



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104080482 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201280068223. 0

C07H 21/02(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 12. 05

C12N 15/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/566, 948 2011. 12. 05 US

61/569, 595 2011. 12. 12 US

61/637, 570 2012. 04. 24 US

13/465, 490 2012. 05. 07 US

61/664, 494 2012. 06. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/067966 2012. 12. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/086008 EN 2013. 06. 13

(73) 专利权人 菲克特生物科学股份有限公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 M·安吉尔 C·罗德

(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 李瑛

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20100317104 A1, 2010. 12. 16, 全文.

Elizabeth S Ng 等. A protocol

describing the use of a recombinant protein-based, animal product-free medium (APEL) for human embryonic stem cell differentiation as spinembryoid bodies.. 《Nature》. 2008, 第 3 卷 (第 5 期), 768-774.

Luigi Warren, 等. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. 《Cell Stem Cell》. 2010, 第 7 卷 618-630.

陈学奎 等. 离子排斥色谱法测定白蛋白中的辛酸钠含量. 《中国输血杂志》. 2000, 第 13 卷 (第 4 期), 242-243.

审查员 彭郁葱

权利要求书1页 说明书40页

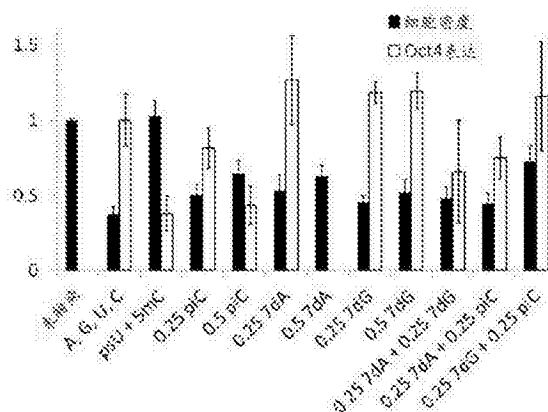
序列表6页 附图11页

(54) 发明名称

用于转染细胞的方法和产物

(57) 摘要

本发明部分涉及编码蛋白质的核酸;含有非规范核苷酸的核酸;包含核酸的治疗剂;用于诱导细胞表达蛋白质的方法、试剂盒和装置;用于转染、基因编辑和重新编程细胞的方法、试剂盒和装置;以及使用这些方法、试剂盒和装置产生的细胞、生物体和治疗剂。本文公开了使用 RNA 用于诱导细胞表达蛋白质和用于重新编程和基因编辑细胞的方法。还公开了用于从患者样品中产生细胞的方法、使用这些方法产生的细胞以及包含使用这些方法产生的细胞的治疗剂。



1. 重编程细胞至较低分化状态的方法,包括:
 - a. 使用包含白蛋白的重编程培养基培养分化的细胞,其中所述白蛋白用离子交换树脂或木炭处理;
 - b. 使用一种或多种合成的 RNA 分子转染所述细胞,其中所述一种或多种合成的 RNA 分子包括至少一种编码一种或多种重编程因子的 RNA 分子,并且其中所述转染导致所述细胞表达所述一种或多种重编程因子;和
 - c. 在连续 5 天期间重复步骤 (b) 至少 2 次,以使所述细胞被重编程至较低分化状态。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述白蛋白用辛酸钠处理。
3. 权利要求 2 的方法,其中使所述白蛋白达到至少 40℃ 的温度。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种合成的 RNA 分子包括至少一种编码下组中的至少一个成员的 RNA 分子:Oct4 蛋白、Sox2 蛋白、Klf4 蛋白和 c-Myc 蛋白。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种合成的 RNA 分子包括至少一种编码 Oct4 蛋白的 RNA 分子、至少一种编码 Sox2 蛋白的 RNA 分子、至少一种编码 Klf4 蛋白的 RNA 分子和至少一种编码 c-Myc 蛋白的 RNA 分子。
6. 权利要求 1 的方法,还包括将所述细胞与下组中的至少一个成员接触:聚-L-赖氨酸、聚-L-鸟氨酸、RGD 肽、纤连蛋白、玻连蛋白、胶原以及层粘连蛋白。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种合成的 RNA 分子包括下组中的至少一个成员:假尿苷残基和 5-甲基胞苷残基。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞是皮肤细胞。
9. 重编程细胞至较低分化状态的方法,包括:
 - a. 使用包含白蛋白的重编程培养基培养分化的细胞,其中所述白蛋白用辛酸钠处理、达到至少 40℃ 的温度并用离子交换树脂或木炭处理;
 - b. 使用一种或多种合成的 RNA 分子转染所述细胞,其中所述一种或多种合成的 RNA 分子包括至少一种编码一种或多种重编程转录因子的 RNA 分子,并且其中所述转染导致所述细胞表达所述一种或多种合成的 RNA 分子;和
 - c. 在连续 5 天期间重复步骤 (b) 至少 2 次,以使所述细胞被重编程至较低分化状态。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述一种或多种合成的 RNA 分子包括至少一种编码下组中的至少一个成员的 RNA 分子:Oct4 蛋白、Sox2 蛋白、Klf4 蛋白和 c-Myc 蛋白。
11. 权利要求 9 的方法,其中所述一种或多种合成的 RNA 分子包括至少一种编码 Oct4 蛋白的 RNA 分子、至少一种编码 Sox2 蛋白的 RNA 分子、至少一种编码 Klf4 蛋白的 RNA 分子和至少一种编码 c-Myc 蛋白的 RNA 分子。
12. 权利要求 9 的方法,还包括将所述细胞与下组中的至少一个成员接触:聚-L-赖氨酸、聚-L-鸟氨酸、RGD 肽、纤连蛋白、玻连蛋白、胶原以及层粘连蛋白。
13. 权利要求 9 的方法,其中所述一种或多种合成的 RNA 分子包括下组中的至少一个成员:假尿苷残基和 5-甲基胞苷残基。
14. 权利要求 9 的方法,其中所述细胞是皮肤细胞。

用于转染细胞的方法和产品

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求 2011 年 12 月 5 日提交的美国临时申请号 61/566,948、2011 年 12 月 12 日提交的美国临时申请号 61/569,595、2012 年 4 月 24 日提交的美国临时申请号 61/637,570、2012 年 5 月 7 日提交的美国申请号 13/465,490 以及 2012 年 6 月 26 日提交的美国临时申请号 61/664,494 的优先权,所述申请都特此以引用的方式整体并入。

发明领域

[0003] 本发明部分涉及编码蛋白质的核酸;含有非规范核苷酸的核酸;包含核酸的治疗剂;用于诱导细胞表达蛋白质的方法、试剂盒和装置;用于转染、基因编辑和重新编程细胞的方法、试剂盒和装置;以及使用这些方法、试剂盒和装置产生的细胞、生物体和治疗剂。

[0004] 电子呈送的文本文件的描述

[0005] 由此电子呈送的文本文件的内容以引用的方式整体并入本文:序列表的计算机可读格式副本(文件名:FABI_001_01W0_SeqList_ST25.txt;记录日期:2012 年 12 月 4 日;文件大小:18KB)。

[0006] 背景

[0007] 核酸转染

[0008] 可以通过在体外和体内使核酸与带电的脂质、利匹哆异德(lipidoid)、肽、其聚合物或混合物预先复合来将核酸递送至细胞。此类转染试剂为可商购的,并且广泛用于将核酸递送至培养的细胞。暴露于转染试剂-核酸复合物的细胞可以通过内吞作用或其它方式内化这些复合物。一旦在细胞里面,核酸可以进行它的预期的生物功能。在蛋白质编码 RNA 的情况下,例如, RNA 可以通过细胞的核糖体翻译成蛋白质。

[0009] 无血清细胞培养

[0010] 动物血清如胎牛血清(FBS)通常用作细胞培养基中的补充剂以促进许多类型的细胞的生长。然而,血清的不确定性质使得与这种组分接触的细胞对于研究和治疗应用而言不可取。因此,已开发了无血清细胞培养基以消除批料与批料之间的变化和被与血清缔合的毒性物质和/或病原物质污染的危险。

[0011] 血清中最丰富的蛋白质为血清白蛋白。血清白蛋白在体外和体内结合各种各样的分子,包括激素、脂肪酸、钙离子和金属离子以及小分子药物,并且可以在体外和体内将这些分子运输至细胞。血清白蛋白(最经常地牛血清白蛋白(BSA)或人血清白蛋白(HSA))是无血清细胞培养基中的常见成分,其中它通常在 1g/L 至 10g/L 的浓度下使用。血清白蛋白传统上通过乙醇分级分离(“科恩(Cohn)”工艺)由血浆制备。分离含有血清白蛋白的级分(“科恩级分 V”或简单地“级分 V”),并且通常不需进一步处理而使用。因此,血清白蛋白的标准制剂包含蛋白质部分(血清白蛋白多肽)和缔合分子部分(包括结合血清白蛋白多肽的盐、脂肪酸等等)。血清白蛋白的缔合分子组分的组成通常是复杂和未知的。

[0012] 可以处理血清白蛋白用于某些专门的应用(参见 Barker A method for the deionization of bovine serum albumin. Tissue Culture Association. 1975; Droge 等

Biochem Pharmacol. 1982 ;31:3775-9 ;Ng 等 Nat Protoc. 2008 ;3:768-76 ;美国专利申请公布号 US2010/0168000, 所述参考文献和专利申请的内容特此以引用的方式并入)。这些处理方法最常见用来使球蛋白和污染病毒从血清白蛋白的溶液中去除, 并且经常包括通过添加短链脂肪酸、辛酸, 接着是热灭活 / 沉淀污染物来稳定血清白蛋白多肽。针对高度专门化的干细胞培养应用, 使用离子交换树脂使过量盐从 BSA 溶液中去除已示出增加细胞存活力 (参见 Ng 等 Nat Protoc. 2008 ;3:768-76 ;美国专利申请公布号 US2010/0168000, 所述参考文献和专利申请的内容特此以引用的方式并入)。然而, 重组血清白蛋白没有获益于所述处理, 甚至在相同敏感的干细胞培养应用中 (参见 Ng 等 Nat Protoc. 2008 ;3:768-76 ;美国专利申请公布号 US 2010/0168000, 所述参考文献和专利申请的内容特此以引用的方式并入), 证明了这些应用中的去离子化的作用是为了使过量盐从白蛋白溶液中去除, 并不改变白蛋白的缔合分子组分。另外, 先前尚未探索所述处理对其它细胞类型如人成纤维细胞的作用和所述处理对转染效率和转染相关的毒性的作用。此外, 白蛋白缔合的脂质已示出是对人多能干细胞培养关键的, 并且从白蛋白中去除这些已示出会导致人多能干细胞的自发分化, 甚至当将脂质分开地添加至细胞培养基中 (参见 Garcia-Gonzalo 等 PLoS One. 2008 ;3:e1384, 所述参考文献的内容特此以引用的方式并入)。因此, 认为含有带未修饰的缔合分子组分的白蛋白的细胞培养基是对人多能干细胞培养关键的。重要地, 先前尚未探索脂质载体如白蛋白的缔合分子组分与转染效率和转染相关的毒性之间的关系。

[0013] 细胞重新编程

[0014] 可以通过将它们暴露于具体细胞外信号 (cue) 和 / 或通过异位表达具体蛋白质、微 RNA 等等来重新编程细胞。虽然先前已描述了若干重新编程方法, 但是依靠异位表达的大多数方法要求引入外源 DNA, 这会携带突变危险。已报道了基于直接递送重新编程蛋白的无 DNA 重新编程方法, 然而这些方法效率太低并且对于商业使用而言不可靠。另外, 已描述了基于 RNA 的重新编程方法, 然而, 当在成年细胞上进行时, 现有的基于 RNA 的重新编程方法是缓慢的、不可靠的和效率低的, 要求许多转染 (导致相当大的费用和出错机会), 可以仅重新编程有限数量的细胞类型, 可以使细胞重新编程为仅有限数量的细胞类型, 要求使用免疫抑制剂并且要求使用多种人来源的组分, 所述人来源的组分包括血液来源的 HSA 和人成纤维细胞供给者 (feeder)。先前公开的细胞重新编程方法的许多缺点使得它们对于研究和治疗使用而言不可取。

[0015] 基因编辑

[0016] 若干天然存在的蛋白质含有 DNA 结合结构域, 所述 DNA 结合结构域可以识别具体 DNA 序列, 例如锌指 (ZF) 和转录激活因子样效应子 (TALE)。含有一个或多个 DNA 结合结构域和核酸酶的催化结构域的融合蛋白可以用来在细胞中的 DNA 的希望区中产生双链断裂。当与含有同源于细胞的 DNA 的一个或多个区的 DNA 模板组合时, 基因编辑蛋白可以用来插入 DNA 序列或另外地以控制的方式改变细胞的 DNA 的序列。然而, 用于基因编辑细胞的大多数目前的方法使用基于 DNA 的载体来表达基因编辑蛋白。因此, 这些基因编辑方法是效率低的, 并且携带不受控制的诱变的危险, 使得它们对于研究和治疗使用而言不可取。先前尚未探索用于无 DNA 基因编辑体细胞的方法, 或用于同时或依次基因编辑和重新编程体细胞的方法。最后, 先前尚未探索在抗细菌、抗病毒或抗癌治疗中使用基因编辑。

[0017] 模式生物

[0018] 已通过胚胎微注射编码锌指核酸酶和 TALE- 核酸酶 (TALEN) 的核酸来产生基因敲除大鼠。还已经通过将编辑锌指核酸酶的核酸注射到胚胎中而在小鼠和大鼠中报道了引入序列特异性突变 (又称为“敲入”) 的基因编辑。使用胚胎干细胞产生基因修饰的大鼠, 并且通过体细胞重新编程产生有生殖系形成能力的大鼠多能干细胞。然而, 先前尚未探索使用基因编辑的重新编程细胞来产生基因修饰的生物体, 包括小鼠和大鼠。

[0019] 本领域中存在对用于转染细胞的改进方法和产品的需要。

[0020] 发明概述

[0021] 因此, 本发明提供了用于诱导细胞表达蛋白质和用于转染、重新编程和基因编辑细胞的试剂、方案、试剂盒以及装置。不像先前报道的方法, 本发明的某些实施方案不涉及使细胞暴露于外源 DNA 或异源或动物来源的材料。

[0022] 一方面, 本发明提供包含三个或更多个非规范核苷酸的合成 RNA 分子, 所述每个非规范核苷酸包括来自以下的一个或多个取代: 嘧啶位置 2C、嘧啶位置 4C、嘧啶位置 5C、嘌呤位置 6C、嘌呤位置 7N 以及嘌呤位置 8C。在一些实施方案中, 合成 RNA 分子由体外转录产生。在其它实施方案中, 合成 RNA 分子进一步包含以下的至少一种: 5'-帽、5'-帽 1 结构和 3'-聚 (A) 尾。在其它实施方案中, 至少两个非规范核苷酸为嘧啶。在还其它的实施方案中, 非规范核苷酸包括以下的至少一种: 假尿苷、2- 硫代尿苷、4- 硫代尿苷、5- 氮杂尿苷、5- 羟基尿苷、5- 氨基尿苷、5- 甲基尿苷、2- 硫代假尿苷、4- 硫代假尿苷、5- 羟基假尿苷、5- 甲基假尿苷、5- 氨基假尿苷、假异胞苷、5- 甲基胞苷、N4- 甲基胞苷、2- 硫代胞苷、5- 氮杂胞苷、5- 羟基胞苷、5- 氨基胞苷、N4- 甲基假异胞苷、2- 硫代假异胞苷、5- 羟基假异胞苷、5- 氨基假异胞苷、5- 甲基假异胞苷、N6- 甲基腺苷、7- 脱氮杂腺苷、6- 硫代鸟苷、7- 脱氮杂鸟苷、8- 氮杂鸟苷、6- 硫代 -7- 脱氮杂鸟苷、6- 硫代 -8- 氮杂鸟苷、7- 脱氮杂 -8- 氮杂鸟苷以及 6- 硫代 -7- 脱氮杂 -8- 氮杂鸟苷。在其它实施方案中, 至少两个非规范核苷酸各包含小于 20% 的合成 RNA 分子。在还其它的实施方案中, 非规范核苷酸包括以下的至少一种: 假尿苷、2- 硫代尿苷、4- 硫代尿苷、5- 氮杂尿苷、5- 羟基尿苷、5- 氨基尿苷、5- 甲基尿苷、2- 硫代假尿苷、4- 硫代假尿苷、5- 羟基假尿苷、5- 甲基假尿苷以及 5- 氨基假尿苷; 以及以下的至少一种: 假异胞苷、5- 甲基胞苷、N4- 甲基胞苷、2- 硫代胞苷、5- 氮杂胞苷、5- 羟基胞苷、5- 氨基胞苷、N4- 甲基假异胞苷、2- 硫代假异胞苷、5- 羟基假异胞苷、5- 氨基假异胞苷以及 5- 甲基假异胞苷。在另一实施方案中, 非规范核苷酸进一步包括以下的至少一种: N6- 甲基腺苷、7- 脱氮杂腺苷、6- 硫代鸟苷、7- 脱氮杂鸟苷、8- 氮杂鸟苷、6- 硫代 -7- 脱氮杂鸟苷、6- 硫代 -8- 氮杂鸟苷、7- 脱氮杂 -8- 氮杂鸟苷以及 6- 硫代 -7- 脱氮杂 -8- 氮杂鸟苷。

[0023] 另一方面, 本发明提供了包含非规范核苷酸并且编码基因编辑蛋白的合成 RNA 分子。

[0024] 在另一个实施方案中, 本发明提供了包含本文所描述的合成 RNA 分子的治疗组合物。

[0025] 另一方面, 本发明提供了治疗组合物, 其包含编码基因编辑蛋白的合成 RNA 分子和转染试剂。

[0026] 在另一个实施方案中, 本发明提供了用于使用核酸转染细胞的方法, 所述方法包括使细胞与本文所描述的合成 RNA 分子接触。

[0027] 在另一个实施方案中, 本发明提供了用于诱导哺乳动物细胞表达感兴趣的蛋白质

的方法,所述方法包括使细胞与本文所描述的合成 RNA 分子接触。在另一个实施方案中,本发明提供了用于重新编程细胞的方法,所述方法包括使细胞与本文所描述的合成 RNA 分子接触。在另一个实施方案中,本发明提供了用于基因编辑细胞的方法,所述方法包括使细胞与本文所描述的合成 RNA 分子接触。

[0028] 另一方面,本发明提供了用于使用核酸转染细胞的方法,所述方法包括:使细胞与含有氢化可的松和 / 或白蛋白的培养基接触,其中白蛋白用离子交换树脂或木炭处理;以及使细胞与核酸接触。在一个实施方案中,白蛋白用短链脂肪酸处理,和 / 或使其达到至少 40℃ 的温度。在其它实施方案中,方法进一步包括使细胞与转染试剂接触。在其它实施方案中,细胞为哺乳动物细胞,并且哺乳动物细胞被诱导表达感兴趣的蛋白质。在其它实施方案中,方法进一步包括在连续 5 天期间使细胞与核酸接触至少两次。在一些实施方案中,核酸编码重新编程蛋白。在其它实施方案中,细胞被重新编程。在又一个实施方案中,细胞为皮肤细胞,并且进一步包括在支持以下的至少一种生长的条件下培养皮肤细胞:皮肤细胞、多能干细胞、葡萄糖反应性胰岛素产生细胞、造血细胞、心脏细胞以及视网膜细胞,并且其中皮肤细胞被重新编程为选自以下的细胞:皮肤细胞、多能干细胞、葡萄糖反应性胰岛素产生细胞、造血细胞、心脏细胞以及视网膜细胞。在又一个实施方案中,核酸编码 Oct4 蛋白。在又一个实施方案中,方法进一步包括使细胞与编码以下的至少一种的核酸接触: Sox2 蛋白、Klf4 蛋白和 c-Myc 蛋白。在又一个实施方案中,方法进一步包括使细胞与编码 Sox2 蛋白、Klf4 蛋白和 c-Myc 蛋白的一种或多种核酸接触。在还其它的实施方案中,核酸编码基因编辑蛋白。在还其它的实施方案中,核酸编码单独作用或与一个或多个其它分子组合作用而在 DNA 分子中产生单链或双链断裂的蛋白质。在各种实施方案中,细胞被基因编辑。在一些实施方案中,单链或双链断裂处于选自以下的基因的转录起始位点的约 5,000,000 个碱基内:CCR5、CXCR4、GAD1、GAD2、CFTR、HBA1、HBA2、HBB、HBD、FANCA、XPA、XPB、XPC、ERCC2、POLH、HTT、DMD、SOD1、APOE、APP、LRRK2、PRNP、BRCA1 和 BRCA2 或其类似物、变体或家族成员。在一些实施方案中,方法进一步包括使细胞与以下的至少一种接触:聚-L-赖氨酸、聚-L-鸟氨酸、RGD 肽、纤连蛋白、玻连蛋白、胶原以及层粘连蛋白或其生物活性片段、功能性变体或家族成员。在还其它的实施方案中,核酸为合成 RNA 分子,所述合成 RNA 分子可以含有以下的至少一种:假尿苷、5-甲基假尿苷和 5-甲基胞苷。在一些实施方案中,方法提供了使细胞与分化因子接触和 / 或从患者中收获细胞和 / 或将细胞递送至患者。

[0029] 另一方面,本发明提供了包含白蛋白的培养基,其中白蛋白为重组的,并且用离子交换树脂或木炭处理。在另一个实施方案中,培养基进一步包含缓冲的盐溶液和氨基酸和 / 或以下的一种或多种:胰岛素、转铁蛋白和硒和 / 或胆固醇和 / 或类固醇(例如,氢化可的松)和 / 或免疫抑制剂(例如 B18R)。

[0030] 另一方面,本发明提供了包含氢化可的松和 / 或白蛋白以及合成 RNA 分子的试剂盒,其中白蛋白用离子交换树脂或木炭处理。在一个实施方案中,合成 RNA 分子编码以下的至少一种:Oct4 蛋白、Sox2 蛋白、Klf4 蛋白、c-Myc 蛋白、Nanog 蛋白、Lin28 蛋白以及 Utl1 蛋白。在另一个实施方案中,试剂盒进一步包含转染试剂和 / 或本文所描述的合成 RNA 分子。在另一个实施方案中,试剂盒为重新编程试剂盒和 / 或基因编辑试剂盒。

[0031] 另一方面,本发明提供了包含核酸和转染试剂的核酸转染-试剂复合物,其中核酸转染-试剂复合物通过冷却来固化。在一些实施方案中,核酸转染-试剂复合物通过使

核酸转染 – 试剂复合物与在液相和 / 或汽相下的液氮接触来固化。

[0032] 另一方面,本发明提供了用于转染细胞的方法,所述方法包括使细胞与本文所描述的核酸转染 – 试剂复合物接触。

[0033] 另一方面,本发明提供了用于转染细胞的系统,所述系统包括用于使细胞与转染培养基接触的装置和用于使细胞与核酸转染 – 试剂复合物接触的装置。在一些实施方案中,细胞周围的大气含有大约 5% 二氧化碳和 / 或大约 5% 氧气。

[0034] 在一些实施方案中,本发明提供了细胞和 / 或生物体和 / 或治疗组合物和 / 或包含通过本文所描述的方法产生的细胞的治疗组合物。

[0035] 在一些方面中,提供了具有低毒性和高翻译效率的合成 RNA 分子。在其它方面中,提供了用于产生合成 RNA 分子和将合成 RNA 分子递送至细胞的方法、试剂盒和装置。在还其它的方面中,提供了用于高效转染、重新编程和基因编辑细胞的细胞培养基。其它方面涉及包含合成 RNA 分子的治疗剂,所述治疗剂包括用于治疗 1 型糖尿病、心脏病 (包括缺血性和扩张性心肌病)、黄斑变性、帕金森氏病、囊性纤维化、镰状细胞贫血、地中海贫血、范科尼贫血、重度联合免疫缺陷、遗传性感觉神经病、着色性干皮病、亨廷顿氏病、肌营养不良、肌萎缩性侧索硬化、阿尔茨海默氏病、癌症以及传染病 (包括肝炎和 HIV/AIDS)。另外的方面涉及包含细胞的治疗剂,所述治疗剂包括用于治疗 1 型糖尿病、心脏病 (包括缺血性和扩张性心肌病)、黄斑变性、帕金森氏病、囊性纤维化、镰状细胞贫血、地中海贫血、范科尼贫血、重度联合免疫缺陷、遗传性感觉神经病、着色性干皮病、亨廷顿氏病、肌营养不良、肌萎缩性侧索硬化、阿尔茨海默氏病、癌症以及传染病 (包括肝炎和 HIV/AIDS)。

[0036] 附图详述

[0037] 在所附附图中通过实例的方式而并非通过限制的方式说明了本发明,并且其中:

[0038] 图 1 描绘了在变性甲醛 – 琼脂糖凝胶上分辨的编码指定蛋白质的 RNA。

[0039] 图 2A 描绘了使用编码 Oct4 并且包含指定核苷酸的合成 RNA 转染的原代人成纤维细胞。“A”是指腺苷,“G”是指鸟苷,“U”是指尿苷,“C”是指胞苷,“psU”是指假尿苷,“5mC”是指 5- 甲基胞苷,“N4mC”是指 N4- 甲基胞苷,“7dG”是指 7- 脱氮杂鸟苷,并且“psisoc”是指假异胞苷。核苷酸前面的数字指明体外转录反应中的对应的核苷酸 -5' - 三磷酸的部分。例如,0.5N4mC 是指在含有等量的 N4- 甲基胞苷 -5' - 三磷酸和胞苷 -5' - 三磷酸的体外转录反应中合成的 RNA。固定细胞并且在转染后 20h 对 Oct4 蛋白染色。

[0040] 图 2B 描绘了使用编码 Oct4 并且包含指定核苷酸的合成 RNA 转染的原代人成纤维细胞的培养物的 Oct4 表达和细胞密度。如在图 2A 中,核苷酸被缩写,除了“7dA”是指 7- 脱氮杂腺苷,并且“piC”是指假异胞苷。示出细胞密度被归一化为未转染的细胞。示出 Oct4 表达被归一化为仅含有规范核苷酸的合成 RNA。误差棒指明标准误差 (n = 3)。

[0041] 图 3A 描绘了在挑取集落并且铺放在基底膜提取物涂布的板上一天后,通过使用编码蛋白质 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc-2(T58A) 和 Lin28 的 RNA 转染原代人成纤维细胞而产生的重新编程细胞系。

[0042] 图 3B 描绘了如在图 3A 中产生、对多能干细胞标记物 Oct4 和 SSEA4 染色的重新编程细胞系。标记“Hoechst”的图表明细胞核,并且标记“合并”的图表明来自三个通道的合并信号。

[0043] 图 3C 描绘了如在图 3A 中转染和培养的原代人成纤维细胞。总共进行 5 次转染。

在第 7 天拍摄照片。具有重新编程形态的若干细胞集落是可见的。

[0044] 图 4A 描绘了 1.5mm 直径的皮穿孔活组织检查组织样品。

[0045] 图 4B 描绘了如在图 4A 中收获并且悬浮在含有酶的溶液的气-液界面处的组织样品。

[0046] 图 4C 描绘了如在图 4A 中收获、如在图 4B 中分离并且铺放在 96 孔板的孔中的原代人成纤维细胞。

[0047] 图 5A 描绘了重新编程为胰岛素产生细胞的原代人成纤维细胞。固定细胞并且对胰岛素染色。

[0048] 图 5B 描绘了重新编程为造血细胞的原代人成纤维细胞。固定细胞并且对 CD34 染色。

[0049] 图 5C 描绘了重新编程为搏动心脏细胞的原代人成纤维细胞。

[0050] 图 6A 描绘了用于产生 RNA TALEN™骨架的体外转录模板的正链。

[0051] 图 6B 描绘了在 Golden-Gate 克隆反应以并入一系列单体重复从而形成完整的 RNA TALEN™模板之后的图 6A 的模板。

[0052] 图 6C 描绘了由图 6B 的模板产生的 5'-加帽、3'-聚(A)-加尾的 RNA TALEN™。

[0053] 图 7 描绘了图 6B 的模板的序列,其中 RNA TALEN™被设计为结合 DNA 的 20bp 区,并且其中标记“X(02)X”、“X(03)X”等等的区代表可以被选择以靶向具体 DNA 序列的重复可变结构域(RVD)。这个模板编码 RNA TALEN™,其中不考虑 RVD,被 RNA TALEN™结合的第一残基为胸苷残基,并且因此第一 RVD 标记为“X(02)X”而不是“X(01)X”。

[0054] 图 8 描绘了基因编辑和重新编程的原代人成纤维细胞。箭头指明具有重新编程形态的细胞集落。

[0055] 图 9A 描绘了可以自动或半自动方式转染和 / 或重新编程细胞的系统的正视图。

[0056] 图 9B 描绘了图 9A 的系统的后面板。

[0057] 图 9C 描绘了图 9A 的系统的主要组件。

[0058] 图 10A 描绘了复合培养基内的 RNA 和转染试剂的复合。

[0059] 图 10B 描绘了用于分配含有核酸的预先复合的沉淀的两种方法。

[0060] 图 10C 描绘了用于使用抽吸器使盖子从孔板上去除的方法。

[0061] 图 10D 描绘了用于使用夹子使盖子从孔板上去除的方法。

[0062] 图 11 描绘了可以自动或半自动方式与用于成像、孵育和以另外的方式操控细胞的仪器可操作组合转染和 / 或重新编程细胞的系统。

[0063] 定义

[0064] “分子”意指分子实体(分子、离子、复合物等)。

[0065] “蛋白质”意指多肽。

[0066] “RNA 分子”意指包含 RNA 的分子。

[0067] “合成 RNA 分子”意指使用生物工程在细胞外部产生的 RNA 分子或在细胞内部产生的 RNA 分子,例如在体外转录反应中产生的 RNA 分子、通过直接化学合成产生的 RNA 分子或在基因工程化的大肠杆菌(E. coli)细胞中产生的 RNA 分子。

[0068] “核苷酸”意指核苷酸或其片段或衍生物,例如核碱基、核苷、核苷酸-三磷酸等。

[0069] “核苷”意指核苷酸。

- [0070] “转染”意指使细胞与分子接触,其中分子被细胞内化。
- [0071] “转染时”意指转染期间或之后。
- [0072] “转染试剂”意指与分子缔合并且促进分子递送至细胞和/或通过细胞内化分子的物质或多种物质的混合物,例如阳离子脂质、带电聚合物或细胞穿透肽。
- [0073] “基于试剂的转染”意指使用转染试剂转染。
- [0074] “细胞培养基”意指可以用于细胞培养的培养基,例如杜尔贝科氏改良伊格尔培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM) 或 DMEM+10%胎牛血清 (FBS)。
- [0075] “复合培养基”意指向其中添加转染试剂和待转染的分子的培养基,并且其中转染试剂与待转染的分子缔合。
- [0076] “转染培养基”意指可以用于转染的培养基,例如杜尔贝科氏改良伊格尔培养基 (DMEM) 或 DMEM/F12。
- [0077] “重组蛋白”意指不是在动物或人中产生的蛋白质或肽。非限制性的实例包括在细菌中产生的人转铁蛋白,在鼠细胞的体外培养物中产生的人纤连蛋白以及在稻米植物中产生的人血清白蛋白。
- [0078] “脂质载体”意指可以使脂质或脂溶性分子在水溶液中的溶解度增加的物质,例如人血清白蛋白或甲基- β -环糊精。
- [0079] “Oct4 蛋白”意指由 POU5F1 基因编码的蛋白质或其天然或工程化的变体、家族成员、直系同源基因、片段或融合构建体,例如人 Oct4 蛋白 (SEQ ID NO:1)、小鼠 Oct4 蛋白、Oct1 蛋白、由 POU5F1 假基因 2 编码的蛋白质、Oct4 蛋白的 DNA 结合结构域或 Oct4-GFP 融合蛋白。在一些实施方案中,Oct4 蛋白包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 70%同一性,或在其它实施方案中与 SEQ ID NO:1 具有至少 75%、80%、85%、90%或 95%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Oct4 蛋白包含相对于 SEQ ID NO:1 具有 1 至 20 个氨基酸插入、缺失或取代(总起来说)的氨基酸序列。在其它实施方案中,Oct4 蛋白包含相对于 SEQ ID NO:1 具有 1 至 15 个或 1 至 10 个氨基酸插入、缺失或取代(总起来说)的氨基酸序列。
- [0080] “Sox2 蛋白”意指由 SOX2 基因编码的蛋白质或其天然或工程化的变体、家族成员、直系同源基因、片段或融合构建体,例如人 Sox2 蛋白 (SEQ ID NO:2)、小鼠 Sox2 蛋白、Sox2 蛋白的 DNA 结合结构域或 Sox2-GFP 融合蛋白。在一些实施方案中,Sox2 蛋白包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 70%同一性,或在其它实施方案中与 SEQ ID NO:2 具有至少 75%、80%、85%、90%或 95%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Sox2 蛋白包含相对于 SEQ ID NO:2 具有 1 至 20 个氨基酸插入、缺失或取代(总起来说)的氨基酸序列。在其它实施方案中,Sox2 蛋白包含相对于 SEQ ID NO:2 具有 1 至 15 个或 1 至 10 个氨基酸插入、缺失或取代(总起来说)的氨基酸序列。
- [0081] “Klf4 蛋白”意指由 KLF4 基因编码的蛋白质或其天然或工程化的变体、家族成员、直系同源基因、片段或融合构建体,例如人 Klf4 蛋白 (SEQ ID NO:3)、小鼠 Klf4 蛋白、Klf4 蛋白的 DNA 结合结构域或 Klf4-GFP 融合蛋白。在一些实施方案中,Klf4 蛋白包含与 SEQ ID NO:3 具有至少 70%同一性,或在其它实施方案中与 SEQ ID NO:3 具有至少 75%、80%、85%、90%或 95%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Klf4 蛋白包含相对于 SEQ ID NO:3 具有 1 至 20 个氨基酸插入、缺失或取代(总起来说)的氨基酸序列。在其它实施方案中,Klf4 蛋白包含相对于 SEQ ID NO:3 具有 1 至 15 个或 1 至 10 个氨基酸插入、缺失或取

代（总起来说）的氨基酸序列。

[0082] “c-Myc 蛋白”意指由 MYC 基因编码的蛋白质或其天然或工程化的变体、家族成员、直系同源基因、片段或融合构建体，例如人 c-Myc 蛋白 (SEQ ID NO:4)、小鼠 c-Myc 蛋白、1-Myc 蛋白、c-Myc (T58A) 蛋白、c-Myc 蛋白的 DNA 结合结构域或 c-Myc-GFP 融合蛋白。在一些实施方案中，c-Myc 蛋白包含与 SEQ ID NO:4 具有至少 70% 同一性，或在其它实施方案中与 SEQ ID NO:4 具有至少 75%、80%、85%、90% 或 95% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，c-Myc 蛋白包含相对于 SEQ ID NO:4 具有 1 至 20 个氨基酸插入、缺失或取代（总起来说）的氨基酸。在其它实施方案中，c-Myc 蛋白包含相对于 SEQ ID NO:4 具有 1 至 15 个或 1 至 10 个氨基酸插入、缺失或取代（总起来说）的氨基酸序列。

[0083] “重新编程”意指引起细胞的表型变化，例如引起 β -细胞祖先分化为成熟 β -细胞，引起成纤维细胞去分化为多能干细胞，引起角质化细胞转分化为心脏干细胞或引起神经元的轴突生长。

[0084] “重新编程因子”意指当细胞与分子接触和 / 或细胞表达分子时，可以单独或与其它分子组合引起重新编程的分子，例如 Oct4 蛋白。

[0085] “供给者”意指可以用来调节培养基或以另外的方式支持培养的其它细胞的生长的细胞。

[0086] “调节”意指使一个或多个供给者与培养基接触。

[0087] “脂肪酸”意指包含具有至少两个碳原子的脂肪链的分子，例如亚油酸、 α -亚麻酸、辛酸、白三烯、前列腺素、胆固醇、糖皮质激素、消退素、保护素、血栓烷、脂氧素、maresin、鞘脂、色氨酸、N-乙酰基色氨酸或其盐、甲酯或衍生物。

[0088] “短链脂肪酸”意指包含具有 2 个与 30 个之间碳原子的脂肪链的脂肪酸。

[0089] “白蛋白”意指在水中高度溶解的蛋白质，例如人血清白蛋白。

[0090] “缔合分子”意指与另一个分子非共价结合的分子。

[0091] “白蛋白的缔合分子组分”意指结合白蛋白多肽的一种或多种分子，例如结合白蛋白多肽的脂质、激素、胆固醇、钙离子等。

[0092] “处理过的白蛋白”意指经处理以减少、去除、替换或以另外的方式灭活白蛋白的缔合分子组分的白蛋白，例如在升高的温度下孵育的人血清白蛋白、与辛酸钠接触的人血清白蛋白或与多孔材料接触的人血清白蛋白。

[0093] “离子交换树脂”意指当与含有离子的溶液接触时可以用一个或多个不同的离子替换一个或多个离子的材料，例如可以用一个或多个钠离子替换一个或多个钙离子的材料。

[0094] “生殖细胞”意指精细胞或卵细胞。

[0095] “多能干细胞”意指在体内可以分化成具有所有三个胚层（内胚层、中胚层和外胚层）的细胞的细胞。

[0096] “体细胞”意指不是多能干细胞或生殖细胞的细胞，例如皮肤细胞。

[0097] “葡萄糖反应性胰岛素产生细胞”意指当暴露于某一浓度的葡萄糖时可以产生和 / 或分泌不同于（小于或大于）当细胞暴露于不同浓度的葡萄糖时细胞产生和 / 或分泌的胰岛素的量的一定量的胰岛素的细胞，例如 β -细胞。

[0098] “造血细胞”意指血细胞或可以分化成血细胞的细胞，例如造血干细胞或白细胞。

[0099] “心脏细胞”意指心脏细胞或可以分化成心脏细胞的细胞,例如心脏干细胞或心肌细胞。

[0100] “视网膜细胞”意指视网膜的细胞或可以分化成视网膜的细胞的细胞,例如视网膜色素上皮细胞。

[0101] “皮肤细胞”意指常见于皮肤中的细胞,例如成纤维细胞、角质化细胞、黑素细胞、脂肪细胞、间质干细胞、脂肪干细胞或血细胞。

[0102] “Wnt 信号传导激动剂”意指可以进行蛋白质的 Wnt 家族的一个或多个成员的一种或多种生物功能的分子,例如 Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt3a 或 2-氨基-4-[3,4-(亚甲基二氧基)苄基氨基]-6-(3-甲氧基苯基)嘧啶。

[0103] “IL-6 信号传导激动剂”意指可以进行 IL-6 蛋白的一种或多种生物功能的分子,例如 IL-6 蛋白或 IL-6 受体(又称为可溶的 IL-6 受体、IL-6R、IL-6R α 等)。

[0104] “TGF- β 信号传导激动剂”意指可以进行蛋白质的 TGF- β 超家族的一个或多个成员的一种或多种生物功能的分子,例如 TGF- β 1、TGF- β 3、活化素 A、BMP-4 或 Nodal。

[0105] “免疫抑制剂”意指可以阻抑免疫系统的一个或多个方面的物质,但所述物质通常不存在于哺乳动物中,例如 B18R 或地塞米松(dexamethasone)。

[0106] “基因编辑”意指改变细胞的 DNA 序列。

[0107] “基因编辑蛋白”意指可以单独或与另一个分子组合改变细胞的 DNA 序列的蛋白质,例如核酸酶、转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶、大范围核酸酶、切口酶或其天然或工程化的变体、家族成员、直系同源基因、片段或融合构建体。

[0108] “单链断裂”意指其中连接核苷酸的一个或多个共价键在一个或两个链之一中断裂的单链或双链 DNA 的区。

[0109] “双链断裂”意指其中连接核苷酸的一个或多个共价键在两个链的每个链中断裂的双链 DNA 的区。

[0110] 血清白蛋白是无血清细胞培养基的常见组分。现已经发现血清白蛋白可以抑制转染,并且在转染培养基中包括处于通常用于无血清细胞培养基的浓度下的未处理的血清白蛋白可以在转染时导致低转染效率和/或低细胞存活力。血清白蛋白多肽可以在体外和体内结合各种各样的分子,包括脂质、离子、胆固醇等,并且因此,从血液和重组血清白蛋白中分离的血清白蛋白包含多肽组分和缔合分子组分。现已经发现当转染时由血清白蛋白引起的低转染效率和低细胞存活力可以部分地由血清白蛋白的缔合分子组分引起。进一步发现可以通过部分或完全减少、去除、替换或以另外的方式灭活血清白蛋白的缔合分子组分来增加转染效率并且可以减少转染相关的毒性。因此,本发明的某些实施方案涉及用于处理蛋白质以部分或完全减少、去除、替换或以另外的方式灭活蛋白质的缔合分子组分的方法。其它实施方案涉及被处理以部分或完全减少、去除、替换或以另外的方式灭活蛋白质的缔合分子组分的蛋白质。

[0111] 某些实施方案涉及用于通过使蛋白质与减少当转染时由蛋白质引起的低转染效率和/或低细胞存活力的一种或多种分子接触来处理蛋白质的方法。发现使血清白蛋白与短链脂肪酸、辛酸钠(又称为“辛酸(octanoic acid)”、“辛酸酯”、“辛酸盐”或“辛酸(caprylic acid)”)接触可减少在某些情况下当转染时由血清白蛋白引起的低转染效率和低细胞存活力。可以用来处理蛋白质的其它物质包括:癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕

桐酸、硬脂酸、花生酸、二十二烷酸、二十四烷酸、蜡酸、肉豆蔻脑酸、棕榈油酸、十六碳烯酸 (sapienic acid)、油酸、反油酸、异油酸、亚油酸、亚麻酸、 α -亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸、二十二碳六烯酸、色氨酸、N-乙酰基色氨酸、胆固醇、其它脂肪酸以及其盐、混合物、片段和衍生物。用于处理蛋白质的物质可以是纯物质、明确定义的混合物或复合物或未定义的混合物,如基于动物或基于植物的油,例如鱼肝油。在某些实施方案中,在蛋白质被纯化之后处理蛋白质。在其它实施方案中,在蛋白质被纯化之前处理蛋白质。在还其它的实施方案中,在蛋白质被纯化的同时处理蛋白质。在还其它的实施方案中,处理蛋白质并且不纯化蛋白质。

[0112] 在升高的温度下孵育蛋白质可以引起蛋白质的多肽组分部分或完全变性,这可以减少或消除可能是对维持蛋白质的缔合分子组分关键的结合位点。因此,某些实施方案涉及用于通过在升高的温度下孵育蛋白质来处理蛋白质的方法。在一个实施方案中,在至少约 40°C 的温度下孵育蛋白质至少约 10 分钟。在另一个实施方案中,在至少约 50°C 的温度下孵育蛋白质至少约 10 分钟。在另一个实施方案中,在至少约 55°C 的温度下孵育蛋白质至少约 30 分钟。在一个实施方案中,使蛋白质与辛酸钠接触并且然后在约 60°C 下孵育若干小时,如约 1 小时与约 24 小时之间或约 2 小时与约 6 小时之间。在另一个实施方案中,辛酸钠的浓度为约 5mM 与约 50mM 之间或约 10mM 与约 40mM 之间。在某些实施方案中,辛酸钠可以被以下的至少一种元素 (element) 替换或与以下的至少一种元素组合使用:癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、二十二烷酸、二十四烷酸、蜡酸、肉豆蔻脑酸、棕榈油酸、十六碳烯酸、油酸、反油酸、异油酸、亚油酸、亚麻酸、 α -亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸、二十二碳六烯酸、色氨酸、N-乙酰基色氨酸以及胆固醇或其盐、混合物、片段和衍生物。

[0113] 糖化和糖基化是通过其使一个或多个糖分子结合蛋白质的方法。糖化和糖基化可以影响蛋白质的结合性质,并且血清白蛋白含有若干个潜在的糖化部位。因此,某些实施方案涉及用于通过使蛋白质糖化或糖基化来处理蛋白质的方法。

[0114] 离子交换树脂 (包括阴离子交换树脂、阳离子交换树脂和混合床树脂) 通常用来使溶液去离子化。蛋白质 (如血清白蛋白) 的缔合分子组分可以包含离子。因此,某些实施方案涉及用于通过使蛋白质与一种或多种离子交换树脂接触来处理蛋白质的方法。在一个实施方案中,一种或多种离子交换树脂包括含有具有质子 (H^+) 和羟基 (OH^-) 形式的官能团的混合床树脂。在另一个实施方案中,一种或多种离子交换树脂包括当树脂变为与离子饱和时改变颜色的指示剂。除了与一种或多种离子交换树脂接触之外,其它方法可以用来减少、去除、替换或以另外的方式灭活蛋白质的缔合分子组分,包括使蛋白质与木炭接触,所述木炭可以被活化和 / 或用化学品 (如硫酸葡聚糖) 处理;透析 (包括导致缔合分子组分解缔合的稀释,无论解缔合的分子随后是否从溶液中去掉);结晶;色谱法;电泳;热处理;低温处理;高 pH 处理;低 pH 处理;有机溶剂沉淀以及亲和纯化。

[0115] 用于处理蛋白质的某些方法可以优选地减少、去除、替换或以另外的方式灭活具体类型的分子。在某些情况下,组合两种或更多种用于处理蛋白质以减少当转染时由蛋白质引起的低转染效率和 / 或低细胞存活力的方法因此可以是有益的。因此,某些实施方案涉及用于使用两种或更多种方法以减少、去除、替换或以另外的方式灭活蛋白质的缔合分子组分来处理蛋白质的方法。在一个实施方案中,使蛋白质与一种或多种离子交换树脂和

活性炭接触。在另一个实施方案中,使蛋白质与辛酸钠接触、在升高的温度下孵育、与一种或多种离子交换树脂接触以及与活性炭接触。在另一个实施方案中,蛋白质为血清白蛋白,并且升高的温度为至少约 50°C。

[0116] 蛋白质的缔合分子组分的某些元素可以有益于培养的细胞和 / 或转染,例如某些消退素、保护素、脂氧素、maresin、类花生酸、前列环素、血栓烷、白三烯、环戊烯酮前列腺素以及糖皮质激素。因此,某些实施方案涉及用于处理蛋白质以减少、去除、替换或以另外的方式灭活蛋白质的缔合分子组分而没有减少、去除、替换或以另外的方式灭活蛋白质的缔合分子组分的一种或多种有益元素的方法。其它实施方案涉及用于处理蛋白质以减少、去除、替换或以另外的方式灭活蛋白质的缔合分子组分,并且进一步使蛋白质与一个或多个包含蛋白质的缔合分子组分的一种或多种有益元素的分子接触的方法。

[0117] 还其它的实施方案涉及用于通过使蛋白质与一个或多个包含蛋白质的缔合分子组分的一种或多种有益元素的分子接触来处理蛋白质以减少当转染时由蛋白质引起的低转染效率和 / 或低细胞存活力的方法。还其它的实施方案涉及用于通过使细胞与一个或多个包含蛋白质的缔合分子组分的一种或多种有益元素的分子接触来在转染时增加转染效率和 / 或增加细胞存活力的方法。在一个实施方案中,使蛋白质与一种或多种离子交换树脂或木炭接触,并且进一步使其与糖皮质激素接触,如氢化可的松、强的松、强的松龙、甲基强的松龙、地塞米松或倍他米松 (betamethasone)。在另一个实施方案中,使细胞与糖皮质激素接触,如氢化可的松、强的松、强的松龙、甲基强的松龙、地塞米松或倍他米松。已经进一步发现在某些情况下,在转染培养基中包括一种或多种类固醇和 / 或一种或多种抗氧化剂可以增加转染效率、重新编程效率和基因编辑效率。因此,某些实施方案涉及用于通过在含有类固醇的培养基中培养细胞并且使细胞与一个或多个合成 RNA 分子接触来诱导细胞表达感兴趣的蛋白质的方法。在一个实施方案中,类固醇为氢化可的松。在另一个实施方案中,氢化可的松以约 0.1 μ M 与约 10 μ M 之间或约 1 μ M 的浓度存在于培养基中。其它实施方案涉及用于通过在含有抗氧化剂的培养基中培养细胞并且使细胞与一个或多个合成 RNA 分子接触来诱导细胞表达感兴趣的蛋白质的方法。在一个实施方案中,抗氧化剂为抗坏血酸或抗坏血酸-2-磷酸盐。在另一个实施方案中,抗坏血酸或抗坏血酸-2-磷酸盐以约 0.5mg/L 与约 500mg/L 之间 (包括约 50mg/L) 的浓度存在于培养基中。还其它的实施方案涉及用于通过在含有类固醇和 / 或抗氧化剂的培养基中培养细胞并且使细胞与一个或多个合成 RNA 分子接触来重新编程和 / 或基因编辑细胞的方法,其中一个或多个合成 RNA 分子编码一种或多种重新编程蛋白和 / 或基因编辑蛋白。在某些实施方案中,细胞存在于生物体中,并且将类固醇和 / 或抗氧化剂递送至生物体。

[0118] 已经报道了在某些情况下将转铁蛋白添加至复合培养基中来增加质粒转染的效率。现已经发现,将转铁蛋白添加至复合培养基中还可以增加用合成 RNA 分子转染的效率。因此,某些实施方案涉及用于通过将一个或多个合成 RNA 分子和转染试剂添加至含有转铁蛋白的溶液中来诱导细胞表达感兴趣的蛋白质的方法。在一个实施方案中,转铁蛋白以约 1mg/L 与约 100mg/L 之间 (如约 5mg/L) 的浓度存在于溶液中。在另一个实施方案中,转铁蛋白为重组的。

[0119] 其它实施方案涉及含有根据本发明的一种或多种方法处理的蛋白质的培养基。在某些实施方案中,在与培养基的一种或多种其它成分混合之前处理蛋白质。在一个实施方

案中,培养基为转染培养基。在另一个实施方案中,培养基还支持有效的转染和高细胞存活力。在某些实施方案中,将蛋白质和减少当转染时由蛋白质引起的低转染效率和 / 或低细胞存活力的一个或多个分子独立地添加至培养基中。在一个实施方案中,在与培养基的一种或多种其它成分混合之前处理蛋白质。在另一个实施方案中,通过首先由使血清白蛋白的浓缩溶液与一种或多种离子交换树脂接触,然后使一种或多种离子交换树脂从血清白蛋白的浓缩溶液中去处理血清白蛋白的浓缩溶液,并且然后将处理过的血清白蛋白的浓缩溶液添加至培养基的其它组分中来制备培养基。在另一个实施方案中,在将血清白蛋白的浓缩溶液添加至培养基的其它组分之前使血清白蛋白的浓缩溶液进一步与木炭接触。在还另一个实施方案中,首先使血清白蛋白的浓缩溶液与辛酸钠接触,然后升高到至少约 50℃ 的温度持续至少约 10 分钟,然后与一种或多种离子交换树脂接触,然后与活性炭接触,并且然后添加至培养基的其它组分中。

[0120] 现在已经发现,使用含有缓冲的盐溶液、氨基酸、胆固醇、氢化可的松以及血清白蛋白的培养基转染细胞可以产生有效的转染,并且使用基本上由缓冲的盐溶液、氨基酸、胰岛素、转铁蛋白、胆固醇、氢化可的松、血清白蛋白以及成纤维细胞生长因子组成的培养基转染细胞可以产生有效的转染和有效的重新编程。因此,某些实施方案涉及含有以下的转染培养基:缓冲的盐溶液、氨基酸、胆固醇、氢化可的松以及血清白蛋白。其它实施方案涉及基本上由以下组成和 / 或包含以下的转染培养基:缓冲的盐溶液、氨基酸、胰岛素、转铁蛋白、胆固醇、氢化可的松、血清白蛋白以及成纤维细胞生长因子。还其它的实施方案涉及基本上由以下组成和 / 或包含以下的重新编程培养基:缓冲的盐溶液、氨基酸、胰岛素、转铁蛋白、胆固醇、氢化可的松、血清白蛋白以及成纤维细胞生长因子。在一个实施方案中,培养基还包括聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯和 / 或 D- α -生育酚乙酸酯。在另一个实施方案中,培养基还包括例如约 1mg/L 与约 100mg/L 之间的浓度的抗坏血酸或抗坏血酸-2-磷酸酯。在一个实施方案中,氢化可的松以约 1 μ M 的浓度存在。在另一个实施方案中,成纤维细胞生长因子为碱性成纤维细胞生长因子,并且碱性成纤维细胞生长因子以约 1ng/mL 与约 200ng/mL 之间,如约 4ng/mL 与约 100ng/mL 之间、或约 10ng/mL 与约 50ng/mL 之间或约 20ng/mL 的浓度存在。在一个实施方案中,血清白蛋白为人血清白蛋白,并且人血清白蛋白以约 0.05% 与约 2% 之间,包括约 0.1% 与约 1% 之间,如约 0.5% 的浓度存在。在另一个实施方案中,人血清白蛋白为重组的。在又另一个实施方案中,胆固醇以约 4.5mg/L 的浓度存在。在一个实施方案中,培养基不含有任何动物来源的组分。在另一个实施方案中,培养基不含有任何未定义的组分,例如鱼肝油脂肪酸或血清。在一个实施方案中,培养基含有 TGF- β 抑制剂,例如 A83-01 或 SB431542。在一个实施方案中,TGF- β 抑制剂以约 0.1 μ M 与约 10 μ M 之间的浓度存在。在一个实施方案中,培养基含有 Wnt 信号传导激动剂,如 Wnt3a。在另一个实施方案中,Wnt 信号传导激动剂以约 10ng/mL 与约 500ng/mL 之间,包括约 50ng/mL 与约 200ng/mL 之间的浓度存在。在一个实施方案中,培养基含有硒来源,如亚硒酸钠。

[0121] 在某些情况下,用非动物来源和 / 或重组组分替换动物来源的组分可以是可取的,部分因为非动物来源和 / 或重组组分可以产生具有比动物来源的组分更高程度的一致性,并且部分因为非动物来源和 / 或重组组分携带比动物来源的组分更少的被毒性物质和 / 或致病物质污染的危险。因此,某些实施方案涉及为非动物来源和 / 或重组的蛋白质。其它实施方案涉及培养基,其中培养基的一些或所有组分为非动物来源和 / 或重组的。在一

个实施方案中,蛋白质为重组血清白蛋白。在另一个实施方案中,蛋白质为重组人血清白蛋白。在又一个实施方案中,蛋白质为重组血清白蛋白并且培养基的所有组分为非动物来源和/或重组的。

[0122] 血清白蛋白的 N-末端可以含有镍结合结构域和铜结合结构域,所述镍结合结构域和铜结合结构域可以是重要的抗原决定子。使天冬氨酸残基从血清白蛋白的 N-末端上缺失可以消除血清白蛋白的镍结合活性和铜结合活性,并且可以产生蛋白质的低过敏性变体。因此,某些实施方案涉及具有改良的结合特征和/或其它可取的特征如低过敏性蛋白质的蛋白质。在一个实施方案中,蛋白质为血清白蛋白,并且血清白蛋白缺乏 N-末端天冬氨酸。

[0123] 其它实施方案涉及用于转染细胞的方法。在一个实施方案中,用一种或多种核酸转染细胞,并且使用转染试剂(如基于脂质的转染试剂)进行转染。在一个实施方案中,一种或多种核酸包括至少一个 RNA 分子。在另一个实施方案中,用一种或多种核酸转染细胞,并且一种或多种核酸编码以下的至少一种:p53、TERT、细胞因子、分泌蛋白、膜结合蛋白、酶、基因编辑蛋白、染色质修饰蛋白、DNA 结合蛋白、转录因子、组蛋白脱乙酰酶、病原相关分子模式以及肿瘤相关抗原或其生物活性片段、类似物、变体或家族成员。在另一个实施方案中,重复地转染细胞,如在连续约 10 天期间至少约 2 次,或在连续约 7 天期间至少约 3 次,或在连续约 6 天期间至少约 4 次。

[0124] 可以通过用编码一种或多种重新编程因子的一种或多种核酸转染细胞,并且在支持重新编程细胞的培养基中培养细胞来进行重新编程。重新编程因子的实例包括但不限于:Oct4 蛋白、Sox2 蛋白、Klf4 蛋白、c-Myc 蛋白、l-Myc 蛋白、TERT 蛋白、Nanog 蛋白、Lin28 蛋白、Utlf1 蛋白、Aicda 蛋白、miR200 微小 RNA、miR302 微小 RNA、miR367 微小 RNA、miR369 微小 RNA 以及其生物活性片段、类似物、变体和家族成员。因此,某些实施方案涉及用于重新编程细胞的方法。在一个实施方案中,通过用编码一种或多种重新编程因子的一种或多种核酸转染细胞来重新编程细胞。在一个实施方案中,一种或多种核酸包括编码 Oct4 蛋白的 RNA 分子。在另一个实施方案中,一种或多种核酸还包括编码 Sox2 蛋白、Klf4 蛋白和 c-Myc 蛋白的一个或多个 RNA 分子。在又一个实施方案中,一种或多种核酸还包括编码 Lin28 蛋白的 RNA 分子。在一个实施方案中,细胞为人皮肤细胞,并且人皮肤细胞被重新编程为多能干细胞。在另一个实施方案中,细胞为人皮肤细胞,并且人皮肤细胞被重新编程为葡萄糖反应性胰岛素产生细胞。可以被重新编程的其它细胞和细胞可以被重新编程为其它细胞的其它细胞的实例包括但不限于:皮肤细胞、多能干细胞、间质干细胞、 β -细胞、视网膜色素上皮细胞、造血细胞、心脏细胞、气道上皮细胞、神经干细胞、神经元、神经胶质细胞、骨细胞、血细胞以及骨髓干细胞。在一个实施方案中,在支持重新编程细胞的培养基中培养细胞。在一个实施方案中,培养基还支持细胞。

[0125] 重要地,已经报道了用编码 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 的病毒感染皮肤细胞、组合在支持心肌细胞生长的培养基中培养细胞可引起皮肤细胞重新编程为心肌细胞,而没有首先将皮肤细胞重新编程为多能干细胞(参见 Efs 等 Nat Cell Biol. 2011;13:215-22,所述参考文献的内容特此以引用的方式并入)。在某些情况下,例如当产生个性化治疗剂时,直接重新编程(重新编程一种体细胞为另一种体细胞而没有首先重新编程体细胞为多能干细胞,又称为“转分化”)可以是可取的,部分因为培养多能干细胞会是耗时和昂贵的,在建

立和表征稳定的多能干细胞系中所涉及的额外处理可以携带增加的污染危险,并且与首先产生多能干细胞相关的培养中的额外时间可以携带增加的基因组不稳定性 and 获得突变的危险,包括点突变、拷贝数变化以及核型异常。因此,某些实施方案涉及用于重新编辑体细胞的方法,其中细胞被重新编程为体细胞,并且其中不产生被表征的多能干细胞系。

[0126] 用于通过用编码重新编程因子的 RNA 转染它们来重新编程细胞的先前报道的方法要求使用供给者。在许多情况下,供给者的使用可能不是可取的,部分因为供给者可能来源于动物或异源,并且可能因此携带免疫原性和被病原体污染的危险。现已经发现,本发明的培养基可以使不具有供给者的 RNA 重新编程实现。进一步发现根据本发明的方法重新编程细胞可以是快速、有效和可靠的,其中使细胞不与供给者接触。因此,某些实施方案涉及用于重新编程细胞的方法,其中使细胞不与供给者接触。

[0127] 现已经发现,当根据本发明的方法重新编程细胞时,重新编程效率可以与起始细胞密度相关。因此,某些实施方案涉及用于重新编程细胞的方法,其中以约 100 个细胞/cm²与约 100,000 个细胞/cm²之间的密度铺放细胞。在一个实施方案中,以约 100 个细胞/cm²与约 10,000 个细胞/cm²之间或约 2000 个细胞/cm²与约 20,000 个细胞/cm²之间或约 1000 个细胞/cm²与约 2000 个细胞/cm²之间的密度铺放细胞。

[0128] 进一步发现在某些情况下,根据本发明的方法重新编程细胞可以比根据其它方法要求更少的总转染。因此,某些实施方案涉及用于重新编程细胞的方法,其中在连续约 20 天期间进行约 2 次与约 12 次之间的转染,或在连续约 15 天期间进行约 4 次与约 10 次之间的转染,或在连续约 10 天期间进行约 4 次与约 8 次之间的转染。认识到当将核酸添加至其中培养细胞的培养基中时,细胞很可能会与多于一个核酸分子同时或在不同时间下接触和/或内化。因此,细胞可以与核酸接触多于一次,例如重复地,甚至当仅一次将核酸添加至其中培养细胞的培养基中时。

[0129] 供给者可以通过分泌分子如结合表面的胶原(“细胞粘附分子”)来促进细胞粘附至表面。细胞表面上的蛋白质(包括整联蛋白)可以结合这些细胞粘附分子,这可以产生粘附至表面的细胞。现已经发现,可以通过用一个或多个细胞粘附分子涂布表面来重新编程细胞,包括不具有供给者。进一步发现了细胞粘附分子纤连蛋白和玻连蛋白特别适用于这种目的。因此,某些实施方案涉及用于转染、重新编程和/或基因编辑细胞的方法,其中使细胞与接触一个或多个细胞粘附分子的表面接触。在一个实施方案中,一个或多个细胞粘附分子包括以下的至少一种:聚-L-赖氨酸、聚-L-鸟氨酸、RGD 肽、纤连蛋白、玻连蛋白、胶原以及层粘连蛋白或其生物活性片段、类似物、变体或家族成员。在另一个实施方案中,一个或多个细胞粘附分子为纤连蛋白或其生物活性片段。在又一个实施方案中,纤连蛋白为重组的。在还另一个实施方案中,一个或多个细胞粘附分子为纤连蛋白和玻连蛋白或其生物活性片段的混合物。在另一个实施方案中,纤连蛋白和玻连蛋白各以约 100ng/cm²的浓度存在于表面上和/或以约 1μg/mL 的浓度存在于用来涂布表面的溶液中。在又一个实施方案中,纤连蛋白和玻连蛋白均是重组的。使表面与一个或多个细胞粘附分子接触可以作为独立步骤进行和/或通过将一个或多个细胞粘附分子包括在培养基中。

[0130] 值得注意的是,核酸可以含有一个或多个非规范或“修饰的”残基(例如除了腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶以及胞嘧啶以外的残基或其标准核苷、核苷酸、脱氧核苷或脱氧核苷酸衍生物)。特别值得注意的是,假尿苷-5'-三磷酸可以在体外转录反应中取代尿

苷-5'-三磷酸以产生合成 RNA, 其中合成 RNA 的高达至 100% 的尿苷残基可以被假尿苷残基替换。体外转录可以产生具有残留免疫原性的 RNA, 甚至当假尿苷和 5-甲基胞苷分别完全取代尿苷和胞苷时 (参见 Angel Reprogramming Human Somatic Cells to Pluripotency Using RNA [Doctoral Thesis]. Cambridge, MA: MIT; 2011, 所述参考文献的内容特此以引用的方式并入)。出于这个原因, 当用 RNA 转染细胞时, 将免疫抑制剂添加至转染培养基中是常见的。在某些情况下, 将免疫抑制剂添加至转染培养基中可能不是可取的, 部分因为最常见用于这个目的的重组免疫抑制剂 B18R 会是昂贵的并且难以制造。现在已经发现, 可以根据本发明的方法而不使用 B18R 或任何其它免疫抑制剂转染和 / 或重新编程细胞。进一步发现了根据本发明的方法不使用免疫抑制剂重新编程细胞可以是快速、有效和可靠的。因此, 某些实施方案涉及用于转染细胞的方法, 其中转染培养基不含有免疫抑制剂。其它实施方案涉及用于重新编程细胞的方法, 其中转染培养基不含有免疫抑制剂。在某些情况下, 例如当使用高细胞密度时, 将免疫抑制剂添加至转染培养基中可以是有益的。因此, 某些实施方案涉及用于转染细胞的方法, 其中转染培养基含有免疫抑制剂。其它实施方案涉及用于重新编程细胞的方法, 其中转染培养基含有免疫抑制剂。在一个实施方案中, 免疫抑制剂为 B18R 或其生物活性片段、类似物、变体或家族成员或地塞米松或其衍生物。在一个实施方案中, 以小于约 20,000 个细胞 / cm² 的密度铺放细胞, 并且转染培养基不含有免疫抑制剂。在另一个实施方案中, 转染培养基不含有免疫抑制剂, 并且选择核酸剂量以防止过量毒性。在还另一个实施方案中, 核酸剂量为 6 孔板的小于 2 μg / 孔, 如 6 孔板的约 0.25 μg / 孔或 6 孔板的约 1 μg / 孔。

[0131] 根据本发明的某些实施方案产生的重新编程细胞适合用于治疗应用, 包括当它们不含有外源 DNA 序列时移植到患者中, 并且它们不暴露于动物来源或人来源的产品中, 所述产品可以是未定义的, 并且所述产品可以含有毒性污染物和 / 或致病污染物。此外, 本发明的某些实施方案的高速度、效率和可靠性可以减少获得和积累突变和其它染色体异常的危险。本发明的某些实施方案可以因此用来产生具有适合在治疗应用中使用的安全性特征的细胞。例如, 使用本发明的 RNA 和培养基重新编程细胞 (其中培养基不含有动物来源或人来源的组分) 可以产生尚未暴露于异源材料的细胞。因此, 某些实施方案涉及具有可取的安全性特征的重新编程细胞。在一个实施方案中, 重新编程细胞具有正常核型。在另一个实施方案中, 相对于患者基因组, 重新编程细胞具有小于约 5 个拷贝数变化 (CNV), 如相对于患者基因组小于约 3 个拷贝数变化, 或相对于患者基因组没有拷贝数变化。在又另一个实施方案中, 相对于患者基因组, 重新编程细胞在编码区具有正常核型和小于约 100 个单核苷酸变体, 或相对于患者基因组在编码区中具有小于约 50 个单核苷酸变体, 或相对于患者基因组在编码区中具有小于约 10 个单核苷酸变体。

[0132] 内毒素和核酸酶可以共同纯化和 / 或变为与其它蛋白质 (如血清白蛋白) 缔合。具体来说重组蛋白可以经常具有高水平的缔合内毒素和核酸酶, 部分由于在它们的产生过程中发生的细胞溶解。可以通过本发明的许多方法减少、去除、替换或以另外的方式灭活内毒素和核酸酶, 所述方法包括例如通过乙酰化; 通过添加稳定剂如辛酸钠, 接着通过热处理; 通过将核酸酶抑制剂添加至白蛋白溶液和 / 或培养基中; 通过结晶; 通过与一种或多种离子交换树脂接触; 通过与木炭接触; 通过制备型电泳或通过亲和色谱法。现在已经发现, 使内毒素和 / 或核酸酶从培养基和 / 或从培养基的一种或多种组分中部分或完全减少、去除、

替换或以另外的方式灭活可以增加针对可以被转染和重新编程的细胞的效率。因此,某些实施方案涉及用于使用一种或多种核酸转染细胞的方法,其中处理转染培养基以部分或完全减少、去除、替换或以另外的方式灭活一种或多种内毒素和/或核酸酶。其它实施方案涉及引起核酸最小程度降解的培养基。在一个实施方案中,培养基含有小于约 1EU/mL、或小于约 0.1EU/mL 或小于约 0.01EU/mL。

[0133] 在某些情况下,基于蛋白质的脂质载体如血清白蛋白可以被基于非蛋白质的脂质载体如甲基-β-环糊精替换。本发明的培养基还可以在沒有脂质载体的情况下使用,例如当使用可以不要求或可以不获益于脂质载体存在的方法,例如使用一种或多种基于聚合物的转染试剂或基于肽的转染试剂进行转染时。

[0134] 许多蛋白质缔合分子(如金属)可以是对细胞高度毒性的。这种毒性可以引起培养的存活力降低以及获得突变。因此,某些实施方案具有产生不含毒性分子的细胞的额外益处。

[0135] 可以通过将蛋白质悬浮在溶液中并且测量溶液的电导率来测量蛋白质的缔合分子组分。因此,某些实施方案涉及含有蛋白质的培养基,其中 10% 的蛋白质水溶液的电导率为小于约 500 μmho/cm。在一个实施方案中,溶液的电导率为小于约 50 μmho/cm。

[0136] 低氧环境可以有益于许多类型的细胞的培养。因此,某些实施方案涉及用于培养、转染、重新编程和/或基因编辑细胞的方法,其中在低氧环境中培养、转染、重新编程和/或基因编辑细胞。在一个实施方案中,低氧环境含有约 2% 与约 10% 之间的氧气、或约 4% 与约 6% 之间的氧气。

[0137] 可以增加递送至细胞的核酸的量以增加核酸的希望的作用。然而,增加递送至细胞的核酸的量超过某一点会引起细胞的存活力降低,部分由于转染试剂的毒性。现已经发现,当将核酸递送至处于固定体积的一群细胞(例如,处于组织的区中的细胞或生长在细胞培养容器中的细胞)时,递送至各细胞的核酸的量可以取决于递送至细胞群的核酸的总量和细胞的密度,其中更高的细胞密度导致递送至各细胞的核酸更少。在某些实施方案中,使用一种或多种核酸转染细胞多于一次。在某些条件下,例如当细胞正在增殖时,细胞密度可能在一次转染至下一次转染之间变化。因此,某些实施方案涉及用于使用核酸转染细胞的方法,其中转染细胞多于一次,并且其中对于两次转染而言递送至细胞的核酸的量不同。在一个实施方案中,细胞在两次转染之间增殖,并且对于两次转染的第二次而言递送至细胞的核酸的量比对于两次转染的第一次而言更大。在另一个实施方案中,转染细胞多于两次,并且对于三次转染的第二次而言递送至细胞的核酸的量比对于相同的三次转染的第一次而言更大,并且对于相同的三次转染的第三次而言递送至细胞的核酸的量比对于相同的三次转染的第二次而言更大。在又一个实施方案中,转染细胞多于一次,并且对于至少两次连续的转染而言,在每次转染过程中递送至细胞的核酸的最大量足够低以产生至少约 80% 存活力。

[0138] 现已经发现,调节一系列转染中的递送至一群增殖细胞的核酸的量可以导致核酸的作用增加和细胞的存活力增加。进一步发现在某些情况下,当在一系列转染中使细胞与编码一种或多种重新编程因子的一种或多种核酸接触时,重新编码的效率可以对于一系列转染的至少部分而言当在后面的转染中递送的核酸的量大于在前面的转染中递送的核酸的量时有所增加。因此,某些实施方案涉及用于重新编程细胞的方法,其中在一系列转染中

将一种或多种核酸重复地递送至细胞,并且对于至少一次后面的转染而言递送至细胞的核酸的量比对于至少一次前面的转染而言更大。在一个实施方案中,转染细胞约 2 次与约 10 次之间,或约 3 次与约 8 次之间,或约 4 次与约 6 次之间。在另一个实施方案中,一种或多种核酸包括至少一个 RNA 分子,转染细胞约 2 次与约 10 次之间,并且在每次转染中递送至细胞的核酸的量与先前最近转染中递送至细胞的核酸的量相同或比其更大。在又一个实施方案中,在第一次转染中递送至细胞的核酸的量为约 20ng/cm²与约 250ng/cm²、或 100ng/cm²与 600ng/cm²之间。在又一个实施方案中,在约 12 小时与约 48 小时之间的间隔下转染细胞约 5 次,并且对于第一次转染而言递送至细胞的核酸的量为约 25ng/cm²,对于第二次转染而言约 50ng/cm²,对于第三次转染而言约 100ng/cm²,对于第四次转染而言约 200ng/cm²,并且对于第五次转染而言约 400ng/cm²。在又一个实施方案中,在第五次转染之后进一步转染细胞至少一次,并且递送至细胞的核酸的量为约 400ng/cm²。

[0139] 某些实施方案涉及用于使用核酸转染细胞的方法,其中通过测量细胞密度并且基于细胞密度的测量选择核酸的量来转染而确定核酸的量。在一个实施方案中,细胞存在于体外培养物中,并且通过光学装置测量细胞密度。在另一个实施方案中,重复地转染细胞,细胞密度在两次转染之间有所增加,并且对于两次转染的第二次而言转染的核酸的量比对于两次转染的第一次而言更大。

[0140] 现在已经发现在某些情况下,在本发明的培养基中培养的细胞的转染效率和存活力可以通过调节培养基来改进。因此,某些实施方案涉及用于调节培养基的方法。其它实施方案涉及被调节的培养基。在一个实施方案中,供给者为成纤维细胞,并且培养基被调节大约 24 小时。其它实施方案涉及用于转染细胞的方法,其中转染培养基被调节。其它实施方案涉及用于重新编程和/或基因编辑细胞的方法,其中培养基被调节。在一个实施方案中,有丝分裂灭活供给者,例如通过暴露于化学品如丝裂霉素-C 或通过暴露于 γ 射线。在某些实施方案中,仅使用自体材料以部分地(例如并且不希望受理论约束)避免从供给者至细胞的疾病传播的危险可以是有益的。因此,某些实施方案涉及用于转染细胞的方法,其中转染培养基被调节,并且其中供给者来源于与被转染的细胞相同的个体。其它实施方案涉及用于重新编程和/或基因编辑细胞的方法,其中培养基被调节,并且其中供给者来源于与被重新编程和/或基因编辑的细胞相同的个体。

[0141] 可以通过调节将若干分子添加至培养基中。因此,某些实施方案涉及补充有存在于调节的培养基中的一个或多个分子的培养基。在一个实施方案中,培养基补充有 Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt3a 或其生物活性片段、类似物、变体、激动剂或家族成员。在另一个实施方案中,培养基补充有 TGF- β 或其生物活性片段、类似物、变体、激动剂或家族成员。在又一个实施方案中,根据本发明的方法重新编程细胞,其中培养基没有在约 1 天与约 5 天之间补充 TGF- β ,并且然后在至少约 2 天补充 TGF- β 。在又一个实施方案中,培养基补充有 IL-6、IL-6R 或其生物活性片段、类似物、变体、激动剂或家族成员。在又一个实施方案中,培养基补充有鞘脂或脂肪酸。在又一个实施方案中,鞘脂为溶血磷脂酸、溶血神经鞘氨酯(lysosphingomyelin)、鞘氨醇-1-磷酸酯或其生物活性类似物、变体或衍生物。

[0142] 除了有丝分裂灭活细胞之外,在某些条件下,辐射可以改变细胞的基因表达,引起细胞产生更少的某些蛋白质和更多的非辐射细胞的某些其它蛋白质,例如蛋白质的 Wnt 家族的成员。另外,蛋白质的 Wnt 家族的某些成员可以促进细胞的生长和转化。现在已经发现

在某些情况下,可以通过使细胞与使用辐射过的供给者代替丝裂霉素 -c 处理过的供给者调节的培养基接触来极大地增加 RNA 重新编程的效率。进一步发现,当使用辐射过的供给者时观察到的重新编程效率的增加部分地由供给者分泌的 Wnt 蛋白引起。因此,某些实施方案涉及用于重新编程细胞的方法,其中使细胞与 Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt3a 或其生物活性片段、类似物、变体、家族成员或激动剂接触,包括 Wnt 蛋白的下游靶标的激动剂和 / 或模拟 Wnt 蛋白的一种或多种生物作用的试剂,例如 2-氨基-4-[3,4-(亚甲基二氧基)苄基氨基]-6-(3-甲氧基苯基)嘧啶。

[0143] 现在已经发现本发明的培养基可以用来维持培养的细胞,包括成纤维细胞和人多能干细胞(即,作为“维持培养基”)。因此,某些实施方案涉及用作维持培养基的培养基。在一个实施方案中,培养基不含有任何人来源的组分。在另一个实施方案中,培养基被化学定义。

[0144] 由于许多基于 DNA 的重新编程方法的低效率,这些方法可能难以或不可能与来源于患者样品的细胞一起使用,所述患者样品可能仅含有少量的细胞。相比之下,本发明的某些实施方案的高效率可以允许从少量的细胞中(包括从单细胞中)进行可靠的重新编程。某些实施方案可以因此用来重新编程来自活组织检查样品的细胞,包括不需要首先建立大型培养。在某些情况下(例如当产生个性化治疗剂时)直接从活组织检查中重新编程细胞可以是可取的,部分因为建立原代细胞的大型培养会可能是耗时的,在建立大型培养中涉及的额外处理可以携带增加的污染危险,并且培养的额外时间可以携带增加的基因组不稳定性 and 获得突变的危险,包括点突变、拷贝数变化以及核型异常。因此,某些实施方案涉及用于通过首先从患者或从活组织检查样品中收获细胞并且然后重新编程细胞来重新编程细胞的方法。在一个实施方案中,在没有首先建立大型培养的情况下重新编程细胞,优选地在培养物传代多于两次之前进行第一次转染。在另一个实施方案中,从患者中收获细胞,并且在离第一次铺放细胞的时间不多于约 14 天之后进行第一次转染。在又一个实施方案中,从活组织检查样品中收获细胞,并且在离第一次铺放细胞的时间不多于约 7 天之后进行第一次转染。在又一个实施方案中,活组织检查是全厚度皮穿孔活组织检查,通过用一种或多种酶处理来从活组织检查样品中收获细胞,将细胞铺放在被一个或多个细胞粘附分子涂布的表面上和 / 或将细胞铺放在含有细胞粘附分子的培养基中,用包含至少一个 RNA 分子的一种或多种核酸转染细胞,并且在离第一次铺放细胞的时间不多于约 14 天之后进行第一次转染。在又一个实施方案中,酶为胶原酶。在又一个实施方案中,胶原酶为无动物组分。在另一个实施方案中,胶原酶以约 0.1mg/mL 与约 10mg/mL 之间、或约 0.5mg/mL 与约 5mg/mL 之间的浓度存在。在又一个实施方案中,从血液中收获细胞。在又一个实施方案中,将细胞铺放在含有来源于患者的血液的一种或多种蛋白质的培养基中。在又一个实施方案中,将细胞铺放在 DMEM/F12+2mM L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺+约 5%与约 25%之间的患者来源的血清或约 10%与约 20%之间的患者来源的血清或约 20%患者来源的血清中。

[0145] 现在已经发现在某些情况下,使用本发明的培养基用编码 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 的 RNA 的混合物转染细胞可以引起细胞的增殖速率增加。当递送至细胞的 RNA 的量太低而不能确保所有细胞被转染时,仅一部分细胞可以示出增加的增殖速率。在某些情况下,如当产生个性化治疗剂时,增加细胞的增殖速率可以是可取的,部分因为这样做可以减少产生

治疗剂所必要的时间,并且因此可以减少治疗剂的成本。因此,某些实施方案涉及用于使用编码 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 的 RNA 的混合物转染细胞的方法,其中细胞展现出增加的增殖速率。在一个实施方案中,从培养物中分离出增加的增殖速率的细胞。在另一个实施方案中,使示出增加的增殖速率的细胞在支持一种或多种细胞类型的生长的培养基中扩增和培养,并且重新编程为具有所述一种或多种细胞类型之一的细胞。

[0146] 许多疾病与一种或多种突变相关。通过使细胞与编码蛋白质的核酸接触来校正突变,所述蛋白质单独或与其它分子组合校正突变(基因编辑的实例)。此类蛋白质的实例包括:锌指核酸酶和 TALEN。因此,某些实施方案涉及用于使用核酸转染细胞的方法,其中核酸编码蛋白质,所述蛋白质单独或与其它分子组合而在 DNA 分子中产生单链或双链断裂。在一个实施方案中,蛋白质为锌指核酸酶或 TALEN。在另一个实施方案中,核酸为 RNA 分子。在又一个实施方案中,单链或双链断裂处于选自以下组的基因的转录起始位点的约 5,000,000 个碱基内:CCR5、CXCR4、GAD1、GAD2、CFTR、HBA1、HBA2、HBB、HBD、FANCA、XPA、XPB、XPC、ERCC2、POLH、HTT、DMD、SOD1、APOE、PRNP、BRCA1 和 BRCA2 或其类似物、变体或家族成员。在又一个实施方案中,通过在单链或双链断裂的区中引起 DNA 序列的插入或通过在单链或双链断裂的区中引起 DNA 序列以另外方式改变来使用用作修复模板的核酸转染细胞。在又一个实施方案中,重新编程细胞,并且随后基因编辑细胞。在又一个实施方案中,基因编辑细胞,并且随后重新编程细胞。在又一个实施方案中,在彼此约 7 天之内进行基因编辑和重新编程。在又一个实施方案中,同时或在同一天发生基因编辑和重新编程。在又一个实施方案中,细胞为皮肤细胞,皮肤细胞被基因编辑以破坏 CCR5 基因,皮肤细胞被重新编程为造血干细胞,因此产生用于 HIV/AIDS 的治疗剂,并且将治疗剂引入到患有 HIV/AIDS 的患者中。在又一个实施方案中,皮肤细胞来源于治疗剂被引入其中的相同患者。

[0147] 可以根据本发明的方法编辑以产生本发明的治疗剂的基因包括可以被编辑以恢复正常功能的基因以及可以被编辑以减少或消除功能的基因。此类基因包括,但不限于:β 珠蛋白(HBB),在其中的突变可以引起镰状细胞疾病(SCD)和β-地中海贫血;早发性乳癌 1(BRCA1)和早发性乳癌 2(BRCA2),在其中的突变可以增加对乳癌的易感性;C-C 趋化因子受体 5(CCR5)和 C-X-C 趋化因子受体 4(CXCR4),在其中的突变可以赋予 HIV 感染抗性;囊性纤维化跨膜传导调控因子(CFTR),在其中的突变可以引起囊性纤维化;肌营养不良蛋白(DMD)、在其中的突变可以引起肌营养不良(包括假肥大型肌营养不良和贝克氏肌营养不良);谷氨酸脱羧酶 1 和谷氨酸脱羧酶 2(GAD 1、GAD2),在其中的突变可以防止β-细胞的自身免疫破坏;血红蛋白 α 1、血红蛋白 α 2 和血红蛋白 δ(HBA1、HBA2 和 HBD),在其中的突变可以引起地中海贫血;亨廷顿病(HTT),在其中的突变可以引起亨廷顿氏病;超氧化物歧化酶 1(SOD1),在其中的突变可以引起肌萎缩性侧索硬化(ALS);XPA、XPB、XPC、XPD(ERCC6)和聚合酶(DNA 指导的),η(POLH),在其中的突变可以引起着色性干皮病;富含亮氨酸的重复激酶 2(LRRK2),在其中的突变可以引起帕金森氏病和范科尼贫血;互补组 A、B、C、D1、D2、E、F、G、I、J、L、M、N、P(FANCA、FANCB、FANCC、FANCD1、FANCD2、FANCE、FANCF、FANCG、FANCI、FANCJ、FANCL、FANCM、FANCN、FANCP)以及 RAD51 同系物 C(酿酒酵母(*S. cerevisiae*))(RAD51C),在其中的突变可以引起范科尼贫血。

[0148] 某些实施方案涉及治疗剂,其包含编码一种或多种基因编辑蛋白的核酸。其它实

施方案涉及治疗剂,其包含根据本发明的方法转染、重新编程和 / 或基因编辑的一个或多个细胞。在一个实施方案中,细胞被转染、重新编程和 / 或基因编辑,并且转染、重新编程和 / 或基因编辑的细胞被引入到患者中。在另一个实施方案中,从转染、重新编程和 / 或基因编辑的细胞被引入其中的相同患者中收获细胞。可以使用本发明的治疗剂治疗的疾病的实例包括,但不限于:阿尔茨海默氏病、脊髓损伤、肌萎缩性侧索硬化、囊性纤维化、心脏病(包括缺血性和扩张性心肌病)、黄斑变性、帕金森氏病、亨廷顿氏病、糖尿病、镰状细胞贫血、地中海贫血、范科尼贫血、着色性干皮病、肌营养不良、重度联合免疫缺陷、遗传性感觉神经病、癌症以及 HIV/AIDS。在某些实施方案中,治疗剂包含化妆品。在一个实施方案中,从患者中收获细胞,将细胞重新编程和扩增为大量的脂肪细胞,因此产生化妆品,并且将化妆品引入到患者中。在还另一个实施方案中,化妆品用于组织重建。

[0149] 当本文提供产生具体类型的细胞和产生包含具体类型的细胞的治疗剂的详细实例时,应该认识到本发明的方法可以例如通过根据本发明的方法重新编程细胞并且通过提供与形成期间存在于细胞微环境中的条件类似的条件在模拟形成的一个或多个方面的条件下培养细胞而用来产生许多其它类型的细胞和产生包含一种或多种许多其它类型的细胞的治疗剂。

[0150] 某些实施方案涉及具有各种各样人白细胞抗原 (HLA) 类型的细胞文库 (“HLA- 匹配的文库”)。HLA- 匹配的文库可以是有益的,部分因为它可以提供快速产生和 / 或分布治疗剂而不会使患者必须等待从患者的细胞中产生的治疗剂。这样一种文库可以是对心脏病和血液和 / 或免疫系统的疾病的治疗特别有益的,针对这些疾病患者可以受益于立即获得治疗剂。

[0151] 某些实施方案涉及用于组织 / 器官建模和 / 或疾病建模的细胞。在一个实施方案中,使皮肤细胞重新编程和扩增为大量的心脏细胞,并且心脏细胞用于针对心脏毒性筛选生物活性分子 (安全性测试的实例)。在另一个实施方案中,使来自患有阿尔茨海默氏病的患者的皮肤细胞重新编程和扩增为大量的皮层神经元,并且皮层神经元用于筛选减少不溶性斑块积累的生物活性分子 (效力测试的实例)。因此,本发明的某些实施方案有助于安全性测试和 / 或效力测试。

[0152] 某些实施方案涉及用于包裹细胞和 / 或使细胞种植在支架中的方法,并且涉及包裹的细胞和 / 或种植在支架中的细胞。在某些情况下,包裹细胞可以是有益的,部分因为包裹的细胞可以是比未包裹的细胞免疫原性小。在一个实施方案中,细胞被重新编程为葡萄糖反应性胰岛素产生细胞,将葡萄糖反应性胰岛素产生细胞包裹在如海藻酸盐的材料中,并且将包裹的葡萄糖反应性胰岛素产生细胞引入到患有 1 型糖尿病的患者中。在另一个实施方案中,引入是通过腹膜内注射或门脉内注射。在某些情况下,使细胞种植在支架中可以是有益的,部分因为支架可以提供机械稳定性。在一个实施方案中,使细胞重新编程和扩增为大量的成纤维细胞和角质化细胞,使成纤维细胞和角质化细胞种植在包含胶原的支架中,并且将所种植的支架涂敷于伤口上,形成合成皮肤移植物。在另一个实施方案中,重新编程细胞,将重新编程的细胞与呈液体或泥浆形式的支架混合,将混合物引入到患者中,并且在引入时或引入后支架的硬度增加。

[0153] 某些实施方案涉及用于纯化细胞的方法。转染、重新编程和基因编辑可以经常产生细胞群,所述细胞群包括具有希望的表型的细胞和具有一种或多种不希望的表型的细

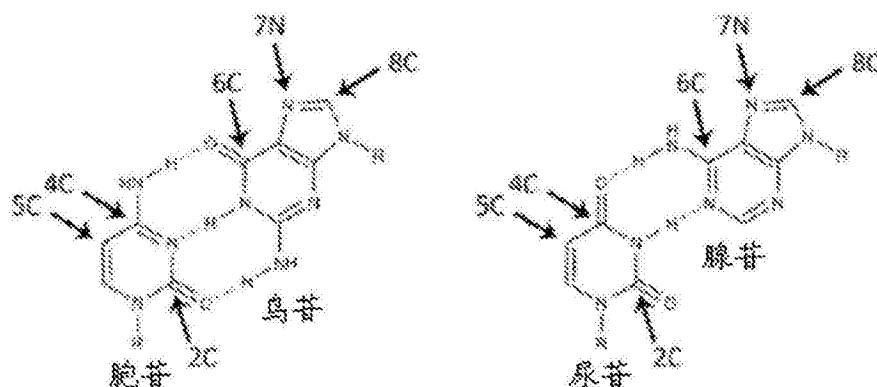
胞。因此,某些实施方案涉及用于纯化转染的细胞、重新编程的细胞和 / 或基因编辑的细胞的方法。在一个实施方案中,使用密度梯度纯化细胞。在另一个实施方案中,通过使细胞与允许具有一种或多种希望的表型的细胞与具有一种或多种不希望的表型的细胞分离的一种或多种抗体接触的来纯化细胞。在另一个实施方案中,抗体与基底结合,优选地磁珠。在又一个实施方案中,抗体与荧光分子结合,并且通过荧光激活细胞分选法 (FACS) 或其它类似方式进行分离。在另一个实施方案中,优选地通过使细胞与防止细胞分裂的一个或多个分子接触来防止具有不希望的表型的细胞增殖,所述分子优选地丝裂霉素 -c、5- 氮杂 - 脱氧胞苷、氟尿嘧啶或其生物活性类似物或衍生物。其它实施方案涉及包含被纯化以富集具有一种或多种希望的表型的细胞级分的细胞的治疗剂。

[0154] 某些实施方案涉及用于产生动物模型的方法,所述模型包括突变和疾病的模型。在一个实施方案中,基因编辑动物皮肤细胞并且重新编程为多能干细胞。在另一个实施方案中,将约 1 至 100 个重新编程和基因编辑的细胞注射到胚泡中,并且将胚泡植入到动物的子宫角中。在一个实施方案中,动物选自以下组:猫、狗、小鼠、猪、马、奶牛、鸡、绵羊、山羊、鱼、灵长类动物以及大鼠。在另一个实施方案中,动物为大鼠。

[0155] 当并入到合成 RNA 分子中时,某些非规范核苷酸可以部分地通过干扰检测外源核酸的蛋白质(例如蛋白激酶 R、Rig-1 和蛋白质的寡腺苷酸合成酶家族)的结合来减少合成 RNA 分子的毒性。已经报道的当并入其中时减少合成 RNA 分子的毒性的非规范核苷酸包括:假尿苷、5- 甲基尿苷、2- 硫代尿苷、5- 甲基胞苷、N6- 甲基腺苷以及其某些组合。然而,可以使它们能够实现降低合成 RNA 分子的毒性的非规范核苷酸的化学特征直到此时仍未知。此外,并入大量的大多数非规范的核苷酸(例如,5- 甲基尿苷、2- 硫代尿苷、5- 甲基胞苷以及 N6- 甲基腺苷)可以减少合成 RNA 分子可以翻译成蛋白质的效率,在要求蛋白质表达的应用中限制含有这些核苷酸的合成 RNA 分子的效用。另外,虽然在合成 RNA 分子中假尿苷可以完全取代尿苷而没有减少合成 RNA 分子可以翻译成蛋白质的效率,但是在某些情况下,例如当进行频繁的重复转染时,仅含有腺苷、鸟苷、胞苷和假尿苷的合成 RNA 分子可以展现过量的毒性。

[0156] 现在已经发现,含有在嘧啶的情况下在 2C 和 / 或 4C 和 / 或 5C 位置上或在嘌呤的情况下在 6C 和 / 或 7N 和 / 或 8C 位置上包括一个或多个取代的一个或多个非规范核苷酸的合成 RNA 分子可以比仅含有规范核苷酸的合成 RNA 分子毒性小,部分由于这些位置上的取代干扰由检测外源核酸的蛋白质识别合成 RNA 分子的能力,并且此外,在这些位置上的取代可以对合成 RNA 分子可以翻译成蛋白质的效率具有最小的影响,部分由于缺乏在这些位置上的取代与碱基配对和碱基堆积相互作用的干扰。

[0157]



[0158] 在嘧啶的情况下在 2C 和 / 或 4C 和 / 或 5C 位置上或在嘌呤的情况下在 6C 和 / 或 7N 和 / 或 8C 位置上包括一个或多个取代的非规范核苷酸的实例包括,但不限于 :2- 硫代尿苷、5- 氮杂尿苷、假尿苷、4- 硫代尿苷、5- 甲基尿苷、5- 氨基尿苷、5- 羟基尿苷、5- 甲基 -5- 氮杂尿苷、5- 氨基 -5- 氮杂尿苷、5- 羟基 -5- 氮杂尿苷、5- 甲基假尿苷、5- 氨基假尿苷、5- 羟基假尿苷、4- 硫代 -5- 氮杂尿苷、4- 硫代假尿苷、4- 硫代 -5- 甲基尿苷、4- 硫代 -5- 氨基尿苷、4- 硫代 -5- 羟基尿苷、4- 硫代 -5- 甲基 -5- 氮杂尿苷、4- 硫代 -5- 氨基 -5- 氮杂尿苷、4- 硫代 -5- 羟基 -5- 氮杂尿苷、4- 硫代 -5- 甲基假尿苷、4- 硫代 -5- 氨基假尿苷、4- 硫代 -5- 羟基假尿苷、2- 硫代胞苷、5- 氮杂胞苷、假异胞苷、N4- 甲基胞苷、N4- 氨基胞苷、N4- 羟基胞苷、5- 甲基胞苷、5- 氨基胞苷、5- 羟基胞苷、5- 甲基 -5- 氮杂胞苷、5- 氨基 -5- 氮杂胞苷、5- 羟基 -5- 氮杂胞苷、5- 甲基假异胞苷、5- 氨基假异胞苷、5- 羟基假异胞苷、N4- 甲基 -5- 氮杂胞苷、N4- 甲基假异胞苷、2- 硫代 -5- 氮杂胞苷、2- 硫代假异胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基胞苷、2- 硫代 -N4- 氨基胞苷、2- 硫代 -N4- 羟基胞苷、2- 硫代 -5- 甲基胞苷、2- 硫代 -5- 氨基胞苷、2- 硫代 -5- 羟基胞苷、2- 硫代 -5- 甲基 -5- 氮杂胞苷、2- 硫代 -5- 氨基 -5- 氮杂胞苷、2- 硫代 -5- 羟基 -5- 氮杂胞苷、2- 硫代 -5- 甲基假异胞苷、2- 硫代 -5- 氨基假异胞苷、2- 硫代 -5- 羟基假异胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基 -5- 氮杂胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基假异胞苷、N4- 甲基 -5- 甲基胞苷、N4- 甲基 -5- 氨基胞苷、N4- 甲基 -5- 羟基胞苷、N4- 甲基 -5- 甲基 -5- 氮杂胞苷、N4- 甲基 -5- 氨基 -5- 氮杂胞苷、N4- 甲基 -5- 羟基 -5- 氮杂胞苷、N4- 甲基 -5- 甲基假异胞苷、N4- 甲基 -5- 氨基假异胞苷、N4- 甲基 -5- 羟基假异胞苷、N4- 氨基 -5- 氮杂胞苷、N4- 氨基假异胞苷、N4- 氨基 -5- 甲基胞苷、N4- 氨基 -5- 氨基胞苷、N4- 氨基 -5- 羟基胞苷、N4- 氨基 -5- 甲基 -5- 氮杂胞苷、N4- 氨基 -5- 氨基 -5- 氮杂胞苷、N4- 氨基 -5- 羟基 -5- 氮杂胞苷、N4- 氨基 -5- 甲基假异胞苷、N4- 氨基 -5- 氨基假异胞苷、N4- 氨基 -5- 羟基假异胞苷、N4- 羟基 -5- 氮杂胞苷、N4- 羟基假异胞苷、N4- 羟基 -5- 甲基胞苷、N4- 羟基 -5- 氨基胞苷、N4- 羟基 -5- 羟基胞苷、N4- 羟基 -5- 甲基 -5- 氮杂胞苷、N4- 羟基 -5- 氨基 -5- 氮杂胞苷、N4- 羟基 -5- 羟基 -5- 氮杂胞苷、N4- 羟基 -5- 甲基假异胞苷、N4- 羟基 -5- 氨基假异胞苷、N4- 羟基 -5- 羟基假异胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基 -5- 甲基胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基 -5- 氨基胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基 -5- 羟基胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基 -5- 甲基 -5- 氮杂胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基 -5- 氨基 -5- 氮杂胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基 -5- 羟基 -5- 氮杂胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基 -5- 甲基假异胞苷、2- 硫代 -N4- 甲基 -5- 氨基假异胞苷、2- 硫代 -N4- 氨基 -5- 氮杂胞苷、2- 硫代 -N4- 氨基假异胞苷、2- 硫代 -N4- 氨基 -5- 甲基胞苷、2- 硫代 -N4- 氨基 -5- 氨基胞苷、2- 硫代 -N4- 氨基 -5- 羟基胞苷、2- 硫代 -N4- 氨基 -5- 甲基 -5- 氮杂胞苷、2- 硫代 -N4- 氨基 -5- 氨基 -5- 氮杂胞苷、

基-5-氨基-5-氮杂胞苷、2-硫代-N4-氨基-5-羟基-5-氮杂胞苷、2-硫代-N4-氨基-5-甲基假异胞苷、2-硫代-N4-氨基-5-氨基假异胞苷、2-硫代-N4-氨基-5-羟基假异胞苷、2-硫代-N4-羟基-5-氮杂胞苷、2-硫代-N4-羟基假异胞苷、2-硫代-N4-羟基-5-甲基胞苷、N4-羟基-5-氨基胞苷、2-硫代-N4-羟基-5-羟基胞苷、2-硫代-N4-羟基-5-甲基-5-氮杂胞苷、2-硫代-N4-羟基-5-氨基-5-氮杂胞苷、2-硫代-N4-羟基-5-羟基-5-氮杂胞苷、2-硫代-N4-羟基-5-甲基假异胞苷、2-硫代-N4-羟基-5-氨基假异胞苷、2-硫代-N4-羟基-5-羟基假异胞苷、N6-甲基腺苷、N6-氨基腺苷、N6-羟基腺苷、7-脱氮杂腺苷、8-氮杂腺苷、N6-甲基-7-脱氮杂腺苷、N6-甲基-8-氮杂腺苷、7-脱氮杂-8-氮杂腺苷、N6-甲基-7-脱氮杂-8-氮杂腺苷、N6-氨基-7-脱氮杂腺苷、N6-氨基-8-氮杂腺苷、N6-氨基-7-脱氮杂-8-氮杂腺苷、N6-羟基腺苷、N6-羟基-7-脱氮杂腺苷、N6-羟基-8-氮杂腺苷、N6-羟基-7-脱氮杂-8-氮杂腺苷、6-硫代鸟苷、7-脱氮杂鸟苷、8-氮杂鸟苷、6-硫代-7-脱氮杂鸟苷、6-硫代-8-氮杂鸟苷、7-脱氮杂-8-氮杂鸟苷以及6-硫代-7-脱氮杂-8-氮杂鸟苷。注意到,针对某些非规范核苷酸存在替代的命名方案。例如,在某些情况下,5-甲基假尿苷可以称为“3-甲基假尿苷”或“N3-甲基假尿苷”。

[0159] 含有前缀“氨基”的核苷酸可以是指含有与核苷酸的指定位置上的原子结合的氮原子的任何核苷酸,例如5-氨基胞苷可以是指5-氨基胞苷、5-甲基氨基胞苷以及5-硝基胞苷。类似地,含有前缀“甲基”的核苷酸可以是指含有与核苷酸的指定位置上的原子结合的碳原子的任何核苷酸,例如5-甲基胞苷可以是指5-甲基胞苷、5-乙基胞苷以及5-羟甲基胞苷,含有前缀“硫代”的核苷酸可以是指含有与核苷酸的给定位置上的原子结合的硫原子的任何核苷酸,并且含有前缀“羟基”的核苷酸可以是指含有与核苷酸的给定位置上的原子结合的氧原子的任何核苷酸。

[0160] 因此,某些实施方案涉及合成RNA分子,其中合成RNA分子含有在嘧啶的情况下在2C和/或4C和/或5C位置上或在嘌呤的情况下在6C和/或7N和/或8C位置上包括一个或多个取代的一种或多种核苷酸。其它实施方案涉及治疗剂,其中治疗剂含有一个或多个合成RNA分子,并且其中一个或多个合成RNA分子含有在嘧啶的情况下在2C和/或4C和/或5C位置上或在嘌呤的情况下在6C和/或7N和/或8C位置上包括一个或多个取代的一种或多种核苷酸。在一个实施方案中,治疗剂包含转染试剂。在另一个实施方案中,转染试剂包含阳离子脂质、脂质体或胶束。在还另一个实施方案中,脂质体或胶束包含叶酸盐并且治疗组合物具有抗癌活性。在另一个实施方案中,一种或多种核苷酸包括以下的至少一种:假尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、5-氮杂尿苷、5-羟基尿苷、5-甲基尿苷、5-氨基尿苷、2-硫代假尿苷、4-硫代假尿苷、5-羟基假尿苷、5-甲基假尿苷、5-氨基假尿苷、假异胞苷、N4-甲基胞苷、2-硫代胞苷、5-氮杂胞苷、5-羟基胞苷、5-氨基胞苷、5-甲基胞苷、N4-甲基假异胞苷、2-硫代假异胞苷、5-羟基假异胞苷、5-氨基假异胞苷、5-甲基假异胞苷、7-脱氮杂腺苷、7-脱氮杂鸟苷、6-硫代鸟苷以及6-硫代-7-脱氮杂鸟苷。在另一个实施方案中,一种或多种核苷酸包括以下的至少一种:假尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、5-氮杂尿苷、5-羟基尿苷、5-甲基尿苷、5-氨基尿苷、2-硫代假尿苷、4-硫代假尿苷、5-羟基假尿苷、5-甲基假尿苷以及5-氨基假尿苷;以及以下的至少一种:假异胞苷、N4-甲基胞苷、2-硫代胞苷、5-氮杂胞苷、5-羟基胞苷、5-氨基胞苷、5-甲基胞苷、N4-甲基假异胞苷、2-硫代假异胞苷、5-羟基假异胞苷、5-氨基假异胞苷以及5-甲基假异胞苷。在还另一个实施方案

中,一种或多种核苷酸包括以下的至少一种:假尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、5-氮杂尿苷、5-羟基尿苷、5-甲基尿苷、5-氨基尿苷、2-硫代假尿苷、4-硫代假尿苷、5-羟基假尿苷和5-甲基假尿苷、5-氨基假尿苷以及以下的至少一种:假异胞苷、N4-甲基胞苷、2-硫代胞苷、5-氮杂胞苷、5-羟基胞苷、5-氨基胞苷、5-甲基胞苷、N4-甲基假异胞苷、2-硫代假异胞苷、5-羟基假异胞苷、5-氨基假异胞苷和5-甲基假异胞苷以及以下的至少一种:7-脱氮杂鸟苷、6-硫代鸟苷和6-硫代-7-脱氮杂鸟苷。在又一个实施方案中,一种或多种核苷酸包括:5-甲基胞苷和7-脱氮杂鸟苷。在另一个实施方案中,一种或多种核苷酸还包括假尿苷或4-硫代尿苷或5-甲基尿苷或5-氨基尿苷或4-硫代假尿苷或5-甲基假尿苷或5-氨基假尿苷。在还另一个实施方案中,一种或多种核苷酸还包括7-脱氮杂腺苷。在另一个实施方案中,一种或多种核苷酸包括:假异胞苷和7-脱氮杂鸟苷以及4-硫代尿苷。在又一个实施方案中,一种或多种核苷酸包括:假异胞苷或7-脱氮杂鸟苷和假尿苷。在还另一个实施方案中,一种或多种核苷酸包括:5-甲基尿苷和5-甲基胞苷以及7-脱氮杂鸟苷。在另一实施方案中,一种或多种核苷酸包括:假尿苷或5-甲基假尿苷和5-甲基胞苷以及7-脱氮杂鸟苷。在另一个实施方案中,一种或多种核苷酸包括:假异胞苷和7-脱氮杂鸟苷以及假尿苷。

[0161] 通过通常用于体外转录的RNA聚合酶,某些非规范核苷酸可以比其它非规范核苷酸更有效地并入到合成RNA分子中,部分由于这些确定的非规范核苷酸参与标准碱基配对相互作用和碱基堆积相互作用并且以类似于其中对应的规范核苷酸与RNA聚合酶相互作用的方式与RNA聚合物相互作用的趋势。因此,含有一种或多种非规范核苷酸的某些核苷酸混合物可以是有益的,部分因为含有这些核苷酸混合物的体外转录反应可以产生大量的合成RNA。因此,某些实施方案涉及核苷酸混合物,其含有在嘧啶的情况下在2C和/或4C和/或5C位置上或在嘌呤的情况下在6C和/或7N和/或8C位置上包括一个或多个取代的一种或多种核苷酸。核苷酸混合物包括,但不限于(每种核苷酸前面的数字指明体外转录反应中的非规范核苷酸三磷酸的示例性部分,例如,0.2假异胞苷是指含有腺苷-5'-三磷酸、鸟苷-5'-三磷酸、尿苷-5'-三磷酸、胞苷-5'-三磷酸以及假异胞苷-5'-三磷酸的反应,其中假异胞苷-5'-三磷酸以大约等于存在于反应中的假异胞苷-5'-三磷酸+胞苷-5'-三磷酸的总量的0.2倍的量存在于反应中,其中量是基于摩尔或质量而测量的,并且其中核苷酸前面的多于一个数字指明示例性部分的范围):1.0假尿苷、0.1-0.8 2-硫代尿苷、0.1-0.8 5-甲基尿苷、0.2-1.05-羟基尿苷、0.1-1.0 5-氨基尿苷、0.1-1.0 4-硫代尿苷、0.1-1.0 2-硫代假尿苷、0.1-1.0 4-硫代假尿苷、0.1-1.0 5-羟基假尿苷、0.2-1.0 5-甲基假尿苷、0.1-1.0 5-氨基假尿苷、0.2-1.0 2-硫代胞苷、0.1-0.8假异胞苷、0.2-1.0 5-甲基胞苷、0.2-1.0 5-羟基胞苷、0.1-1.0 5-氨基胞苷、0.2-1.0 N4-甲基胞苷、0.2-1.0 5-甲基假异胞苷、0.2-1.0 5-羟基假异胞苷、0.2-1.0 5-氨基假异胞苷、0.2-1.0 N4-甲基假异胞苷、0.2-1.0 2-硫代假异胞苷、0.2-1.0 7-脱氮杂鸟苷、0.2-1.0 6-硫代鸟苷、0.2-1.0 6-硫代-7-脱氮杂鸟苷、0.2-1.0 8-氮杂鸟苷、0.2-1.0 7-脱氮杂-8-氮杂鸟苷、0.2-1.0 6-硫代-8-氮杂鸟苷、0.1-0.5 7-脱氮杂腺苷以及0.1-0.5 N6-甲基腺苷。

[0162] 现在已经发现,组合某些非规范核苷酸可以是有益的,部分因为非规范核苷酸对降低合成RNA分子的毒性的贡献可以是额外的。因此,某些实施方案涉及核苷酸混合物,其中核苷酸混合物含有多于一种以上列出的非规范核苷酸,例如,核苷酸混合物含有假异胞苷

和 7-脱氮杂鸟苷或核苷酸混合物含有 N4-甲基胞苷和 7-脱氮杂鸟苷等。在一个实施方案中,核苷酸混合物含有多于一种以上列出的非规范核苷酸,并且每种非规范核苷酸以以上列出的部分存在于混合物中,例如核苷酸混合物含有 0.1-0.8 假异胞苷和 0.2-1.0 7-脱氮杂鸟苷或核苷酸混合物含有 0.2-1.0 N4-甲基胞苷和 0.2-1.0 7-脱氮杂鸟苷等。

[0163] 在某些情况下,例如当可以不必要或希望使体外转录反应的产率最大化时,可以使用核苷酸部分而不是以上给定的那些。以上列出的示例性部分和部分的范围涉及具有通常纯度(大于 90%纯度)的核苷酸-三磷酸溶液。可以通过使用具有更大纯度的核苷酸-三磷酸溶液来使用这些和其它核苷酸的更大部分,所述更大纯度例如大于约 95%纯度或大于约 98%纯度或大于约 99%纯度或大于约 99.5%纯度,所述纯度可以例如通过使用现有的化学纯化技术如高压液相色谱法(HPLC)或通过其它方式纯化核苷酸三磷酸溶液来实现。在一个实施方案中,纯化具有多种异构体的核苷酸以富集希望的异构体。

[0164] 其它实施方案涉及用于通过使细胞与合成 RNA 分子接触来诱导细胞表达感兴趣的蛋白质的方法,所述合成 RNA 分子含有在嘧啶的情况下在 2C 和 / 或 4C 和 / 或 5C 位置上或在嘌呤的情况下在 6C 和 / 或 7N 和 / 或 8C 位置上包括一个或多个取代的一种或多种非规范核苷酸。还其它的实施方案涉及用于通过使细胞与合成 RNA 分子接触来转染、重新编程和 / 或基因编辑细胞的方法,所述合成 RNA 分子含有在嘧啶的情况下在 2C 和 / 或 4C 和 / 或 5C 位置上或在嘌呤的情况下在 6C 和 / 或 7N 和 / 或 8C 位置上包括一个或多个取代的一种或多种非规范核苷酸。在一个实施方案中,合成 RNA 分子由体外转录产生。在一个实施方案中,合成 RNA 分子编码一种或多种重新编程因子。在另一个实施方案中,一种或多种重新编程因子包括 Oct4 蛋白。在另一个实施方案中,还使细胞与编码 Sox2 蛋白的合成 RNA 分子接触。在又一个实施方案中,还使细胞与编码 Klf4 蛋白的合成 RNA 分子接触。在又一个实施方案中,还使细胞与编码 c-Myc 蛋白的合成 RNA 分子接触。在又一个实施方案中,还使细胞与编码 Lin28 蛋白的合成 RNA 分子接触。

[0165] 在含有规范核苷酸和非规范核苷酸的体外转录反应中,如 T7RNA 聚合酶的酶可以优选并入规范核苷酸。因此,含有某一部分的非规范核苷酸的体外转录反应可以产生含有与存在于反应中的非规范核苷酸的部分不同(通常更低)部分的非规范核苷酸的 RNA。在某些实施方案中,提到核苷酸并入部分(例如,“含有 50%假异胞苷的合成 RNA 分子”或“0.1-0.8 假异胞苷”)因此可以是指含有指定部分的核苷酸的 RNA 分子和在含有指定部分的核苷酸(或核苷酸衍生物,例如核苷酸-三磷酸)的反应中合成的 RNA 分子,即使这样的反应可以产生含有与存在于反应中的非规范核苷酸的部分不同的部分的核苷酸的 RNA。

[0166] 不同的核苷酸序列可以通过使用替代的密码子来编码相同的蛋白质。在某些实施方案中,提到核苷酸并入部分因此可以是指含有指定部分的核苷酸的 RNA 分子和编码与不同 RNA 分子相同的蛋白质的 RNA 分子,其中不同 RNA 分子含有指定部分的核苷酸。

[0167] 某些实施方案涉及试剂盒,其含有实践本发明所需要的一种或多种材料。在一个实施方案中,试剂盒含有合成 RNA 分子。在一个实施方案中,试剂盒含有编码一种或多种重新编程因子和 / 或基因编辑蛋白的合成 RNA 分子。在另一个实施方案中,合成 RNA 分子含有在嘧啶的情况下在 2C 和 / 或 4C 和 / 或 5C 位置上或在嘌呤的情况下在 6C 和 / 或 7N 和 / 或 8C 位置上包括一个或多个取代的一种或多种非规范核苷酸。在另一个实施方案中,试剂盒含有以下的一种或多种:转染培养基、转染试剂、复合培养基以及涂布溶液。在一个实

施方案中,涂布溶液含有纤连蛋白和 / 或玻连蛋白,优选地重组纤连蛋白和 / 或重组玻连蛋白。在一个实施方案中,试剂盒的一个或多个组分呈多个等分试样存在。在一个实施方案中,试剂盒含有核酸转染-试剂复合物的等分试样。在另一个实施方案中,试剂盒含有以固体形式,例如呈冷冻或冷冻干燥的沉淀提供的核酸转染-试剂复合物的等分试样。在又一个实施方案中,试剂盒含有培养基的等分试样,其中每个等分试样含有通过化学处理或通过冷冻稳定的转染试剂-核酸复合物。

[0168] 通常转染和具体地重新编程可以是不同和耗时的技术,所述技术可以是重复的和易于出错。然而,这些技术经常手动进行,由于缺乏自动的转染仪器。因此,某些实施方案涉及可以自动或半自动方式转染、重新编程和 / 或基因编辑细胞的系统。

[0169] 现参考图 9A 至图 11,某些实施方案涉及能够在多孔板 (2) 中转染细胞的系统 (1)。在一个实施方案中,板被装入从系统滑出的托盘 (3) 中。在另一个实施方案中,系统能够存放多个板 (12)。在又一个实施方案中,系统包括存放转染培养基的装置 (4)。在一个实施方案中,系统包括存放限定温度 (优选地 2C 与 6C 之间) 下的培养基的装置。在一个实施方案中,系统包括存放从孔中去除的液体、废物和 / 或细胞的装置 (5)。在另一个实施方案中,系统包括供应电源的连接 (6)。在又一个实施方案中,系统包括端口 (33) 与计算机 (34) 连通。在一个实施方案中,端口为 USB 端口。在一个实施方案中,系统包括排出风扇 (7)。在另一个实施方案中,系统包括供应真空的连接 (8)。

[0170] 细胞存活力可以获益于控制细胞周围的环境。因此,某些实施方案涉及包括用于在指定或希望的温度下孵育细胞的装置的系统。在一个实施方案中,在约 35C 与 39C 之间的一个或多个温度下孵育细胞。在一个实施方案中,在约 37C 的温度下孵育细胞。其它实施方案涉及包括用于控制在其中孵育细胞的大气的装置的系统。在一个实施方案中,系统包括用于调节大气的二氧化碳浓度的装置。在一个实施方案中,二氧化碳浓度为 3% 与 7% 之间,优选地约 5%。在另一个实施方案中,系统包括用于调节大气的氧气浓度的装置。在一个实施方案中,系统通过引入氮气来调节氧气浓度。在还另一个实施方案中,氧气浓度为约 3% 与约 7% 之间,如约 5%。在一个实施方案中,系统包括用于控制在其中孵育细胞的大气的氧气和二氧化碳浓度的装置。在另一个实施方案中,系统包括供应二氧化碳的连接 (9)。在又一个实施方案中,系统包括供应氮气的连接 (10)。在又一个实施方案中,系统包括供应氧气的连接 (11)。

[0171] 某些实施方案涉及包括用于分配核酸转染-试剂复合物和 / 或培养基的装置 (24) 的系统。在一个实施方案中,系统包括可以分配复合物和 / 或培养基的一个或多个前面装载吸管。用于分配复合物的其它装置的实例包括,但不限于:后面装载吸管、蠕动泵、微流体装置、电喷雾喷嘴、压电喷射器以及声学液滴喷射器。某些实施方案涉及包括用于产生核酸转染-试剂复合物 (13) 的装置的系统。在一个实施方案中,系统包括用于组合一种或多种转染试剂 (14) 和一种或多种核酸 (15) 的装置。在一个实施方案中,用于组合的装置包括一个或多个前面装载吸管。可以用于组合的其它装置的实例包括,但不限于:后面装载吸管、蠕动泵、微流体装置、电喷雾喷嘴、压电喷射器以及声学液滴喷射器。在一个实施方案中,系统包括一个或多个可去除尖端。在另一个实施方案中,可以消毒一个或多个可去除尖端。在另一个实施方案中,一个或多个可去除尖端为一次性的。在又一个实施方案中,一个或多个可去除尖端由塑料或玻璃制成。在还另一个实施方案中,塑料为聚丙烯。在一个实施方

案中,系统包括用于在一种或多种复合培养基(16)中使用一种或多种转染试剂孵育一种或多种核酸的装置。在另一个实施方案中,系统包括用于存放一种或多种核酸、一种或多种转染试剂以及一种或多种复合培养基的装置。在一个实施方案中,在室温下发生复合。在一个实施方案中,系统包括用于在使细胞与培养基接触之前加温培养基例如至约 20℃与约 39℃之间或约 30℃与约 39℃之间的装置。在一个实施方案中,使用加热元件(25)加温培养基。在一个实施方案中,系统包括用于存放和/或分配多种培养基的装置。

[0172] 某些实施方案涉及用于存放核酸转染-试剂复合物的方法。在一个实施方案中,使一种或多种核酸和一种或多种转染试剂与一种或多种复合培养基组合并且冷却以产生核酸转染-试剂沉淀。在一个实施方案中,通过与液氮接触来进行冷却。其它冷却方法包括,但不限于与以下接触:珀尔贴(Peltier)冷却器、冷却液体丙烷、冷却液体乙烷以及冷却抛光金属表面。在一个实施方案中,方法大致上不含 RNA 酶。某些实施方案涉及用于使用核酸转染-试剂沉淀转染细胞的方法。在一个实施方案中,在添加至转染培养基之前加温沉淀。在一个实施方案中,通过将沉淀放在小体积的温热转染培养基中来加温沉淀,所述温热转染培养基然后与待转染的细胞接触。在另一个实施方案中,直接将沉淀添加至转染培养基中。某些实施方案涉及可以使用核酸转染-试剂沉淀进行转染的系统。在一个实施方案中,系统包括用于在限定的温度范围内存放沉淀(17)的装置。在一个实施方案中,温度范围为约 -90℃与约 0℃之间,优选地约 -30℃与约 -4℃之间。在一个实施方案中,系统包括用于分配沉淀的装置。在一个实施方案中,使用柱塞(19)分配沉淀。在另一个实施方案中,使用转盘(20)分配沉淀,所述转盘(20)含有穿过其中分配沉淀的开口(21)。在一个实施方案中,设备包括用于在将沉淀添加至转染培养基之前加温沉淀的装置。在一个实施方案中,通过将沉淀放在含有温热转染培养基的小容器(22)中来加温沉淀,所述温热转染培养基然后与待转染的细胞接触。在另一个实施方案中,设备含有用于将沉淀直接分配到转染培养基中的装置。在又一个实施方案中,将沉淀存放在药筒(16)中。在一个实施方案中,系统包括用于替换药筒的装置(36)。

[0173] 在细胞培养过程中,为了添加营养物和/或减少、去除或以另外的方式灭活细胞废物或其它不希望的组分,全部或部分替换培养基或用额外量的培养基或其它补充剂补充培养基可以是有益的,所述细胞废物或其它不希望的组分可以存在于培养基中,包括残留复合物。因此,某些实施方案涉及包括用于使培养基从细胞中全部或部分去除的装置(23)的系统。在一个实施方案中,系统包括吸气器。

[0174] 某些实施方案涉及包括用于去除孔板的盖子的装置的系统。在一个实施方案中,系统包括用于使用抽吸器(27)去除孔板的盖子(26)的装置。用于去除孔板的盖子的其它装置包括,但不限于:粘合剂、铰接式附属物(28)、夹具、磁铁以及电磁铁。在某些实施方案中,系统包括用于使细胞成像的装置(29)。在一个实施方案中,通过测量含有细胞的容器的光学密度来确定细胞密度。在另一个实施方案中,通过使细胞成像来确定细胞密度。

[0175] 某些实施方案涉及用于与其它仪器可操作组合的系统,所述其它仪器例如用于培养、成像或以另外的方式操控细胞的仪器。在一个实施方案中,使用机械臂(30)来装载系统(1)。在另一个实施方案中,机械臂用来将板转移至孵育器(31)和/或从孵育器(31)中转移板。在又一个实施方案中,板成像仪(32)用来使细胞成像。在又一个实施方案中,使用计算机(34)控制系统。在一个实施方案中,系统用于转染、重新编程和/或基因编辑

细胞。

[0176] 因此,本发明具有为研究和治疗使用提供产品的目的。

[0177] 在以下所附描述中列举了本发明的细节。虽然在本发明的实践或测试中可以使用与本文所描述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料,但如今描述了说明性的方法和材料。通过描述和通过权利要求书本发明的其它特征、目的和优点将显而易见。在说明书和所附权利要求书中,单数形式还包括复数,除非上下文另外清楚地指出。除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。

实施例

[0178] 实施例 1 RNA 合成

[0179] 由 DNA 模板(表 1)合成编码人蛋白质 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc-2(T58A) 和 Lin28 并且包含规范和非规范核苷酸的各种组合的 RNA。通过琼脂糖凝胶电泳来分析 RNA 的样品以评价 RNA 的品质(图 1)。然后将 RNA 稀释至 100ng/ μ L 与 500ng/ μ L 之间。针对某些实验,在 1 μ L/100 μ g 的 RNA 的浓度下添加 RNA 酶抑制剂(Suprase • In™, Life Technologies Corporation)。在 4°C 下存放 RNA 溶液。针对涉及 RNA 混合物的某些实验,以 3:1:1:1:1 的摩尔比混合编码 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc-2(T58A) 和 Lin28 的 RNA。

[0180] 表 1.

[0181]

模板	核苷酸	反应 体积/ μL	ivT 产率/ μg
Oct4	A, G, psU, 5mC	210	1976.0
Sox2	A, G, psU, 5mC	70	841.7
Klf4	A, G, psU, 5mC	70	950.0
c-Myc-2 (T58A)	A, G, psU, 5mC	70	535.8
Lin28	A, G, psU, 5mC	70	551.0
Oct4	A, G, psU, 5mC	105	1181.8
Sox2	A, G, psU, 5mC	35	533.9
Klf4	A, G, psU, 5mC	35	552.9
c-Myc-2 (T58A)	A, G, psU, 5mC	35	471.2
Lin28	A, G, psU, 5mC	35	440.8
Oct4	A, G, psU, 5mC	105	1155.2
Sox2	A, G, psU, 5mC	35	526.3
Klf4	A, G, psU, 5mC	35	494.0
c-Myc-2 (T58A)	A, G, psU, 5mC	35	446.5
Lin28	A, G, psU, 5mC	35	389.5
Sox2	A, G, psU, 5mC	20	143.8
Sox2	A, G, U, psisoC	20	114.1
Sox2	A, G, 0.25 2sU, psisoC	20	78.0
Sox2	A, G, 0.25 2sU, 0.25 psisoC	20	140.1
Sox2	A, G, 5mU, psisoC	20	30.6
Sox2	A, G, 0.5 5mU, psisoC	20	65.9

[0182]

Oct4	A, G, U, psisoC	30	191.6
Sox2	A, G, U, psisoC	10	50.7
Klf4	A, G, U, psisoC	10	74.5
c-Myc-2 (T58A)	A, G, U, psisoC	10	87.2
Lin28	A, G, U, psisoC	10	86.8
Oct4	A, G, 0.25 5mU, psisoC	30	195.8
Sox2	A, G, 0.25 5mU, psisoC	10	36.2
Klf4	A, G, 0.25 5mU, psisoC	10	33.6
c-Myc-2 (T58A)	A, G, 0.25 5mU, psisoC	10	63.0
Lin28	A, G, 0.25 5mU, psisoC	10	77.2
Oct4	A, G, U, C	30	165.2
Sox2	A, G, U, C	10	94.7
Klf4	A, G, U, C	10	91.4
c-Myc-2 (T58A)	A, G, U, C	10	84.9
Lin28	A, G, U, C	10	104.4
Oct4	A, G, U, 0.25 psisoC	30	161.2
Sox2	A, G, U, 0.25 psisoC	10	83.8
Klf4	A, G, U, 0.25 psisoC	10	85.1
c-Myc-2 (T58A)	A, G, U, 0.25 psisoC	10	89.3
Lin28	A, G, U, 0.25 psisoC	10	94.9
Oct4	A, G, U, 0.5 psisoC	30	150.8
Sox2	A, G, U, 0.5 psisoC	10	79.3
Klf4	A, G, U, 0.5 psisoC	10	83.8
c-Myc-2 (T58A)	A, G, U, 0.5 psisoC	10	94.7
Lin28	A, G, U, 0.5 psisoC	10	78.6
Oct4	0.25 7dA, G, U, C	10	29.7
Oct4	0.5 7dA, G, U, C	10	44.7
Oct4	A, 0.25 7dG, U, C	10	45.2
Oct4	A, 0.5 7dG, U, C	10	31.7

[0183]

Oct4	0.25 7dA, 0.25 7dG, U, C	10	13.2
Oct4	0.25 7dA, G, U, 0.25 psisoC	10	47.6
Oct4	A, 0.25 7dG, U, 0.25 psisoC	10	10.5
Oct4	A, 0.5 7dG, U, 0.25 psisoC	30	125.3
Sox2	A, 0.5 7dG, U, 0.25 psisoC	10	20.5
Klf4	A, 0.5 7dG, U, 0.25 psisoC	10	18.4
c-Myc-2 (T58A)	A, 0.5 7dG, U, 0.25 psisoC	10	22.1
Lin28	A, 0.5 7dG, U, 0.25 psisoC	10	39.7
Oct4	A, 0.5 7dG, U, 0.5 psisoC	30	92.3
Sox2	A, 0.5 7dG, U, 0.5 psisoC	10	20.1
Klf4	A, 0.5 7dG, U, 0.5 psisoC	10	17.7
c-Myc-2 (T58A)	A, 0.5 7dG, U, 0.5 psisoC	10	95.4
Lin28	A, 0.5 7dG, U, 0.5 psisoC	10	26.0
Oct4	0.25 7dA, 7dG, U, 0.25 psisoC	20	3.8
Sox2	0.25 7dA, 7dG, U, 0.25 psisoC	20	5.4
Klf4	0.25 7dA, 7dG, U, 0.25 psisoC	20	5.9
c-Myc-2 (T58A)	0.25 7dA, 7dG, U, 0.25 psisoC	20	5.9
Lin28	0.25 7dA, 7dG, U, 0.25 psisoC	20	5.1
Oct4	0.25 7dA, 7dG, U, 0.5 psisoC	20	3.0
Sox2	0.25 7dA, 7dG, U, 0.5 psisoC	20	3.3
Klf4	0.25 7dA, 7dG, U, 0.5 psisoC	20	4.1
c-Myc-2 (T58A)	0.25 7dA, 7dG, U, 0.5 psisoC	20	4.5
Lin28	0.25 7dA, 7dG, U, 0.5 psisoC	20	5.0
Oct4	A, 0.75 7dG, U, C	10	40.8
(2h 孵育)			
Oct4	A, 7dG, U, C	10	14.1
(2h 孵育)			
Oct4	A, 0.75 7dG, U, C	10	42.9
(20h 孵育)			

[0184]

Oct4	A, 7dG, U, C	10	24.4
(20h 孵育)			
Oct4	A, G, U, 0.25 N4mC	10	73.1
Oct4	A, G, U, 0.5 N4mC	10	66.2
Oct4	A, G, U, 0.75 N4mC	10	55.1
Oct4	A, G, U, N4mC	10	32.7
Oct4	A, 0.75 7dG, U, C	10	35.6

[0185] “A”是指腺苷-5′-三磷酸,“G”是指鸟苷-5′-三磷酸,“U”是指尿苷-5′-三磷酸,“C”是指胞苷-5′-三磷酸,“psU”是指假尿苷-5′-三磷酸,“5mC”是指5-甲基胞苷-5′-三磷酸,“2sU”是指2-硫代尿苷-5′-三磷酸,“psisoC”是指假异胞苷-5′-三磷酸,“5mU”是指5-甲基尿苷-5′-三磷酸,“7dA”是指7-脱氮杂腺苷-5′-三磷酸,“7dG”是指7-脱氮杂鸟苷-5′-三磷酸,并且“N4mC”是指N4-甲基胞苷-5′-三磷酸。

[0186] 实施例2 转染培养基配制

[0187] 开发支持有效转染、重新编程和基因编辑细胞的培养基:DMEM/F12+10 μg/mL 胰岛素+5.5 μg/mL 转铁蛋白+6.7ng/mL 亚硒酸钠+20ng/mL bFGF+5mg/mL 处理过的人血清白蛋白。

[0188] 当与具体转染试剂、具体核酸和具体细胞类型一起使用时,还开发了这种培养基的变型来提供改进的性能:DMEM/F12+10 μg/mL 胰岛素+5.5 μg/mL 转铁蛋白+6.7ng/mL 亚硒酸钠+4.5 μg/mL 胆固醇+20ng/mL bFGF+5mg/mL 处理过的人血清白蛋白, DMEM/F12+10 μg/mL 胰岛素+5.5 μg/mL 转铁蛋白+6.7ng/mL 亚硒酸钠+1 μM 氢化可的松+20ng/mL bFGF+5mg/mL 处理过的人血清白蛋白,以及DMEM/F12+10 μg/mL 胰岛素+5.5 μg/mL 转铁蛋白+6.7ng/mL 亚硒酸钠+4.5 μg/mL 胆固醇+1 μM 氢化可的松+20ng/mL bFGF+5mg/mL 处理过的人血清白蛋白。

[0189] 在某些实验中添加至细胞培养基中的额外组分的实例(与实例浓度一起列出)包括:15mM HEPES、2mM L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺、2 μg/mL 乙醇胺、10 μg/mL 脂肪酸、10 μg/mL 鱼肝油脂肪酸(甲酯)、25 μg/mL 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯、2 μg/mL D-α-生育酚乙酸酯、1 μg/mL 至 50 μg/mL L-抗坏血酸 2-磷酸一倍半镁盐水合物、200ng/mL B18R 以及 0.1% 普罗尼克 F-68。

[0190] 针对其中调节培养基的某些实验,使用了以下变型:

[0191] DMEM/F12+15mM HEPES+2mM L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺+10 μg/mL 胰岛素+5.5 μg/mL 转铁蛋白+6.7ng/mL 亚硒酸钠+2 μg/mL 乙醇胺+4.5 μg/mL 胆固醇+10 μg/mL 鱼肝油脂肪酸(甲酯)+25 μg/mL 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯+2 μg/mL D-α-生育酚乙酸酯+1 μg/mL L-抗坏血酸 2-磷酸一倍半镁盐水合物+0.1% 普罗尼克 F-68+20ng/mL bFGF+5mg/mL 处理过的人血清白蛋白。

[0192] 针对其中没有调节培养基的某些实验,使用了以下变型。

[0193] DMEM/F12+15mM HEPES+2mM L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺+10 μg/mL 胰岛素+5.5 μg/mL 转铁蛋白+6.7ng/mL 亚硒酸钠+2 μg/mL 乙醇胺+4.5 μg/mL 胆固醇+1 μM 氢化可的

松 +0 $\mu\text{g/mL}$ 至 25 $\mu\text{g/mL}$ 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯 +2 $\mu\text{g/mL}$ D- α -生育酚乙酸酯 +50 $\mu\text{g/mL}$ L-抗坏血酸 2-磷酸一倍半镁盐合物 +20ng/mL bFGF+5mg/mL 处理过的人血清白蛋白。

[0194] 为了制备这些变型,通过添加 32mM 辛酸钠、接着在 60°C 下加热 4h、接着在室温下用离子交换树脂 (AG501-X8(D)) 处理 6h、接着在室温下用葡聚糖涂布的活性炭 (C6241, Sigma-Aldrich Co. LLC.) 处理过夜、接着离心、过滤、用不含核酸酶的水调节至 10% 溶液、接着添加至培养基的其它组分中来处理所述处理过的人血清白蛋白。针对其中调节培养基的某些实验,对辐射过的人新生儿成纤维细胞供给者调节培养基,持续 24h。将细胞铺放在纤连蛋白涂布的板或纤连蛋白和玻连蛋白涂布的板上,除非另外说明。

[0195] 可以调节培养基的配制来满足培养的具体细胞类型的需要。此外,在某些情况下,处理过的人血清白蛋白可以被其它处理过的白蛋白(例如处理过的牛血清白蛋白)替换,其它谷氨酰胺来源可以替代 L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺或除了 L-丙氨酰基-L-谷氨酰胺以外(例如 L-谷氨酰胺)而使用,其它缓冲体系可以替代 HEPES 或除了 HEPES 以外(例如磷酸盐、碳酸氢盐等)而使用,硒可以呈替代亚硒酸钠或除了亚硒酸钠以外(例如亚硒酸)的其它形式提供,其它抗氧化剂可以替代 L-抗坏血酸 2-磷酸一倍半镁盐合物和/或 D- α -生育酚乙酸酯或除了 L-抗坏血酸 2-磷酸一倍半镁盐合物和/或 D- α -生育酚乙酸酯以外(例如, L-抗坏血酸)而使用,其它表面活性剂可以替代聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯和/或普罗尼克 F-68 或除了聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯和/或普罗尼克 F-68 以外(例如普罗尼克 F-127)而使用,其它基础培养基可以替代 DMEM/F12 或除了 DMEM/F12 以外(例如 MEM、DMEM 等)而使用,并且培养基的组分可以随时间而变化,例如通过第 0 天至第 5 天使用没有 TGF- β 的培养基,并且然后在第 5 天后使用含有 2ng/mL TGF- β 的培养基。在某些情况下,可以在适当浓度下添加其它成分,例如脂肪酸、溶血磷脂酸、溶血神经鞘氨酯、鞘氨醇-1-磷酸酯、其它鞘脂、蛋白质的 TGF- β /NODAL 家族的成员、IL-6、蛋白质的 Wnt 家族的成员等,并且当与那些细胞类型(例如,鞘氨醇-1-磷酸酯和多能干细胞)一起使用时,可以在适当浓度下将已知促进或抑制具体细胞类型和/或蛋白质的激动剂和/或拮抗剂的生长的成分或已知促进或抑制具体细胞类型的生长的其它分子添加至培养基中。成分可以采取纯化的化合物、明确定义的混合物的部分、复合物或未定义的混合物(例如动物油或植物油)的部分的形式,并且可以通过生物方法例如调节来添加。组分的浓度可以不同于将对于本领域中的技术人员而言明显的范围内的所列出的值。

[0196] 实施例 3 使用合成 RNA 转染细胞

[0197] 为了在 6 孔板中转染,首先在复合培养基 (**Opti-MEM®**, Life Technologies Corporation) 中分别将 2 μg RNA 和 6 μL 转染试剂 (Lipofectamine™ RNAiMAX, Life Technologies Corporation) 各自稀释至 60 μL 的总体积。根据转染试剂制造商的指示,然后混合稀释的 RNA 和转染试剂并且在室温下孵育 15min。然后将复合物添加至培养的细胞中。将 30 μL 与 240 μL 之间的复合物添加至 6 孔板的每个孔中,每个孔已经含有 2mL 的转染培养基。然后轻轻摇晃板以使复合物分布在每个孔中。在用新鲜转染培养基 (2mL/孔) 替换培养基之前,使用复合物孵育细胞 2 小时至过夜。放大体积规模用于在 24 孔板和 96 孔板中转染。在使用针对 Oct4 的抗体转染后 20h 至 24h,固定和染色细胞 (图 2A)。染色和计数细胞核以确定 RNA 的相对毒性 (图 2B)。

[0198] 实施例 4 分析未处理的人血清白蛋白制剂支持核酸转染和 RNA 重新编程的能力

[0199] 在具有或不具有 5mg/mL HSA 的培养基中培养原代人新生儿成纤维细胞。筛选科恩级分 V (A6784, Sigma-Aldrich Co. LLC.) 和四种不同的重组 HSA 制剂 (A6608、A7736、A9731 和 A9986, 所有均来自 Sigma-Aldrich Co. LLC.)。根据实施例 3 转染细胞, 其中根据实施例 1 合成 RNA。虽然未转染的细胞在含有任何 HSA 制剂的培养基中生长良好, 但是在转染的孔中, 每种 HSA 制剂产生显著不同的细胞形态和细胞密度, 并且没有一种产生指明重新编程的形态变化。

[0200] 实施例 5 产生辛酸盐处理的人血清白蛋白

[0201] 用 22mM 氯化钠和 16mM 辛酸钠 (Sigma-Aldrich Co. LLC) 预先孵育 HSA 的 10% 溶液, 并且在组成完全培养基之前在 37°C 下孵育 3 小时。

[0202] 实施例 6 使用离子交换色谱法处理人血清白蛋白

[0203] 通过在室温下轻轻搅拌地将 2g 的 HSA 溶解在 10mL 不含核酸酶的水中来制备在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (A7736, Sigma-Aldrich Co. LLC.) 中产生的重组 HSA 的 20% 溶液。然后通过首先添加 1g 的混合床去离子树脂 (AG 501-X8(D), Bio-Rad Laboratories, Inc.) 并且在室温下摇动 1h 来使 HSA 溶液去离子化。然后将 HSA 溶液倾析到含有 5g 新鲜树脂的管中, 并且在室温下摇动 4h。最后, 倾析去离子化的 HSA 溶液, 使用不含核酸酶的水调节至 10% 的总蛋白质含量, 使用 0.2 μ m PES-膜过滤器过滤消毒, 并且在 4°C 下存放。

[0204] 实施例 7 分析在含有辛酸盐处理的人血清白蛋白的培养基中培养的细胞的转染效率和存活力

[0205] 在含有根据实施例 4 处理的重组 HSA 或含有处理过的血液来源的 HSA (Bio-Pure HSA, Biological Industries) 的培养基中培养原代人新生儿成纤维细胞。在第 0 天开始, 根据实施例 3 每日转染细胞, 其中根据实施例 1 合成 RNA。在第 3 天拍摄照片。在含有辛酸盐的孔中观察到经历类似于间充质向上皮转化的形态变化的细胞的若干小区域, 指明了增加的转染效率。在含有处理过的血液来源的 HSA 的样品中观察到类似于间充质向上皮转化的形态变化的许多大区域。在这两种情况下, 形态变化是重新编程的特征。

[0206] 实施例 8 使用含有辛酸盐处理的人血清白蛋白重新编程人成纤维细胞

[0207] 在 5000 个细胞 / 孔的密度下在成纤维细胞培养基 (DMEM+10% 胎牛血清) 中将原代人新生儿成纤维细胞铺放在 6 孔板中。6 小时后, 用含有辛酸盐处理的 HSA 的转染培养基替换培养基。在第 0 天开始, 根据实施例 3 每日转染细胞, 其中根据实施例 1 合成 RNA。到第 5 天, 孔含有展现出与重新编程一致的形态的细胞的若干区域。这个实验不包括使用供给者或免疫抑制剂。

[0208] 实施例 9 分析在含有离子交换树脂处理的人血清白蛋白的培养基中培养的细胞的转染效率和存活力

[0209] 在第 0 天开始, 根据实施例 3 转染原代人新生儿成纤维细胞, 其中根据实施例 1 合成 RNA。在第 2 天拍摄照片。与含有处理过的血液来源的 HSA 或离子交换树脂处理的重组 HSA 的孔相比, 在含有未处理的 HSA 的孔中的细胞展现出低存活力。

[0210] 实施例 10 使用离子交换树脂处理的人血清白蛋白重新编程人成纤维细胞

[0211] 在 10,000 个细胞 / 孔的密度下在成纤维细胞培养基 (DMEM+10% 胎牛血清) 中将

原代人新生儿成纤维细胞铺放在供给者上的 6 孔板中。在第 0 天开始,根据实施例 3 每日转染细胞,其中根据实施例 1 合成 RNA。在第 4 天进行具有分流比为 1:20 的传代。在第 10 天拍摄照片。孔含有展现出与重新编程一致的形态的许多细胞大集落。在曝露于含有未处理的 HSA 的细胞培养基的孔中没有观察到集落。

[0212] 实施例 11 不使用供给者或免疫抑制剂重新编程人成纤维细胞

[0213] 在 20,000 个细胞 / 孔的密度下在成纤维细胞培养基 (DMEM+10% 胎牛血清) 中将原代人成纤维细胞铺放在 6 孔板中。6 小时后,用含有处理过的 HSA 并且不含有免疫抑制剂的转染培养基替换培养基,并且根据实施例 3 每日转染细胞,其中根据实施例 1 合成 RNA,除了 RNA 的剂量减少至 1 μ g / 孔并且总共进行 5 次转染。在第 7 天拍摄照片。早在第 5 天,展现出与重新编程一致的形态的细胞小集落变为可见的。在第 7 天,用在辐射过的小鼠胚胎成纤维细胞上调节 24 小时的 DMEM/F12+20% Knockout™ 血清替代品 (Life Technologies Corporation)+1X 非必需氨基酸 +2mM L- 谷氨酰胺替换培养基,并且然后补充 20ng/mL bFGF 和 10 μ MY-27632。早在第 8 天,具有重新编程形态的大集落变为可见的。在第 10 天获取集落,并且铺放在用基底膜提取物 (**Cultrex®** Human BME **Pathclear®**, Trevigen Inc.) 涂布的孔中 (图 3A)。细胞快速生长,并且传代以建立系。建立的系针对多能干细胞标记物 Oct4 和 SSEA4 染色阳性 (图 3B)。重复整个方案,并且获得类似结果 (图 3C)。

[0214] 实施例 12 来自人皮肤活组织检查组织中的细胞的有效、快速的衍生和重新编程

[0215] 根据批准的方案,对 31 周岁的健康志愿者进行全厚度皮穿孔活组织检查。简单地说,通过局部涂敷 2.5% 利多卡因使左上臂上的皮肤区域麻醉。用 70% 异丙醇给所述区域消毒,并且使用 1.5mm 直径穿孔进行全厚度皮活组织检查 (图 4A)。用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲洗组织,并且放在含有 250 μ L TrypLE™ Select CTS™ (Life Technologies Corporation) 的 1.5mL 管中,并且在 37C 下孵育 30min。然后将组织转移至含有 250 μ L DMEM/F12-CTS™ (Life Technologies Corporation)+5mg/mL 胶原酶的 1.5mL 管中,并且在 37C 下孵育 2h (图 4B)。使用镊子去除表皮,并且以机械方式剥离组织。用 DMEM/F12-CTS™ 冲洗细胞两次,并且铺放在 24 孔板和 96 孔板的纤连蛋白涂布的孔中。还对相同的志愿者进行了静脉切开术,并且将静脉血收集在 **Vacutainer®** SST™ 管 (Becton, Dickinson and Company) 中。根据制造商的方案分离血清。通过混合 DMEM/F12-CTS™+2mM L- 丙氨酰基-L- 谷氨酰胺 (Sigma-Aldrich Co.LLC.)+20% 人血清来制备等基因涂覆培养基。将来自皮组织样品的细胞铺放在转染培养基或等基因涂覆培养基中。2 天后,冲洗孔,并且用转染培养基替换培养基。具有成纤维细胞形态的许多细胞附着并且到第 2 天开始扩散 (图 4C)。在第 2 天开始根据实施例 3 转染细胞,其中根据实施例 1 合成 RNA,其中放大所有体积以适应更小的孔。到第 5 天,观察到具有与重新编程一致的形态的细胞区域。

[0216] 实施例 13 使用含有非规范核苷酸的合成 RNA 重新编程人成纤维细胞

[0217] 在 20,000 个细胞 / 孔的密度下,在转染培养基中将原代人成纤维细胞铺放在用重组人纤连蛋白和重组人玻连蛋白 (所述重组人纤连蛋白和重组人玻连蛋白各自用 DMEM/F12 稀释至 1 μ g/mL、1mL/ 孔的浓度,在室温下孵育 1h) 涂布的 6 孔板中。第二天,如在实施例 3 中转染细胞,其中根据实施例 1 合成 RNA,除了 RNA 的剂量为第 1 天 0.5 μ g / 孔、第 2 天 0.5 μ g / 孔以及第 3 天 2 μ g / 孔。在第 4 天拍摄照片。在第 4 天,展现出与重新编程一致的形态的细胞小集落是可见的。

[0218] 实施例 14 用未调节的转染培养基重新编程人成纤维细胞

[0219] 在 20,000 个细胞 / 孔的密度下,在转染培养基中将原代人成纤维细胞铺放在用重组人纤连蛋白和重组人玻连蛋白(所述重组人纤连蛋白和重组人玻连蛋白各自用 DMEM/F12 稀释至 1 μ g/mL、1mL/ 孔的浓度,在室温下孵育 1h) 涂布的 6 孔板中。第二天,如在实施例 3 中转染细胞,其中根据实施例 1 合成 RNA,除了 RNA 的剂量为第 1 天 0.5 μ g/ 孔、第 2 天 0.5 μ g/ 孔、第 3 天 2 μ g/ 孔、第 4 天 2 μ g/ 孔以及第 5 天 4 μ g/ 孔。早在第 5 天,展现出与重新编程一致的形态的细胞小集落变为可见的。在第 7 天,用在辐射过的小鼠胚胎成纤维细胞上调 24 小时的 DMEM/F12+20% Knockout™ 血清替代品 (Life Technologies Corporation)+1X 非必需氨基酸+2mM L- 谷氨酰胺替换培养基,并且然后补充 20ng/mL bFGF 和 10 μ MY-27632。早在第 8 天,具有重新编程形态的大集落变为可见的。在第 10 天挑取集落,并且铺放在用基底膜提取物 (**Cultrex®** Human BME **Pathclear®**, Trevigen Inc.) 涂布的孔中。细胞快速生长,并且传代以建立系。

[0220] 实施例 15 葡萄糖反应性胰岛素产生细胞的产生

[0221] 根据实施例 11 或实施例 12 重新编程细胞,并且然后在 DMEM/F12+0.2% HSA+0.5X N2 补充剂+0.5X B27 补充剂+100ng/mL 活化素 A+1 μ M 渥曼青霉素中培养 4 天,接着在 1:1F12/IMDM+0.5% HSA+0.5% ITS 补充剂+0.5X B27 补充剂+2 μ M 视黄酸+20ng/mL FGF7+50ng/mL NOGGIN 中培养 4 天,接着在 DMEM+0.5% HSA+1% ITS 补充剂+1X N2 补充剂+50ng/mL EGF 中培养 5 天,接着在 DMEM/F12+1% ITS 补充剂+10ng/mL bFGF+10mM 烟酰胺+50ng/mL 艾塞那肽 (exendin)-4+10ng/mL BMP4 中培养 7 至 9 天,以便产生葡萄糖反应性胰岛素产生细胞。可选地,根据实施例 11 或实施例 12 重新编程细胞,并且然后在 1:1F12/IMDM+0.5% HSA+0.5% ITS 补充剂+0.5X B27 补充剂+2 μ M 视黄酸+20ng/mL FGF7+50ng/mL NOGGIN 中培养 4 天,接着在 DMEM+0.5% HSA+1% ITS 补充剂+1X N2 补充剂+50ng/mL EGF 中培养 5 天,接着在 DMEM/F12+1% ITS 补充剂+10ng/mL bFGF+10mM 烟酰胺+50ng/mL 艾塞那肽-4+10ng/mL BMP4 中培养 7 至 9 天,以便产生葡萄糖反应性胰岛素产生细胞而没有产生定形内胚层细胞。可选地,根据实施例 11 或实施例 12 重新编程细胞,并且然后在 1:1F12/IMDM+0.5% HSA+0.5% ITS 补充剂+0.5X B27 补充剂+2 μ M 视黄酸+20ng/mL FGF7+50ng/mL NOGGIN 中培养 4 天,接着在 DMEM/F12+1% ITS 补充剂+10ng/mL bFGF+10mM 烟酰胺+50ng/mL 艾塞那肽-4+10ng/mL BMP4 中培养 7 至 9 天,以便产生葡萄糖反应性胰岛素产生细胞而没有产生定形内胚层细胞并且没有使祖细胞扩增。虽然可以使内胚层细胞或胰岛素产生细胞与存在于培养物中的其它细胞分离,但是这种方法产生了足够高百分比的一般不要求此种分离的葡萄糖反应性胰岛素产生细胞。然后所得到的细胞可以在体外或体内用于筛选糖尿病研究或开发用于糖尿病的治疗剂的生物活性分子。

[0222] 实施例 16 使用重组蛋白产生葡萄糖反应性胰岛素产生细胞

[0223] 根据实施例 11 重新编程细胞,并且然后在 DMEM/F12、100ng/ml 活化素 A、25ng/ml Wnt3a、0.01% 重组 HSA、1X ITSE 中培养 1 天,接着在 DMEM/F12、100ng/ml 活化素 A、0.01% 重组 HSA、1X ITSE 中培养 2 天,接着在 DMEM/F12、50ng/ml FGF10、0.25 μ M KAAD- 环杷明、0.01% 重组 HSA、1X ITSE 中培养 3 天,接着在 DMEM/F12、1% B27、2 μ M 全反式视黄酸、50ng/ml FGF10、0.25 μ M KAAD- 环杷明中培养 4 天,接着在 DMEM/F12、1% B27、1 μ M γ - 分泌酶抑制剂 DAPT、50ng/ml 艾塞那肽-4、10nM β 细胞素、10mM 烟酰胺中培养 2 天,接着在

DMEM/F12、50mg/L 抗坏血酸-2-磷酸盐、1% B27、1 μ M γ -分泌酶抑制剂 DAPT、50ng/ml 艾塞那肽-4、50ng/ml IGF-1、50ng/ml HGF、10nM β 细胞素、10mM 烟酰胺中培养6天,以便产生葡萄糖反应性胰岛素产生细胞(图 5A)。所得到的细胞可以在体外或体内用于筛选糖尿病研究或开发用于糖尿病的治疗剂的生物活性分子。

[0224] 实施例 17 用于包含重新编程细胞的 1 型糖尿病的个性化细胞替代疗法

[0225] 根据实施例 12 和实施例 14 使患者皮肤细胞重新编程为葡萄糖反应性胰岛素产生细胞。然后从培养容器中酶促释放细胞,并且将约 1×10^6 个与约 1×10^7 个之间的细胞注射到腹膜内空间或门静脉。在腹膜内注射的情况下,使细胞与细胞外基质蛋白预先混合以防止过度迁移。细胞移入并且开始产生胰岛素。监测胰岛素 /C-肽水平,并且需要时进行额外注射。

[0226] 实施例 18 RNA TALEN 的合成

[0227] 如在实施例 1 中由 DNA 模板合成编码 20bp-匹配 TALEN 的 RNA(图 6A 至图 6C 和图 7)(表 2)。通过琼脂糖凝胶电泳来分析所得到的 RNA 以评价 RNA 的品质。然后将 RNA 稀释至 200ng/ μ L,并且在 1 μ L/100 μ g RNA 的浓度下添加 RNA 酶抑制剂(Suprase • In™, Life Technologies Corporation)。在 4°C 下存放 RNA 溶液。在 1:1 摩尔比下混合编码每半个 TALEN 对的 RNA。

[0228] 表 2.

[0229]

模板	核苷酸	反应	ivT
		体积/ μ L	产率/ μ g
XPA-L1	A, G, psU, 5mC	20	120.0
XPA-L2	A, G, psU, 5mC	20	114.0
XPA-R1	A, G, psU, 5mC	20	159.6
CCR5-L1	A, G, psU, 5mC	20	170.4
CCR5-L2	A, G, psU, 5mC	20	142.8
CCR5-R1	A, G, psU, 5mC	20	132.0
CCR5-R2	A, G, psU, 5mC	20	154.8
CCR5-L1	A, G, psU, 5mC	10	56.6
CCR5-L2	A, G, psU, 5mC	10	58.5
CCR5-R1	A, G, psU, 5mC	10	56.8
CCR5-R2	A, G, psU, 5mC	10	58.7

[0230] 实施例 19 靶向 CCR5 基因的 RNA TALEN 的合成

[0231] 根据实施例 18 合成编码 TALEN L1:TCATTTTCCATACAGTCAGT, L2:TTTTCATACAGTCAGTATC, R1:TGACTATCTTTAATGTCTGG 以及 R2:TATCTTTAATGTCTGGAAAT 的 RNA。这些 TALEN 靶向有义链(L1 和 L2)或反义链(R1 和 R2)上的 CCR5 基因内的 20-bp 位

点。制备以下 TALEN 对 :L1&R1、L1&R2、L2&R1 以及 L2&R2。

[0232] 实施例 20 使用 RNA TALEN 和无 DNA、无供给者、无免疫抑制剂、无调节重新编程人成纤维细胞来基因编辑 CCR5 基因

[0233] 在 10,000 个细胞 / 孔的密度下,在转染培养基中将原代人成纤维细胞铺放在用重组人纤连蛋白和重组人玻连蛋白(所述重组人纤连蛋白和重组人玻连蛋白各自用 DMEM/F12 稀释至 1 μ g/mL、1mL/ 孔的浓度,在室温下孵育 1h) 涂布的 6 孔板中。第二天,如在实施例 3 中转染细胞,除了 RNA 的剂量为 0.5 μ g/ 孔,并且根据实施例 19 合成 RNA。第二天开始,根据实施例 11 重新编程细胞。如在实施例 11 中,具有重新编程的形态特征的细胞大集落变为可见的。在第 9 天拍摄照片(图 8)。

[0234] 实施例 21 用 RNA TALEN 和 DNA 修复模板转染细胞

[0235] 首先用复合培养基(**Opti-MEM®**)将含有从靶向双链断裂位置的 500bp 上游跨越至靶向双链断裂位置的 500bp 下游的 1001bp- 区的 0.5ug RNA+0.5ug DNA 和 6 μ L 转染试剂(Lipofectamine™2000,Life Technologies Corporation) 分别稀释至各自 60 μ L 的总体积。根据转染试剂制造商的指示,然后混合稀释的 RNA+DNA 和转染试剂并且在室温下孵育 15min。然后将复合物添加至培养的细胞中。向 6 孔板的每个孔中添加 60 μ L 与 120 μ L 之间,每个孔已经含有 2mL 的转染培养基。然后轻轻摇晃板以使复合物分布在每个孔中。在用新鲜转染培养基(2mL/ 孔) 替换培养基之前,使用复合物孵育细胞 2 小时至过夜。

[0236] 实施例 22 使用 RNA TALEN 和 DNA 修复模板以及无 DNA、无供给者、无免疫抑制剂、无调节重新编程人成纤维细胞来基因编辑

[0237] 在 10,000 个细胞 / 孔的密度下在成纤维细胞培养基(DMEM+10%胎牛血清) 中将原代人成纤维细胞铺放在 6 孔板中。6 小时后,用含有处理过的 HSA 并且不含有免疫抑制剂的转染培养基替换培养基,并且根据实施例 21 转染细胞。第二天开始,根据实施例 11 或实施例 12 重新编程细胞,除了省略初始铺放和培养基变化步骤。

[0238] 实施例 23 造血细胞的产生

[0239] 根据实施例 11 重新编程细胞,并且然后在 IMDM+0.5% HSA+1x ITS 补充剂 +450 μ M 单硫代甘油 +2mM L- 谷氨酰胺 +1X 非必需氨基酸 +50ng/mL BMP4+50ng/mL VEGF+50ng/mL bFGF 中培养 6 天,以便产生造血细胞(图 5B)。可选地,根据实施例 11 或实施例 12 或实施例 20 或实施例 22 重新编程细胞,并且然后在 IMDM+0.5% HSA+1x ITS 补充剂 +450 μ M 单硫代甘油 +2mM L- 谷氨酰胺 +1X 非必需氨基酸 +50ng/mL BMP4+50ng/mL VEGF+50ng/mL bFGF 中培养 6 天,接着在 IMDM+0.5% HSA+1 x ITS 补充剂 +0.1mM2- 巯基乙醇 +5U/mL 肝素 +10ng/mL TP0+25ng/mL SCF+25ng/mL FLT3L+10ng/mL IL-3+10ng/mL IL-6 中培养 8 天,以便产生造血细胞。可选地,根据实施例 11 或实施例 12 或实施例 20 或实施例 22 重新编程细胞,并且然后重新铺放在胶原 IV 上并且在 IMDM+0.5% HSA+1x ITS 补充剂 +450 μ M 单硫代甘油 +2mM L- 谷氨酰胺 +1X 非必需氨基酸 +50ng/mL BMP4+50ng/mL VEGF+50ng/mL bFGF 中培养 6 天,接着在 IMDM+0.5% HSA+1x ITS 补充剂 +0.1mM2- 巯基乙醇 +5U/mL 肝素 +10ng/mL TP0+25ng/mL SCF+25ng/mL FLT3L+10ng/mL IL-3+10ng/mL IL-6 中培养 8 天,以便产生造血细胞。可选地,根据实施例 11 或实施例 12 或实施例 20 或实施例 22 重新编程细胞,并且然后在 1:1F12/IMDM+0.5% HSA+1x ITS 补充剂 +4.5 μ g/mL 胆固

醇 +10 μ g/mL 鱼肝油脂肪酸 +25 μ g/mL 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯 +2 μ g/mL D- α -生育酚乙酸酯 +450 μ M 单硫代甘油 +2mM L-谷氨酰胺 +25ng/mL BMP4+25ng/mL VEGF+25ng/mL bFGF+20ng/mL SCF 中培养 10 天,以便产生造血细胞。

[0240] 实施例 24 用于包含重新编程细胞的血液疾病的个性化细胞替代疗法

[0241] 根据实施例 23 使患者皮肤细胞重新编程为造血细胞。然后从培养容器中释放细胞,并且经过若干小时的时间段将每千克患者体重约 1×10^6 个与约 1×10^7 个之间的细胞灌注到主静脉中。

[0242] 实施例 25 用于包含基因编辑细胞和重新编程细胞的 HIV/AIDS 的个性化细胞替代疗法

[0243] 根据实施例 23 使患者皮肤细胞基因编辑和重新编程为造血细胞。然后从培养容器中酶促释放细胞,并且经过若干小时的时间段将每千克患者体重约 1×10^6 个与约 1×10^7 个之间的细胞灌注到主静脉中。造血干细胞回到骨髓腔并且植入。可选地,根据实施例 23 使患者皮肤细胞基因编辑和重新编程为造血细胞,然后从培养容器中酶促释放细胞,并且分离 CD34+/CD90+/Lin- 细胞或 CD34+/CD49f+/Lin- 细胞。将约 1×10^3 个与约 1×10^5 个之间的细胞灌注到患者的主静脉中。造血干细胞回到骨髓腔并且植入。

[0244] 实施例 26 用于筛选生物活性分子的心脏病模型

[0245] 根据实施例 11 重新编程细胞,并且然后在 DMEM/F12+0.2% HSA+0.5X N2 补充剂 +0.5X B27 补充剂 +100ng/mL 活化素 A+1 μ M 渥曼青霉素中培养 4 天,接着在 1:1F12/IMDM+0.5% HSA+0.5% ITS 补充剂 +0.5X B27 补充剂 +2 μ M 视黄酸 +20ng/mL FGF7+50ng/mL NOGGIN 中培养 4 天,接着在 DMEM/F12+1% ITS 补充剂 +10ng/mL bFGF+10mM 烟酰胺 +50ng/mL 艾塞那肽 -4+10ng/mL BMP4 中培养 7 至 9 天,以便产生心脏细胞(图 5C)。可选地,根据实施例 12 重新编程细胞。虽然可以使心脏细胞与存在于培养物中的其它细胞分离,但是这种方法产生了足够高百分比的一般不要求此类分离的心脏细胞。所得到的细胞可以在体外或体内用于筛选心脏病研究或开发用于心脏病的治疗剂的生物活性分子。所得到的细胞还可以用于心脏毒性筛选。

[0246] 实施例 27 用于包含重新编程细胞的缺血性心肌病的个性化细胞替代疗法

[0247] 根据实施例 26 使患者皮肤细胞重新编程为心脏细胞。然后从培养容器中酶促释放细胞,并且将约 1×10^6 个与约 1×10^7 个之间的细胞注射到心包中或将约 1×10^3 个与约 1×10^5 个之间的细胞注射到一个或多个冠状动脉中。细胞植入,并且需要时进行额外注射。

[0248] 实施例 28 用于筛选生物活性分子的视网膜疾病模型

[0249] 根据实施例 11 或实施例 12 重新编程细胞,并且然后在 DMEM/F12+0.2% HSA+0.5X N2 补充剂 +0.5X B27 补充剂中培养 7 天以产生视网膜细胞。所得到的细胞可以在体外或体内用于筛选视网膜疾病研究或开发用于视网膜疾病的治疗剂的生物活性分子。

[0250] 实施例 29 用于包含重新编程细胞的黄斑变性的个性化细胞替代疗法

[0251] 根据实施例 28 使患者皮肤细胞重新编程为视网膜细胞。然后从培养容器中酶促释放细胞,并且将约 1×10^4 个与约 1×10^5 个之间的细胞注射到视网膜中或视网膜下。细胞植入,并且需要时进行额外注射。

[0252] 等效方案

[0253] 本领域技术人员仅使用常规实验将认识到或能够确定本文确切描述的具体实施

方案的许多等效方案。此类等效方案意图涵盖在以下权利要求书的范围中。

[0254] 以引用的方式并入

[0255] 本文引用的所有专利和出版物特此以引用的方式整体并入。

[0001]

序列表

<110> Factor Bioscience Inc.
 Angel, Matthew
 <120> 用于转染细胞的方法和产品
 <130> FABI-001/01WO
 <150> US 61/566,948
 <151> 2011-12-05
 <160> 4
 <170> PatentIn 3.5 版
 <210> 1
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1
 Met Ala Gly His Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Asp Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro
 20 25 30
 Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly
 35 40 45
 Pro Gly Val Gly Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro
 50 55 60
 Pro Pro Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Gly Val Gly Leu Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu
 85 90 95
 Gly Glu Ala Gly Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro
 100 105 110
 Glu Pro Cys Thr Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys
 115 120 125
 Leu Glu Gln Asn Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys
 130 135 140
 Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu
 145 150 155 160
 Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly
 165 170 175
 Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu
 180 185 190
 Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val
 195 200 205
 Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu

[0002]

```

210          215          220
Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg
225          230          235          240
Val Arg Gly Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr
245          250          255
Leu Gln Gln Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp
260          265          270
Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser
275          280          285
Ser Ser Asp Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro
290          295          300
Phe Ser Gly Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe
305          310          315          320
Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser
325          330          335
Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr
340          345          350
Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn
355          360
<210> 2
<211> 317
<212> PRT
<213> 智人
<400> 2
Met Tyr Asn Met Met Glu Thr Glu Leu Lys Pro Pro Gly Pro Gln Gln
1          5          10          15
Thr Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ser Thr Ala Ala Ala Ala Gly Gly
20          25          30
Asn Gln Lys Asn Ser Pro Asp Arg Val Lys Arg Pro Met Asn Ala Phe
35          40          45
Met Val Trp Ser Arg Gly Gln Arg Arg Lys Met Ala Gln Glu Asn Pro
50          55          60
Lys Met His Asn Ser Glu Ile Ser Lys Arg Leu Gly Ala Glu Trp Lys
65          70          75          80
Leu Leu Ser Glu Thr Glu Lys Arg Pro Phe Ile Asp Glu Ala Lys Arg
85          90          95
Leu Arg Ala Leu His Met Lys Glu His Pro Asp Tyr Lys Tyr Arg Pro
100         105         110
Arg Arg Lys Thr Lys Thr Leu Met Lys Lys Asp Lys Tyr Thr Leu Pro
115         120         125

```

[0003]

Gly Gly Leu Leu Ala Pro Gly Gly Asn Ser Met Ala Ser Gly Val Gly
 130 135 140
 Val Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Val Asn Gln Arg Met Asp Ser Tyr
 145 150 155 160
 Ala His Met Asn Gly Trp Ser Asn Gly Ser Tyr Ser Met Met Gln Asp
 165 170 175
 Gln Leu Gly Tyr Pro Gln His Pro Gly Leu Asn Ala His Gly Ala Ala
 180 185 190
 Gln Met Gln Pro Met His Arg Tyr Asp Val Ser Ala Leu Gln Tyr Asn
 195 200 205
 Ser Met Thr Ser Ser Gln Thr Tyr Met Asn Gly Ser Pro Thr Tyr Ser
 210 215 220
 Met Ser Tyr Ser Gln Gln Gly Thr Pro Gly Met Ala Leu Gly Ser Met
 225 230 235 240
 Gly Ser Val Val Lys Ser Glu Ala Ser Ser Ser Pro Pro Val Val Thr
 245 250 255
 Ser Ser Ser His Ser Arg Ala Pro Cys Gln Ala Gly Asp Leu Arg Asp
 260 265 270
 Met Ile Ser Met Tyr Leu Pro Gly Ala Glu Val Pro Glu Pro Ala Ala
 275 280 285
 Pro Ser Arg Leu His Met Ser Gln His Tyr Gln Ser Gly Pro Val Pro
 290 295 300
 Gly Thr Ala Ile Asn Gly Thr Leu Pro Leu Ser His Met
 305 310 315
 <210> 3
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 3
 Met Arg Gln Pro Pro Gly Glu Ser Asp Met Ala Val Ser Asp Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Ala Ser Gly Pro Ala Gly Arg Glu Lys
 20 25 30
 Thr Leu Arg Gln Ala Gly Ala Pro Asn Asn Arg Trp Arg Glu Glu Leu
 35 40 45
 Ser His Met Lys Arg Leu Pro Pro Val Leu Pro Gly Arg Pro Tyr Asp
 50 55 60
 Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Thr Asp Leu Glu Ser Gly Gly Ala Gly
 65 70 75 80

[0004]

Ala Ala Cys Gly Gly Ser Asn Leu Ala Pro Leu Pro Arg Arg Glu Thr
 85 90 95
 Glu Glu Phe Asn Asp Leu Leu Asp Leu Asp Phe Ile Leu Ser Asn Ser
 100 105 110
 Leu Thr His Pro Pro Glu Ser Val Ala Ala Thr Val Ser Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Gly Pro Ala Ser Ala
 130 135 140
 Pro Ser Thr Cys Ser Phe Thr Tyr Pro Ile Arg Ala Gly Asn Asp Pro
 145 150 155 160
 Gly Val Ala Pro Gly Gly Thr Gly Gly Gly Leu Leu Tyr Gly Arg Glu
 165 170 175
 Ser Ala Pro Pro Pro Thr Ala Pro Phe Asn Leu Ala Asp Ile Asn Asp
 180 185 190
 Val Ser Pro Ser Gly Gly Phe Val Ala Glu Leu Leu Arg Pro Glu Leu
 195 200 205
 Asp Pro Val Tyr Ile Pro Pro Gln Gln Pro Gln Pro Pro Gly Gly Gly
 210 215 220
 Leu Met Gly Lys Phe Val Leu Lys Ala Ser Leu Ser Ala Pro Gly Ser
 225 230 235 240
 Glu Tyr Gly Ser Pro Ser Val Ile Ser Val Ser Lys Gly Ser Pro Asp
 245 250 255
 Gly Ser His Pro Val Val Val Ala Pro Tyr Asn Gly Gly Pro Pro Arg
 260 265 270
 Thr Cys Pro Lys Ile Lys Gln Glu Ala Val Ser Ser Cys Thr His Leu
 275 280 285
 Gly Ala Gly Pro Pro Leu Ser Asn Gly His Arg Pro Ala Ala His Asp
 290 295 300
 Phe Pro Leu Gly Arg Gln Leu Pro Ser Arg Thr Thr Pro Thr Leu Gly
 305 310 315 320
 Leu Glu Glu Val Leu Ser Ser Arg Asp Cys His Pro Ala Leu Pro Leu
 325 330 335
 Pro Pro Gly Phe His Pro His Pro Gly Pro Asn Tyr Pro Ser Phe Leu
 340 345 350
 Pro Asp Gln Met Gln Pro Gln Val Pro Pro Leu His Tyr Gln Glu Leu
 355 360 365
 Met Pro Pro Gly Ser Cys Met Pro Gln Glu Pro Lys Pro Lys Arg Gly
 370 375 380

[0005]

Arg Arg Ser Trp Pro Arg Lys Arg Thr Ala Thr His Thr Cys Asp Tyr
385 390 395 400

Ala Gly Cys Gly Lys Thr Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His
405 410 415

Leu Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr His Cys Asp Trp Asp Gly
420 425 430

Cys Gly Trp Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg
435 440 445

Lys His Thr Gly His Arg Pro Phe Gln Cys Gln Lys Cys Asp Arg Ala
450 455 460

Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Phe
465 470 475

<210> 4
<211> 454
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Met Asp Phe Phe Arg Val Val Glu Asn Gln Gln Pro Pro Ala Thr Met
1 5 10 15

Pro Leu Asn Val Ser Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr Asp
20 25 30

Ser Val Gln Pro Tyr Phe Tyr Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr Gln
35 40 45

Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp Ile
50 55 60

Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser Arg
65 70 75 80

Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Thr Pro Phe Ser
85 90 95

Leu Arg Gly Asp Asn Asp Gly Gly Gly Gly Ser Phe Ser Thr Ala Asp
100 105 110

Gln Leu Glu Met Val Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn Gln
115 120 125

Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile Ile
130 135 140

Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys Leu Val
145 150 155 160

Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Gly Ser
165 170 175

[0006]

Pro Asn Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr
 180 185 190
 Leu Gln Asp Leu Ser Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val
 195 200 205
 Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Ala
 210 215 220
 Ser Gln Asp Ser Ser Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser
 225 230 235 240
 Ser Thr Glu Ser Ser Pro Gln Gly Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His
 245 250 255
 Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu
 260 265 270
 Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Ala Pro
 275 280 285
 Gly Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala Gly Gly His Ser Lys
 290 295 300
 Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His
 305 310 315 320
 Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala
 325 330 335
 Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser
 340 345 350
 Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn
 355 360 365
 Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu
 370 375 380
 Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala
 405 410 415
 Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 420 425 430
 Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln
 435 440 445
 Leu Arg Asn Ser Cys Ala
 450

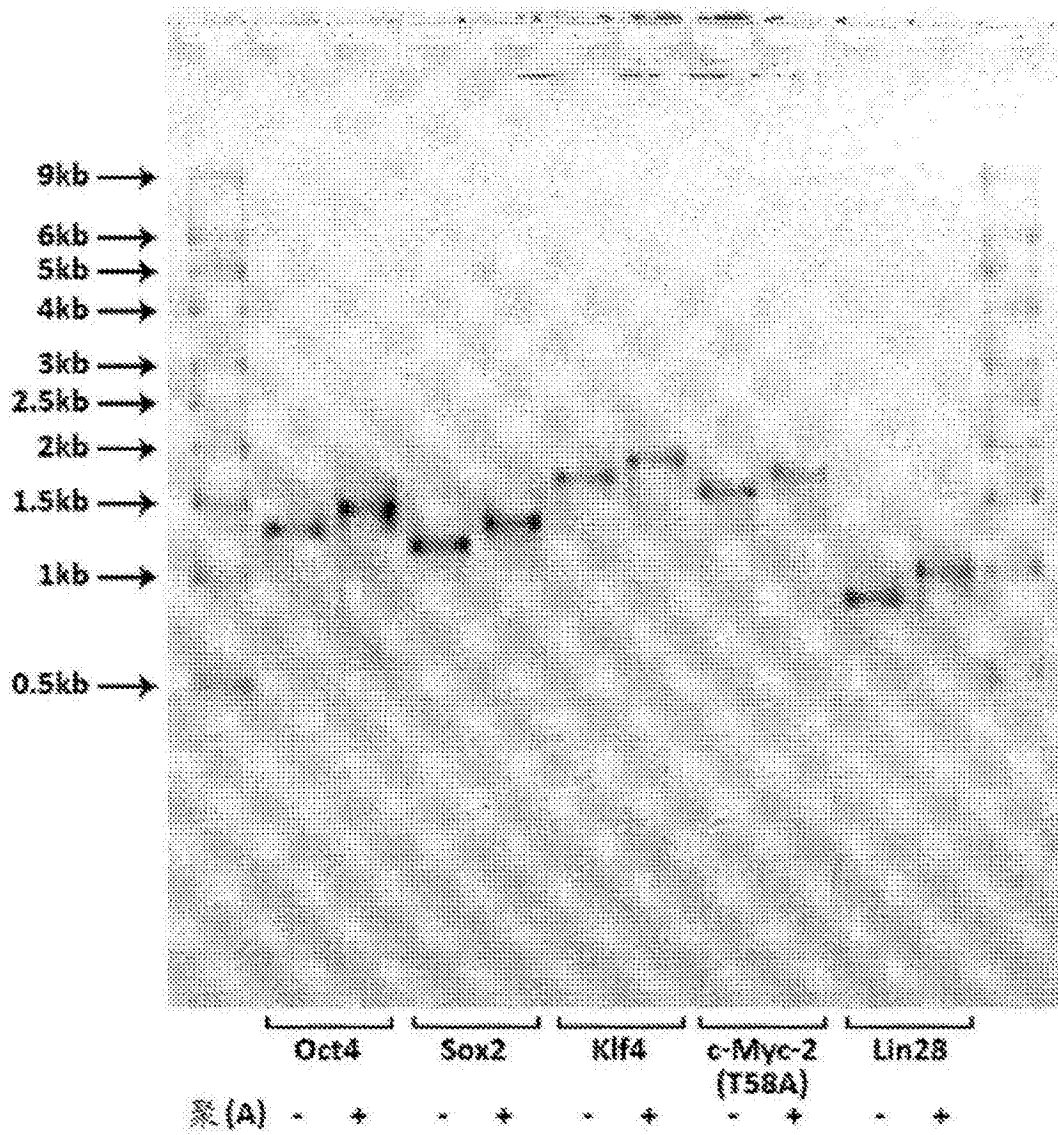


图 1

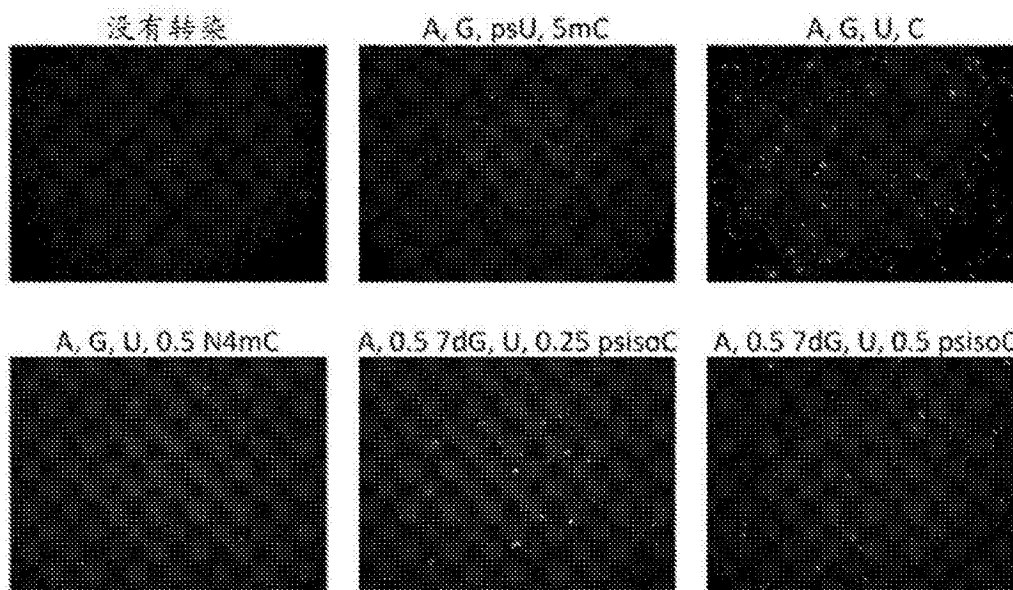


图 2A

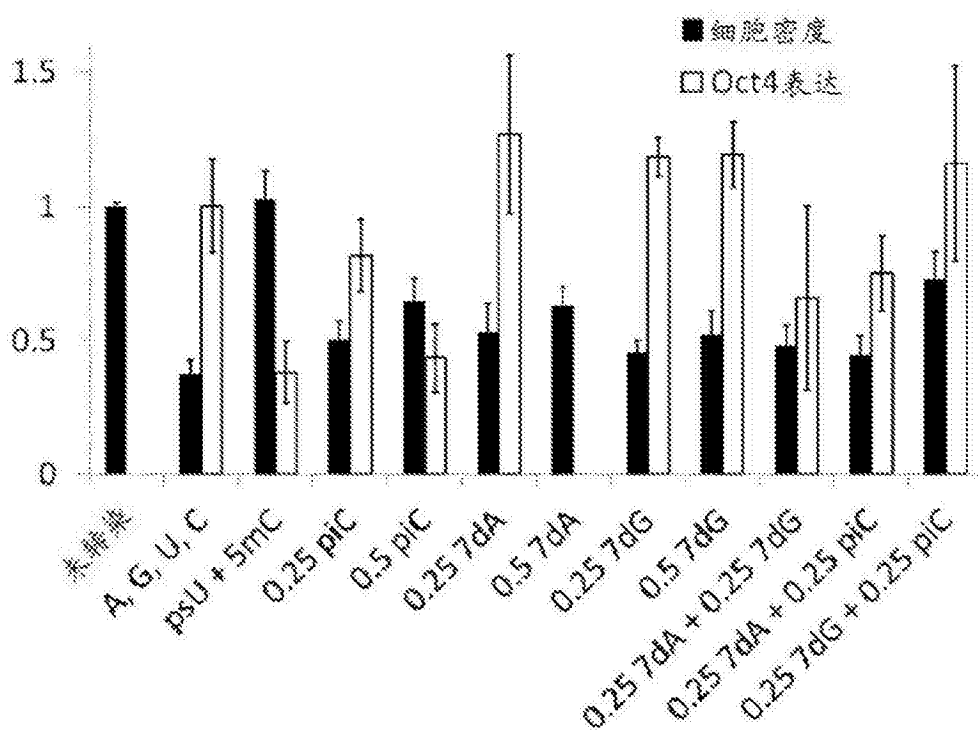


图 2B

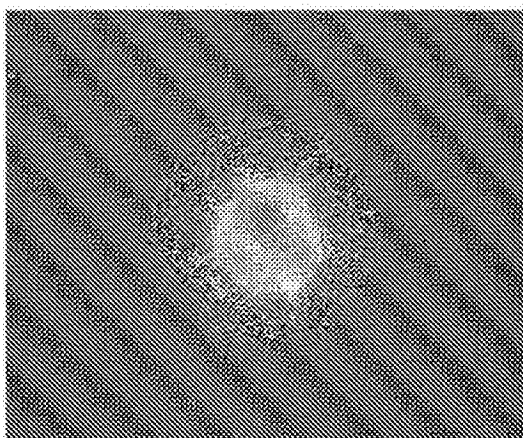


图 3A

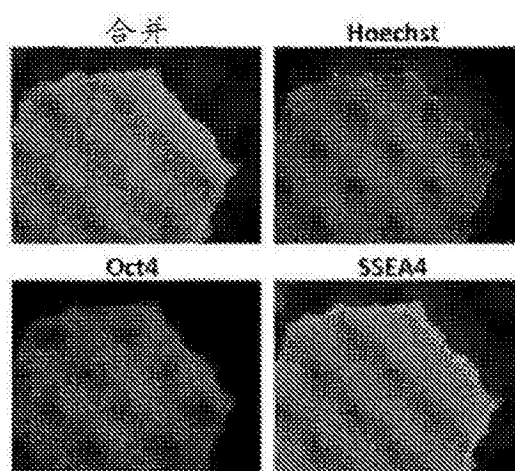


图 3B

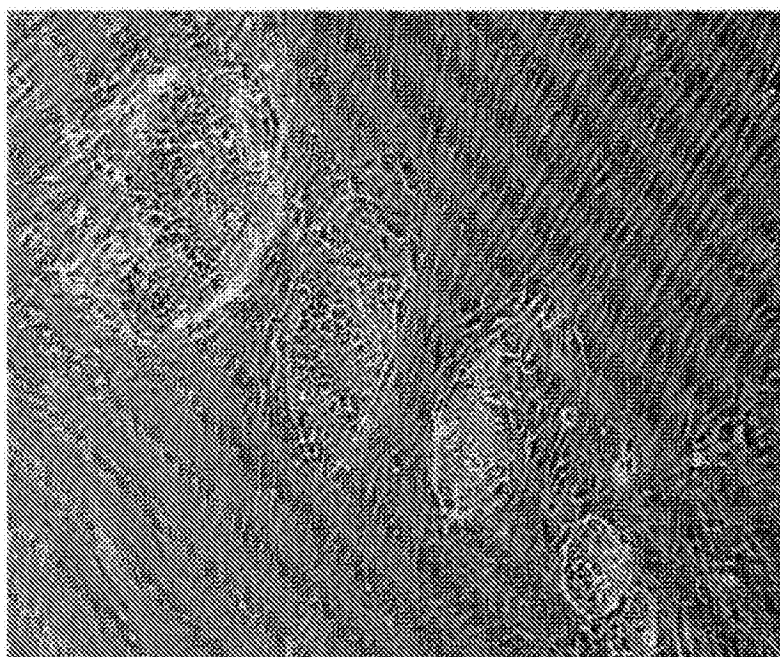


图 3C

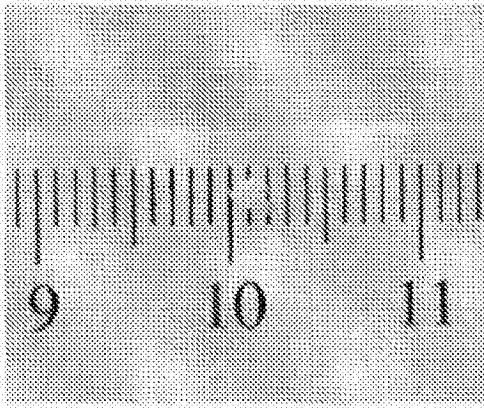


图 4A

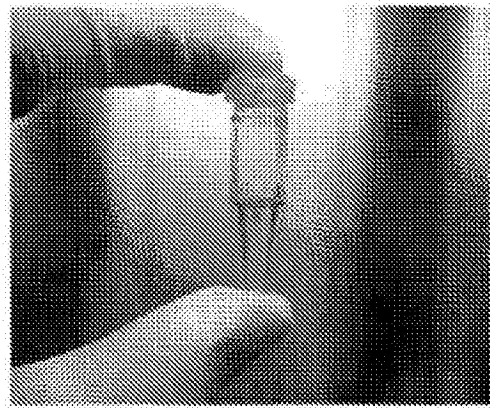


图 4B

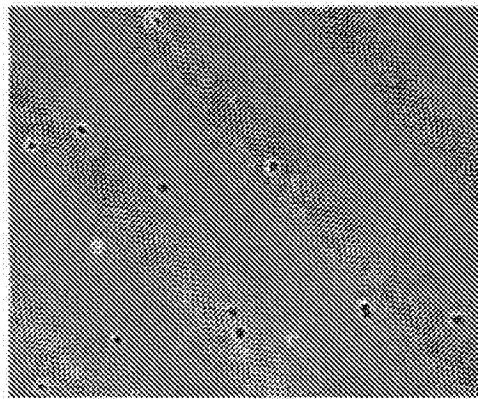


图 4C

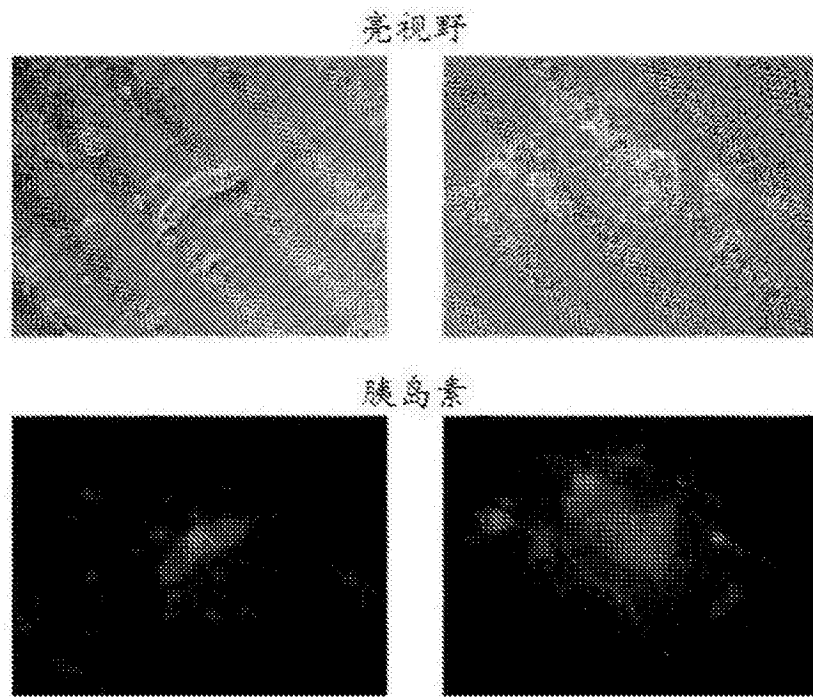


图 5A

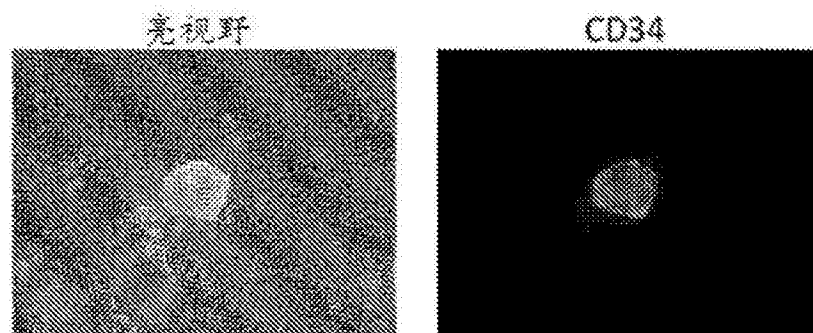


图 5B

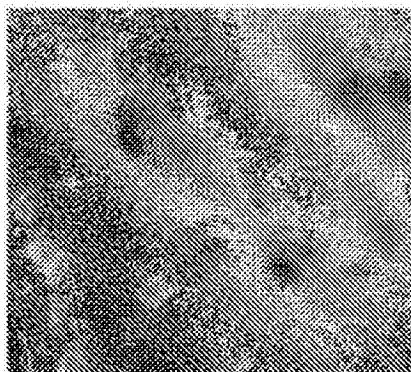


图 5C

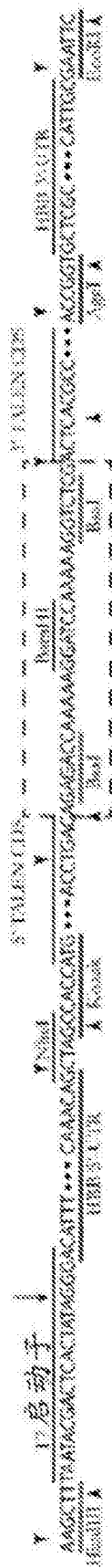


图 6A

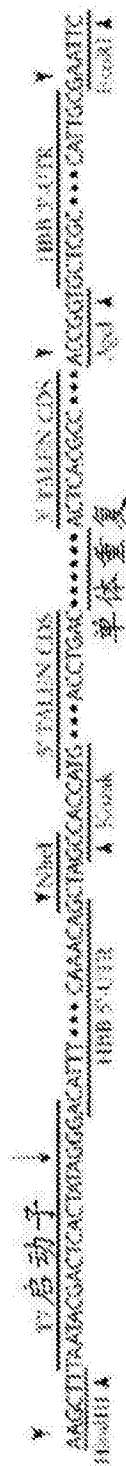


图 6B

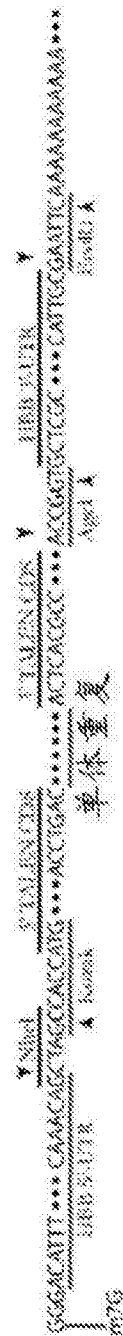


图 6C

AAATATC (RVD N1, 100% A)
AAAGGA (RVD NG, 100% T)
CATGAC (RVD HD, 100% C)
AAACAAC (RVD NN, 100% G 或 A)

55

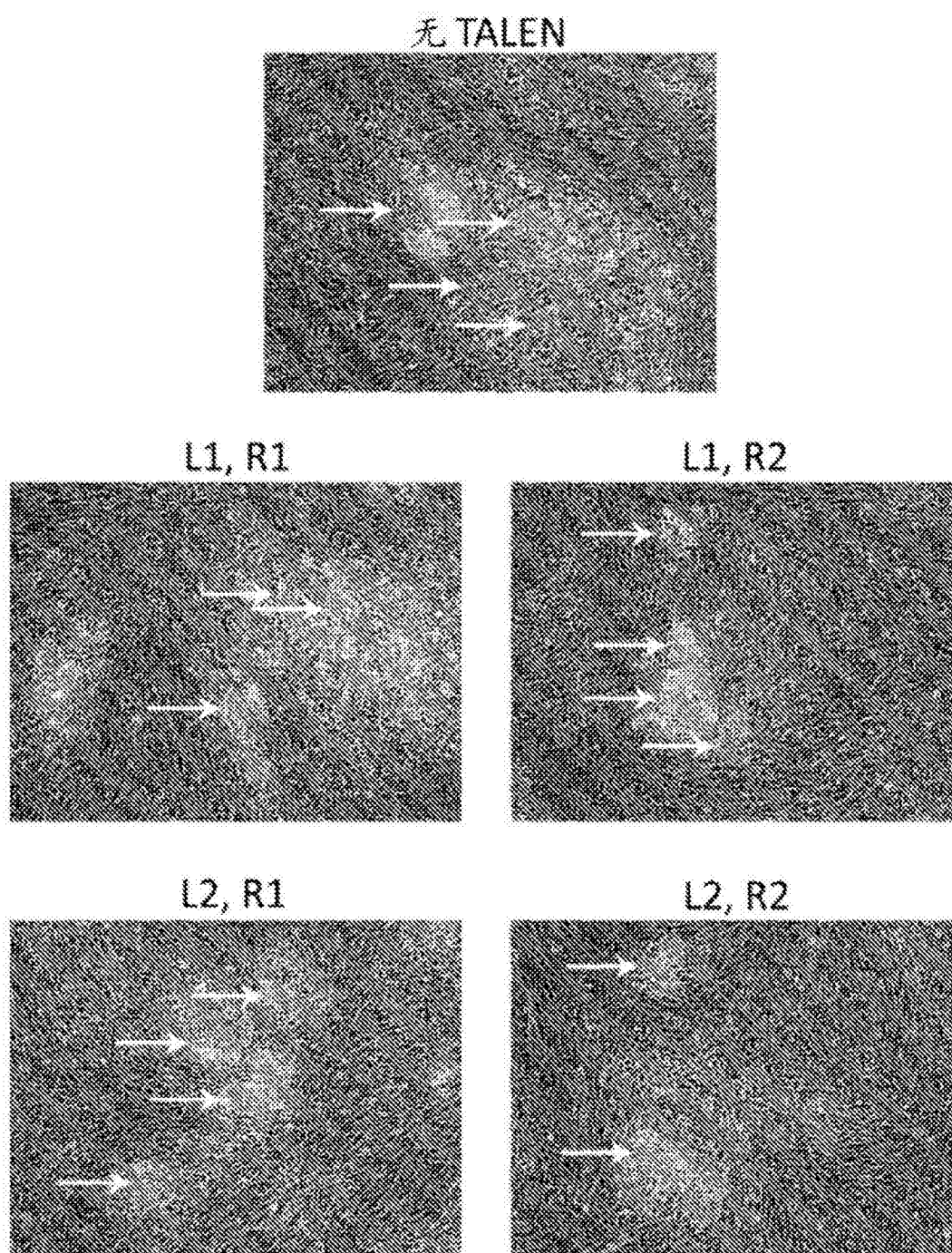


图 8

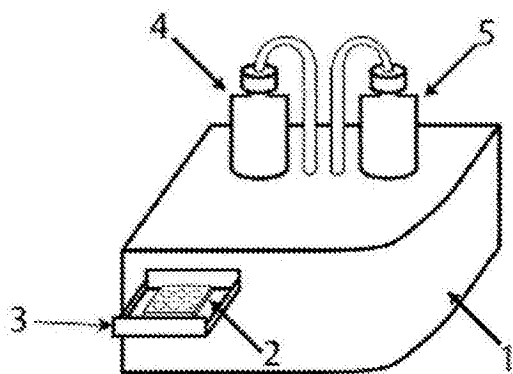


图 9A

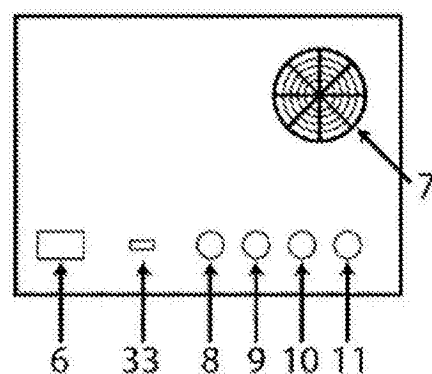


图 9B

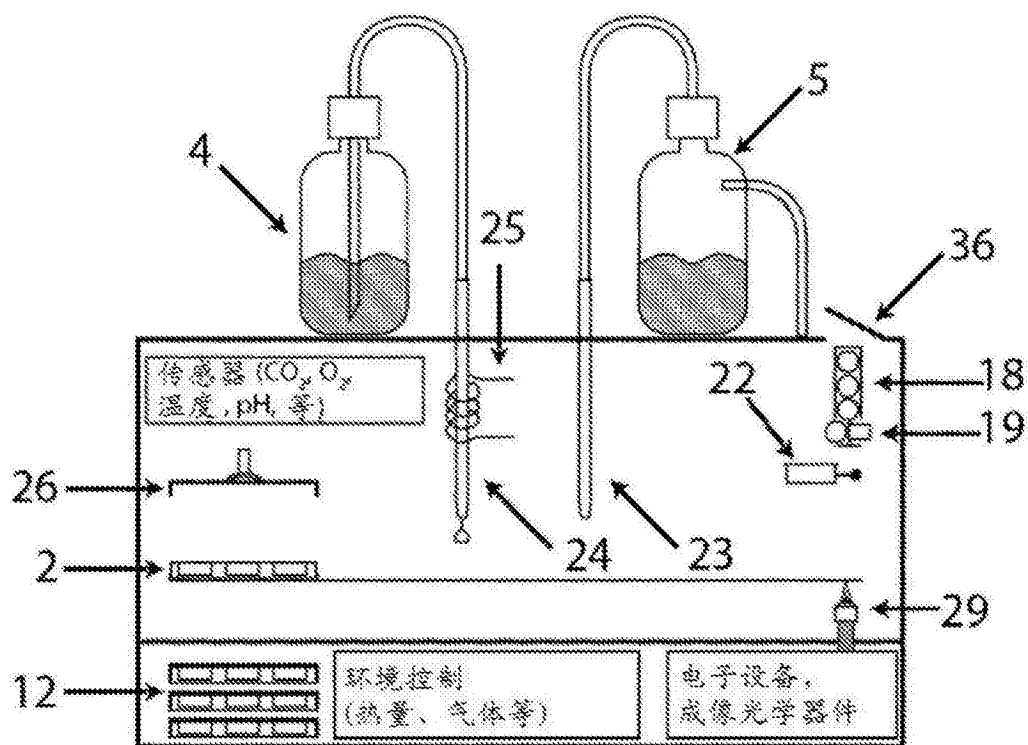


图 9C

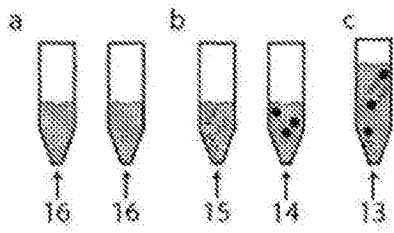


图 10A

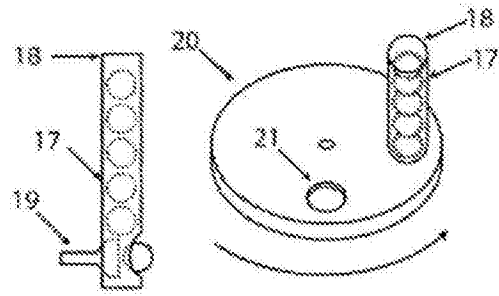


图 10B

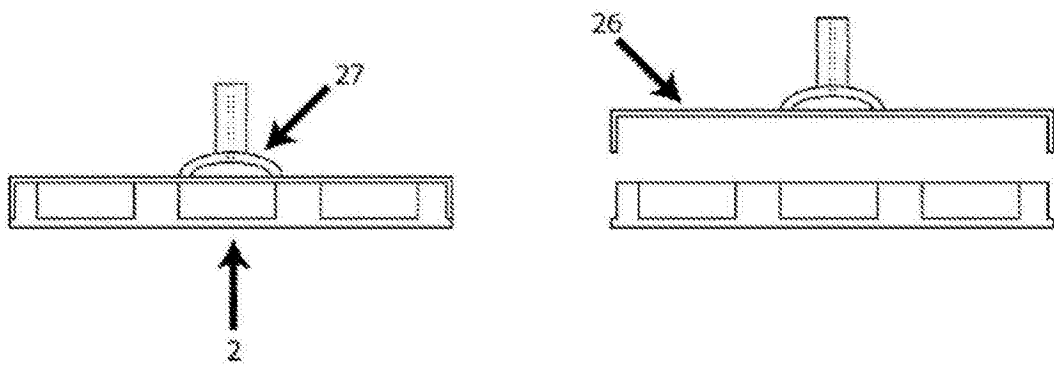


图 10C

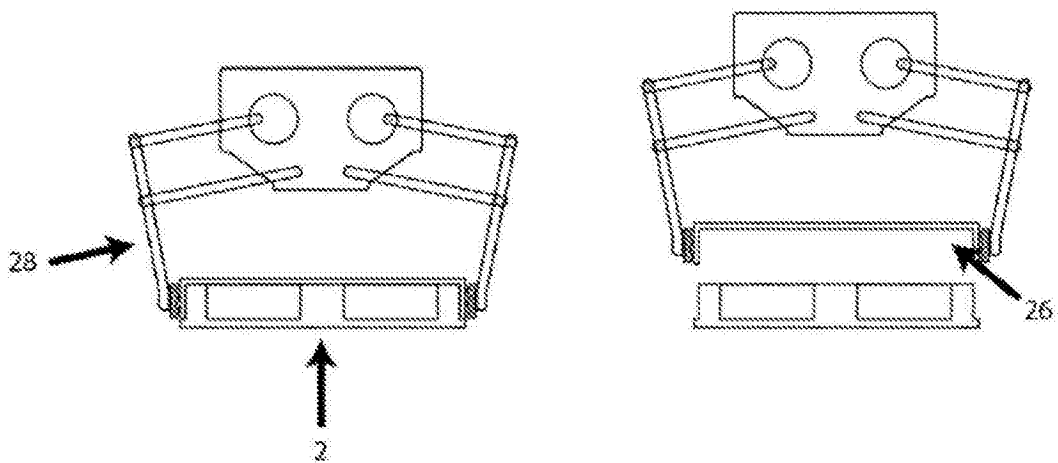


图 10D

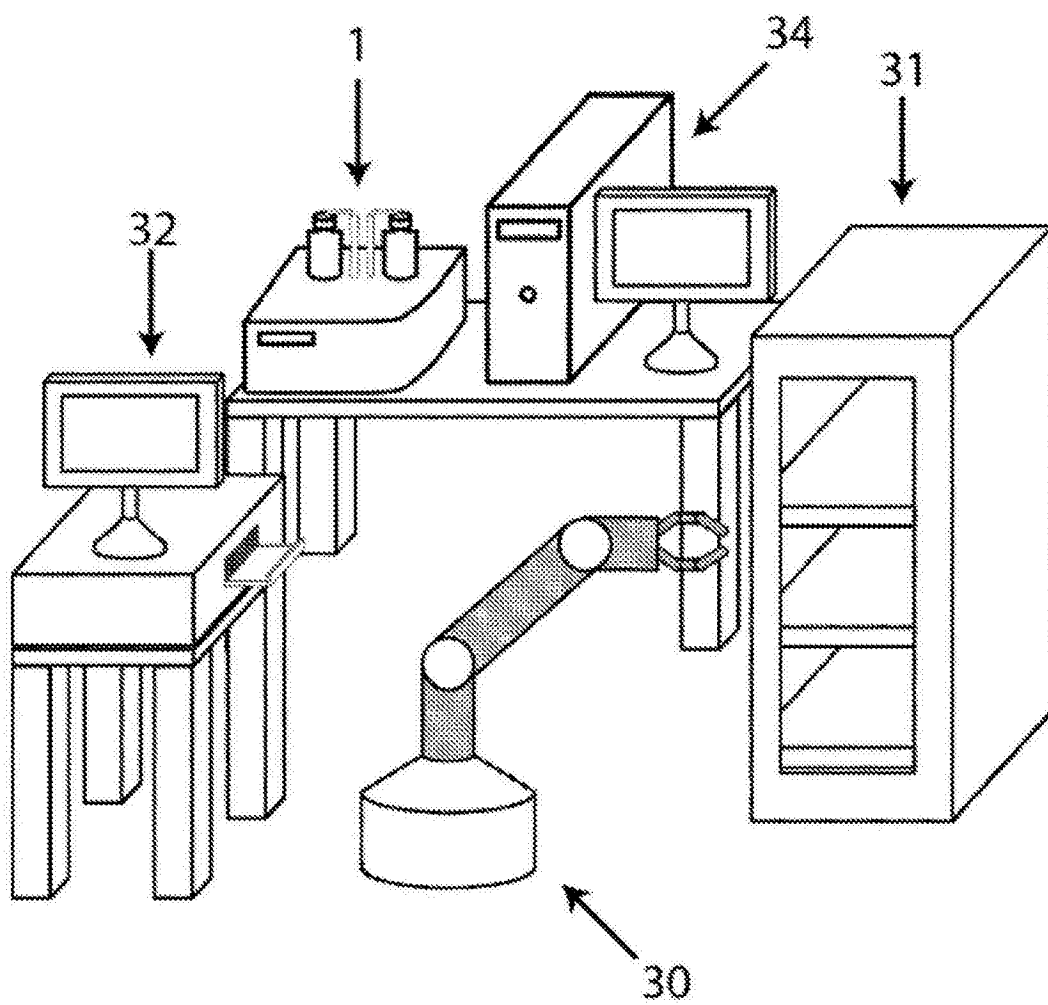


图 11