明胶	Sigma	C1890
台盼蓝染色	Invitrogen	15250-061
PEI	Sigma	03880
10 cm 组织培养板	Falcon	353003
6 孔组织培养板	Nunc	140685
250 ml 培养基过滤器	Nunc	568-002

[0445] 表6

[0446]

D10F		FACS缓冲液
DMEM	90%	PBS(无Ca和Mg)
FBS	10%	2%
+或-HEPES	50mM	(0.1%NaN3可选地)

[0447] 表7

[0448]

条件化培养基(CM)	
DMEM/F12	80%
KOSR	20%
NEAA	1%
BME	0.1 mM
L-谷氨酰胺	1 mM
zbFGF	100 ng/ml
暴露于高密度 MEF 培养物。每日收集培养基，持续 8-10 天。仅在用于 IPS 培养物之前加入 zbFGF，然后过滤。	

[0449] 实施例11:从$CD34^+$造血细胞产生iPS细胞

[0450] 根据实施例1的描述,从leukopak或新鲜采集的血液样品分离PBMC。根据生产商的说明书,使用Indirect CD34MicroBead Kit(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)或Direct CD34MicroBead Kit或谱系消除试剂盒(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)就$CD34^+$细胞进行MACS分离。收集$CD34^+$MACS纯化的细胞的级份进行FACS分析,将剩余的细胞重新铺板于低附着6孔板,使用如下所述的$CD34^+$细胞扩增培养基。可以使用CD34直接微珠或间接的CD34半抗原抗体染色试剂盒进行$CD34^+$细胞富集。

[0451] 表8.CD34扩增培养基

[0452]

CD34扩增培养基	浓度	供应商	目录号
Stem Pro-34	48ml	Invitrogen	10639-011
Step Pro-34Supp	650ul	Invitrogen	
Penn/Strep	0.5ml	Invitrogen	
L-Glut/BME	0.5ml	Invitrogen/Sigma	
IL3	20ng/ml	Invitrogen	PHC0034
Flt3L	100ng/ml	Invitrogen	PHC1705
SCF	100ng/ml	Invitrogen	PHC2115

[0453] $CD34^+$细胞扩增培养基:根据生产商的说明书,将Stem Pro 34(Invitrogen)与所需体积的营养补充物混合。Stem Pro complete中补充100ng/ml重组干细胞因子和100ng/ml Flt-3配体和20ng/ml重组人白细胞介素-3(IL-3)。培养基中还补充新鲜的1%谷氨酰胺和1%青霉素链霉素溶液。将所有的补充物混合并在使用前过滤培养基。

[0454] 通过如上所述的方法,在转染前大约24小时接种细胞。另外,转染293T细胞以生产逆转录病毒,然后以"OCT4,SOX2,NANOG和Lin28"或"OCT4,SOX2,KLF4,c-MYC"基因转染造血细胞,通过MMLV逆转录病毒递送,如上文所述。这些实验的结果为,观察到以上述任一组基因转染的$CD34^+$造血细胞引起新的iPS细胞系的产生。

[0455] 以下程序用于使用MMLV逆转录病毒重编程PBMC:将MACS LS分离柱置于-20℃以迅速冷却(或者,可以在4℃过夜冷却柱和MACS缓冲液)。解冻适当数目的PBMC管以收集~$3x10^8$细胞。使用MACS缓冲液将细胞达到5ml(在整个程序中保持缓冲液为冷的)。在1200rpm离心5分钟,吸掉上清液并重悬于MACS缓冲液中。使用血细胞计数器计数细胞。将细胞悬浮液分装入3个管:每个$1x10^8$,并在300xg离心10分钟。可以使用CD34直接微珠或间接CD34半抗原抗体染色试剂盒进行$CD34^+$细胞的富集。将每个细胞沉淀物重悬于300ul MACS缓冲液。向每个管中加入100ul FcR封闭试剂,混匀。向每个管中加入100ul CD34-半抗原-抗体或直接CD34珠,混匀。在4℃温育15分钟。以5ml MACS缓冲液洗涤细胞并在300xg离心10分钟。完全吸掉上清液。将细胞重悬于500ul MACS缓冲液。如果使用一步CD34直接微珠,则细胞已准备好进行分离。如果使用间接CD34分离珠,则在分离之前还有一个温育步骤:使用抗-半抗原微珠温育。加入100ul抗-半抗原,混匀。在4℃温育15分钟。以2ml MACS缓冲液洗涤细胞,在300xg离心10分钟。重悬于500ul MACS缓冲液中。从4℃取出MACS LS柱。将柱置于分离器磁铁上。以3ml MACS缓冲液润洗该柱。将细胞悬浮液施加至该柱。收集穿过的未标记的细胞,并以3ml MACS缓冲液洗涤该柱。再重复洗涤2次。从磁铁上取下柱子并置于适当的收集

管中。加入3ml MACS缓冲液，通过以提供的冲入物冲洗柱子而收集富集的$CD34^+$细胞级份。收集富集群体的级份用于FACS分析。使用$CD34^+$细胞扩增培养基将剩余的细胞重新铺板于低附着的6孔板。当使用“谱系细胞消除试剂盒”时，以谱系阳性抗体(CD2,CD3,CD11b,CD14,CD15,CD16,CD19,CD56,CD123,CD235a)的生物素化的混合物温育细胞，以除掉成熟的造血细胞类型，例如T细胞、B细胞、NK细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞、红细胞。温育之后，洗涤细胞并以抗生物素微珠温育。洗涤细胞悬浮液并人工通过柱子或通过使用AutoMAC细胞分离器进行分离。

[0456] 通过以下方法鉴定并挑取iPS集落：形态上来讲，集落一般是密集的，并且包含小的、致密的具有增大的细胞核和2个不同核仁的细胞。集落通常太密集以致不能观察到此类明显特征，并且显示出在集落的中央具有分化的物质。集落的边界通常是确定的，然而，血液iPS细胞(BiPSC)表现出更弥散，具有蓬松的边界，该特征通常与之前的衍生自成纤维细胞的iPSC不一致。集落将使表达自整合的病毒DNA的GFP和RFP沉默。一些好的真正的集落在转导后～20天时丧失荧光，一些在它们被挑取和转移后、感染后～35-40天时丧失荧光。所有的集落都应该缺乏GFP和RFP的表达(虽然在附近的单细胞处观察到一些表达)。为了人工挑取，使用移液管枪头将集落破碎为3-6个碎片，以增加从周围的MEF和造血干细胞释放干细胞的概率。除非形成多个集落，否则不进行挑取，以避免使总集落的计数混淆，即，避免小块的集落重新沉降并被误计数为新克隆的可能性。然后将细胞直接转移至含有MEF和hES培养基+100ng/ml斑马鱼bFGF的6孔板的接收孔中。然后监视1-2周增殖、形态和荧光的丧失，以确认克隆确实被完全编程。每日喂养细胞。在挑取和铺板的集落粘附并显示出特征性ES样形态之后，按照上文描述，再次人工挑取集落至一组新的6孔MEF板上，并每日喂养。随着孔变为汇合，使用胶原酶按照正常的iPS系传代。在多个传代冷冻等份试样，在每一组进行测试解冻。

[0457] 就多能性标志物(SSEA-4,Oct3/4,Tra-160,Tra-181)的存在对那些挑取和扩增的集落进行染色。另外，就碱性磷酸酶活性的存在对集落进行染色。就正常核型的存在测试克隆，通过FISH分析确认iPS克隆的性质是亲代细胞类型的。这些测试的结果表明：$CD34^+$细胞被成功转化为iPS细胞。观察到：虽然当以“Sox2,Oct4,c-Myc和Klf-4”转染$CD34^+$细胞时，转染效率较高，但是观察到，将克隆维持于经辐射的MEF和Matrigel上时，衍生自经“Sox2,Oct4,Nanog和Lin28”转染的$CD34^+$细胞的iPS细胞更加稳定。在进一步的实验中，通过以“Sox2,Oct4,c-Myc和Klf-4”进行的转染成功地将获自leukopak和供体血液的$CD34^+$细胞转化为iPS细胞。观察到祖细胞类型的重编程效率是大约10个集落/100,000个细胞。

[0458] ＊＊＊

[0459] 根据本公开文本，无需过量实验即可实现并执行本文公开和要求保护的所有方法。虽然已经以优选实施方式的形式描述了本发明的组合物和方法，但是对本领域技术人员明显的是，可以不脱离本发明的概念、精神和范围而对如本文描述的方法、方法的步骤或步骤的次序进行改变。更具体而言，明显的是，某些化学和生理学上均相关的试剂可以替换如本文描述的试剂，但仍然获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员明显的所有的此类相似的替换和修饰都被认为是在如随附的权利要求所定义的本发明的精神、范围和概念之内。

[0460] 参考文献

[0461] 通过引用的方式将以下参考文献特别并入本文，达到它们提供示例性的程序上的或其它的细节以补充本文所示的那些内容的程度。

[0462] 美国专利4,683,202

[0463] 美国专利4,684,611

[0464] 美国专利4,952,500

[0465] 美国专利5,302,523

[0466] 美国专利5,322,783

[0467] 美国专利5,384,253

[0468] 美国专利5,464,765

[0469] 美国专利5,538,877

[0470] 美国专利5,538,880

[0471] 美国专利5,550,318

[0472] 美国专利5,563,055

[0473] 美国专利5,580,859

[0474] 美国专利5,589,466

[0475] 美国专利5,591,616

[0476] 美国专利5,610,042

[0477] 美国专利5,656,610

[0478] 美国专利5,702,932

[0479] 美国专利5,736,524

[0480] 美国专利5,780,448

[0481] 美国专利5,789,215

[0482] 美国专利5,925,565

[0483] 美国专利5,928,906

[0484] 美国专利5,935,819

[0485] 美国专利5,945,100

[0486] 美国专利5,981,274

[0487] 美国专利5,994,624

[0488] 美国专利公开号20030211603

[0489] 美国专利公开号20070238170

[0490] 美国专利公开号20080038820

[0491] 美国专利公开号20080226558

[0492] 美国专利公开号20080254003

[0493] 美国专利公开号20090047739

[0494] 美国专利系列号61/058,858

[0495] 美国专利系列号61/088,054

[0496] 美国专利系列号61/156,304

[0497] 美国专利系列号61/172,079

[0498] Aasen等人，Nat.Biotechnol.，26:1276-1284，2008.

[0499] Akkina等人,J.Virol.70:2581-2585,1996.

[0500] Alexander等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5092-5096,1988.

[0501] Almquist等人,Med.Chem.,23(12):1392-1398,1980.

[0502] Andrews等人,In:Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells,Robertson (Ed.),IRL Press,207-246,1987.

[0503] Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.,1994.

[0504] Berger等人,Blood,101:476-484,2003.

[0505] Biswas等人,Annals NY Acad.Sci.,590:582-583,1990.

[0506] Biswas,等人,J.Clin.Microbiol.,29:2228-2233,1991.

[0507] Bode等人,Gene Ther.Mol.Biol.,6:33-46,2001.

[0508] Boland等人,Nature.Aug 2,2009.[Epub ahead of print]

[0509] Boyer等人,Cell,122(6):947-56,2005.

[0510] Carbonelli等人,FEMS Microbiol.Lett.,177(1):75-82,1999.

[0511] Chadwick等人,Blood,102(3):906-15,2003.

[0512] Chambers等人,Cell,113(5):643-55,2003.

[0513] Chandler等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94(8):3596-601,1997.

[0514] Chatenoud,Curr.Opin.Immunol.,17:632-637,2005.

[0515] Chen and Okayama,Mol.Cell Biol.,7(8):2745-2752,1987.

[0516] Choi等人,Stem Cells,27(3):559-67,2009.

[0517] Christ等人,Haematologica 92(9):1165-72,2007.

[0518] Cocea,Biotechniques,23(5):814-816,1997.

[0519] Ebert等人,Nature,457:277-280,2009.

[0520] Eminli等人,Nat.Genet.,41:968-976,2009.

[0521] EP 45665

[0522] EPO 0273085

[0523] Ercolani等人,J.Biol.Chem.,263:15335-15341,1988.

[0524] Evans,等人,In:Cancer Principles and Practice of Oncology,Devita等人(Eds.),Lippincot-Raven,NY,1054-1087,1997.

[0525] Fechheimer等人,Proc Natl.Acad.Sci.USA,84:8463-8467,1987.

[0526] Fraley等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76:3348-3352,1979.

[0527] Ghosh and Bachhawat,In:Liver Diseases,Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands,Wu等人(Eds.),Marcel Dekker,NY,87-104,1991.

[0528] Gopal,Mol.Cell Biol.,5:1188-1190,1985.

[0529] Graham and Van Der Eb,Virology,52:456-467,1973.

[0530] Gratwohl等人,Blood,100:2374-2386,2002.

[0531] Guo等人Stem Cells.21(1):15-20,2003.

[0532] Hanna等人,Cell,133:250-264,2008.

[0533] Harland and Weintraub,J.Cell Biol.,101(3):1094-1099,1985.

[0534] Hess等人Blood,104(6):1648-55,2004.

[0535] Hong等人,Nature,460:1132-1135,2009.

[0536] Johnson等人,Blood,114:535-546,2009.

[0537] Kadaja-Saarepuu等人Oncogene,27(12):1705-15,2008.

[0538] Kaeppler等人,Plant Cell Reports,9:415-418,1990.

[0539] Kaji等人,Nature,458,771-775,2009.

[0540] Kaneda等人,Science,243:375-378,1989.

[0541] Karanu等人Leukemia 17,1366-1374.

[0542] Karin等人Cell,36:371-379,1989

[0543] Kato等人,J.Biol.Chem.,266:3361-3364,1991.

[0544] Kawamura等人,Nature,460:1140-1144,2009.

[0545] Kim等人,J.Virol.,66:3879-3882,1992.

[0546] Kleeberger等人,Clin.Diagn.Lab Immunol.,6:14-19,1999.

[0547] Klein等人,Nature,327:70-73,1987.

[0548] Ladi等人,Nature Immunology,7:338-343,2006.

[0549] Langle-Rouault等人,J.Virol.,72(7):6181-6185,1998.

[0550] Levenson等人,Hum.Gene Ther.,9(8):1233-1236,1998.

[0551] Levitskaya等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94(23):12616-12621,1997.

[0552] Li等人,Nature,460:1136-1139,2009.

[0553] Lichtman and Williams,In:Williams hematology.McGraw-Hill Medical Pub.Division.1(various pagings),NY,2006.

[0554] Loh等人,Blood,113:5476-5479,2009.

[0555] Ludwig等人,Nat.Biotechnol.,24(2):185-187,2006b.

[0556] Ludwig等人,Nat.Methods,3(8):637-46,2006a.

[0557] Ludwig等人,Nat.Methods,3:637-646,2006.

[0558] Macejak and Sarnow,Nature,353:90-94,1991.

[0559] Maherali and Hochedlinger,Cell Stem Cell,3:.595-605,2008.

[0560] Maniatis,等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1988.

[0561] Marion等人,Nature,460:1149-1153,2009.

[0562] Meuer等人,Cell,36:897-906,1984.

[0563] Mitchell等人,PLoS Biol.,2:E234,2004.

[0564] Morgan等人,Science,314:126-129,2006.

[0565] Nabel等人,Science,244(4910):1342-1344,1989.

[0566] Narazaki等人,Circulation,118(5):498-506,2008.

[0567] Ng等人,Blood,106(5):1601-1603,2005.

[0568] Ng等人,Nuc.Acids Res.,17:601-615,1989.

[0569] Nicolau and Sene,Biochim.Biophys.Acta,721:185-190,1982.

[0570] Nicolau等人,Methods Enzymol.,149:157-176,1987.
[0571] Omirulleh等人,Plant Mol.Biol.,21(3):415-428,1993.
[0572] O'Shea等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:10306,1992.
[0573] PCT Appln.WO 94/09699
[0574] PCT Appln.WO 94/09699
[0575] PCT Appln.WO 95/03408
[0576] PCT Appln.WO 95/06128
[0577] PCT Appln.WO 99/20741
[0578] Scymczak等人,Nat.Biotechnol.,22(5):589-94,2004.
[0579] Ryan等人,Biochemistry,36(42):12802-12813,1997.
[0580] De Felipe,Prog.Brain Res.,136:215-38,2002.
[0581] Pelletier and Sonenberg,Nature,334(6180):320-325,1988.
[0582] Perales等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:4086-4090,1994.
[0583] Potrykus等人,Mol.Gen.Genet.,199(2):169-177,1985.
[0584] Potter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:7161-7165,1984.
[0585] Quitsche等人,J.Biol.Chem.,264:9539-9545,1989.
[0586] Richards等人,Cell,37:263-272,1984.
[0587] Rippe,等人,Mol.Cell Biol.,10:689-695,1990.
[0588] Sambrook and Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd Edition,Cold Spring Harbor Laboratory,N.Y.,1989.
[0589] Takahashi等人,Cell,126(4):663-676,2006.
[0590] Takahashi等人,Cell,126(4):663-76,2007a.
[0591] Takahashi等人,Cell,131:861-872,2007.
[0592] Thomson等人,Science,282:1145-1147,1998.
[0593] Tur-Kaspa等人,Mol.Cell Biol.,6:716-718,1986.
[0594] Utikal等人,Nature,460:1145-1148,2009.
[0595] van Dongen等人,Leukemia,17:2257-2317,2003.
[0596] van Lent等人,J.Immunol.,179:4959-4968,2007.
[0597] Vodyanik等人,Blood,108(6):2095-2105,2006.
[0598] Wagner等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87(9):3410-3414,1990.
[0599] Wang等人,Nature Biotechnology,25(3):317-318,2007
[0600] Wilson等人,Nature Reviews Immunology,9:91-105,2009.
[0601] Wilson等人,Science,244:1344-1346,1989.
[0602] Woltjen等人,Nature,458,766-770,2009.
[0603] Wong等人,Gene,10:87-94,1980.
[0604] Wu and Wu,Adv.Drug Delivery Rev.,12:159-167,1993.
[0605] Wu and Wu,Biochemistry,27:887-892,1988.
[0606] Wu and Wu,J.Biol.Chem.,262:4429-4432,1987.
[0607] Wynn,Nature Immunology,6:1069-1070,2005.

[0608] Yamanaka等人,Cell,131(5):861-72,2007.

[0609] Yang and Russell,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:4144-4148,1990.

[0610] Ye等人,Blood,114(27):5473-80,2009.

[0611] Yu等人,Science,318:1917-1920,2007.

[0612] Yu等人,Science,324(5928):797-801,2009.

[0613] Zhang等人,Nat.Biotechnol.,19:1129-1133,2001.

[0614] Zhang,等人,Circ Res.,104(4):e30-41,2009.

[0615] Zhou,等人,Cell Stem Cell,4(5):381-4,2009.

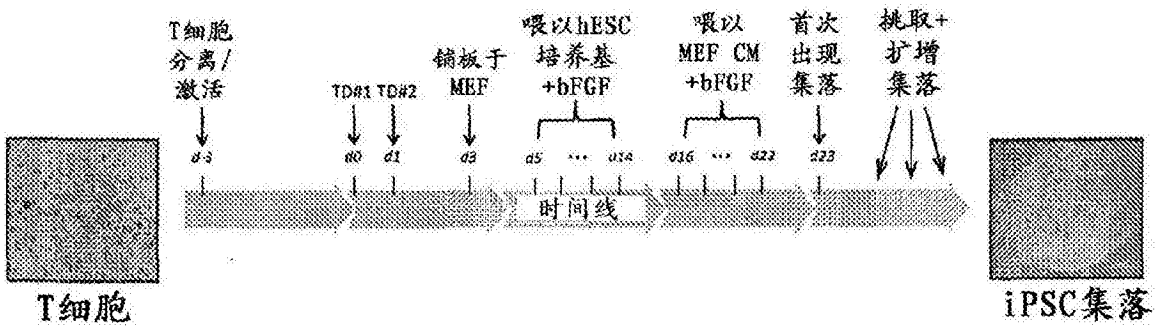
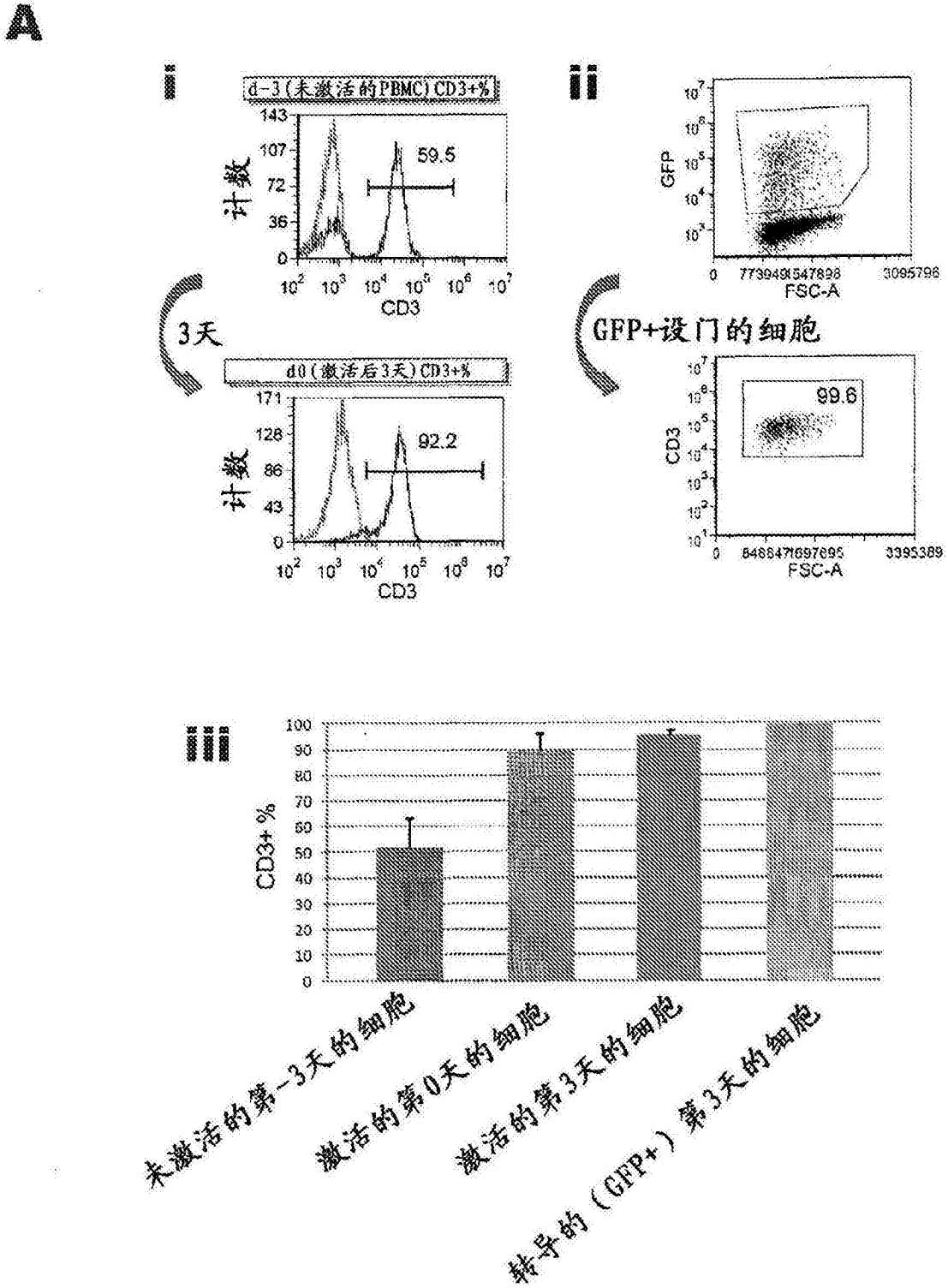
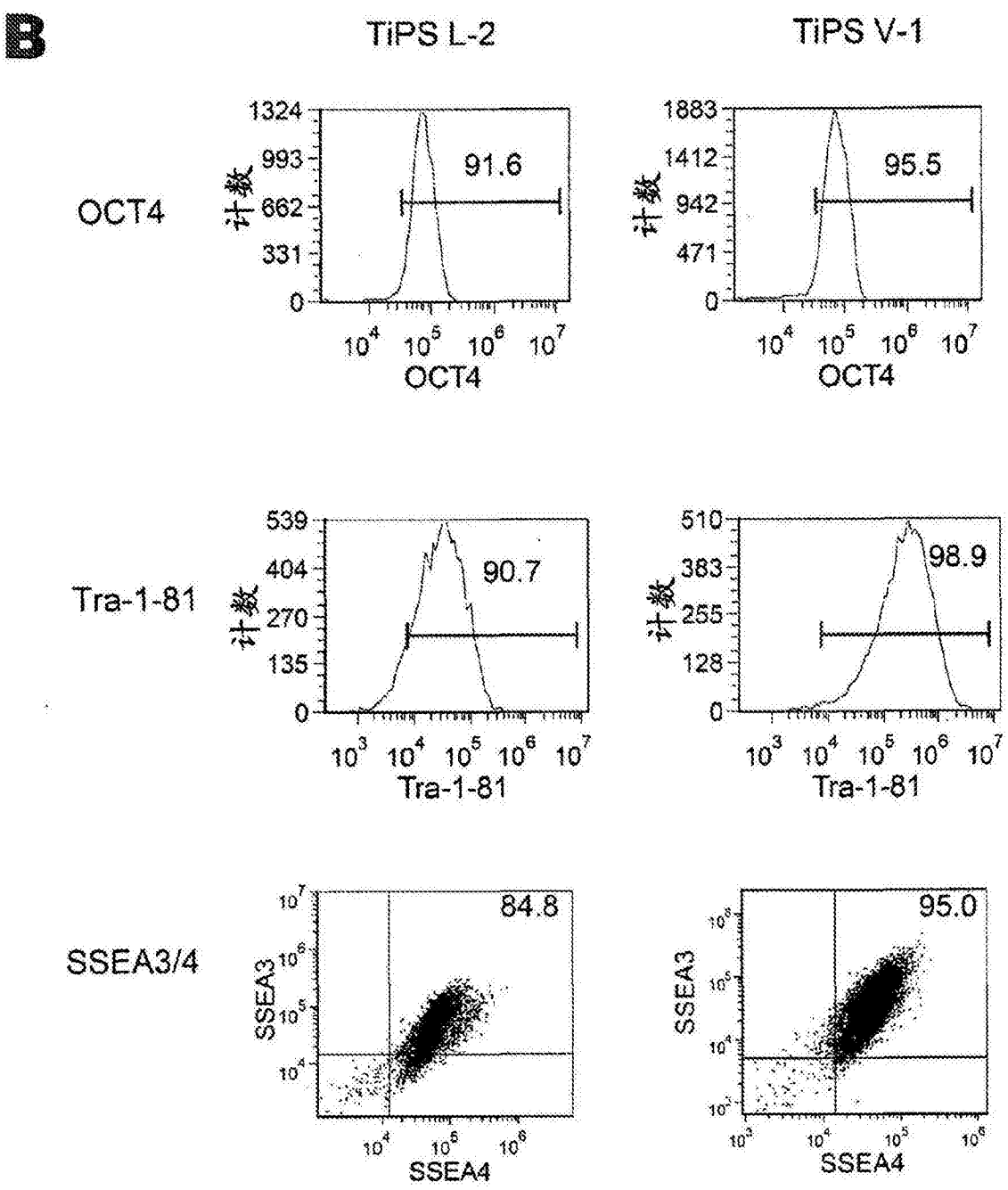

T细胞
分离/
激活
TD#1 TD#2
铺板于
MEF
喂以hESC
培养基
+bFGF
喂以
MEF CM
+bFGF
首次
出现
集落
挑取+
扩增
集落
d-3
d0
d1
d3
d5
d10
d16
d22
d23
时间线
T细胞
iPSC集落

图1


A
i
d-3(未激活的PBMC)CD3+%
计数
59.5
CD3
3天
d0(激活后3天)CD3+%
92.2
ii
GFP
FSC-A
GFP+设门的细胞
CD3
99.6
iii
CD3+ %
未激活的第-3天的细胞
激活的第0天的细胞
激活的第3天的细胞
转导的（GFP+）第3天的细胞


B
TiPS L-2
TiPS V-1
OCT4
Tra-1-81
SSEA3/4
计数
91.6
95.5
90.7
98.9
84.8
95.0
OCT4
Tra-1-81
SSEA3
SSEA4

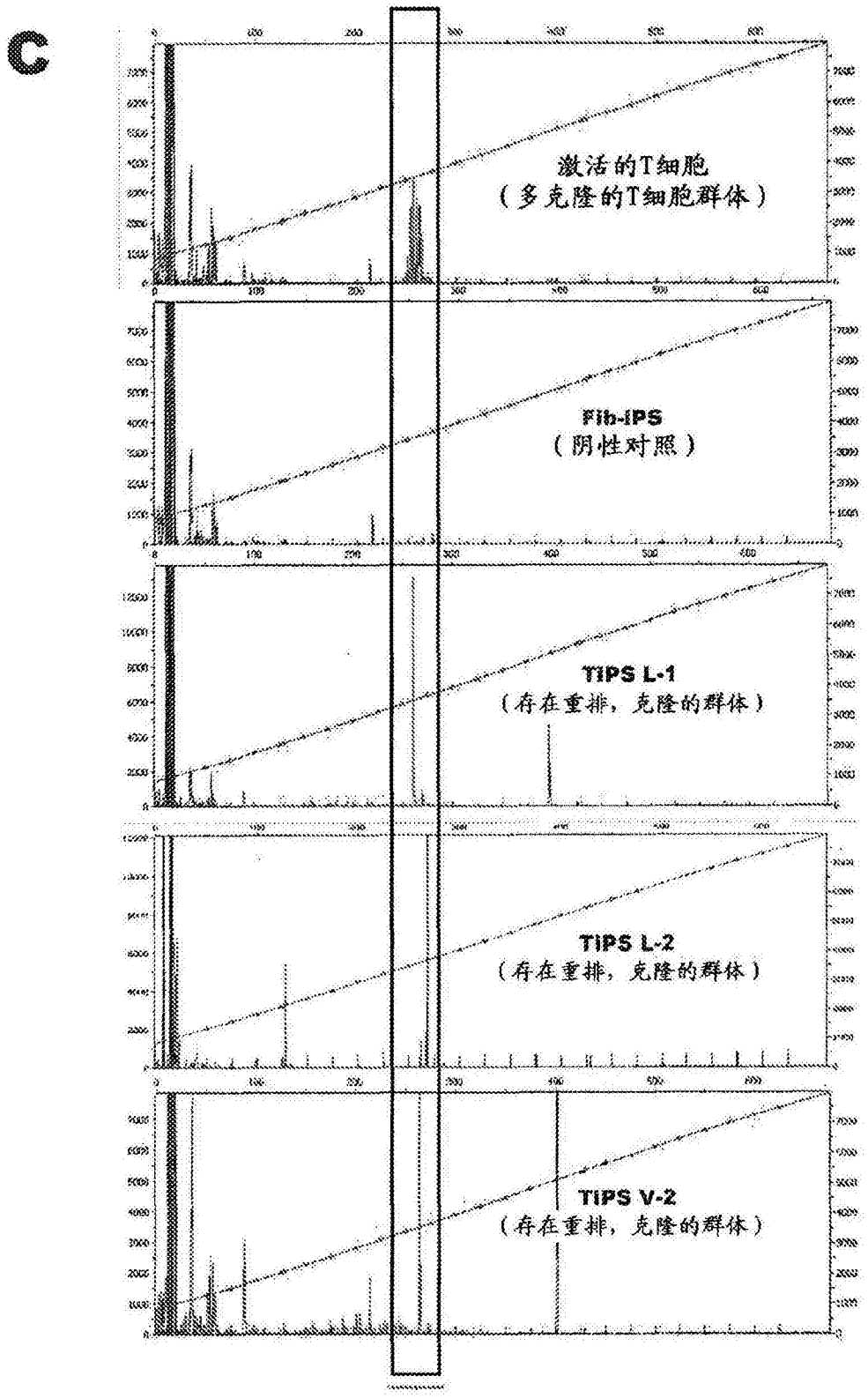

C
激活的T细胞
（多克隆的T细胞群体）
Fib-iPS
（阴性对照）
TiPS L-1
（存在重排，克隆的群体）
TiPS L-2
（存在重排，克隆的群体）
TiPS V-2
（存在重排，克隆的群体）
正确的大小范围（240-285 bp）

图2

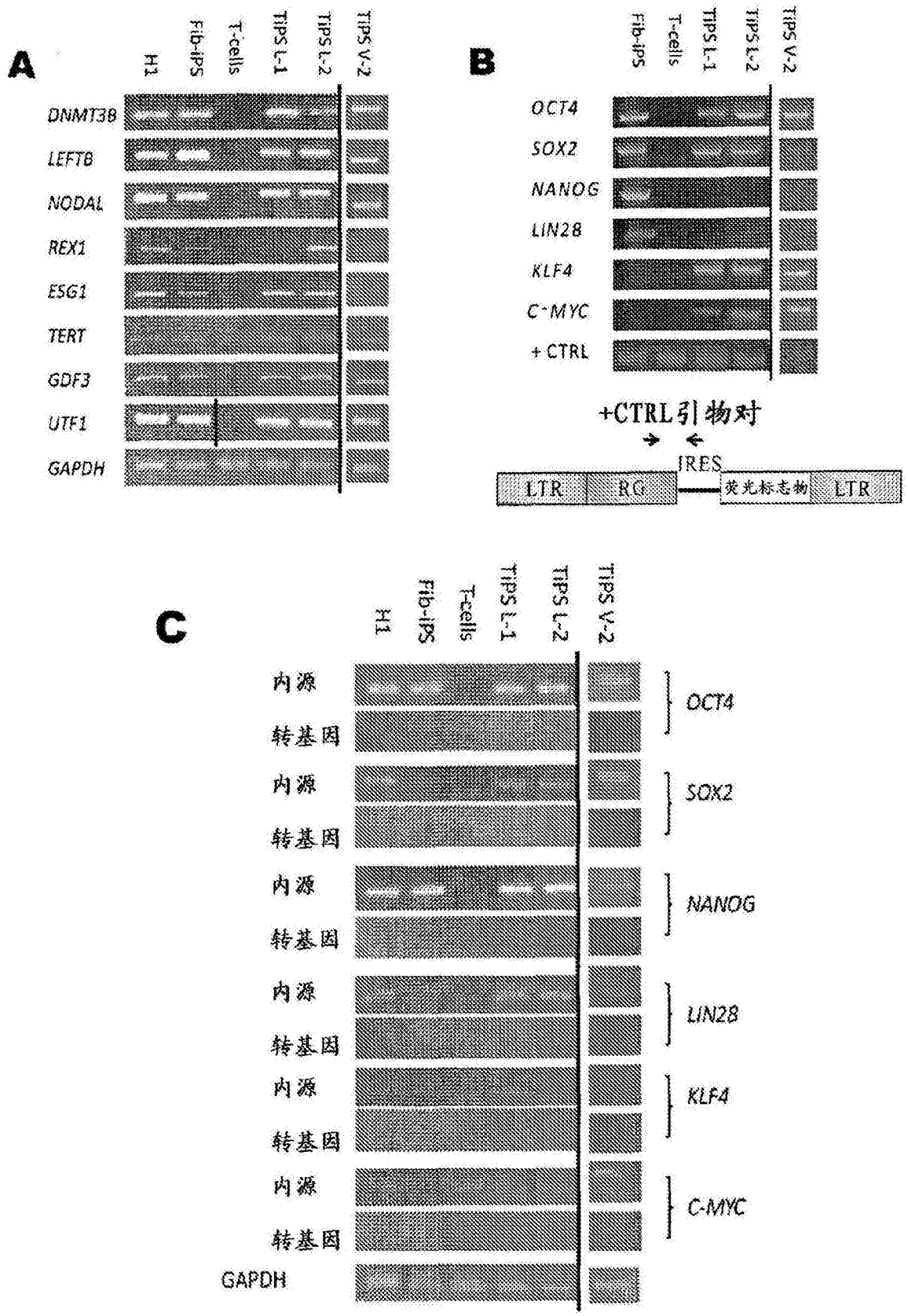

A
H1
Fib-iPS
T-cells
TiPS L-1
TiPS L-2
TiPS V-2
DNMT3B
LEFTB
NODAL
REX1
ESG1
TERT
GDF3
UTF1
GAPDH
B
Fib-iPS
T-cells
TiPS L-1
TiPS L-2
TiPS V-2
OCT4
SOX2
NANOG
LIN28
KLF4
C-MYC
+ CTRL
+CTRL引物对
IRES
LTR
RG
荧光标志物
LTR
C
H1
Fib-iPS
T-cells
TiPS L-1
TiPS L-2
TiPS V-2
内源
转基因
OCT4
SOX2
NANOG
LIN28
KLF4
C-MYC
GAPDH

图3

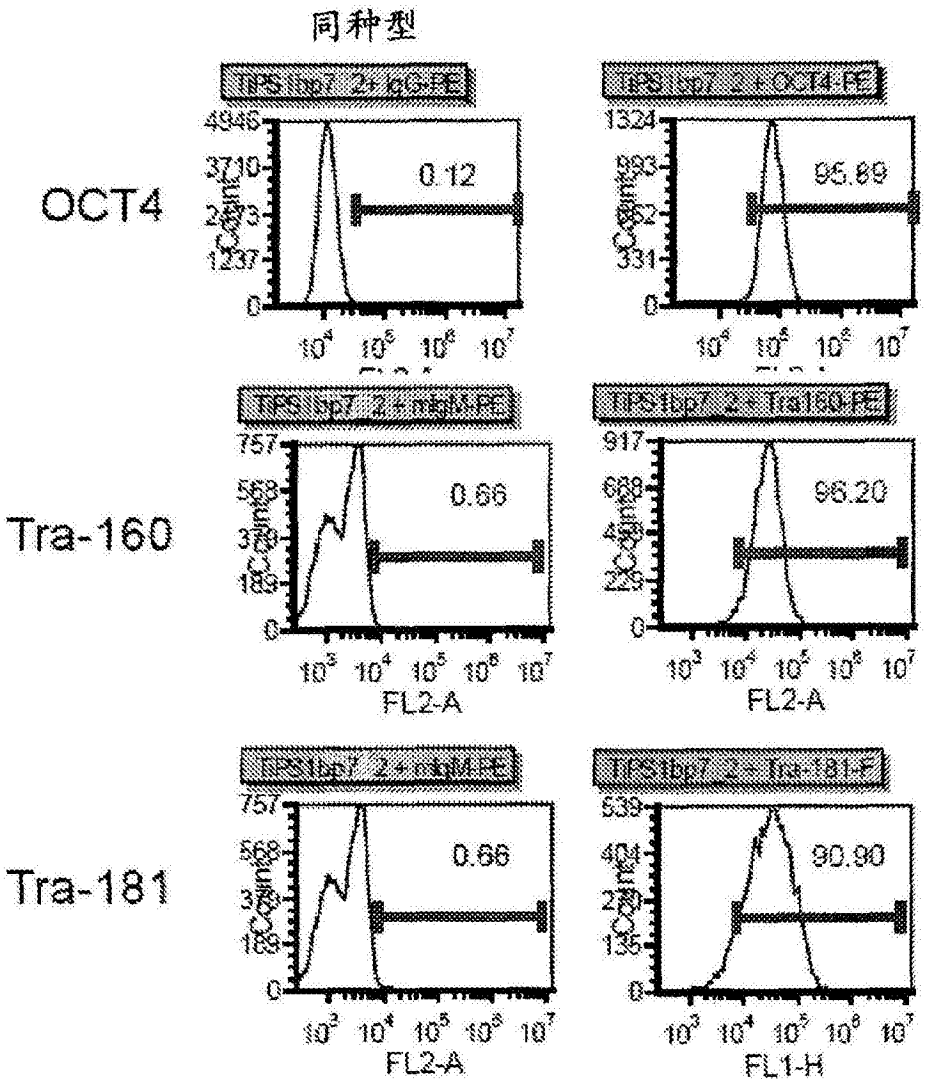
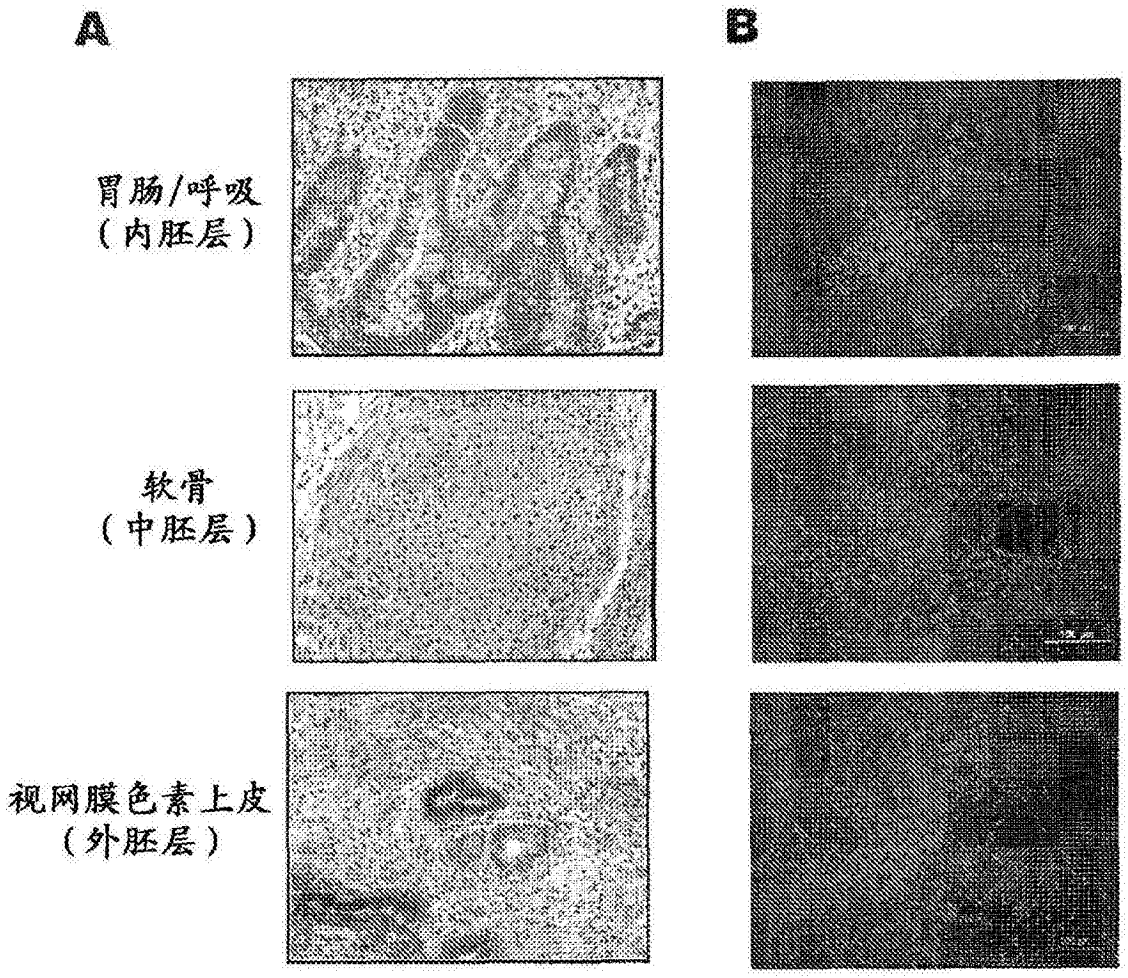
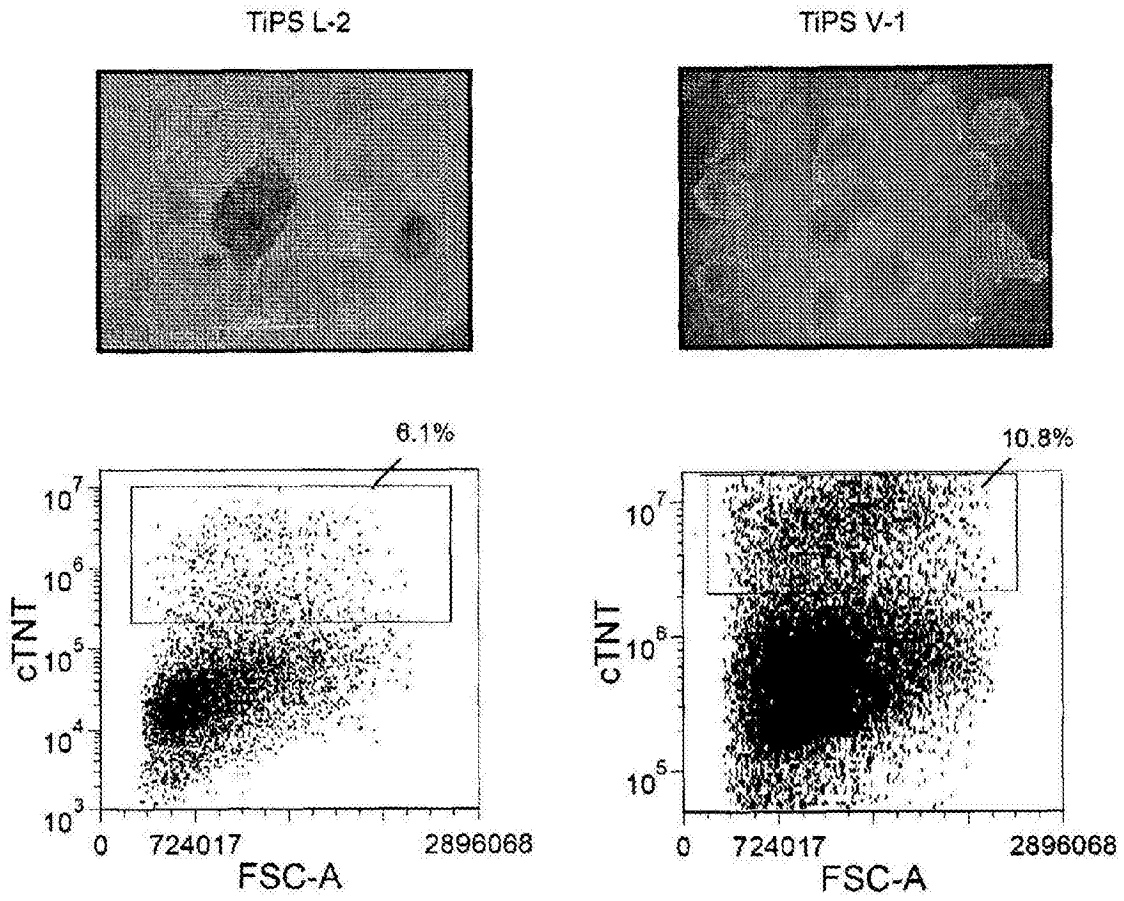

同种型
OCT4
Tra-160
Tra-181
0.12
95.89
0.66
96.20
0.66
90.90
Counts
FL2-A
FL1-H

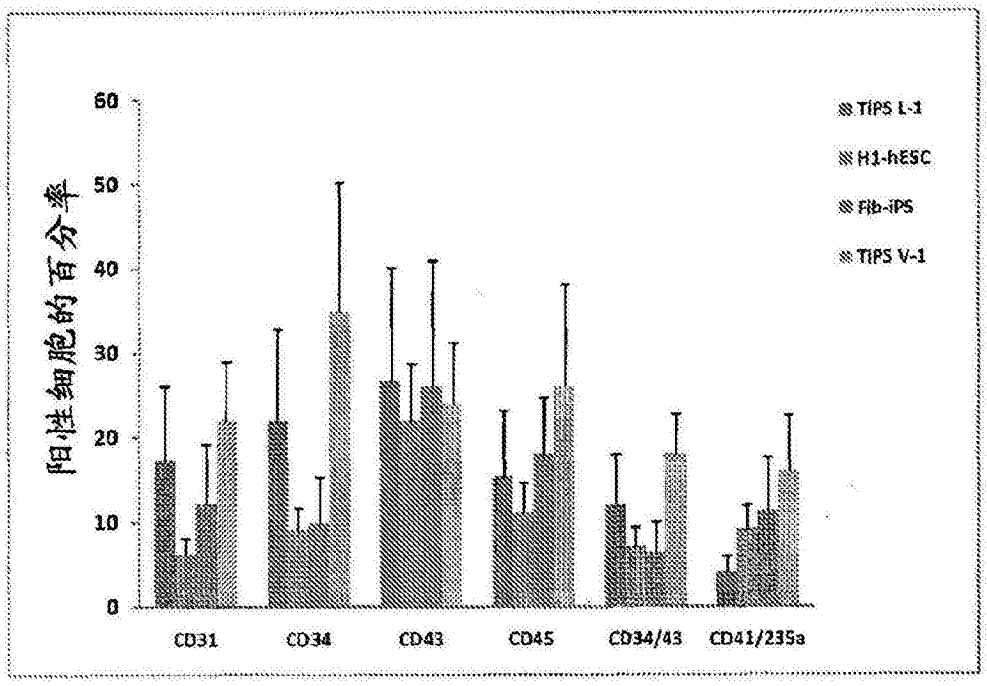
图3D

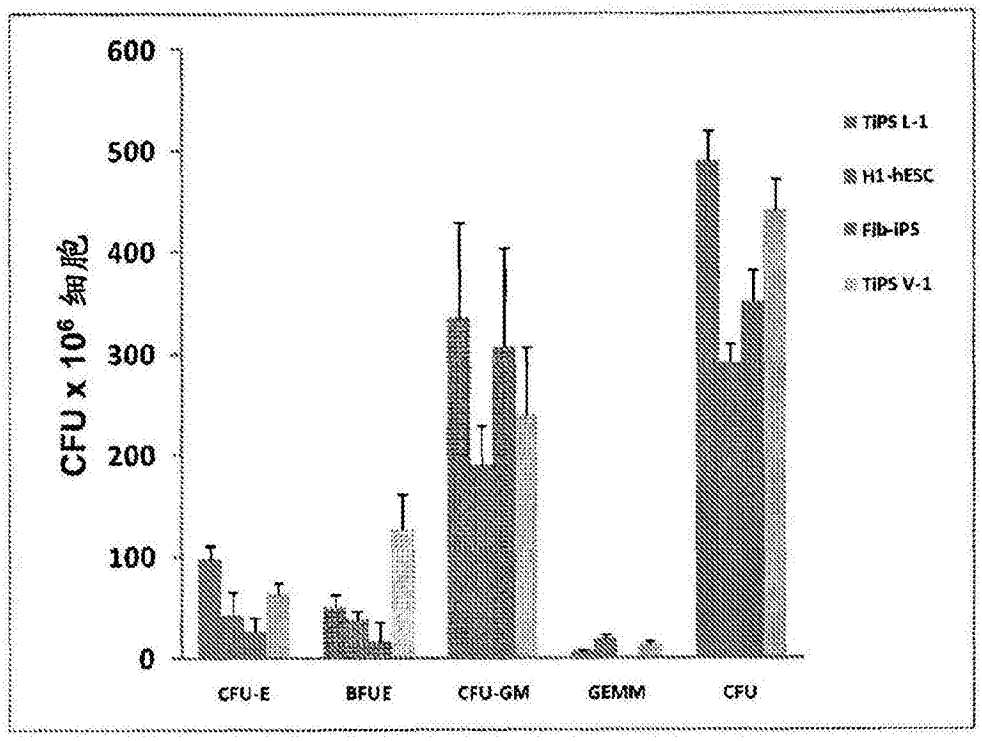

A
B
胃肠/呼吸
（内胚层）
软骨
（中胚层）
视网膜色素上皮
（外胚层）

C



D


阳性细胞的百分率
60
50
40
30
20
10
0
CD31
CD34
CD43
CD45
CD34/43
CD41/235a
TiPS L-1
H1-hESC
Fib-iPS
TiPS V-1


E
600
500
400
300
200
100
0
CFU x 10⁶ 细胞
CFU-E
BFUE
CFU-GM
GEMM
CFU
TiPS L-1
H1-hESC
Fib-iPS
TiPS V-1

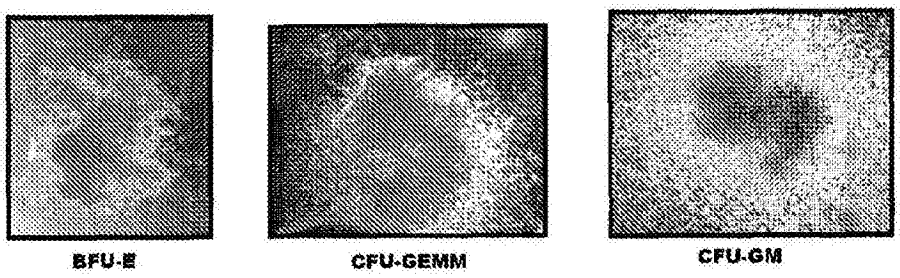

BFU-E
CFU-GEMM
CFU-GM

图4

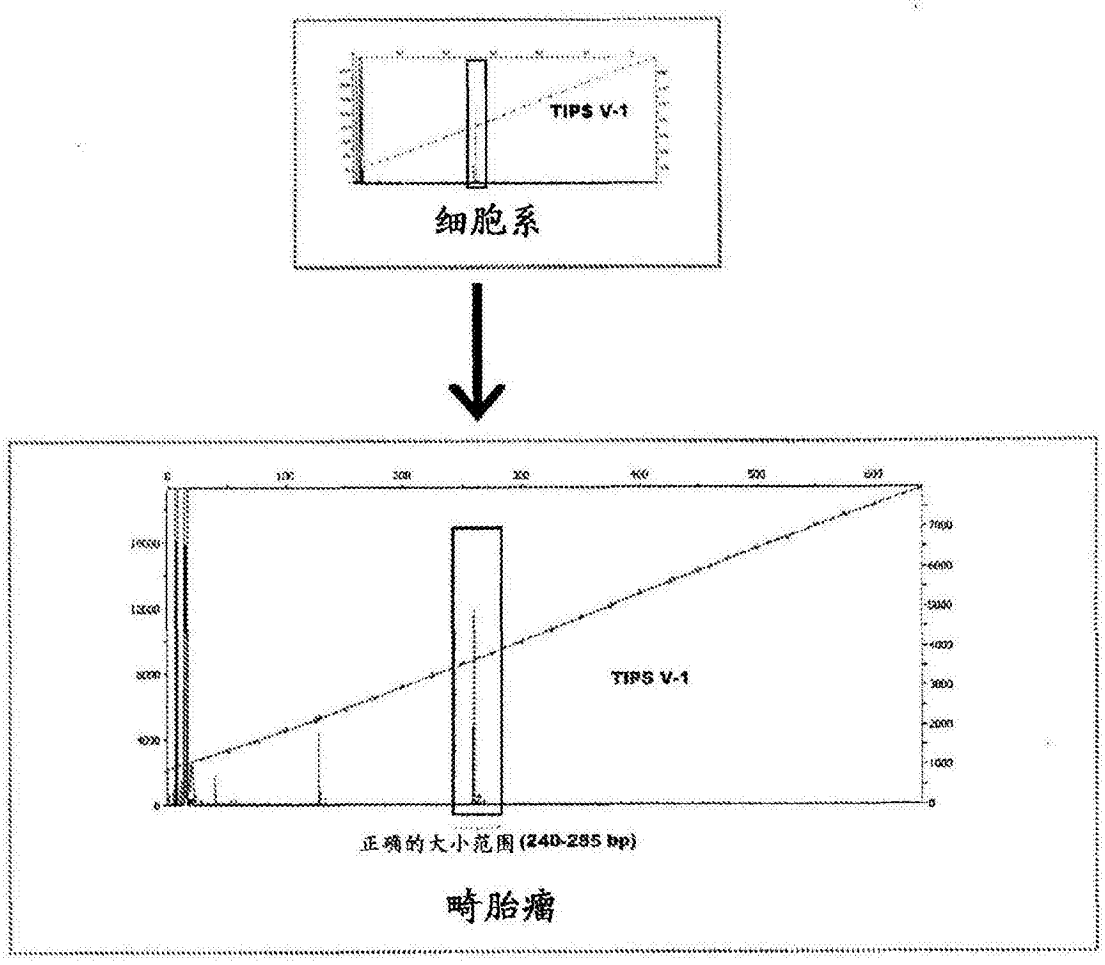


图5

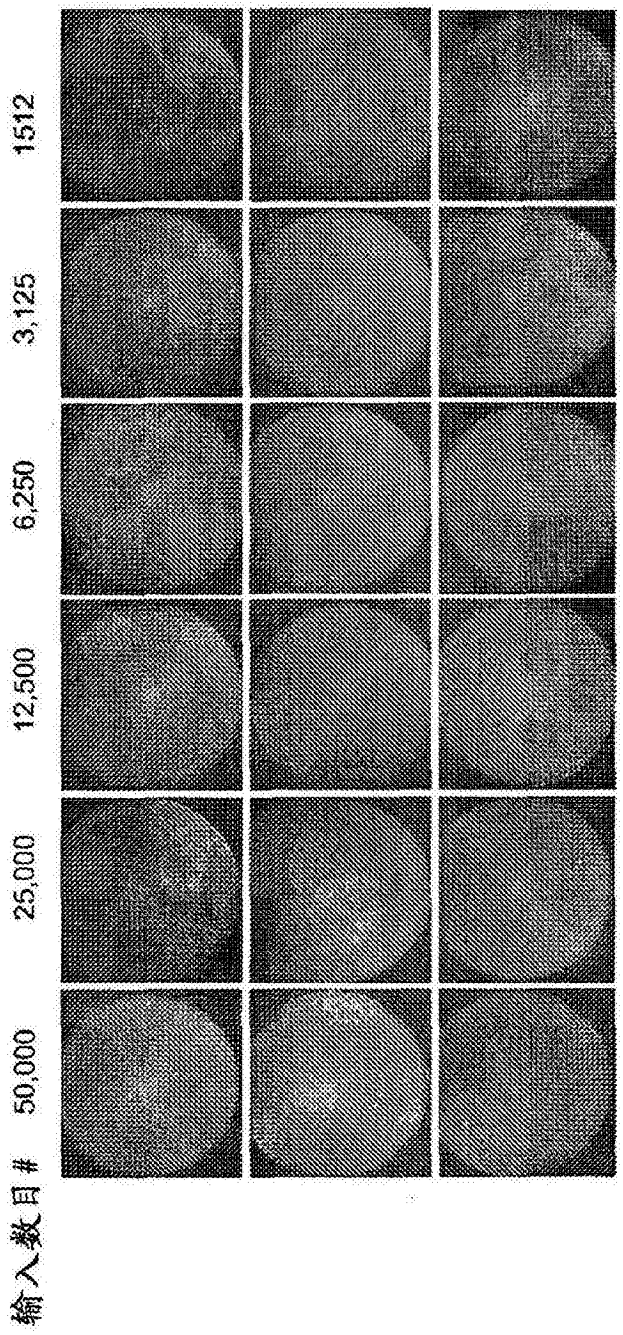


图6A

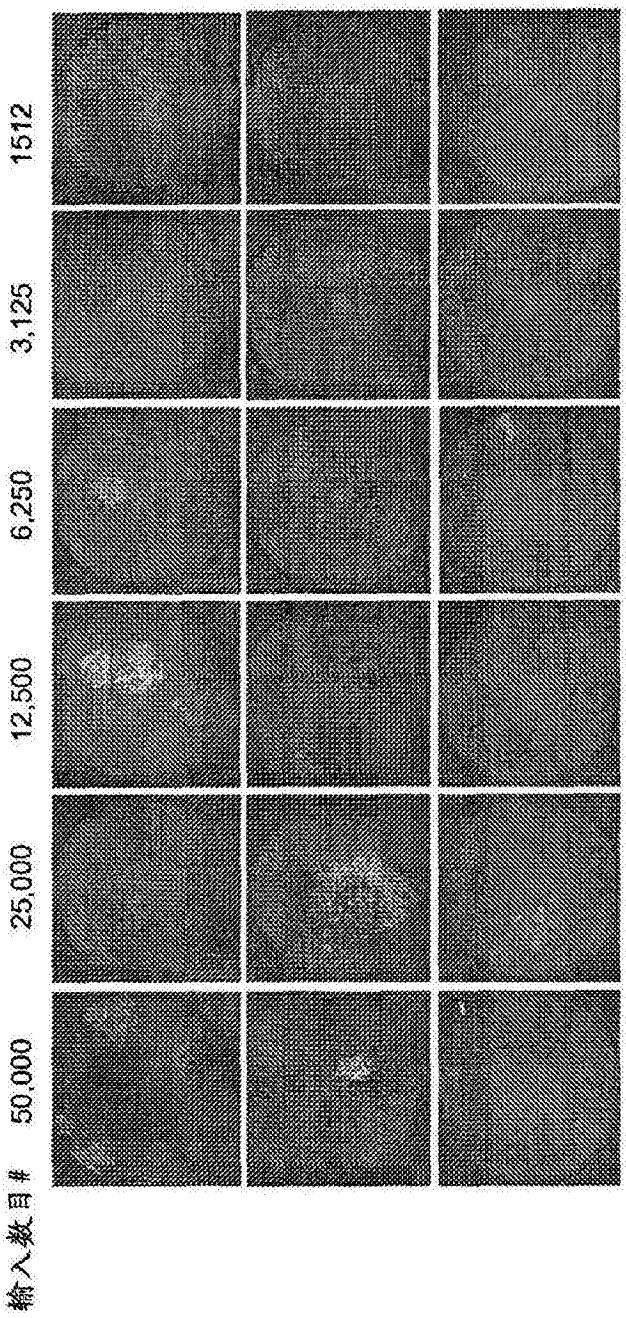


图6B

基因座	重复数目#	TiPS L-1	TiPS L-2	Fib-iPS	亲代PBMC
D16S539	5, 8-15	11,12	11,12	10,13	11,12
D7S820	6-14	8,10	8,10	9,12	8,10
D13S317	7-15	8,12	8,12	11,13	8,12
D5S818	7-15	12,13	12,13	12,13	12,13
CSF1PO	6-15	12,12	12,12	11,13	12,12
TPOX	6-13	9,11	9,11	8,9	9,11
釉基质	NA	X,Y	X,Y	X,X	X,Y
TH01	5-11	7,9	7,9	8,9.3	7,9
vWA	11, 13-21	16,18	16,18	16,19	16,18

图7

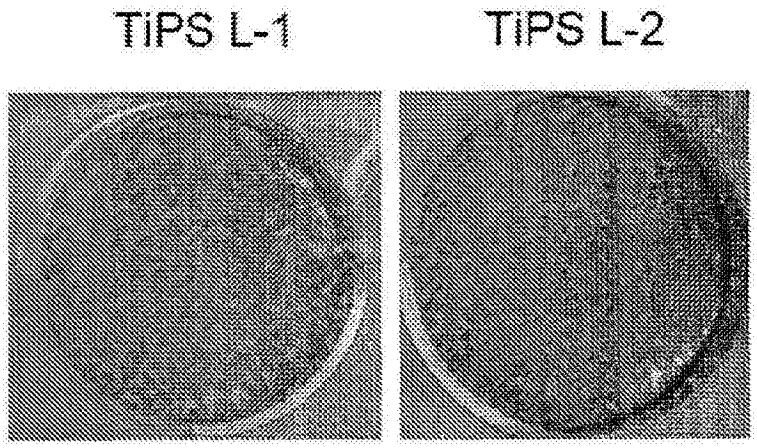


图8

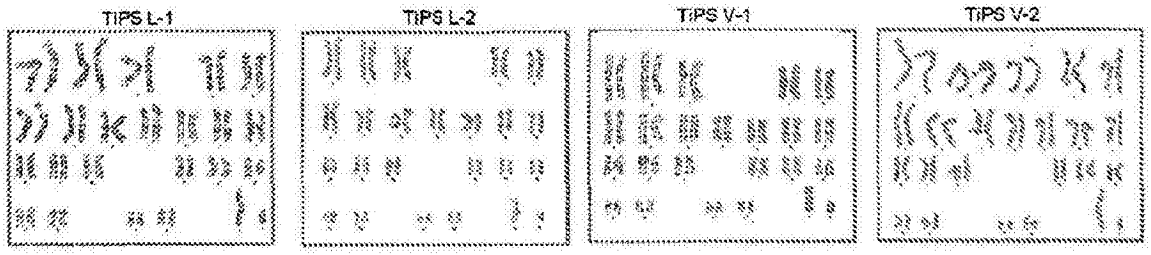


图9

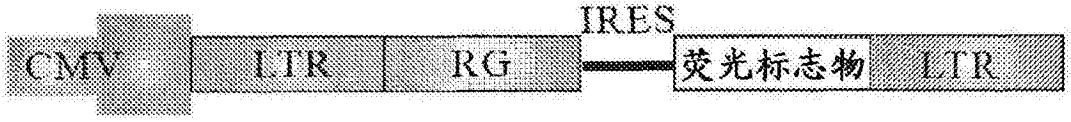


图10

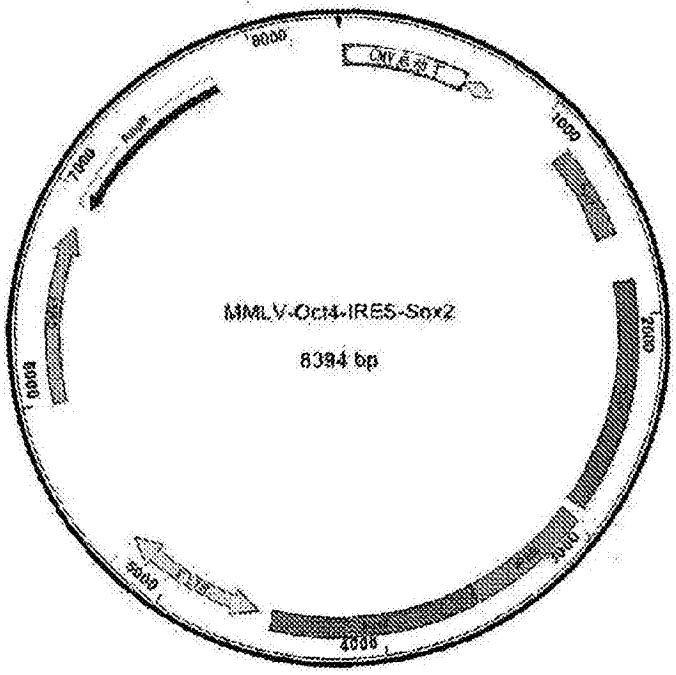


图11A

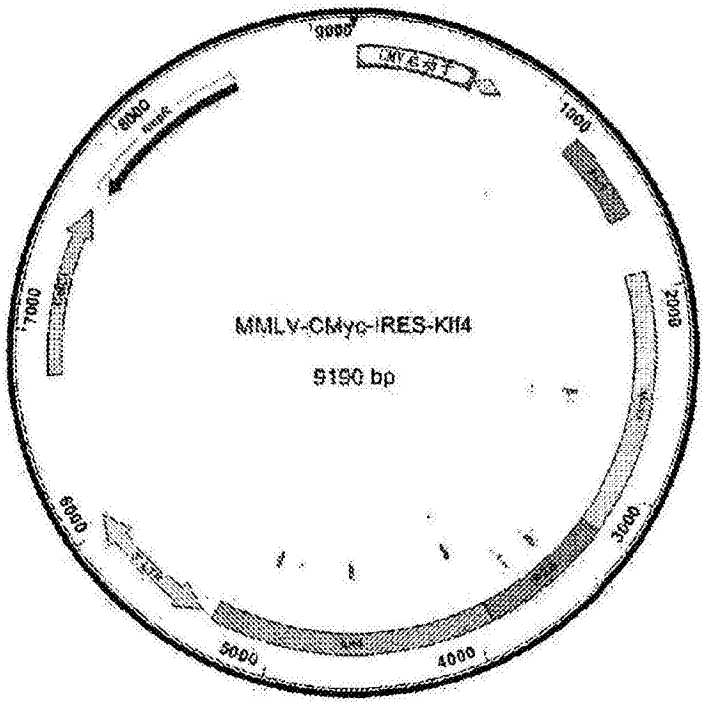


图11B

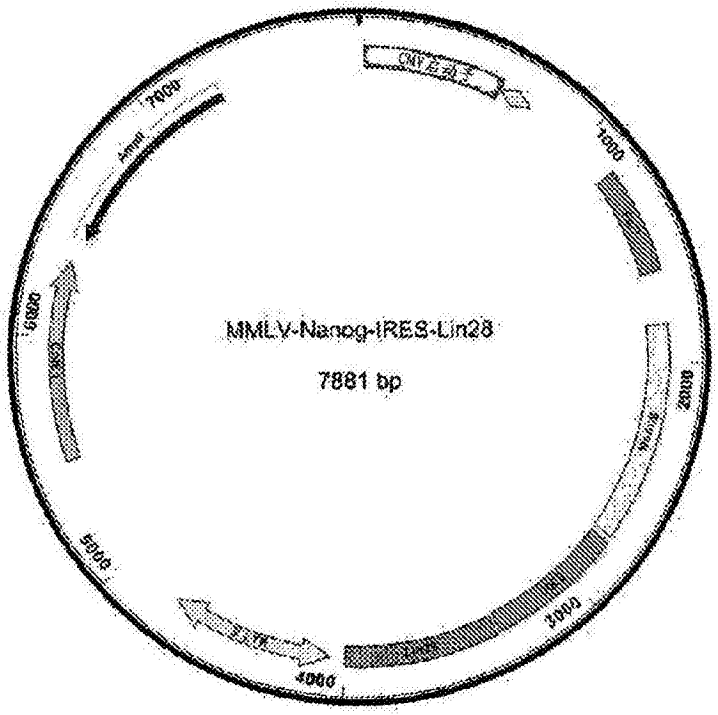

MMLV-Nanog-IRES-Lin28
7881 bp
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

图11C