

白皮书

小分子抑制剂：解锁iPSC的新潜能

诱导多能干细胞 (iPSC) 凭借其遗传可塑性与近乎无限的扩增能力, 为患者特异性疾病建模、高通量药物研发、毒理学研究以及再生医药带来了史无前例的机会。尽管如此, iPSC 的临床转化依然面临着规模化与生产上的巨大挑战, 因此急需发展大规模且经济效益高的细胞培养法。富士胶片新推出的 **Complete CEPT Coktail** 与 **GMP规格Y-27632 Rock抑制剂** 能够支持 iPSC 的上下游产线, 为 iPSC 细胞疗法研发的各个阶段提供综合解决方案。

诱导多能干细胞 (iPSC) —— 医疗研发的新前沿

iPSC 技术能够直接对终末分化成熟体细胞进行重编程, 使其返回多能状态¹, 为药学的未来带来了革新。与人胚胎干细胞 (hESCs) 相似², 人诱导多能干细胞 (hiPSCs) 能够通过细胞培养无止境地扩增, 并分化成几乎所有的细胞种类³。更重要的是, hiPSCs 可使用任何患者或健康受试者提供的细胞制备, 且比较适合基因工程。因此, hiPSCs 提供了一种可靠且具临床意义的体外人模型, 能够规避动物模型的使用, 避免围绕着 hESCs 伦理与免疫排斥⁴ 的担忧。

iPSC 技术的出现为临床与生物学应用带来了无限可能性。除了疾病建模和药物研发外⁵, iPSCs 还为常规药物目前无法治愈的恶性退行性疾病的治疗提供了一种自体细胞来源。这些退行性疾病包括缺血性心力衰竭、糖尿病、帕金森病、阿尔兹海默病, 以及与衰老相关的黄斑病变^{4, 5}。各种新应用也对 iPSC 来源多细胞器官或类器官在疾病建模与再生医疗方面的有效性进行了评估⁵。

仰赖 iPSC 技术的未来

基于 iPSC 的疗法已在临床前体外研究与早期临床研究中被认为安全有效⁶, 因此其在临床领域中的应用数量也稳步上升⁷。事实上, 全球已有超过 80 例与 iPSCs 有关的临床试验已经完成或正在进行中, 范围囊括使用 iPSCs 进行疾病干预, 生产基于 iPSC 的产品, 或是新候选药物的高通量筛选 (图 2)⁶。因此, 干细胞干预的临床转化是 iPSC 需求的主要推手。尽管临床试验的浪潮导致了监管批准流程的延迟, 但更新的监管指南与内部改组举措^{8, 9} 有望提高效率, 加快审批流程, 并进一步推动需求。

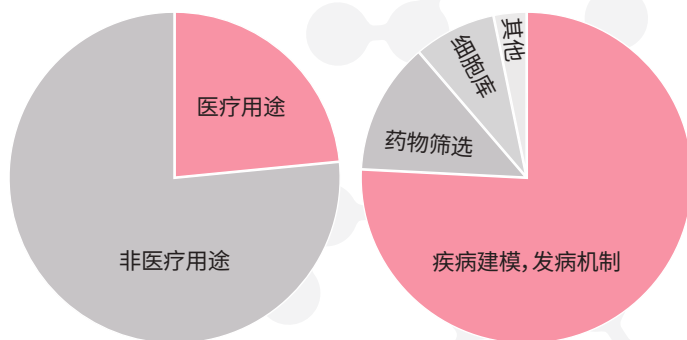


图2. 全球与 iPSCs 有关的临床研究分布

“非医疗用途”研究大多将 iPSCs 用于疾病建模, 药物筛选与建立细胞库。“医疗用途”研究主要为通过将 iPSCs 移植到病人体内以开发新疗法的临床实验 (引用自 Kim et al. 2022, *Stem Cell Rev Rep*)。

另外, 慢性疾病如癌症、中风、糖尿病以及心脏病^{10, 11} 的病例数持续增长, 而试图阻止这种增长趋势的研究也越来越多地依靠 iPSCs 作为研究工具。iPSCs 对比其替代品拥有显著的优势, 包括不使用动物模型以及规避了与 ESCs 相关的伦理问题。这一优势刺激了资本家对 iPSC 相关研究¹² 的投资, 并进一步推动了市场的发展。产业分析报告称, 未来五年全球 iPSC 市场将增长约 9.3% (复合增长率)¹³, 在 2026 年达到 35.7 亿美元¹⁴。其中, 再生医药领域增长得最快¹⁵。



图1. iPSCs 的生物医学应用

医疗转化的展望与规模化的挑战

尽管iPS细胞疗法有着巨大的医疗潜力,但只有少数临床试验评估中的iPS细胞疗法可以真正转化为治疗方案⁶。临床应用可能一名患者每用一剂就需要数十亿的细胞¹⁶,这需要大规模的细胞生产、扩增、冻存产线,以及安全、高可再现性、高效的细胞分化策略¹⁷。iPSC的生产过程冗长复杂,面临着生产方面的巨大挑战。然而这些挑战,恰恰也与iPSC在疾病建模与治疗方面的迷人特性相同。

虽然多功能细胞具有无限自我更新的能力,但它对微环境变化特有的敏感性,会导致其在细胞培养与操作的过程中难以存活。这大大限制了多功能细胞的规模化⁵。的确,多年前就已经确认常规的细胞传代操作会导致iPSC大面积死亡,这也是iPSCs临床转化的主要障碍¹⁸。尽管科研技术已取得了显著的进步,但iPSC的培养方式仍然存在差异且效果欠佳¹⁹,尤其是在单细胞的扩增,冻存以及克隆实验方面缺少高效的实验流程。

iPSCs是黏附依赖型细胞,为了维持多能性以及扩增和后续的分化操作,需要在细胞集落中培养^{20,21}。然而,高效而稳健的克隆、冻存和分化流程往往在单细胞培养中效果最好,但细胞-细胞与细胞-基质之间相互作用的丧失,会使iPSC即使在合适的培养环境下也会发生大面积凋亡。此外,对无动物源成分或无饲养层培养环境的应用,作为解决劳动力、规模、成本以及安全隐患问题的手段,在该领域越热门,其带来的传统iPSC重编程及培养体系的转变也能同时影响细胞的分化与凋亡²²。最后,由易感性增加引发的细胞凋亡所导致的冻存iPSCs的低复苏率,也对临床级别iPSCs的大规模生产造成了重大阻碍²³。

小分子抑制剂——推动干细胞技术

想要跨越前临床与临床环境之间的转化鸿沟,需要我们以远超现今技术所能允许的量产iPSC。另外,成功的培养iPSC高度依赖个人技术水平,既难以传授,也难以囊括在自动化生产流程中。

使用ROCK抑制剂改善iPSC存活率

抑制Rho激酶(ROCK)能够解决部分上述问题。Rho激酶是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,能够调节细胞骨架的收缩与重组。ROCK活性与一系列细胞通路相关,包括细胞凋亡、迁移、增殖以及分化²²,而抑制它能够促进干细胞的生存²⁴。Y-27632是目前有效且具选择性的ROCK抑制剂²⁵。在2007年的一份具历史意义的研究中首次展现了Y-27632对人ESC的生存、分化潜能以及分化能力的正面效果(图3)²⁶。后续研究总结了Y-27632在iPSC的复苏与传代中的应用²²,因此,在单细胞解离前向iPSC培养基中添加10 μM Y-27632成为了iPSC领域的标准操作。

Y-27632通过抑制细胞收缩以及随后的细胞凋亡和失巢凋亡介导的细胞死亡提高细胞的存活率²⁷。Y-27632添加剂能够提高单个细胞的存活率,从而提升接种及克隆效率,支持解离细胞或在无饲养层环境传代的细胞的未分化生长,促进胚体形成,改善冻存与分化操作²⁸,这对iPSC培养而言可谓无价之宝。

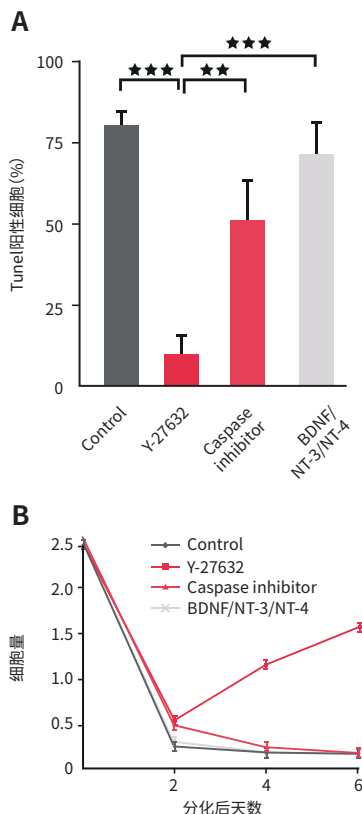


图3. Y-27632改善了解离后人ESC的生存

A: Y-27632、caspase抑制剂,神经生长因子混合物(BDNF/NT-3/NT-4)与凋亡细胞的百分比。

B: 培养解离细胞2、4、6天后细胞的数量(引用自Watanabe *et al.* 2007, *Nat Biotechnol*)。

CEPT: 崭露头角

尽管优势显著,但是Y-27632调控的ROCK抑制并不能从影响细胞稳态、结构与功能的应激机制中保护iPSCs¹⁷。为了克服这些难题,美国国家转化科学促进中心(NCATS)的研究者们通过高通量筛选超过15000种小分子后研发了一种4组分混合物¹⁷。CEPT包括Chroman1²⁹——一种比Y-27632更强力也更具选择性的ROCK抑制剂、泛caspase抑制剂Emericasan、整合应激反应(ISR)抑制剂Trans-ISRIB,以及多胺溶液,能够协同改善在基础研究、转化研究以及后续应用中iPSC的生存状况。

现有研究^{17,30-32}(图4)显示,CEPT混合物能够快速起效,且具有特殊的细胞保护性质,能够克服干细胞工艺流程中固有的应激源,这些应激源往往会导致DNA损伤并造成细胞死亡。CEPT添加剂能够支持解离后细胞的结构与功能完整性,因此尤其适用于需求单细胞分离的应用,还能在长期单细胞传代与冻存中维持iPSC细胞系的多能性、染色体组型与分化能力。此外,CEPT还能提升冻存分化细胞的生存率,以及增加衍生细胞的功能性。最后,CEPT与Y-27632以及其他市售试剂相比(CloneR, RevitaCell, SMC4)选择性更强,效果更好,只需低成本就能获得更好的细胞保护效果。

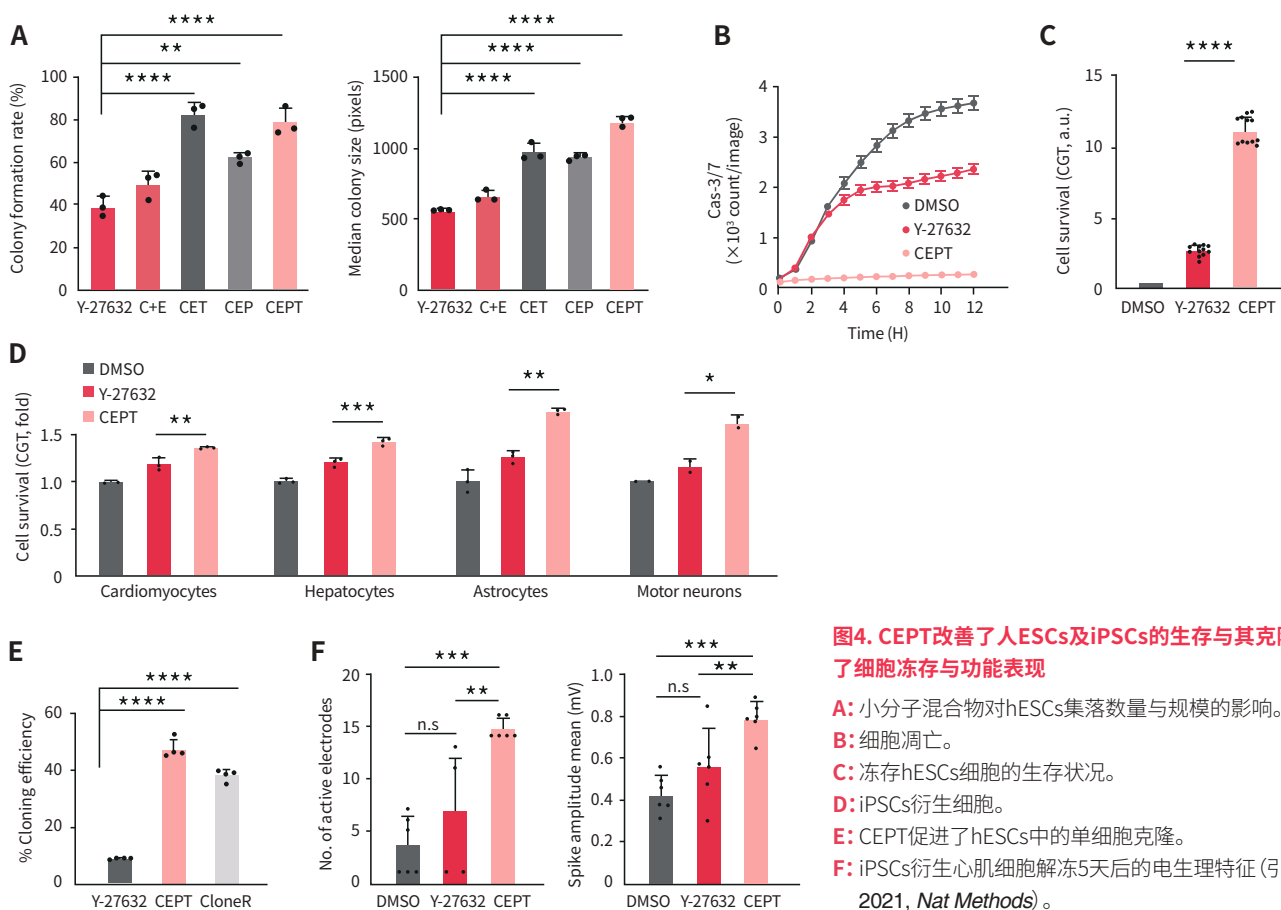


图4. CEPT改善了人ESCs及iPSCs的生存与其克隆的生长,并提高了细胞冻存与功能表现

A: 小分子混合物对hESCs集落数量与规模的影响。
B: 细胞凋亡。
C: 冻存hESCs细胞的生存状况。
D: iPSCs衍生细胞。
E: CEPT促进了hESCs中的单细胞克隆。
F: iPSCs衍生心肌细胞解冻5天后的电生理特征 (引用自Chen *et al.* 2021, *Nat Methods*)。

展望——iPSC的瓶颈与下一步

人iPSCs能够在体外环境下再现受体表现型的能力为生物医药研究带来了变革,并应用在定制患者疾病建模、高通量药物筛查、安全药理学以及再生医药等领域。尽管iPSC提供了前所未有的机遇,想要全面发挥它的潜能还需走很长的路。iPSC在临床转化上的困难之一就是成本,最新的评估³⁴指出一个研究级别的iPS细胞系的生产、表征验证以及储存需要花费1万到2万5千美元,而能供移植使用的GMP规格iPS细胞疗法的费用则更为高昂,平均每位病人约为80万美元。自体疗法需要严格的操作与质量控制,费用会更加昂贵。尽管自体疗法可能是iPSC应用的优势之一,但它的价格可能会限制它的发展,使大多数公司选择生产研发能够用于特定疾病病人的“现货型”异体iPSC细胞系。

除了工艺的复杂性之外,在不考虑质量或其他考量(如致癌性、异质性和免疫原性⁵)的前提下,生产iPSC的成本主要来自其低生存率。这限制了我们将生产规模扩大至临床应用水平。另一大阻碍是细胞培养技术缺乏统一标准,但大力投资iPSC重编程及扩增的优化与自动化方面已成为新的行业趋势。

Y-27632的特性及其对细胞生存和细胞活力的影响标志着干细胞研究的转折点。十多年来,Y-27632添加剂已成为干细胞研究的标准操作,所以关于其在改善细胞生存的优势与机制方面积累了丰富的知

识。为了iPSC应用的高效发展,干细胞药企越来越多地转向使用Y-27632作为细胞疗法的上游原料,富士胶片和光纯药株式会社新推出的GMP规格Y-27632能够支持长期、cGMP级别的iPSC规模化培养以及下游分化。

在需要单细胞解离的研究应用中,全新的CEPT混合物则能够提供更多的优势。它在细胞保护方面的能力,已经在多个领域得到应用,包括自动化iPSC培养³⁰、胚状体优化与类器官模型³³、定向神经分化^{31,32}、胎盘发育及功能研究³⁵。更多研究也在不断发掘它在转化研究中的可用性。

CEPT优越的能力与目标特异性为iPSC高效培养提供了强有力的支持,为疾病模型、新药研发、组织工程及再生医药带来了广泛的影响。富士胶片和光纯药新研发的CEPT混合物由四种成分组成,能够提供优越的细胞保护效果以安全高效地进行iPSC重编程、长期细胞培养、单细胞克隆以及基因编辑、胚状体以及类器官形成、细胞冻存以及细胞库建立。

富士胶片集团一直致力于能够促进生物医药研究与应用的各种创新,新推出的iPSC上下游产品研发的综合解决方案专为推动iPSC技术从前临床阶段到商业生产而设计,有助于发挥iPSC在介入治疗以及提供治疗方案的临床潜能。

参考文献

- ¹ Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**(4):663-76, PMID: 16904174, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- ² Moradi S, Mahdizadeh H, Šarić T, Kim J, Harati J, *et al.* 2019. Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Res Ther* **10**(1):341, PMID: 31753034, <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1455-y>.
- ³ Williams LA, Davis-Dusenbery BN, Eggan KC. 2012. Snap-Shot: directed differentiation of pluripotent stem cells. *Cell* **149**(5):1174-1174.e1, PMID: 22632979, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.015>.
- ⁴ Taylor CJ, Bolton EM, Bradley JA. 2011. Immunological considerations for embryonic and induced pluripotent stem cell banking. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**(1575):2312-22, PMID: 21727137, <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0030>.
- ⁵ Doss MX, Sachinidis A. 2019. Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications. *Cells* **8**(5):403, PMID: 31052294, <https://doi.org/10.3390/cells8050403>.
- ⁶ Kim JY, Nam Y, Rim YA, Ju JH. 2022. Review of the current trends in clinical trials involving induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev Rep* **18**(1):142-154, PMID: 34532844, <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10262-3>.
- ⁷ Li MD, Atkins H, Bubela T. 2013. The global landscape of stem cell clinical trials. *Regen Med* **9**(1):27-39, PMID: 24236476, <https://doi.org/10.2217/rme.13.80>.
- ⁸ US Food and Drug Administration (FDA). 2017. FDA announces comprehensive regenerative medicine policy framework [Press Release]. Silver Spring, MD: FDA, Department of Health and Human Services (HHS). <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-announcescomprehensive-regenerative-medicine-policy-framework>. [accessed 26 Jan 2023].
- ⁹ US Food and Drug Administration (FDA). Statement of Organization, Functions, and Delegations of Authority. [Notice]. **87** FR 58806, 58806-7 (effective Sep. 16, 2022). <https://www.federalregister.gov/d/2022-20997>. [accessed 30 Jan 2023].
- ¹⁰ Murphy SL, Xu J, Kochanek KD, Curtin SC, Arias E. 2017. Deaths: Final data for 2015. *Natl Vital Stat Rep* **66**(6):1-75, PMID: 29235985.
- ¹¹ World Health Organization (WHO). 2022. Invisible numbers: the true extent of noncommunicable diseases and what to do about them. [Website]. Geneva, Switzerland: Noncommunicable Diseases | WHO. <https://www.who.int/teams/noncommunicable-diseases/invisible-numbers>. [accessed 23 Jan 2023].
- ¹² Fung M, Yuan Y, Atkins H, Shi Q, Bubela T. 2017. Responsible translation of stem cell research: An assessment of clinical trial registration and publications. *Stem Cell Reports* **8**(5):1190-1201, PMID: 28416287, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.03.013>.
- ¹³ Polaris Market Research. 2021. Induced pluripotent stem cell (iPSC) market share, size, trends, industry analysis report by application (manufacturing, academic research, drug development & discovery, toxicity screening, regenerative medicine); by derived cell; by region, segment & forecast, 2021 – 2028. [Website]. <https://www.polarismarketresearch.com/industry-analysis/induced-pluripotent-stem-cell-ipsc-market>. [accessed 28 Dec 2022].
- ¹⁴ The Business Research Company. 2022. Induced pluripotent stem cell (iPSC) global market report 2022, by derived cell type, by application, by end-user. [Website]. <https://www.research-andmarkets.com/r/mkszf2>. [accessed 29 Dec 2022].
- ¹⁵ Grand View Research. 2023. Induced pluripotent stem cells production market size, share & trends analysis report by process, by workflow (cell culture), by product, by application (regenerative medicine), by end-user, by region, and segment forecasts, 2022 – 2030. [Website]. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/inducedpluripotent-stem-cells-production-market-report>. [accessed 18 Jan 2023].
- ¹⁶ Chen AK, Reuveny S, Oh SK. 2013. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction. *Biotechnol Adv* **31**(7):1032-46, PMID: 23531528, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.03.006>.
- ¹⁷ Chen Y, Tristan CA, Chen L, Jovanovic VM, Malley C, *et al.* 2021. A versatile polypharmacology platform promotes cytoprotection and viability of human pluripotent and differentiated cells. *Nat Methods* **18**(5):528-541, PMID: 33941937, <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01126-2>.
- ¹⁸ Tristan CA, Hong H, Jethmalani Y, Chen Y, Weber C, *et al.* 2023. Efficient and safe single-cell cloning of human pluripotent stem cells using the CEPT cocktail. *Nat Protoc* **18**(1):58-80, PMID: 36261632, <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00753-z>.
- ¹⁹ Bender E. 2021. Stem-cell start-ups seek to crack the mass-production problem. *Nature* **597**(7878): pp. pages 20-21, <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02627-y>.

- ²⁰ Chen KG, Mallon BS, McKay RD, Robey PG. 2014. Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell Stem Cell* **14**(1):13-26, PMID:24388173, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.005>.
- ²¹ Vernardis SI, Terzoudis K, Panoskaltis N, Mantalaris A. 2017. Human embryonic and induced pluripotent stem cells maintain phenotype but alter their metabolism after exposure to ROCK inhibitor. *Sci Rep* **7**:42138, PMID: 28165055, <https://doi.org/10.1038/srep42138>.
- ²² Castro-Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Piñeiro-Ramil M, Rodríguez-Fernández S, López-Baltar I, *et al.* **2021**. Tips and tricks for successfully culturing and adapting human induced pluripotent stem cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* **23**:569-581, PMID: 34901305, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.10.013>.
- ²³ Claassen DA, Desler MM, Rizzino A. 2009. ROCK inhibition enhances the recovery and growth of cryopreserved human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Mol Reprod Dev* **76**(8):722-32, PMID: 19235204, <https://doi.org/10.1002/mrd.21021>.
- ²⁴ Walker A, Su H, Conti MA, Harb N, Adelstein RS, Sato N. 2010. Non-muscle myosin II regulates survival threshold of pluripotent stem cells. *Nat Commun* **1**:71, PMID: 20842192, <https://doi.org/10.1038/ncomms1074>.
- ²⁵ Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, *et al.* 2000. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* **57**(5):976-83, PMID: 10779382, <https://molpharm.aspetjournals.org/content/57/5/976.long>.
- ²⁶ Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, *et al.* 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **25**(6):681-6, PMID: 17529971, <https://doi.org/10.1038/nbt1310>.
- ²⁷ Chen Y, Tristan CA, Chen L, Jovanovic VM, Malley C, *et al.* 2019. A versatile polypharmacology platform promotes cytoprotection and viability of human pluripotent and differentiated cells. bioRxiv [Preprint] 815761, <https://doi.org/10.1101/815761>. Update in *Nat Methods* **18**(5):528-541, PMID: 33941937, <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01126-2>.
- ²⁸ Kurosawa H. 2012. Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* **114**(6):577-81, PMID: 22898436, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.07.013>.
- ²⁹ Chen YT, Vojtkovsky T, Fang X, Pocas JR, Grant W, *et al.* 2011. Asymmetric synthesis of potent chroman-based Rho kinase (ROCK-II) inhibitors. *Med Chem Commun* **2**:73–75, <https://doi.org/10.1039/C0MD00194E>.
- ³⁰ Tristan CA, Ormanoglu P, Slamecka J, Malley C, Chu PH, *et al.* 2020. Robotic high-throughput biomanufacturing and functional differentiation of human pluripotent stem cells. bioRxiv [Preprint] 3:2020.08.03.235242, <https://doi.org/10.1101/2020.08.03.235242>. Update in *Stem Cell Reports* **16**(12):3076-3092, PMID: 32793899, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.11.004>.
- ³¹ Jovanovic VM, Malley C, Tristan CA, Ryu S, Chu PH, *et al.* 2021. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into radial glia and astrocytes bypasses neurogenesis. bioRxiv [Preprint] 2021.08.23.457423, <https://doi.org/10.1101/2021.08.23.457423>.
- ³² Deng T, Tristan CA, Weber C, Chu PH, Ryu S, *et al.* Scalable generation of pseudo-unipolar sensory neurons from human pluripotent stem cells. bioRxiv [Preprint] 2022.03.24.485622, <https://doi.org/10.1101/2022.03.24.485622>.
- ³³ Ryu S, Weber C, Chu PH, Tristan CA, Ernest B. Enhancing the fitness of embryoid bodies and organoids by chemical cytoprotection. bioRxiv [Preprint] 2022.03.21.485225, <https://doi.org/10.1101/2022.03.21.485225>.
- ³⁴ Huang CY, Liu CL, Ting CY, Chiu YT, Cheng YC, *et al.* 2019. Human iPSC banking: barriers and opportunities. *J Biomed Sci* **26**(1):87, PMID: 31660969, <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0578-x>.
- ³⁵ Slamecka J, Tristan CA, Ryu S, Chu PH, Weber C, *et al.* 2022. A comprehensive roadmap of human placental development in vitro. bioRxiv [Preprint] 2022.04.07.487558, <https://doi.org/10.1101/2022.04.07.487558>.

上述试剂仅供实验研究用,不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from FUJIFILM Wako: <https://labchem-wako.fujifilm.com> / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

富士胶片和光(广州)贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼
3002-3003室

北京 Tel: 13611333218

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

询价: wkgz.info@fujifilm.com

官网: labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信



目录价查询

