



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102959076 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 06

(21) 申请号 201180026219. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 03. 30

C12N 5/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/319, 494 2010. 03. 31 US

61/393, 724 2010. 10. 15 US

61/406, 892 2010. 10. 26 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 11. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/030598 2011. 03. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02011/123572 EN 2011. 10. 06

(71) 申请人 斯克里普斯研究所

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 朱赛勇 丁生

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 张国梁

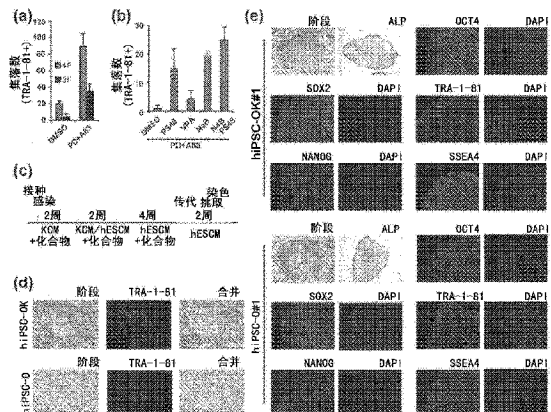
权利要求书 4 页 说明书 37 页 附图 10 页

(54) 发明名称

重编程细胞

(57) 摘要

本发明提供使用 3'-磷酸肌醇依赖性激酶-1(PDK1) 激活剂或促进糖酵解代谢的化合物以及其他小分子从非多能哺乳动物细胞生产诱导的多能干干细胞的方法、组合物和试剂盒。



1. 将非多能哺乳动物细胞诱导为诱导的多能干细胞的方法,所述方法包括在足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件下将非多能细胞与 3'-磷酸肌醇依赖性激酶-1(PDK1) 激活剂接触,由此将所述非多能哺乳动物细胞诱导为诱导的多能干细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述 PDK1 激活剂是变构的 PDK1 激活剂。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述 PDK1 激活剂是 (Z)-5-(4-氯苯基)-3-苯基戊-2-烯酸("PS48"),(Z)-5-(4-溴-2-氟苯基)-3-苯基戊-2-烯酸("PS08"),2-(3-(4-氯苯基)-3-氧代-1-苯基丙基硫代)乙酸,(Z)-5-(萘-2-基)-3-苯基戊-2-烯酸("12Z"),或(Z)-5-(1H-咪唑-3-基)-3-苯基戊-2-烯酸("13Z")。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述 PDK1 激活剂是 PS48。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的方法,所述方法还包括将所述非多能细胞与 TGF $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂接触。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述 TGF $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂是 A-83-01。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法,所述方法还包括将所述非多能细胞与 MEK 抑制剂接触。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述 MEK 抑制剂是 PD0325901。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的方法,所述方法还包括将所述非多能细胞与组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂接触。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述 HDAC 抑制剂是丁酸钠(NaB)。

11. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述 HDAC 抑制剂是丙戊酸(VPA)。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的方法,其中所述条件包括将至少一种外源转录因子引入到所述非多能细胞中。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述外源转录因子包括多肽。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法,其中所述外源转录因子包括 Oct 多肽。

15. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法,其中所述外源转录因子包括选自由 Oct 多肽和 Klf 多肽组成的组的多肽。

16. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法,其中所述外源转录因子包括选自由 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的多肽。

17. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法,所述方法包括将至少两种、三种或四种外源转录因子引入到所述非多能细胞中,其中所述外源转录因子各自包括选自由 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的不同多肽。

18. 根据权利要求 12-17 中任一项所述的方法,其中所述外源转录因子通过将多核苷酸引入到所述非多能细胞中来引入,其中所述多核苷酸编码所述外源转录因子,由此在所述非多能细胞中表达一种或多种转录因子。

19. 根据权利要求 12-17 中任一项所述的方法,其中所述外源转录因子通过将所述外源转录因子与所述非多能细胞接触来引入。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述外源转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。

21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的方法,其中所述非多能细胞是人细胞。

22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的方法,其中所述 PDK1 激活剂以这样的浓度存

在:所述浓度足以在足以诱导所述非多能细胞向所述诱导的多能干细胞转化的条件下将所述非多能细胞诱导为诱导的多能干细胞的效率提高至少 10%。

23. 根据权利要求 1 所述的方法,其中接触包括将所述非多能细胞与 PDK1 激活剂在不存在 MEK 抑制剂的情况下接触,之后将所述非多能细胞与 PDK1 激活剂和 MEK 抑制剂接触。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中接触包括将所述非多能细胞与 PDK1 激活剂、TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂和组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂在不存在 MEK 抑制剂的情况下接触,之后将所述非多能细胞与 PDK1 激活剂、TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂、组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂和 MEK 抑制剂接触。

25. 根据权利要求 1-24 中任一项所述的方法,其中诱导多个多能干细胞,所述方法还包括纯化所述多能干细胞从而产生同质的多能干细胞群。

26. 混合物,其包括:哺乳动物细胞、PDK1 激活剂和以下各项中的一种或多种:

TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂;

MEK 抑制剂;

组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂;或

选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的一种或多种外源转录因子。

27. 根据权利要求 26 所述的混合物,其中至少 99% 的所述细胞是非多能细胞。

28. 根据权利要求 26-27 中任一项所述的混合物,其中基本上所有所述细胞是非多能细胞。

29. 根据权利要求 26-28 中任一项所述的混合物,其中所述细胞是人细胞。

30. 根据权利要求 26-29 中任一项所述的混合物,其中所述 PDK1 激活剂是变构的 PDK1 激活剂。

31. 根据权利要求 30 所述的混合物,其中所述 PDK1 激活剂是 (Z)-5-(4-氯苯基)-3-苯基戊-2-烯酸 ("PS48"), (Z)-5-(4-溴-2-氟苯基)-3-苯基戊-2-烯酸 ("PS08"), 2-(3-(4-氯苯基)-3-氧代-1-苯基丙基硫代)乙酸, (Z)-5-(萘-2-基)-3-苯基戊-2-烯酸 ("12Z"), 或 (Z)-5-(1H-咪唑-3-基)-3-苯基戊-2-烯酸 ("13Z")。

32. 根据权利要求 31 所述的混合物,其中所述 PDK1 激活剂是 PS48。

33. 根据权利要求 26-32 中任一项所述的混合物,所述混合物还包括 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂。

34. 根据权利要求 33 所述的混合物,其中所述 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂是 A-83-01。

35. 根据权利要求 26-34 中任一项所述的混合物,所述混合物还包括 MEK 抑制剂。

36. 根据权利要求 35 所述的混合物,其中所述 MEK 抑制剂是 PD0325901。

37. 根据权利要求 26-36 中任一项所述的混合物,所述混合物还包括组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂。

38. 根据权利要求 37 所述的混合物,其中所述 HDAC 抑制剂是丁酸钠 (NaB)。

39. 根据权利要求 37 所述的混合物,其中所述 HDAC 抑制剂是丙戊酸 (VPA)。

40. 根据权利要求 26-39 中任一项所述的混合物,所述混合物还包括选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽的外源转录因子。

41. 根据权利要求 40 所述的混合物,其中所述外源转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。

42. 根据权利要求 26-41 中任一项所述的混合物,其中所述 PDK1 激活剂以这样的浓度存在:所述浓度足以在足以诱导所述细胞向诱导的多能干细胞转化的条件下将所述混合物中非多能细胞诱导为诱导的多能干细胞的效率提高至少 10%。

43. 用于在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性的试剂盒,所述试剂盒包括:PDK1 激活剂和以下各项中的一种或多种:

TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂;

MEK 抑制剂;

组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂;或

选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的一种或多种转录因子。

44. 根据权利要求 43 所述的试剂盒,所述 PDK1 激活剂是变构的 PDK1 激活剂。

45. 根据权利要求 44 所述的试剂盒,其中所述 PDK1 激活剂是 (Z)-5-(4-氯苯基)-3-苯基戊-2-烯酸 ("PS48"), (Z)-5-(4-溴-2-氟苯基)-3-苯基戊-2-烯酸 ("PS08"), 2-(3-(4-氯苯基)-3-氧代-1-苯基丙基硫代)乙酸, (Z)-5-(萘-2-基)-3-苯基戊-2-烯酸 ("12Z"), 或 (Z)-5-(1H-咪唑-3-基)-3-苯基戊-2-烯酸 ("13Z")。

46. 根据权利要求 45 所述的试剂盒,其中所述 PDK1 激活剂是 PS48。

47. 根据权利要求 43-46 中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒还包括 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂。

48. 根据权利要求 47 所述的试剂盒,其中所述 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂是 A-83-01。

49. 根据权利要求 43-48 中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒还包括 MEK 抑制剂。

50. 根据权利要求 49 所述的试剂盒,其中所述 MEK 抑制剂是 PD0325901。

51. 根据权利要求 43-50 中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒还包括组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂。

52. 根据权利要求 51 所述的试剂盒,其中所述 HDAC 抑制剂是丁酸钠 (NaB)。

53. 根据权利要求 51 所述的试剂盒,其中所述 HDAC 抑制剂是丙戊酸 (VPA)。

54. 根据权利要求 43-53 中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒还包括选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽的转录因子。

55. 根据权利要求 54 所述的试剂盒,其中所述转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。

56. 将非多能哺乳动物细胞诱导为诱导的多能干细胞的方法,所述方法包括将所述非多能细胞与促进糖酵解代谢的化合物在足以将所述细胞诱导成为多能干细胞的条件下接触,由此将所述非多能哺乳动物细胞诱导为诱导的多能干细胞。

57. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解激活剂,糖酵解的底物,糖酵解中间体或其代谢前体,葡萄糖摄取转运蛋白激活剂,线粒体呼吸调节剂,氧化磷酸化抑制剂,或者低氧诱导因子激活剂。

58. 混合物,其包括:哺乳动物细胞、促进糖酵解代谢的化合物和以下各项中的一种或多种:

TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂;

MEK 抑制剂;

组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂;或

选自由 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的一种或多种外源转录因子。

59. 根据权利要求 58 所述的混合物,其中所述促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解激活剂,糖酵解的底物,糖酵解中间体或其代谢前体,葡萄糖摄取转运蛋白激活剂,线粒体呼吸调节剂,氧化磷酸化抑制剂,或者低氧诱导因子激活剂。

60. 用于在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性的试剂盒,所述试剂盒包括促进糖酵解代谢的化合物和以下各项中的一种或多种:

TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂;

MEK 抑制剂;

组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂;或

选自由 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的一种或多种转录因子。

61. 根据权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解激活剂,糖酵解的底物,糖酵解中间体或其代谢前体,葡萄糖摄取转运蛋白激活剂,线粒体呼吸调节剂,氧化磷酸化抑制剂,或者低氧诱导因子激活剂。

## 重编程细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2010 年 3 月 31 日提交的美国临时申请号 61/319,494, 于 2010 年 10 月 15 日提交的美国临时申请号 61/393,724, 和于 2010 年 10 月 26 日提交的美国临时申请号 61/406,892 的优先权的利益, 所述每个申请的内容通过引用完整地结合。

[0003] 发明背景

[0004] 诱导的多能干细胞 (iPSC) 技术, 即通过引入限定的因子将体细胞重编程为与胚胎干细胞 (ESC) 非常相似的多能细胞, 在生物医药研究和再生医学中具有很大的潜力 (Takahashi, K. 和 Yamanaka, S., *Cell*(细胞)126,663-676(2006); Takahashi 等, *Cell*(细胞)131,861-872(2007); Yu 等, *Science*318,1917-1920(2007); Zhou 等, *Cell Stem Cell*(干细胞)4,381-384(2009); Kim 等, *Cell Stem Cell*(干细胞)4,472-476(2009); Maherali, N. 和 Hochedlinger, K., *Cell Stem Cell*(干细胞)3,595-605(2009a); Daley 等, *Cell Stem Cell*(干细胞)4,200-201(2009)。已经开发出多种策略, 以在较少或没有外源基因操作的情况下产生 iPSC, 这表示 iPSC 应用的主要障碍 (Yamanaka 等, 2009; Saha, K., Jaenisch, R., *Cell Stem Cell*(干细胞)5,584-595(2009))。为了实现相对于基因操作或更难以制造 / 使用的生物制剂提供显著优势的通过限定的小分子混合物产生 iPSC 的最终目标, 在鉴别可以在功能上替代外源重编程转录因子 (TF) 和 / 或提高重编程效率和动力学的化学化合物的方面已经进行了大量努力 (Shi 等, *Cell Stem Cell*(干细胞)2,525-528(2008a); Shi 等, *Cell Stem Cell*(干细胞)3,568-574(2008b); Huangfu 等, *Nat Biotechnol*(自然生物技术)26,795-797(2008a); Huangfu 等, *Nat Biotechnol*(自然生物技术)26,1269-1275(2008b); Silva 等, *Plos Bio*6, e253. doi:10.1371/journal.pbio.0060253(2008); Lyssiotis 等, *PNAS*106,8912-8917(2009); Ichida 等, *Cell Stem Cell*(干细胞)5,491-503(2009); Maherali, N., Hochedlinger, K., *Curr Biol*19,1718-1723(2009b); Esteban 等, *Cell Stem Cell*(干细胞)6,71-79(2010); Feng 等, *Cell Stem Cell*(干细胞)4,301-312(2009))。然而, 进一步减少外源 TF 的数目已经成为极大的挑战, 原因在于: (1) 大多数允许或增强重编程的条件 (例如, 开发具体的细胞类型或使用小分子) 是背景依赖的 (context dependent), 即, 这样的具体条件 (例如, 重编程小分子) 通常在具有不同外源因子的不同细胞类型中无效的多或甚至是有毒的并且用于不同的治疗窗口; 以及 (2) 当重编程效率和速度由于更少的使用外源 TF 而进一步按指数降低时, 高通量筛选在技术上是具有挑战的。至今, 仅有内源高水平表达 Sox2 和 cMyc 的神经干细胞 (NSC) 通过仅 Oct4 的外源表达显示被重编程为 iPSC (Kim 等, *Cell*(细胞)136,411-419(2009a); Kim 等, *Nature*(自然)461,643-649(2009b))。然而, 人胎儿 NSC 很少并且实际中难以获得 (Nunes 等, *Nat Med*(自然医学)9,439-447(2003))。因此, 有益的是开发可应用于其他更容易获取和丰富的体细胞的化学重编程条件。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明提供将非多能哺乳动物细胞诱导为诱导的多能干细胞的方法。在一些实施

方案中,该方法包括在足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件下将非多能细胞与 3'-磷酸肌醇依赖性激酶-1 (PDK1) 激活剂接触。在一些实施方案中,PDK1 激活剂是变构的 PDK1 激活剂,例如,(Z)-5-(4-氯苯基)-3-苯基戊-2-烯酸("PS48"),(Z)-5-(4-溴-2-氟苯基)-3-苯基戊-2-烯酸("PS08"),2-(3-(4-氯苯基)-3-氧代-1-苯基丙基硫代)乙酸、(Z)-5-(萘-2-基)-3-苯基戊-2-烯酸("12Z")或(Z)-5-(1H-吡啶-3-基)-3-苯基戊-2-烯酸("13Z")。

[0007] 在一些实施方案中,所述方法还包括将非多能细胞与 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂(例如,A-83-01)接触。在一些实施方案中,所述方法还包括将非多能细胞与 MEK 抑制剂(例如,PD0325901)接触。在一些实施方案中,所述方法还包括将非多能细胞与组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂(例如,丁酸钠(NaB)或丙戊酸(VPA))接触。

[0008] 在一些实施方案中,所述方法包括在足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件下将非多能细胞与 3'-磷酸肌醇依赖性激酶-1 (PDK1) 激活剂接触。在一些实施方案中,所述条件包括将至少一种外源转录因子引入到非多能细胞中。在一些实施方案中,外源转录因子包括多肽。在一些实施方案中,外源转录因子包括 Oct 多肽。在一些实施方案中,外源转录因子包括选自自由 Oct 多肽和 Klf 多肽组成的组的蛋白质。在一些实施方案中,外源转录因子包括选自自由 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的蛋白质。在一些实施方案中,所述条件包括将至少两种、三种或四种外源转录因子引入到非多能细胞中,其中所述外源转录因子各自包括选自自由 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的不同蛋白。在一些实施方案中,通过将多核苷酸引入到非多能细胞中来引入外源转录因子,其中所述多核苷酸编码所述外源转录因子,由此在非多能细胞中表达一种或多种转录因子。在一些实施方案中,外源转录因子通过将外源转录因子与非多能细胞接触来引入。在一些实施方案中,外源转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。

[0009] 在一些实施方案中,非多能细胞是人细胞。在一些实施方案中,PDK1 激活剂以这样的浓度存在:所述浓度足以在足以诱导非多能细胞到诱导的多能干细胞的转化的条件下将非多能细胞诱导为诱导的多能干细胞的效率提高至少 10%。

[0010] 在一些实施方案中,所述方法包括在足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件下将非多能细胞与 3'-磷酸肌醇依赖性激酶-1 (PDK1) 激活剂接触。在一些实施方案中,所述方法包括在不存在 MEK 抑制剂的情况下将非多能细胞与 PDK1 激活剂接触,之后将非多能细胞与 PDK1 激活剂和 MEK 抑制剂接触。在一些实施方案中,所述方法包括在不存在 MEK 抑制剂的情况下将非多能细胞与 PDK1 激活剂、TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂和组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂接触,之后将非多能细胞与 PDK1 激活剂、TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂和 MEK 抑制剂接触。

[0011] 在一些实施方案中,所述方法还包括纯化多能细胞从而产生同质的多能细胞群。在一些实施方案中,其中多个多能干细胞被诱导,所述方法还包括纯化多能干细胞从而产生同质的多能干细胞群。

[0012] 在另一个方面中,本发明提供混合物,所述混合物包含:哺乳动物细胞、PDK1 激活剂和以下各项中的一个或多个:(1) TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂;(2) MEK 抑制剂;(3) 组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂;或(4) 选自自由 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的一种或多种外源转录因子。

[0013] 在一些实施方案中,在混合物中至少 99% 的细胞是非多能细胞。在一些实施方案中,基本上所有细胞是非多能细胞。在一些实施方案中,细胞是人细胞。在一些实施方案中,PDK1 激活剂是变构的 PDK1 激活剂,例如,(Z)-5-(4-氯苯基)-3-苯基戊-2-烯酸("PS48"),(Z)-5-(4-溴-2-氟苯基)-3-苯基戊-2-烯酸("PS08"),2-(3-(4-氯苯基)-3-氧代-1-苯基丙基硫代)乙酸,(Z)-5-(萘-2-基)-3-苯基戊-2-烯酸("12Z"),或(Z)-5-(1H-咪唑-3-基)-3-苯基戊-2-烯酸("13Z")。在一些实施方案中,混合物还包含 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂,例如,A-83-01。在一些实施方案中,混合物还包含 MEK 抑制剂,例如,PD0325901。在一些实施方案中,混合物还包含组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂,例如,丁酸钠 (NaB),或丙戊酸 (VPA)。

[0014] 在一些实施方案中,混合物还包含选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽的外源转录因子。在一些实施方案中,外源转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。在一些实施方案中,在混合物中 PDK1 激活剂以这样的浓度存在:所述浓度足以使在足以诱导细胞到诱导的多能干细胞的转化的条件下将混合物中的非多能细胞诱导为诱导的多能干细胞的效率提高至少 10%。

[0015] 在另一个方面中,本发明提供用于在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性的试剂盒,所述试剂盒包括 PDK1 激活剂,和以下各项中的一种或多种:(1) TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂;(2) MEK 抑制剂;(3) 组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂;或(4) 选自由 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的一种或多种转录因子。在一些实施方案中,PDK1 激活剂是变构的 PDK1 激活剂,例如,(Z)-5-(4-氯苯基)-3-苯基戊-2-烯酸("PS48"),(Z)-5-(4-溴-2-氟苯基)-3-苯基戊-2-烯酸("PS08"),2-(3-(4-氯苯基)-3-氧代-1-苯基丙基硫代)乙酸,(Z)-5-(萘-2-基)-3-苯基戊-2-烯酸("12Z"),或(Z)-5-(1H-咪唑-3-基)-3-苯基戊-2-烯酸("13Z")。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂,例如,A-83-01。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括 MEK 抑制剂,例如,PD0325901。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂,例如,丁酸钠 (NaB),或丙戊酸 (VPA)。

[0016] 在一些实施方案中,所述试剂盒还包括选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽的外源转录因子。在一些实施方案中,外源转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。

[0017] 在另一个方面中,本发明提供将非多能哺乳动物细胞诱导为诱导的多能干细胞的方法。在一些实施方案中,所述方法包括在足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件下将非多能细胞与促进糖酵解代谢的化合物接触,由此将非多能哺乳动物细胞诱导为诱导的多能干细胞。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是 PDK1 激活剂。在一些实施方案中,PDK1 激活剂是变构的 PDK1 激活剂,例如,PS48,PS08,12Z,或 13Z。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解激活剂,例如,果糖 2,6-二磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解的底物,例如,果糖 6-磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解中间体或其代谢前体,例如,烟酸,NADH,或果糖 6-磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是葡萄糖摄取转运蛋白激活剂。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是线粒体呼吸调节剂。在一些实施方案中,线粒体呼吸调节剂是氧化磷酸化抑制剂,例如,2,4-二硝基苯酚,或 2-羟基戊二酸。在一些实施方案中,促进糖酵解



代谢的化合物是低氧诱导因子激活剂,例如,N-草酰甘氨酸,或槲皮素(querctin)。在一些实施方案中,所述方法还包括将非多能细胞与TGF $\beta$ 受体/ALK5抑制剂(例如,A-83-01)接触。在一些实施方案中,所述方法还包括将非多能细胞与MEK抑制剂例如PD0325901接触。在一些实施方案中,所述方法还包括将非多能细胞与组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂(例如,丁酸钠(NaB),或丙戊酸(VPA))接触。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法包括将非多能细胞促进糖酵解代谢的化合物在足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件下与接触。在一些实施方案中,所述条件包括将至少一种外源转录因子引入到非多能细胞中。在一些实施方案中,外源转录因子包括多肽。在一些实施方案中,外源转录因子包括Oct多肽。在一些实施方案中,外源转录因子包括选自由Oct多肽和Klf多肽组成的组的蛋白质。在一些实施方案中,外源转录因子包括选自由Oct多肽、Klf多肽、Myc多肽和Sox多肽组成的组的蛋白质。在一些实施方案中,所述条件包括将至少两种、三种或四种外源转录因子引入到非多能细胞中,其中外源转录因子各自包括选自由Oct多肽、Klf多肽、Myc多肽和Sox多肽组成的组的不同蛋白质。在一些实施方案中,通过将多核苷酸引入到非多能细胞中来引入外源转录因子,其中所述多核苷酸编码外源转录因子,由此在非多能细胞中表达一种或多种转录因子。在一些实施方案中,通过将外源转录因子与非多能细胞接触来引入外源转录因子。在一些实施方案中,外源转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施方案中,非多能细胞是人细胞。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物以这样的浓度存在:所述浓度足以使在足以诱导非多能细胞到诱导的多能干细胞的转化的条件下将非多能细胞诱导为诱导的多能干细胞的效率提高至少10%。

[0020] 在一些实施方案中,所述方法包括将非多能细胞与促进糖酵解代谢的化合物在足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件下接触。在一些实施方案中,所述方法包括将非多能细胞与促进糖酵解代谢的化合物和MEK抑制剂接触。在一些实施方案中,所述方法包括将非多能细胞与促进糖酵解代谢的化合物在不存在MEK抑制剂的情况下接触,之后将非多能细胞与促进糖酵解代谢的化合物和MEK抑制剂接触。在一些实施方案中,所述方法包括将非多能细胞与促进糖酵解代谢的化合物、TGF $\beta$ 受体/ALK5抑制剂和组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂在不存在MEK抑制剂的情况下接触,之后将非多能细胞与促进糖酵解代谢的化合物、TGF $\beta$ 受体/ALK5抑制剂、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂和MEK抑制剂接触。

[0021] 在一些实施方案中,所述方法还包括纯化多能细胞从而产生同质的多能细胞群。在一些实施方案中,其中大量多能干细胞被诱导,所述方法还包括纯化多能干细胞从而产生同质的多能干细胞群。

[0022] 在另一个方面中,本发明提供混合物,所述混合物包含:哺乳动物细胞,促进糖酵解代谢的化合物,和以下各项中的一种或多种:(1)TGF $\beta$ 受体/ALK5抑制剂;(2)MEK抑制剂;(3)组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂;或(4)选自由Oct多肽、Klf多肽、Myc多肽和Sox多肽组成的组的一种或多种外源多肽。在一些实施方案中,混合物中至少99%的细胞最初是非多能细胞。在一些实施方案中,基本上所有细胞最初是非多能细胞。在一些实施方案中,所述细胞是人细胞。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是PDK1激活剂。在一些实施方案中,PDK1激活剂是变构的PDK1激活剂,例如,PS48,PS08,12Z或13Z。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解激活剂,例如,果糖2,6-二磷酸。在一些

实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解的底物,例如,果糖 6- 磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解中间体或其代谢前体,例如,烟酸, NADH, 或果糖 6- 磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是葡萄糖摄取转运蛋白激活剂。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是线粒体呼吸调节剂。在一些实施方案中,线粒体呼吸调节剂是氧化磷酸化抑制剂,例如, 2,4- 二硝基苯酚, 或 2- 羟基戊二酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是低氧诱导因子激活剂,例如, N- 草酰甘氨酸, 或槲皮素。在一些实施方案中,该混合物还包含 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂,例如, A-83-01。在一些实施方案中,该混合物还包含 MEK 抑制剂,例如, PD0325901。在一些实施方案中,该混合物还包含组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂,例如, 丁酸钠 (NaB), 或丙戊酸 (VPA)。

[0023] 在一些实施方案中,外源转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。在一些实施方案中,混合物中的促进糖酵解代谢的化合物以这样的浓度存在:所述浓度足以使在足以诱导细胞到诱导的多能干细胞的转化的条件下将混合物中的非多能细胞诱导为诱导的多能干细胞的效率提高至少 10%。

[0024] 在另一个方面中,本发明提供用于在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性的试剂盒,所述试剂盒包括促进糖酵解代谢的化合物,和以下各项中的一种或多种:(1) TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂;(2) MEK 抑制剂;(3) 组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂;或 (4) 选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽组成的组的一种或多种转录因子;或编码选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽的转录因子的多核苷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是 PDK1 激活剂。在一些实施方案中, PDK1 激活剂是变构的 PDK1 激活剂,例如, PS48, PS08, 12Z 或 13Z。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解激活剂,例如,果糖 2,6- 二磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解的底物,例如,果糖 6- 磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解中间体或其代谢前体,例如,烟酸, NADH, 或果糖 6- 磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是葡萄糖摄取转运蛋白激活剂。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是线粒体呼吸调节剂。在一些实施方案中,线粒体呼吸调节剂是氧化磷酸化抑制剂,例如, 2,4- 二硝基苯酚, 或 2- 羟基戊二酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是低氧诱导因子激活剂,例如, N- 草酰甘氨酸, 或槲皮素。在一些实施方案中,试剂盒还包括 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂,例如, A-83-01。在一些实施方案中,试剂盒还包括 MEK 抑制剂,例如, PD0325901。在一些实施方案中,试剂盒还包括组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂,例如, 丁酸钠 (NaB), 或丙戊酸 (VPA)。在一些实施方案中,外源转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。

[0025] 定义

[0026] “Oct 多肽”是指 Octamer 转录因子家族的任一天然存在成员,或者与最相关的天然存在的家族成员相比保留例如至少 50%、80% 或 90% 的活性之内的转录因子活性的其变体,或至少包括天然存在的家族成员的 DNA 结合结构域并且可以进一步包括转录活化结构域的多肽。示范性 Oct 多肽包括 Oct-1, Oct-2, Oct-3/4, Oct-6, Oct-7, Oct-8, Oct-9 和 Oct-11。例如, Oct3/4 (本文中称为 “Oct4”) 包含 POU 结构域 (在 Pit-1, Oct-1, Oct-2 和 uric-86 之间保守的 150 个氨基酸的序列)。参见 Ryan, A. K. & Rosenfeld, M. G. *Genes Dev.* (基因发育) 11, 1207-1225 (1997)。在一些实施方案中,与天然存在的 Oct 多肽家族成员诸如以上列出的那些或诸如在 Genbank 登记号 NP\_002692.2 (人 Oct4) 或 NP\_038661.1 (小鼠

Oct4) 中列出的相比,变体在其整个序列上具有至少 85%、90%或 95%的氨基酸序列同一性。Oct 多肽(例如,Oct3/4)可以来自人、小鼠,大鼠,牛,猪,或其他动物。通常,相同物种的蛋白将与该物种的被操作的细胞一起使用。

[0027] “Klf 多肽”是指 Krüppel 样因子 (Klfs) 家族的任一天然存在成员,含有与果蝇 (*Drosophila*) 胚胎模式调控子 Krüppel 类似的氨基酸序列的锌指蛋白,或者与最相关的天然存在的家族成员相比保留相似的例如至少 50%、80%或 90%的活性之内的转录因子活性的其变体,或至少包括天然存在的家族成员的 DNA 结合结构域并且可以进一步包括转录活化结构域的多肽。参见, Dang, D. T., Pevsner, J. & Yang, V. W. *Cell Biol.* (细胞生物学) 32, 1103-1121 (2000)。示范性 Klf 家族成员包括 Klf1, Klf2, Klf3, Klf-4, Klf5, Klf6, Klf7, Klf8, Klf9, Klf10, Klf11, Klf12, Klf13, Klf14, Klf15, Klf16 和 Klf17。发现 Klf2 和 Klf-4 是能够在小鼠中产生 iPS 细胞的因子,并且相关的基因 Klf1 和 Klf5 也是如此,虽然效率降低。参见, Nakagawa 等, *Nature Biotechnology* (自然生物技术) 26 :101-106 (2007)。在一些实施方案中,与天然存在 Klf 多肽家族成员诸如以上列出的那些或诸如在 Genbank 登记号 CAX16088 (小鼠 Klf4) 或 CAX14962 (人 Klf4) 中列出的相比,变体在其整个序列上具有至少 85%、90%或 95%的氨基酸序列同一性。Klf 多肽(例如, Klf1, Klf4, 和 Klf5) 可以来自人、小鼠,大鼠,牛,猪,或其他动物。通常,相同物种的蛋白将与该物种的被操作的细胞一起使用。就本文中描述的 Klf 多肽而言,其可以用雌激素相关受体  $\beta$  (Essrb) 多肽替换。因此,意图是对于本文中所述的各种 Klf 多肽实施方案,同等地描述使用 Essrb 替代 Klf4 多肽的对应的实施方案。

[0028] “Myc 多肽”是指 Myc 家族的任一天然存在成员(参见,例如 Adhikary, S. & Eilers, M. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* (自然分子细胞生物学综述) 6 :635-645 (2005)), 或者与最相关的天然存在的家族成员相比保留例如至少 50%、80%或 90%的活性之内的转录因子活性的其变体,或至少包括天然存在的家族成员的 DNA 结合结构域并且可以进一步包括转录活化结构域的多肽。示例性的 Myc 多肽包括,例如, c-Myc、N-Myc 和 L-Myc。在一些实施方案中,与天然存在 Myc 多肽家族成员诸如以上列出的那些或诸如在 Genbank 登记号 CAA25015 (人 Myc) 中列出的相比,变体在其整个序列上具有至少 85%、90%或 95%的氨基酸序列同一性。Myc 多肽(例如, c-Myc) 可以来自人、小鼠,大鼠,牛,猪,或其他动物。通常,相同物种的蛋白将与该物种的被操作的细胞一起使用。就本文中描述的 Myc 多肽而言,其可以用 Wnt 多肽(例如 Wnt3A (例如, NP\_149122. 1)) 或刺激 Wnt 信号传导通路的试剂(例如,糖原合成酶  $\alpha$  或  $\beta$  抑制剂)替换。因此,意图是对于本文中所述的各种 Myc 多肽实施方案,同等地描述使用 Wnt 多肽或刺激 Wnt 信号传导通路的试剂替代 Myc 多肽的对应的实施方案。

[0029] “Sox 多肽”是指 SRY 相关 HMG- 盒 (Sox) 转录因子(其特征为存在高迁移率组 (HMG) 结构域) 的任一天然存在成员,或者与最相关的天然存在的家族成员相比保留例如至少 50%、80%或 90%的活性之内的转录因子活性的其变体,或至少包括天然存在的家族成员的 DNA 结合结构域并且可以进一步包括转录活化结构域的多肽。参见,例如, Dang, D. T. 等, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32 :1103-1121 (2000)。示例性的 Sox 多肽包括,例如, Sox1, Sox-2, Sox3, Sox4, Sox5, Sox6, Sox7, Sox8, Sox9, Sox10, Sox11, Sox12, Sox13, Sox14, Sox15, Sox17, Sox18, Sox-21 和 Sox30。Sox1 已经显示以与 Sox2 相似的效率产生 iPS 细胞,并且基因 Sox3, Sox15 和 Sox18 也已经显示产生 iPS 细胞,尽管效率比 Sox2 稍低。

参见, Nakagawa 等, Nature Biotechnology(自然生物技术)26:101-106(2007)。在一些实施方案中,与天然存在 Sox 多肽家族成员诸如以上列出的那些或诸如在 Genbank 登记号 CAA83435(人 Sox2)中列出的相比,变体在其整个序列上具有至少 85%、90%或 95%的氨基酸序列同一性。Sox 多肽(例如, Sox1, Sox2, Sox3, Sox15 或 Sox18)可以来自人、小鼠,大鼠,牛,猪,或其他动物。通常,相同物种的蛋白将与该物种的被操作的细胞一起使用。

[0030] “外源转录因子”当用于本文中时是指不是天然地(即,内源地)在目的细胞中表达的转录因子。因此,外源转录因子可以从引入的表达盒中表达(例如,在除天然转录因子启动子以外的启动子的控制下)或者可以作为来自细胞外的蛋白引入。在一些实施方案中,外源转录因子包括 Oct 多肽(例如, Oct4), Klf 多肽(例如, Klf4), Myc 多肽(例如, c-Myc),或 Sox 多肽(例如, Sox2)。

[0031] “H3K9”是指组蛋白 H3 赖氨酸 9。与基因活性相关的 H3K9 修饰包括 H3K9 乙酰化和,而与异染色质相关的 H3K9 修饰包括 H3K9 双甲基化或三甲基化。参见,例如, Kubicek 等, Mol. Cell 1473-481(2007)。“H3K4”是指组蛋白 H3 赖氨酸 4。参见,例如, Ruthenburg 等, Mol. Cell 125:15-30(2007)。

[0032] 术语“多能”或“多能性”是指具有产生这样的后代的能力的细胞,所述后代能够在适当条件下经历分化成为共同展示与来自全部三胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的细胞谱系相关的特征的细胞类型。多能干细胞可以形成出生前、出生后或成年动物的许多或全部组织。标准的本领域公认测试,诸如在 8-12 周龄 SCID 小鼠中形成畸胎瘤的能力,可以用于确定细胞群的多能性,然而,不同多能干细胞特征的鉴定也可以用于检测多能细胞。

[0033] “多能干细胞特征”是指将多能干细胞与其他细胞相区别的细胞特征。产生能够在适当条件下经历分化成为共同展示与来自全部三胚层(内胚层、中胚层和外胚层)细胞谱系相关特征的细胞类型后代的能力是多能干细胞特征。表达或不表达某些分子标记物组合也是多能干细胞特征。例如,人多能干细胞表达至少一种、两种或三种,且任选地全部,来自以下非限制性列表的标记物:SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-49/6E、ALP, Sox2、E-钙黏着蛋白、UTF-1、Oct4, Rex1 和 Nanog。与多能干细胞相关的细胞形态学也是多能干细胞特征。

[0034] “重组”多核苷酸是不以其天然状态存在的多核苷酸,例如,所述多核苷酸包括自然界中不存在的核苷酸序列,或所述多核苷酸处于除其天然存在的背景以外的背景中,例如,与其在自然界中典型接近的核苷酸序列分开,或与其典型不接近的核苷酸序列相邻(或相连)。例如,目的序列可以克隆至载体中,或否则与一种或多种另外的核酸重组。

[0035] “表达盒”是指包括与编码蛋白的序列可操作连接的启动子或其他调控序列的多核苷酸。

[0036] 术语“启动子”和“表达控制序列”在本文中用于是指指导核酸转录的核酸控制序列阵列。用于本文中时,启动子包括接近转录起始点的必需核酸序列,诸如在聚合酶 II 型启动子的情形中, TATA 元件。启动子还任选地包括远端增强子或抑制子元件,其可以位于距转录起始点多至数千碱基对处。启动子包括组成型和诱导型启动子。“组成型”启动子是在大部分环境和发育条件下处于活性的启动子。“诱导型”启动子是在环境或发育调节下处于活性的启动子。术语“可操作连接”是指核酸表达控制序列(诸如启动子或转录因子结合位点阵列)和第二核酸序列之间的功能性连接,其中所述表达控制序列指导对应于所述

第二序列的核酸转录。

[0037] “异源序列”或“异源核酸”，用于本文中时，是来源于与特定宿主细胞异源的来源的序列或核酸，或如果来自相同来源，则由其初始形式进行修饰。因此，细胞中的异源表达盒不是特定宿主细胞内源的表达盒，例如通过与来自表达载体的核酸序列而非染色体 DNA 相连，与异源启动子相连，或与报道基因相连等。

[0038] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中可互换地用于指采用单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语包括包含已知的核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸，其是合成的、天然存在的和非天然存在的，其具有与参考核酸类似的结合特性，且其以与参考核苷酸类似的方式代谢。所述类似物的实例包括，但不限于，硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性-磷酸甲酯、2-O-甲基核糖核酸、肽-核酸 (PNAs)。

[0039] 除非另外指出，特定核酸序列还包括其保守修饰变体（例如，简并密码子置换）和互补序列，以及明确指出的序列。特别地，简并密码子置换可以通过产生这样的序列来获得，在所述序列中，一个或多个所选（或全部）密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代 (Batzer 等, *Nucleic Acid Res. (核酸研究)* 19:5081(1991); Ohtsuka 等, *J. Biol. Chem. (生物化学杂志)* 260:2605-2608(1985); Rossolini 等, *Mol. Cell. Probes (分子细胞探针)* 8:91-98(1994))。

[0040] 表达或活性的“抑制剂”、“激活剂”和“调节剂”分别用来指利用用于所述靶蛋白的表达或活性的体外和体内测定所鉴定的抑制分子、活化分子或调节分子，例如，配体、激动剂、拮抗剂、及其同系物和模拟物。术语“调节剂”包括抑制剂和激活剂。抑制剂是，例如，抑制表达或结合，部分或全部阻断刺激或蛋白酶抑制剂活性，降低、防止、延迟活化，失活，去稳定化，或下调所述靶蛋白活性的试剂，例如拮抗剂。激活剂是例如，诱导或活化所述靶蛋白表达或结合，刺激、增加、开放、活化、促进、增强活化或蛋白酶抑制剂活性，致敏或上调所述靶蛋白（或编码多核苷酸）的活性的试剂，例如，激动剂。调节剂包括天然存在的和合成的配体，拮抗剂和激动剂（例如，起激动剂或拮抗剂功能的小化学分子、抗体等）。所述关于抑制剂和激活剂的测定包括，例如，将推定的调节剂化合物应用到表达所述靶蛋白的细胞，然后确定对所述靶蛋白活性的功能性作用，如上所述。将用潜在的激活剂、抑制剂、或调节剂处理的包含所述靶蛋白的样品或测定与无抑制剂、激活剂、或调节剂的对照样品进行比较，以检验作用程度。对照样品（未用调节剂处理）被赋予 100% 的相对活性值。当活性值相对于对照为约 80%，任选 50% 或 25、10%、5% 或 1% 时，实现所述靶蛋白的抑制。当活性值相对于对照为约 110%，任选 150%，任选 200, 300%，400%，500% 或 1000-3000% 或更高时，实现所述靶蛋白的活化。

[0041] 术语“变构”用来指通过分子在酶的不同位置的不同位点（调节位点）处的结合来影响酶的一部分（如活性位点）的活性的作用。非底物分子在变构位点的结合影响底物结合（活性）位点的结合动力学。“变构结合位点”包含在许多酶和受体中。作为与变构结合位点结合的结果，与正常配体的相互作用可能被增强或减弱。例如，3'-磷酸肌醇依赖性激酶-1 (PKI) 中的变构结合位点是位于螺旋 C、螺旋 B 以及 -4 和 -5 片之间的 PKI 相互作用片段 (PIF) 结合口袋 (Pearl 等, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 761-767(2002); Biondi 等, *Biochem. J.* 372, 1-13(2003); Newton 等, *Chem. Rev.* 101, 2353-2364(2001))。

[0042] 当用于本文中时，“促进 (promote)”或“增加 (increase)”或者“促进

(promoting) ” 或 “ 增加 (increasing) ” 在本文中可互换地使用。这些术语是指与未处理的细胞 ( 组织或对象 ) 相比在处理的细胞 ( 组织或对象 ) 中所测参数 ( 例如, 活性、表达、糖酵解、糖酵解代谢、葡萄糖摄取、糖酵解的生物合成下游 ) 的增加。也可以进行相同细胞或组织或对象在处理前和后之间的比较。增加足以被检测。在一些实施方案中, 与未处理的细胞相比, 处理的细胞中的增加至少是约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、2 倍、3 倍、4 倍或更多。

[0043] 当用于本文中时, “ 抑制 (inhibit) ”、“ 防止 (prevent) ” 或 “ 降低 (reduce) ” 或 “ 抑制 (inhibiting) ”、“ 防止 (preventing) ” 或 “ 降低 (reducing) ” 在本文中可互换地使用。这些术语是指与未处理的细胞 ( 组织或对象 ) 相比在处理的细胞 ( 组织或对象 ) 中所测参数 ( 例如, 活性、表达、线粒体呼吸、线粒体氧化、氧化磷酸化 ) 的降低。也可以进行相同细胞或组织或对象在处理前和后之间的比较。降低足以被检测。在一些实施方案中, 与未处理的细胞相比, 处理的细胞中的减小至少是约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或完全被抑制。在一些实施方案中, 与未处理的细胞相比, 在处理的细胞中被测量的参数是不可被检测的 ( 即, 完全被抑制 )。

[0044] 附图简述

[0045] 图 1. 通过单个基因、OCT4 和小分子由初级角质形成细胞产生人诱导的多能干细胞。(a) 用 0.5  $\mu$ M PD0325901 (PD) 和 0.5  $\mu$ M A-83-01 (A83) 处理显著改善由转导有 4TFs (4F, OKSM) 或 3TFs (3F, OKS) 的初级人角质形成细胞产生 iPSC。以 100,000 个转导的细胞 /10cm 皿的密度接种 NHEK。(b) 进一步的化学筛选鉴定出可以基本上增强转导有 2TFs (OK) 的初级人角质形成细胞的重编程的 PS48、NaB 和它们的组合。以 100,000 个转导的细胞 /10cm 皿的密度接种 NHEK。(c) 由被单个重编程基因 (OCT4) 转导的初级人角质形成细胞产生人 iPSC 的实验方案。KCM, 角质形成细胞培养基; hESCM, 人 ESC 培养基。(d) 在挑取集落前用 TRA-1-81 对由转导有 2TFs/OK 或 1TF/OCT4 的初级人角质形成细胞产生的 iPSC 集落进行活体免疫染色。(e) 建立的人 iPSC-OK 和 iPSC-0 细胞表达典型的多能性标记物, 包括 ALP (碱性磷酸酶), OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4 和 TRA-1-81。细胞核用 DAPI 染色。

[0046] 图 2. 人 iPSC-OK 和 iPSC-0 细胞的深入特征。(a) 通过 RT-PCR 对内源多能性基因和外源 OCT4 和 KLF4 进行表达分析。GAPDH 用作输入对照。(b) 通过硫酸氢盐基因组测序对 OCT4 和 NANOG 启动子进行甲基化分析。开圆和闭圆分别指示启动子区域中未甲基化和甲基化的 CpG。(c) 比较 iPSC-0 细胞和 NHEKs 与 hESCs 之间的全局基因表达模式的散布图。通过箭头显示多能性基因 OCT4、NANOG 和 SOX2 的位置。黑线指示样品之间基因表达水平的线性当量和双重改变。(d) 使用 EB 方法, 人 iPSC-OK 和 iPSC-0 在体外可以有效分化为三个胚层中的细胞, 包括神经外胚层细胞 ( $\beta$  III 微管蛋白<sup>+</sup>), 中胚层细胞 (SMA<sup>+</sup>) 和内胚层细胞 (AFP<sup>+</sup>)。 (e) 对通过使用 EB 方法来自分化的人 iPSC 的三个胚层标记物: 外胚层 (PAX6,  $\beta$  III 微管蛋白), 中胚层 (FOXF1, HAND1) 和内胚层 (AFP, GATA6) 进行的定量 PCR 测试。数据显示 GAPDH 归一化的倍数相对于未分化的亲本人 iPSCs 变化。(f) 人 iPSC-OK 和 iPSC-0 可以在 SCID 小鼠中有效产生全畸胎瘤 (full teratoma), 其包含分化的三个胚层中的细胞。

[0047] 图 3. 由人脐静脉内皮细胞通过单个基因、OCT4 和小分子产生和表征人诱导的多能干细胞。(a) 由被 OCT4 转导的 HUVECs 产生人 iPSCs 的实验方案。HCM, HUVEC 培养基; hESCM, 人 ESC 培养基。(b) 建立的来自 HUVECs 的 hiPSC-0 细胞表达典型的多能性标记物,

包括 NANOG 和 SSEA-4。细胞核用 DAPI 染色。(c) 通过 RT-PCR 对内源多能性基因进行表达分析。GAPDH 用作输入对照。(d) 通过硫酸氢盐基因组测序对 OCT4 和 NANOG 启动子进行甲基化分析。开圆和闭圆分别指示启动子区域中未甲基化的和甲基化的 CpGs。(e) 使用 EB 方法, 来自 HUVECs 的 hiPSC-0 细胞在体外可以有效分化为三个胚层中的细胞, 包括神经外胚层细胞 ( $\beta$  III 微管蛋白<sup>+</sup>), 中胚层细胞 (SMA<sup>+</sup>) 和内胚层细胞 (AFP<sup>+</sup>)。 (f) hiPSC-0 细胞可以在 SCID 小鼠中有效产生全畸胎瘤, 其包含分化的三个胚层中的细胞。图 4. 来自 AHEKs 的人 iPSC-0 细胞的表征。(a) 建立的来自成人角质形成细胞的 hiPSC-0 细胞表达典型的多能性标记物, 包括 NANOG, SOX2 和 SSEA-4。细胞核用 DAPI 染色。(b) 使用 EB 方法, 这些 hiPSC-0 细胞可以在体外有效分化为三个胚层中的细胞, 包括神经外胚层细胞 ( $\beta$  III 微管蛋白<sup>+</sup>), 中胚层细胞 (SMA<sup>+</sup>) 和内胚层细胞 (AFP<sup>+</sup>)。

[0048] 图 5. 来自 AFDCs 的人 iPSC-0 细胞的表征。(a) 建立的来自源自羊水的细胞的 hiPSC-0 细胞表达典型的多能性标记物, 包括 NANOG, SOX2 和 SSEA-4。细胞核用 DAPI 染色。(b) 使用 EB 方法, 这些 hiPSC-0 细胞可以在体外有效分化为三个胚层中的细胞, 包括神经外胚层细胞 ( $\beta$  III 微管蛋白<sup>+</sup>), 中胚层细胞 (SMA<sup>+</sup>), 和内胚层细胞 (AFP<sup>+</sup>)。

[0049] 图 6. 另外的 hiPSC 细胞系表达典型的多能性标记物。其他所建立的 hiPSC-0 细胞系表达典型的多能性标记物, 包括 NANOG 和 SSEA-4。细胞核用 DAPI 染色。

[0050] 图 7. hiPSC 细胞系的无饲养层培养物。hiPSC 被分到涂布有 Matrigel/ECM 的平板上化学成分确定的 hESC 培养基中, 如之前所报导的。这些 hiPSC 可以在无培养层环境中保持和扩增。ICC 显示多能性标记物 OCT4 和 SSEA4 的表达。细胞核用 DAPI 染色。

[0051] 图 8. hiPSCs 的基因型分析。使用基因组 DNA 的 RT-PCR 分析显示仅 OCT4 转基因整合到 hiPSC-0 系 (hiPSC-0#1, hiPSC-0#3, hiPSC-0#21, hiPSC-0#26 和 hiPSC-0#31) 的基因组中。NHEKs (a) 和 HUVECs (b) 用作阴性对照, 而载体用作阳性对照。

[0052] 图 9. OCT4 转基因在 hiPSCs 中的整合。用 EcoRI 消化基因组 DNA (10  $\mu$ g) 并与 OCT4cDNA 探针 (pSin-EF2-OCT4-Pur 的 EcoRI/SpeI 片段) 杂交。检测到多个转基因整合。

[0053] 图 10. hiPSC 细胞系的核型分析。在第 15 次传代后 hiPSC-0#1 (a) 和 hiPSC-0#21 (b) 的中期展开显示正常的核型。

[0054] 图 11. PS48 通过促进朝向糖酵解的代谢转换增强重编程过程。(a) PS48 处理活化 PDK1 活性。在 PS48 (5  $\mu$ M) 或 UCN-01 (20nM) 处理后的 Akt (Thr-308) 的磷酸化的蛋白印迹分析。(b) PS48 增强 NHEKs 的重编程, 而 UCN-01 (PDK1 抑制剂) 或 2-脱氧-D-葡萄糖 (10mM) (2-DG, 糖酵解抑制剂) 抑制重编程过程。三种因子 (Klf, Sox 和 Oct) 转导的 NHEKs 以 100,000 个转导的细胞/孔的密度接种, 用化合物处理四周, 然后计数 TRA-1-81 阳性集落。(c) PS48 处理促进/激活向糖酵解的代谢转换, 而 UCN-01 或 2-DG 的处理抑制糖酵解。NHEKs 用 PS48、PS48 和 UCN-01 或者 PS48 和 2-DG 处理 8 天, 然后通过使用 Lactate Assay 试剂盒 (BioVision, Mountain View, CA, USA) 测量培养基中的乳酸盐生产量作为糖酵解的典型指标。(d) PS48 处理上调若干重要糖酵解基因 (包括 GLUT1, HK2, PFK1 和 LDHA) 的表达。(e) 已知的已经广泛用于调节线粒体呼吸, 糖酵解代谢或 HIF 活化的小分子也显示对重编程的对应的一致效果。转导有四种因子 (Klf, Sox, Myc 和 Oct) 的 HUVECs 以 20,000 个转导的细胞/孔的密度接种, 用代谢调节化合物处理三周, 并且计数 TRA-1-81 阳性集落。F2, 6P, 10mM 果糖 2,6-二磷酸; F6P, 10mM 果糖 6-磷酸; 6-AN, 10  $\mu$ M 6-氨基烟酰胺; OA, 10  $\mu$ M 草酸盐;

DNP, 1  $\mu$  M, 2,4-二硝基苯酚; NOG, 1  $\mu$  M N-草酰甘氨酸; QC, 1  $\mu$  M 槲皮素; 2-HA, 10  $\mu$  M 2-羟基戊二酸; NA, 10  $\mu$  M 烟酸; DMSO 用作对照。

[0055] 发明详述

[0056] I. 介绍

[0057] 本发明基于以下意外的发现, 即 3'-磷酸肌醇依赖性激酶-1 (PDK1) 激活剂极大地改善在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性的效率。因此, 本发明提供在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性的方法, 其中所述方法包括将非多能细胞与 PDK1 激活剂接触。

[0058] 本发明还基于以下意外的发现, 即本文所述的促进糖酵解代谢的化合物极大地改善在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性的效率。本发明中发现, 促进糖酵解代谢的化合物有助于从线粒体氧化 (主要由成人体细胞使用) 到糖酵解 (主要由胚胎干细胞 (ESCs) 使用) 的代谢重编程, 由此在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性。促进糖酵解的化合物或抑制或妨碍线粒体呼吸/氧化的化合物因此可用于在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性。此外, 发现, 促进糖酵解的上游 (例如, PDK1 通路, 低氧诱导因子通路, 葡萄糖摄取转运蛋白通路) 或下游 (例如, 脂肪酸合成, 脂质合成, 核苷酸合成, 和氨基酸合成) 的化合物可以用于在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性。因此, 本发明提供在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性的方法, 其中所述方法包括将非多能细胞与如本文所述的促进糖酵解代谢的一种或多种化合物接触。

[0059] 至今, 已经建立大量不同方法和方案用于将非多能哺乳动物细胞诱导为诱导的多能干细胞 (iPSCs)。据信, 本文所述的试剂可以与基本上任何方案结合使用以用于产生 iPSCs 并由此改善该方案的效率。因此, 本发明提供利用至少 PDK1 激活剂 (包括但不限于变构的 PDK1 激活剂), 与任何方案结合来诱导非多能细胞从而产生 iPSCs。在其他实施方案中, 本发明提供利用至少促进糖酵解代谢的化合物与任何方案结合来孵育非多能细胞从而产生 iPSCs。

[0060] 当用于本文中时, 关于非多能细胞诱导为诱导的多能干细胞的 "诱导效率", 是指在足以诱导多能干细胞的条件下, 在规定的时间内可以转化为 iPSCs 的非多能细胞的数目, 或将规定数目的非多能细胞转化为 iPSCs 所需的时间。iPSC 产生方案的效率的改善将取决于方案和本发明所用的试剂。在一些实施方案中, 与在不包括本发明的试剂 (例如, PDK1 激活剂, 例如, 变构的 PDK1 激活剂, 或促进糖酵解代谢的化合物, 例如, PDK1 激活剂, 糖酵解激活剂, 糖酵解底物, 糖酵解中间体及其它们的代谢前体, 葡萄糖摄取转运蛋白激活剂, 线粒体呼吸调节剂, 如氧化磷酸化抑制剂, 以及低氧诱导因子激活剂) 的条件下的相同方案相比, 效率改善了至少 10%, 20%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300% 或更多。在一些实施方案中, 关于在特定的时间内产生的 iPSCs 的数目的改善来测量效率 (例如, 通过比较在包括引入本发明的一种或多种试剂的条件下在规定的时间内由非多能细胞产生的 iPSCs 的数目和在不包括引入本发明的一种或多种试剂的条件下在规定的时间内由非多能细胞产生的 iPSCs 的数目)。在一些实施方案中, 关于产生 iPSCs 的速度的改善来测量效率 (例如, 通过比较在包括引入本发明的一种或多种试剂的条件下由非多能细胞产生规定数目的 iPSCs 所需的时间长度和在不包括引入本发明的一种或多种试剂的条件下由非多能细胞产生规定数目的 iPSCs 所需的时间长度)。在一些实施方案中, 在包括用 Oct4 和 Klf4 转导非多能细胞 (例如, 正常人表皮角质形成细胞) 然后在存在或不存在本发明的一种或



多种试剂（例如，PDK1 激活剂）的情况下培养转导的细胞的条件下测量诱导效率，如在以下实施例部分所述。由非多能细胞诱导 iPSCs 可以根据本领域中已知的任何方法测量，所述方法包括但不限于标记物分析（例如，使用多能性标记物 Tra-1-81 和 / 或 OCT4）。

[0061] 根据本发明的方法，特殊的、依赖于环境的处理方式可以改善重编程效率。在一些实施方案中，特定处理方式的有效性可以取决于细胞类型、细胞传代数和使用的外源转录因子。例如，在一些实施方案中，与转导有四种外源转录因子或与四种外源转录因子接触的重编程细胞相比，当重编程细胞转导有或接触少于四种外源转录因子（即，一种、两种或三种外源转录因子）时，可以观察到通过特定处理方式的重编程效率的更显著的改善。

[0062] 通常，重编程人细胞所需的时间（例如，6-8 周）比重编程小鼠细胞所需的时间（例如，约 2 周）显著更长。在一些实施方案中，如与小鼠细胞相比，当重编程人细胞时，特定处理方式的效果可能更加显著。因此，当在重编程中使用相对较长的周期（例如，至少 3, 4, 5, 6 或更多周）时，可以使用处理方式，例如使用表观遗传修饰剂的处理方式，以改善重编程效率。

[0063] 本发明的发明人已经发现表观遗传修饰剂可以改善重编程效率。如本文中所定义的，术语“表观遗传修饰剂”是指甲基化修饰剂（即，将甲基化改变引入 DNA 或组蛋白的试剂）和 / 或乙酰化修饰剂（即，将乙酰化改变引入 DNA 或组蛋白的试剂）。在一些实施方案中，甲基化修饰剂是 DNA 甲基化抑制剂（例如，DNA 甲基转移酶 (DNMT) 抑制剂如 RG108），组蛋白甲基化抑制剂和 / 或组蛋白去甲基化抑制剂。在一些实施方案中，乙酰化修饰剂是组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂（例如，丙戊酸 (VPA)，丁酸钠 (NaB)，曲古他汀 A (TSA)，或辛二酰苯胺异羟肟酸 (SAHA)，组蛋白乙酰转移酶 (HAT) 抑制剂，组蛋白脱乙酰酶和组蛋白乙酰转移酶。在一些实施方案中，表观遗传修饰剂是抑制甲基转移酶或去甲基酶的试剂或活化甲基转移酶或去甲基酶的试剂。在一些实施方案中，表观遗传修饰剂是抑制组蛋白 H3K9 甲基化或促进 H3K9 去甲基化的试剂，例如，G9a 组蛋白甲基转移酶如 BIX01294。

[0064] 然而，一些表观遗传修饰剂也可以诱导细胞分化。因此，在本发明的一些实施方案中，表观遗传修饰剂仅在处理的早期阶段使用，例如，在头 1、2、3 或 4 周，在处理周期的前半、前 1/3、前四分之一或前 1/5。通过在处理的后期阶段省去表观遗传修饰剂，例如，在后 1、2、3 或 4 周，在处理周期的后半、后 1/3、后四分之一或后 1/5，通过这些表观遗传修饰剂诱导细胞分化的副作用可以至少部分避免。

[0065] 备选地，可以使用不诱导分化或者仅最小化地诱导分化的表观遗传修饰剂。例如，当在处理方式中使用 HDAC 抑制剂时，使用不诱导分化或仅最小化地诱导分化的 HDAC 抑制剂，例如，丁酸钠。

[0066] 在本发明中进一步发现，使用 MEK 抑制剂的处理方式可以改善重编程效率。MEK 抑制剂还支持诱导的多能细胞的细胞自更新。然而，一些 MEK 抑制剂可以抑制细胞增殖。因此，在本发明的一些实施方案中，MEK 抑制剂仅在处理的后期阶段使用，例如，在后 1、2、3 或 4 周，在处理周期的后半、后 1/3、后四分之一或后 1/5。通过在处理的早期阶段（例如，在头 1、2、3 或 4 周，在处理周期的前半、前 1/3、前四分之一或前 1/5）省去 MEK 抑制剂，细胞增殖在早期阶段中不被抑制。例如，多能性可以通过以下方式诱导：在较早阶段将非多能哺乳动物细胞与 PDK1 激活剂或与促进糖酵解代谢的化合物（例如，PDK1 激活剂）在不存在 MEK 抑制剂的情况下接触，之后在后期阶段将非多能细胞与 PDK1 激活剂或促进糖酵解代谢

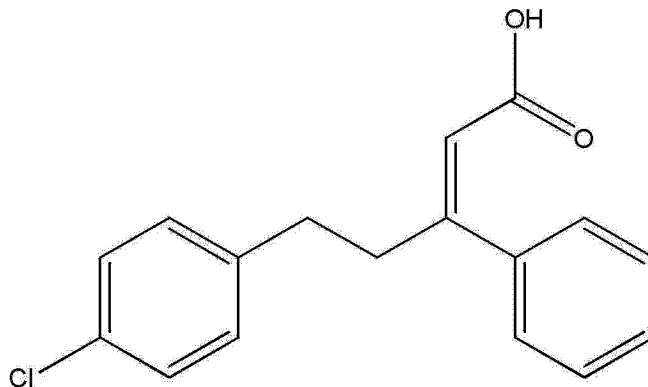
的化合物（例如，PDK1 激活剂）以及 MEK 抑制剂接触。在一些实施方案中，诱导多能性的方法包括在早期阶段将非多能细胞与 PDK1 激活剂或促进糖酵解代谢的化合物（例如，PDK1 激活剂）、TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂和组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂接触，之后在后期阶段将非多能细胞与 PDK1 激活剂或促进糖酵解代谢的化合物（例如，PDK1 激活剂）、TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂、组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂和 MEK 抑制剂接触。

#### [0067] II. PDK1 激活剂

[0068] 3'-磷酸肌醇依赖性激酶 -1 或 "PDK1" 是与 AKT/PKB 和包括 PKC、S6K、SGK 在内的许多其他 AGC 激酶的活化相关的主要激酶。PDK1 的重要作用存在于由若干生长因子和激素活化的信号传导通路如胰岛素信号传导中。PDK1 的结构可以划分为两个结构域；激酶结构域或者催化结构域以及 PH 结构域。PH 结构域主要在 PDK1 与磷脂酰肌醇 (3,4)-二磷酸和磷脂酰肌醇 (3,4,5)-三磷酸的相互作用中起作用，这在包括 AKT 在内的一些膜相关 PDK1 底物的定位和活化中是重要的。激酶结构域具有三个配体结合位点；底物结合位点，ATP 结合位点，和 PIF 结合口袋。包括 S6K 和蛋白激酶 C 在内的若干 PDK1 底物需要在该 PIF 结合口袋处结合。PDK1 的小分子变构激活剂显示选择性地抑制需要对接位点相互作用的底物的活化。这些化合物不结合到活性位点并且允许 PDK1 活化不需要对接位点相互作用的其他底物。PDK1 具有组成型活性，并且目前没有已知的 PDK1 的抑制蛋白。据信 PDK1 的主要效应器 AKT 的活化需要激酶和 PDK1 的 PH 结构域的合适定向以及 AKT 在膜处。依赖磷酸肌醇的激酶 -1 已经显示与以下各项相互作用：SGK, PRKACA, 钠-氢交换调节辅助因子 2, PRKCD, 蛋白激酶 M  $\zeta$  (PKMzeta), PKN2, PRKCI, 蛋白激酶 N1, YWHAH 和 AKT1。

[0069] 示例性的 PDK1 激活剂包括鞘氨醇 (King 等, Journal of Biological Chemistry, 275:18108-18113, 2000)。示例性的 PDK1 的变构激活剂包括 PS48 ((Z)-5-(4-氯苯基)-3-苯基戊-2-烯酸), PS08 ((Z)-5-(4-溴-2-氟苯基)-3-苯基戊-2-烯酸) (Hindie 等, Nature Chemical Biology, 5:758-764, 2009; Huse&Kuriyan, Cell 109:275-282, 2002; Johnson&Lewis, Chem. Rev. 101:2209-2242, 2001), 和化合物 1 (2-(3-(4-氯苯基)-3-氧代-1-苯基丙基硫代)乙酸) (Engel 等, EMBO J. 25:5469-5480, 2006); 3,5-二苯基戊-2-烯酸如化合物 12Z 和化合物 13Z (12Z: 2-(3-(4-氯苯基)-3-氧代-1-苯基丙基硫代)乙酸, (Z)-5-(萘-2-基)-3-苯基戊-2-烯酸; 13Z: (Z)-5-(1H-吡啶-3-基)-3-苯基戊-2-烯酸 (Stroba 等, J. Med. Chem. 52, 4683-4693 (2009))。PS48 具有下式：

[0070]



PS48

[0071] 如在实施方案中所示，将 PDK1 激活剂包括在细胞重编程中可以在单独使用时极

大地增加效率并且当与 HDAC 抑制剂结合使用时导致甚至进一步的效率提高。另外的抑制剂,包括但不限于 ALK5 抑制剂和 / 或 Mek 抑制剂,如在实施例所示,也可以包括在重编程中,尤其当在重编程期间少于四个转录因子 (Oct4, Klf4, Sox2 和 c-Myc) 引入细胞中时。

### [0072] III. 促进糖酵解代谢的化合物

[0073] 如在本文中所定义,代谢调节化合物是指调节(例如,促进或抑制)碳水化合物或其他分子代谢的化合物。代谢调节化合物包括促进糖酵解代谢的化合物。如在本文中所定义,促进糖酵解代谢的化合物是指有助于从线粒体氧化(主要由成人体细胞细胞)到糖酵解(主要由 ESCs 使用)的细胞代谢重编程的化合物。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是促进糖酵解的化合物或促进糖酵解的过程上游(例如, PDK1 通路,低氧诱导因子通路,葡萄糖摄取转运蛋白通路)的化合物。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是抑制或妨碍线粒体呼吸的化合物。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是促进糖酵解的过程下游(例如,脂肪酸合成,脂质合成,核苷酸合成和氨基酸合成)的化合物。促进糖酵解代谢的化合物的实例包括 PDK1 激活剂,糖酵解激活剂,糖酵解底物,糖酵解中间体及其代谢前体,葡萄糖摄取转运蛋白激活剂,线粒体呼吸调节剂如氧化磷酸化抑制剂,和低氧诱导因子激活剂。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物不是单糖(例如,细胞培养基中通常使用的单糖)。单糖的实例包括醛糖如 D-葡萄糖, D-甘露糖和 D-半乳糖,以及酮糖如 D-果糖。

#### [0074] 1. 糖酵解激活剂

[0075] 糖酵解激活剂(例如,糖酵解通路的激活剂)在本领域中是已知的。与糖酵解通路相关的酶在本领域中是已知的并且包括己糖激酶,葡糖激酶,磷酸葡糖异构酶,磷酸果糖激酶,醛缩酶,磷酸丙糖异构酶,甘油醛 3-磷酸脱氢酶,磷酸甘油酸激酶,磷酸甘油变位酶,烯醇化酶,丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶。在一些实施方案中,糖酵解激活剂(例如,糖酵解通路的激活剂)是与糖酵解通路相关的酶的激活剂。在一些实施方案中,糖酵解激活剂是与糖酵解通路唯一相关的三种特定酶(己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶)中的一种的激活剂。

[0076] 己糖激酶激活剂的实例包括磷酸盐、柠檬酸盐、D-苹果酸盐、3-磷酸甘油酸盐、儿茶酚胺和儿茶酚胺衍生物。在一些实施方案中,己糖激酶激活剂是变构激活剂。在一些实施方案中,己糖激酶激活剂不包括磷酸盐或柠檬酸盐。

[0077] 葡糖激酶激活剂的实例包括 GKA1(6-[(3-异丁氧基-5-异丙氧基苯甲酰)氨基]烟酸; Brocklehurst 等, Diabetes53 :535-541, 2004), GKA2(5-({3-异丙氧基-5-[2-(3-噻吩基)乙氧基]苯甲酰}氨基)-1,3,4-噻二唑-2-羧酸; Brocklehurst 等, Diabetes53 :535-541, 2004), R0-28-1675(Grimby 等, Science301 :370-373, 2003), 和化合物 A(N-噻唑-2-基-2-氨基-4-氟-5-(1-甲基咪唑-2-基)硫代苯甲酰胺; Kamata 等, Structure12, 429-438, 2004), LY2121260(2-(S)-环己基-1-(R)-(4-甲烷磺酰苯基)-环丙烷羧酸噻唑-2-基酰胺; Efanov 等, Endocrinology, 146 :3696-3701, 2005)。在一些实施方案中,葡糖激酶激活剂是变构激活剂。另外的葡糖激酶激活剂描述于 W000/058293、W001/44216、W001/83465、W001/83478、W001/85706、W001/85707 和 W002/08209、W007/075847、W007/061923、W007/053345、W007/104034、W007/089512、W008/079787、W008/111473、W009/106203、W009/140624、W009/140624、W008/079787、W002/046173、

W007/006814、W007/006760、W006/058923、W002/048106、W007/125103、W007/125105、W008/012227、W008/074694、W008/078674、W008/084043、W008/084044、W009/127544、W009/127546、W007/125103、W007/125105、W002/014312、W004/063179、W007/006761、W007/031739、W008/091770、W008/116107、W008/118718、W009/083553、W004/052869、W005/123132、W004/072066、W007/117381、W007/115967、W008/005964、W008/154563、W009/022179、W009/046784、W008/005964、W0/10/080333、W0/03/095438、W0/06/016194、W0/05/066145、W0/07/115968、W0/07/143434、W0/08/005914、W0/08/149382、W0/09/018065、W0/09/047798、W0/09/046802、W0/10/029461、W0/08/005914、W0/08/149382、W0/07/143434、W0/10/103438、W0/03/047626、W0/05/095418、W0/08/104994、W0/09/082152、W0/09/082152、W0/05/049019、W0/07/048717、W0/09/042435和 W0/09/042435 中。

[0078] 磷酸果糖激酶（或果糖-6-P 激酶）激活剂的实例包括果糖 2,6-二磷酸。

[0079] 丙酮酸激酶激活剂的实例包括木酮糖 5-P, 神经酰胺, A1 腺苷受体的激动剂如 N-6-环戊基腺苷。另外的丙酮酸激酶激活剂在 W010/042867, W010/042867, W099/048490 和 W009/025781 中公开。

[0080] 磷酸葡萄糖异构酶激活剂, 醛缩酶激活剂, 甘油醛 3P 脱氢酶激活剂, 磷酸丙糖异构酶激活剂, 磷酸甘油酸激酶, 烯醇化酶, 磷酸甘油酸变位酶和乳酸脱氢酶的实例在本领域中是已知的。

[0081] 2. 糖酵解底物

[0082] 糖酵解底物的实例包括葡萄糖 6-磷酸, 果糖 6-磷酸, 果糖 1,6-二磷酸, 甘油醛 3-磷酸, 1,3-二磷酸甘油酸, 3-磷酸甘油酸, 2-磷酸甘油酸和磷酸烯醇丙酮酸。在一些实施方案中, 促进糖酵解代谢的化合物不是单糖（例如, 葡萄糖）。

[0083] 3. 糖酵解中间体及其代谢前体

[0084] 糖酵解中间体都不同地被用于其他重要分子如脂肪酸, 脂质, 核苷酸和氨基酸的生物合成。因此, 如在本文中所定义, 促进糖酵解代谢的化合物包括促进糖酵解的下游过程（例如, 脂肪酸合成, 脂质合成, 核苷酸合成和氨基酸合成）的化合物。在一些实施方案中, 促进糖酵解代谢的化合物包括糖酵解中间体, 例如, 在这些下游生物合成通路中使用的糖酵解中间体。在一些实施方案中, 促进糖酵解代谢的化合物包括糖酵解中间体的代谢前体。如在本文中所定义, 术语“代谢前体”是指例如在细胞、组织或人体中代谢转化为糖酵解中间体的化合物。

[0085] 糖酵解中间体的实例包括葡萄糖 6-磷酸, 果糖 6-磷酸, 果糖 1,6-二磷酸, 二羟丙酮磷酸, 甘油醛 3-磷酸, 1,3-双磷酸甘油酸, 3-磷酸甘油酸, 2-磷酸甘油酸, 磷酸烯醇丙酮酸, 草酰乙酸盐, 丙酮酸盐及其代谢前体。在一些实施方案中, 糖酵解中间体是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)。在一些实施方案中, 促进糖酵解代谢的化合物是 NADH 的代谢前体。在一些实施方案中, 促进糖酵解代谢的化合物是烟酸或烟酰胺。

[0086] 4. 葡萄糖摄取转运蛋白激活剂

[0087] 如在本文中所定义, 术语“葡萄糖摄取转运蛋白激活剂”是指刺激或以其他方式促进葡萄糖摄取转运蛋白的表达或活性的化合物。如在本文中所定义, 术语“葡萄糖转运蛋白”是指将化合物（葡萄糖, 葡萄糖类似物, 其他糖如果糖或肌醇, 或非糖类如抗坏血

酸) 运输通过细胞膜的蛋白质, 并且基于结构相似性 (例如, 与其他葡萄糖转运蛋白的同源性) 其是葡萄糖转运蛋白“家族”成员。如在本文中所定义, 葡萄糖转运蛋白还包括具有不同于葡萄糖的初级底物的转运蛋白。例如, 葡萄糖转运蛋白 GLUTS 主要是果糖的转运蛋白, 并且据报道以低的亲和性转运葡萄糖本身。相似地, 葡萄糖转运蛋白 HMIT 的初级底物是肌醇 (糖醇)。当用于本文中时, 除非另外说明, 术语“葡萄糖转运蛋白”包括果糖和肌醇的转运蛋白。葡萄糖摄取转运蛋白的实例包括选自 GLUT1-12、HMIT 和 SGLT1-6 转运蛋白的组的葡萄糖转运蛋白。

[0088] 葡萄糖摄取转运蛋白激活剂的实例包括胰岛素, 松醇 (参见, 例如, WO/2000/071111), 8-溴-环 AMP (参见, 例如, Ogura 等, Journal of Endocrinology, 164 : 171-178, 2000), 花生四烯酸 (Fong 等, Cellular Signalling, 8 : 179-183, 1996), 佛波酯如 12-O-四-癸酰基-佛波醇 13-乙酸酯 (参见, 例如, Molecular Brain Research, 15 : 221-226, 1992)。

[0089] 5. 线粒体呼吸调节剂 (氧化磷酸化抑制剂)

[0090] 如在本文中所定义, 术语“线粒体呼吸”或“线粒体氧化”是指线粒体内部底物分子 (例如, 糖、有机酸、丙酮酸盐等) 的氧化。在一些实施方案中, 促进糖酵解代谢的化合物是线粒体呼吸调节剂。能够影响线粒体呼吸 / 氧化程度的化合物本文中通常称为“线粒体呼吸调节剂”或其他类似的术语。在一些实施方案中, 可用于本发明的方法的线粒体呼吸调节剂是抑制或妨碍线粒体呼吸或线粒体氧化的化合物。在一些实施方案中, 可用于本发明的方法的线粒体呼吸调节剂是氧化磷酸化抑制剂。

[0091] 本发明的氧化磷酸化抑制剂可以是一种或多种氧化磷酸化酶的任何抑制剂或氧化磷酸化解偶联剂。氧化磷酸化酶在本领域中是已知的并且包括酶复合物 I (NADH 辅酶 Q 还原酶), II (琥珀酸-辅酶 Q 还原酶), III (辅酶 Q 细胞色素 C 还原酶), IV (细胞色素氧化酶) 和 V (F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>, ATP 合成酶)。

[0092] 酶复合物 I 的抑制剂是本领域中已知的任一种并且可以包括, 但不限于以下任一种: 三苯甲基硫代丙氨酸 (tritylthioalanine), 洋红霉素, 和哌嗪二酮, 鱼藤酮, 戊巴比妥, 1-甲基-4-苯基吡啶鎓 (MPP<sup>+</sup>), 百草枯 (paraquat), 亚甲基蓝, 和铁氰化物 (后 2 种是电子受体)。酶复合物 II 的抑制剂是本领域中已知的任一种。辅酶 Q 的抑制剂是本领域中已知的任一种。酶复合物 III 的抑制剂是本领域中已知的任一种并且可以包括, 但不限于: 黏硫菌素, 抗霉素 A, 泛半醌, 细胞色素 C, 4,6-二氨基三嗪衍生物, 甲氨蝶呤 (methotrexate) 或电子受体如吩嗪甲基硫酸酯和 2,6-二氯苯酚-靛酚。酶复合物 IV 的抑制剂是本领域中已知的任一种并且可以包括, 但不限于氰化物, 硫化氢, 叠氮化物, 甲酸酯, 磷, 一氧化碳和电子受体铁氰化物。酶复合物 V 的抑制剂是本领域中已知的任一种并且可以包括, 但不限于 2-羟基戊二酸, VM-26 (4'-去甲-表鬼臼毒噻吩亚甲基糖苷), 三苯甲基硫代丙氨酸, 洋红霉素, 哌嗪二酮, 二硝基苯酚, 二硝甲酚, 2-羟基-3-烷基-1,4-萘醌, 诱凋亡菌素糖苷配基 (aglycone), 寡霉素, 奥萨霉素, 胞变霉素 (cytovaricin), 萘醌衍生物 (例如, 二氯烯丙基-散沫花醌和拉帕醇), 罗丹明, 罗丹明 123, 罗丹明 6G, 羰基氰化对三氟甲氧基苯胺, rothenone, 番红 O, 环己锡, DDT, 十氯酮, 砷酸盐, 五氯苯酚, 苄腈, 噻二唑除草剂, 水杨酸盐, 阳离子两亲药物 (胺碘酮 (amiodarone), 哌克昔林 (perhexiline)), 短杆菌肽, 卡西霉素, 五氯丁二烯基-半胱氨酸 (PCBD-cys), 和三氟羰基氰化苯胺 (FCCP)。氧化磷酸化的其他抑

制剂可以包括苍术苷, DDT, 游离脂肪酸, 溶血磷脂 (lysophospholipids), n- 乙基马来酰亚胺, mersanyl 和对苯醌。

[0093] 氧化磷酸化解偶联剂是指充当从电子传递的氧化磷酸化的解偶联剂的化合物。氧化磷酸化解偶联剂的实例包括, 但不限于, DNP, 5- 氯 -3- 叔丁基 -2' - 氯 -4' - 硝基水杨酰苯胺 (S-13), 2, 3, 4, 5, 6- 五氯酚钠 (PCP), 4, 5, 6, 7- 四氯 -2-( 三氟甲基 )-1H- 苯并咪唑 (TTFB), 氟灭酸 (2-[3-( 三氟甲基 ) 苯胺基 ] 苯甲酸), 3, 5- 二叔丁基 -4- 羟基 - 苯亚甲基丙二腈 (SF6847), 羰基氧化间氯苯胺 (CCCP), 羰基氧化对 [ 三氟甲氧基 ]- 苯胺 (FCCP), 和  $\alpha$ -( 苯胺基 ) 苯基乙腈衍生物. 苯基乙腈衍生物; 和弱酸, 包括: 弱酸性酚类, 苯并咪唑, N- 苯基邻氨基苯甲酸盐, 水杨酰苯胺, 苯胺, 水杨酸, 酰基二 - 硫代胍基甲酸盐, 香豆素, 和芳香胺。

#### [0094] 6. 低氧诱导因子激活剂

[0095] 低氧诱导因子通路的激活剂是本领域中已知的并且包括生物碱和其他氨基酸衍生物, HIF 天冬酰胺酰羟化酶 (抑制因子的 HIF 或 FIH) 和 HIF 脯氨酰羟化酶 (HPH 或 PHD) 的抑制剂, 糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) 的抑制剂, 氧化氮 (NO) 供体, 微管解聚剂 (MDA), 酚类化合物, 萜烯 / 类固醇, 和前列腺素 E2 (PGE2)。生物碱和其他氨基酸衍生物的实例包括去铁胺和去铁 - 铁螯合素 DFE722SM, 环吡酮胺 [ **Loprox®**, 6- 环己基 -1- 羟基 -4- 甲基 -2(1H)- 吡啶酮 2- 氨基乙醇 ], 和 8- 甲基 -pyridoxatin。糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) 的抑制剂的实例包括靛玉红, 靛玉红的衍生物如 5- 碘靛玉红 -3' - 肟和 5- 甲基靛玉红 -3' - 肟。氧化氮 (NO) 供体的实例包括 S- 亚硝基 -N- 乙酰基 -D, L- 青霉胺 (SNAP), 3-( 羟基 -1-(1- 甲基乙基) -2- 亚硝基胍基 )-1- 丙胺 (NOC5), 二氮烯 -1- 鎓 -1, 2- 二醇 (NOC-18), S- 亚硝基谷胱甘肽 (GSNO), 精胺 NONOate (NO 与天然产物精胺的复合物), 二乙胺 NONOate, 和二乙基酪胺 NONOate。微管解聚剂 (MDA) 的实例包括植物生物碱长春碱, 秋水仙素, 和合成的 MDA 如诺考达唑。酚类化合物的实例包括二苯甲酰甲烷 (DBM), 黄酮类槲皮素 (3, 3', 4', 5, 7- 五羟黄酮), (-)- 表儿茶素 -3- 五倍子酸盐 (ECG), 和 (-)- 表儿茶素 -3- 五倍子酸盐 (EGCG)。萜烯和类固醇的实例包括倍半萜 - 托酚酮 (例如, pycnidione, epolone A 和 epolone B), 4- 羟基雌二醇 (4-OHE2), 二氢睾酮, 甲基三烯甘油酯 (R1881), 和半萜酯佛波醇 12-0- 十四酸酯 13- 乙酸酯 (PMA, 也被称为 12-0- 十四烷酰佛波醇 13- 乙酸酯或 TPA)。

[0096] HIF 天冬酰胺酰羟化酶 (抑制因子的 HIF 或 FIH) 和 HIF 脯氨酰羟化酶 (HPH 或 PHD) 的抑制剂的实例包括 2- 酮戊二酸 (2OG) 的类似物如 N- 草酰甘氨酸 (5, NOG), NOG 的酯衍生物 (例如, DMOG (二甲基 - 草酰甘氨酸)), N-((3- 羟基 -6- 氯喹啉 -2- 基) 羰基) - 甘氨酸, 3- 羟基吡啶 -2- 羰基 - 甘氨酸, 3, 4- 二羟苯甲酸酯, 吡啶 -2, 5- 草酸酯, 吡啶 -2, 4- 草酸酯, N- 草酰 -2S- 丙氨酸, 2OG 的其他类似物, 如在 Mole 等, Bioorg Med Chem Lett. 13 : 2677-80, 2003 中描述的, 丙氨何普菌素和去丙氨酰丙氨何普菌素 (dealanylalahopcin), 去丙氨酰丙氨何普菌素类似物 3- 羰基亚甲基 N- 羟基琥珀酰亚胺, 3- 羰基 -N- 羟基吡咯烷酮, 1- 含羞草素 (L-Mim), 3, 4- 二羟基苯甲酸乙酯 (3, 4-DHB), 和 6- 氯 -3- 羟基喹啉 -2- 碳酸 -N- 羰基甲基胺 (S956711)。另外的 HIF 天冬酰胺酰羟化酶和 HIF 脯氨酰羟化酶抑制剂描述于, 例如, Ivan 等, Proc Natl Acad Sci USA 99 : 13459-13464, 2002, W003/049686, W003/080566, 和 W006/084210, W010/056767。

[0097] HIF 通路的其他激活剂包括离子螯合剂（例如，去铁胺，2,2'-吡啶基，1,10-邻二氮杂菲，Ca<sup>2+</sup> 螯合剂 BAPTA(1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸)，过度金属（例如，钴，镍，铬(VI)，和铜)，有机汞化合物汞撒利(mersaly1)，和 FG-0041(在结构上与 1,10-邻二氮杂菲相关的化合物)。

[0098] HIF 通路的其他激活剂包括上调 HIF-1 翻译的蛋白质。蛋白激酶 C(PKC) 提高 HIF-1 $\alpha$  转录的速率并且在磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K) 通路中起作用，这同样增强 HIF-1 $\alpha$  翻译。PKC 通路激活 S6 核糖体蛋白的表达，该蛋白特异性地识别 mRNA 转录产物如 HIF-1 $\alpha$ 。经由 S6 蛋白在正常氧含量条件中的磷酸化，HIF-1 $\alpha$  mRNA 翻译的速率可以被极大提高，从而有效地对抗该亚基的蛋白酶体降解的效果并且增加 HIF-1 复合物在细胞内的水平。PI3K 通路已经被鉴定为多种调节物（如脂多糖）的初级手段，影响 HIF-1 $\alpha$  在脉管平滑肌细胞和巨噬细胞中的活化(Dery 等, Int J Biochem Cell Bio. 37 :535-540, 2004 ;Page 等, J Biol Chem. 277 :48403-48409, 2002)。

[0099] 来源于巨噬细胞的肽 PR39 已经显示为通过降低其降解来稳定 HIF-1 $\alpha$ ，导致脉管结构在体外的加速形成和小鼠中增加的心肌脉管系统(Li 等, NatMed6 :49-55. 2000)。HIF-1 的直接诱导已经通过使用阻断 VHL 介导的降解的 ODDD 多肽的 N 端或 C 端来实现(Maranchie 等, Cancer Cell11 :247-255, 2002)。

[0100] HIF 通路激活剂还包括其他非缺氧生理刺激如生长因子，细胞因子，和激素。激活 HIF 通路的生长因子的实例包括胰岛素类生长因子(IGF)-1 和 IGF-2，IGF 结合蛋白(IGFBP)-2 和 IGFBP-3，EGF，碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)，和调蛋白。激活 HIF 通路的细胞因子的实例包括肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )，白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )，和 IL-1。激活 HIF 通路的激素的实例包括脉管激素血管紧张素 II 和凝血酶，甲状腺激素和卵泡刺激激素。其他生理因子如氧化还原蛋白硫氧还蛋白-1(Trx-1) 和氧化的低密度脂蛋白(oxLDL) 也可以诱导 HIF-1 $\alpha$  蛋白并激活 HIF-1。

#### [0101] 7. PDK1 激活剂

[0102] 在一些实施方案中，促进糖酵解代谢的化合物是 PDK1 激活剂。示例性的 PDK1 激活剂描述于本文之前的部分 II 中。

#### [0103] IV. HDAC 抑制剂

[0104] 示例性的 HDAC 抑制剂可以包括结合其显性阴性变体的抗体，以及靶向 HDAC 的 siRNA 和反义核酸。HDAC 抑制剂包括，但不限于，TSA(曲古他汀 A)(参见，例如，Adcock, British Journal of Pharmacology150 :829-831(2007))，VPA(丙戊酸)(参见，例如，Munster 等, Journal of Clinical Oncology25 :18S(2007) :1065)，丁酸钠(NaBu)(参见，例如，Han 等, Immunology Letters108 :143-150(2007))，SAHA(辛二酰苯胺异羟肟酸或伏林司他(vorinostat))(参见，例如，Kelly 等, Nature Clinical Practice Oncology2 :150-157(2005))，苯基丁酸钠盐(参见，例如，Gore 等, Cancer Research66 :6361-6369(2006))，缩肽(FR901228, FK228)(参见，例如，Zhu 等, Current Medicinal Chemistry3(3) :187-199(2003))，特拉孢星(trapoxin)(TPX)(参见，例如，Furumai 等, PNAS98(1) :87-92(2001))，含环氧肟酸的肽 1(CHAP1)(参见，Furumai, 同上)，MS-275(参见，例如，Carninci 等, W02008/126932, 其通过引用结合于此))，LBH589(参见，例如，Goh 等, W02008/108741, 其通过引用结合于此)和 PDX101(参见，Goh, 同上)。通常在整体水平，

多能细胞具有更多的组蛋白乙酰化,而分化的细胞具有较少的组蛋白乙酰化。组蛋白乙酰化也涉及组蛋白和 DNA 甲基化调节。在一些实施方案中,HDAC 抑制剂促进沉默的多能性基因的活化。

#### [0105] V. ALK5 抑制剂

[0106] TGF  $\beta$  受体 (例如, ALK5) 抑制剂可以包括与其显性阴性变体结合的抗体,以及抑制 TGF  $\beta$  受体 (例如, ALK5) 表达的反义核酸。示例性的 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂包括,但不限于, SB431542 (参见,例如, Inman 等, *Molecular Pharmacology* 62(1) : 65-74 (2002)), A-83-01, 也被称为 3-(6-甲基-2-吡啶基)-N-苯基-4-(4-喹啉基)-1H-吡唑-1-碳硫酰胺 (参见,例如, Tojo 等, *Cancer Science* 96(11) : 791-800 (2005)), 并且可以商购自例如, Toicris Bioscience) ; 2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶, Wnt3a/B10 (参见,例如, Dalton 等, WO2008/094597, 其通过引用结合于此), BMP4 (参见, Dalton, 同上), GW788388 (-{4-[3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]吡啶-2-基}-N-(四氢-2H-吡喃-4-基)苯甲酰胺) (参见,例如, Gellibert 等, *Journal of Medicinal Chemistry* 49(7) : 2210-2221 (2006)), SM16 (参见,例如, Suzuki 等, *Cancer Research* 67(5) : 2351-2359 (2007)), IN-1130 (3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)苯甲酰胺) (参见,例如, Kim 等, *Xenobiotica* 38(3) : 325-339 (2008)), GW6604 (2-苯基-4-(3-吡啶-2-基-1H-吡唑-4-基)吡啶) (参见,例如, de Gouville 等, *Drug News Perspective* 19(2) : 85-90 (2006)), SB-505124 (2-(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2-叔丁基-3H-咪唑-4-基)-6-甲基吡啶盐酸盐) (参见,例如, DaCosta 等, *Molecular Pharmacology* 65(3) : 744-752 (2004)) 和 嘧啶衍生物 (参见,例如, 列于 Stiefel 等, WO2008/006583 (通过引用结合于此) 中的那些), SU5416 ; 2-(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2-叔丁基-3H-咪唑-4-基)-6-甲基吡啶盐酸盐 (SB-505124) ; 乐地单抗 (lerdelimumb) (CAT-152) ; 美替木单抗 (metelimumab) (CAT-192) ; GC-1008 ; ID11 ; AP-12009 ; AP-11014 ; LY550410 ; LY580276 ; LY364947 ; LY2109761 ; SB-505124 ; SB-431542 ; SD-208 ; SM16 ; NPC-30345 ; Ki26894 ; SB-203580 ; SD-093 ; Gleevec ; 3,5,7,2',4' - 五羟黄酮 (Morin) ; 活化素 -M108A ; P144 ; 和可溶性 TBR2-Fc (参见,例如, Wrzesinski 等, *Clinical Cancer Research* 13(18) : 5262-5270 (2007) ; Kaminska 等, *Acta Biochimica Polonica* 52(2) : 329-337 (2005) ; 和 Chang 等, *Frontiers in Bioscience* 12 : 4393-4401 (2007))。此外,虽然 "ALK5 抑制剂" 不意在涵盖非特异性的激酶抑制剂,但是 "ALK5 抑制剂" 应当被理解为涵盖除了 ALK5 外还抑制 ALK4 和 / 或 ALK7 的抑制剂,如,例如, SB-431542 (参见,例如, Inman 等, *J. Mol. Pharmacol.* 62(1) : 65-74 (2002))。不意在限制本发明的范围,据信,ALK5 抑制剂影响间充质向上皮的转化 / 转变 (MET) 过程。TGF  $\beta$  / 活化素通路是上皮向间充质转变 (EMT) 驱动物。因此,抑制 TGF $\beta$  / 活化素通路可以促进 MET (即,重编程) 过程。

[0107] 考虑到本文中显示抑制 ALK5 的效果的数据,据信, TGF  $\beta$  / 活化素通路的抑制将具有相似效果。因此, TGF  $\beta$  / 活化素通路的任何抑制剂 (例如,上游或下游) 可以用于结合,或代替,本文中每一段所述的 ALK5 抑制剂。示例性的 TGF  $\beta$  / 活化素通路抑制剂包括但不限于: TGF  $\beta$  受体抑制剂, SMAD2/3 磷酸化抑制剂, SMAD2/3 与 SMAD4 相互作用抑制剂,以及 SMAD6 和 SMAD7 的激活剂 / 激动剂。此外,以下所述的分类仅出于组织目的,并且本领域技



术人员将知道化合物可以影响通路中的一点或多点,并且因此化合物可以作用于超过一种的所限定的分类。

[0108] SMAD2/3 磷酸化的抑制剂可以包括与其显性阴性变体结合的抗体,以及靶向 SMAD2 或 SMAD3 的反义核酸。抑制剂的具体实例包括 PD169316 ;SB203580 ;SB-431542 ;LY364947 ;A77-01 ;和 3,5,7,2',4' - 五羟黄酮 (Morin)。参见,例如,Wrzesinski,同上 ;Kaminska,同上 ;Shimanuki,等,Oncogene26 :3311-3320(2007) ;和 Kataoka 等,EP1992360,上述文献中的每个的内容都通过引用结合于此。

[0109] SMAD2/3 和 SMAD4 相互作用的抑制剂可以包括与其显性阴性变体结合的抗体,以及靶向 SMAD2, SMAD3 和 / 或 SMAD4 的反义核酸。SMAD2/3 和 SMAD4 的相互作用的抑制剂的具体实例包括,但不限于, Trx-SARA, Trx-xFoxH1b 和 Trx-Lef1。(参见,例如, Cui 等, Oncogene24 :3864-3874(2005) 以及 Zhao 等, Molecular Biology of the Cell,17 :3819-3831(2006).)

[0110] SMAD6 和 SMAD7 的激活剂 / 激动剂包括,但不限于,与其显性阴性变体结合的抗体,以及靶向 SMAD6 或 SMAD7 的反义核酸。抑制剂的具体实例包括,但不限于, smad7-as PTO- 寡核苷酸。参见,例如, Miyazono 等, US6534476, 和 Steinbrecher 等, US2005119203, 这两篇文献都通过引用结合于此。

#### [0111] VI. MEK 抑制剂

[0112] MEK 的抑制剂可以包括针对其显性阴性变体的抗体,以及抑制 MEK 表达的 siRNA 和反义核酸。MEK 抑制剂的具体实例包括,但不限于, PD0325901, (参见,例如, Rinehart, 等, Journal of Clinical Oncology22 :4456-4462(2004)), PD98059(可获得自,例如, Cell Signaling Technology), U0126(可获得自,例如, Cell Signaling Technology), SL327(可获得自,例如, Sigma-Aldrich), ARRY-162(可获得自,例如, Array Biopharma), PD184161(参见,例如, Klein 等, Neoplasia8 :1-8(2006)), PD184352(CI-1040)(参见,例如, Mattingly 等, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics316 :456-465(2006)), 舒尼替尼 (sunitinib)(参见,例如, Voss 等, US2008004287, 其通过引用结合于此), 索拉非尼 (sorafenib)(参见, Voss supra), 凡德他尼 (Vandetanib)(参见, Voss, 同上), 帕唑帕尼 (pazopanib)(参见,例如, Voss, 同上), 阿昔替尼 (Axitinib)(参见, Voss, 同上) 和 PTK787(参见, Voss, 同上)。

[0113] 目前,若干 MEK 抑制剂正在进行临床试验评估。CI-1040 已经在对癌症的 I 期和 II 期临床试验中得到评估(参见,例如, Rinehart 等, Journal of Clinical Oncology22(22) :4456-4462(2004))。临床试验中评估的其他 MEK 抑制剂包括 PD184352(参见,例如, English 等, Trends in Pharmaceutical Sciences23(1) :40-45(2002)), BAY43-9006(参见,例如, Chow 等, Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 46 :72-78(2001)), PD-325901(也被称为 PD0325901), GSK1120212, ARRY-438162, RDEA119, AZD6244(也被称为 ARRY-142886 或 ARRY-886), R05126766, XL518 和 AZD8330(也被称为 ARRY-704)。参见,例如, 来自国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 在万维网 (World Wide Web) 于 clinicaltrials.gov 的信息以及来自国立癌症研究院 (National Cancer Institute) 在万维网于 cancer.gov/clinicaltrials 的信息。

#### [0114] VII. 重编程

[0115] 至今,已经建立大量不同方法和方案用于诱导非多能哺乳动物细胞成为诱导的多能干细胞(iPSCs)。通过畸胎瘤形成和嵌合体分布判断,iPSC在形态学、增殖和多能性方面类似于ESCs。据信,PDK1激活剂或促进糖酵解代谢的化合物(例如,PDK1激活剂),任选结合HDAC抑制剂,并且任选ALK5抑制剂和任选MEK抑制剂,将基本上改进用于产生iPSCs的任何重编程方案。据信可以改进的重编程方案包括那些,其涉及诱导选自Oct多肽(包括但不限于Oct3/4),Sox多肽(包括但不限于Sox2),Klf多肽(包括但不限于Klf4)和/或Myc多肽(包括但不限于c-Myc)的一种或多种重编程转录因子。因此,在一些实施方案中,足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件包括这样的条件,其中选自Oct多肽(包括但不限于Oct3/4),Sox多肽(包括但不限于Sox2),Klf多肽(包括但不限于Klf4)和/或Myc多肽(包括但不限于c-Myc)的一种或多种重编程转录因子被引入到细胞中。如在实施例所述,PDK1激活剂已经显示利用少至一种重编程转录因子(例如,仅Oct4)改善重编程。因此,在一些实施方案中,足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件包括这样的条件,其中一种重编程转录因子(例如,仅Oct4)被引入到细胞中。

[0116] 在一些实施方案中,足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件包括将重编程因子引入到细胞,例如,通过从已经被引入到目标细胞中的重组表达盒表达,或者通过在外源重编程转录因子多肽存在的情况下孵育细胞以使多肽进入细胞。

[0117] 研究表明利用在ESCs中高表达的四种转录因子(Oct-3/4, Sox2, KLF4和c-Myc)逆转录病毒转导小鼠成纤维细胞产生诱导的多能干(iPS)细胞。参见,Takahashi, K.和Yamanaka, S. *Cell* (细胞)126,663-676(2006);Okita, K., Ichisaka, T.和Yamanaka, S. *Nature*448,313-317(2007);Wernig, M.等 *Nature*448,318-324(2007);Maherali, N.等 *Cell Stem Cell* (干细胞)1,55-70(2007);Meissner, A., Wernig, M. & Jaenisch, R. *Nature Biotechnol.* 25,1177-1181(2007);Takahashi, K.等 *Cell* (细胞)131,861-872(2007);Yu, J.等 *Science*318,1917-1920(2007);Nakagawa, M.等 *Nature Biotechnol.* 26,101-106(2007);Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P. & Jaenisch, R. *Cell Stem Cell.* (干细胞)2,10-12(2008)。研究还证明了利用在ESCs中高表达的转录因子的人体细胞的重编程:Hockemeyer等 *Cell Stem Cell.* (干细胞)11;3(3):346-53(2008);Lowry等 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(8):2883-8(2008);Park等 *Nature.* 10;451(7175):141-6(2008);Nakagawa等 *Nat Biotechnol.* Jan;26(1):101-6(2008);Takahashi等 *Cell.* (细胞)131(5):861-72(2007);和Yu等 *Science.* 318(5858):1917-20(2007)。据信这些方法可以通过包括PDK1激活剂或促进糖酵解代谢的更多的化合物中的一种(例如,PDK1激活剂)以及任选如本文所述的其他试剂而得到改善。

[0118] 为了解决靶细胞基因组承载整合的外源序列而带来的安全问题,已经进一步开发了多种改进的遗传方法并且可以根据本发明来使用。这些方法以潜在减小的风险产生iPS细胞,并且包括用以递送重编程基因的非整合的腺病毒(Stadtfield, M.等(2008) *Science*322,945-949),重编程质粒的瞬时转染(Okita, K.等(2008) *Science*322,949-953),piggyBac转座系统(Woltjen, K.等(2009) *Nature*458,766-770,Yusa等(2009) *Nat. Methods*6:363-369,Kaji, K.等(2009) *Nature*458,771-775),Cre-可切除病毒(Soldner, F.等(2009) *Cell*1136,964-977),和基于oriP/EBNA1的游离型表达系统(Yu,

J. 等 (2009) Science DOI:10.1126; 以上每篇文献的内容通过引用完整地结合于此。因此, 在一些实施方案中, 足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件包括这样的条件, 其中根据上述任一种方法通过非整合腺病毒, 重编程质粒的瞬时转染, piggyBac 转座系统, re- 可切除病毒 (Soldner, F. 等 (2009) Cell (细胞) 136, 964-977), 和 / 或基于 oriP/EBNA1 的游离型表达系统来递送重编程因子。在一些实施方案中, 如上所述的 PDK1 激活剂或促进糖酵解代谢的更多的化合物中的一种 (例如, PDK1 激活剂) 和任选其他试剂在任何上述方法与细胞一起孵育。

[0119] 如上所述, 重编程可以包括在一种或多种蛋白质的存在下在允许蛋白质引入到细胞中的条件下培养靶细胞。参见, 例如, Zhou H 等, Cell Stem Cell. 2009 May 8; 4(5):381-4; WO/2009/117439。可以通过不涉及引入编码多肽的多核苷酸的多种不同方法来将外源多肽 (即, 自细胞外部提供和 / 或不由细胞产生的蛋白质) 引入到细胞中。在一些实施方案中, 足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件包括将一种或多种外源蛋白引入到细胞中, 每种外源蛋白包括目的转录因子多肽, 所述目的转录因子多肽与使转录因子进入细胞 (并且在一些实施方案中是细胞核) 的能力增强的多肽连接 (例如, 作为融合蛋白连接或者不同地共价或非共价连接)。

[0120] 增强跨膜转运的多肽序列的实例包括, 但不限于, 果蝇同源异型蛋白触角足转录蛋白 (Drosophila homeoprotein antennapedia transcription protein) (AntHD) (Joliot 等, New Biol. 3:1121-34, 1991; Joliot 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:1864-8, 1991; Le Roux 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:9120-4, 1993), 单纯疱疹病毒结构蛋白 VP22 (Elliott 和 O' Hare, Cell (细胞) 88:223-33, 1997); HIV-1 转录激活剂 TAT 蛋白 (Green 和 Loewenstein, Cell (细胞) 55:1179-1188, 1988; Frankel 和 Pabo, Cell (细胞) 55:1289-1193, 1988); Kaposi FGF 信号序列 (kFGF); 蛋白转导结构域 -4 (PTD4); Penetratin, M918, Transportan-10; 核定位序列序列, PEP-I 肽; 两性分子肽 (例如, MPG 肽); 递送增强转运蛋白, 如在美国专利号 6, 730, 293 中所述的 (包括但不限于包含至少 5-25 个以上连续的精氨酸或者在 30、40 或 50 个氨基酸的连续组中包含 5-25 个以上的精氨酸的肽序列; 包括但不限于具有足够的 (例如, 至少 5 个) 胍基或脒基部分的肽); 以及可商购的 Penetratin™1 肽, 以及可以从法国巴黎的 Daitos S. A. 获得的 Vectocell® 平台的 Daitos Peptide Vectors ("DPVs")。同样参见, WO/2005/084158 和 WO/2007/123667 以及其中描述的其他转运蛋白。不仅这些蛋白可以通过质膜, 而且其他蛋白 (如本文所述的转录因子) 的附着, 也足以刺激这些复合物的细胞摄取。之前已经描述了能够介导相关分子向细胞中的引入的多种多肽并且其可以适用于本发明。参见, 例如, Langel (2002) Cell Penetrating Peptides (细胞穿透肽) CRC Press, Pharmacology and Toxicology Series (药理学和毒理学系列)。

[0121] 增强跨膜转运的示例性多肽序列包括:

[0122] VP22: GSPPTAPTRSKTPAQLGLARKLHFSTAPPNPDPWTPRVAGFNKRVRFRFSPQTARRATTTTR I; kFGF: AGSGGAVALLPVLLALLAPGGGEFA; PTD4: AGSGGYARAAARQARAGGEFA; PENETRATIN: RQIKIWFQGRMKWKK; TAT: YGRKKRRQRRR; M918: MVTVLFRRLRIRRACGPPRVRV; TRANSPORTAN-10: AGYLLGKIGLKALAALAKKIL。

[0123] 在一些实施方案中, 增强跨膜转运的多肽是包含至少 5 个以上连续或非连续精氨

酸的肽序列（例如，8-精氨酸肽）。在一些实施方案中，增强跨膜转运的多肽是包含至少 7 个以上连续或非连续精氨酸的肽序列。例如，增强跨膜转运的多肽是包含 11 个连续精氨酸的肽序列，例如，ESGGGGSPGRRRRRRRRRRR。如上所述，转运增强序列中的精氨酸不需要都是连续的。在一些实施方案中，多精氨酸（例如，连续或非连续的）区域至少为 5, 8, 10, 12, 15, 20 以上个氨基酸长，并且具有至少例如，40%，50%，60%，70%，80%，90% 以上的精氨酸。

[0124] 在一些实施方案中，足以将细胞诱导成为多能干细胞的条件包括这样的条件，其中一种或多种外源多肽，例如，Oct 多肽（包括但不限于 Oct3/4），Sox 多肽（包括但不限于 Sox2），Klf 多肽（包括但不限于 Klf4）和 / 或 Myc 多肽（包括但不限于 c-Myc），通过常规方法如脂质转染，电穿孔，磷酸钙沉淀，粒子轰击和 / 或微注射引入到细胞中，或者可以通过蛋白质递送试剂引入到细胞中。例如，外源多肽可以通过共价或非共价连接的脂质（例如通过共价连接的十四酰基团）引入到细胞中。在一些实施方案中，用于脂质转染的脂质任选被排斥在细胞递送模块外。在一些实施方案中，本文所述的转录因子多肽作为脂质体的部分或脂质混合物 (lipid cocktail)（如可商购的 Eugene6 和 Lipofectamine）外源引入。在另外的备选方案中，转录因子蛋白可以被微注射或通过其他方式直接引入到靶细胞中。在一些实施方案中，使用 Profect 蛋白递送试剂，例如，Profect-P1 和 Profect-P2 (Targeting Systems, El Cajon, CA)，或者使用 **Pro-Ject®** 转染试剂 (Pierce, Rockford IL, USA) 将转录因子多肽递送到细胞中。在一些实施方案中，使用单层纳米管 (SWNT) 将转录因子多肽递送到细胞中。

[0125] 如在 WO/2009/117439 的实施例中所所述，利用该发明的转录因子多肽孵育细胞的周期延长可能对细胞是有毒性的。因此，在本发明的一些实施方案中，足以诱导非多能哺乳动物细胞成为多能干细胞的条件包括孵育 PDK1 激活剂或促进糖酵解代谢的更多的化合物中的一种（例如，PDK1 激活剂）和任选 HDAC 抑制剂，ALK5 抑制剂和 / 或 Mek 抑制剂，以及间歇地用 Oct 多肽（包括但不限于 Oct3/4），Sox 多肽（包括但不限于 Sox2），Klf 多肽（包括但不限于 Klf4）和 / 或 Myc 多肽（包括但不限于 c-Myc）中的一种或多种孵育非多能哺乳动物细胞，并且具有插入周期，其中在不存在一种或多种多肽的情况下孵育细胞。在一些实施方案中，使用和不使用多肽进行孵育的循环可以重复 2, 3, 4, 5, 6 或更多次并且进行足够长的时间（即，使用以及不使用蛋白质进行孵育）从而实现多能细胞的开发。

[0126] 在编程转录因子（例如，经由表达盒或作为蛋白质递送的）的递送前、同时或之后，多种试剂（例如，PDK1 激活剂或促进糖酵解代谢的化合物，HDAC 抑制剂，TGF  $\beta$  受体 / ALK5 抑制剂，MEK/ERK 通路抑制剂，和 / 或 Rho GTPase/ROCK 抑制剂等）可以与非多能细胞接触。为方便起见，递送重编程因子的日期被指定为“第 1 天”。在一些实施方案中，抑制剂在约第 3-7 天集合地（即，作为“混合物 (cocktail)”）与细胞接触并且持续 7-14 天。备选地，在一些实施方案中，该混合物在第 0 天（即，预编程因子前一天）与细胞接触并孵育达约 14-30 天。

[0127] 目的蛋白所引入到的细胞可以是哺乳动物细胞。所述细胞可以是人或非人（例如，灵长类，大鼠，小鼠，兔，牛，狗，猫，猪等）的。所述细胞可以是，例如，在培养物中或在组织、液体等中和 / 或来自有机体或在有机体中。可以向多能性诱导的细胞包括，但不限于，角质形成细胞，毛囊细胞，HUVEC（人脐静脉内皮细胞），脐带血细胞，神经祖细胞和成纤维

细胞。

[0128] 在一些实施方案中,小分子可以改善产生多能细胞(例如,iPS细胞)的方法的效率。例如,改善的效率可以显示为加快产生这样多能细胞的时间(例如,与不使用小分子的相似或相同方法相比,将开发多能细胞的时间缩短至少一天)。备选地,或相结合地,小分子可以增加通过特定方法所产生的多能细胞的数目(例如,与不使用小分子的相似或相同方法相比,在给定的时间内,将数目增加至少10%,30%,50%,100%,200%,500%等)。

[0129] 任选地,或此外,小分子可以“补充”或替代通常不同地被认为是产生多能细胞所必须的这些蛋白质中的一种的表达。通过将细胞与在功能上替代转录因子中的一种的试剂接触,可能的是产生这样的多能细胞,所述多能细胞具有除了被所述试剂替代或补充的转录因子外的所有以上列出的转录因子。

[0130] VIII. 转化

[0131] 本发明采用重组遗传学领域中的常规技术。公开了本发明中所用一般方法的基础文本包括Sambrook等,Molecular Cloning,A Laboratory Manual(分子克隆,实验室手册)(第3版,2001);Kriegler, Gene Transfer and Expression:A Laboratory Manual(基因转移和表达:实验室手册)(1990);和Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学方案)(Ausubel等编辑,1994)。在一些实施方案中,用于表达一种或多种重编程转录因子的表达盒被引入到细胞中。

[0132] 在一些实施方案中,细胞和要被表达的蛋白质的物种是相同的。例如,如果使用小鼠细胞,则将小鼠直向同源物引入到细胞中。如果使用人细胞,则将人直向同源物引入到细胞中。

[0133] 要理解,当要将两个以上的蛋白在细胞中表达时,可以使用一个或多个表达盒。例如,当一个表达盒表达多个多肽时,可以使用多顺反子表达盒。

[0134] 任何类型的载体都可以用于将本发明的表达盒引入到细胞中。示例性的载体包括但不限于质粒和病毒载体。示例性的病毒载体包括,例如,腺病毒载体,AAV载体,和逆转录病毒(例如,慢病毒(lentiviral))载体。

[0135] 据信用于供本发明使用的细胞、组织或有机体的转化的核酸递送的合适方法实际上包括任何这样的方法,通过所述方法核酸(例如,DNA)可以引入到细胞、组织或有机体中,如本文所述或如本领域技术人员已知的(例如,Stadtfield和Hochedlinger, Nature Methods 6(5):329-330(2009);Yusa等, Nat. Methods 6:363-369(2009);Woltjen,等, Nature 458,766-770(9 April 2009))。这些方法包括,但不限于,DNA的直接递送如通过体外转染(Wilson等, Science, 244:1344-1346,1989, Nabel和Baltimore, Nature 326:711-713,1987), 任选使用Fugene6(Roche)或Lipofectamine(Invitrogen), 通过注射(美国专利号5,994,624,5,981,274,5,945,100,5,780,448,5,736,524,5,702,932,5,656,610,5,589,466和5,580,859,每个都通过引用结合于此),包括微注射(Harland和Weintraub, J. Cell Biol., 101:1094-1099,1985;U.S. Pat. No. 5,789,215,其通过引用结合于此);通过电穿孔(U.S. Pat. No. 5,384,253,其通过引用结合于此;Tur-Kaspa等, Mol. Cell Biol., 6:716-718,1986;Potter等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:7161-7165,1984);通过磷酸钙沉淀(Graham和Van Der Eb, Virology, 52:456-467,1973;Chen和Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752,1987;Rippe等, Mol. Cell Biol., 10:689-695,

1990) ;通过使用 DEAE- 葡聚糖,继之以聚乙二醇 (Gopal, Mol. Cell Biol., 5 :1188-1190, 1985) ;通过直接声波加载 (sonicloading) (Fechheimer 等, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA, 84 :8463-8467, 1987) ;通过脂质体介导的转染 (Nicolau 和 Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721 :185-190, 1982 ;Fraley 等, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA, 76 :3348-3352, 1979 ;Nicolau 等, Methods Enzymol., 149 :157-176, 1987 ;Wong 等, Gene, 10 :87-94, 1980 ;Kaneda 等, Science, 243 :375-378, 1989 ;Kato 等, J Biol. Chem., 266 :3361-3364, 1991) 和受体介导的转染 (Wu 和 Wu, Biochemistry, 27 :887-892, 1988 ;Wu 和 Wu, J. Biol. Chem., 262 :4429-4432, 1987) ;以及这些方法的任何组合,所述文献中的每个都通过引用结合于此。

#### [0136] IX. 混合物

[0137] 如本文所述,本发明提供哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞在与 PDK1 激活剂或促进糖酵解代谢的化合物,以及以下各项中的一种或多种的混合物中:(a) TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂;(b) MEK 抑制剂;(c) 组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂;或 (d) 选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽的外源多肽。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是 PDK1 激活剂。在一些实施方案中,PDK1 激活剂是变构的 PDK1 激活剂,例如,PS48。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解激活剂,例如,果糖 2,6- 二磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解的底物,例如,果糖 6- 磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解中间体或其代谢前体,例如,烟酸, NADH, 或果糖 6- 磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是葡萄糖摄取转运蛋白激活剂。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是线粒体呼吸调节剂。在一些实施方案中,线粒体呼吸调节剂是氧化磷酸化抑制剂,例如,2,4- 二硝基苯酚,或 2- 羟基戊二酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是低氧诱导因子激活剂,例如, N- 草酰甘氨酸,或槲皮素。

[0138] 在一些实施方案中,所述混合物还包含 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂。TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂包括但不限于 A-83-01。在一些实施方案中,所述混合物还包含 MEK 抑制剂。MEK 抑制剂包括但不限于 PD0325901。在一些实施方案中,所述混合物还包含组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂。HDAC 抑制剂包括但不限于丁酸钠 (NaB) 和丙戊酸 (VPA)。在一些实施方案中,所述混合物还包含外源转录因子,例如,选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽的外源转录因子。在一些实施方案中,外源转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。

[0139] 在一些实施方案中,化合物 (例如, PDK1 激活剂或促进糖酵解代谢的化合物) 以足以诱导或改善向多能性诱导的效率的浓度存在于混合物中。例如,在一些实施方案中,化合物的浓度为至少 0. 1nM,例如,至少 1, 10, 100, 1000, 10000 或 100000nM,例如,在 0. 1nM 至 100000nM 之间,例如,在 1nM 至 10000nM 之间,例如,在 10nM 至 10000nM 之间。在一些实施方案中,混合物在合成的容器中 (例如,试管、培养皿等)。因此,在一些实施方案中,细胞是分离的细胞 (不是动物的部分)。在一些实施方案中,细胞分离自动物 (人或非人),放置在容器中,与本文所述的一种或多种化合物接触。随后可以培养细胞并且任选地,将其回插入相同或不同的动物中,任选在细胞已经被刺激从而变为特定细胞类型或品系后。在一些实施方案中,当混合物在足以诱导细胞到诱导的多能干细胞的转化的条件下时,抑制剂的浓度足以使混合物中的非多能细胞诱导为诱导的多能干细胞的效率改善至少 10%, 20%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300% 以上。

[0140] 如本文所述,在一些实施方案中,细胞包含用于异源表达 Oct 多肽、Myc 多肽、Sox 多肽和 Klf 多肽中的至少一种或多种的表达盒。在一些实施方案中,细胞不包含用于表达 Oct、Myc、Sox 或 Klf 多肽中的一种或多种(在一些实施方案中,包括任何)的表达盒。

[0141] 根据本发明的细胞可以是人或非人(例如,灵长类,大鼠,小鼠,兔,牛,狗,猫,猪等)的。非多能细胞的实例包括本文所述的那些,包括但不限于,来自选自骨髓、皮肤、骨骼肌、脂肪组织和外周血的组织的细胞。示例性细胞类型包括,但不限于,成纤维细胞,肝细胞,成肌细胞,神经元,成骨细胞,破骨细胞,T 细胞,角质形成细胞,毛囊细胞,人脐静脉内皮细胞(HUVEC),脐带血细胞,和神经祖细胞。在一些实施方案中,混合物中至少 99% 的细胞最初是非多能细胞。在一些实施方案中,混合物中基本上所有细胞最初都是非多能细胞。

[0142] 在一些实施方案中,混合物中至少 0.001%,至少 0.002%,至少 0.005%,至少 0.01%,至少 0.05%,至少 0.1%,至少 0.5%,至少 1%,至少 2%,至少 3%,至少 4%,至少 5%,至少 6%,至少 7%,至少 8%,至少 9%,至少 10%,至少 15%,至少 20%,至少 30%,至少 40%,至少 50%,至少 60%,至少 70%,至少 80%,或至少 90% 的细胞被诱导为多能细胞。在一些实施方案中,混合物中至少 99% 的细胞被诱导为多能细胞。在一些实施方案中,基本上所有细胞都被诱导为非多能细胞。

#### [0143] X. 试剂盒

[0144] 本发明提供试剂盒,所述试剂盒用于在非多能哺乳动物细胞中诱导多能性,所述试剂盒包括 PDK1 激活剂或促进糖酵解代谢的化合物,以及以下各项中的一种或多种(a) TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂;(b) MEK 抑制剂;(c) 组蛋白脱乙酰酶(HDAC) 抑制剂;或(d) 选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽的外源多肽。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是 PDK1 激活剂。在一些实施方案中,PDK1 激活剂是变构的 PDK1 激活剂,例如,PS48。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解激活剂,例如,果糖 2,6-二磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解的底物,例如,果糖 6-磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是糖酵解中间体或其代谢前体,例如,烟酸,NADH,或果糖 6-磷酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是葡萄糖摄取转运蛋白激活剂。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是线粒体呼吸调节剂。在一些实施方案中,线粒体呼吸调节剂是氧化磷酸化抑制剂,例如,2,4-二硝基苯酚,或 2-羟基戊二酸。在一些实施方案中,促进糖酵解代谢的化合物是低氧诱导因子激活剂,例如,N-草酰甘氨酸,或槲皮素。

[0145] 在一些实施方案中,所述试剂盒还包括 TGF  $\beta$  受体 /ALK5 抑制剂,例如,A-83-01。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括 MEK 抑制剂,例如,PD0325901。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括组蛋白脱乙酰酶(HDAC) 抑制剂,例如,丁酸钠(NaB),或丙戊酸(VPA)。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括外源转录因子,例如,选自 Oct 多肽、Klf 多肽、Myc 多肽和 Sox 多肽的外源转录因子。在一些实施方案中,外源转录因子包含增强跨细胞膜运输的氨基酸序列。

[0146] 在一些实施方案中,所述试剂盒还包括非多能细胞。非多能细胞的实例包括本文所述的那些,包括但不限于,来自选自骨髓、皮肤、骨骼肌、脂肪组织和外周血的组织的细胞。示例性的细胞类型包括,但不限于,成纤维细胞,肝细胞,成肌细胞,神经元,成骨细胞,

破骨细胞, T 细胞, 角质形成细胞, 毛囊细胞, 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 脐带血细胞和神经祖细胞。

[0147] 实施例

[0148] 以下实施例用于说明而非限制本发明。

[0149] 实施例 1 :通过 OCT4 和化学化合物重编程人初级体细胞

[0150] 我们在此报道新型小分子混合物 (cocktail), 其能利用仅 OCT4 的外源表达来实现人初级体细胞向 iPSC 的重编程。

[0151] 结果

[0152] 在若干容易获得的初级人体细胞类型中, 能够容易地从人皮肤或毛囊分离的角质形成细胞代表有吸引力的用于重编程的细胞源, 因为它们内源表达 KLF4 和 cMYC, 并且据报道可以使用常规的四种 TFs 或三种 TFs (没有 MYC) 更有效地重编程 (Aasen, T. 等, *Nat Biotechnol* 26 :1276-1284 (2008); Maherali, N. 等, *Cell Stem Cell* 3, 340-345 (2008))。最近, 我们报道了使用小分子 (即, 分别使用 SB431542 和 PD0325901) 对 TGF  $\beta$  和 MAPK/ERK 通路进行双重抑制为利用四种外源 TFs (即, Oct4, Sox2, Klf4 和 c-Myc TFs, 或 "OSKM") 的人成纤维细胞的重编程提供显著增强的条件 (Lin, T. 等, *Nat Methods* 6 :805-808 (2009))。此外, 我们已经证明这样的双通路抑制也可以增强通过两种外源 TFs (即, Oct4 和 Klf4, 或 "OK") 以及两种小分子, Parnate (赖氨酸特异性去甲基化酶 1 的抑制剂) 和 CHIR99021 (GSK3 抑制剂) 的人角质形成细胞的重编程 (Li, W. 等, *Stem Cells* 27 :2992-3000 (2009))。然而, 这样的 2-TFs 重编程过程效率很低并且复杂 (例如, 涉及两种外源 TFs 和四种化学品), 并且利用甚至还要少一种 TF 的重编程都显得令人畏惧。为了实现仅使用 OCT4 的重编程, 我们在改善重编程条件和鉴别新的重编程化学实体方面开发出逐步策略。

[0153] 我们首先尝试在四种或三种 TFs (即, OSKM 或 OSK) 条件下进一步优化重编程过程: 在新生人表皮角质形成细胞 (NHEKs) 中, 通过在不同浓度测试 TGF  $\beta$  和 MAPK 通路的多种抑制剂, 使用之前报道的人 iPSC 表征方法 (Lin, T. 等, *Nat Methods* 6 :805-808 (2009))。我们发现, 0.5  $\mu$ M PD0325901 和 0.5  $\mu$ M A-83-01 (更加有效和选择性的 TGF  $\beta$  受体抑制剂) 的组合在增强转导有 OSKM 或 OSK 的人角质形成细胞的重编程方面更加有效 (图 1a)。显著地, 当我们进一步减少病毒转导至仅两种因子 /OK 时, 当 NHEKs 用 0.5  $\mu$ M PD0325901 和 0.5  $\mu$ M A-83-01 处理时, 我们仍然可以从其产生 iPSC, 虽然效率很低。然后我们开始以不同浓度筛选来自已知具有生物活性的化合物的集合的其他小分子, 如之前所报道的。在目前多测试的多种化合物中, 我们惊奇地发现在重编程方面从未得到报道的 PDK1 (3'-磷酸肌醇依赖性激酶-1) 的小分子激活剂, PS48 (5  $\mu$ M) 可以显著地使重编程效率增加约十五倍。有趣的是, 我们还发现对于在 OK 条件下产生 iPSC, 0.25mM 丁酸钠 (NaB, 组蛋白脱乙酰酶抑制剂) 结果比之前报道的 0.5mM VPA 更可靠和有效 (图 1b)。之后的后续研究证明 5  $\mu$ M PS48 和 0.25mM NaB 的组合可以进一步增强重编程效率超过二十五倍 (图 1b 和表 3)。

[0154] 在仅两种 TFs 的重编程 NHEKs 的这样空前的效率的情况下, 我们进一步研究了通过不同的处理窗口期间细化那些小分子的组合来仅利用 OCT4 产生 iPSC 的可能性。用 OCT4 转导初级 NHEKs 并用化学品处理 (图 1c)。在不同的条件下, 类似于 hESCs 的少量 iPSC 集落 (1, 000, 000 个接种的细胞中的四至六个集落) 出现在前四周期间用 0.25mM NaB, 5  $\mu$ M



PS48 和  $0.5 \mu\text{M}$  A-83-01 处理,之后用  $0.25\text{mM}$  NaB,  $5 \mu\text{M}$  PS48,  $0.5 \mu\text{M}$  A-83-01 和  $0.5 \mu\text{M}$  PD0325901 再处理四周的 OCT4 感染的 NHEKs 中 (图 1c)。这样的 TRA-1-81 阳性 iPSC 集落 (图 1d) 在常规 hESC 培养基下生长得更大并且可以连续传代从而产生被进一步表征的稳定的 iPSC 克隆 (图 1e 和 2)。此外,通过向该化学品混合物中加入  $2 \mu\text{M}$  Parnate 和  $3 \mu\text{M}$  CHIR99021 (其已经显示出在 OK 条件下改善 NHEKs 的重编程),仅使用 OCT4 的 iPSC 也可以产生自人成人角质形成细胞。在初级角质形成细胞通过 OCT4 和小分子可靠的重编程为 iPSC 后,我们进一步将该条件应用于其他人初级细胞类型,包括 HUVECs (分化的中胚层细胞) 和 AFDCs (源自羊水的细胞)。类似地,TRA-1-81 阳性 iPSC 集落出现在用化学品处理的 OCT4 感染的 HUVECs 和 AFDCs 中。显著地,表现为在 OCT4 和小分子条件下 HUVECs 和 AFDCs 的重编程比 NHEKs 的重编程更有效和快速 (表 3)。来自每个细胞类型的 iPSC 的两个克隆在常规 hESC 培养条件下长期扩增达超过 20 代并被进一步表征 (表 4)。

[0155] 这些稳定扩增的 hiPSC-OK 和 hiPSC-0 细胞在形态学上不能区别于 hESCs,并且可以在无饲料 (feeder-free) 和化学成分确定的条件下在 ECM 涂布的表面上培养 (图 1e 和图 6)。它们对于碱性磷酸酶 (ALP) 染色呈阳性,并且通过免疫细胞化学 / ICC 检测,表达典型的多能性标记物,包括 OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-81 和 SSEA4 (图 1e, 3b, 图 4-5)。此外,RT-PCR 分析确认了内源人 OCT4, SOX2, NANOG, REX1, UTF1, TDGF2, FGF4 基因的表达,以及外源 OCT4 和 KLF4 的沉默 (图 2a 和 3c)。此外,亚硫酸氢盐测序分析显示 hiPSC-OK 和 hiPSC-0 细胞的 OCT4 和 NANOG 启动子在很大程度上被去甲基化 (图 2b 和 3d)。该结果为 hiPSC-OK 和 hiPSC-0 细胞中的多能性转录程序的再活化提供了进一步的证据。hiPSC-0 细胞, NHEKs 和 hESCs 的全局基因表达分析显示 hiPSC-0 细胞不同于 NHEKs (Pearson 相关性值 :0.87) 并且与 hESCs 最相似 (Pearson 相关性值 :0.98) (图 2c)。基因型分析显示 hiPSC-0 细胞仅包含 OCT4 转基因而未受转基因 KLF4 或 SOX2 的污染 (图 8)。DNA 印迹分析显示在不同的克隆之间存在 OCT4 转基因的多个不同的整合位点 (图 9)。此外,核型分析结果显示 hiPSC-0 在整个重编程和扩增过程期间保持正常的核型 (图 10)。此外, DNA 指纹测试排除了这样的可能性,即这些 hiPSC 由实验室中的 hESC 污染产生 (表 5)。

[0156] 为检验这些 hiPSC-0 细胞的发育潜能,通过标准胚状体 (EB) 分化方法使它们在体外分化。ICC 分析表明它们可以有效地分化为以  $\beta$  III-微管蛋白<sup>+</sup> 为特征的神经元细胞 (外胚层), SMA<sup>+</sup> 中胚层细胞,和 AFP<sup>+</sup> 内胚层细胞 (图 2d 和 3e)。定量 PCR 分析进一步确认了这些和另外的品系特异的标记基因的表达,所述标记基因包括外胚层细胞 ( $\beta$  III-微管蛋白和 NESTIN), 中胚层细胞 (MSX1 和 MLC2a), 以及内胚层细胞 (FOXA2 和 AFP) (图 2e)。在 EB 方案后,这些 hiPSC-OK 和 hiPSC-0 细胞还可以产生有节奏搏动的心肌细胞。为测试它们在体内的多能性,将它们移植到 SCID 小鼠中。四至六周后,这些 hiPSC-0 细胞有效地产生包含所有三个胚层的衍生物的典型的畸胎瘤 (图 2f 和 3f)。总的说来,这些体外和体内特征表明单个转录因子, OCT4, 与限定的小分子混合物结合,足以将若干种人初级体细胞重编程为在形态学上、分子上和功能上类似于多能 hESCs 的 iPSC。

[0157] 讨论

[0158] 上述研究具有大量重要的启示:首先,尽管胎儿 NSCs 显示为通过仅 OCT4 的异位表达被重编程为 iPSC,关于下述问题存在显著的怀疑:仅外源 OCT4 基因是否足以重编程不内源表达 SOX2 (重编程中两种主要多能性基因之一)、处于较后的发育阶段 (例如,早期胚

胎 / 胎儿对比出生 / 成人) 的其他更实用的人体细胞, 并且是否可以在不显著伤害个体的情况下获得。就我们所知, 我们的研究第一次证明 iPSC 可以实际来源于转导有单个外源重编程基因 OCT4 的容易获得的初级人体细胞 (例如, 角质形成细胞)。与来自脑部的神经干细胞相比, 角质形成细胞更易获得并且可以利用较少的侵入式方法容易地获得自出生的个体。这进一步加强了开发用于以更安全的方法和 / 或更好的质量产生 iPSC 的多种实际上易获得的人体细胞的策略。因此, 该新方法及其进一步的开发将显著促进用于多种用途的患者特异的多能干细胞的制备。

[0159] 第二, 虽然小分子及它们的组合已经被鉴别为仅替代一种或两种重编程 TFs, 当更多的外源重编程 TFs 被一起省略时, 产生 iPSC 的挑战呈指数地增大。在使得能够仅利用 OCT4 产生 iPSC 方面在功能上同时替代三种主要转录因子 (即, SOX2、KLF4 和 MYC) 的此新的小分子混合物的鉴定代表了向着仅利用小分子的最终重编程的又一主要步骤, 并进一步证实和巩固了获得 iPSCs 的化学方法。

[0160] 第三, 这表明单个基因条件对于蛋白质 - 诱导的多能干细胞 (piPSC) 技术也具有重要启示。piPSC 技术的实际挑战是大规模且可靠地制备四种可转导的重编程蛋白, 所述四种蛋白中的每个在制备中具有不同的性质 (例如, 它们的表达, 折叠, 稳定性等)。显然地, 将该小分子混合物与单个可转导的蛋白组合将显著简化 piPSC 技术并促进其应用。

[0161] 第四, 我们鉴定了新的小分子, PS48, 其在增强重编程方面具有新的靶标 / 机制。PS48 是 PDK1 的变构的小分子激活剂 (Hindie, V. 等, *Nat Chem Biol* 4 :758-764(2009))。PS48 增强重编程的一种机制表现为促进从主要由成人体细胞使用的线粒体氧化到主要由 ESCs 使用的糖酵解的代谢重编程 (其也被称为 Warburg 作用) (Manning, B. D. 和 Cantley, *Cell* 1129 :1261-1274(2007) ;Kondoh, H. 等, *Antioxid Redox Signal* 9 :293-299(2007) ; Heiden, M. G. V. 等, *Science* 324 :1029-1033(2009))。相比线粒体呼吸, 多能干细胞对糖酵解代谢的这种差异性使用将通过在较少的氧化胁迫下促进增殖 / 细胞周期转化来有助于多能性。对于高度增殖的细胞, 氧化磷酸化将不能够满足为细胞复制提供大分子前体的需要, 并且还在线粒体中产生大量的活性氧种类, 所述活性氧种类可能诱发过度的氧化损伤。另一方面, 糖酵解代谢可以更有效地产生大分子前体, 如针对非必需氨基酸的糖酵解中间体和针对脂肪酸的乙酰基 -CoA, 同时提供足够的能量从而满足增殖细胞的需要 (Kondoh, H. 等, *Antioxid Redox Signal* 9 :293-299(2007) ;Heiden, M. G. V. 等, *Science* 324 : 1029-1033(2009))。有趣地, 缺氧条件及其效应物 HIF-1 $\alpha$  活化不仅与促进糖酵解代谢紧密联系, 并且还显示为增强小鼠和人两者的重编程 (Yoshida, Y. 等, *Cell Stem Cell* 5 : 237-241(2009))。机械地, 生长因子信号传导通路, 缺氧条件 /HIF-1 $\alpha$  和重编程因子 Myc 显示为调控细胞代谢的互补方面, 包括上调葡萄糖转运蛋白和糖酵解的代谢酶, 如 GLUT1, HK2 和 PFK1 (Gordan, J. D. 等, *Cancer Cell* 12 :108-113(2007) ;DeBerardinis, R. J. 等, *Cell metabolism* 7 :11-20(2008))。这些研究表明 :在增强重编程方面, Myc、缺氧条件 /HIF-1 $\alpha$  和生长因子 /Akt 通路活化的一种可能的保守机制集中在它们在调节糖酵解代谢中的基本作用。支持该主张的是, 我们发现 :用 PS48 处理激活下游 Akt/PKB (图 11a), 并且上调若干主要糖酵解基因的表达 (图 11d), 促进到糖酵解的代谢转换 (图 11c)。相反地, 我们发现 :通过 UCN-01 (PDK1 抑制剂) 使 PDK1 活性失活或通过 2-脱氧 -D- 葡萄糖 (糖酵解抑制剂) 抑制糖酵解不仅减弱糖酵解 (图 11c) 而且还阻断重编程过程 (图 11b)。此外, 已经广泛

用于介导线粒体呼吸 (2,4-二硝基苯酚),糖酵解代谢 (果糖 2,6-二磷酸和草酸盐),或更具体地 HIF 通路活化 (N-草酰甘氨酸和槲皮素) 的若干已知的小分子也显示相应的对重编程的一致作用;即,促进糖酵解代谢的化合物增强重编程 (如 2,4-二硝基苯酚和 N-草酰甘氨酸),而阻断糖酵解代谢的化合物抑制重编程 (如草酸盐) (图 11e) (Hewitson, K. S. 和 Schofield, C. J., *Drug Discov Today*9:704-711(2004);Pelicano, H. 等, *Oncogene*25:4633-4646(2006))。总之,这些结果表明向厌氧糖酵解的代谢转换对于体细胞到多能干细胞的重编程是关键的并且对其有促进作用。

[0162] 最后,此新且强大的用于重编程的小分子混合物证实了本文提出的逐步的化学优化和筛选策略作为获得最终纯粹化学品诱导的多能干细胞的生产性方法。此外,我们发现:在不同的情境中,不同的小分子介导相同的靶标/机制可能对重编程具有显著不同的效果,例如 A-83-01 和 NaB 的更好的重编程增强人角质形成细胞中的活性,表明对于具体的重编程情境来说“个性化”优化和用不同方式处理的重要性。

[0163] 方法

[0164] 细胞培养

[0165] 将正常人表皮角质形成细胞 (Lonza) 保持在角质形成细胞培养基 (KCM, Lonza) 中。将人脐静脉内皮细胞 (HUVECs, Millipore) 保持在 EndoGRO-VEGF 完全培养基 (HCM, CHEMICON) 中。将人 ESCs 和 hiPSC 在 MEF 饲养细胞上在常规人 ESC 培养基 (hESCM:DMEM/F12,15% Knockout 血清替代物,1% Glutamax,1% 非必需氨基酸,1% 青霉素/链霉素,0.1mM  $\beta$  巯基乙醇和 10ng/ml bFGF) 中培养。除非有所提及,所有细胞培养产品均来自 Invitrogen/Gibco BRL。

[0166] 慢病毒制备

[0167] 制备慢病毒上清并如前所述那样收集 (Yu, J. 等, *Science*318:1917-1920(2007))。用于制备慢病毒的质粒包括 pSin-EF2-Puro-hOCT4, pSin2-EF2-Puro-hSOX2, pLove-mKlf4, pLove-mMyc, 包装质粒 psPAX2 和编码被膜的质粒 pMD2.G (Yu, J. 等, *Science*318:1917-1920(2007) 和 Li, W. 等, *Stem Cells*27:2992-3000(2009))。

[0168] NHEKs 的重编程

[0169] 将 NHEKs 培养在 100mm 组织培养皿中并用新鲜制备的慢病毒上清对其进行 3 次转导 (每次转导 3-4 小时)。将 1,000,000 个经转导的 NHEKs 接种到放射 x 射线灭活的 CF1MEF 饲养细胞上在 100-mm 皿中并在 KCM 中培养并用 5  $\mu$ M PS48,0.25mM NaB (Stemgent) 和 0.5  $\mu$ M A-83-01 (Stemgent) 处理 2 周,之后将一半体积的培养基变为 hESCM 并补充以 5  $\mu$ M PS48,0.25mM NaB 和 0.5  $\mu$ M A-83-01 再培养 2 周。然后细胞培养基变为 hESCM 并补充以 5  $\mu$ M PS48,0.25mM NaB,0.5  $\mu$ M A-83-01 和 0.5  $\mu$ M MPD0325901 (Stemgent) 再培养 4 周。将在不含有化学品的培养基中培养的相同的 OCT4 感染的角质形成细胞作为对照。通过 Accutase (Millipore) 分解培养物并在分解后的第一天中用 1  $\mu$ M Thiazovivin (Stemgent) 处理。挑取 Alexa Fluor555 小鼠抗人 TRA-1-81 抗体 (BD Pharmingen) 阳性染色的 iPSC 集落用于在饲养细胞上在 hESCM 中扩增并常规培养。

[0170] HUVECs 的重编程

[0171] 将 HUVECs 培养在 100mm 组织培养皿中并用新鲜制备的慢病毒上清对其进行 2 次

转导（每次转导 4-6 小时）。将 200,000 个经转导的 HUVECs 接种到明胶涂布的 100-mm 皿上，在 HCM 中培养，并用 5  $\mu$  M PS48, 0.25mM NaB 和 0.5  $\mu$  M A-83-01 处理 2 周，之后将一半体积的培养基变为 hESCM 并补充以 5  $\mu$  M PS48, 0.25mM NaB 和 0.5  $\mu$  M A-83-01 再培养 2 周。然后将细胞培养基变为 hESCM 并补充以 5  $\mu$  M PS48, 0.25mM NaB, 0.5  $\mu$  M A-83-01 和 0.5  $\mu$  M PD0325901 再培养 1-2 周。挑取 Alexa Fluor555 小鼠抗人 TRA-1-81 抗体阳性染色的 iPSC 集落用于在饲养细胞上在 hESCM 中扩增并常规培养。通过 Accutase 分解培养物并在分解后的第一天中用 1  $\mu$  M Thiazovivin 处理。

[0172] 使用多种代谢调节化合物的 HUVECs 的重编程

[0173] 将 HUVECs 培养在 100-mm 组织培养皿中并用新鲜制备的含四种重编程因子 (Klf, Sox, Myc 和 Oct) 的慢病毒上清对其进行 2 次转导（每次转导 4-6 小时）。将约 20,000 个经转导的 HUVECs 接种到明胶涂布的 6-孔板上，在 HCM 中培养，并用代谢调节化合物处理 2 周。然后将细胞培养基变为 hESCM 并补充以代谢调节化合物再培养 1-2 周。计数 Alexa Fluor555 小鼠抗人 TRA-1-81 抗体阳性染色的 iPSC 集落的数目。测试多种代谢调节化合物，包括 10mM 果糖 2,6-二磷酸 (F2,6P), 10mM 果糖 6-磷酸 (F6P), 10  $\mu$  M 6-氨基烟酰胺 (6-AN), 10  $\mu$  M 草酸盐 (OA), 1  $\mu$  M 2,4-二硝基苯酚 (DNP), 1  $\mu$  M N-草酰甘氨酸 (NOG), 1  $\mu$  M 槲皮素 (QC), 10  $\mu$  M 2-羟基戊二酸 (2-HA), 或 10  $\mu$  M 烟酸 (NA)。

[0174] 体外分化

[0175] hiPSC 的体外分化通过标准胚状体 (EB) 方法进行。简言之，通过 Accutase (Millipore) 解离 hiPSC，在超低附着 6 孔板中培养八天后转移到 Matrigel 涂布的 6 孔板在分化培养基中。在八天后，将细胞固定用于免疫细胞化学分析或者收集用于 RT-PCR 测试。分化培养基：DMEM/F12, 10% FBS, 1% Glutamax, 1% 非必需氨基酸, 1% 青霉素 / 链霉素, 0.1mM  $\beta$  巯基乙醇。

[0176] 碱性磷酸酶染色和免疫细胞化学测定

[0177] 使用碱性磷酸酶检测试剂盒 (Stemgent) 根据制造商的方案进行碱性磷酸酶染色。标准免疫细胞化学测定如前所报道的那样进行 (Li, W. 等, StemCells27: 2992-3000 (2009))。所用的初级抗体可以见于表 2 中。次级抗体是 Alexa Fluor488 驴抗小鼠或抗兔 IgG (1:1000) (Invitrogen)。细胞核通过 DAPI (Sigma-Aldrich) 染色显示。使用 Nikon Eclipse TE2000-U 显微镜捕获图像。

[0178] 通过 RT-PCR 和 qRT-PCR 的基因表达分析

[0179] 对于 RT-PCR 和 qRT-PCR 分析，使用 RNeasy Plus Mini 试剂盒结合 QIAshredder (Qiagen) 从人 iPSC 提取总 RNA。第一链反转录利用 2  $\mu$  gRNA 使用 iScript™ cDNA 合成试剂盒 (BioRad) 进行。多能性标记物的表达通过 RT-PCR 使用 Platinum PCR SuperMix (Invitrogen) 来分析。分化后的品系特异标记物的表达通过 qRT-PCR 使用 iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 来分析。引物可见于表 1 中。

[0180] 微阵列分析

[0181] 将 Human Ref-8\_v3expression Beadchip (Illumina, CA, USA) 用于微阵列杂交以检查 NHEKs、hiPSC 和 hES 细胞的全局基因表达。利用 Illumina TotalPrep RNA 扩增试剂盒 (Ambion AMIL1791, Foster City, CA, USA) 从 500ng 总 RNA 合成生物素 -16-UTP- 标记的 cRNA。根据 Illumina BeadStation500 $\times$  系统手册 (Illumina, San Diego, CA, USA) 使

用提供的试剂和 GE Healthcare 链霉抗生物素 -Cy3 染色溶液制备含 750ng 标记的扩增的 cRNA 的杂交混合物。到 Illumina Human Ref-8v3expressionBeadchip 的杂交在 BeadChip Hyb Wheel 上在 55°C 进行 18 小时。使用 Illumina BeadArray Reader 扫描阵列。所有样品都制成两份生物学复制品。微阵列数据的处理和分析利用 Illumina BeadStudio 软件进行。所述数据被减去背景并使用秩不变量选项归一化。

[0182] 硫酸氢盐基因组测序

[0183] 使用 Non Organic DNA 分离试剂盒 (Millipore) 分离基因组 DNA 然后用 EZ DNA Methylation-Gold 试剂盒 (Zymo Research Corp., Orange, CA) 处理。然后将经处理的 DNA 用作扩增目的序列的模板。用于 OCT4 和 NANOG 启动子片段扩增的引物显示在表 1 中。使用用于测序的 TOPO TA 克隆试剂盒 (Invitrogen) 克隆所得的片段并测序。

[0184] hiPSCs 的基因型分析

[0185] 使用基因组 DNA 的 RT-PCR, 利用特异性引物 (表 1; Yu, J. 等, Science 318: 1917-1920 (2007) 和 Li, W. 等, Stem Cells 27: 2992-3000 (2009)) 来进行 hiPSC 系的基因型分析。

[0186] 畸胎瘤形成

[0187] 通过使用 0.05% 胰蛋白酶 -EDTA 来收获 hiPSC 系。在 SCID 小鼠 (n = 3) 的肾包膜下注射五百万个细胞。在 4-6 周后, 收获发育良好的畸胎瘤, 固定然后在 TSRI 组织学重点实验室 (TSRI histology core facility) 进行组织学分析。

[0188] 表 1. 所用引物

[0189]

基因	正向	反向
用于 RT-PCR		
<i>Endo-OCT4</i>	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG	ACTTCACCTTCCCTCCAACC
<i>Endo-SOX2</i>	CAAAAATGGCCATGCAGGTT	AGTTGGGATCGAACAAAAGCTATT
<i>Endo-NANOG</i>	TTTGGAAGCTGCTGGGGAAG	GATGGGAGGAGGGGAGAGGA
<i>Endo-KLF4</i>	ACGATCGTGGCCCCGAAAAAGGACC	GATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC
<i>Endo-cMYC</i>	GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC	TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG
<i>REX1</i>	CAGATCCTAACAGCTCGCAGAAT	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA
<i>UTF1</i>	CCGTCGCTGAACACCGCCCTGCTG	CGCGCTGCCAGAATGAAGCCCAC
<i>TDGF2</i>	CTGCTGCCTGAATGGGGGAACCTGC	GCCACGAGGTGCTCATCCATCACAAGG

[0190]

基因	正向	反向
<i>FGF4</i>	CTACAACGCCTACGAGTCCTACA	GTTGCACCAGAAAAGTCAGAGTTG
<i>Exo-OCT4</i>	TGCTCCGTCACCACTCTGG	ATGCATGCGGATCCTTCG
<i>PAX6</i>	TGTCCAACGGATGTGAGT	TTCCCAAGCAAAGATGGAC
<i>βIII</i> 微管蛋白	CAACAGCACGGCCATCCAGG	CTTGGGGCCCTGGGCCCTCCGA
<i>FOXF1</i>	AAAGGAGCCACGAAGCAAGC	AGGCTGAAGCGAAGGAAGAGG
<i>HAND1</i>	TCCCTTTTCCGCTTGCTCTC	CATCGCCTACCTGATGGACG
<i>AFP</i>	AGCAGCTTGGTGGTGGATGA	CCTGAGCTTGGCACAGATCCT
<i>GATA6</i>	TGTGCGTTCATGGAGAAGATCA	TTTGATAAGAGACCTCATGAACCGACT
<i>GAPDH</i>	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	GGAGGAGTGGGTGTCTGCTGT
用于硫酸氢盐测序		
<i>OCT4-1</i>	TTAGGAAAATGGGTAGTAGGGATT	TACCCAAAAAACAATAAATTATAAAACCT
<i>OCT4-2</i>	GGATGTTATTAAGATGAAGATAGTTGG	CCTAAACTCCCCTTCAAAATCTATT
<i>NANOG</i>	GAGTTAAAGAGTTTGTTTTAAAAATTAT	TCCCAAATCTAATAATTTATCATATCTTTC
用于基因型分析		
<i>OCT4-Int</i>	CAGTGCCCGAAACCCACAC	AGAGGAACTGCTTCCTTCACGACA
<i>SOX2-Int</i>	TACCTCTTCTCCCACTCCA	AGAGGAACTGCTTCCTTCACGACA
<i>KLF4-Int</i>	CACCTTGCTTACACATGAAGAGG	CGTAGAATCGAGACCGAGGAGA

[0191] 表 2. 应用的初级抗体

[0192]

抗体	物种	稀释	厂家
抗 OCT4 (1)	小鼠	1 : 500	Santa Cruz Biotechnology
抗 OCT4 (2)	兔	1 : 500	Stemgent
抗 SOX2	兔	1 : 1000	Chemicon
抗 NANOG	兔	1 : 500	Abcam
抗 SSEA4	小鼠	1 : 500	Stemgent
抗 TRA-1-81	小鼠	1 : 500	Stemgent
TUJ1 (抗 β III 微管蛋白)	小鼠	1 : 3000	Covance Research Products
抗 SMA	小鼠	1 : 500	Sigma
抗 AFP	小鼠	1 : 500	Sigma

[0193] 表 3. 重编程实验概述

[0194]

供体细胞	诱导因子	化学品	实验	TRA-1-81 阳性集落
	OCT4+KLF4+SOX2+MYC	DMSO	#1	17
			#2	20
			#3	23
		A83+PD	#1	72
			#2	104
			#3	91
	OCT4+KLF4+SOX2	DMSO	#1	2
			#2	3
			#3	8
		A83+PD	#1	26
			#2	35
			#3	44

[0195]

供体细胞	诱导因子	化学品	实验	TRA-1-81 阳性集落	
NHEKs (批号: 0000087940)	OCT4+KLF4	A83+PD	#1	1	
			#2	2	
			#3	0	
		A83+PS48+PD	#1	15	
			#2	18	
			#3	5	
		A83+VPA+PD	#1	6	
			#2	0	
			#3	3	
		A83+NaB+PD	#1	20	
			#2	17	
			#3	18	
		A83+PS48+NaB+PD	#1	21	
			#2	30	
			#3	27	
		OCT4	A83+PS48+NaB+PD	#1	4
				#2	0
				#3	3
NHEKs (批号: 2F0661)	OCT4	A83+PS48+NaB+PD	#1	2	
			#2	3	
			#3	0	
AHEKs	OCT4	A83+PS48+NaB+PD +Par+CHIR	#1	3	
			#2	2	
HUVECs	OCT4	A83+PS48+NaB+PD	#1	4	
			#2	7	
			#3	4	
HUVECs	OCT4	A83+PS48+NaB+PD +Par+CHIR	#1	23	
			#2	17	
AFDCs	OCT4	A83+PS48+NaB+PD +Par+CHIR	#1	5	
			#2	11	

[0196] NHEKs, 新生人表皮角质形成细胞; HUVECs, 人脐静脉内皮细胞; AHEKs, 成人表皮角质形成细胞; AFDCs, 源自羊水的细胞。所用化学品浓度: PD, 0.5  $\mu$ M PD0325901; A83, 0.5  $\mu$ M A-83-01; PS48, 5  $\mu$ M PS48; VPA, 0.5mM 丙戊酸; NaB, 0.25mM 丁酸钠; Par, 2  $\mu$ M Parnate; CHIR, 3  $\mu$ M CHIR99021。对于四因子或三因子诱导的重编程, NHEKs 以 100,000 个转导的细胞/10cm 皿的浓度接种并且在四周后计数阳性集落; 对于两因子诱导的重编程,

NHEKs 以 100,000 个转导的细胞 /10cm 皿的密度接种并在六周后计数阳性集落 ;而对于单因子诱导的重编程, NHEKs 和 AHEKs 以 1,000,000 个经转导的细胞 /10cm 皿的密度接种并在八周后计数阳性集落。HUVECs 和 AFDCs 以 200,000 个经转导的细胞 /10cm 皿的密度接种并在六周后计数阳性集落。

[0197] 表 4. 建立的人 iPSC 细胞系的表征

[0198]

hiPSC 克隆	诱导因子	细胞源	标记物 表达	RT-PCR 测试	EB 分化	畸胎瘤 测试	
hiPSC-OK#1	OCT4+KLF4	NHEKs	√	√	√	√	
hiPSC-OK#3			√	√	√		
hiPSC-O#1	OCT4	NHEKs	√	√	√	√	
hiPSC-O#3			√	√	√		
hiPSC-O#4			√				
hiPSC-O#5			√				
另外 2 个系							
hiPSC-O#21	OCT4	HUVECs	√	√	√	√	
hiPSC-O#22			√				
hiPSC-O#26			√	√	√		
hiPSC-O#31			√	√	√	√	
另外 7 个系							
hiPSC-O#52	OCT4	AHEKs	√		√		
hiPSC-O#57			√				
hiPSC-O#63	OCT4	AFDCs	√		√		
hiPSC-O#65			√				

[0199] 所表征的那些细胞系在常规 hESC 培养条件下长期扩增达超过 20 代并进一步对其进行标记物表达和多能性的表征 ;同时将所建立的其他细胞系在第 5 或 6 次传代时贮藏。空白表示“未测定”。

[0200] 表 5. 对 Oct4 诱导的 iPSC 和亲本细胞系进行的 DNA 指纹分析

[0201]



基因组位置	NHEK(集合的)	hiPSC-o#1	HUVEC	hiPSC-0#21
珐琅蛋白	X, Y	X, Y	X	X
vWA	11, 15, 17, 18, 19	15, 18	15 ;16	15 ;16
D8S1179	10, 13, 16	13,	10 ;13	10 ;13
TPOX	8, 9, 11, 12	8	8	8
FGA	19, 22, 23, 24	19, 22	24 ;27	24 ;27
D3S1358	13, 14, 15, 17	17	14 ;16	14 ;16
TH01	6, 7, 9, 9, 3	7, 9	6	6
D21S11	24. 2, 29, 30. 2, 35	24. 2, 29	28 ;30. 2	28 ;30. 2
D18S51	13, 14, 16, 17, 18, 19	13, 17	13 ;18	13 ;18
PentaE	5, 8, 13, 14, 19	13, 19	12	12
D5S818	8, 11, 12, 13	11, 13	12 ;13	12 ;13
D13S317	8, 9, 11, 12, 13	9, 12	11 ;14	11 ;14
D7S820	8, 9, 10, 11	9, 10	11	11

[0202]

基因组位置	NHEK(集合的)	hiPSC-0#1	HUVEC	hiPSC-0#21
D16S539	9, 10, 11, 12, 13	9, 13	9 ;11	9 ;11
CSF1PO	10, 11, 12	11, 12	11 ;12	11 ;12
PentaD	2. 2, 10, 12	10	12 ;13	12 ;13

[0203] 研究了十五个多形性短串联重复 (STR)DNA 位置和性染色体标记物珐琅蛋白 (amelogenin)。

[0204] 实施例 2 :人脐静脉内皮细胞的重编程

[0205] 我们测试了 HDAC 抑制剂、PDK1 激活剂、TGF  $\beta$  受体抑制剂和 MEK 抑制剂的组合对通过慢病毒仅转导有 Oct4 的 HUVECs 的作用以了解它们对重编程动力学和效率的作用。

[0206] 方法

[0207] 将人脐静脉内皮细胞 (HUVECs, Millipore) 保持在 EndoGRO-VEGF 完全培养基 (HCM, CHEMICON) 中。将 HUVECs 培养在 100mm 组织培养皿中并用新鲜制得的慢病毒上清转导 2 次 (4-6 小时 / 次)。然后将 200,000 个经转导的 HUVECs 接种到明胶涂布的 100-mm

皿上并在 HCM 中培养并用 PDK1 激活剂 PS48 (5  $\mu$  M), HDAC 抑制剂 NaB (0.25mM) 和 TGF  $\beta$  受体抑制剂 A-83-01 (0.5  $\mu$  M) 处理 2 周,之后将一半体积的培养基变为 hESCM 并补充以 PDK1 激活剂 PS48 (5  $\mu$  M), HDAC 抑制剂 NaB (0.25mM) 和 TGF  $\beta$  受体抑制剂 A-83-01 (0.5  $\mu$  M) 再培养 2 周。然后将细胞培养基变为 hESCM 并补充以 PDK1 激活剂 PS48 (5  $\mu$  M), HDAC 抑制剂 NaB (0.25mM) 和 TGF  $\beta$  受体抑制剂 A-83-01 (0.5  $\mu$  M) 和 MEK 抑制剂 PD0325901 (0.5  $\mu$  M) 再培养 2 周。通过 Alexa Fluor555 小鼠抗人 TRA-1-81 抗体 (BD Pharmingen) 将 iPSC 集落染色为阳性。hESCM :DMEM/F12, 15% Knockout 血清替代物, 1% Glutamax, 1% 非必需氨基酸, 1% 青霉素 / 链霉素, 0.1mM  $\beta$  巯基乙醇和 10ng/ml bFGF。

[0208] 结果

[0209] 对于仅转导有 Oct4 的 HUVECs, 我们测试了 HDAC 抑制剂、PDK1 激活剂、TGF  $\beta$  受体抑制剂、MEK 抑制剂的组合对重编程效率的作用。我们发现用 5  $\mu$  M PS48, 0.25mM NaB, 0.5  $\mu$  M A-83-01 和 0.5  $\mu$  M PD0325901 的组合处理导致  $\sim$  0.0015% 的重编程效率。

[0210] 提供以上实施例用于说明本发明而非限制其范围。本发明的其他变体对于本领域普通技术人员将是非常显然的并且被所附权利要求所涵盖。本文引用的所有出版物、数据库、Genbank 序列、专利以及专利申请通过引用结合于此。

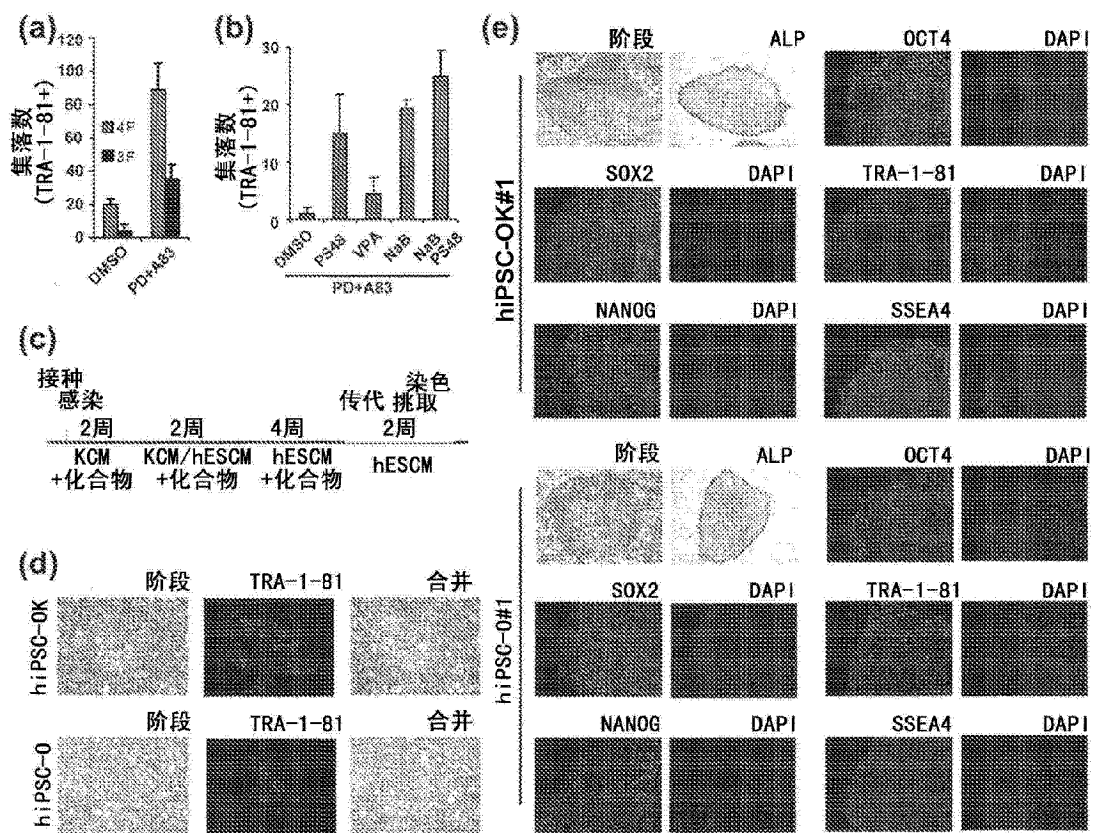


图 1

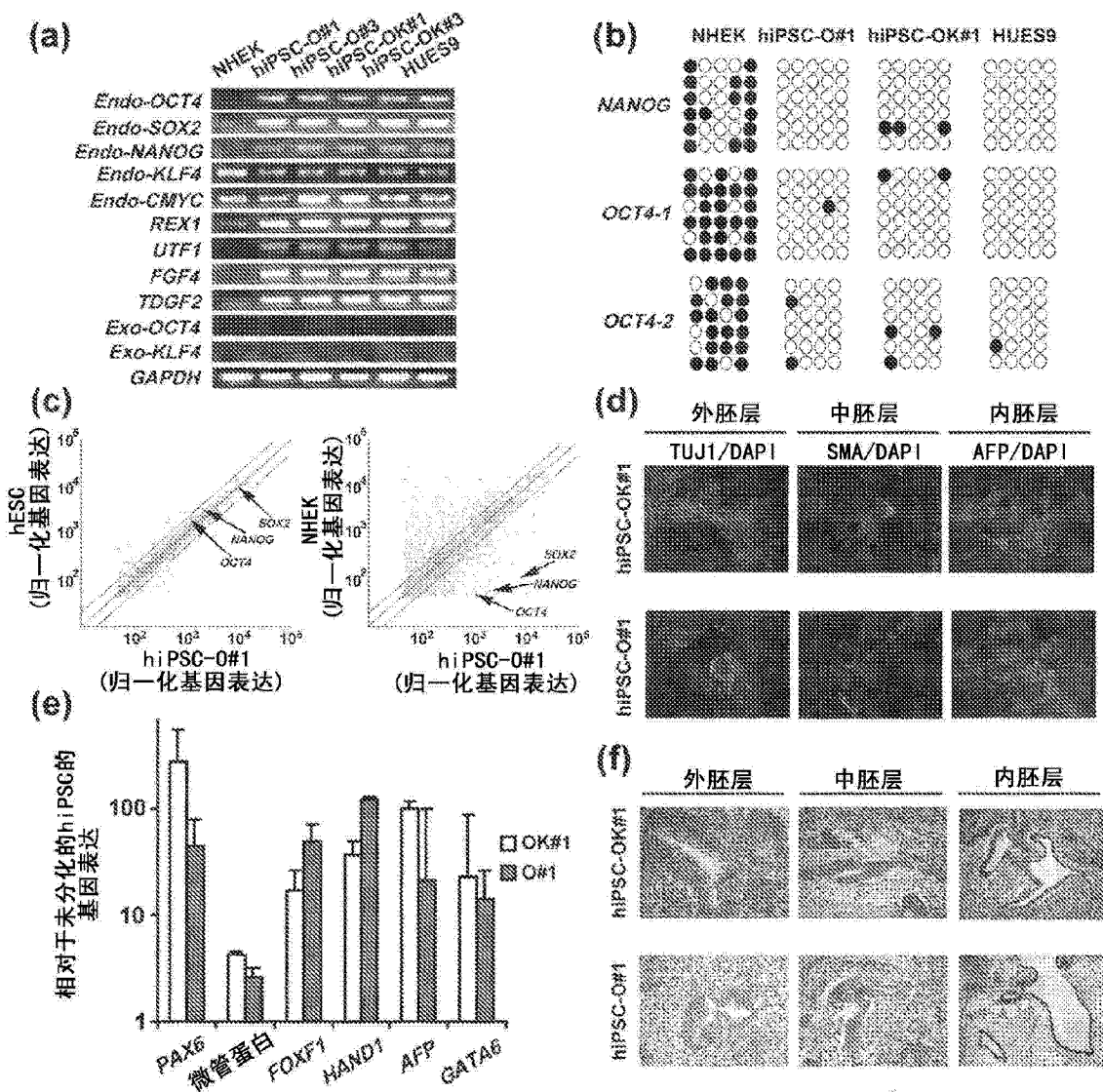


图 2

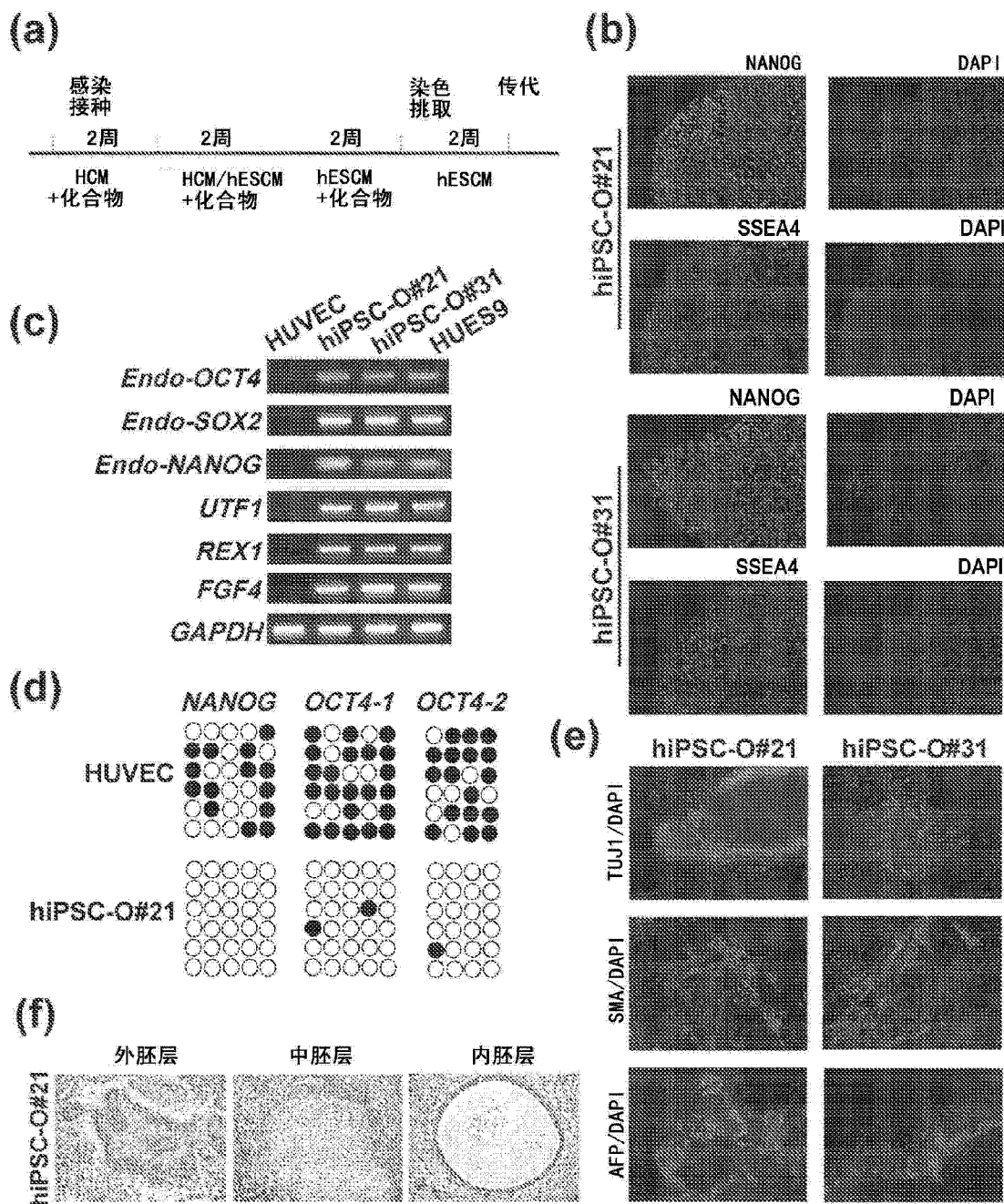


图 3

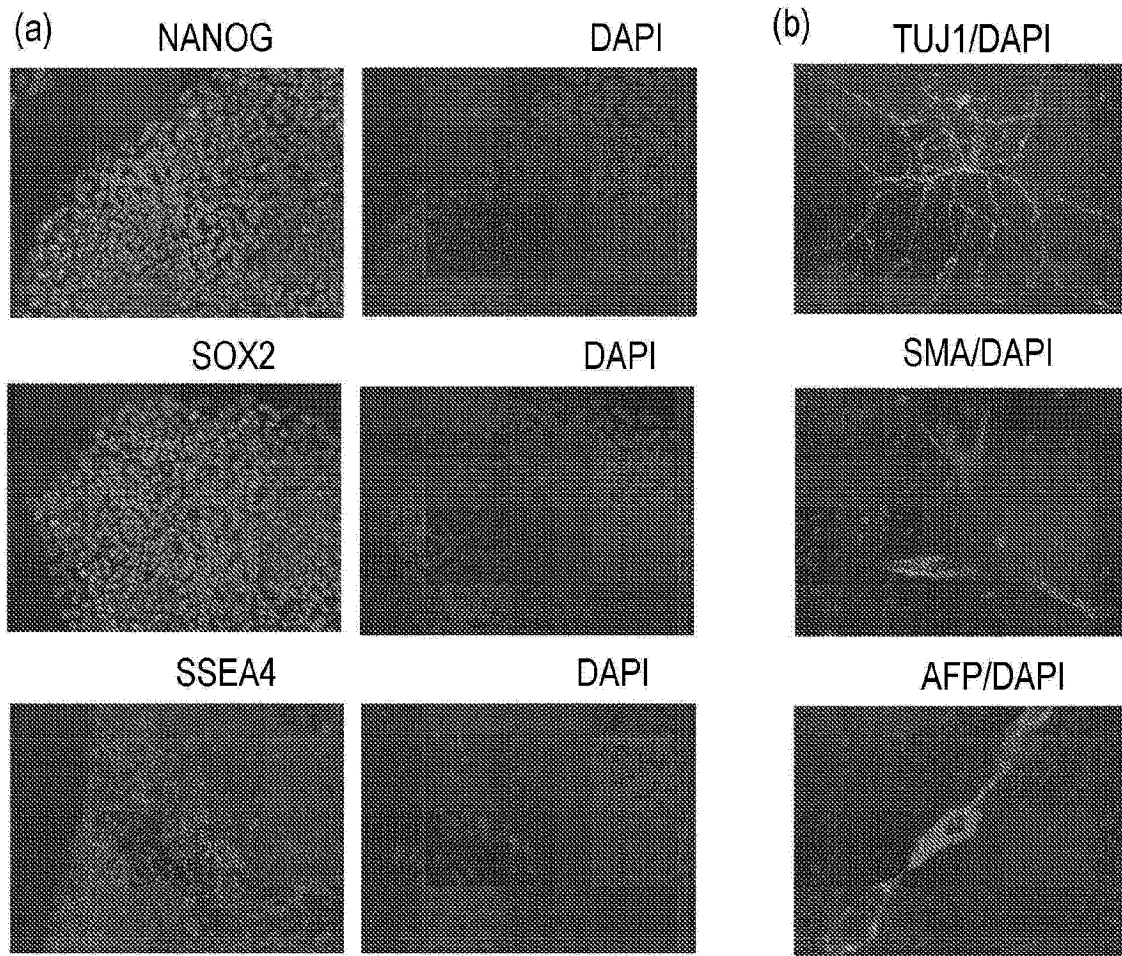


图 4

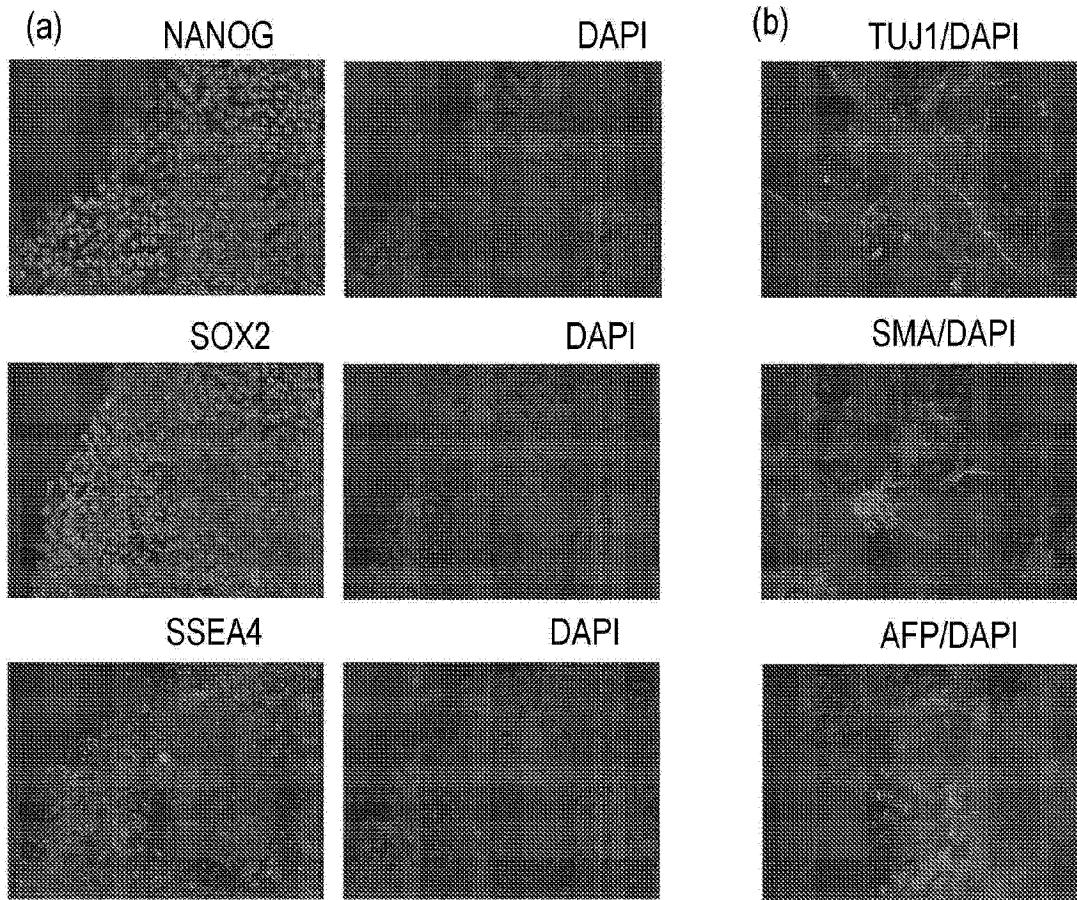


图 5

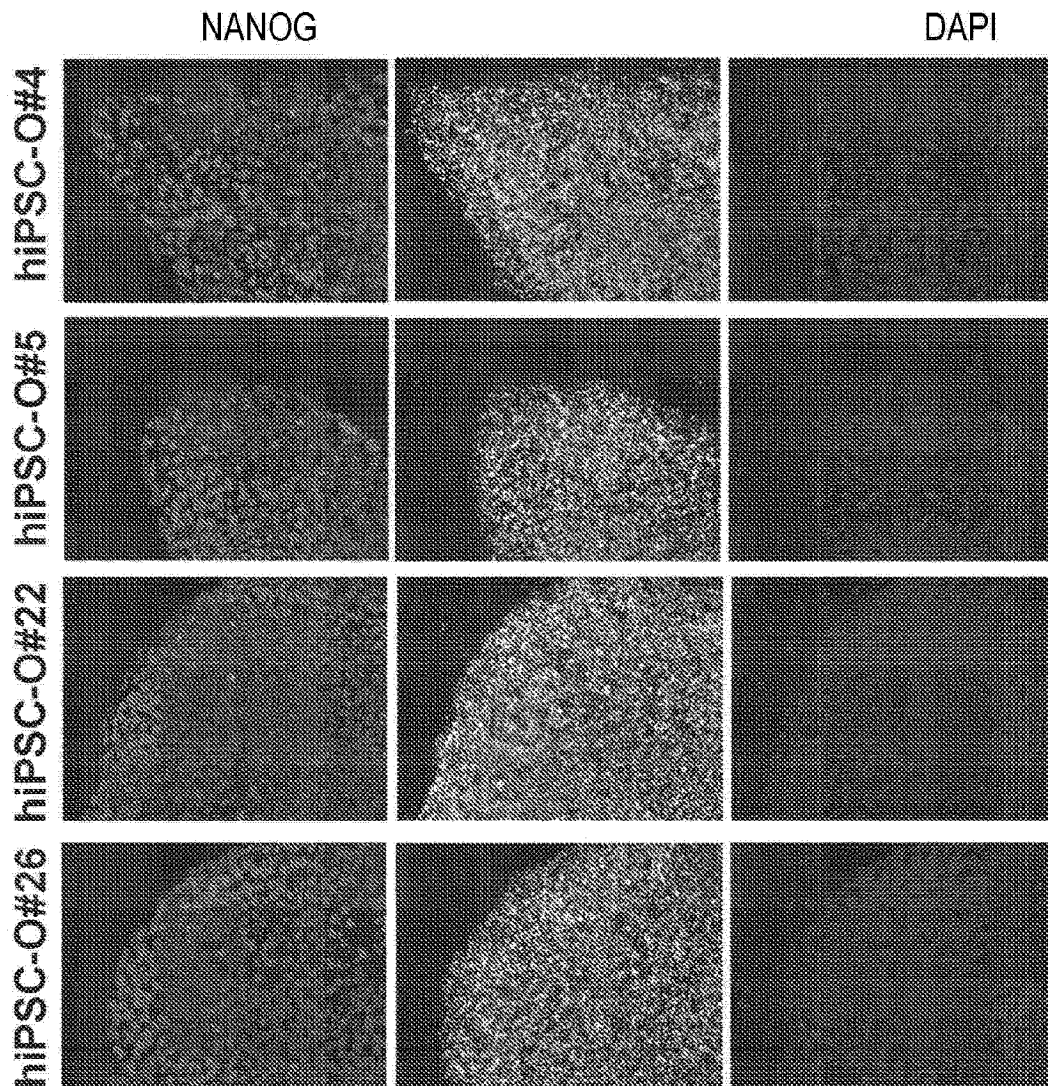


图 6



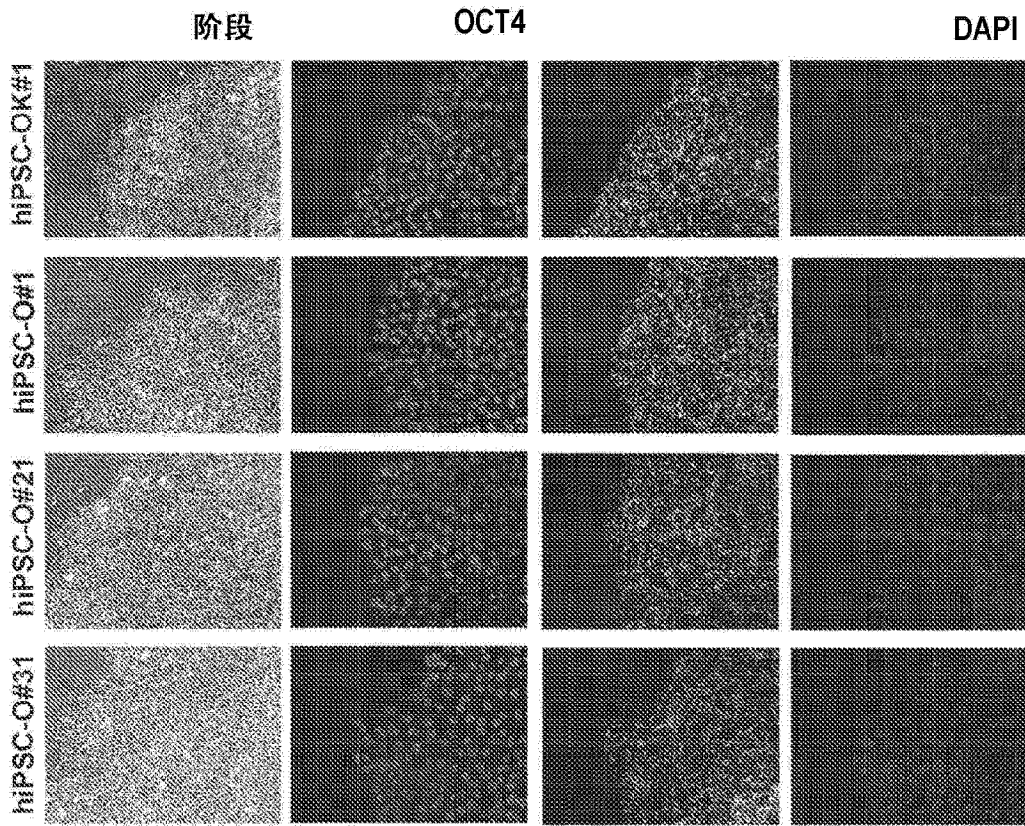


图 7

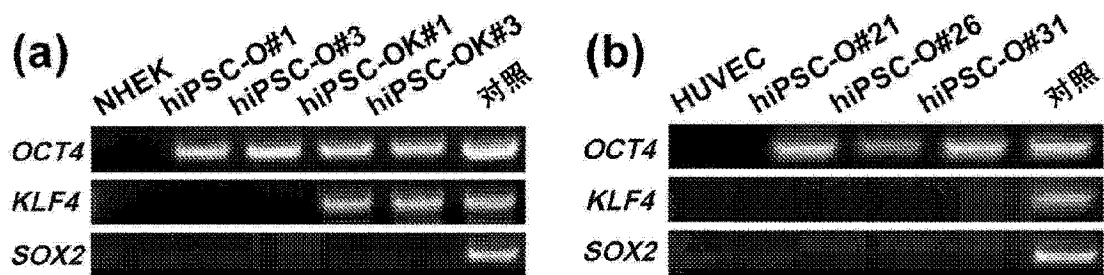


图 8

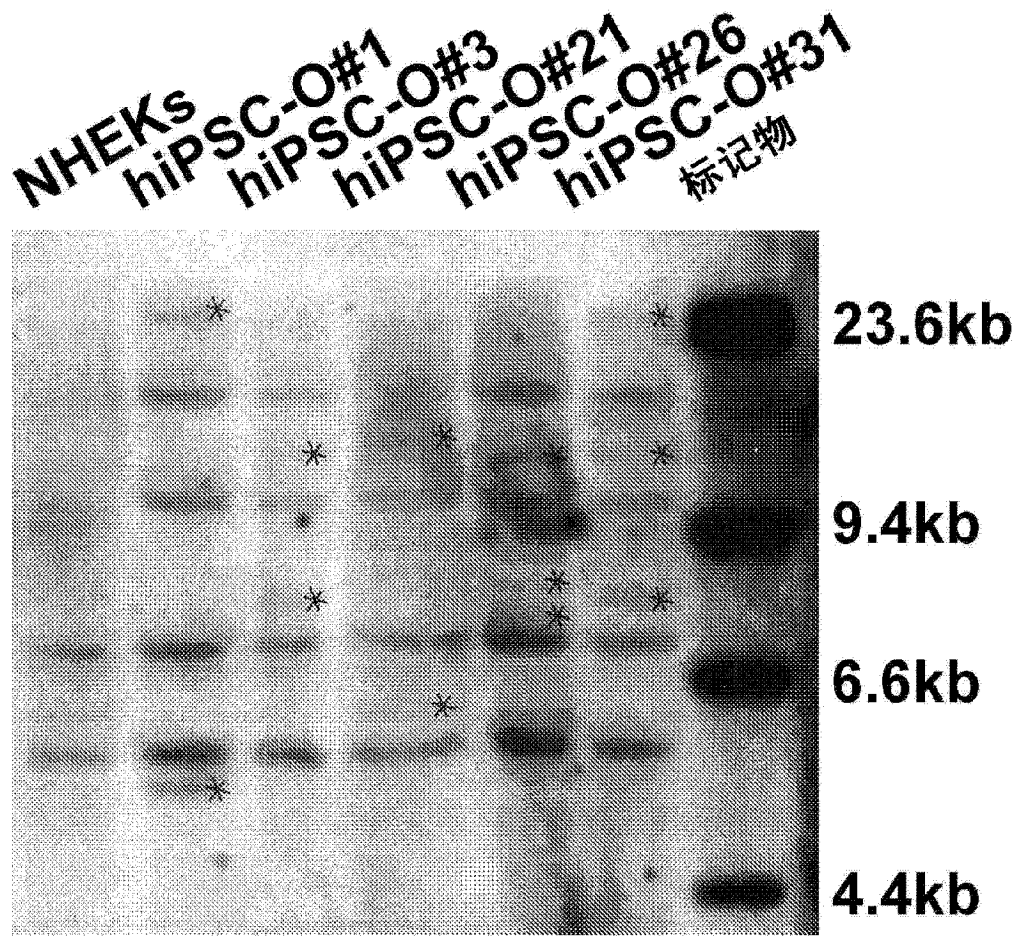


图 9

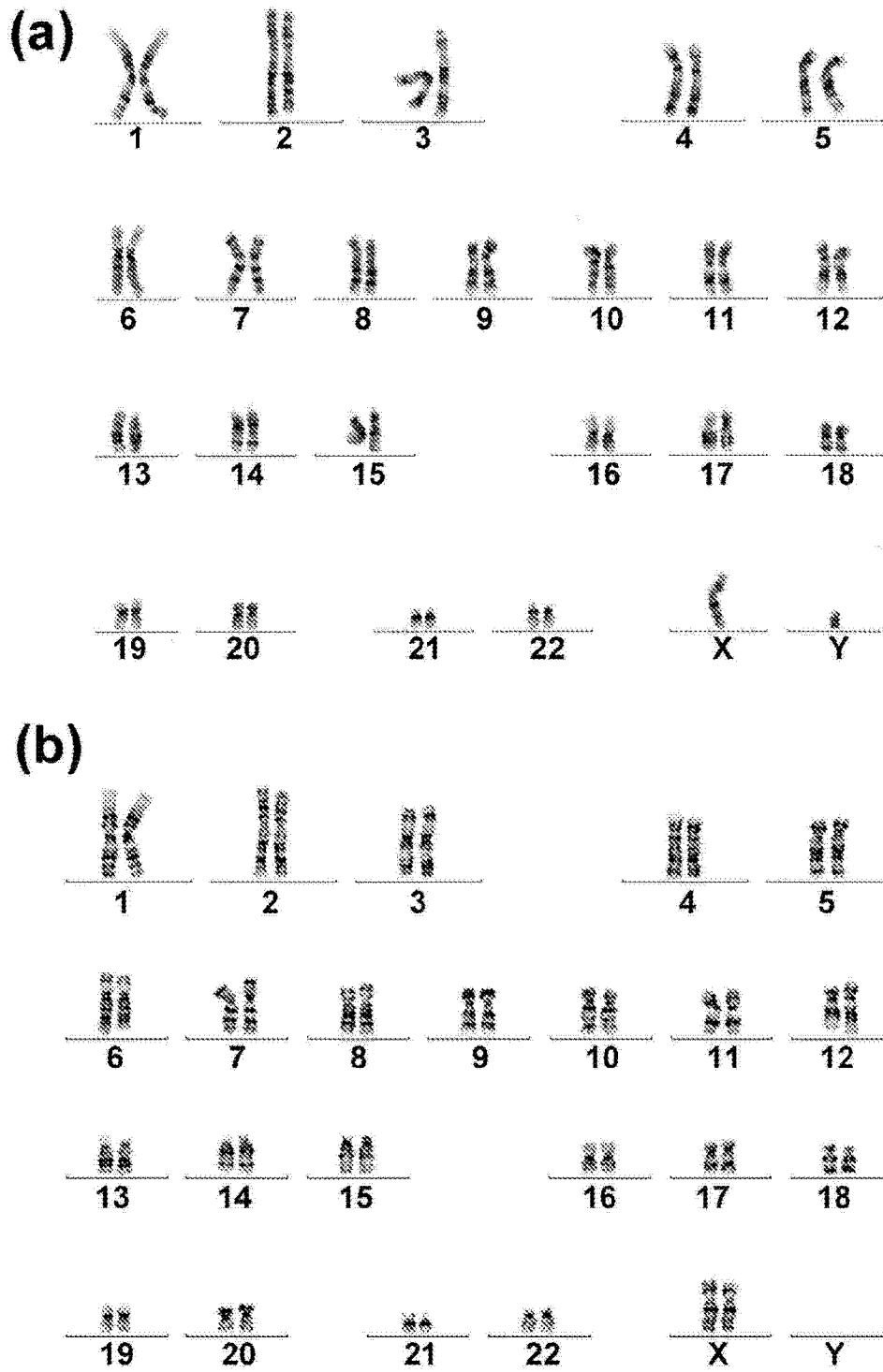


图 10

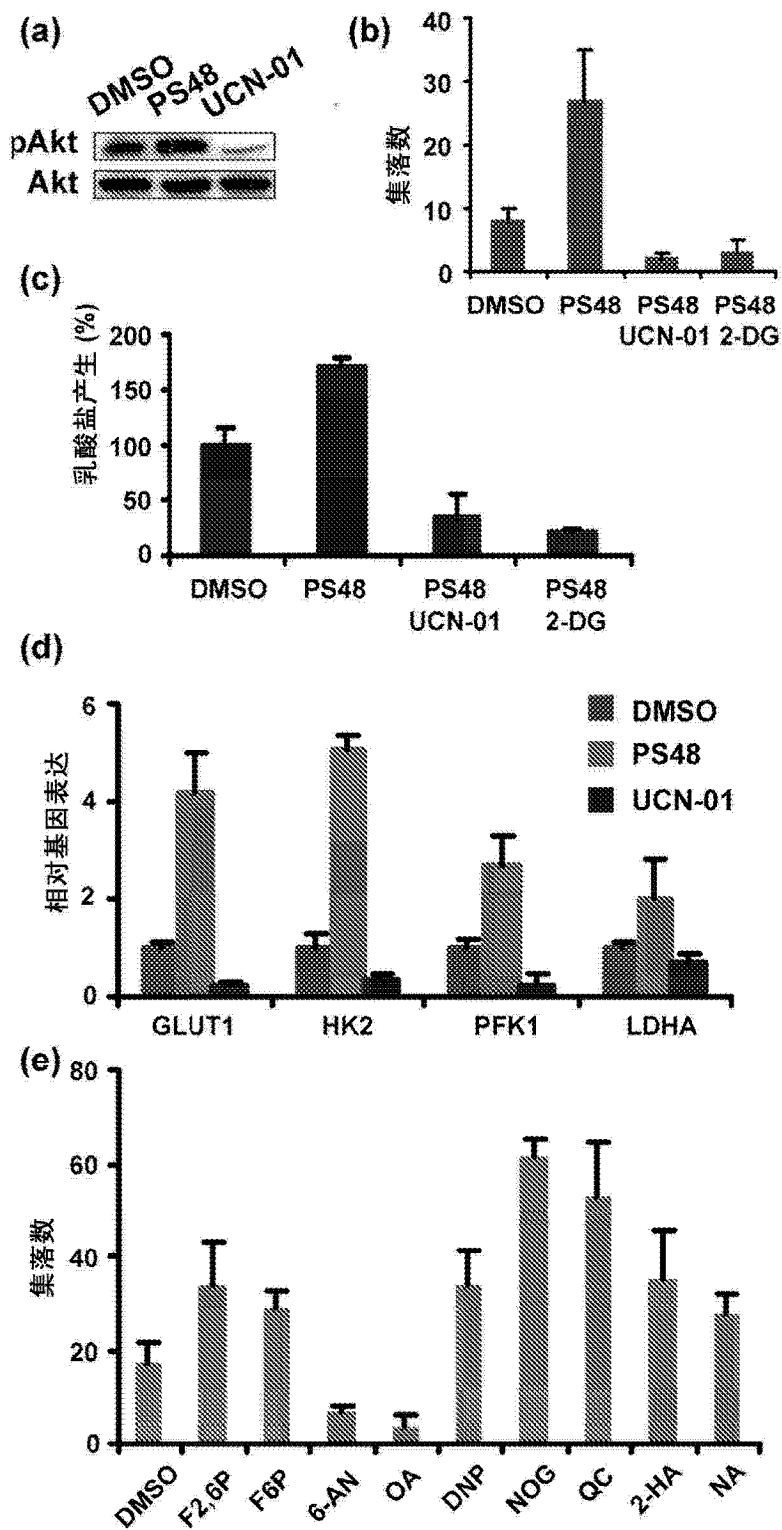


图 11