



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108778299 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201780016762.2

(22)申请日 2017.01.12

(30)优先权数据

62/277,784 2016.01.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/013229 2017.01.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/123789 EN 2017.07.20

(71)申请人 隆萨沃克斯维尔股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 E·阿伯拉翰 T·佩恩 R·J·杨

I·弗里德里希本宁

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 余颖 陈扬扬

(51)Int.Cl.

A61K 35/545(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 5/00(2006.01)

C12N 5/04(2006.01)

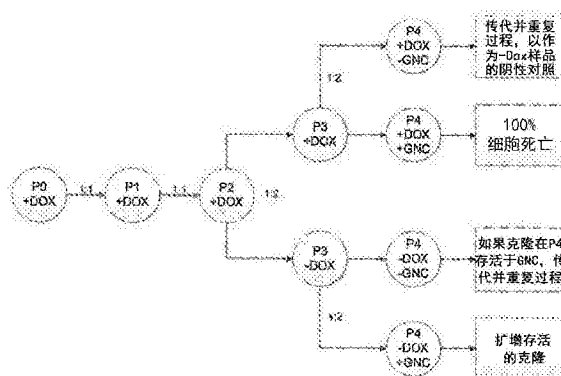
权利要求书6页 说明书34页 附图1页

(54)发明名称

生成无载体诱导多能干细胞的载体和方法

(57)摘要

本发明主要涉及生成不含重编程载体的诱导多能干细胞(iPSC)的方法。在一些实施方式中,本发明涉及通过导入包括至少一个表达盒的附加型载体在体细胞中诱导多能性,所述表达盒含有重编程因子和/或合成转录因子和自杀基因。在一些实施方式中,本发明涉及通过导入包括表达盒的附加型载体在体细胞中诱导多能性,所述表达盒含有重编程因子和/或合成转录因子和转录调节EBNA-1基因。在一些实施方式中,本发明涉及通过导入包括表达盒的附加型载体在体细胞中诱导多能性,所述表达盒含有重编程因子和/或合成转录因子以及自杀基因和转录调节EBNA-1基因。



1. 一种生成基本上不含重编程载体的诱导人类多能干细胞 (iPSC) 的方法, 其包括:
 - (a) 将重编程载体导入人类体细胞以生成第一细胞群, 其中, 所述重编程载体包括病毒复制起点, 编码 iPSC 重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒, 以及自杀基因;
 - (b) 培养所述第一细胞群以实现重编程因子、合成转录因子或两者的表达, 从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群;
 - (c) 将所述第二细胞群与自杀基因底物接触以生成基本上不含重编程载体的 iPSC。
2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述自杀基因选自胸苷激酶和胞嘧啶脱氨酶。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述复制起点是 OriP。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 其中, 所述表达盒包括多核苷酸, 其编码 EBV 的 EBNA-1, 缺失 EBNA-1 残基 65-89 的 EBNA-1 衍生物, 缺失 EBNA-1 残基 90-328 的 EBNA-1 衍生物, 或缺失 EBNA-1 残基 65-328 的 EBNA-1 衍生物。
5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的方法, 其中, 所述体细胞选自人外周血单核细胞、成纤维细胞、角化细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞、胃细胞和 β 细胞。
6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的方法, 其中, 所述 iPSC 重编程因子选自 Sox-2、Oct-4、Nanog、KLF4、cMYC、Lin-28 和 p53DD 中的一种或多种。
7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的方法, 其中, 所述 iPSC 重编程因子选自 Sox-2、Oct-4 或 Sox-2 和 Oct-4 两者。
8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的方法, 其中, 所述重编程因子包括 Sox-2、Oct-4 以及 KLF4、cMYC、Lin-28 和 p53DD 中的一种或多种。
9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法, 其还包括: (d) 就所述附加型重编程载体的存在筛选 (c) 中所述细胞群。
10. 如权利要求 9 所述的方法, 其还包括: (e) 培养 (d) 中筛选的不含所述附加型重编程载体的细胞。
11. 如权利要求 9-10 中任一项所述的方法, 其中, 所述筛选包括 qPCR 载体检测试验。
12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的方法, 其还包括在步骤 (b) 之后步骤 (c) 之前继代培养所述第二细胞群。
13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 所述继代培养后, 在不进一步的传代的情况下进行步骤 (c)。
14. 一种生成基本上不含附加型重编程载体的诱导人类多能干细胞 (iPSC) 的方法, 其包括:
 - (a) 将附加型重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群, 其中所述附加型重编程载体包括:
 - (i) OriP 复制起点,
 - (ii) 编码 iPSC 重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒,
 - (iii) 多核苷酸, 其编码 EBV 的 EBNA-1, 缺失 EBNA-1 残基 65-89 的 EBNA-1 衍生物, 缺失 EBNA-1 残基 90-328 的 EBNA-1 衍生物, 或缺失 EBNA-1 残基 65-328 的 EBNA-1 衍生物, 和
 - (iv) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因;
 - (b) 培养所述第一细胞群以实现重编程因子、合成转录因子或两者的表达, 从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群;

(c) 将所述第二细胞群与自杀基因底物接触以生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC。

15. 如权利要求14所述的方法, 其中, 所述体细胞选自人外周血单核细胞、成纤维细胞、角化细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞, 胃细胞和 β 细胞。

16. 如权利要求14-15中任一项所述的方法, 其中, 所述iPSC重编程因子选自Sox-2、Oct-4、Nanog、KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。

17. 如权利要求14-16中任一项所述的方法, 其中, 所述iPSC重编程因子包括Sox-2、Oct-4或Sox-2和Oct-4两者。

18. 如权利要求14-17中任一项所述的方法, 其中, 所述iPSC重编程因子包括Sox-2、Oct-4以及KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。

19. 一种生成基本上不含重编程载体的诱导人类多能干细胞(iPSC)的方法, 其包括:

(a) 将重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群, 其中所述重编程载体包括(i) 病毒复制起点, (ii) 编码iPSC重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒, (iii) 调节所述重编程载体染色体外复制以及分配的基因, 以及(iv) 调节型启动子系统;

(b) 培养所述第一细胞群以实现所述重编程因子、所述合成转录因子或两者的表达, 从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群, 其中所述附加型重编程载体在培养所述第一细胞群期间复制;

(c) 培养所述第二细胞群, 其中对所述调节所述重编程载体染色体外复制以及分配的基因进行调节以使所述重编程载体在细胞分裂期间丧失, 从而生成基本上不含所述重编程载体的iPSC。

20. 如权利要求19所述的方法, 其中, 所述调节所述附加型重编程载体转录的基因包括四环素或四环素衍生物活化系统。

21. 如权利要求20所述的方法, 其中, 步骤(b)中所述的培养期间存在多西环素, 而步骤(c)中不存在多西环素。

22. 如权利要求20所述的方法, 其中, 步骤(b)中所述的培养期间不存在多西环素, 而步骤(c)中存在多西环素。

23. 如权利要求19-22中任一项所述的方法, 其中, 所述复制起点是OriP。

24. 如权利要求19-23中任一项所述的方法, 其中, 所述表达盒包括多核苷酸, 其编码EBV的EBNA-1, 缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物, 缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物, 或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物。

25. 如权利要求19-24中任一项所述的方法, 其中, 所述体细胞选自人外周血单核细胞、成纤维细胞、角化细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞, 胃细胞和 β 细胞。

26. 如权利要求19-25中任一项所述的方法, 其中, 所述iPS重编程因子选自Sox-2、Oct-4、Nanog、KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。

27. 如权利要求19-26中任一项所述的方法, 其中, 所述iPS重编程因子包括Sox-2、Oct-4或Sox-2和Oct-4。

28. 如权利要求19-27中任一项所述的方法, 其中, 所述重编程因子包括Sox-2、Oct-4以及KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。

29. 如权利要求19-28中任一项所述的方法, 其还包括: (d) 就所述附加型重编程载体的

存在筛选(c)中所述细胞群。

30. 如权利要求29所述的方法,其还包括:(e)培养(d)中筛选的不含所述附加型重编程载体的细胞。

31. 如权利要求29-30中任一项所述的方法,其中,所述筛选包括qPCR载体检测试验。

32. 如权利要求19-31中任一项所述的方法,其还包括将所述第一细胞群传代。

33. 如权利要求19-31中任一项所述的方法,其中,在不将所述第一细胞群传代的情况下进行步骤(c)。

34. 一种生成基本上不含附加型重编程载体的诱导人类多能干细胞(iPSC)的方法,其包括:

(a) 将附加型重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群,其中所述附加型重编程载体包括:

(i) OriP复制起点,

(ii) 编码iPSC重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒,

(iii) 多核苷酸,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物,和

(iv) 四环素或四环素衍生物调节型启动子系统(TetOn或TetOff);

(b) 培养所述第一细胞群以生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群,其中所述附加型重编程载体在培养期间复制;

(c) 培养所述第二细胞群以生成第三细胞群,其中所述附加型重编程载体在培养期间不复制;

(d) 从所述第三细胞群选取集落以生成第四细胞群;并且

(e) 培养所述第四细胞群以生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC。

35. 如权利要求34所述的方法,其中,所述体细胞选自成纤维细胞、角化细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞,胃细胞和 β 细胞。

36. 如权利要求34-35中任一项所述的方法,其中,所述iPS重编程因子选自Sox-2、Oct-4、Nanog、KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。

37. 如权利要求34-36中任一项所述的方法,其中,所述iPS重编程因子包括Sox-2、Oct-4或Sox-2和Oct-4。

38. 如权利要求34-37中任一项所述的方法,其中,所述重编程因子包括Sox-2、Oct-4以及KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。

39. 一种生成基本上不含重编程载体的诱导人类多能干细胞(iPSC)的方法,其包括:

(a) 将重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群,其中所述重编程载体包括(i) 病毒复制起点,(ii) 编码iPSC重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒,(iii) 调节所述重编程载体染色体外复制以及分配的基因,(iv) 调节型启动子系统,以及(v) 自杀基因;

(b) 培养所述第一细胞群以实现重编程因子、合成转录因子或两者的表达,从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群,其中所述重编程载体在培养期间复制;

(c) 培养所述第二细胞群,其中对所述调节染色体外复制以及分配的基因进行调节以使所述重编程载体在细胞分裂期间丧失,从而生成包括大体上不含所述重编程载体的iPSC的第三细胞群;

- (d) 将所述第三细胞群与自杀基因底物接触以生成基本上不含重编程载体的iPSC。
40. 如权利要求39所述的方法,其中,所述自杀基因选自胸苷激酶和胞嘧啶脱氨酶。
41. 如权利要求39或40所述的方法,其中,所述复制起点是OriP。
42. 如权利要求39-41中任一项所述的方法,其中,所述表达盒包括多核苷酸,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物。
43. 如权利要求39-42中任一项所述的方法,其中,所述体细胞选自成纤维细胞、角化细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞,胃细胞和 β 细胞。
44. 如权利要求39-43中任一项所述的方法,其中,所述iPSC重编程因子选自Sox-2、Oct-4、Nanog、KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。
45. 如权利要求39-44中任一项所述的方法,其中,所述iPSC重编程因子包括Sox-2、Oct-4或Sox-2和Oct-4。
46. 如权利要求39-45中任一项所述的方法,其中,所述重编程因子包括Sox-2,Oct-4以及KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。
47. 如权利要求39-46中任一项所述的方法,其中,所述调节所述表达盒转录的基因包括四环素或四环素衍生物活化系统,所述表达盒编码所述iPSC重编程因子。
48. 如权利要求39-47中任一项所述的方法,其中,步骤(b)中所述培养期间存在多西环素,而步骤(c)中不存在多西环素。
49. 如权利要求39-47中任一项所述的方法,其中,步骤(b)中所述培养期间不存在多西环素,而步骤(c)中存在多西环素。
50. 如权利要求39-49中任一项所述的方法,其还包括:(e)就所述附加型重编程载体的存在筛选(d)中所述第三细胞群。
51. 如权利要求39-50中任一项所述的方法,其中,对(d)中所述包括附加型重编程载体的第三细胞群中的细胞不进行培养。
52. 如权利要求9-10中任一项所述的方法,其中,所述筛选包括qPCR载体检测试验。
50. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其还包括将所述第一细胞群传代。
51. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中,在不将所述第一细胞群传代的情况下进行步骤(c)。
52. 一种生成基本上不含附加型重编程载体的诱导人类多能干细胞(iPSC)的方法,其包括:
- (a) 将附加型重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群,其中所述附加型重编程载体包括:
- (i) OriP复制起点,
- (ii) 编码iPSC重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒,
- (iii) 多核苷酸,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物,
- (iv) 四环素或四环素衍生物调节型启动子系统(TetOn或TetOff),和
- (v) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因;
- (b) 培养所述第一细胞群以实现所述重编程因子的表达,从而生成具有与胚胎干细胞

一致性状的第二细胞群,其中所述附加型重编程载体在培养期间复制;

(c) 培养所述第二细胞群以生成第三细胞群,所述第三细胞群包括大体上不含附加型重编程载体的iPSC,其中在培养所述第二细胞群期间,所述附加型重编程载体不复制;

(d) 将所述第三细胞群与自杀基因底物接触以生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC。

53. 如权利要求52所述的方法,其中,所述iPS重编程因子选自Sox-2、Oct-4、Nanog、KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。

54. 如权利要求52-53中任一项所述的方法,其中,所述iPS重编程因子包括Sox-2、Oct-4或Sox-2和Oct-4。

55. 如权利要求52-54中任一项所述的方法,其中,所述重编程因子包括Sox-2、Oct-4以及KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。

56. 一种附加型重编程载体,其包含:

(a) OriP复制起点;

(b) 编码iPSC重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒,和

(c) 多核苷酸分子,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物,和

(c) 自杀基因。

57. 一种附加型重编程载体,其包含:

(a) OriP复制起点;

(b) 编码iPSC重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒,

(c) 多核苷酸分子,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物,和

(d) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因。

58. 一种附加型重编程载体,其包含:

(a) OriP复制起点;

(b) 编码iPSC重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒,

(c) 多核苷酸分子,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物,和

(d) 调节型启动子系统。

59. 一种附加型重编程载体,其包含:

(a) OriP复制起点;

(b) 编码iPSC重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒,

(c) 多核苷酸分子,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物,和

(d) TetOn或TetOff系统。

60. 一种附加型重编程载体,其包含:

(a) OriP复制起点;

(b) 编码iPSC重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒;

(c) 多核苷酸分子,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失

EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物;和

(d) TetOn或TetOff系统;和

(e) 自杀基因。

61. 一种附加型重编程载体,其包含:

(a) OriP复制起点,

(b) 编码iPSC重编程因子、合成转录因子或两者的表达盒;

(c) 多核苷酸,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物;

(d) TetOn或TetOff系统,和

(e) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因。

62. 如权利要求56-61中任一项所述的载体,其中,所述iPSC重编程因子选自Sox-2、Oct-4、Nanog、KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。

63. 如权利要求56-62中任一项所述的载体,其中,所述iPS重编程因子包括Sox-2、Oct-4或Sox-2和Oct-4。

64. 如权利要求56-63中任一项所述的载体,其中,所述重编程因子包括Sox-2、Oct-4以及KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。

生成无载体诱导多能干细胞的载体和方法

背景技术

发明领域

[0001] 本发明主要涉及生成不含重编程载体的诱导多能(pluripotent)干细胞(iPSC)的方法。在一些实施方式中,本发明涉及通过导入包括至少一个表达盒的附加型(episomal)载体在体细胞中诱导多能性,所述表达盒含有重编程因子和/或合成转录因子和自杀基因。

背景技术

[0002]

[0003] 现今生成诱导多能干细胞(iPSC)的细胞重编程方法常常使用逆转录病毒来递送重编程因子。(Schlaeger等,“非整合性重编程方法的比较(A comparison of non-integrating reprogramming methods)”,*Nat Biotechnol* 33(1):58-63(2015)(“Schlaeger”)。这些病毒的RNA被逆转录进DNA并且整合至宿主细胞的基因组中。然而,这类细胞并不适用于治疗性应用的规管准则。因此,需要其它重编程方法以保证iPSC不含任何外源性DNA序列。

[0004] 如Schlaeger所总结,主要方法包括使用信使RNA转染(具有或不具有小-RNA),以及基于附加体(EBNA-1)的表达载体。基于RNA的第一种方法可以高效生成iPSC,但是在劳动力需求和成功率(方法稳健性)以及细胞种类和供体特异性上有明显的问题。

[0005] 考虑到方法所需的所有特征,附加型载体重编程存在令人兴奋的重编程“全方位(all-round)”系统。然而,由于载体保留延迟或整合至宿主细胞基因组,仍然存在的问题是在建立无外源性DNA系建立之前需要大量的传代。

[0006] 当前使用附加型载体的细胞重编程方案需要进行定量测量以保证生成的iPSC系是无载体的。新生成的iPSC通常采集自转染后20-30天的P0平板。大多数集落在采集时仍然保留载体,并且不同的iPSC克隆中载体丧失动力学不同,一些集落被鉴定为以低传代(5-10)实现无载体,而另一些以高传代(15-30)实现无载体。这就使得必需从P0平板采集许多iPSC集落,并且长时间保持对它们的培养直到实现载体清除。该操作是细胞疗法应用的障碍,因为时间和成本是重要的因素。

发明内容

[0007] 在一些实施方式中,本发明提供了生成基本上不含重编程载体的诱导人类多能干细胞(iPSC)的高效方法,其包括:(a)将重编程载体导入人类体细胞以生成第一细胞群,其中重编程载体包括病毒复制起点,编码至少一种iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达表达盒,和自杀基因;(b)培养第一细胞群以实现重编程因子和/或合成转录因子的表达,从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群;以及(c)将所述第二细胞群与自杀基因底物接触以生成基本上不含重编程载体的细胞群。

[0008] 在一些实施方式中,本发明涉及生成基本上不含附加型重编程载体的诱导人类多

能干细胞 (iPSC) 的方法, 其包括: (a) 将附加型重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群, 其中附加型重编程载体包括 (i) OriP 复制起点, (ii) 编码 iPSC 重编程因子和/或合成转录因子的表达盒, (iii) 多核苷酸, 其编码 EBV 的 EBNA-1, 缺失 EBNA-1 残基 65-89 的 EBNA-1 衍生物, 缺失 EBNA-1 残基 90-328 的 EBNA-1 衍生物, 或缺失 EBNA-1 残基 65-328 的 EBNA-1 衍生物, 和 (iv) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因; (b) 培养第一细胞群以实现重编程因子和/或合成转录因子的表达, 从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群; (c) 将第二细胞群与自杀基因底物接触以生成基本上不含附加型重编程载体的 iPSC。

[0009] 在其它实施方式中, 本发明提供了生成基本上不含重编程载体的诱导人类多能干细胞 (iPSC) 的方法, 其包括: (a) 将重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群, 其中重编程载体包括 i) 病毒复制起点, ii) 编码 iPSC 重编程因子和/或合成转录因子的表达盒, iii) 调节重编程载体染色体外复制以及分配 (partition) 的基因, 和 iv) 调节型启动子系统; (b) 培养第一细胞群以实现重编程因子和/或合成转录因子的表达, 从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群, 其中所述重编程载体在第一细胞培养期间复制; 并且 (c) 培养第二细胞群, 其中对调节重编程载体染色体外复制以及分配的基因进行调节, 从而使得重编程载体在细胞分裂期间丧失, 进而生成基本不含重编程载体的 iPSC。

[0010] 在其它实施方式中, 本发明提供了生成基本上不含附加型重编程载体的诱导人类多能干细胞 (iPSC) 的方法, 其包括: (a) 将附加型重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群, 其中附加型重编程载体包括 (i) OriP 复制起点, (ii) 编码 iPSC 重编程因子和/或合成转录因子的表达盒, (iii) 多核苷酸, 其编码 EBV 的 EBNA-1, 缺失 EBNA-1 残基 65-89 的 EBNA-1 衍生物, 缺失 EBNA-1 残基 90-328 的 EBNA-1 衍生物, 或缺失 EBNA-1 残基 65-328 的 EBNA-1 衍生物, 和 (iv) 四环素或四环素衍生物调节型启动子系统 (TetOn 或 TetOff); (b) 培养第一细胞群以生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群, 其中附加型重编程载体在培养期间复制; (c) 培养第二细胞群以生成第三细胞群, 其中附加型重编程载体在培养期间不复制; (d) 从第三细胞群选取集落以生成第四细胞群; 并且 (e) 培养第四细胞群以生成基本上不含附加型重编程载体的 iPSC。

[0011] 在其它实施方式中, 本发明提供了生成基本上不含重编程载体的诱导人类多能干细胞 (iPSC) 的方法, 其包括: (a) 将重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群, 其中重编程载体包括 i) 病毒复制起点, ii) 编码 iPSC 重编程因子和/或合成转录因子的表达盒, iii) 调节重编程载体染色体外复制以及分配的基因, iv) 调节型启动子系统, 和 v) 自杀基因; (b) 培养第一细胞群以实现重编程因子和/或合成转录因子的表达, 从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群, 其中所述重编程载体在培养期间复制; (c) 培养第二细胞群, 其中对调节染色体外复制以及分配的基因进行调节, 从而使得重编程载体在细胞分裂期间丧失以生成包括这样 iPSC 的第三细胞群, 所述 iPSC 大体上不含重编程因子; 并且 (d) 将第三细胞群与自杀基因底物接触以生成基本不含重编程载体的 iPSC。

[0012] 在其它实施方式中, 本发明提供了生成基本上不含附加型重编程载体的诱导人类多能干细胞 (iPSC) 的方法, 其包括: (a) 将附加型重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群, 其中附加型重编程载体包括 (i) OriP 复制起点, (ii) 编码 iPSC 重编程因子和/或合成转录因子的表达盒, (iii) 多核苷酸, 其编码 EBV 的 EBNA-1, 缺失 EBNA-1 残基 65-89 的 EBNA-1 衍生物, 缺失 EBNA-1 残基 90-328 的 EBNA-1 衍生物, 或缺失 EBNA-1 残基 65-328 的 EBNA-1 衍生物,

(iv) 四环素或四环素衍生物调节型启动子系统 (TetOn或TetOff) ; 和v) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因; (b) 培养第一细胞群以实现重编程因子的表达, 从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群, 其中附加型重编程载体在培养期间复制; (c) 培养第二细胞群以生成包括这样iPSC的第三细胞群, 所述iPSC大体上不含附加型重编程载体, 其中在培养第二细胞群期间, 附加型重编程载体不复制; 并且 (d) 将第三细胞群与自杀基因底物接触以生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC。

[0013] 在实施方式中, 本发明提供了附加型重编程载体, 其包括: (a) OriP复制起点; (b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒; (c) 多核苷酸分子, 其编码EBV的EBNA-1, 缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物, 缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物, 或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物; 和 (d) 自杀基因。

[0014] 在其它实施方式中, 本发明提供了附加型重编程载体, 其包括: (a) OriP复制起点; (b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒; (c) 多核苷酸分子, 其编码EBV的EBNA-1, 缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物, 缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物, 或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物; 和 (d) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因。

[0015] 在实施方式中本发明还提供了附加型重编程载体, 其包括: (a) OriP复制起点; (b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒; (c) 多核苷酸分子, 其编码EBV的EBNA-1, 缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物, 缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物, 或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物; 和 (d) 调节型启动子系统。

[0016] 在实施方式中, 本发明还提供了附加型重编程载体, 其包括: (a) OriP复制起点; (b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒; (c) 多核苷酸分子, 其编码EBV的EBNA-1, 缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物, 缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物, 或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物; 和 (d) TetOn或TetOff系统。

[0017] 在实施方式中, 本发明还提供了附加型重编程载体, 其包括: (a) OriP复制起点; (b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒; (c) 多核苷酸分子, 其编码EBV的EBNA-1, 缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物, 缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物, 或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物; (d) TetOn或TetOff系统; 和 (e) 自杀基因。

[0018] 在实施方式中, 本发明还提供了附加型重编程载体, 其包括: (a) OriP复制起点; (b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒; (c) 多核苷酸分子, 其编码EBV的EBNA-1, 缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物, 缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物, 或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物; (d) TetOn或TetOff系统; 和 (e) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因。

附图说明

[0019] 出于阐述本发明的目的, 附图中描述了本发明的某些实施方式。然而, 本发明不仅限于附图中描述的实施方案的精确安排和手段。

[0020] 图1示出iPSC集落扩增和分析的过程。

[0021] 发明详述

[0022] 定义

[0023] 除非另有定义, 本文使用的所有科技术语与本发明所属领域普通技术人员所理解

的通常含义相同。

[0024] 在详细描述本发明之前,应理解的是本发明不限于特定组合物或工艺步骤,所述组合物或工艺步骤可变化。在本说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一个”,“一种”和“该”、“所述”包含复数指示物,除非上下文中有明确的另外说明。同样,术语“一个”(或“一种”)以及术语“一个/种或多个/种”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0025] 此外,本文所用“和/或”时应视作具体公开了两种特征或组分的每一种,有或没有另一种。因此,本文短语“A和/或B”中使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)、和“B”(单独)。同样,诸如短语“A、B、和/或C”中使用的术语“和/或”旨在包括各种以下实施方式:A、B、和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0026] 除非另有说明,本公开中所有百分比、比例等表达均“以重量计”。本文所用“以重量计”是术语“以质量计”的同义词,并且表示本文所定义的比例或百分比是根据重量所确定,而非体积、厚度或其它测量值。

[0027] 本文所用术语“约”表示近似于,在某范围内,大致,或在…周围。当术语“约”与数值范围联用时,其通过延伸所示数值的上下边界来修改该数值范围。通常,本文所用术语“约”通过10%的变化对所列数值进行向上或向下修改。

[0028] 单位、前缀和符号以它们的国际单位制(SI)接受的形式表示。数值范围包括限定该范围的数值。除非另外说明,氨基酸以氨基到羧基的取向从左到右书写。本文提供的标题不是本发明的各种方面或实施方式的限制,可以参考说明书整体理解本发明的各种方面或实施方式。因此,下面紧接着定义的术语完全参考说明书全文定义。

[0029] 应当理解的是,在任何用语言“包括”描述的实施方式中,也提供了“由……组成”和/或“基本由……组成”的其他类似实施方式。

[0030] 本文中氨基酸由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的公知三字母符号或单字母符号表示。同样,核苷酸按其普遍接受的单字母代码指称。

[0031] “重编程”是一种特定细胞类型向另一种类型的转换。例如,重编程是体细胞类型(诸如成纤维细胞)向多能细胞类型的转换。如果在充分扩增后,可测量比例的进行重编程细胞(子代)相比重编程前具有新细胞类型的表型特征,那么该细胞被重编程。在某些条件下,具有新细胞类型特征的子代比例可以是至少约0.05%、0.1%、0.2%、0.5%、1%、5%、25%或更多。

[0032] “载体”或“构建体”(有时称之为基因递送或基因转移“载剂”)指这样的大分子或分子复合物,其包括体外或体内待递送至宿主细胞的多核苷酸。载体可以是线性或环状分子。

[0033] “附加型载体”指不依赖于存在载体的细胞中染色体DNA而复制的载体(如上定义)。

[0034] “质粒”(载体的常见类型)是分离自染色体DNA的染色体外DNA分子,其能够不依赖于相容细胞中的染色体DNA进行复制。例如,诸如pUC的某些质粒在细菌中独立地复制,但在哺乳动物细胞中不是这样。在某些情况中,其是环状和双链的。

[0035] “复制起点(ori)”或“复制的起点”是涉及DNA复制的DNA序列。它们通常来自于各自具有不同特征的细菌或病毒。细菌细胞中的DNA复制需要细菌“ori”。所有常见质粒/载体

将包含这样的区域(通常衍生自pUC载体)以允许高效的增殖。病毒“ori”,例如来自淋巴营养性疱疹病毒作用于允许在哺乳动物细胞中复制。当其存在,并且存在适当的栓系蛋白(tethering protein)(例如,EBNA-1)时,细胞能够将载体维持在DNA合成启动的位置或附近,导致细胞分裂期间DNA复制并分配。EBV的ori包括FR序列(30bp重复的20个不完美拷贝),以及优选地,DS序列。然而,EBV中的其它位点结合EBNA-1,例如,Rep*序列可以取代DS作为复制起点。因此,EBV的复制起点包括FR、DS或Rep*序列或通过核酸修饰或合成组合由其衍生的任何功能性等价序列。例如,本发明还可以使用遗传工程改造的EBV复制起点,诸如通过个别元件的插入或突变。

[0036] 术语“OriP”指支持人细胞中质粒复制和稳定维持的EB病毒染色体区域。

[0037] “淋巴营养性”疱疹病毒是这样一种疱疹病毒,其在淋巴母细胞(例如,人B淋巴细胞)或其它细胞类型中复制并且在其自然生命周期的至少部分进行染色体外复制。感染宿主后,这些病毒通过将病毒基因组维持成质粒来潜伏性地感染宿主。示例性的淋巴营养性疱疹病毒包括但不限于EB病毒(EBV)、卡波济氏肉瘤疱疹病毒(KSHV)、松鼠猴疱疹病毒(HS)和马立克氏病病毒(MDV)。

[0038] 本文所用“模板”是淋巴营养性疱疹病毒野生型蛋白质特异性结合的DNA分子,其中野生型蛋白质对应EBNA-1,所以在该模板中存在这样的DNA序列,其以对应EBV的OriP的DNA序列与野生型蛋白质结合亲和力的至少10%的亲合力与野生型蛋白质结合,并且由此在蛋白质结合和/或在细胞中维持的模板增强后,模板转录任选地启动和/或增强。“整合模板”是稳定地维持在细胞基因组中的一类模板,例如,整合到该细胞染色体中。“染色体外模板”是稳定地维持在细胞中但是不整合到染色体中的模板。

[0039] 术语“控制元件”统指启动子区域、多聚腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调控结构域、复制起点、内部核糖体进入位点(“IRES”)、增强子、剪接点等,它们一起提供受体细胞中编码序列的复制、转录、转录后加工和翻译。这些控制元件并非所有都需要始终存在,只要选定的编码序列能够在合适的宿主细胞中进行复制、转录和翻译。

[0040] 本文所用术语“启动子”的通常含义指包括DNA调控序列的核苷酸区域,其中该调控序列衍生自能够结合RNA聚合酶并且启动下游(3'方向)编码序列转录的基因。

[0041] 本文所用术语“体细胞”指除了诸如卵子、精子等生殖细胞以外的任何细胞,其不直接将其DNA转移至下一代。通常,体细胞具有受限或没有多能性。本文所用体细胞可以是天然产生的或遗传修饰的。体细胞的示例包括单核细胞,如外周血单核细胞,成纤维细胞,角化细胞,造血细胞,间质细胞,肝细胞,胃细胞和β细胞。

[0042] 如本文所用,当细胞具有少于10%元件时,细胞“大体上不含”附加型重编程载体和外源性遗传元件(例如,大体上不含重编程载体遗传元件),并且当细胞具有少于1%元件时,细胞“基本上不含”附加型重编程载体和外源性遗传元件(例如,基本上不含重编程遗传元件)。然而,更加希望得到是这样的细胞群,其中少于0.5%或少于0.1%的总细胞群包括外源性遗传元件。因此,iPS细胞群中少于0.1%-10%(包括所有的中间百分比)的细胞包括不需要的外源性遗传元件。

[0043] 述及“增强子”是指这样的核酸序列,当其位于启动子附近时,相对于不存在增强子结构域情况下的启动子所产生的转录活性,其产生增强的转录活性。

[0044] 述及“表达构建体”或“表达盒”是指能够指导转录的核酸分子。表达构建体包括

(至少) 启动子或与启动子功能性等价的区域。还可以包括其它元件, 诸如启动子, 和/或转录终止信号。

[0045] 当术语“外源性”关于细胞或生物体中的蛋白质、基因、核酸或多核苷酸使用时, 其指蛋白质、基因、核酸或多核苷酸已经通过人工或天然方法被导入细胞或生物体。就细胞而言, 术语“外源性”指通过人工或天然手段分离并随后导入其他细胞或生物体的细胞。外源性核酸可以来自不同的生物体或细胞, 或者其可以是生物体或细胞中天然出现的核酸的一个或多个拷贝。外源性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。作为非限制性的示例, 外源性核酸处于与天然细胞不同的染色体位置, 或者与天然存在的核酸序列不同的核酸序列侧接。

[0046] 术语“传代”指通过将一些或所有细胞从先前培养物转移至具有新鲜生长培养基的新底物(例如, 新的容器)来进行继代培养细胞的过程。

[0047] 术语“自杀基因”是编码这样蛋白质的核苷酸, 所述蛋白质将无毒性化合物转变成毒性形式。自杀基因的示例包括单纯性疱疹病毒胸苷激酶/更昔洛韦系统, 胞嘧啶脱氨酶/5-FU系统和羧基酯酶/伊立替康系统。自杀基因通常组成型表达, 从而使得当提供适当底物提供时候产生细胞毒性。“自杀基因底物”是自杀基因转将其变成毒性形式的无毒性化合物。

[0048] 术语“对应于”表示多核苷酸序列与参考多核苷酸序列的全部或部分同源(即相同而非严格进化相关), 或多肽序列与参考多肽序列相同。本文所用术语“与……互补”表示互补序列与参考多核苷酸序列的全部或部分同源。用于说明, 核苷酸序列“TATAC”对应于参考序列“TATAC”且与参考序列“GTATA”互补。

[0049] “编码”特定蛋白质的“基因”、“多核苷酸”、“编码区域”、“序列”、“区段”、“片段”或“转基因”是这样的核酸分子, 当其位于适当调控序列控制下时, 其在体外或体内被转录以及任选地也被翻译成基因产物, 例如, 多肽。编码区域可以cDNA、基因组DNA或RNA形式存在。当以DNA形式存在时候, 核酸分子可以是单链(即, 有义链)或双链。编码区域的边界由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确定。基因可包括但不限于: 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。

[0050] 本文以本领域最广泛的含义使用术语“细胞”, 其指这样的生物体, 所述生物体是多细胞生物体组织的结构单元, 通过将其与外界隔离的膜结构包围, 具有自我复制的能力, 并且具有遗传信息以及将其表达的机制。本文所用细胞可以是天然产生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)。

[0051] 本文所用术语“细胞群”涵盖克隆细胞群体。

[0052] 本文所用术语“干细胞”指能够自我复制且具有多能性的细胞。通常, 干细胞可以使受损组织重生。本文所述干细胞可以是但不限于, 胚胎干(ES)细胞或组织干细胞(也称为组织特异性干细胞或成体干细胞)。能够具有上述能力的任何人工生产的细胞(例如, 融合细胞、重编程的细胞、或如本文所用的细胞)都可以是干细胞。

[0053] “胚胎干(ES)细胞”是衍生自早期胚胎的多能性干细胞。ES细胞首先建立于1981年, 并且从1989年开始已经应用于生产基因敲除小鼠。人ES细胞在1998年建立, 当前能够用于再生医疗。

[0054] 不同于ES细胞,组织干细胞具有有限的分化潜能。组织干细胞存在于组织中的特定位置,并且具有未分化的胞内结构。因此,组织干细胞的多能性特别低。组织干细胞具有较高的核/胞质比,并且具有一些胞内细胞器。大多数组织干细胞具有低多能性、长细胞周期以及超越个体生命的增殖能力。基于细胞来源的位置,如真皮系统、消化系统、骨髓系统、神经系统等,将组织干细胞分类。真皮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(常见)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、间充质干细胞等。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。

[0055] “诱导多能干细胞”通常缩写为iPS细胞或iPSC,其是通过表达用于维持胚胎干细胞特性的基因和因子经人工遗传重编程至胚胎干细胞样状态的细胞。通过导入被称之为重编程因子的特定因子,iPSC衍生自非多能性细胞,通常是成熟体细胞或终末分化细胞,如成纤维细胞、造血细胞、肌细胞、神经元、表皮细胞等。合成转录因子是非天然产生的重编程因子,可以将其导入体细胞来将细胞重编程成胚胎干细胞样状态。

[0056] “多能性”指细胞分化成衍生自下述三胚层中任一胚层的细胞的能力:内胚层(例如内部胃内壁、胃肠道、肺)、中胚层(例如肌肉、骨、血液、泌尿生殖系统)或外胚层(例如表皮组织和神经系统)。本文所用“多能干细胞”指可以分化成衍生自三胚层中任一胚层的细胞的细胞。

[0057] 述及关于核酸分子“可操作地连接”是指两个或多个核酸分子(例如,待转录的核酸分子、启动子和增强子元件)以允许核酸分子转录的方式连接。关于肽和/或多肽分子“可操作地连接”是指两个或多个肽和/或多肽分子以这样的方式连接,所述方式产生单个多肽链,即融合多肽,其具有该融合体各肽和/或多肽组分的至少一种特性。融合多肽是特别嵌合的,即,其是由异源性分子组成。

[0058] “同源性”指两个多核苷酸或两个多肽之间的相同性百分比。一条序列与另一条序列之间的对应关系可以通过本领域已知的技术来确定。例如,可以通过比对序列信息并使用容易得到的计算机程序来直接比较两个多肽分子之间的序列信息来确定同源性。或者,测定同源性可以通过多核苷酸在允许同源区域间形成稳定双链体的条件下杂交,然后用单链特异性核酸酶消化并确定已消化片段的大小。当使用上述方法确定至少约80%,具体至少约90%,和最具体约95%的核苷酸或氨基酸分别与限定长度的分子匹配时,两条DNA、或两条多肽序列彼此之间“大体上同源”。

[0059] 概述

[0060] 在通过非整合性附加型载体的细胞重编程过程中,定量测量通常是必需的,从而胞质iPSC系无载体。当前用于生产无载体iPSC的方法,包括使用DNA介导的重编程,并且涉及从P0平板采集多个数量的iPSC集落并且将其扩增至有足够多细胞实施定量载体检测,然后进一步培养直至载体清除。尽管无载体集落有可能在第3代被鉴定出,但是大部分的iPSC克隆在第10代甚至更多代仍然保留载体。当将其作为工业化过程的一部分进行时,如此长时间的培养对劳动力需求、时间表和成本有严重影响。在实施方式中,本发明提供了两种不同的方法来促进更快速的载体清除:i)时间调控重编程后载体保留,和ii)在重编程载体上纳入自杀基因以选择无载体集落的生长。

[0061] 在实施方式中,本发明提供了通过修饰载体,包括用于递送重编程因子和/或合成

转录因子的附加型载体来生产用于细胞疗法的无外源性DNA的iPSC的方法,所述修饰通过(1)向附加型载体添加自杀基因,或(2)将载体上存在的组成型EBNA-1表达盒用一个或多个载体上调节表达盒替换,其中EBNA-1表达经由调节型启动子系统控制。这些方法可以独立或组合使用。

[0062] 在实施方式中,本发明提供了多种优势,包括(1)减少了鉴定无载体iPSC前所需培养传代的次数,(2)减少了鉴定无载体iPSC前所需采集和维持的集落数量,(3)将iPSC集落汇集成“库”的能力,而不是手动采集个别的集落,以及(4)整体劳动、时间和成本节约。

[0063] 自杀基因

[0064] 自杀基因负责将非毒性化合物转换成毒性形式。因此,可以将它们置于表达载体上,通过在适当时间添加无毒性自杀基因底物作为载体保留的阴性选择。可以添加至附加型载体的潜在自杀基因包括胸苷激酶和胞嘧啶脱氨酶。这些基因的表达将通过组成型启动子控制。细胞死亡只有在将它们各自的底物更昔洛韦(GNC)或5-氟胞嘧啶(5-FC)直接添加至培养基后才会被诱导。

[0065] 重编程后(采集集落之前或不久之后)提供自杀基因底物将会导致保留载体的iPSC集落的细胞死亡。存活的集落是丢失了载体的那些,并且因此可以将其进一步收集和扩增。筛选试验对哪些iPSC集落有希望扩增、库存和分化提供了指示,不需要投入资源扩增并非无载体的iPSC。此外,应用该策略选择无载体iPSC集落能够以“库”收获iPSC,而不需要手动采集单个集落,并且在建立稳定的细胞系之前减少了培养的停滞期。收获iPSC库缩短了实现完全表征和库存的时间,并且额外地提供了不同的iPSC库,其增加了下游细胞疗法应用的高效细胞分化的可能性。

[0066] 在添加自杀基因底物之时P0平板中出现的iPSC仍然保留载体的情况下,即使使用自杀基因方法,载体清除动力学可以决定集落采集。然而,例如,在P1采集后,自杀基因底物可以“复制(replica)”平板提供,以鉴定无载体iPSC克隆,不需要进行资源密集型的qPCR筛选。

[0067] 本发明因此提供了生产基本上不含重编程载体的诱导人多潜能干细胞(iPSC)的方法,其包括:(a)向人类体细胞中导入重编程载体以生产第一细胞群,其中所述重编程载体包括病毒复制起点,编码至少一种iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒,和自杀基因;(b)培养第一细胞群以实现重编程因子和/或合成转录因子的表达,从而生产具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群;以及(c)将第二细胞群与自杀基因底物接触以生产基本上不含重编程载体的细胞群。在实施方式中,自杀基因选自胸苷激酶和胞嘧啶脱氨酶。

[0068] 在使用自杀基因增强iPSC生产效率的方法的实施方式中,在将附加型重编程载体导入细胞后,对细胞进行足够长时间的培养以允许体细胞转换成iPSC,即,培养至实现重编程因子的表达,从而生成具有与胚胎细胞一致性状的细胞群。在实施方式中,继代培养具有与胚胎细胞一致性状的细胞群。在实施方式中,继代培养后,对细胞进行进一步的传代,然后提供自杀基因底物(例如,GNC或5-FC)。在其它实施方式中,继代培养后,在提供自杀基因底物前,不对细胞进行进一步的传代。

[0069] 在实施方式中,使用自杀基因来增强iPSC产生效率的本发明方法中所用复制起点是OriP。在另一些实施方式中,复制起点是OriP,并且表达盒包括多核苷酸,其编码EBV的EBNA-1,或缺失EBNA-1残基65-89、缺失EBNA-1残基90-328或缺失上述两者的EBNA-1衍生

物。

[0070] 在实施方式中,使用自杀基因来增强iPSC产生效率的本发明方法还包括就附加型重编程载体的存在筛选细胞群。在将附加型重编程载体导入体细胞后,可以在该方法中的任一步骤进行这样的筛选。在实施方式中,提供自杀基因底物后对细胞进行筛选。筛选方法是本领域已知的,包括但不限于qPCR载体检测试验。在实施方式中,对在提供自杀基因底物后的细胞群中仍然含有附加型重编程载体的细胞不再进行培养。

[0071] 本发明方法还包括生成基本上不含附加型重编程载体的诱导人类多能干细胞(iPSC),其包括(a)将附加型重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群,其中附加型重编程载体包括(i) OriP复制起点,(ii) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒,(iii) 多核苷酸,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物,和(iv) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因;(b) 培养第一细胞群以实现重编程因子和/或合成转录因子的表达,从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群;(c) 将第二细胞群与自杀基因底物接触以生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC。EBNA-1和衍生物的描述见于Levitskaya等,Nature 375:685 (1995)、Levitskaya等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:12616-12621 (1997)和Yin,Science 301:1371-1374 (2003),其各自通过引用将其全部内容纳入本文。

[0072] 在实施方式中,使用自杀基因来增强iPSC产生效率的本发明方法中所用体细胞包括单核细胞,包括人外周血单核细胞、成纤维细胞、角化细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞,胃细胞和/或 β 细胞。在实施方式中,使用自杀基因来增强iPSC产生效率的本发明方法中所用体细胞是人外周血单核细胞。

[0073] 在实施方式中,使用自杀基因来增强iPSC产生效率的本发明方法中所用重编程因子包括Sox-2、Oct-4、Nanog、KLF4、cMYC、Lin-28和/或p53DD。在其它实施方式中,iPSC重编程因子包括Sox-2和Oct-4。在实施方式中,iPSC重编程因子是Sox-2、Oct-4和Nanog。在实施方式中,iPSC重编程因子是Sox-2、Oct-4以及KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。在实施方式中,iPSC重编程因子是Sox-2、Oct-4、KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD。

[0074] 在实施方式中,当单独使用自杀基因途径来促进载体清除时,在采集集落前4-5天向P0平板添加适当的底物。这将选择无载体集落存活。qPCR载剂检测筛选试验对哪些存活的iPSC集落有希望进一步扩增、库存和分化提供了进一步的验证。如上所述,取决于载体清除动力学,可能需要将自杀基因底物添加向以后的传代移动。

[0075] EBNA-1的调节型表达

[0076] EBNA-1是一种病毒蛋白,其涉及结合附加型重编程载体中存在的被称为OriP的区域,并促进细胞分裂期间染色体DNA的束缚。这使得转染后质粒维持增强。尽管最初为了实现高水平表达重编程因子和/或合成转录因子这是有利的,但是一旦重编程出现后这使得质粒丧失缓慢。

[0077] 在实施方式中,本文所提供的发明通过抑制其转录后编程(例如,通过使用四环素阻遏型(TetOff))或通过使用只有在重编程出现后才活化的诱导型系统(例如,四环素诱导型(TetOn))来调节EBNA-1。同样存在控制EBNA-1表达的其它方法(例如,一旦出现了重编程,可以表达EBNA-1的诱导型反义或干扰RNA)。存在诸如多西环素(Dox)的诱导剂(针对Tet系统),并且与当前的iPSC生成方法相容。这些方法减少了细胞分裂期间质粒的分配,并且

因此减少生成无载体细胞系所需传代的次数。

[0078] 在实施方式中,本发明提供了生成基本上不含重编程载体的诱导人类多能干细胞(iPSC)的方法,其包括:(a)将重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群,其中重编程载体包括i)病毒复制起点,ii)编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒,iii)调节重编程载体染色体外复制以及分配的基因,和iv)调节型启动子系统;(b)培养第一细胞群以实现重编程因子和/或合成转录因子的表达,从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群,其中所述重编程载体在第一细胞培养期间复制;并且(c)培养第二细胞群,其中对调节重编程载体染色体外复制以及分配的基因进行调节,从而使得重编程载体在细胞分裂期间丧失,进而生成基本不含重编程载体的iPSC。

[0079] 在实施方式中,用于调节染色体外复制以及分配的本发明方法利用四环素或四环素衍生物活化系统,例如,TetOn或TetOff系统。在实施方式中,当使用TetOn系统时,存在四环素或诸如多西环素的四环素衍生物,同时培养转染的细胞群以上调EBNA-1表达。然后在不存在四环素或衍生物的情况下培养细胞群以减少EBNA-1的表达,并因此大体上减少附加型载体的复制和分配。

[0080] 在实施方式中,用于调节染色体外复制和分配的本发明方法利用TetOff系统。在TetOff系统中,不存在四环素或诸如多西环素的四环素衍生物,同时培养转染的细胞群以上调EBNA-1表达。然后在存在四环素或衍生物的情况下培养细胞群以下调EBNA-1的表达,并因此大体上减少附加型载体的复制和分配。

[0081] 在实施方式中,调节染色体外复制和分配的本发明方法利用OriP复制起点。在另一些实施方式中,复制起点是OriP,并且表达盒包括多核苷酸,其编码EBV的EBNA-1,或缺失EBNA-1残基65-89、缺失EBNA-1残基90-328或缺失上述两者的EBNA-1衍生物。

[0082] 在实施方式中,调节染色体外复制和分配的本发明方法中还包括就附加型重编程载体的存在筛选细胞群。在将附加型重编程载体导入体细胞后,可以在该方法中的任一步骤进行这样的筛选。在实施方式中,激活自杀基因后对细胞进行筛选。筛选方法是本领域已知的,包括但不限于qPCR载体检测试验。

[0083] 在调节染色体外复制和分配的方法的实施方式中,将附加型重编程载体导入细胞并对细胞进行足够长时间的培养以允许体细胞转换成iPSC,即培养至实现重编程因子和/或合成转录因子的表达,从而生成具有与胚胎细胞一致性状的细胞群,然后对具有与胚胎细胞一致性状的细胞进行继代培养。在实施方式中,继代培养后,对细胞进行进一步的传代,然后培养细胞群以生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC。在其它实施方式中,继代培养后,培养之前不对细胞进行传代,其中附加型重编程载体在培养期间不复制。

[0084] 本发明还提供了生成基本上不含附加型重编程载体的诱导人类多能干细胞(iPSC)的方法,其包括:(a)将附加型重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群,其中附加型重编程载体包括(i)OriP复制起点,(ii)编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒,(iii)多核苷酸,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物,和(iv)四环素或四环素衍生物调节型启动子系统(TetOn或TetOff);(b)培养第一细胞群以生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群,其中附加型重编程载体在培养期间复制;(c)培养第二细胞群以生成第三细胞群,其中附加型重编程载体在培养期间不复制;(d)从第三细胞群

选取集落以生成第四细胞群；并且(e)培养第四细胞群以生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC。

[0085] 在实施方式中，调节染色体外复制和分配的本发明方法利用这样的体细胞，所述体细胞可以是人外周血单核细胞、成纤维细胞、角化细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞，胃细胞和β细胞。

[0086] 在实施方式中，本发明方法中所用调节外染色体复制和分配的重编程因子包括Sox-2、Oct-4、Nanog、KLF4、cMYC、Lin-28和/或p53DD。在其它实施方式中，iPSC重编程因子包括Sox-2和Oct-4。在实施方式中，iPSC重编程因子是Sox-2、Oct-4和Nanog。在实施方式中，iPSC重编程因子是Sox-2、Oct-4以及KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。在实施方式中，iPSC重编程因子是Sox-2、Oct-4、KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD。

[0087] 在实施方式中，当单独调节EBNA-1表达以促进载体清除时，在采集iPSC集落前，EBNA-1表达在对应P0平板的时间点减少。如在当前的iPSC生成过程中一样，进行菌落采集，然而，在较早的传代数中鉴定出更多的无载体菌落。

[0088] 组合自杀基因以及受调节的外染色体复制和分配

[0089] 在实施方式中，将方法组合提供了其它益处，并且允许对实验方法进行有益的修饰。由于基于EBNA-1附加型载体的属性，在转染后期间(即，20-30天)提供自杀基于底物导致存在于P0平板的iPSC集落大量细胞死亡。这一不希望的作用通过减少EBNA-1表达来减弱，从而在添加针对自杀基因的底物之前促进载体清除。

[0090] 将方法组合的另一益处在于，当实现高重编程效率和高载体清除时，iPSC集落可以库采集，促进扩增、库存和表征。

[0091] 本发明因此还提供了生成基本上不含附加型重编程载体的诱导人类多能干细胞(iPSC)的方法，其包括：(a)将重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群，其中重编程载体包括i)病毒复制起点，ii)编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒，iii)调节重编程载体染色体外复制以及分配的基因，iv)调节启动子系统，和v)自杀基因；(b)培养第一细胞群以实现重编程因子和/或合成转录因子的表达，从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群，其中所述重编程载体在培养期间复制；(c)培养第二细胞群，其中对调节染色体外复制以及分配的基因进行调节，从而使得重编程载体在细胞分裂期间丧失以生成包括这样iPSC的第三细胞群，所述iPSC大体上不含重编程因子；并且(d)将第三细胞群与自杀基因底物接触以生成基本不含重编程载体的iPSC。

[0092] 在本发明的组合方法中的实施方式中，自杀基因选自胸苷激酶和胞嘧啶脱氨酶。

[0093] 在本发明的组合方法中，复制起点是OriP。在其它些实施方式中，复制起点是OriP，并且表达盒包括多核苷酸，其编码EBV的EBNA-1，或缺失EBNA-1残基65-89、缺失EBNA-1残基90-328或缺失上述两者的EBNA-1衍生物。

[0094] 在本发明的组合方法中，调节这样表达盒转录的基因包括四环素或四环素衍生物(例如，多西环素)活化系统，所述表达盒编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子。在实施方式中，多西环素在培养第一细胞群期间存在以实现重编程因子的表达，从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的细胞群，而多西环素在培养生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC期间不存在，其中在培养期间，附加型重编程载体不复制。在实施方式中，多西环素在第一培养步骤期间不存在，并且多西环素不存在于第二步骤。

[0095] 在本发明的组合方法中,其它实施方式还包括就附加型重编程载体的存在筛选细胞群。在将附加型重编程载体导入体细胞后,可以在该方法中的任一步骤进行这样的筛选。在实施方式中,培养第二细胞群后对细胞进行筛选以生成包括这样iPSC的第三细胞群,所述iPSC大体上不含附加型重编程载体,其中在培养第二细胞群期间,附加型重编程载体不复制。在其它实施方式中,激活自杀基因后对细胞进行筛选。筛选方法是本领域已知的,包括但不限于qPCR载体检测试验。在实施方式中,在培养第二细胞群以生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC后,细胞群存在附加型重编程载体。

[0096] 在本发明的组合方法的实施方式中,将附加型重编程载体导入细胞并对细胞进行足够长时间的培养以允许体细胞转换成iPSC,即培养至实现重编程因子和/或合成转录因子的表达,从而生成具有与胚胎细胞一致性状的细胞群,然后对具有与胚胎细胞一致性状的细胞进行继代培养。在实施方式中,继代培养后,对细胞进行进一步的传代,然后培养细胞群以生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC。在其它实施方式中,继代培养后,培养之前不对细胞进行传代,其中附加型重编程载体在培养期间不复制。在本发明的组合方法的其它实施方式中,在将附加型重编程载体导入细胞后,对细胞进行足够长时间的培养以允许体细胞转换成iPSC,即,培养至实现重编程因子和/或合成转录因子的表达,从而生成具有与胚胎细胞一致性状的细胞群后。在实施方式中,继代培养具有与胚胎细胞一致性状的细胞。在实施方式中,继代培养后对细胞进行进一步的传代,然后提供自杀基因底物(添加GNC或5-FC)。在其它实施方式中,继代培养后,在提供自杀基因底物之前,不对细胞进行传代。

[0097] 本发明还提供了生成基本上不含附加型重编程载体的诱导人类多能干细胞(iPSC)的方法,其包括:(a)将附加型重编程载体导入体细胞以生成第一细胞群,其中附加型重编程载体包括(i)OriP复制起点,(ii)编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒,(iii)多核苷酸,其编码EBV的EBNA-1,缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物,缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物,或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物,(iv)四环素或四环素衍生物调节启动子系统(TetOn或TetOff);和v)胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因;(b)培养第一细胞群以实现重编程因子和/或合成转录因子的表达,从而生成具有与胚胎干细胞一致性状的第二细胞群,其中附加型重编程载体在培养期间复制;(c)培养第二细胞群以生成包括这样iPSC的第三细胞群,所述iPSC大体上不含附加型重编程载体,其中在培养第二细胞群期间,附加型重编程载体不复制;并且(d)将第三细胞群与自杀基因底物接触以生成基本上不含附加型重编程载体的iPSC。

[0098] 在一些实施方式中,本发明的组合方法利用体细胞,所述体细胞可以是人外周血单核细胞、成纤维细胞、角化细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞,胃细胞和β细胞。

[0099] 在一些实施方式中,本发明的组合方法中所用的重编程因子包括Sox-2、Oct-4、Nanog、KLF4、cMYC、Lin-28和/或p53DD。在其它实施方式中,iPSC重编程因子包括Sox-2和Oct-4。在一些实施方式中,iPSC重编程因子是Sox-2、Oct-4和Nanog。在实施方式中,iPSC重编程因子是Sox-2、Oct-4以及KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD中的一种或多种。在实施方式中,iPSC重编程因子是Sox-2、Oct-4、KLF4、cMYC、Lin-28和p53DD。

[0100] 附加型重编程载体

[0101] 在实施方式中,本发明提供了附加型重编程载体,其包括:(a)OriP复制起点;(b)

编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒；(c) 多核苷酸分子，其编码EBV的EBNA-1，缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物，缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物，或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物；和(d) 自杀基因。

[0102] 在其它实施方式中，本发明提供了附加型重编程载体，其包括：(a) OriP复制起点；(b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒；(c) 多核苷酸分子，其编码EBV的EBNA-1，缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物，缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物，或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物；和(d) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因。

[0103] 在实施方式中本发明还提供了附加型重编程载体，其包括：(a) OriP复制起点；(b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒；(c) 多核苷酸分子，其编码EBV的EBNA-1，缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物，缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物，或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物；和(d) 调节启动子系统。

[0104] 在实施方式中，本发明还提供了附加型重编程载体，其包括：(a) OriP复制起点；(b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒；(c) 多核苷酸分子，其编码EBV的EBNA-1，缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物，缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物，或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物；和(d) TetOn或TetOff系统。

[0105] 在实施方式中，本发明还提供了附加型重编程载体，其包括：(a) OriP复制起点；(b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒；(c) 多核苷酸分子，其编码EBV的EBNA-1，缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物，缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物，或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物；(d) TetOn或TetOff系统；和(e) 自杀基因。

[0106] 在实施方式中，本发明还提供了附加型重编程载体，其包括：(a) OriP复制起点；(b) 编码iPSC重编程因子和/或合成转录因子的表达盒；(c) 多核苷酸分子，其编码EBV的EBNA-1，缺失EBNA-1残基65-89的EBNA-1衍生物，缺失EBNA-1残基90-328的EBNA-1衍生物，或缺失EBNA-1残基65-328的EBNA-1衍生物；(d) TetOn或TetOff系统；和(e) 胸苷激酶或胞嘧啶脱氨酶自杀基因。

[0107] 在实施方式中，本发明的方法利用单个载体或多个载体来产生基本上不含重编程载体的iPSC。例如，在实施方式中，如上所述的EBV的调节EBNA-1或EBNA-1的衍生物与表达盒重编程因子和/或合成转录因子不在同一载体上。此外，在实施方式中，自杀基因和/或调节启动子系统位于分开的载体。

[0108] 重编程因子

[0109] 生成iPSC所必需的是重编程因子。下述因子或因子的组合可用于本发明的方法中。在某些方面，编码Sox和Oct (特别是Oct3/4) 将会包含于重编程载体。例如，一种或多种重编程载体可包括编码Sox2、Oct4、Nanog以及任选地Lin28的表达盒，或编码Sox2、Oct4、Klf4以及任选地c-Myc的表达盒，或编码Sox2、Oct4以及任选地Esrrb的表达盒，或编码Sox2、Oct4、Nanog、Lin28、Klf4、c-Myc以及任选地SV40大T抗原的表达盒。编码这些重编程因子的核酸可以包括在相同的表达盒、不同的表达盒、相同的重编程载体或不同的重编程载体中。

[0110] Oct4和Sox基因家族的某些成员(Sox1、Sox2、Sox3和Sox15) 已经被鉴定为涉及诱导过程的重要的转录调节子，其缺失使得诱导是不可能的。然而，包括Klf家族(Klf1、Klf2、Klf4和Klf5)、Myc家族(c-Myc、L-Myc和N-Myc)、Nanog和Lin28的某些成员的其它基因已经

被鉴定将增强诱导效率。

[0111] Oct4 (Pou5f1) 是八聚体 (“Oct”) 转录因子家族中的一种, 并且在维持多能性中起着重要作用。诸如卵裂球和胚胎干细胞等细胞中缺失Oct4将导致自发性滋养层分化, 而Oct4的存在因此将产生胚胎干细胞的多能性和分化潜能。包括Oct1和Oct6的“Oct”家族的各种其它基因无法引起诱导。

[0112] 与Oct4类似, Sox家族基因与维持多能性相关, 但是与在多能干细胞中专一表达的Oct4相反, 其与多潜能 (multipotent) 和单能干细胞相关。尽管Sox2是用于重编程诱导的最初基因, 但是已经发现Sox家族的其它基因也可以在诱导过程中起作用。Sox1产生iPS细胞的效率与Sox2相似, 并且基因Sox3、Sox15和Sox18同样生成iPS细胞, 尽管以降低的效率。

[0113] Lin28是表达在与分化和增殖相关的胚胎癌细胞以及胚胎干细胞中的mRNA结合蛋白。

[0114] 用于本方法的重编程载体以及本发明的载体可以是天然或非天然产生的。非天然产生的重编程载体在本文被称为合成转录因子。也可以将合成转录因子导入体细胞来将细胞重编程成胚胎干细胞样状态。合成转录因子可以增强重编程效率并加速动力学。本领域普通技术人员已知其它合成转录因子。

[0115] 用于本发明的重编程蛋白可以被具有几乎相同重编程功能的蛋白质同源物取代。编码这些同源物的核酸也可以用于重编程。优选保守氨基酸取代, 也就是, 例如, 极性酸性氨基酸天冬氨酸-谷氨酸; 极性碱性氨基酸的赖氨酸/精氨酸/组氨酸; 非极性或疏水性氨基酸亮氨酸/异亮氨酸/甲硫氨酸/缬氨酸/丙氨酸/甘氨酸/脯氨酸; 极性或无电荷亲水性氨基酸丝氨酸/苏氨酸。保守氨基酸取代还包括基于侧链的分组。例如, 带有脂肪族侧链的氨基酸组是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸; 带有脂肪族-羟基侧链的氨基酸组是丝氨酸和苏氨酸; 带有含酰胺侧链的氨基酸组是天冬酰胺和谷氨酰胺; 带有芳香族侧链的氨基酸组是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸; 带有碱性侧链的氨基酸组是赖氨酸、精氨酸和组氨酸; 以及带有含硫侧链的氨基酸组是半胱氨酸和甲硫氨酸。例如, 能合理预期用异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸, 用谷氨酸取代天冬氨酸, 用丝氨酸取代苏氨酸, 或用结构上相关氨基酸类似地取代某氨基酸对所得多肽的特性不会产生大影响。氨基酸改变是否产生功能性多肽可以通过测定多肽的特异性活性容易地确定。

[0116] 自杀基因

[0117] 自杀基因已经在癌症治疗中进行了测试。现今用于癌症治疗的常规化疗的主要限制是由于药物对正常组织作用所导致的低治疗指数以及副作用。研发具有对肿瘤选择性增强的疗法中最创新的方法之一是基因疗法。

[0118] 自杀基因疗法的基本概念如下: 将基因选择性地导入肿瘤环境, 其编码使全身可用的前药局部代谢成活性抗肿瘤剂的酶。用于癌症疗法的自杀基因方法的第一示例是将单纯性疱疹病毒胸苷激酶基因导入肿瘤BALB/c小鼠K3T3肉瘤细胞系。以更昔洛韦的治疗中, 更昔洛韦被胸苷激酶转换成这样的化合物, 所述化合物在通过细胞激酶的三磷酸化作用后变的具有毒性导致体外肿瘤细胞的破坏。向具有通过细胞系产生的K3T3肉瘤的BALB/c小鼠给予更昔洛韦导致体内肿瘤的破坏。自杀基因疗法的中心原理是在健康宿主组织和癌症细胞之间人工生成可利用的生化差异。

[0119] 在本发明中, 利用自杀基因清除仍然含有附加型重编程载体的iPSC。当自杀基因

系统被激活时,只有含有附加型载体的那些细胞被杀伤。

[0120] 用于生成无载体的诱导多能干细胞的染色体外载体

[0121] 如上所述,使用异位表达重编程基因的逆转录病毒或慢病毒载体已经实现了由人类体细胞生成多能干细胞。诸如莫洛尼鼠白血病病毒的重组逆转录病毒具有以稳定的形式整合到宿主基因组中的能力。它们含有逆转录酶,其允许整合到宿主基因组。慢病毒是逆转录病毒的亚类。由于它们整合到非分裂以及分裂细胞基因组的能力,它们广泛地用作载体。这些病毒载体也已经被广泛地用于更广泛的范围:细胞的分化编程,包括重编程、分化和转化分化。RNA形式的病毒基因组在病毒进入细胞时进行逆转录以产生DNA,然后通过病毒整合酶以随机位置插入基因组。如上所述,基于细胞疗法的治疗性应用并不优选将病毒核苷酸整合至宿主基因组。

[0122] 因此,在某些实施方式中,本发明提供了生成基本上不含外源性遗传元件的诱导多能干细胞和其它所需细胞类型的方法,诸如由之前方法中所用的逆转录病毒或慢病毒载体。这些方法利用染色体外复制载体,或能够以附加体方式复制的载体。

[0123] EB病毒

[0124] 也称为人类疱疹病毒4 (HHV-4) 的EB病毒 (EBV) 是疱疹病毒家族 (其包括单纯性疱疹病毒和巨细胞病毒) 的一种病毒。EBV染色体外维持其基因组并与宿主细胞器 (machinery) 合作用于高效复制和维持,这仅依赖于其复制的两个基本特征以及细胞分裂期间在细胞内的保留。OriP元件以顺式存在,并且作为复制的起点。另一因子EBNA1反式作用,通过与OriP内序列结合来促进质粒DNA的复制和维持。

[0125] OriP

[0126] OriP是支持人细胞中质粒复制和稳定维持的EB病毒染色体区域。其是位于或邻近DNA复制启动的位点,并由相距约1千碱基对的两个顺式作用序列组成,所述两个顺式作用序列被称为重复家族 (family of repeats, FR) 和二重对称 (dyad symmetry, DS)。

[0127] FR由21个30bp重复的不完美拷贝组成,并且包含20个高亲和力EBNA-1结合位点。当FR与EBNA1结合时,其既作为上至10kb远的顺式启动子的转录增强子,又有助于核保留以及含FR质粒的忠实维持。OriP质粒的高效分配也可能归因于FR。尽管病毒已经进化出维持FR中20个EBNA1-结合位点,但是高效的质粒维持仅需要这些位点中的7个,并且可以通过3个DS拷贝的聚合物重建,其一共具有12个EBNA1-结合位点。

[0128] 二重对称元件 (DS) 足以在EBNA1存在的情况下启动DNA合成,并且启动发生在或邻近DS。病毒DNA合成的终止被认为发生在FR,因为如2D凝胶电泳所观察,当FR与EBNA1结合时,其作为复制叉屏障。由DS启动DNA合成被许可成每个细胞周期一次,并且通过细胞复制系统的组分调节。DS含有4个EBNA1-结合位点,尽管其所具有的亲和力比FR中的那些低。DS的拓扑结构使得四个结合位点以两对位点排列,其中各对之间具有21bp的中心间距,而两个非配对内部结合位点之间具有33bp的中心间距。

[0129] DS内元件的功能性作用已经通过被称作Rep*的EBV基因组的另一区域的研究确认,Rep*被鉴定为可以低效地替代DS的元件。将Rep*聚合8次产生了与DS对复制支持一样高效的元件。Rep*的生化解剖鉴定了一对EBNA 1-结合位点,其具有对其复制功能重要的21bp中心间距 (ibid)。发现Rep*的最小复制子 (replicator) 是该对EBNA 1-结合位点,因为即使聚合物中所有的侧接序列被衍生自 λ 噬菌体的序列替换,其复制功能仍然保留。DS和Rep*的

比较揭示了一种常用机制:这些复制子通过经由一对适当间隔的位点招募细胞复制器来支持DNA合成的启动,所述位点被EBNA1弯曲和结合。

[0130] 存在于哺乳动物细胞中复制的其它染色体外质粒与EBV无关,并且看起来与EBV的Raji菌株内的启动区域类似。例如,本领域已知含有“核骨架/基质连接区域”(S/MAR)和稳健转录单位的质粒。它们的S/MAR来自人干扰素- β 基因,A/T富集,并且通过其与核基质的关联以及其在低离子强度下或当包埋于超螺旋DNA时的优选解链操作性地限定。这些质粒半保留地复制,结合ORC蛋白,并且在它们整个DNA中有效且随机地支持DNA合成的启动。它们在没有药物选择的情况下高效地维持在增殖的仓鼠和人细胞中,并且当被导入猪胚胎时,可以支持GFP在胎儿动物的大多数组织中的表达。

[0131] EBNA1

[0132] EB核抗原1 (EBNA1) 是一种DNA-结合蛋白,其与Rep*或OriP的FR和DS结合以促进EBV质粒复制和忠实分配至的子细胞,其在细胞分裂期间独立于细胞染色体但是与细胞染色体协同。

[0133] 通过突变和缺失分析,将EBNA1的641个氨基酸(AA)分类至与其各种功能相关的结构域。位于AA40-89和AA329-378之间的两个区域当通过EBNA1结合时能够顺式或反式连接两个DNA元件,并且因此被称为连接区1和2(LR1和LR2)。将EBNA1的这些结构域与GFP融合使用的GFP回归有丝分裂染色体。LR1和LR2对于复制是功能冗余的;缺失其中之一产生能够支持DNA复制的EBNA1衍生物。LR1和LR2富集精氨酸和甘氨酸残基,并且与结合A/T富集DNA的AT-钩部分类似。体外分析EBNA1的LR1和LR2已经证明其结合A/T富集DNA的能力。当含有一个这样AT-钩的LR1与EBNA1的DNA-结合和二聚化结构域融合时,发现其足以实现OriP质粒的DNA复制,虽然不如野生型EBNA1高效。

[0134] EBNA1对OriP复制的支持并不需要LR2。此外,可以用含有AT-钩基序的细胞蛋白(诸如HMG1a)替换EBNA1的N末端半部,并且仍然保持复制功能。这些发现表示,在人类细胞中维持OriP所需要的可能是LR1和LR2的AT-钩活性。

[0135] 三分之一的EBNA残基(AA91-328)由甘氨酸-甘氨酸-丙氨酸(GGA)重复组成,涉及EBNA通过抑制蛋白酶体降解和呈递来避免宿主免疫应答的能力。同样还发现这些重复将抑制EBNA1的体外和体内翻译。然而,该结构域的大量缺失对于EBNA1在细胞培养中的功能没有显著影响。

[0136] 核定位信号(NLS)由AA379-386编码,并且还与细胞核纳入器(importation machinery)关联。

[0137] 最后,C-末端(AA458-607)编码EBNA1的重叠DNA-结合和二聚化结构域。结合DNA的这些结构域的结构通过X射线晶体学解析,并且发现其与乳头瘤病毒E2蛋白的DNA-结合结构域相似。

[0138] 在本发明的实施方式中,重编程载体将包含OriP以及编码这样形式EBNA1的缩短序列(abbreviated sequence),所述EBNA1能够支持质粒复制以及其在细胞分裂期间的正确维持。三分之一的野生型EBNA1氨基末端内高度重复序列以及去除在各种细胞中已经显示出毒性的25个氨基酸区域对于EBNA1与OriP相关的反式作用是非必需的。因此,示例性衍生物,被称为 Δ UR1的EBNA1的缩短形式可与OriP一起在该基于质粒的系统中使用。本领域已知可由染色体外模板激活转录的EBNA1衍生物的更多示例,例如,Kirchmaier和Sugden,

J.Virol.71 (3):1776-1775 (1997),以及Kennedy和Sugden,Mol.Cell.Biol.23 (19):6901-6908 (2003),两者通过引用纳入本文。

[0139] 用于本发明的一种EBNA-1的衍生物是多肽,相对于对应的野生型多肽,其具有修饰的氨基酸序列。修饰包括在对应EBNA-1中LR1 (约40-约89残基) 独特区域 (约65-约89残基) 的区域中缺失、插入或取代至少一个氨基酸残基,并且可以包括在对应EBNA-1其它残基的区域中缺失、插入和/或取代一个或多个氨基酸残基,例如,约1-约40残基、约90-约328残基 (“Gly-Gly-Ala” 重复区域)、约329-约377残基 (LR2)、约379-约386残基 (NLS)、约451-约608残基 (DNA结合和二聚化) 或约609-约641残基,只要所得到的衍生物具有所需特性,例如,二聚化和结合含有对应OriP的ori的DNA,定位于细胞核,不是细胞毒性的,并且由染色体外激活转录而不是由整合的模板大体上激活转录。取代包括利用D型而非L型以及其它已知氨基酸类似物的取代,例如,非天然氨基酸,诸如 α -双取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸等。这些类似物包括磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸,磷酸酪氨酸,羟脯氨酸, γ -羧基谷氨酸;马尿酸,八氢吡啶-2-羧酸,抑胃酶氨酸,1,2,3,4,-四氢异喹啉-3-羧酸,青霉素,鸟氨酸,瓜氨酸, α -甲基-丙氨酸,对苯甲酰基-苯丙氨酸,苯基甘氨酸,炔丙基甘氨酸,肌氨酸, ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸, ϵ -N-乙酰赖氨酸,N-乙酰丝氨酸,N-甲酰基甲硫氨酸,3-甲基组氨酸,5-羟基赖氨酸, ω -N-甲基精氨酸和其他类似的氨基酸和亚氨基酸和叔丁基甘氨酸。

[0140] 优选保守氨基酸取代,也就是,例如,极性酸性氨基酸天冬氨酸-谷氨酸;极性碱性氨基酸的赖氨酸/精氨酸/组氨酸;非极性或疏水性氨基酸亮氨酸/异亮氨酸/甲硫氨酸/缬氨酸/丙氨酸/甘氨酸/脯氨酸;极性或无电荷亲水性氨基酸丝氨酸/苏氨酸。保守氨基酸取代还包括基于侧链的分组。例如,带有脂肪族侧链的氨基酸组是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;带有脂肪族-羟基侧链的氨基酸组是丝氨酸和苏氨酸;带有含酰胺侧链的氨基酸组是天冬酰胺和谷氨酰胺;带有芳香族侧链的氨基酸组是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;带有碱性侧链的氨基酸组是赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及带有含硫侧链的氨基酸组是半胱氨酸和甲硫氨酸。例如,能合理预期用异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸,用谷氨酸取代天冬氨酸,用丝氨酸取代苏氨酸,或用结构上相关氨基酸类似地取代某氨基酸对所得分子的属性不会产生大影响。氨基酸改变是否产生功能性多肽可以通过测定多肽的特异性活性容易地确定。

[0141] 通常,落入本发明范围内的氨基酸取代通过选择对以下结果的维持上没有显著差异的取代来实现:(a) 取代区域中肽主链的结构,(b) 分子在目标位点处的电荷或疏水性,或(c) 侧链体积。基于共同的侧链特性将天然产生的残基分组:

[0142] (1) 疏水性:met、ala、val、leu、ile;

[0143] (2) 中性亲水性:cys、ser、thr;

[0144] (3) 酸性:asp、glu;

[0145] (4) 碱性:asn、gln、his、lys、arg;

[0146] (5) 影响链取向的残基:gly、pro;和

[0147] (6) 芳族:trp、tyr、phe。

[0148] 本发明还考虑了具有非保守取代的多肽。非保守取代需要将上述类型中一种类型的成员更换为另一种类型的成员。

[0149] 多肽或该多肽氨基残基的酸加成盐可以通过将多肽或胺与一个或多个当量的所

需无机或有机酸(例如,盐酸)接触制备。多肽羧基的酯也可以通过本领域已知的任何常用方法制备。

[0150] 载体构建和递送

[0151] 在某些实施方式中,重编程或分化编程载体被构建除了上述编码重编程因子、分化重编程因子和/或合成转录因子的核酸序列以外,还包括其它元件,从而在细胞中表达这些重编程因子。在实施方式中,这些载体的组分和递送方法如下述所公开。

[0152] 载体

[0153] 基于质粒或脂质体的染色体外质粒(例如基于OriP的载体)和/或编码EBNA-1衍生物的载体的使用允许向细胞导入DNA的大片段并且在染色体外维持。

[0154] 其它染色体外载体包括其它基于淋巴营养性疱疹病毒的载体。淋巴营养性疱疹病毒是这样一种疱疹病毒,其在淋巴母细胞(例如,人B淋巴母细胞)中复制并且在其自然生命周期的部分变成质粒。示例性的淋巴营养性疱疹病毒包括但不限于,EBV,卡波济氏肉瘤疱疹病毒(KSHV);松鼠猴疱疹病毒(HSV)和马立克氏病病毒(MDV)。也提供了基于附加体的载体的其它来源,诸如酵母ARS、腺病毒、SV40或BPV。

[0155] 载体还可以包括其它组分或官能团,其进一步调节基因递送和/或基因表达,或以其它方式向靶向的细胞提供有益的特性。这样的其它组分包括,例如,影响对细胞结合和靶向的组分(包括介导细胞类型或组织特异性结合的组分);影响细胞摄入载体核酸的组分;影响摄入后细胞内多核苷酸定位的组分(诸如介导核酸定位的试剂);以及影响多核苷酸表达的组分。

[0156] 调节元件

[0157] 载体中包括的真核表达盒优选包含(以5'-至-3'方向)真核转录启动子,其可操作地连接编码蛋白质的序列,包括间插序列的剪接信号以及转录终止/多聚腺苷酸化序列。

[0158] 启动子/增强子

[0159] “启动子”是一种控制序列,其是核酸序列的一个区域,在该区域中控制转录的启动和速率。其可含有调控蛋白和分子(如RNA聚合物和其他转录因子)可结合的遗传元件以启动核酸序列的具体转录。术语“可操作地定位”、“可操作地连接”、“控制下”和“转录控制下”表示启动子位于相对于核酸序列的正确功能性位置和/或取向以控制该序列的转录启动和/或表达。

[0160] 适用于本发明EBNA-1-编码载体的启动子是这样的启动子,所述启动子指导编码EBNA-1蛋白的表达盒表达以产生足够稳态水平的EBNA-1蛋白质,从而稳定维持含有EBV OriP的载体。启动子还用于高效表达编码重编程因子和/或合成转录因子的表达盒。

[0161] 启动子一般包含功能为定位RNA合成的起始位点的序列。其熟知的示例是TATA盒,但在一些缺少TATA盒的启动子中,例如,哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和SV40晚基因的启动子,与其起始位点本身重叠的离散元件有助于固定启动的位置。其他启动子元件调控转录启动的频率。通常,这些位于起始位点上游30-110bp的区域中,但是几种启动子已经显示在起始位点的下游也含有功能元件。为了将编码序列置于启动子的“控制下”,将其定位于所选择启动子的“下游”(即3'端)的转录阅读框的转录启动位点的5'端。“上游”启动子刺激DNA的转录并且促进编码的RNA的表达。

[0162] 启动子元件之间的间隙通常是柔性的,使得当元件翻转或相对于彼此移动时保留

启动子功能。在tk启动子中,在活性开始减弱之前,启动子元件之间的间距可增加到50bp。取决于启动子,单个元件似乎可协同或单独发挥作用以激活转录。启动子可与或可不与“增强子”联用,增强子是指参与核酸序列的转录活性的顺式作用调控序列。

[0163] 启动子可以是与核酸序列天然相关的启动子,如可通过分离位于编码片段和/或外显子上游的5'非编码序列获得。这种启动子可称为“内源的”。类似地,增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子,位于该序列的上游或下游。或者,将通过定位重组或异源启动子控制下的编码核酸片段来获得特定优势,该重组或异源启动子是指在其天然环境中正常情况下不与核酸序列相关的启动子。重组或异源增强子也指在其天然环境中通常不与核酸序列相关的增强子。这类启动子或增强子可包括其他基因的启动子或增强子、从任意其他病毒或原核或真核细胞中分离的启动子或增强子、和“天然不存在”的启动子或增强子,即含有不同转录调控区域的不同元件,和/或改变表达的突变。例如,在重组DNA构建中最常用的启动子包括 β -内酰胺酶(青霉素酶),乳糖和色氨酸(trp)启动子系统。除了通过合成产生启动子和增强子的核酸序列以外,可使用重组克隆和/或核酸扩增技术(包括PCR与本文所述的组合物结合)来产生序列。此外,在实施方式中,也可采用在非核细胞器如线粒体、叶绿体等内引序列的转录和/或翻译的控制序列。

[0164] 采用有效引导DNA片段在选择表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生物体中表达的启动子和/或增强子会是重要的。所采用的启动子可以是组成型、组织特异性、诱导型、和/或可用于在合适条件下引导导入的DNA片段的高水平表达,这在重组蛋白和/或肽的大规模生产中是有优势的。启动子可以是异源或内源的。

[0165] T3、T7或SP6胞质表达系统的使用是一种实施方式。如果以递送复合物的部分或额外的基因表达构建体提供合适的细菌聚合酶,真核细胞可支持来自特定细菌启动子的胞质转录。

[0166] 启动子的非限制示例包括早期或晚期病毒启动子,诸如SV40早期或晚期启动子,巨细胞病毒(CMV)即刻早期启动子,劳斯氏肉瘤病毒(RSV)早期启动子;真核细胞启动子,诸如例如 β 肌动蛋白启动子(Ng, S.Y., Nuc. Acid Res. 17:601-615, 1989, Quitsche等, J. Biol. Chem. 264:9539-9545, 1989), GADPH启动子(Alexander等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:5092-5096, 1988, Ercolani等, J. Biol. Chem. 263:15335-15341, 1988), 金属硫蛋白启动子(Karin等Cell 36:371-379, 1989; Richards等, Cell 37:263-272, 1984);以及连接的应答元件启动子,诸如邻近最小TATA盒的环状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)和应答元件启动子(tre)。还可以使用人生长激素启动子序列(例如, Genbank登录号X05244所描述的人生长激素最小启动子, 核苷酸283-341)或小鼠乳腺肿瘤启动子(可由ATCC获得, 目录号ATCC 45007)。具体示例是磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子。

[0167] 启动信号和内部核糖体结合位点

[0168] 编码序列的充分翻译也可能需要特异性启动信号。这些信号包括ATG启动密码子或相邻序列。可能需要提供外源性翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将易于确定这些并提供必要的信号。众所周知,启动密码子必需与所需编码序列的阅读框在同一“框内”,以保证完整插入物的翻译。外源翻译控制信号和启动密码子可为天然或合成的。表达效率可以通过包括合适转录增强子元件等来增强。

[0169] 多重克隆位点

[0170] 载体可包括多重克隆位点(MCS),其为含有多个限制性酶位点的核酸区域,其中任意位点可与标准重组技术联用来消化载体。“限制性酶消化”是指用仅在核酸分子的特异性位置上发挥作用的酶催化切割核酸分子。这些限制性酶中的许多是市售可得的。

[0171] 剪接位点

[0172] 在实施方式中,用于本发明方法的载体包括剪接位点。大多数转录的真核RNA分子将会进行RNA剪接以从初级转录物去除内含子。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,以保证适当处理蛋白质表达的转录物。

[0173] 终止信号

[0174] 在实施方式中,本发明的载体或构建体包括至少一种终止信号。“终止信号”或“终止子”包含参与由RNA聚合酶对RNA转录物的特异性终止的DNA序列。因此,在某些实施方式中,提供了终止RNA转录物产生的终止信号。终止子可能是体内实现所需信使水平需要的。

[0175] 在真核系统中,终止子区域还可以包含允许新转录物的位点特异性切割以暴露多聚腺苷酸化位点的特异性DNA序列。这向专门的内源性聚合酶提供向转录物的3'末端添加约200个A残基延伸(聚A)的信号。用该聚A尾修饰的RNA分子看起来更加稳定,并且被更高效地翻译。因此,在涉及真核细胞的其它实施方式中,优选的是终止子包括用于切割RNA的信号,并且更优选的是终止子信号促进信使多聚腺苷酸化。终止子和/或多聚腺苷酸化位点元件可用于提高信使水平和最小化从所述盒向其他序列的通读。

[0176] 提供的用于本发明的终止子包括本文所述或本领域普通技术人员已知的任何已知的转录终止子,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。在某些实施方式中,终止信号可能缺乏可转录或可翻译序列,例如由于序列截短。

[0177] 多聚腺苷酸化信号

[0178] 在表达中,特别是在真核表达中,通常包括多聚腺苷酸化信号以实现转录物的适当多聚腺苷酸化。多聚腺苷酸化信号的性质不被认为是成功实施本发明的关键,并且任何可以使用任何这样的序列。优选的实施方式包括SV40多聚腺苷酸化信号或牛生长激素多聚腺苷酸化信号,方便且已知在各种靶细胞中有良好功能。多聚腺苷酸化可能增加转录物的稳定性,或可能促进胞质运输。

[0179] 选择和可筛选标志物

[0180] 在本发明的某些实施方式中,含有本发明核酸构建体的细胞可以通过包括表达载体中的标志物体外或体内鉴定。此类标志物赋予细胞可鉴定的改变,使得可以容易地鉴定含有表达载体的细胞。通常,选择标志物赋予允许进行选择特性。正选择标志物是该标志物的存在将允许其进行选择的标志物,而负选择标志物是其存在将阻止其进行选择的标志物。正选择标志物的示例是抗药性标志物。

[0181] 通常,药物选择标志物的纳入能协助克隆和鉴定转化体,例如,赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博来霉素和组氨醇抗性的基因是有用的选择标志物。除了赋予允许基于施加的条件区分转化体的表型的标志物外,还提供了包括可筛选标志物的其它类型的标志物,诸如其基础是量热分析的GFP。或者,可以利用可筛选酶作为负选择标志物,诸如单纯性疱疹病毒胸苷激酶(tk)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。本领域技术人员还将了解如

何应用免疫标志物,有可能与FACS分析联合。使用的标志物并不被认为是重要的,只要其能与编码基因产物的基因同时表达即可。选择和可筛选标志物的其它示例为本领域普通技术人员熟知。本发明的一个特征包括在分化编程因子已经在这些细胞中实现所需改变的分化状态后,使用选择和可筛选标志物来选择无载体的细胞

[0182] 载体递送

[0183] 藉由本发明将重编程或分化编程载体导入体细胞可以使用本文所述或本领域普通技术人员已知的任何合适的核酸递送方法来转化细胞。这类方法包括但不限于,直接递送DNA,诸如通过离体转染,包括显微注射;通过电穿孔;通过磷酸钙沉淀法;通过使用DEAE-右旋糖苷然后通过聚乙二醇;通过直接超声加载;通过脂质体介导的转染和受体介导的转染;通过微粒轰击;通过与碳化硅纤维搅拌;通过农杆菌介导的转化;通过PEG介导的原生质体转化;通过干燥/抑制介导的DNA摄取以及这些方法的任意组合。递送本发明载体的其它方法包括“细胞挤压(cell squeezing)”,其涉及细胞的快速机械变形以将大分子和纳米材料递送至细胞。参见例如,Sharei,“细胞挤压作为稳定的微流体细胞内递送平台(Cell Squeezing as a Robust, Microfluidic Intracellular Delivery Platform)”,*J. Vis. Exp.* 81:1-7 (2013),通过引用将其纳入本文。

[0184] 脂质体介导的转染

[0185] 在本发明的某些实施方式中,核酸可包埋在脂质复合物,例如脂质体中。脂质体是水泡性结构,特征为磷脂双层膜和内部水性介质。多层脂质体具有水性介质隔开的多重脂质层。当磷脂悬浮在过量水溶液中时其自动形成。脂质组分进行自重排列,然后形成闭合结构并将水包埋在内,并溶解脂双层之间的溶质。还提供了与Lipofectamine (吉布可BRL公司(Gibco BRL))或Superfect (凯杰公司(Qiagen))复合的核酸。所用脂质体的量可根据脂质体的性质以及使用的细胞变化,例如,每1百万-1千万细胞可以使用约5-20 μ g载体DNA。

[0186] 电穿孔

[0187] 在本发明的某些实施方式中,核酸通过电穿孔被导入细胞器官、细胞、组织或生物体。电穿孔涉及细胞和DNA悬液暴露至高压放电。通过机械损伤可使受体细胞更易于转化。同样,所用载体的量可根据所用细胞的性质变化,例如,每1百万-1千万细胞可以提供约5-20微克载体DNA。

[0188] 通过电穿孔转染真核细胞非常成功。通过该方法,小鼠前B淋巴细胞已用人 κ -免疫球蛋白基因转染(Potter等,1984),且大鼠肝实质细胞已用氯霉素乙酰基转移酶基因转染(Tur-Kaspa等,1986)。

[0189] 磷酸钙

[0190] 在本发明的其他实施方式中,使用磷酸钙沉淀法将核酸导入细胞。人KB细胞已使用该技术用腺病毒5DNA转染。同样用该方法,小鼠L(A9)、小鼠C127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3和HeLa细胞用新霉素标志物基因转染,而大鼠肝实质细胞用各种标志物基因转染。

[0191] DEAE-右旋糖苷

[0192] 在另一实施方式中,用DEAE-右旋糖苷然后用聚乙二醇将核酸递送至细胞。通过该方法,报告质粒被导入小鼠骨髓瘤和红白血病细胞。

[0193] 超声加载

[0194] 本发明的其他实施方式包括通过直接超声加载导入核酸。LTK-成纤维细胞已通过

超声加载用胸苷激酶转染。

[0195] 受体介导的转染

[0196] 此外,核酸可经由受体介导的递送载体递送至靶细胞。这通过靶细胞中发生的受体介导的内吞作用利用大分子的选择性摄取。考虑各种受体的细胞类型特异分布,该递送方法对本发明增加另一程度的特异性。

[0197] 某些受体介导的基因靶向载体包含细胞受体特异性配体和核酸结合剂。其他包括细胞受体特异性配体,待递送的核酸以可操作地与之结合。在本发明的某些方面,将会选择配体以对应靶细胞群上特异性表达的受体。

[0198] 在其他实施方式中,细胞特异性核酸靶向载体的核酸递送载体组分可包括与脂质体组合的特异性结合配体。待递送的核酸封装于脂质体内,并且特异性结合配体被功能性地纳入脂质体膜中。该脂质体因此特异性地结合靶细胞的受体并递送该内容至细胞。已表明此类系统在(例如)表皮生长因子(EGF)用在受体介导的核酸向细胞的递送中的系统中有功能,所述细胞表现出EGF受体下调。

[0199] 在其他实施方式中,靶递送载体的核酸递送载体组分为脂质体自身,其将优选包含指导细胞特异性结合的一种或多种脂质或糖蛋白。例如,乳糖基(lactosyl)-神经酰胺、半乳糖-末端无唾液酸神经节苷脂(asialganglioside)已被纳入脂质体中并观察到肝实质细胞对胰岛素基因摄取的增加(Nicolau等,1987)。这提供了本发明的组织特异性转化构建体可以类似的方式特异性地递送至靶细胞。

[0200] 微粒轰击

[0201] 微粒轰击技术可以用于将核酸导入至少一种细胞器、细胞、组织或生物体。该方法取决于将DNA包被的微粒加速至高速以使其穿透细胞膜进入细胞而不杀死细胞的能力。本领域已知各种微粒轰击技术,其中许多可用于本发明。

[0202] 在该微粒轰击中,可用至少一种核酸包被一种或多种颗粒,并通过推入力将其递送至细胞。已开发了加速小颗粒的数种装置。一种这样的装置依赖高压放电来产生电流,继而提供原动力。所用微颗粒由生物惰性物质组成,例如钨或金颗粒或珠。示例性颗粒包括由钨、铂、和金(优选的)组成的颗粒。在一些情况中,这提供了使用微粒轰击将DNA递送至受体细胞不在需要将DNA沉积在金属颗粒上。然而,这提供了颗粒可能含DNA而非用DNA包被。DNA包被的颗粒可能增加了经由颗粒轰击的DNA递送水平,但就其本身而言并非必须。

[0203] 对于轰击,悬浮液中细胞在过滤器或固体培养基上浓缩。或者,可以将未成熟胚或其它靶细胞设置在固体培养基上。待轰击的细胞位于巨粒(macroparticle)停止平板下适当距离。

[0204] 选择iPS细胞

[0205] 在本发明的某些方面,重编程载体导入体细胞后,对细胞进行培养扩增(任选地选择例如正选择或可筛选标志物等载体元件的存在来浓缩转染的细胞),并且重编程载体将在这些细胞中表达重编程因子并且与细胞分裂一起复制和分配。这些表达的重编程因子将会重编程体细胞基因组以建立自持型(self-sustaining)多能状态,并且在去除载体存在的正向选择后或同时,外源性遗传元件将逐渐丧失。这些诱导多能干细胞可以选自基于胚胎干细胞特征的体细胞衍生的子代,因为所期望的是它们与多能胚胎干细胞具有相似的特征。还可以应用其它负选择步骤,通过检测不存在重编程载体DNA或使用选择标志物来加速

或协助选择基本上没有外源性遗传元件的iPSC细胞。

[0206] 选择胚胎干细胞特征

[0207] iPSC与天然分离的多能干细胞(诸如小鼠和人胚胎干细胞,分别为mESC和hESC)在下述方面相似,因此确认iPSC相对天然分离的多能干细胞的同一性、可靠性和多能性。因此,由本发明公开方法生成的诱导多能干细胞可以基于一种或多种下述胚胎干细胞特征进行选择。

[0208] 细胞生物学特性

[0209] 形态学:iPSC与ESC形态上相似。各细胞可以具有圆形的大细胞核以及少量细胞质。iPSC的集落可以与ESC的集落相似。人iPSC形成与hESC相似的锋利、平坦、紧凑的集落,而小鼠iPSC形成与mESC相似的集落,其与hESC相比较不平坦但更聚集。

[0210] 生长特性:倍增时间和有丝分裂活性是ESC的基础,因为干细胞必须自我更新作为其定义的一部分。iPSC可以是有丝分裂活跃的,主动自我更新,增殖并且以与ESC相等的速率分裂。

[0211] 干细胞细胞外标志物:iPSC可以表达ESC上表达的细胞表面抗原性标志物。人iPSC表达对hESC具有特异性的标志物,包括但不限于SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-49/6E。与mESC相似,小鼠iPSC表达SSEA-1,但是不表达SSEA-3或SSEA-4。

[0212] 干细胞基因:iPSC可以表达未分化ESC中表达的基因,包括Oct-3/4、Sox-2、Nanog、GDF3、REX1、FGF4、ESG1、DPPA2、DPPA4和hTERT。

[0213] 端粒酶活性:维持细胞分裂不受到约50次细胞分裂海弗利克极限(Hayflicklimit)限制所必需的是端粒酶。hESC表达高端粒酶活性以维持自我更新和增殖,并且iPSC还显示出高端粒酶活性和表达hTERT(人端粒酶逆转录酶),其是端粒酶蛋白复合物所必需的组分。

[0214] 多能性:iPSC能够以与ESC相似的方式分化成三胚层细胞。

[0215] 神经分化: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。儿茶酚胺相关酶的存在可以表明iPSC可以像hESC分化成多巴胺能神经元。干细胞相关基因将在分化后下调。

[0216] 心脏分化:iPSC可以分化成自发地开始跳动的心肌细胞。心肌细胞表达TnTc、MEF2C、MYL2A、MYHCB和NKX2.5。干细胞相关基因将在分化后下调。

[0217] 畸胎瘤形成:将iPSC注射到免疫缺陷小鼠可以在特定时间后自发地形成畸胎瘤,如9周。畸胎瘤是含有源自内胚层、中胚层和外胚层三个胚层的组织的多个谱系的肿瘤;这与通常只有一种细胞类型的其他肿瘤不同。畸胎瘤形成是多样性的标志测试。

[0218] 拟胚体:培养中的hESC同时形成被称为“拟胚体”球状胚胎样结构,其由有丝分裂活性和分化的hESC的核心以及由所有三个胚层完全分化的细胞的外围组成。iPSC还可以形成拟胚体,并且具有外周分化细胞。

[0219] 囊胚注射:hESC通常位于囊胚的内细胞团(成胚细胞)内,并且在成胚细胞中,分化成胚胎,而囊胚的壳体(滋养层)分化成胚胎外组织。中空的滋养层无法形成活胚胎,并且因此成胚细胞内的胚胎干细胞需要分化并形成胚胎。iPSC通过微量移液管注射到滋养层以生成转移至雌性受体的囊胚,这将导致嵌合的存活小鼠幼崽;具有iPSC衍生物的小鼠在其全身具有10%-90%嵌合性。

[0220] 表观遗传重编程

[0221] 启动子脱甲基化:甲基化将甲基基团转移至DNA碱基,通常将甲基基团转移至CpG位点内的胞嘧啶分子(邻近胞嘧啶/鸟嘌呤序列)。基因的广泛甲基化通过抑制表达蛋白质的活性或招募干扰表达的酶来干扰表达。因此,基因的甲基化通过抑制转录有效将其沉默。多能性相关基因的启动子,包括Oct-3/4、Rex1和Nanog可以在iPSC中脱甲基化,显示其启动子活性,并且激活在iPSC中促进和表达多能性相关基因。

[0222] 组蛋白脱甲基化:组蛋白是这样的压缩蛋白(compacting protein),其结构性地定位于可以通过各种染色质相关修饰实现其活性的DNA序列。与Oct-3/4、Sox-2和Nanog相关的H3组蛋白可以经脱甲基化以激活Oct-3/4、Sox-2和Nanog的表达。

[0223] 选择无残基特征

[0224] 本发明中诸如基于OriP的质粒的重编程载体将在染色体外复制,并且在生成之后不存在于宿主细胞中。然而,基本上不含外源性载体元件的后代细胞的其它选择步骤可以协助该过程。例如,可以提取后代细胞的样品来测试本领域已知外源性载体元件的存在与否。

[0225] 另一种方法或互补的方法是使用常规方法测试后代细胞中不存在外源性遗传元件,如RT-PCR、PCR、FISH(荧光原位杂交法)、基因阵列或杂交(例如,Southern印迹)。

[0226] 培养iPS细胞

[0227] 使用公开的方法将重编程载体导入体细胞后,在足以维持多能性的培养基中培养这些细胞。培养本发明生成的诱导多能干(iPS)细胞可以使用针对培养灵长类多能干细胞,特别是胚胎干细胞所研发的各种培养基和技术。

[0228] 例如,如同人胚胎干(hES)细胞,iPS细胞可以维持在80%DMEM(吉布可公司(Gibco)#10829-018或#11965-092),20%组成明确的胎牛血清(FBS)未加热失活,1%非必需氨基酸,1mM L-谷氨酰胺和0.1mMβ-巯基乙醇。或者,ES细胞可以维持在无血清培养基中,其由80%敲除DMEM(吉布可公司#10829-018),20%血清替代物(吉布可公司#10828-028),1%非必需氨基酸,谷氨酰胺和0.1mMβ-巯基乙醇制备。在使用前,添加人bFGF至约4ng/mL的最终浓度(WO 99/20741)。

[0229] 如同ES细胞,IPS细胞具有可以通过免疫组织化学或流式细胞术鉴定的特征抗原,这使用针对SSEA-1、SSEA-3和SSEA-4的抗体(贝塞斯达马里兰州儿童健康与人类发展国家研究所的杂交瘤发展研究库(Developmental Studies Hybridoma Bank,National Institute of Child Health and Human Development,Bethesda Md))以及TRA-1-60和TRA-1-81(Andrews等于Robertson E编著《畸胎瘤和胚胎干细胞(Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells)》,IRL出版社,207-246,1987)。胚胎干细胞的多能性可以通过将大约0.5-10¹⁰ 6个细胞注射到8-12周龄雄性SCID小鼠后腿部肌肉确认。生成的畸胎瘤证明三胚层各自至少一种细胞类型。

实施例

[0230] 下面开始参照以下实施例描述本发明。这些实施例仅为说明性的,并且不应当认为本发明仅限于这些实施例,而应认为本发明涵盖通过本文所提供教导可明显看出的任何和所有变化形式。

- [0231] 实施例1
- [0232] 材料和方法
- [0233] 方案:用附加型质粒对人PBMC进行非饲养依赖性 (Feeder-Independent) 重编程以及使用4D核转染对增强子A进行重编程。
- [0234] 材料:
- [0235] 1.hPBMC(隆萨公司 (Lonza) 目录CC-2702, (50x10⁶个细胞/瓶)
- [0236] 2.Lonza L7 hPSC Culture MediumTM和补充试剂盒
- [0237] 3.Lonza L13 hPSC Passaging SolutionTM
- [0238] 4.Lonza L7 hPSC MatrixTM
- [0239] 5.Lonza 4D NucleofectorTM
- [0240] 6.Lonza P3 Primary Cell 4D-NucleofectorTM试剂盒
- [0241] 7.Lonza Episomal Reprogramming KitTM
- [0242] a.Episomal Reprogramming Plasmid MixTM
- [0243] b.Episomal Enhancer ATM
- [0244] 8.6孔和12孔组织培养处理平板
- [0245] 9.PBMC基础培养基:HPGMTM:无抗体的PoieticsTM造血祖细胞生长培养基。
- [0246] 10.PBMC培养基补充物(参见表格)
- [0247] 11.离心管
- [0248] 12.1X PBS
- [0249] 13.干冰
- [0250] 14.ParafilmTM
- [0251] 15.低氧加湿细胞培养孵育器 (3%O₂;5%CO₂)
- [0252] 16.加湿细胞培养孵育器 (20.9%O₂;5%CO₂)
- [0253] 启动步骤期间(0-6天),观察到细胞数量的显著减少。针对10-50x10⁶起始细胞数量优化该方案。如果启动时少于10x10⁶个细胞,考虑2天后在启动细胞,在第8天核转染。
- [0254] 当保持在4℃时,补充HPGM最长可达10天。所有的离心均应当在室温下进行。
- [0255] 方案
- [0256] 计划和估计每天将需要的PBMC基础培养基和具有补充物的PBMC培养基的量。将所需量置于适当温度。
- [0257] 第0天:从液氮贮槽取出一瓶hPBMC。立即在37℃水浴中开始解冻瓶子,不淹没瓶盖。当出现非常少量可见冰,将瓶从水浴中取出。用70%乙醇清洁瓶外侧。
- [0258] 将瓶内的内容物转移至50ml离心管中。
- [0259] 向细胞逐滴缓慢地加入49ml室温基础PBMC培养基。不要一次性向细胞添加大量培养基。这样可能导致渗透压休克。
- [0260] 以200×g收集细胞15分钟。
- [0261] 将培养基从管中取出,不要破坏细胞沉淀。
- [0262] 温柔地将细胞沉淀悬浮于含有所有补充物的10ml PBMC培养基中。对细胞进行计数。
- [0263] 以2-4×10⁶个细胞/ml将细胞接种到6孔组织培养物处理的平板上。

- [0264] 将平板置于常氧条件 (20.9%O₂; 5%CO₂) 下加湿的37℃孵育器中。
- [0265] 第3天: 将细胞转移至15ml离心管中。用1ml基础PBMC培养基清洗孔。以200×g收集细胞5分钟。将培养基从管中取出, 不要破坏细胞沉淀。
- [0266] 温柔地将细胞沉淀悬浮于含有所有补充物的10ml PBMC培养基中。对细胞进行计数。
- [0267] 以0.5–1×10⁶个细胞/ml将细胞接种到6孔平板上。
- [0268] 将平板置于常氧条件 (20.9%O₂; 5%CO₂) 下加湿的37℃孵育器中。
- [0269] 第5天: 根据说明, 用L7 hPSC Matrix™准备用于第6天的6孔平板。
- [0270] 第6天: 从6孔平板中移出基质溶液。向各需要的孔添加2ml含有所有补充物的PBMC培养基。向各孔添加6μl Episomal Enhancer A™。
- [0271] 以37℃ (3%O₂, 5%CO₂) 在低氧加湿的孵育器中预平衡1小时。
- [0272] 从孵育器移出细胞。转移至15ml管。用1ml基础PBMC培养基清洗孔。对细胞进行计数。
- [0273] 将1×10⁶个细胞转移至至少两个15ml管。
- [0274] 一个管将不经核转染, 并且将会被作为基因组DNA对照制备。该对照可以后续用于确认iPSC系的种类 (STR分析)。
- [0275] 转移管至离心并以200x g收集细胞5分钟。将对照管置于一边直到核转染反应完成。
- [0276] 对于各核转染: 吸取100μl的P3 Nucleofector™溶液至含有3ug的Episomal Reprogramming Plasmid Mix™的管中。
- [0277] 从已经收集在离心管中细胞移去上清液。
- [0278] 将各管细胞悬浮于制备的核转染试剂 (步骤20)。
- [0279] 暴露于P3 Nucleofector™溶液的细胞应当最小化。一次仅通过4D Nucleofector™制备和处理一个管。
- [0280] 转移细胞至Nucleocuvette™, 并且置于4D Nucleofector™。避免产生气泡, 使用程序E0-115核转染细胞。
- [0281] 使用由Nucleofection™试剂盒提供的转移移液管向样品池添加大约500μl预热PBMC培养基 (包含所有补充物), 并且直接将细胞转移到平衡的6孔平板中的一个孔中。
- [0282] 将平板置于37℃ (3%O₂, 5%CO₂) 低氧加湿的孵育器两天。
- [0283] 完成处理基因组DNA对照样品: 从步骤18中置于一边的含有细胞的管移除培养基。使用1ml血清移液管, 在1X PBS中悬浮细胞, 并且转移至1.5ml离心管。以300×g离心细胞5分钟。小心地去除上清液。在干冰上快速冷却细胞沉淀, 并且将样品储存在-80℃。
- [0284] 第8天: 将2ml含有补充物的L7 hPSC Culture Medium™添加到具有核转染细胞的各孔中。
- [0285] 将平板置于37℃ (3%O₂, 5%CO₂) 低氧加湿的孵育器两天。
- [0286] 第10天: 用2ml含有补充物的L7 hPSC Culture Medium™替换培养基。
- [0287] 将平板置于37℃ (3%O₂, 5%CO₂) 低氧加湿的孵育器两天。
- [0288] 从第14天开始继续每隔一天更换培养基: 用2ml含有补充物的L7 hPSC Culture Medium™替换培养基。重复每隔一天更换培养基直至集落大到可以继代培养。

[0289]

[0290]

PBMC 培养基补充物(添加至 HPGM 用于启动以及核转染后恢复)			
组分	供应商	母液浓度	最终浓度
1-硫代甘油	西格玛公司 (Sigma) #M6145		200 μ M
全转铁蛋白	R&D 系统公司 (R&D Systems) #2914-HT	20 mg/ml	100 μ g/ml
地塞米松	西格玛公司 #D1756	10 mM (10,000X)	1 μ M
SCF	派普技术公司 (PeproTech) #300-07	100 ug/ml (2,000X)	100 ng/ml
EPO	R&D 系统公司 #287-TC-500	2 U/ μ l (1,000X)	2 U/ml
IL-3	派普技术公司 #200-03	10 μ g/ml	10 ng/ml
IGF-1	派普技术公司 #100-11	40 ng/ μ l	40 ng/ml

[0291] 继代培养iPSC集落:用L7 hPSC Matrix™制备12孔平板。

[0292] 使用含有补充物的L7 hPSC Culture Medium™将存在的初始集落手动传代(P1)至单独的孔中。

[0293] 将平板置于常氧条件(20.9%O₂;5%CO₂)下加湿的37℃培养箱中。

[0294] 一旦已经将集落手动传代至新的平板后(步骤36),人iPSC培养物应当在常氧条件(20.9%O₂;5%CO₂)下加湿的37℃孵育器中培养。

[0295] 对于P3以及后续的传代,根据说明使用L7 hPSC Passaging Solution™在扩增期间继代培养集落。

[0296] 步骤1,实验目标1:通过调节EBNA-1表达,确定iPSC中载体清除的动力学

[0297] 对于该实验,EBNA-1序列将从功能性TetOn载体被克隆到TRE启动子下游,以产生TetOn-EBNA-1载体。在该系统中,EBNA-1表达将会在存在多西环素(Dox)的情况下被激活(TetOn系统)。使用相同的克隆策略,产生用作Tet调节对照载体的TetOn-eGFP载体。为了测试调节型与组成型EBNA-1表达的效果,将会生成驱动EBNA-1表达的含有CAG启动子的载体。将测试有或没有OriP区域的TetOn-EBNA-1载体和CAG-EBNA-1载体。最终,该“测试”载体含有组成型eGFP表达盒(SV40启动子)并且含有OriP区域。该“测试”载体是含有重编程因子的标准载体的模拟物。参见表1将用于研究EBNA-1调节对附加型载体清除效果的载体列表和描述。

[0298] 载体将以各种组合共转染到iPSC,并且转染的细胞将会用或不用Dox维持15传代

(参见表2对于转染条件和预期效果的总结)。GFP报告子的表达在适用的情况下将会被监控。细胞沉淀将会在每个细胞传代收集。载体清除的状态将会使用qPCR载体检测筛选试验每隔2-3个细胞传代检验。

[0299] 表1. 用于研究EBNA-1调节对iPSC中附加型载体清除效果的载体列表

[0300]

载体		描述
TetOn-eGFP	TetOn 调节的 eGFP (通过 Dox 激活)	TetOn 调节的控制载体
TetOn-EBNA-1	TetOn 调节的 EBNA-1 (通过 Dox 激活)	调节型 EBNA-1 载体
CAG-EBNA-1	组成型表达的 EBNA-1	组成型 EBNA-1 载体
TetOn-EBNA-1 (OriP)	TetOn 调节的 EBNA-1 (通过 Dox 激活)	调节型 EBNA-1 载体
CAG-EBNA-1 (OriP)	组成型表达的 EBNA-1	组成型 EBNA-1 载体
SV40-eGFP (OriP)	组成型表达的 eGFP	测试载体 – eGFP

[0301] 表2. 载体清除的转染条件和预期效果的总结

[0302]

条件	处理	条件目的	预期效果
SV40-eGFP (OriP)	N/A	转染效率控制和载体保留的阴性对照	因为载体是瞬时的，预期 GFP 表达将由于约 2 周内的快速清除而快速降低
SV40-eGFP (OriP) : CAG-EBNA-1 (OriP)	N/A	载体保留阳性对照	藉由添加 EBNA-1 表达，瞬时载体将作为附加型载体。由于在 >15 个传代中缓慢的载体清除，预期 GFP 表达将缓慢降低
TetOn-eGFP	+Dox (可能会对多个浓度进行测试)	Tet 调节对照	GFP 的 Dox 依赖性表达。Dox 的存在诱导 GFP 表达。由于不存在 EBNA-1，快速载体清除
TetOn-eGFP	-Dox	Tet 调节对照	由于缺少 Dox，不诱导 eGFP 表达。由于不存在 EBNA-1，快速载体清除
SV40-eGFP (OriP) : TetOn-EBNA-1	+Dox (可能会对多个浓度进行测试)	EBNA1 表达的 Tet 调节	EBNA-1 的 Dox 依赖性表达以及对应载体清除率 (>15 个传代高 EBNA-1 表达)
SV40-eGFP (OriP) : TetOn-EBNA-1	-Dox	EBNA1 表达的 Tet 调节	由于缺少 Dox，不诱导 EBNA-1 表达。在 < 7 传代内快速载体清除
SV40-eGFP (OriP) : TetOn-EBNA-1 (OriP)	+Dox (可能会对多个浓度进行测试)	EBNA1 表达的 Tet 调节	EBNA-1 的 Dox 依赖性表达以及对应载体清除率 (>15 个传代高 EBNA-1 表达) EBNA-1 载体上包括 OriP 可能会进一步影响保留动力学。
SV40-eGFP (OriP) : TetOn-EBNA-1 (OriP)	-Dox	EBNA1 表达的 Tet 调节	由于缺少 Dox，不诱导 EBNA-1 表达。在 < 7 传代内快速载体清除。EBNA-1 载体上包括 OriP 可能会

[0303]

			进一步影响保留动力学。
--	--	--	-------------

[0304] 步骤1,实验目的2:测试自杀基因纳入对iPSC中载体清除动力学的效果

[0305] 自杀基因胸苷激酶 (TK) 序列将会被克隆到在表1中描述的SV40-eGFP (OriP), TetOn-EBNA-1和CAG-EBNA-1载体中 (参见表3列表)。SV40-eGFP (OriP) 载体将会被用于提供转染效率对照,并且作为“测试”载体。用于转染的载体组合如表4所示。测试的EBNA-1载体最初将含有OriP区域,但是也会适当测试不含有OriP的变体 (同样包括在表3中)。

[0306] 为了确定GNC与TK载体联用的最佳浓度,将会根据标准做法构建杀伤曲线。用SV40-eGFP-TK (OriP) 转染iPSC,然后在转染后48小时用各种浓度的GNC处理 (参见表4对于转染条件和预期效果的总结)。一旦确定最佳GNC浓度,将用EBNA-1表达载体重复实验以验证其对最佳GNC浓度的响应。活细胞的数量将会使用Cell Titer-Glo荧光细胞活性试验 (普洛麦格公司 (Promega)) 确定。此外,凋亡细胞的数量将会使用CellEvent™半胱天冬蛋白酶-3/7绿色即用型探测试剂确定 (英杰公司)。

[0307] 表3.用于iPSC中自杀基因激活的载体的列表

[0308]

载体	描述
SV40-eGFP TK (OriP)	含有自杀基因 (TK) 的组成型表达的 eGFP
TetOn-EBNA-1 TK	含有组成型启动子表达的自杀基因 (TK) 的调节型 EBNA-1
CAG-EBNA-1 TK	含有自杀基因 (TK) 的组成型表达的 EBNA-1
TetOn-EBNA-1 TK (OriP)	含有 OriP 与组成型启动子表达的自杀基因 (TK) 的调节型 EBNA-1
CAG-EBNA-1 TK (OriP)	含有自杀基因 (TK) 与 OriP 的组成型 EBNA-1

[0309] 表4.转染条件和预期效果的总结

[0310]

条件	处理	条件目的	预期效果
SV40-eGFP TK (OriP)	-GNC	TK 阴性对照。	缺少自杀基因 (TK) 底物导致无细胞死亡
SV40-eGFP TK (OriP) : CAG-EBNA-1 TK (OriP)	-GNC	TK 阴性对照。	缺少自杀基因 (TK) 底物导致无细胞死亡
SV40-eGFP TK (OriP)	+0.2 μ M GNC	鉴定最佳 GNC 浓度	TK 底物 (GNC) 导致剂量依赖性诱导细胞死亡
SV40-eGFP TK (OriP)	+2 μ M GNC		
SV40-eGFP TK (OriP)	+20 μ M GNC		
SV40-eGFP TK (OriP) : CAG-EBNA-1 TK (OriP)	+0.2 μ M GNC	鉴定最佳 GNC 浓度	TK 底物 (GNC) 导致剂量依赖性诱导细胞死亡
SV40-eGFP TK (OriP) : CAG-EBNA-1 TK (OriP)	+2 μ M GNC		
SV40-eGFP TK (OriP) : CAG-EBNA-1 TK (OriP)	+20 μ M GNC		
SV40-eGFP TK (OriP) : TetOn-EBNA-1 TK (OriP)	-Dox -GNC	TK 阴性对照。	缺少自杀基因 (TK) 底物导致无细胞死亡
SV40-eGFP TK (OriP) : TetOn-EBNA-1 TK (OriP)	+Dox -GNC		
SV40-eGFP TK (OriP) : TetOn-EBNA-1 TK (OriP)	-Dox 以确定的 最佳 GNC 浓度	TK 激活阳性 对照	TK 底物 (GNC) 导致剂量依赖性诱导细胞死亡。 Dox 可能影响载体保留动力学, 并且因此影响剂量响应。
SV40-eGFP TK (OriP) : TetOn-EBNA-1 TK (OriP)	+Dox 以确定的 最佳 GNC 浓度		

[0311] 步骤2, 实验目标1: 通过调节EBNA-1表达然后激活用于无载体集落筛选的自杀基

因,促进iPSC集落中载体清除

[0312] 对于该实验,重编程载体将通过克隆Oct4、Sox2、KLF4、cMYC、Lin28和p53DD到OriP TK载体中代替步骤1实验中所用SV40-eGFP的位置来产生。此外,上文所述TetOn-EBNA-1TK载体将会被用于EBNA-1调节和自杀基因激活(参见表5中用于细胞重编程和载体清除诱导的载体的列表和描述)。为了诱导细胞重编程,PBMC将与Oct4-TK (OriP)、Sox2/KLF4TK (OriP)、cMYC/Lin28TK (OriP)、mp53DD TK (OriP) 和TetOn-EBNA-1TK载体共同核转染。

[0313] 将核转染的细胞置于P0平板并如重编程方案所述培养(参见附录A重编程方案),并且在存在Dox的情况下培养以允许EBNA-1表的以及重编程载体的保留。出现在P0平板的集落将会被手动传代至单独的孔中,并且用补充了Dox的培养基饲养。各克隆的P1集落也将以1:1的比例传代,并且用补充了Dox的培养基饲养。各克隆的P2集落将以1:2的比例传代至两个孔,并且用补充了Dox的培养基饲养。来自两个孔的各克隆的P3集落将以1:2的比例传代以生成4个重复孔。将各iPSC克隆的两个孔维持在补充了Dox的培养基中,而用没有Dox的培养基培养另外两个孔。到了P4,为了诱导仍然保留载体的集落细胞死亡,将GNC添加到各iPSC克隆的两个孔的培养基中——一个用Dox处理,另一个不用Dox处理。应当在用Dox培养的所有集落中观测细胞死亡。将对来自没有用Dox处理的孔的存活克隆进一步扩增。如果在P4没有克隆在GNC处理中存活,那么剩余的重复孔将会被传代至P5,并且将会重复该过程直到鉴定出无载体的克隆。在扩增过程中,将会收集细胞沉淀并使用qPCR载体检测筛选试验分析以确认载体清除(参见图1,其显示了iPSC集落扩增和分析的方法)。作为待重编程的给定体细胞重编程过程和能力的阳性对照,用Okita重编程组合核转染细胞,Okita,K.(2013).“一种从脐带血和外周血细胞中生成无整合的人诱导多能干细胞的有效非病毒方法(An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells).”Stem Cells 31 (3):458-66)。

[0314] 表5.待用于细胞重编程以及诱导载体清除然后用自杀基因激活筛选的载体列表

[0315]

载体	描述
Oct4-TK (OriP)	组成型表达的 Oct4, 重编程载体
Sox2/KLF4 TK (OriP)	组成型活性 Sox 和 KLF4, 重编程载体
cMYC/Lin28 TK (OriP)	组成型活性 cMYC 和 Lin28, 重编程载体
mp53DD TK (OriP)	组成型活性 p53, 重编程载体
TetOn-EBNA-1 TK	TetOn 调节型 EBNA-1 (通过 Dox 激活) 和组成型表达的自杀基因 (TK)
TetOn-EBNA-1 TK (OriP)	TetOn 调节型 EBNA-1 (通过 Dox 激活) 和组成型表达的自杀基因 (TK)

[0316] 步骤2,实验目标2:通过调节EBNA-1表达然后通过自杀基因激活确定在P0平板上

诱导载体清除的可行性

[0317] 细胞重编程依赖于在体细胞中在绝对表达水平和时间上控制重编程因子表达的能力。人们普遍预计当前的方法对于两方面都是次佳的。

[0318] 移除EBNA-1诱导(通过充培养基中移除Dox)来诱导载体清除的时机有可能对重编程效率产生潜在的负面影响。为了从P0平板采集作为库而非单个集落的iPSC集落,需要确定在不影响重编程效率的情况下撤除Dox的最佳时间点。对于该实验,PBMC将会与Oct4TK (OriP)、Sox2/KLF4TK (OriP)、cMYC/Lin28TK (OriP)、mp53DD TK (OriP)和TetOn-EBNA1TK载体共同核转染,并如重编程方法所述(参见附录A重编程方案)在Dox存在的情况下培养,以允许EBNA-1表达和重编程载体的保留。

[0319] 表6所示核转染后,在不同的时间点从培养基中撤除Dox。使用相衬显微镜检测在不同实验条件下iPSC集落的外形。当集落大到足以继代培养,将GNC加入培养基以激活TK并选择无载体的集落存活。存活的集落将会被进一步采集和扩增。在扩增过程中,将会收集细胞沉淀并且使用qPCR载体检测筛选实验分析,以确认载体清除。作为待重编程的给定体细胞重编程过程和能力的阳性对照,用Okita重编程组合核转染细胞(Okita,Yamakawa等2013)。

[0320] 表6.P0平板上实验条件和Dox撤除计划

[0321]

	孔 1-2	孔 3-4	孔 5-6	孔 7-8
0-8 天	+Dox	+Dox	+Dox	-Dox
8-16 天	+Dox	+Dox	-Dox	-Dox
16-24 天	+Dox	-Dox	-Dox	-Dox
24-28 天	+Dox/+GNC	-Dox/+GNC	-Dox/+GNC	-Dox/+GNC
条件目的	测试新的重编程组合	测试 Dox 撤除对重编程效率的影响		重编程的阴性对照

[0322]

[0323] 支持数据:自杀基因底物对不表达自杀基因的hPSC的细胞毒性作用。

[0324] 因为我们意图在细胞重编程期间或之后激活体细胞中的自杀基因,我们测试了更昔洛韦和5-FC对不表达相应自杀基因的hiPSC的细胞毒性作用。hiPSC在存在0.2、2或20 μ M最终浓度的更昔洛韦的情况下培养48小时,并且将最终浓度为1、10和100 μ M的5-FC添加到hiPSC。48小时后,固定细胞并针对碱性磷酸酶活性染色。染色结果显示更昔洛韦或5-FC对hiPSC没有细胞毒性作用。其它实验将会证明表达自杀基因的hiPSC中所需更昔洛韦和5-FC的水平,以确定最小所需浓度。

[0325] 多西环素对hPSC的积极效果

[0326] EBNA-1调节可能会通过使用多西环素诱导型启动子系统来实现。近期的出版物已经报道多西环素对hPSC存活和自我更新表现出显著效果(Chang,M.Y.等”多西环素增强了

人多能干细胞的生存和自我更新能力(Doxycycline enhances survival and self-renewal of human pluripotent stem cells).”Stem Cell Reports 3(2):353-64 (2014))。多西环素的效果并不与其抗菌作用相关,而是通过直接激活PI3-AKT胞内信号介导。这些发现表明,多西环素是干细胞培养中有用的补充物,协助其生长和维持,并且因此可以预见用其调节EBNA-1表达没有负面效果。

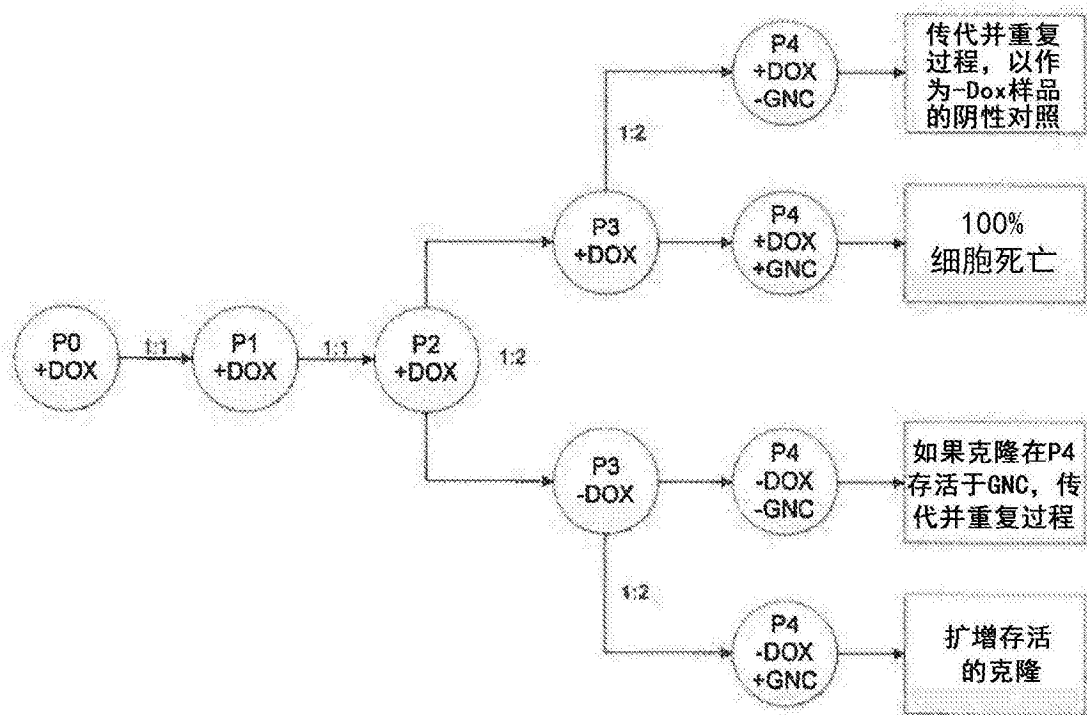


图1 i PSC克隆扩增和分析的方法