

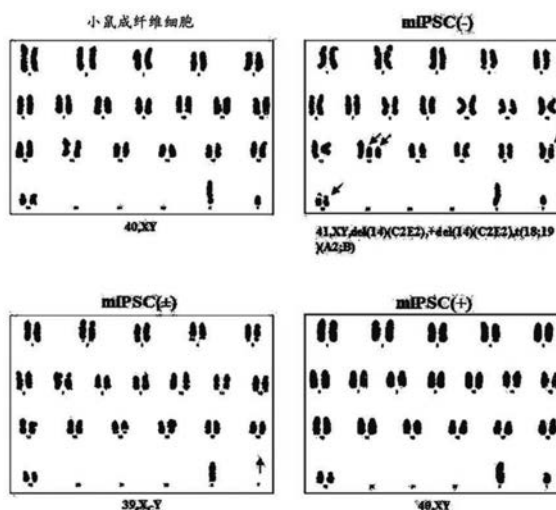


(45) 授权公告日 2020.12.25

地址 韩国首尔特别市

(57) 摘要

本发明涉及及用于维持多能干细胞染色体稳定性的组合物,其包含小分子化合物,且更具体地,涉及及用于维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的组合物,其包含能够在诱导的多能干细胞的诱导和所述细胞后续培养过程中抑制染色体结构和数目突变或DNA损伤的ROCK抑制剂、MEK抑制剂、ALK5抑制剂或抗氧化剂。所述用于维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的包含小分子化合物的组合物在诱导的多能干细胞产生过程中增加重编程速率和效率并展示对染色体结构和数目突变或DNA损伤出色的抑制效果。因此,本发明的组合物对具有出色染色体稳定性的诱导的多能干细胞治疗剂的开发非常有用。



1. 组合物在维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性中的用途,所述诱导的多能干细胞通过导入包含Oct4、Klf4、Sox2和cMyc的基因来产生,其中所述组合物的活性成分是SB431542、PD0325901、thiazovivin 和L-抗坏血酸,其中所述染色体稳定性通过抑制染色体结构突变和数目突变或DNA损伤维持。

2. 一种用于维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的方法,所述诱导的多能干细胞通过导入包含Oct4、Klf4、Sox2和cMyc的基因来产生,所述方法包括:用权利要求1所定义的组合物处理诱导的多能干细胞,其中所述染色体稳定性通过抑制染色体结构突变和数目突变或DNA损伤维持。

3. 权利要求2的方法,其中将所述组合物添加至诱导体细胞重编程的阶段中。

4. 权利要求2的方法,其中所述组合物在重编程的诱导后添加。

5. 一种用于培养诱导的多能干细胞的方法,所述诱导的多能干细胞通过导入包含Oct4、Klf4、Sox2和cMyc的基因来产生,所述方法包括在权利要求1所定义的组合物中培养诱导的多能干细胞。

6. 权利要求5的方法,其进一步包括在无饲养细胞的条件下培养诱导的多能干细胞。

7. 权利要求1的用途,其中将所述组合物添加至诱导体细胞重编程的阶段中。

8. 权利要求1的用途,其中所述组合物在重编程的诱导后添加。

包含小分子化合物的用于维持多能干细胞染色体稳定性的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于维持多能干细胞的染色体稳定性的组合物,其包含小分子化合物,且更具体地,涉及用于维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的组合物,其包含能够在诱导的多能干细胞的诱导和所述细胞后续培养过程中抑制染色体结构和数目突变或DNA损伤的ROCK抑制剂、MEK抑制剂、ALK5抑制剂或抗氧化剂。

技术背景

[0002] 用于产生诱导的多能干细胞的技术是使用动物体细胞制备与胚胎干细胞相似的细胞的技术,且包括在特定培养条件下于四种已知的重编程因子(Oct4、Klf4、Sox2和cMyc)存在下培养细胞。通过该方法制备的诱导的多能干细胞具有分化成为所有组织特异性细胞的优势,并可用作不构成任何伦理问题的细胞治疗剂,但这些诱导的多能干细胞具有的劣势在于它们以低效率产生,它们的安全性难以保证且与胚胎干细胞并不完全相似。

[0003] 自2006诱导的多能干细胞技术开发以来,已实施对于该技术的许多研究,且由这些研究获得的多种组合物已用于增加产生诱导的多能干细胞的效率。作为结果,23篇文章已报道使用特定的组合物成功增加诱导的多能干细胞的产生效率,且6篇文章已报道即使在一种或多种重编程因子不存在下也可成功产生诱导的多能干细胞。

[0004] 至今,已实施研究来主要增加产生诱导的多能干细胞的效率。然而,当仅诱导的多能干细胞的产生效率增加而诱导的多能干细胞的安全性确认不足时,看起来诱导的多能干细胞并非是在临床上可应用的。因此,为增加诱导的多能干细胞的临床应用性,需要致力于增加诱导的多能干细胞安全性的研究,且应该开发制备与胚胎干细胞更相似的诱导的多能干细胞的方法。

[0005] 在与本发明相关的现有技术中,韩国专利注册号10-1211610(2012年12月6日)公开了通过使用Bmi1、MEK抑制剂和GSK抑制剂诱导从体细胞至胚胎干细胞样细胞的反分化(dedifferentiation)的组合物,和使用所述组合物用于产生胚胎干细胞样细胞的方法。韩国专利注册号10-1211624(2012年12月6日)公开了通过使用Shh、FGFR酪氨酸激酶抑制剂、MEK抑制剂和GSK抑制剂诱导从体细胞至胚胎干细胞样细胞的反分化的组合物,和使用所述组合物用于产生胚胎干细胞样细胞的方法。此外,韩国专利公开号10-2010-0101764(2010年9月20日)、韩国专利公开号10-2011-0094348(2011年8月23日)、韩国专利公开号10-2012-0094488(2012年8月24日)和韩国专利公开号10-2012-0121084(2012年11月5日)公开了用于产生和维持多能干细胞的有用培养方法和培养基等。

[0006] 与本发明的领域相关的数篇文章已报导使用组合物处理增加诱导的多能干细胞产生的效率,但此使用组合物的处理是否可抑制诱导的多能干细胞的突变尚不知晓。具体地,未报导包含MEK抑制剂、ALK5抑制剂、ROCK抑制剂或抗氧化剂的组合物的使用可抑制突变或DNA损伤,后者为在诱导的多能干细胞产生中发生的问题,因而可提供稳定的诱导的多能干细胞。

[0007] 因此,本发明发现了包含ROCK抑制剂thiazovivin、MEK抑制剂PD0325901、ALK5抑制剂SB431542或抗氧化剂L-抗坏血酸的组合物通过抑制诱导的多能干细胞中的结构突变和数目突变或DNA损伤维持染色体稳定性,由此完成本发明。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文件

[0010] 专利文件1:韩国专利注册号10-1211610(2012年12月6日)

[0011] 专利文件2:韩国专利注册号10-1211624(2012年12月6日)

[0012] 专利文件3:韩国专利公开号(2010年9月20日)

[0013] 专利文件4:韩国专利公开号10-2011-0094348(2011年8月23日)

[0014] 专利文件5:韩国专利公开号10-2012-0094488(2012年8月24日)

[0015] 专利文件6:韩国专利公开号10-2012-0121084(2012年11月5日)

[0016] 非专利文件

[0017] 非专利文件1:Li,W.,Wei,W.,Zhu,S.,Zhu,J.,Shi,Y.,Lin,T.,Hao,E.,Hayek,A.,Deng,H.,和Ding,S.(2009a).Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors.Cell Stem Cell 4,16-19.

[0018] 非专利文件2:Li,W.,Zhou,H.,Abujarour,R.,Zhu,S.,Young Joo,J.,Lin,T.,Hao,E.,Scholer,H.R.,Hayek,A.和Ding,S.(2009b).Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2.Stem Cells 27,2992-3000.

[0019] Non-专利文件3:Lin,T.,Ambasudhan,R.,Yuan,X.,Li,W.,Hilcove,S.,Abujarour,R.,Lin,X.,Hahm,H.S.,Hao,E.,Hayek,A.等(2009).A chemical platform for improved induction of human iPSCs.Nat Methods 6,805-808.

[0020] Non-专利文件4:Yuan,X.,Wan,H.,Zhao,X.,Zhu,S.,Zhou,Q.和Ding,S.(2011).Combined Chemical Treatment Enables Oct4-Induced Reprogramming from Mouse Embryonic Fibroblasts.Stem Cells.

[0021] Non-专利文件5:Zhu,S.,Li,W.,Zhou,H.,Wei,W.,Ambasudhan,R.,Lin,T.,Kim,J.,Zhang,K.和Ding,S.(2010).Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4and chemical compounds.Cell Stem Cell 7,651-655.

发明内容

[0022] 本发明的目的是提供用于维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的组合物,其包含至少一种选自下组的小分子化合物作为活性成分:ROCK抑制剂、MEK抑制剂、ALK5抑制剂和抗氧化剂。

[0023] 本发明的另一目的是提供用于维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的方法,所述方法包括用上文所述的组合物处理诱导的多能干细胞,和用于培养诱导的多能干干细胞的方法,所述方法包括用上文所述的组合物培养诱导的多能干细胞。

[0024] 附图简述

[0025] 图1a示意性显示在用于产生诱导的多能干细胞的方法中使用的整体实验方案。

[0026] 图1b描绘了显示用包含小分子组合物的组合物处理和不用所述组合物处理提供具有典型形态学的诱导的多能干细胞的图片。

[0027] 图1c是显示用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞和未用所述组合物处理的诱导的多能干细胞之间重编程效率和速率的对比图。

[0028] 图2a和2b是显示实施的RT-PCR和荧光染色分析以分析用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞和未用所述组合物处理的诱导的多能干细胞中多能性基因和蛋白表达的结果图。

[0029] 图3a描绘了显示用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞和未用所述组合物处理的诱导的多能干细胞中分化成为三胚层的能力的荧光染色图像。

[0030] 图3b描绘了显示实施的组化检查以确认通过畸胎瘤形成实验在免疫缺陷小鼠中形成肿瘤后分化为三胚层,从而确认用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞和未用所述组合物处理的诱导的多能干细胞在体内分化能力的结果图。

[0031] 图4a显示当无饲养细胞(feeder cell)培养干细胞时,用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞可以更稳定的方式维持而不引起不必要的分化的图像。

[0032] 图4b和4c是显示实施的细胞计数和PCR以检查用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞增殖能力增加和诱导的多能干细胞中多能基因的表达水平增加的结果图。

[0033] 图5a-5d显示实施的通过对用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞和未用所述组合物处理的诱导的多能干细胞的荧光染色的细胞计数、免疫缺陷型小鼠中形成的肿瘤体积比较和形成EB(胚体)的能力比较的结果以确认诱导的多能干细胞分化能力增加。

[0034] 图6a是显示比较用包含小分子化合物的组合物长时间培养的诱导的多能干细胞(miPSC(+))、在诱导重编程后的初始培养阶段用所述化合物处理但在传代培养过程中未用所述组合物处理的诱导的多能干细胞(miPSC(±))和未用所述组合物处理诱导的多能干细胞(miPSC(-))之间的染色体异常的频率从而确认包含小分子化合物的组合物防止染色体结构异常的结果表。

[0035] 图6b和6c显示在用包含小分子化合物的组合物长时间培养的诱导的多能干细胞(miPSC(+))、在诱导重编程后的初始培养阶段用所述化合物处理但在传代培养过程中未用所述组合物处理的诱导的多能干细胞(miPSC(±))和未用所述组合物处理诱导的多能干细胞(miPSC(-))中分析显示染色体数目和结构异常的代表性核型的结果从而确认包含小分子化合物的组合物防止染色体数目和结构异常。

[0036] 图6d显示在用包含小分子化合物的组合物长时间培养的诱导的多能干细胞(miPSC(+))、在诱导重编程后的初始培养阶段用所述化合物处理但在传代培养过程中未用所述组合物处理的诱导的多能干细胞(miPSC(±))和未用所述组合物处理诱导的多能干细胞(miPSC(-))中比较性分析总的核型的结果以确认包含小分子化合物的组合物防止染色体异常。

[0037] 图7a和7b显示通过分析用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞(miPSC(+))的p1和p30和未用所述组合物处理的诱导的多能干细胞的p1和p30中的DNA损伤标记物 γ H2AX蛋白比较DNA损伤预防的结果。

[0038] 图7c和7d显示在诱导用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞(miPSC(+))重编程后初始7天和未用所述组合物处理的诱导的多能干细胞(miPSC(-))的p1和p30分析DNA损伤标记物 γ H2AX蛋白的结果从而确认培养基组合物防止初始重编程阶段发生DNA损伤。

[0039] 图7e和7f显示在其中使用本发明的全部小分子化合物的组合的条件下(SPTA)、其中使用每种小分子化合物的条件下和其中使用已知增加重编程效率的其他小分子化合物的条件下诱导重编程后5天检测和比较性分析DNA损伤标记物 γ H2AX蛋白的结果。

[0040] 用于实施本发明的最佳模式

[0041] 除非另外表明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员所理解的相同的含义。一般而言,本文使用的命名法和将在下文描述的实验方法是本领域熟知和通常采用的那些。

[0042] 一方面,本发明涉及用于维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的组合物,其包含至少一种选自下组的小分子化合物作为活性成分:ROCK抑制剂、MEK抑制剂、ALK5抑制剂和抗氧化剂。

[0043] 在本发明中,ROCK(Rho相关激酶)抑制剂用于增加染色体稳定性,且优选选自thiazovivin、Y-27632、法舒地尔(fasudil)(HA-1077)、羟基法舒地尔(HA-1100)、H-1152、3-(4-吡啶基)-1H-吡唑、N-(4-吡啶基)-N'-(2,4,6-三氯苯基)脲、金硫葡萄糖和LY29400。最优选地,ROCK抑制剂是thiazovivin,但不限于此。

[0044] 在本发明中,MEK(丝裂原活化蛋白激酶)抑制剂通过诱导快速重编程用于增加染色体稳定性,且优选为PD0325901或U0126(1,4-二氨基-2,3-二氰基-1,4-二[2-氨基苯基硫基]丁二烯),更优选为PD0325901,但不限于此。除上述化合物,可使用抑制MEK的所有代谢过程和MEK的表达的信号传导抑制剂。

[0045] 在本发明中,ALK5(活化素受体样激酶5)抑制剂通过诱导快速的重编程用于增加染色体稳定性,且优选为A-83-01或SB431542,更优选为SB431542,但不限于此。除上述化合物,可使用抑制ALK5的所有代谢步骤和ALK5的表达的信号传导抑制剂。

[0046] 在本发明中,抗氧化剂特别受限于其种类,但优选可为选自下组的至少一种:维生素E、维生素A、维生素C等,氧代噻唑烷、N-乙酰半胱氨酸、TEMPO、SOD(超氧化物歧化酶)、谷胱甘肽过氧化物酶、清除剂氧(scavenger oxygen)、过氧化氢、硫辛酸氧化物自由基、羟基自由基、金属结合蛋白、硒、还原的谷胱甘肽、 β -胡萝卜素、黄酮类、芝麻酚、没食子酸衍生物、Ajowan(印度藏茴香)、谷维素、白藜芦醇、儿茶素、卵磷脂、脑磷脂、Sulfhydryls(巯基)(SRH)、柠檬酸、抗坏血酸、过氧化氢酶、BHA、BHT、PG、NDGA、对苯二酚、邻苯二酚和DPPD(N,N-二苯基-对苯二胺),更优选为L-抗坏血酸。具体地,L-抗坏血酸可通过抗氧化活性增加染色体稳定性改善细胞活力。

[0047] 本发明中的小分子化合物可通过人工合成制备,或可以为商业合成产品。当使用商业合成产品时,优选在DMSO中溶解后添加至培养基。在本发明具体地实例中,将其添加至DMEM培养基。

[0048] 在本发明中,干细胞优选为通过一种或多种选自下组的基因诱导的诱导的多能干细胞:Oct4、Klf4、Sox2和cMyc。

[0049] 本发明的特征在于通过抑制染色体结构和数目突变或DNA损伤维持染色体稳定

性。

[0050] 如本文使用,术语“多能的”或“多能性”指具有产生后代能力的细胞,所述后代在合适条件下可经历分化为总体展示与来自三胚层(内胚层、中胚层和外胚层)细胞系相关的特性的细胞类型。多能干细胞或诱导的多能干细胞可有助于成年动物的多种或全部组织。本领域接受的标准测试,如在8-12周龄SCID小鼠中形成畸胎瘤的能力,可用于建立细胞群体的多能性,然而多种多能干细胞特征的鉴别也可用于检测多能细胞。细胞多能性是连续性的,范围由可形成适当胚胎(embryo proper)的每种细胞的完全全能细胞(例如胚胎干细胞和诱导的多能干细胞)至可形成所有三个胚层但不展示完全全能细胞的所有特征(如例如种系传递和生成完整生物体的能力)的不完全或部分多能细胞。在一些实施方案中,如本文其他地方讨论的多能性基因或多能性标记物的表达可用于评估细胞的多能性。

[0051] 如本文使用的术语“多能干细胞”指具有多能干细胞特性的细胞。多能干细胞是多能的重编程干细胞、诱导的多能干细胞或胚胎干细胞,且优选为多能的重编程干细胞。

[0052] 如本文使用的“多能干细胞特性”指将多能干细胞区分于其他细胞的细胞特性。产生后代能力为多能干细胞特性,其中所述后代在合适条件下可经历分化为总体展示与来自所有三个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的细胞系相关的特性的细胞类型。小鼠多能干细胞表达至少一些和任选地全部标记物,包括SSEA1、Oct4、Klf4、Sox2、Rex1和Nanog。与多能干细胞相关的细胞形态也是多能干细胞的特性。

[0053] 在本发明的具体实例中,为检查包含小分子化合物的组合物是否增加诱导的多能干细胞的重编程速率和效率,通过使用逆转录病毒将重编程因子(Oct4、Klf4、Sox2和cMyc)导入小鼠尾尖成纤维细胞而生成诱导的多能干细胞。同时,通过在包含小分子化合物的组合物存在时培养的细胞组(miPSC(+))和在包含小分子化合物的组合物不存在时培养的细胞组(miPSC(-))之间比较产生诱导的多能干细胞集落的时间点和数目来测量重编程速率和效率。结果,发现本发明的包含小分子化合物的组合物存在时重编程速率增加,且计数产生的诱导的多能干细胞集落的结果指示集落产生的效率增加。

[0054] 使用包含小分子化合物的组合物产生的诱导的多能干细胞特征在于其增殖和维持多能性的能力与胚胎干细胞的那些更接近。观察到使用本发明的组合物产生的诱导的多能干细胞存在很少或不存在不需要的分化,且在胚胎干细胞中表达的多能基因如Nanog、Klf4和Zfp296的表达水平增加。

[0055] 此外,已显示使用本发明包含小分子化合物的组合物产生的诱导的多能干细胞具有与胚胎干细胞接近的分化能力,且能够外胚层分化成神经元特异性表达蛋白TuJ1、中胚层分化成心肌细胞特异性表达蛋白Desmin(结蛋白),和内胚层分化成原始间充质细胞特异性表达蛋白AFP。最终,发现使用本发明的组合物产生的诱导的多能干细胞形成在诱导分化成功能性神经元方面具有更高效力的功能性神经元。

[0056] 本发明包含小分子化合物的组合物特征在于其能够抑制在产生诱导的多能干细胞的过程中由快速细胞变化引起的细胞染色体的数目和结构突变。染色体核型分析指示多种染色体结构突变如复制、缺失和易位发生在未用组合物处理的诱导的多能干细胞中,但在用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞中未发现染色体结构突变。

[0057] 此外,本发明包含小分子化合物的组合物特征在于其能够抑制在产生诱导的多能干细胞的过程中由快速细胞改变引起的细胞DNA损伤。 γ H2AX蛋白的免疫荧光染色指示DNA

损伤发生在多至约20%的未用组合物处理的诱导的多能干细胞中,但DNA损伤仅发生于小于5%的用包含小分子化物的组合物处理的诱导的多能干细胞中,其与正常细胞中的情况相似。特别地,本发明中使用的小分子化合物即使在其单独使用时可抑制DNA损伤,且已知增加重编程效率的其他小分子化合物未显示此DNA损伤抑制效果。

[0058] 由于如上文所述的染色体突变或DNA损伤可减少细胞维持和分化的效率且具有诱导异常分化以发展成癌细胞的潜在风险,认为本发明的组合物还与产生诱导的多能干细胞用于安全的细胞疗法的目的一致。

[0059] 综上所述,根据本发明的包含小分子化物的组合物可防止由重编程过程中的快速细胞改变引起的细胞染色体中的突变或DNA损伤。此外,本发明的组合物诱导体细胞重编程更快发生,增加重编程的效率,并增加在胚胎干细胞中特异性表达的基因的表达水平。因此,本发明可提供具有与胚胎干细胞更相似的增殖和分化能力的诱导的多能干细胞。

[0060] 因此,与仅提及增加重编程效率的现有技术文件不同,当诱导的多能干细胞细胞用于临床疗法时,还可增加染色体稳定性的本发明的包含小分子化物的组合物具有增加这些细胞的效率和安全性的效果,且不仅作为用于产生细胞治疗剂的原始材料非常有价值,而且作为用于染色体突变研究的材料。

[0061] 在另一方面,本发明涉及用于维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的方法,所述方法包括用组合物处理诱导的多能干细胞以维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性,所述组合物包含至少一种选自下组的小分子化合物作为活性成分:ROCK抑制剂、MEK抑制剂、ALK5抑制剂和抗氧化剂。

[0062] 本发明中,组合物优选在诱导体细胞重编程的初始阶段添加。由于初始阶段意指从将一个或多个选自Oct4、Klf4、Sox2和cMyc的基因引入培养物-诱导的集落形成的时间段,最优选在基因引入后4天内添加组合物,其为重编程诱导的初始阶段。此外,优选在诱导重编程后形成的诱导的多能干细胞维持的长期培养阶段添加组合物。

[0063] 在本发明中,组合物还可包含MEK抑制剂、ALK5抑制剂、ROCK抑制剂和抗氧化剂中的每一种,且优选包含这些抑制剂和抗氧化剂的两种或多种的组合。最优选地,所述组合物包含全部这些抑制剂和抗氧化剂的组合。

[0064] 在另一方面,本发明涉及用于培养诱导的多能干细胞的方法,所述方法包括用组合物培养诱导的多能干细胞以维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性,所述组合物包含至少一种选自下组的小分子化合物作为活性成分:ROCK抑制剂、MEK抑制剂、ALK5抑制剂和抗氧化剂。

[0065] 本发明中,用于培养诱导的多能干细胞的方法可进一步包括在无饲养细胞(feeder cell-free)条件下培养诱导的多能干细胞。如果诱导的多能干细胞是稳定化的,这些细胞可在仅用明胶涂覆的培养皿上于无饲养细胞条件下培养。如果所述细胞在无饲养细胞条件中培养,则本发明的组合物不存在时会发生不需要的分化,使得难以制成展示均匀形态的细胞,而本发明组合物的使用抑制了不需要的分化,使得以更稳定和有效的方式维持诱导的多能干细胞成为可能。

[0066] 作为在本发明中用于培养诱导的多能干细胞的培养基,可使用本领域已知的任何基础培养基而不受限制。用于本发明的基础培养基可为合成的基础培养基或商业上可得到的基础培养基。商业上可得到的基础培养基的实例包括达尔伯克氏改良的伊格尔氏培养基

(Dulbecco's modified eagle's medium) (DMEM)、基本必需培养基(MEM)、伊格尔基本培养基(basal medium eagle) (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、 α -基本必需培养基(α -MEM)、格拉斯哥(氏)基本必需培养基(G-MEM)和Isocove's改良的达尔伯克氏培养基,但不限于此。商业上可得到的基础培养基可为DMEM。此外,基础培养基优选包括10% (v/v) 马血清。在本发明的具体实例中,诱导的多能干细胞在DMEM培养基中培养。

[0067] 本发明还提供使用本发明包含小分子化合物的组合物产生诱导的多能干细胞的方案,所述诱导的多能干细胞具有与胚胎干细胞更相似的增殖和分化能力。

[0068] 如上文所述,本发明涉及使用包含小分子化合物的组合物维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的方案和使用包含小分子化合物的组合物培养诱导的多能干细胞的方案。更具体地,本发明涉及包含小分子化合物作为活性成分的组合物增加诱导的多能干细胞产生效率的新用途。根据本发明,通过将四种重编程因子(Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc)引入小鼠尾尖成纤维细胞然后在包含小分子化合物(ROCK抑制剂、MEK抑制剂、ALK5抑制剂或抗氧化剂)作为活性成分的培养基中培养成纤维细胞而产生的诱导的多能干细胞可以快速和有效的方式产生,且还可抑制染色体突变和DNA损伤。这些结果不仅可非常有效地用于产生未来临床应用中可使用的安全的诱导的多能干细胞,还可用于在这些细胞分化成多种功能性细胞后开发多种细胞治疗剂。换言之,本发明可有效用作核心技术以开发用于细胞疗法的干细胞系,其可治疗多种不可治愈的疾病。

[0069] 在上文的说明书中,描述集中在诱导的多能干细胞的培养上,但对本发明所属领域的技术人员显而易见的是本发明的包含小分子化合物作为活性成分的组合物具有维持多能性和抑制染色体突变或DNA损伤的效果,且可使用已知技术应用。

实施例

[0070] 下文中,本发明将参照实施例进一步详细说明。对本领域的技术人员显而易见的是实施例仅出于说明目的而并非是对本发明保护范围的限制。因此,本发明实质范围将通过所附的权利要求及其等同物进行限定。

[0071] 实施例1:包含用于诱导重编程的重编程因子的逆转录病毒的构建

[0072] 为构建能够递送四种重编程因子(Oct4、Klf4、Sox2和cMyc)的逆转录病毒,使用购自Addgene的pMXs载体质粒。用于构建逆转录病毒的293GPG细胞培养于100-mm细胞培养皿中从而生长至约80%汇合,并使用Lipofectamin 2000(Invitrogen)根据附加的说明将质粒引入293GPG细胞。48小时后,每天收集作为细胞培养上清分泌的5ml的逆转录病毒进行两周并在-80°C保存直至使用。逆转录病毒与包含2-4 μ g/ml Polybrene的培养基混合,且细胞在培养基中培养4-5小时以用逆转录病毒感染细胞并将基因递送入细胞。

[0073] 实施例2:使用包含小分子化合物的组合物产生诱导的多能干细胞

[0074] 2-1:小分子化合物的组合和添加

[0075] 为使用小分子化合物产生诱导的多能干细胞,将MEK抑制剂、ALK5抑制剂、ROCK抑制剂和抗氧化剂添加至培养基组合物,并在培养基组合物中培养细胞。具体地,作为小分子化合物,单独或组合使用MEK抑制剂PD0325901、ALK5抑制剂SB431542、ROCK抑制剂thiazovivin和抗氧化剂L-抗坏血酸。各小分子化合物为购自生产厂家如Stemgent、Cayman和Sigma的粉末状产品。此处,将MEK抑制剂PD0325901以0.5mM的浓度溶解于二甲基亚砜

(DMSO) 并作为1000倍浓缩液保存在-20℃的温度,并将ALK5抑制剂SB431542以2mM的浓度溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 并作为1000倍浓缩液保存在-20℃的温度。将ROCK抑制剂thiazovivin以0.5mM的浓度溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 并作为1000倍浓缩液保存在-20℃的温度,并将抗氧化剂L-抗坏血酸以200mM的浓度溶解于三重蒸馏水并作为1000倍浓缩液保存在-20℃的温度。将各小分子化合物作为添加剂在用于产生诱导的多能干细胞或维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的培养过程中用于培养基。此处,培养基中小分子化合物的最终浓度对于PD0325901为0.5μM,对于SB431542为2μM,对于Thiazovivin为0.5μM,且对于L-抗坏血酸为200μM。

[0076] 2-2: 诱导的多能干细胞的产生

[0077] 使用逆转录病毒将重编程因子引入小鼠尾尖成纤维细胞,由此获得诱导的多能干细胞。具体地,将约50,000-100,000小鼠成纤维细胞在约2-3代培养于100-mm细胞培养皿,且培养后,用包含含有四种重编程因子 (Oct4、Klf4、Sox2和cMyc) 的质粒的逆转录病毒以2或更多MOI感染细胞。

[0078] 用病毒感染的细胞进一步培养约两天,然后用0.05%胰蛋白酶-EDTA 2处理3分钟以分离单细胞。分离的细胞培养在用0.1%明胶涂覆的6-孔细胞培养皿上生长的饲养细胞上。作为饲养细胞,使用分裂受丝裂霉素抑制的小鼠成纤维细胞。将实施例2-1中制备的包含小分子化合物的组合物添加至用于培养小鼠胚胎干细胞的培养基,且由重编程因子引入的成纤维细胞在5%二氧化碳和37℃的温度条件下培养在培养基中。用于此实施例中的用于培养小鼠干细胞的基础培养基组合物由补充了2mM L-谷氨酰胺、10mMβ-巯基乙醇、0.1mM MEM NEAA、500单位/ml ESGRO (LIF)、10% 马血清和抗生素Pen/strep的DMEM高葡萄糖培养基 (GIBCO) 组成。

[0079] 2-3: 诱导的多能干细胞的培养

[0080] 培养约1周后,观察到具有与胚胎干细胞相似形态的诱导的多能干细胞集落在饲养细胞上形成 (图1b)。为检查形成的诱导的多能干细胞集落是否具有与胚胎干细胞相似的特性,实施了AP染色。AP染色的结果指示观察到诱导的多能干细胞集落,其染色为红色且对于染色为阳性 (图1b)。根据附加的指引使用测试试剂盒 (Stemgent) 实施AP染色。此外,显示本发明包含小分子化合物的组合物增加了重编程速率和效率 (图1c)。

[0081] 产生的诱导的多能干细胞集落使用玻璃吸管物理分离并培养在新鲜的饲养细胞上。发现当诱导的多能干细胞稳定化时,这些细胞能在仅用明胶涂覆而无饲养细胞的培养皿上培养。

[0082] 实施例3: 通过RT-PCR和免疫荧光染色对诱导的多能干细胞多能性的确认-产生的诱导的多能干细胞的验证

[0083] 对于RT-PCR,诱导的多能干细胞用0.05%胰蛋白酶-EDTA处理2-3分钟以分离单细胞,且将分离的细胞离心。将沉淀转移入1.5-ml管,且从其提取RNA。使用TRI试剂分离细胞RNA。使用逆转录酶和寡聚物 (dT) 将3μg的RNA转化成cDNA,并通过PCR使用引物扩增感兴趣的cDNA。电穿孔PCR产物以检查感兴趣基因的表达水平。PCR的结果指示构建的诱导的多能干细胞系全部表达多能性基因,包括Oct4、Klf4、Sox2、Nanog和Rex1 (图2a)。对于免疫荧光染色,在多孔培养皿中培养的细胞用PBS洗涤,然后用4%多聚甲醛 (para-formaldehyde) 溶液在室温固定1小时或在4℃过夜。固定的细胞用0.1% Triton-X溶液处理5分钟以穿透细胞

膜,其后将细胞用10%正常驴血清封闭,然后与一抗温育。免疫荧光染色的结果指示多能性标记物包括Oct4、Klf4、Sox2、cMyc和SSEA1在全部诱导的多能干细胞中表达(图2b)。

[0084] 实施例4:检查诱导的多能干细胞分化能力-产生的诱导的多能干细胞的验证

[0085] 4-1:诱导的多能干细胞的分化

[0086] 为检查产生的诱导的多能干细胞的分化能力,用胰蛋白酶-EDTA处理全部细胞系以分离单细胞,然后诱导胚体(EB)的形成。为允许诱导的多能干细胞分化成为胚体(EB),将诱导的多能干细胞在不抑制诱导的多能干细胞分化的LIF的情况下悬浮培养。具体地,培养的诱导的多能干细胞用PBS洗涤,然后用0.05%胰蛋白酶-EDTA处理2-3分钟以分离单细胞。分离的细胞在用于细胞不对其粘附的细菌培养物的培养皿中用2mM L-谷氨酰胺、10mMβ-巯基乙醇、0.1mM MEM NEAA、10%胎牛血清(FBS)和抗生素Pen/strep的DMEM高葡萄糖培养基(GIBCO)悬浮培养4天,由此获得悬浮的EB。

[0087] 将获得的EB转移至细胞培养皿并在其中粘附培养,且通过免疫荧光染色观察到形成的外胚层、内胚层和中胚层分化的细胞。免疫荧光染色的结果指示所有构建的诱导的多能干细胞具有正常的分化能力且可分化成全部三种胚层(图3a)。

[0088] 4-2:畸胎瘤产生

[0089] 为检查诱导的多能干细胞在体内分化的能力,使用采用免疫缺陷小鼠的畸胎瘤产生方法。换言之,为检查畸胎瘤是否通过诱导的多能干细胞的移植产生,使用将诱导的多能干细胞皮下移植入免疫缺陷SCID小鼠(BALB/c nu)的方法。具体地,将培养的诱导的多能干细胞用PBS洗涤并用胰蛋白酶-EDTA处理以分离单细胞,然后将1,000,000细胞用0.1ml培养基稀释且将混合物与0.1ml的BD Matrigel基质均匀混合并皮下注射入5-10周龄SCID小鼠侧面。注射后,当小鼠保存约8-10周时观察畸胎瘤是否在小鼠中形成。提取产生的畸胎瘤并使用H&E染色进行组织学分析,且用显微镜观察到分化成为三胚层。畸胎瘤组织学分析的结果指示全部诱导的多能干细胞系正常产生畸胎瘤且在畸胎瘤中发现对应于外胚层、内胚层和中胚层的结构(图3b)。

[0090] 实施例5:检查包含小分子化合物的组合物对诱导的多能干细胞稳定维持的作用

[0091] 为检查包含小分子化合物的组合物对实施例2中构建和培养的诱导的多能干细胞的作用,实施了形态分析、增殖速率分析和基因表达水平分析。为检查包含小分子化合物的组合物对诱导的多能干细胞中的形态和视觉改变的作用,未用组合物处理的诱导的多能干细胞(miPSC(-))和使用组合物构建的诱导的多能干细胞(miPSC(+))在具有饲养细胞的条件和无饲养细胞条件下相互比较。

[0092] 在具有饲养细胞的条件下,即使当不使用包含小分子化合物的组合物时,在维持细胞形态和特性上没有大问题,但在无饲养细胞条件下,当不使用包含小分子化合物的组合物时发生了不需要的分化,使得难以制成显示均匀形态的细胞。然而,当使用包含小分子化合物的组合物时,组合物抑制了不需要的分化,使得以更稳定和有效的方式维持诱导的多能干细胞成为可能(图4a)。

[0093] 为检查包含小分子化合物的组合物对诱导的多能干细胞的增殖速率的作用,将使用组合物产生的诱导的多能干细胞的增殖速率与(不)使用组合物产生的诱导的多能干细胞的增殖速率相互比较。将相同数目的不同类型的细胞培养相同时间,且对细胞计数并比较。结果,显示细胞分裂一次所需时间在用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能

干细胞中更短,且该更短的时间几乎与胚胎干细胞的情况相似(图4b)。

[0094] 最后,为检查包含小分子化合物的组合物在维持诱导的多能干细胞的过程中对多能基因表达水平的作用,对实施例2中检查的多能基因的表达进行了量化分析。结果,显示使用包含小分子化合物的组合物产生的诱导的多能干细胞中大多数多能性基因表达水平显著更高(图4c)。

[0095] 实施例6:检查包含小分子化合物的组合物对诱导的多能干细胞的分化能力增加的作用

[0096] 为检查包含小分子化合物的组合物对在实施例2中构建和培养的诱导的多能干细胞在分化过程中诱导的多能干细胞分化能力的作用,在未用组合物处理的诱导的多能干细胞和使用组合物产生的诱导的多能干细胞间比较了分化成三胚层的效率、产生的畸胎瘤的体积和EB的形成效率。

[0097] 通过免疫荧光染色观察分化成外胚层、内胚层和中胚层的细胞,且计数表达每种标记物的细胞的数目,由此测量分化成三胚层的效率。结果,显示使用包含小分子化合物的组合物构建的细胞系与未用组合物处理的细胞系相比显示更高的外胚层分化效率。这表明包含小分子化合物的组合物增加诱导的多能干细胞的分化能力(图5a和5b)。

[0098] 比较了体内产生的畸胎瘤的体积。结果,显示从未用包含小分子化合物的组合物处理的细胞系产生的畸胎瘤体积非常小,而从使用包含小分子化合物的组合物构建的细胞系产生的畸胎瘤体积与从胚胎干细胞产生的畸胎瘤体积相似,且本发明的组合物还增加诱导的多能干细胞在体内分化的能力(图5c)。

[0099] 测量从未用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞形成的EB数目和从使用包含小分子化合物的组合物产生的诱导的多能干细胞形成的EB数目并相互比较。结果,显示包含小分子化合物的组合物还增加EB的形成效率(图5d)。

[0100] 实施例7:检查包含小分子化合物的组合物对诱导的多能干细胞中染色体突变的抑制作用

[0101] 为检查包含小分子化合物的组合物在诱导的多能干细胞的诱导过程中、诱导过程后细胞的初始培养过程中、长期维持和细胞培养过程中是否增加遗传稳定性,通过分析未用组合物处理的诱导的多能干细胞和使用组合物产生的诱导的多能干细胞的核型而检查是否发生染色体突变和染色体突变的频率。将全部细胞长期培养从而突变会自然发生,且通过一般的核型分析方法分析其染色体。

[0102] 为检查包含小分子化合物的组合物的作用,将未用组合物处理的细胞系与用组合物处理的细胞系进行比较。结果,显示染色体结构和数目突变发生在未用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞中,而染色体突变未发生在用包含小分子化合物的组合物处理的诱导的多能干细胞中。此外,可见在使用组合物诱导重编程的初始培养步骤后的长期培养中,在未用组合物处理的诱导的多能干细胞(miPSC(±))中没发生染色体结构突变,但发生了染色体数目突变。这表明包含小分子化合物的组合物可抑制诱导的多能干细胞中的染色体突变且还具有抑制发生于重编程诱导步骤、初始培养阶段和维持和长期培养细胞的后续阶段中的突变的有效能力(图6a-6d)。

[0103] 实施例8:检查包含小分子化合物的组合物对DNA损伤抑制的作用

[0104] 在检查包含小分子化合物的组合物在诱导的多能干细胞的诱导、诱导步骤后的初

始细胞培养和细胞的长期维持和培养过程中是否增加遗传稳定性的另一分析方法中,分析了DNA损伤的程度。

[0105] 使用成纤维细胞和小鼠胚胎干细胞在重编程前作为阳性对照,检查未用组合物处理的诱导的多能干细胞的初始(-,p1)代细胞和长期传代(-,p30)细胞与使用组合物产生的诱导的多能干细胞的初始(+,p1)代细胞和长期传代(+,p30)细胞之间DNA损伤程度的差异。基于由DNA损伤产生的 γ H2AX蛋白的存在或不存在分析DNA损伤的程度,并使用绿色荧光标记的抗体通过免疫荧光染色对感兴趣的蛋白染色并分析(图7a)。

[0106] 为更详细地分析包含小分子化合物的组合物的作用,分析了 γ H2AX蛋白在未用组合物处理的细胞系和用组合物处理的细胞系之间的生成比率。

[0107] 结果,显示在未用组合物处理的诱导的多能干细胞中,约13%的初始代(p1)细胞和约5%的长期传代(p30)细胞经历DNA损伤,而在用组合物处理的诱导的多能干细胞中,仅约5%的初始代(p1)细胞和仅少于约1%的长期传代(p30)细胞经历DNA损伤。这指示在重编程过程中或重编程后的长期培养过程中使用小分子化合物显示与正常成纤维细胞或重编程前的正常胚胎干细胞相似的DNA状态,表明本发明的组合物能在诱导的多能干细胞中抑制DNA损伤至与正常干细胞中相似的水平(图7b)。

[0108] 工业实用性

[0109] 如上文所述,根据本发明的用于维持诱导的多能干细胞的染色体稳定性的包含小分子化合物的组合物在产生诱导的多能干细胞的过程中增加重编程速率和效率,并展示对染色体结构和数目突变或DNA损伤的优异的抑制作用。因此,本发明的组合物对于具有优异的染色体稳定性的诱导的多能干细胞治疗剂的开发是非常有用的。

[0110] 尽管本发明已参照具体特征进行了详细说明,对本领域的技术人员显而易见的是此说明仅用于优选的实施方案而并非限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围将通过所附权利要求及其等同物限定。

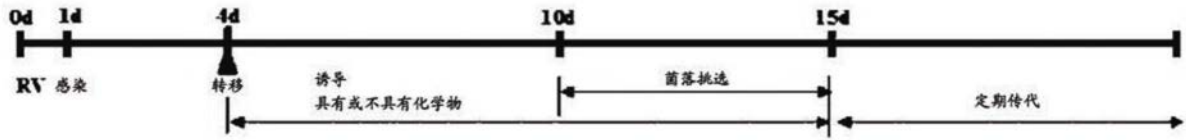


图1a

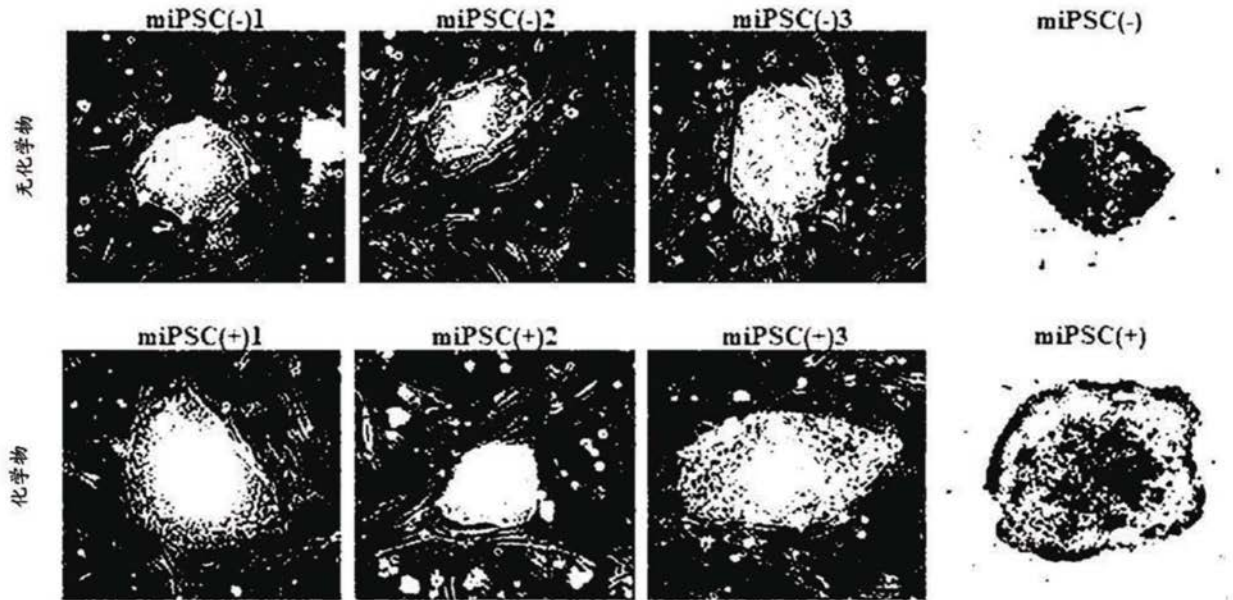


图1b

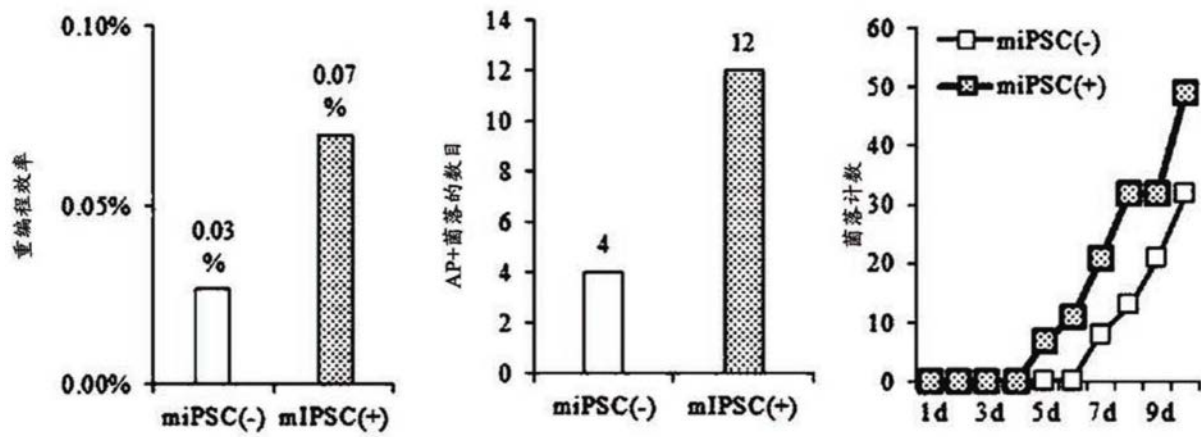


图1c

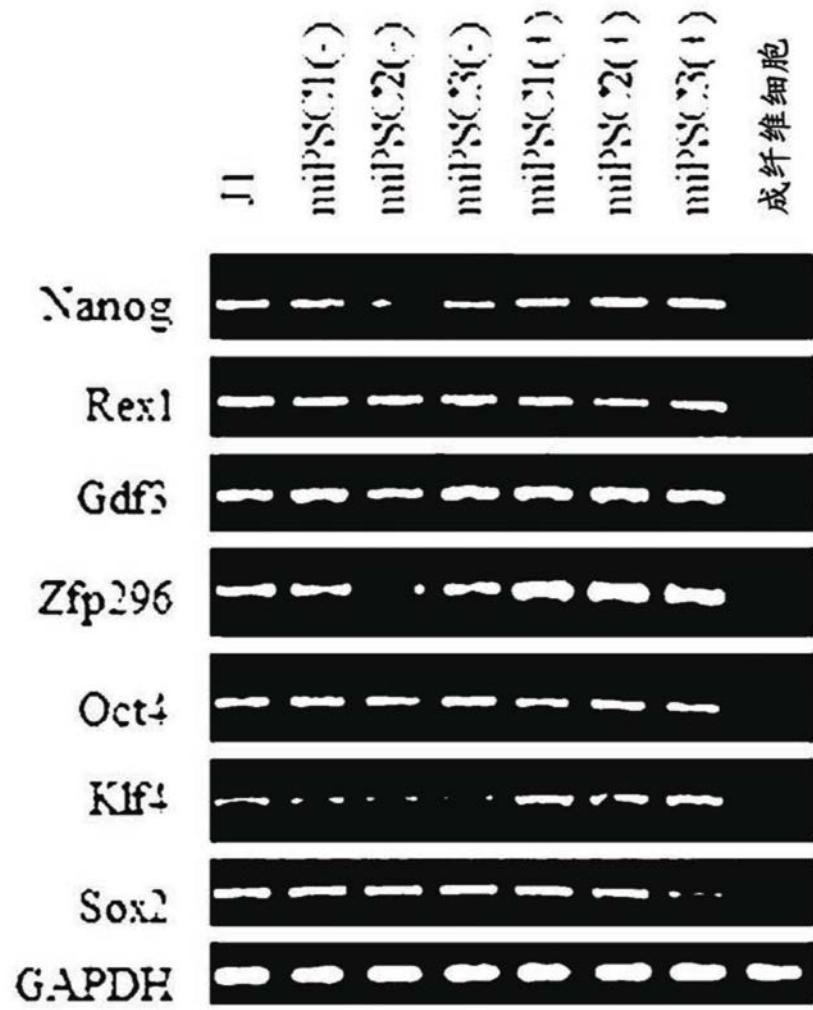


图2a

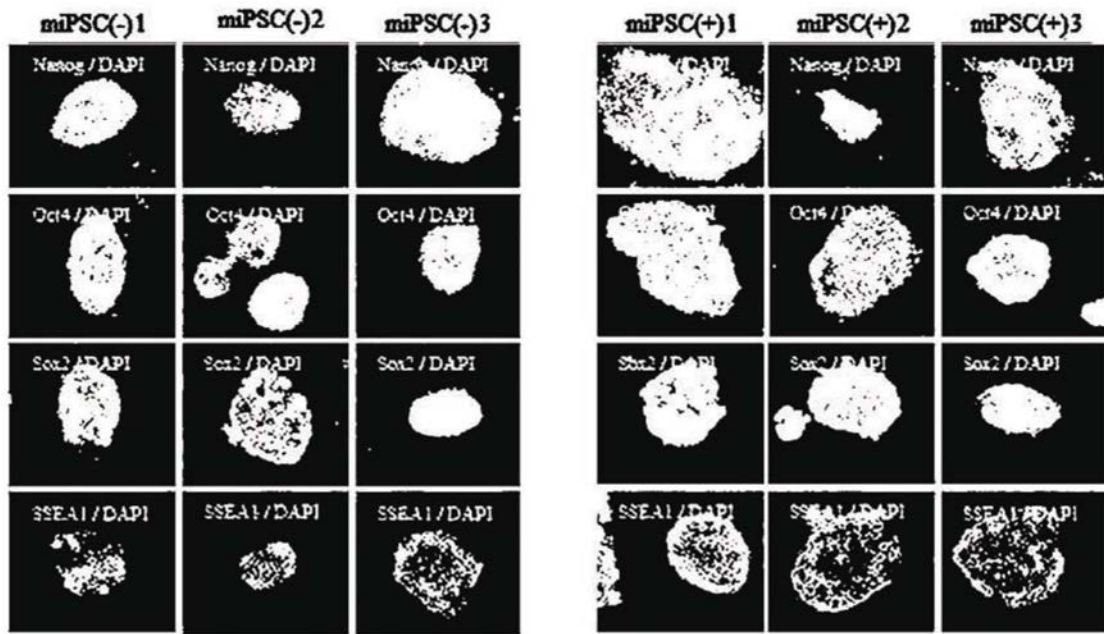


图2b

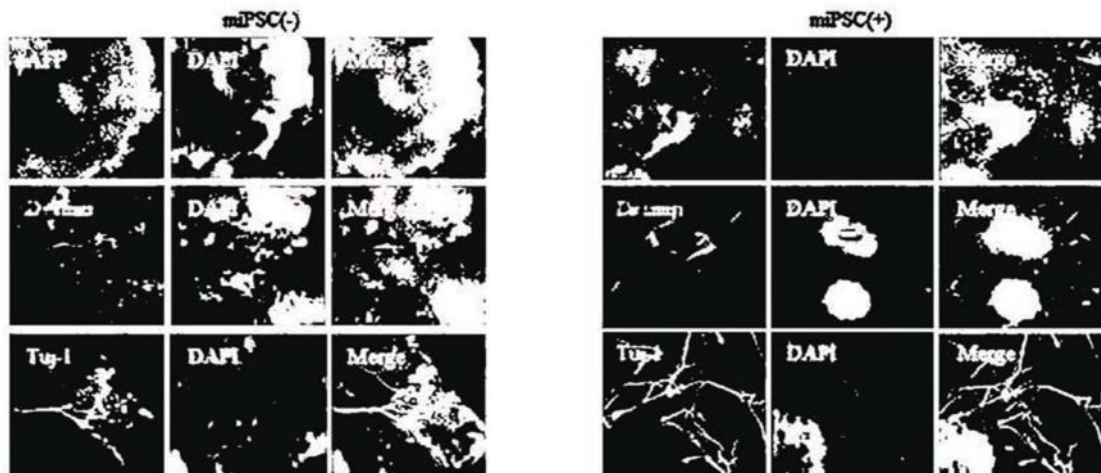


图3a

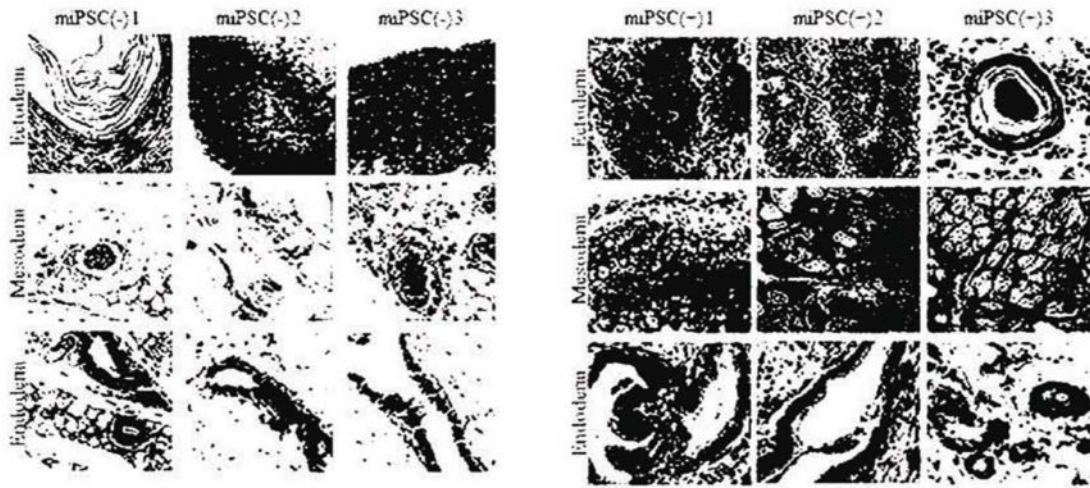


图3b

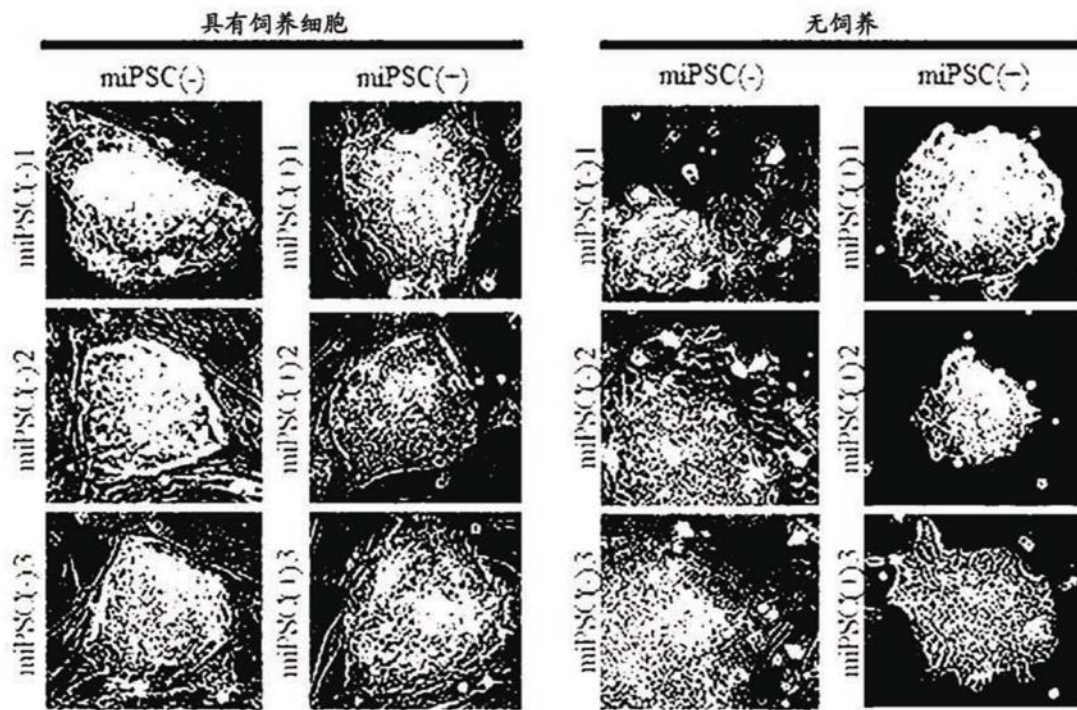


图4a

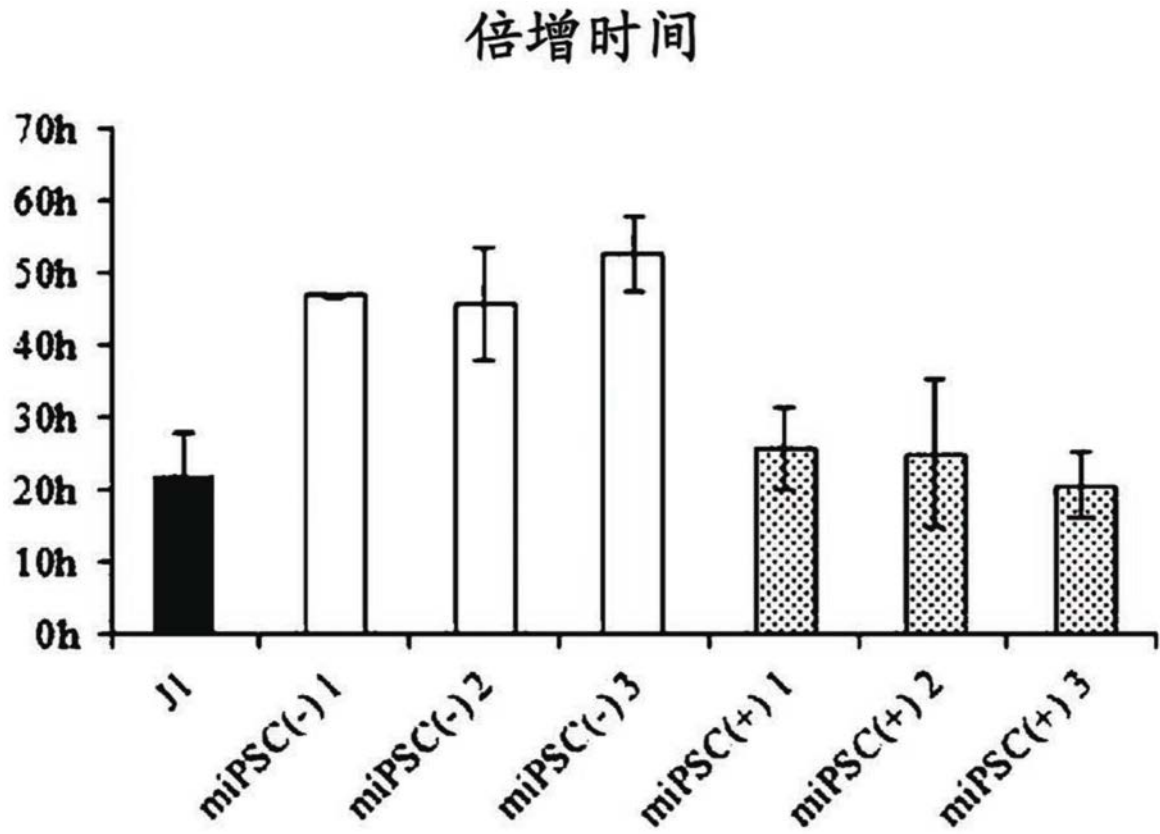


图4b

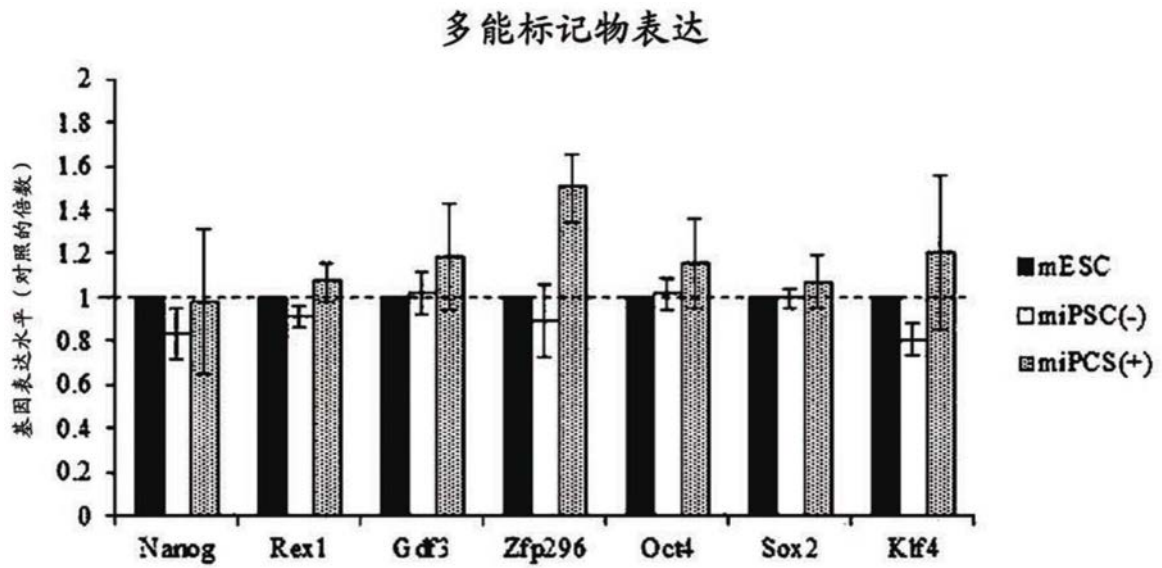


图4c

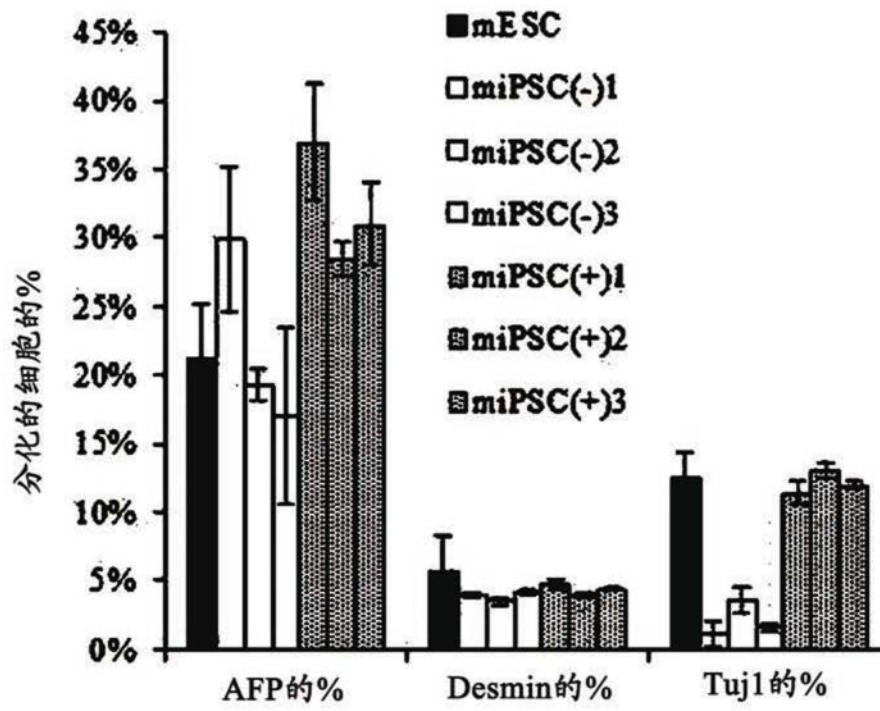


图5a

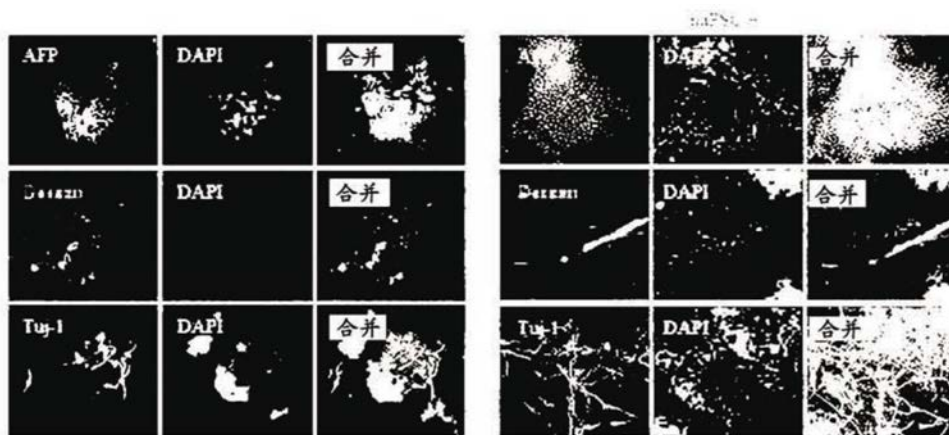


图5b

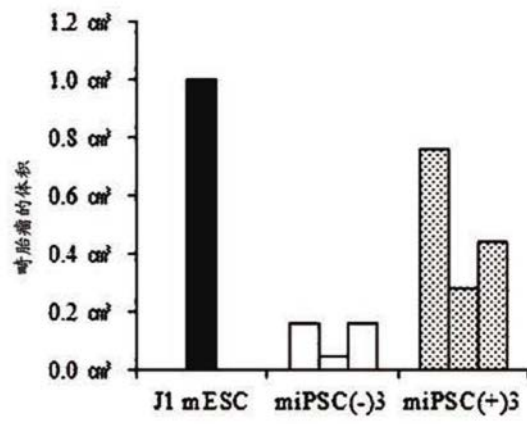
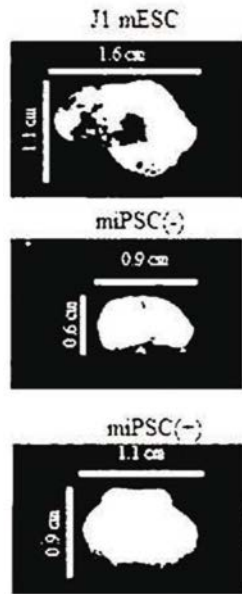


图5c

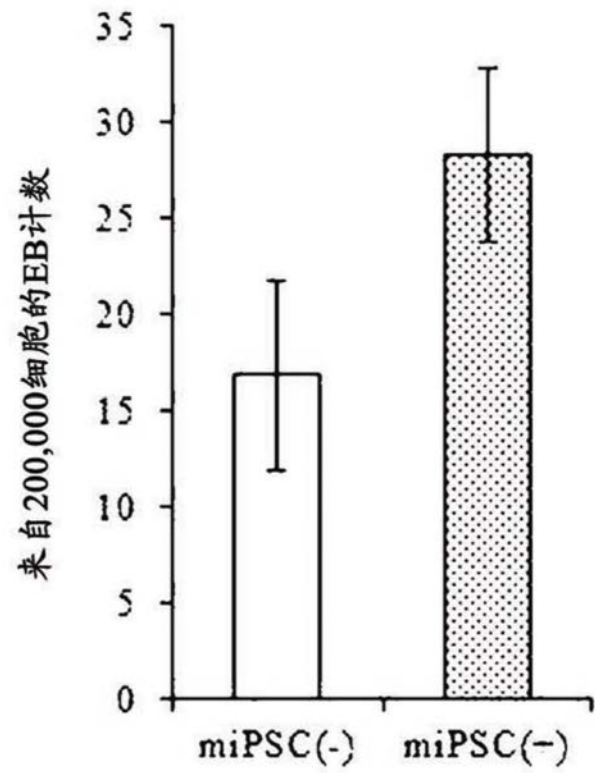
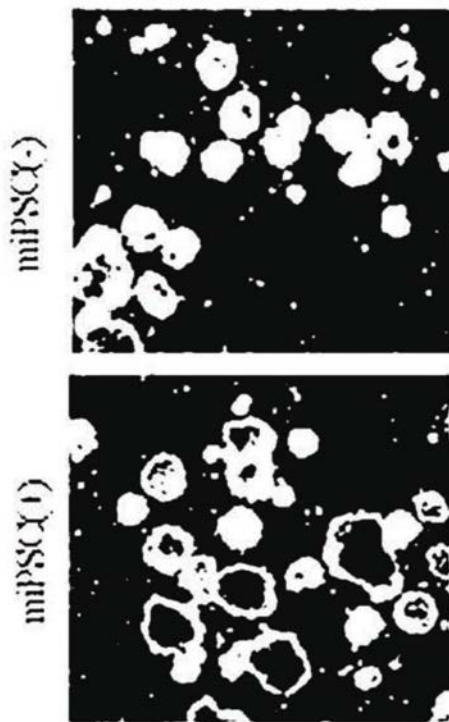


图5d

表1. 无化学物和化学物处理的小鼠iPSC中60个分析的细胞内观察到的染色体突变

	染色体																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y	
miPSC(-)																					20	
失去1拷贝																					20	
获得1拷贝		1						6		1	1			4								
缺失														20								
复制						22																
转位																		20	20			
miPSC(±)																						
失去1拷贝																					38	
获得1拷贝								20		33												
缺失																						
复制																						
转位																						
miPSC(+)																						
失去1拷贝																						
获得1拷贝																						
缺失																						
复制																						
转位																						

图6a

表2. 在无化学物和化学物处理的小鼠iPSC系中观察到的染色体非整倍性突变

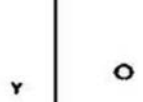
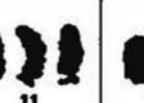
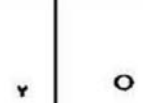
	Ch.2	Ch.8	Ch.10	Ch.11	Ch.14	Ch.Y	突变
miPSC(-)	 2 获得1拷贝	 8 获得1拷贝	 10 获得1拷贝	 11 获得1拷贝	 14 获得1拷贝	 X Y 失去1拷贝	○
miPSC(±)	 2	 8 获得1拷贝	 10	 11 获得1拷贝	 14	 X Y 失去1拷贝	○
miPSC(+)	 2	 8	 10	 11	 14	 X Y	X

图6b

表3. 在无化学物和化学物处理的小鼠iPSC系中观察到的染色体结构突变

	Ch.6	Ch.14	Ch.18	Ch.19	突变
miPSC(-)	 复制	 缺失	 t(18;19)	 t(18;19)	○
miPSC(±)	 6	 14	 18	 19	X
miPSC(+)	 6	 14	 18	 19	X

图6c

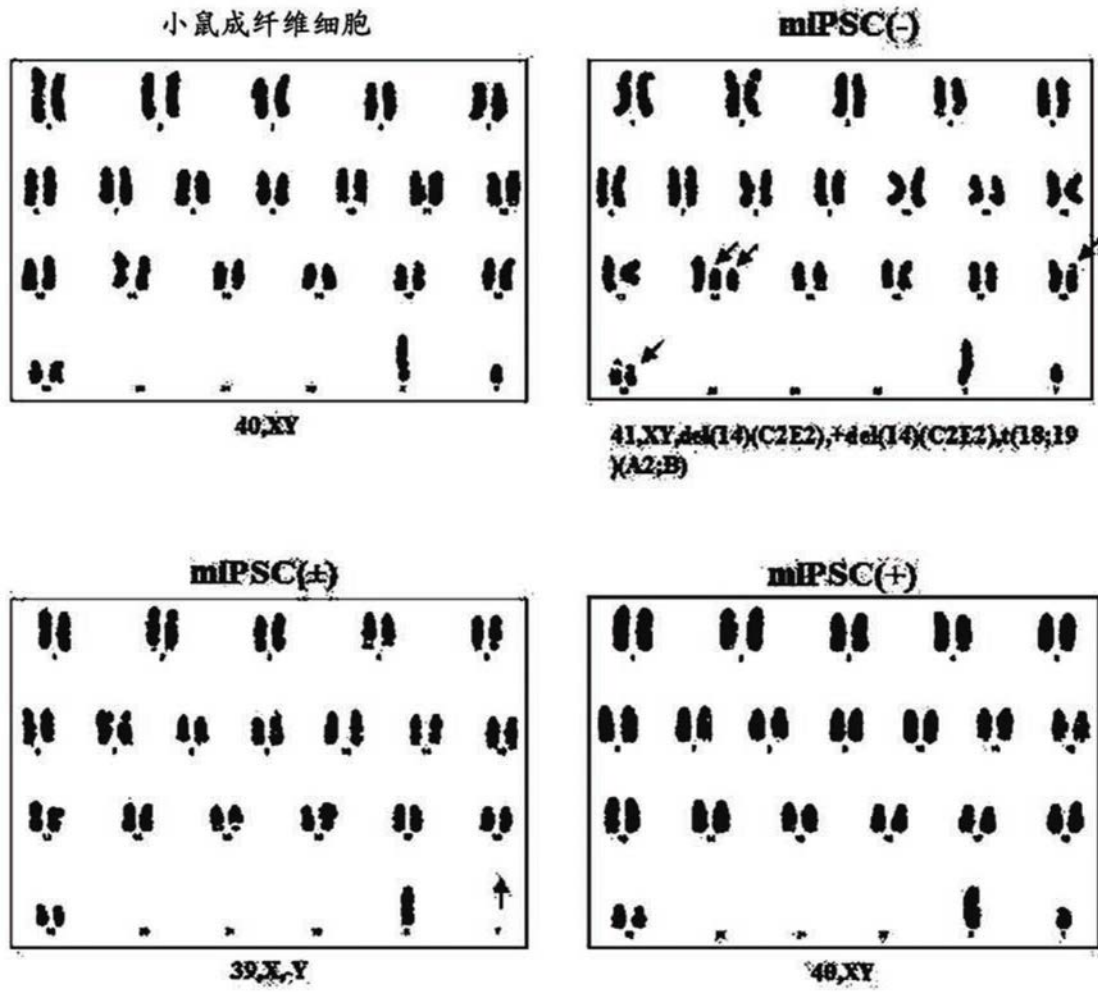


图6d

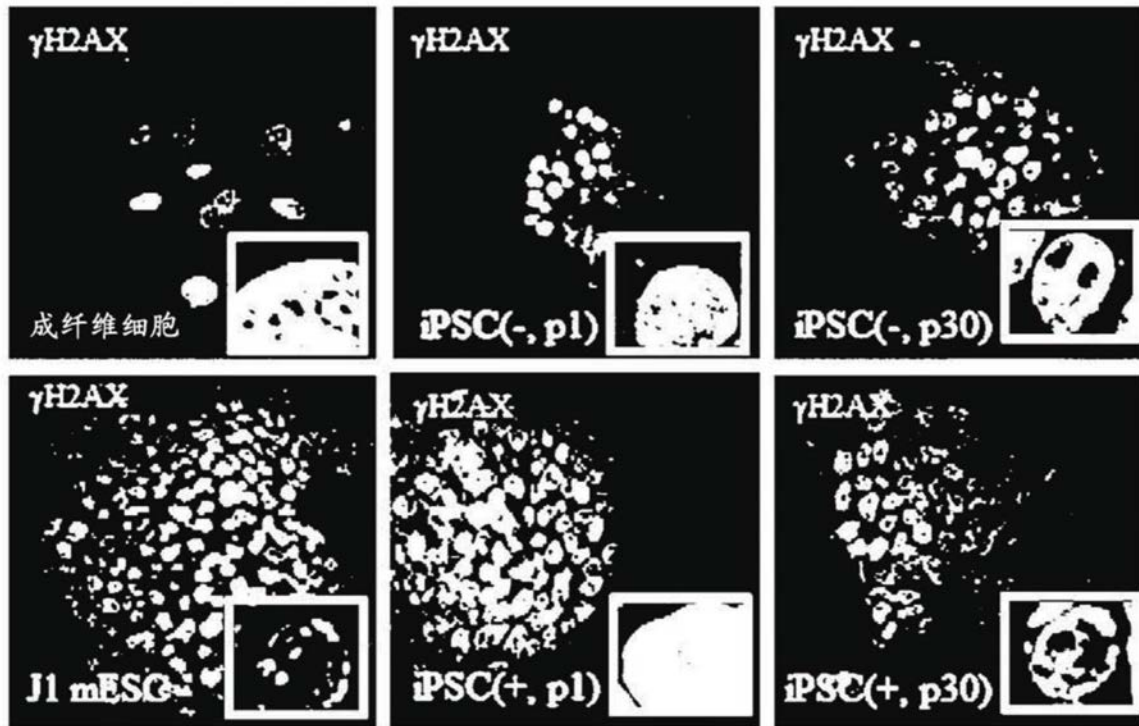


图7a

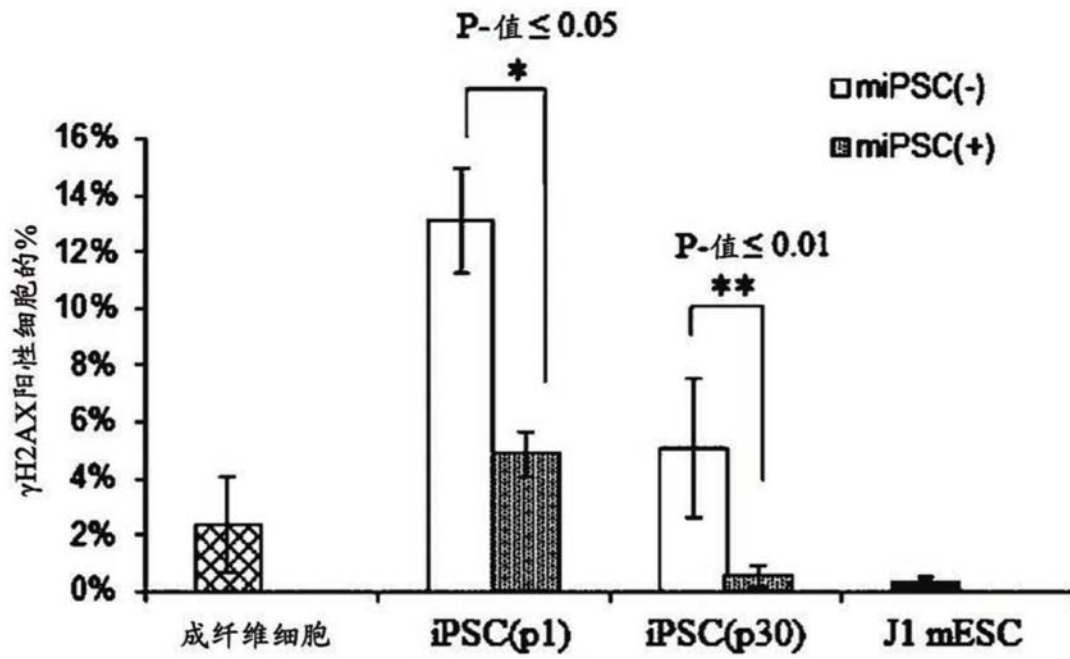


图7b

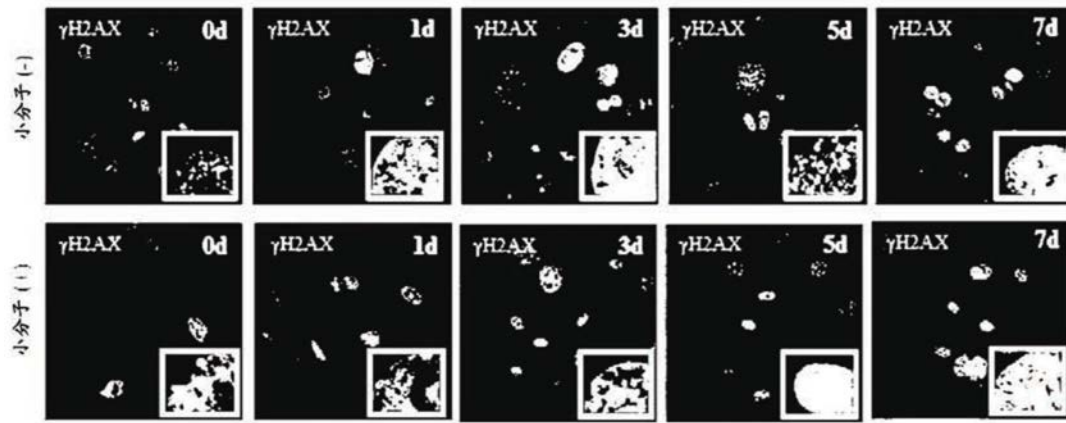


图7c

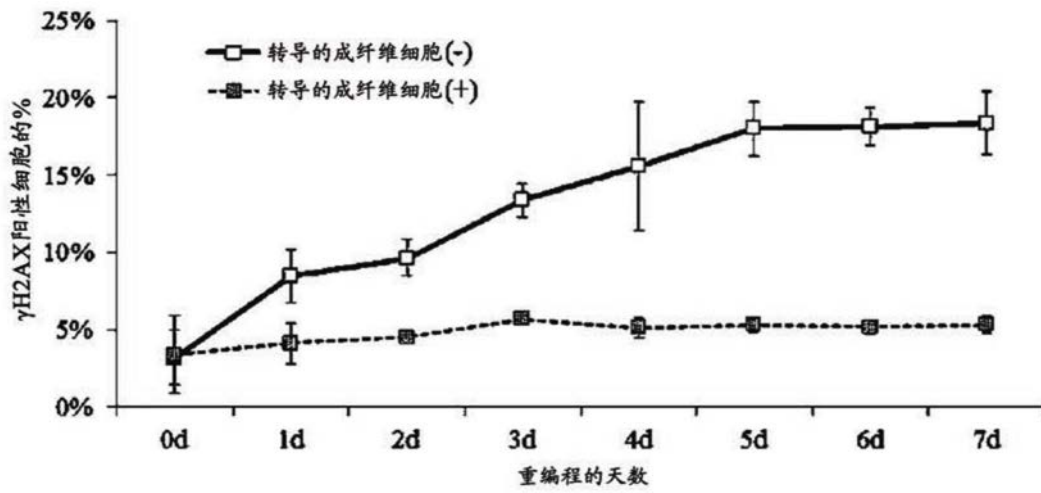


图7d

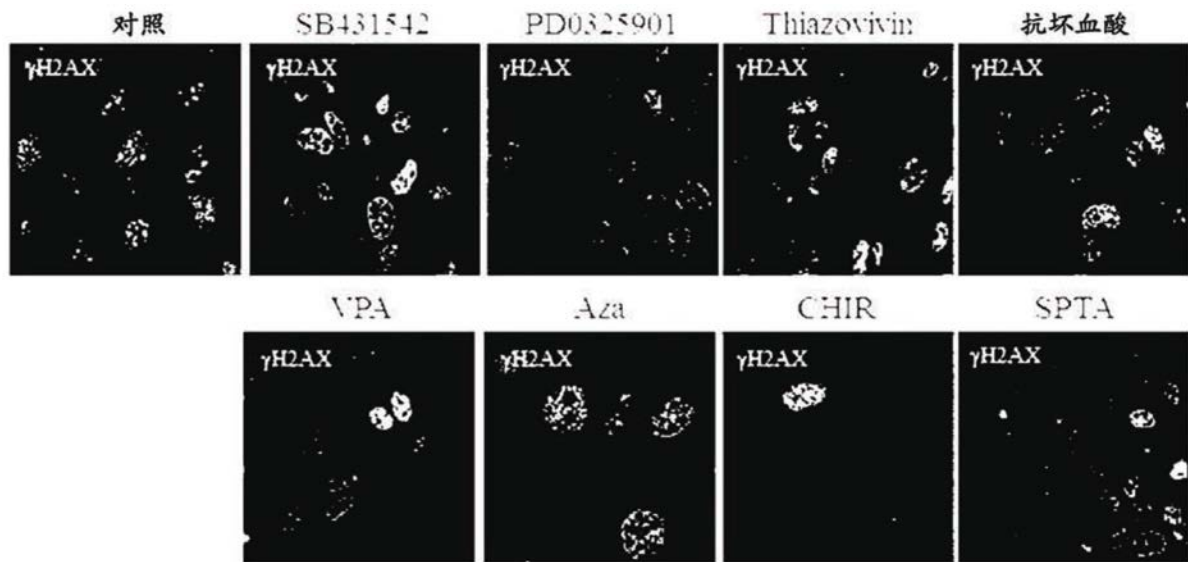


图7e

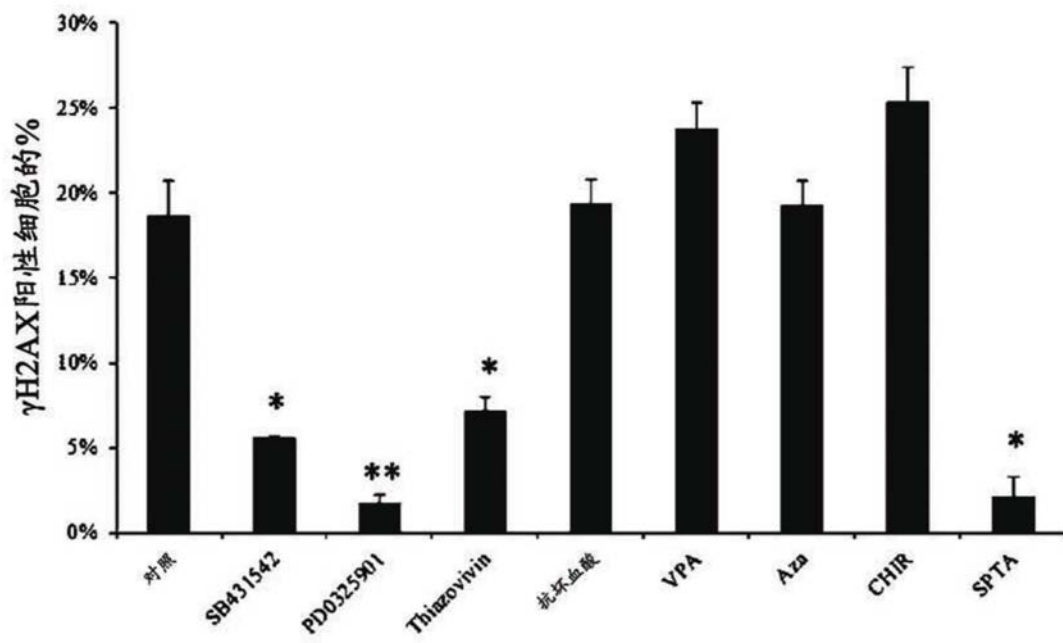


图7f