

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/00

C12N 15/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99805691. X

[43] 公开日 2001 年 6 月 13 日

[11] 公开号 CN 1299408A

[22] 申请日 1999.3.2 [21] 申请号 99805691. X

[30] 优先权

[32] 1998.3.2 [33] US [31] 09/032,945

[86] 国际申请 PCT/US99/04608 1999.3.2

[87] 国际公布 WO99/45100 英 1999.9.10

[85] 进入国家阶段日期 2000.10.31

[71] 申请人 马萨诸塞大学

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 J·罗贝尔 J·西柏利

S·L·史蒂斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 李 瑛

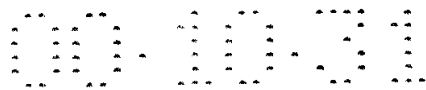
权利要求书 5 页 说明书 32 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 通过异种间的核移植产生的胚细胞或干
细胞样细胞系

[57] 摘要

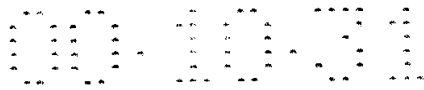
本发明提供了改良的核转移方法,所述方法包括将分化的供体细胞核植入与供体细胞不同种的去核卵母细胞中。所得的核转移单位可用于产生同基因的胚胎干细胞,尤其是人同基因的胚细胞或干细胞。这些胚细胞或干细胞样细胞可用于产生所需的分化细胞,并可用于通过同源重组在所述细胞基因组的特定位点处导入,除去或修饰所需基因。可含有异源基因的这些细胞对细胞移植疗法和体外细胞分化研究特别有用。本发明还提供了通过对供体细胞进行基因修饰而抑制细胞凋亡,选择特定的细胞周期和/或增强胚胎生长和发育而改善核转移效力的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

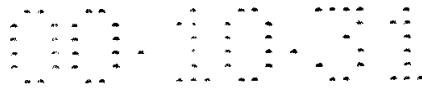


权利要求书

1. 产生胚细胞或干细胞样细胞的方法，所述方法包括下列步骤：
 - (i) 在适于形成核转移 (NT) 单位的条件下，将所需的分化的人或哺乳动物细胞或细胞核插入去核的动物卵母细胞中，其中所述卵母细胞得自与人或哺乳动物细胞不同的动物种；
 - (ii) 激活所得的核转移单位；
 - (iii) 培养所述经激活的核转移单位直至大于 2 细胞发育阶段；和
 - (iv) 培养得自所述经培养的 NT 单位的细胞以获得胚细胞或干细胞样细胞。
2. 权利要求 1 的方法，其中插入去核动物卵母细胞的细胞是人细胞。
3. 权利要求 2 的方法，其中所述人细胞是成年细胞。
4. 权利要求 2 的方法，其中所述人细胞是上皮细胞，角质细胞，淋巴细胞或成纤维细胞。
5. 权利要求 2 的方法，其中卵母细胞得自哺乳动物。
6. 权利要求 5 的方法，其中动物卵母细胞得自具爪动物。
7. 权利要求 6 的方法，其中所述具爪动物选自牛，绵羊，猪，马，狗和野牛。
8. 权利要求 1 的方法，其中去核卵母细胞在去核之前已成熟。
9. 权利要求 1 的方法，其中融合的核转移单位在体外被激活。



10. 权利要求 1 的方法，其中在饲养层培养物上培养激活的核转移单位。
11. 权利要求 10 的方法，其中饲养层含有成纤维细胞。
12. 权利要求 1 的方法，其中的步骤(iv)是在饲养细胞层上培养具有 16 个或更多细胞的 NT 单位中的细胞。
13. 权利要求 12 的方法，其中所述饲养细胞层含有成纤维细胞。
14. 权利要求 13 的方法，其中所述成纤维细胞含有小鼠胚胎成纤维细胞。
15. 权利要求 1 的方法，其中所得胚细胞或干细胞样细胞经诱导可以分化。
16. 权利要求 2 的方法，其中所得胚细胞或干细胞样细胞经诱导可以分化。
17. 权利要求 1 的方法，其中融合是通过电融合实现的。
18. 根据权利要求 1 的方法得到的胚细胞或干细胞样细胞。
19. 根据权利要求 2 的方法得到的人胚细胞或干细胞样细胞。
20. 根据权利要求 3 的方法得到的人胚细胞或干细胞样细胞。
21. 根据权利要求 4 的方法得到的人胚细胞或干细胞样细胞。



22. 根据权利要求 6 的方法得到的人胚细胞或干细胞样细胞。
23. 根据权利要求 7 的方法得到的人胚细胞或干细胞样细胞。
24. 通过权利要求 16 的方法得到的分化的人细胞。
25. 权利要求 24 的分化的人细胞，其选自神经细胞，造血细胞，胰腺细胞，肌细胞，软骨细胞，尿道细胞，肝细胞，脾细胞，生殖细胞，皮肤细胞，肠细胞和胃细胞。
26. 治疗方法，所述方法包括给需要细胞移植疗法的患者施用权利要求 24 的同基因分化的人细胞。
27. 权利要求 26 的方法，其中实施所述细胞移植疗法可治疗的疾病或病症选自帕金森氏病，杭廷顿氏舞蹈病，老年性痴呆，ALS，脊髓缺陷或损伤，多发性硬化，肌营养不良，囊性纤维化，肝病，糖尿病，心脏病，软骨缺陷或损伤，烧伤，足溃疡，血管病，泌尿道病，AIDS 和癌症。
28. 权利要求 26 的方法，其中分化的人细胞是造血细胞或神经细胞。
29. 权利要求 26 的方法，其中的治疗方法可治疗帕金森氏病，分化的细胞是神经细胞。
30. 权利要求 26 的方法，其中的治疗方法可治疗癌症，分化的细胞是造血细胞。
31. 权利要求 24 的分化的人细胞，其含有并表达插入的基因。



32. 权利要求 1 的方法，其中在所述胚细胞或干细胞样细胞中插入，除去或修饰所需基因。
33. 权利要求 32 的方法，其中所需基因编码治疗性的酶，生长因子或细胞因子。
34. 权利要求 32 的方法，其中所述胚细胞或干细胞样细胞是人胚细胞或干细胞样细胞。
35. 权利要求 32 的方法，其中通过同源重组除去，修饰或缺失所需基因。
36. 权利要求 1 的方法，其中对供体细胞进行基因工程改造以破坏内胚层，外胚层和中胚层中的至少一个的发育。
37. 权利要求 1 的方法，其中对供体细胞进行基因修饰以增强分化效力。
38. 权利要求 36 的方法，其中在含有至少一种 capsase 抑制剂的培养基中培养经培养的核转移单位。
39. 权利要求 1 的方法，其中供体细胞表达能显示出特定细胞周期蛋白表达的可测标记。
40. 权利要求 36 的方法，其中供体细胞经修饰后改变了选自下列的基因的表达：SRF，MESP-1，HNF-4， β -1 整联蛋白，MSD，GATA-6，GATA-4，RNA 解旋酶 A 和 H β 58。
41. 权利要求 37 的方法，其中已对所述供体细胞进行基因修饰以导入

可提供 Q7 和/或 Q9 基因表达的 DNA。

42. 权利要求 41 的方法，其中所述基因与可调节的启动子可操作相连。

43. 权利要求 1 的方法，其中供体细胞经基因修饰后可抑制细胞凋亡。

44. 权利要求 43 的方法，其中通过改变选自下列的一个或多个基因的表达可提供减少的细胞凋亡：Bad, Bok, BH3, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, GimL, Bid, EGL-1, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1, Nr-13, BHRF-1, LMW5-HL, ORF16, Ks-Bcl-2, E1B-19K 和 CED-9。

45. 权利要求 44 的方法，其中至少一个所述基因与诱导型启动子可操作相连。

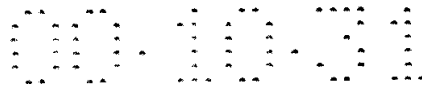
46. 哺乳动物体细胞，所述细胞表达编码可测标记的 DNA，所述可测标记的表达与特定细胞周期蛋白相连。

47. 权利要求 46 的细胞，其中细胞周期蛋白选自细胞周期蛋白 D1, D2, D3, B1, B2, E, A 和 H。

48. 权利要求 46 的细胞，其中可测标记是荧光多肽。

49. 权利要求 48 的细胞，其中所述哺乳动物细胞选自人，灵长类动物，啮齿类动物，具爪动物，狗和猫细胞。

50. 权利要求 48 的细胞，其中所述细胞是人，牛或灵长类动物的细胞。



说明书

通过异种间的核移植产生的胚细胞或干细胞样细胞系

发明领域

本发明一般涉及通过将动物或人细胞的细胞核植入与供体核不同种的动物的去核卵母细胞而产生胚细胞或干细胞样细胞。本发明更具体地涉及通过将灵长类动物或人细胞的核植入去核的动物卵母细胞，如灵长类动物或具爪动物的卵母细胞，在优选的实施方案中为牛去核卵母细胞而产生灵长类动物或人胚细胞或干细胞样细胞。

本发明还涉及所得的胚细胞或干细胞样细胞，优选为灵长类动物或人的胚细胞或干细胞样细胞用于治疗，诊断，产生可用于治疗或诊断的分化细胞，和产生转基因的胚或转基因的分化细胞，细胞系，组织和器官的用途。另外，本发明所得的胚细胞或干细胞样细胞本身也可在用于产生嵌合体或无性系，优选为转基因的克隆或嵌合动物的核移植或核转移方法中用作核供体。

发明背景

在体外，由植入前的小鼠早期胚胎得到胚胎干(ES)细胞系的方法是众所周知的(例见Evans等，自然，29:154-156(1981); Martin, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78:7634-7638(1981))，假如存在成纤维细胞饲养层(Evans等，文献同上)或分化抑制源(Smith等，发育生物学，121:1-9(1987))，ES细胞可以非分化状态被传代。

据报道，ES细胞具有多种用途，例如，ES细胞可用作体外分化模型，尤其是可用作研究参与早期发育调节之基因的体外模型。当将小鼠ES细胞导入植入前的小鼠胚胎时可产生种系嵌合体，从而阐明了其多能性(Bradley等，自然，309:255-256(1984))。

由于ES细胞能将其基因组转移至下一代，因此，ES细胞具有潜在的实用性，通过使用具有或不具有所需基因修饰的ES细胞可以对家畜

进行种系操作。另外，对家畜，如具爪动物而言，从诸如植入前的家畜胚胎中得到的核能支持去核卵母细胞的按期发育 (Smith 等, 生物繁殖, 40:1027-1035(1989); Keefer 等, 生物繁殖, 50:935-939(1994))。这与得自小鼠胚胎的核相反，据报道得自小鼠胚胎的核在转移后的 8-细胞阶段后仍不能支持去核卵母细胞的发育 (Cheong 等, 生物繁殖, 48:958(1993))。因此，得自家畜的 ES 细胞非常合乎需要，因为它们可提供潜在的经基因操作的或要不然可用于核转移法的全能性供体核来源。

一些研究小组已报道了据称为多能性的胚细胞系的分离。例如，据 Notarianni 等, J. Reprod. Fert. Suppl, 43:255-260(1991) 报道，由猪和绵羊胚泡建立了据称为稳定的，多能性的细胞系，其中所述胚泡表现出的一些形态学和生长特性类似于通过免疫切除由绵羊胚泡分离出的内细胞团原代培养物的细胞。另外，Notarianni 等, J. Reprod. Fert. Suppl, 41:51-56 (1990) 公开了得自猪胚泡的推定的多能性胚细胞系的维持和分化。另外，Gerfen 等, 动物生物技术, 6(1):1-14(1995) 公开了由猪胚泡分离胚细胞系。无需使用条件培养基，这些细胞可在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上稳定维持。据报道，这些细胞在培养的过程中分化为几个不同的细胞类型 (Gerfen 等, 文献同上)。

另外，Saito 等, Roux's Arch. Dev. Biol., 201:134-141(1992) 报道了经培养的牛胚胎干细胞-样细胞系，该细胞系可存活 3 代，但第 4 代后即消失。Handyside 等, Roux's Arch. Dev. Biol., 196:185-190(1987) 公开了在允许分离得自小鼠 ICM 的小鼠 ES 细胞系的条件下培养经免疫切除分离的绵羊胚胎内细胞团。据 Handyside 等, (1987) (文献同上) 报道，在上述条件下，绵羊 ICM 附着，扩散和产生 ES 细胞样和内胚层样细胞区域，但经延长培养之后，只有内胚层样细胞清晰可见。

最近，Cherny 等, Theriogenology, 41:175(1994) 报道了可在长期培养物中维持的据称为多能性的衍生自牛原生殖细胞的细胞系。培养约 7 天之后，这些细胞产生了 ES 样集落，其碱性磷酸酶 (AP) 的染色

体移植组织也不容易得到，同种异体移植和异种移植的组织都要遭受移植物排斥。另外，在某些情况下，在移植前对细胞或组织进行基因修饰是有利的。然而，很多经过必需的基因修饰的细胞或组织在培养过程中不能较好地分裂，而大多数的基因转化类型需要快速分裂的细胞。

因此，本领域中显然需要供应人胚细胞或干细胞样非分化的细胞以用于移植以及细胞和基因治疗。

发明目的

本发明的目的是提供新的和改良的产生胚细胞或干细胞样细胞的方法。

本发明更具体的目的是提供新的产生胚细胞或干细胞样细胞的方法，所述方法包括将哺乳动物或人细胞的核植入异种去核卵母细胞中。

本发明的另一个更具体的目的是提供新的产生非人灵长类动物或人胚细胞或干细胞样细胞的方法，所述方法包括将非人灵长类动物或人细胞的核植入去核的动物或人卵母细胞中，如具爪动物，人或灵长类动物去核的卵母细胞中。

本发明的另一个更具体的目的是提供新的产生谱系-缺损的非人灵长类动物或人胚细胞或干细胞样细胞的方法，所述方法包括将非人灵长类动物或人细胞，如成人细胞的核植入去核的非人灵长类动物或人卵母细胞中，其中该细胞经基因改造而不能分化成特定的细胞谱系，或者通过例如表达反义 DNA 或核酶端粒酶基因进行修饰而使细胞变为“死亡的”，从而不能产生存活的后代。

本发明的另一个目的是增强核转移的效力，尤其是通过对核转移所用的供体体细胞进行基因工程改造以提供增强胚胎发育之基因(如 MHC I 家族的基因，尤其是 Ped 基因，如 Q7 和/或 Q9)的表达从而增强通过核转移产生的植入前胚胎的发育。

本发明的另一个目的是通过 IVP 增强核转移胚胎的产生，更具体地

用于基因治疗。

本发明的另一个具体的目的是将本发明体外产生的胚细胞或干细胞样细胞用于例如研究细胞分化和检测用途(如用于药物研究)。

本发明的另一个目的是提供改良的移植疗法,所述方法包括使用由本发明产生的胚细胞或干细胞样细胞产生的等基因或同基因细胞,组织或器官。所述疗法可以治疗的疾病包括例如:帕金森氏病,杭廷顿氏舞蹈病,早老性痴呆,ALS,脊髓损伤,多发性硬化,肌营养不良,糖尿病,肝病,心脏病,软骨替换,烧伤,血管病,泌尿道病,以及免疫缺损,骨髓移植,癌症等疾病。

本发明的另一个目的是将本发明产生的转基因的或经基因改造的胚细胞或干细胞样细胞用于基因治疗,尤其是用于治疗 and/或预防上述疾病和损伤。

本发明的另一个目的是将本发明产生的胚细胞或干细胞样细胞或本发明产生的转基因的或经基因改造的胚细胞或干细胞样细胞用作核移植中所用的核供体。

本发明的另一个目的是使用本发明产生的经基因改造的ES细胞来产生转基因动物,如非人灵长类动物,啮齿类动物,具爪动物等。所述转基因动物可用于产生例如研究人类疾病或生产所需多肽,如治疗剂或营养药物所需的动物模型。

本发明的上述和其它目的,优点和特征将在下文中具体体现,因此,参照下列有关本发明优选实施方案的详细描述和所附权利要求书将会更清楚地理解本发明的特征。

附图简述

图1是通过将成人细胞转移至去核的牛卵母细胞中而产生的核转移(NT)单位的照片。

图2至5是得自图1所示NT单位的胚胎干细胞样细胞的照片。

发明详述

本发明提供了通过核转移或核移植产生胚细胞或干细胞样细胞，更具体地为非人灵长类动物或人的胚细胞或干细胞样细胞的新方法。在本申请中，核转移或核移植或 NT 可以互换使用。

如上所述，通过核转移或核移植分离真正的胚细胞或干细胞样细胞尚无人报道。相反，以前报道的 ES-样细胞分离自受精的胚胎。另外，从未有人报道过包括基因不相似的种的细胞或 DNA，更具体地为包括一个种(如人)的成年细胞或 DNA 和另一个不相关种的卵母细胞的成功核转移。相反，尽管有人报道通过融合密切相关种的细胞产生了胚胎，如牛-山羊和牛-野牛，但它们不能产生 ES 细胞(Wolfe 等, Theriogenology, 33(1):350(1990))。另外，也无人报道过由非胎儿组织来源产生灵长类动物或人的 ES 细胞的方法。相反，目前可以得到的有限的人胎儿细胞和组织必须得自或衍生自自发流产的组织 and 流产的胎儿。

在本发明之前，无人可通过异种间的核移植得到胚细胞或干细胞样细胞。

本发明人十分出乎意料地发现通过将人细胞(如成年分化的人细胞)的核植入去核的动物卵母细胞中，用于产生核转移(NT)单位，其中的细胞通过培养可产生人胚细胞或干细胞样细胞和细胞集落，即可得到人胚细胞或干细胞样细胞和细胞集落。此结果非常令人惊奇，因为该结果首次阐明了有效的异种间核移植，它包括将分化的供体细胞或核导入基因上不相似的种的去核卵母细胞，例如将分化的动物或人细胞，如成年细胞的细胞核植入不同动物种的去核卵中以产生核转移单位，当在适当条件下培养其中所含的细胞时即可产生胚细胞或干细胞样细胞和细胞集落。

优选将用于产生 ES 样细胞的 NT 单位培养至大小至少为 2 至 400 个细胞，更优选为 4 至 128 个细胞，最优选大小至少约为 50 个细胞。

在本发明中，胚细胞或干细胞样细胞指的是本发明产生的细胞。本申请中将这些细胞称为干细胞样细胞而不是干细胞的原因是它们一般是通过异种间的核转移产生的。尽管预期这些细胞具有与正常干细胞

相似的分化能力，但由于它们产生的方式的特殊性而使它们也具有一些不显著的差异。例如，这些干细胞样细胞具有核转移所用卵母细胞的线粒体，因此，其行为方式与常规的胚胎干细胞不同。

本发现基于下列观察结果：将成人细胞，尤其是得自人供体口腔的人上皮细胞的细胞核植入去核的牛卵母细胞时，导致形成核转移单位，通过培养其中的细胞可产生人干细胞样细胞或胚细胞和人胚细胞或干细胞样细胞集落。最近，通过将成人角质细胞植入去核的牛卵母细胞中，成功地产生了胚泡和 ES 细胞系而再现了上述结果。根据上述结果，本发明人提出下列假说，即牛卵母细胞和人卵母细胞和可能是普遍的哺乳动物卵母细胞在胚胎发育过程中必须经过成熟的过程，该成熟过程足够相似或保守以使牛卵母细胞能用作人卵母细胞的有效替代物。显然，卵母细胞实际上普遍含有蛋白质或核酸类因子，可在适当条件下诱导胚胎发育，不同种中的这些功能相同或非常类似。这些因子可含有物质 RNA 和/或端粒酶。

根据人细胞核可有效植入牛卵母细胞这一事实，可合理地预期人细胞可植入其它非相关种，如其它具爪动物以及其它动物的卵母细胞中。尤其是，其它具爪动物的卵母细胞应该是适合的，例如猪，绵羊，马，山羊等。另外，其它来源的卵母细胞应该是适合的，例如得自其它灵长类动物，两栖类动物，啮齿类动物，兔，豚鼠等的卵母细胞。另外，使用类似的方法，应该可以将人细胞或细胞核转移至人卵母细胞中并使用所得的胚细胞产生人 ES 细胞。

因此，在最宽的实施方案中，本发明包括通过注射或融合将动物或人细胞核或动物或人细胞植入不同于供体核之动物种的去核卵母细胞中以产生 NT 单位，该 NT 单位中所含的细胞可用于得到胚细胞或干细胞样细胞和/或细胞培养物。例如，本发明包括通过注射或融合将具爪动物的细胞核或具爪动物的细胞植入另一种，如另一种具爪动物或非具爪动物的去核卵母细胞中，细胞和/或核混合产生 NT 单位，在适当条件下培养 NT 单位的细胞可得到多细胞的 NT 单位，优选其含有至少约 2 至 400 个细胞，更优选为 4 至 128 个细胞，最优选至少约为 50

个细胞。该 NT 单位的细胞经培养后可用于产生胚细胞或干细胞样细胞或细胞集落。

然而，本发明的优选实施方案包括：通过将供体人细胞的核或人细胞植入去核的人，灵长类动物或非灵长类动物的卵母细胞，如具爪动物的卵母细胞，在优选实施方案中为牛去核的卵母细胞中而产生非人灵长类动物或人胚细胞或干细胞样细胞。

通常，可通过包括下列步骤的核转移方法产生胚细胞或干细胞样细胞：

(i) 得到所需的人或动物细胞以用作供体核的来源（可对其进行基因修饰）；

(ii) 从适当来源，如哺乳动物和最优选为灵长类动物或具爪动物来源，如牛得到卵母细胞；

(iii) 使所述卵母细胞去核；

(iv) 通过融合或注射将人或动物细胞或核转移至不同于供体细胞或核之动物种的去核的卵母细胞中；

(v) 培养所得的 NT 产物或 NT 单位以产生多细胞结构；和

(vi) 培养得自所述胚胎的细胞以得到胚细胞或干细胞样细胞和干细胞样细胞集落。

核转移技术或核移植技术已在文献中公开并描述于发明背景中提及的很多参考文献中。例见 Campbell 等，*Theriogenology*, 43:181(1995)；Collas 等，*Mol. Report Dev.*, 38:264-267 (1994)；Keefe 等，*生物繁殖*, 50:935-939(1994)；Sims 等，*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:6143-6147(1993)；W0 94/26884；W094/24274 和 W090/03432(皆全文列入本文作为参考)。另外，美国专利 4,944,384 和 5,057,420 中描述了牛核移植的方法，该方法也见 Cibelli 等，*科学*, Vol. 280:1256-1258(1998)。

通过众所周知的方法可得到和培养人或动物细胞，优选为哺乳动物细胞。可用于本发明的人和动物细胞包括例如上皮细胞，神经细胞，表皮细胞，角质细胞，造血细胞，黑素细胞，软骨细胞，淋巴细胞(B

和 T 淋巴细胞), 其它免疫细胞, 红细胞, 巨噬细胞, 黑素细胞, 单核细胞, 成纤维细胞, 心肌细胞和其它肌细胞等。另外, 用于核转移的人细胞可得自不同器官, 如皮肤, 肺, 胰腺, 肝脏, 胃, 肠, 心脏, 生殖器官, 膀胱, 肾脏, 尿道和其它泌尿器官等。这些只是适当供体细胞的例子。适当供体细胞, 即可用于本发明的细胞可得自身体的任何细胞或器官, 它包括所有体细胞或生殖细胞。优选地, 供体细胞或核可含有活跃分裂的, 即非休眠的细胞, 因为据报道这样可以增强克隆效力。另外, 也优选这种供体细胞处于 G1 细胞周期。

根据 Thomson 等, 科学, 282:1145-1147(1998)和 Thomson 等., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 92: 7544-7848(1995)(皆全文列入本文作为参考)报道的培养方法, 可使用所得的胚细胞得到胚胎干细胞系。

可用作核转移供体的细胞的例子是得自人供体口腔的上皮细胞和成人角质细胞。然而, 如上文所讨论的, 公开的方法也适用于其它人细胞或核。另外, 细胞核可得自人体细胞和生殖细胞。

也可以在核转移之前, 使用本领域已知的适当技术使供体细胞停滞于有丝分裂阶段。将细胞周期终止于不同阶段的方法详细描述于美国专利 5, 262, 409(列入本文作为参考)。具体地说, 尽管据报道环己酰亚胺对有丝分裂具有抑制作用(Bowen 和 Wilson(1995) J. Heredity 45:3-9), 但当其与电脉冲处理联合使用时, 仍可用于改善对成熟的牛泡内卵母细胞的激活(Yang 等(1992), 生物繁殖, 42(Suppl. 1):117)。

接合子基因激活与组蛋白 H4 的超乙酰化有关。与其它化合物一样, 制滴菌素-A 能以可逆的方式抑制组蛋白脱乙酰基酶(Adenot 等, 在 1-细胞小鼠胚胎的原核中, 父本和母本染色质的差异性的 H4 乙酰化优先于 DNA 复制和示差转录活性, 发育(1997, 11) 124(22):4615-4625; Yoshida 等, 制滴菌素 A 和 trapoxin: 探测组蛋白乙酰化对染色质结构和功能之作用的新的化学探针(1995, 5) 17(5):423-430)。

例如，据信丁酸也可通过抑制组蛋白脱乙酰基酶而导致组蛋白的超乙酰化。一般说来，丁酸似乎能修饰基因表达，在几乎所有的情况下，在培养的细胞中加入丁酸似乎能抑制细胞生长。丁酸在此方面的用途描述于美国专利 5,681,718(列入本文作为参考)。因此，在融合之前可将供体细胞暴露于制滴菌素 A 或另一种适当的脱乙酰基酶抑制剂中，或者在激活基因组之前将这种化合物加入培养基中。

另外，据认为，转录因子适当接近 DNA 调节序列也需要 DNA 的脱甲基化。已有人描述了 DNA 从植入前胚胎的 8 细胞阶段至胚泡阶段的完全脱甲基化(Stein 等, Mol. Reprod. & Dev. 47(4):421-429)。另外，据 Jaenisch 等(1997)报道，可使用 5-氮胞苷降低细胞中的 DNA 甲基化水平，潜在地导致转录因子更易于接近 DNA 调节序列。因此，可在融合前将供体细胞暴露于 5-氮胞苷(5-Aza)，或从 8 细胞阶段至胚泡阶段在培养基中加入 5-Aza。或者，也可使用其它已知的方法来实现 DNA 的脱甲基化。

用于核转移的卵母细胞可得自包括哺乳动物和两栖类动物的动物。卵母细胞适当的哺乳动物来源包括羊，牛，绵羊，猪，马，兔，山羊，豚鼠，小鼠，仓鼠，大鼠，灵长类动物，人等。在优选的实施方案中，卵母细胞得自灵长类动物或具爪动物，如牛。

分离卵母细胞的方法是本领域众所周知的。实质上，该方法包括从哺乳动物或两栖类动物，如牛的卵巢或生殖道中分离卵母细胞。牛卵母细胞易于获得的来源是屠宰场。

为了成功地使用诸如基因工程，核转移和克隆的技术，一般必须将在卵母细胞用作核转移的受体细胞之前，或在卵母细胞与精细胞受精以发育成胚胎之前，在体外使卵母细胞成熟。该方法一般需要从动物卵巢(如在屠宰场得到的牛卵巢)中收集不成熟(前期 I)的卵母细胞，并于受精或去核之前在成熟培养基中使卵母细胞成熟直至卵母细胞达到中期 II 阶段，对牛卵母细胞而言，该阶段一般发生在吸出后约 18 至 24 小时。本发明中将这段时间称为“成熟期”。为了计算时间，本文所用的“吸出”指的是从卵泡中吸出不成熟的卵母细胞。

另外，核转移技术中成功使用了已在体内成熟的中期 II 阶段的卵母细胞。实质上，可通过外科手术从开始发情后或注射人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 或类似激素之后 35 至 48 小时的未超排卵或超排卵的奶牛或小母牛体内采集成熟的中期 II 卵母细胞。

据报道，去核和核转移时使卵母细胞成熟对 NT 法成功意义重大 (例见 Prather 等, 分化, 48:1-8, 1991)。一般说来, 以前成功的哺乳动物胚胎克隆实践使用中期 II 阶段的卵母细胞作为受体卵母细胞, 因为据信在此阶段, 卵母细胞可以被或足以被“激活”以象处理受精的精子一样处理导入的核。对家畜, 尤其是牛而言, 卵母细胞的激活期一般在吸出后约 16-52 小时, 优选约 28-42 小时。

例如, 可按 Seshagine 等, 生物繁殖, 40, 544-606, 1989 所述用 HEPES 缓冲的仓鼠胚胎培养基 (HECM) 洗涤不成熟的卵母细胞, 然后于 39°C, 将卵母细胞置于数滴成熟培养基中, 该培养基由 50 μ l 含有 10% 胎牛血清的组织培养基 (TCM) 199 组成, 其中还含有适当的促性腺素, 如促黄体素 (LH) 和促滤泡激素 (FSH) 和雌二醇, 所述培养基上覆盖了一层轻量石蜡或硅。

在时间固定不变的成熟期之后, 一般约为 10 至 40 小时, 优选约为 16 至 18 小时之后, 使卵母细胞去核。在去核之前, 优选取出卵母细胞, 并在取出一堆细胞之前将其置于含有 1mg 透明质酸酶/ml 的 HECM 中。通过重复地用孔非常细的移液管进行移液或通过短暂地涡旋可以实现此目的。然后筛选剥离的卵母细胞的极体, 选择通过极体的存在测定的中期 II 卵母细胞, 然后用于核转移。按下述进行去核。

通过如美国专利 4, 994, 384 (列入本文作为参考) 所述的已知方法可进行去核。例如, 将中期 II 卵母细胞置于任选含有 7.5 μ g 松胞菌素 B/ml 的 HECM 中立即去核, 或者将所述卵母细胞置于含有 10% 发情期奶牛血清的适当培养基, 如 CR1aa 中, 随后再进行去核, 优选不超过 24 小时之后, 更优选在 16 至 18 小时之后进行去核。

使用显微外科技术, 用微型移液管除去极体和邻近的胞质即可实现去核的目的, 然后进行筛选以鉴定出已被成功去核的卵母细胞。通过

用 1 μ g 33342 Hoechst 染料/ml HECM 染色卵母细胞以进行筛选，然后在紫外光照射(少于 10 秒)下观察卵母细胞，将已成功去核的卵母细胞置于适当培养基中。

在本发明中，优选在体外成熟开始之后约 10 小时至约 40 小时，更优选在体外成熟开始之后约 16 小时至约 24 小时，最优选在体外成熟开始之后约 16 至 18 小时使受体卵母细胞去核。

然后将一般异源于去核卵母细胞的单个动物或人细胞或细胞核转移至去核卵母细胞的卵周隙，以用于产生 NT 单位。可根据本领域已知的方法，使用动物或人细胞或细胞核和去核的卵母细胞产生 NT 单位。例如，可通过电融合融合细胞。通过提供足以导致质膜瞬时击穿的电脉冲即可完成电融合。质膜的击穿非常短暂，因为膜能快速地重新形成。实质上，如果两个邻接的膜被诱导击穿的话，通过重新形成脂质双层混合体，两个细胞之间的小通道即可开放。由于小开口在热力学上的不稳定性，它会扩大直至两个细胞变成一个细胞。有关此方法的进一步讨论可参照 Prather 等的美国专利 4,997,384(全文列入本文作为参考)。可使用多种电融合介质，包括例如蔗糖，甘露糖醇，山梨糖醇和磷酸盐缓冲溶液。也可使用仙台病毒为融合剂进行融合(Graham, Wister Inot. Symp. Monogr., 9, 19, 1969)。

在某些情况下(如供体核较小)，优选将核直接注射至卵母细胞而不是使用电穿孔融合。该技术公开于 Collas 和 Barnes, Mol. Reprod. Dev., 38:264-267(1994)(全文列入本文作为参考)。

优选地，在卵母细胞开始成熟之后约 24 小时，通过使用 90-120V 的电脉冲约 15 微秒，在 500 μ m 的槽中电融合人或动物细胞和卵母细胞。融合之后，将所得融合的 NT 单位置于适当培养基中直至激活，如下文所鉴定的激活。一般很快即可激活，一般在少于 24 小时之后，优选约在 4 至 9 小时之后即可激活。

通过已知方法可激活 NT 单位，所述方法包括例如在低于生理温度下培养 NT 单位，实质上是对 NT 单位实施冷的，或实际上凉的温度休克。通过在室温下培养 NT 单位可最方便地实现这一目的，因为室温比

胚胎正常暴露的生理温度条件更低。

或者，使用已知的激活剂进行激活。例如，已证实精子在受精过程中穿入卵母细胞可激活预融合的卵母细胞，在核转移之后产生更多数目的活的妊娠和多个基因相同的小牛。诸如电和化学休克的处理或环己酰亚胺处理也可用于激活融合后的 NT 胚胎。适当的卵母细胞激活法是 Susko-Parrish 等的美国专利 5,496,720 (列入本文作为参考) 的主题。

例如，通过同时或依次进行下列步骤即可激活卵母细胞：

- (i) 增加卵母细胞中的二价阳离子水平，和
- (ii) 降低卵母细胞中的细胞蛋白质的磷酸化。

通过以离子载体的形式，将二价阳离子，如镁，锶，钡或钙导入卵母细胞的胞质中一般即可实现上述目的。增加二价阳离子水平的其它方法包括使用电休克，乙醇处理和笼形螯合剂处理。

通过已知方法可降低磷酸化，例如通过加入激酶抑制剂，如丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂，如 6-二甲基-氨基-嘌呤，星形孢菌素，2-氨基嘌呤和鞘氨醇。

或者，通过将磷酸酶，如磷酸酶 2A 和磷酸酶 2B 导入卵母细胞中也可抑制细胞蛋白质的磷酸化。

可在适当的体外培养基中培养激活的 NT 单位直至产生胚细胞或干细胞样细胞和细胞集落。适于培养和使胚胎成熟的培养基是本领域众所周知的。可用于培养和维持牛胚胎的已知培养基的例子包括 Ham's F-10 + 10%胎牛血清 (FCS)，组织培养基-199 (TCM-199) + 10%胎牛血清，Tyrodes-白蛋白-乳酸盐-丙酮酸盐 (TALP)，Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水 (PBS)，Eagle's 和 Whitten's 培养基。用于收集卵母细胞并使其成熟的一个最常用的培养基是 TCM-199，其中添加的 1 至 20%血清包括胎牛血清，新生儿血清，发情期的奶牛血清，羔羊血清或小公牛血清。优选的维持培养基包括含有 Earl 盐，10%胎牛血清，0.2MM Ma 丙酮酸盐和 50µg/ml 硫酸庆大霉素的 TCM-199。上述任何培养基也包括与多种细胞类型的共培养，所述细胞如颗粒细胞，输卵管细胞，BRL

能分化成特定的细胞谱系即可实现上述目的。具体地说，可对细胞进行基因修饰，以使当该细胞用作核转移供体时，所得“胚胎”不含有或基本上缺乏中胚层，内胚层或外胚层组织中的至少一个。

希望通过敲除或破坏一个或多个中胚层，内胚层或外胚层特定基因的表达来实现上述目的，所述基因的例子包括：

中胚层：SRF, MESP-1, HNF-4, β -1 整联蛋白, MSD;

内胚层：GATA-6, GATA-4;

外胚层：RNA 解旋酶 A, H β 58.

上面列出的是参与中胚层，内胚层和外胚层发育之已知基因的非限制性例子。以前的文献中报道了中胚层缺损，内胚层缺损和外胚层缺损细胞和胚胎的产生。例见 Arsenian 等，EMBO J., Vol. 17(2):6289-6299(1998); Saga Y, Mech. Dev., Vol. 75(1-2):53-66(1998); Holdener 等，发育，Vol. 120(5):1355-1346(1994); Chen 等，Genes Dev. Vol. 8(20):2466-2477(1994); Rohwedel 等，发育生物学，201(2):167-189(1998) (中胚层); Morrissey 等，Genes Dev. Vol. 12(22): 3579-3590(1998); Soudais 等，发育，Vol. 121(11):3877-3888(1995) (内胚层); 和 Lee 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95:(23):13709-13713(1998); 和 Radice 等，发育，Vol. 111(3):801-811(1991) (外胚层)。

一般说来，可对所需体细胞，如人角质细胞，上皮细胞或成纤维细胞进行基因工程改造以使一个或多个特异于特定细胞谱系的基因被“敲除”和/或所述基因的表达被显著削弱。通过已知方法，如同源重组可实现此目的。“敲除”所需基因所用的优选基因系统公开于 Capecchi 等的美国专利 5,631,153 和 5,464,764，其中报道了正-负选择(PNS)载体，该载体能靶向修饰所需哺乳动物基因组中的 DNA 序列。这种基因修饰可导致细胞当用作核转移供体时不能分化成特定的细胞谱系。

经基因修饰的细胞可用于产生谱系-缺损的核转移胚胎，即该胚胎不能产生至少一个功能性的中胚层，内胚层或外胚层。因此，即使将

在蛋白途径迅速破坏上述细胞周期蛋白的蛋白质的一部分(Adams 等, 科学, 281(5321):1322-1326 (1998))。

在本发明中, 可构建供体细胞, 使其在易于检测的条件下(优选肉眼可见, 如通过使用荧光标记)表达一个或多个上述细胞周期蛋白基因。例如, 可将特定的细胞周期蛋白 DNA 与调节序列以及可测标记, 如绿色荧光蛋白(GFP)可操作相连, 后面再连接细胞周期蛋白破坏盒, 并任选连接有隔离序列以增强细胞周期蛋白和/或标记蛋白的表达。藉此, 易于用肉眼检测和选择所需细胞周期的细胞并将其用作核转移供体。例如, 为了选择处于 G1 期的细胞, 需使用细胞周期蛋白 D1 基因。然而, 任何细胞周期蛋白基因都应适用于本发明(例见 King 等, 细胞分子生物学, Vol. 7(9):1343-1357(1996))。

本发明的另一方面是增强核转移效力的方法, 优选为增强异种间核转移效力的方法。尽管本发明人已阐明当将一个种的细胞核或细胞插入或融合于另一个种的去核卵母细胞时可得到能产生胚泡的核转移胚胎, 所述胚胎能产生 ES 细胞系, 此方法的效力十分低。因此, 一般需要进行很多次融合来产生胚泡, 培养所述胚泡的细胞才能产生 ES 细胞和 ES 细胞系。

另一种增强核转移胚胎之体外发育的方法是使培养条件最优化。获得此结果的一个方法是在阻止细胞凋亡的条件下培养 NT 胚胎。关于本发明的此实施方案, 已发现诸如 capsases 的蛋白酶可通过类似于其它细胞类型的细胞凋亡导致卵母细胞死亡(例见 Jurisicosva 等, Mol. Reprod. Devel., 51(3):243-253(1998))。

希望通过在用于核转移和维持胚泡或培养植入前期的胚胎的培养基中加入一种或多种 capsase 抑制剂来增强胚泡的发育。所述抑制剂包括例如 capsase-4 抑制剂 I, capsase-3 抑制剂 I, capsase-6 抑制剂 II, capsase-9 抑制剂 II 和 capsase-1 抑制剂 I, 其量是能有效抑制细胞凋亡的量, 如占培养基重量的 0.00001 至 5.0%; 更优选占培养基重量的 0.01% 至 1.0%。因此, 可使用上述方法, 通过增强胚泡和胚胎随后在组织培养中的发育来提高核转移的效力。

得到所需大小的 NT 单位之后，用器械从区带(zone)中取出细胞，然后用于产生胚细胞或干细胞样细胞和细胞系。优选通过下列步骤实现此目的，即取出含有 NT 单位的细胞团，其一般含有至少约 50 个细胞，洗涤该细胞，将细胞铺于饲养层，如经照射的成纤维细胞上。用于得到干细胞样细胞或细胞集落的细胞一般得自经培养的 NT 单位的内层绝大部分，其大小优选为至少 50 个细胞。然而，细胞数目较小或较大的 NT 单位以及得自 NT 单位其它部分的细胞也可用于得到 ES-样细胞和细胞集落。

将供体细胞 DNA 在卵母细胞的胞质溶胶中暴露较长时间将有利于去分化的过程。在此方面，通过从重构的胚胎中取出卵裂球并将其与新去核的卵母细胞融合即可实现再克隆。或者，可将供体细胞与去核的卵母细胞融合，4 至 6 小时之后，无需激活，取出染色体并与较年幼的卵母细胞融合，随后再进行激活。

在适当生长培养基，如添加有 10% FCS 和 0.1mM β -巯基乙醇(Sigma)和 L-谷氨酰胺的 α MEM 中的饲养层中维持细胞。按需要经常更换生长培养基以使生长最优化，如约每隔 2 至 3 天更换一次培养基。

这种培养方法可以形成胚细胞或干细胞样细胞或细胞系。对衍生自人细胞/牛卵母细胞的 NT 胚胎而言，在 α MEM 培养基中培养约 1 天多即可观察到集落。然而，随着特定的核供体细胞，特定的卵母细胞和培养条件的不同，培养时间也有所不同。本领域技术人员在必要时可改变培养条件以使特定胚细胞或干细胞样细胞的生长最优化。

所得胚细胞或干细胞样细胞和细胞集落表现出来的外观与用作核细胞供体之种而不是用作供体卵母细胞之种的胚细胞或干细胞样细胞类似。例如，对于通过将人核供体细胞转移至去核的牛卵母细胞得到的胚细胞或干细胞样细胞而言，细胞现出的形态更类似于小鼠胚胎干细胞而不是牛 ES-样细胞。

更具体地说，尚未较详尽地定义人 ES-系细胞集落的各个细胞，所述集落的周边可以折射且外表光滑。另外，细胞集落的倍增时间较长，约为小鼠 ES 细胞的两倍。与衍生自牛和猪的 ES 细胞不同的是，所述

集落不具有上皮细胞样外观。

如上所述，据 Thomson 在美国专利 5,843,780 中的报道，灵长类动物干细胞是 SSEA-1(-)，SSEA-4(+), TRA-1-60(+), TRA-1-81(+) 和碱性磷酸酶(+)。希望根据本发明方法产生的人和灵长类动物 ES 细胞能表现出类似的或相同的标记物表达。

或者，可根据细胞产生所有中胚层，外胚层和内胚层组织的能力证实该细胞确实是人或灵长类动物胚胎干细胞。通过在适当条件下培养本发明产生的 ES 细胞即可阐明这一点，所述培养条件公开于例如 Thomson 的美国专利 5,843,780(列入本文作为参考)。

所得的胚细胞或干细胞样细胞和细胞系，优选为人胚细胞或干细胞样细胞和细胞系具有多种治疗和诊断应用。最特别的是，所述胚细胞或干细胞样细胞可用于细胞移植疗法。人胚细胞或干细胞样细胞可用于治疗多种疾病。

在此方面，已知小鼠胚胎干(ES)细胞几乎能分化成任何细胞类型，如造血干细胞。因此，本发明产生的人胚细胞或干细胞样细胞应该具有类似的分化能力。可根据已知方法诱导本发明的胚细胞或干细胞样细胞以分化得到所需的细胞类型。例如，通过在分化培养基中并在允许细胞分化的条件下培养本发明的胚细胞或干细胞样细胞，即可诱导其分化产生造血干细胞，肌细胞，心肌细胞，肝细胞，软骨细胞，上皮细胞，尿道细胞等。导致胚胎干细胞分化的培养基和方法是本领域的已知方法，适当的培养条件也是本领域众所周知的。

例如，Palacios 等，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:7530-7537(1995)公开了通过对干细胞进行诱导而由胚细胞系产生造血干细胞，所述诱导法包括：起初在缺乏视黄酸的悬浮培养基中培养干细胞聚集体，接着在含有视黄酸的相同培养基中进行培养，然后将细胞聚集体转移至可提供细胞附着的底物中。

另外，Pedersen. J. Reprod. Fertil. Dev., 6:543-552(1994)是一篇综述，该文中提到的多篇论文公开了体外分化胚胎干细胞以产生多种分化细胞类型的分化，所述细胞类型包括造血细胞，肌细胞，

心肌细胞，神经细胞等。

另外，Bain 等，发育生物学，168:342-357(1995)公开了体外分化胚胎干细胞以产生具有神经元特性的神经细胞的方法。这些参考文献是已报道的由胚细胞或干细胞样细胞获得分化细胞的方法的例子。这些参考文献，尤其是其中公开的有关分化胚胎干细胞之方法的内容都全文列入本文作为参考。

因此，本领域技术人员使用已知方法和培养基可培养本发明的胚细胞或干细胞样细胞以得到所需的分化细胞类型，如神经细胞，肌细胞，造血细胞等。

另外，使用可诱导的 Bcl-2 或 Bcl-x1 对增强特定细胞谱系的体外发育可能是有用的。在体内，Bcl-2 可防止淋巴和神经发育过程中的很多(但不是全部的)细胞凋亡型细胞死亡。美国专利 5,646,008(列入本文作为参考)中详细讨论了在转染供体细胞之后，如何将 Bcl-2 的表达用于抑制相关细胞谱系的细胞凋亡。

可使用本发明的胚细胞或干细胞样细胞得到任何所需的分化细胞类型。这种分化的人细胞的治疗用途是无与伦比的。例如，在需要骨髓移植的治疗过程中可使用人造造血干细胞。可使用该方法治疗很多种疾病，例如晚期癌症(卵巢癌和白血病)以及危及免疫系统的疾病，如 AIDS。通过例如将癌症或 AIDS 患者的成年体细胞，如上皮细胞或淋巴细胞与去核的卵母细胞，如牛卵母细胞融合，得到上文所述的胚细胞或干细胞样细胞，并在有利于分化的条件下培养该细胞直至获得造血干细胞，籍此可得到造血干细胞。可使用这种造血干细胞治疗包括癌症和 AIDS 的疾病。

或者，可将神经病患者的成年体细胞与去核的动物卵母细胞，如灵长类动物或牛卵母细胞融合，从中得到人胚细胞或干细胞样细胞，在分化条件下培养该细胞以产生神经细胞系。通过移植这种人神经细胞可以治疗的特定疾病包括例如：帕金森氏病，老年性痴呆，ALS 和大脑麻痹等。具体到帕金森氏病，已阐明植入的胎儿脑神经细胞可与周围的细胞建立良好的联系并可产生多巴胺，这样就可以长期逆转帕

金森氏病的症状。

为了特异性选择分化细胞，可用经由诱导型启动子表达的选择标记转染供体细胞，当诱导分化时即可选择或富集特定的细胞谱系。例如，可使用 CD34-neo 选择造血干细胞，Pw1-neo 选择肌细胞，Mash-1-neo 选择交感神经元，Mal-neo 选择人大脑皮层灰质的 CNS 神经元等。

本发明的一大优点是实质上可无限量地供应适于移植的等基因或同基因的人细胞。因此，可以避免目前的移植方法所带来的严重问题，即由于宿主抗移植物或移植物抗宿主排斥而发生的对移植组织的排斥现象。通常，通过施用诸如环孢菌素的抗排斥药物即可预防或减轻排斥现象。然而，所述药物具有显著有害的副作用，如免疫抑制，致癌特性并且非常昂贵。本发明应该能消除或至少大大降低对抗排斥药物的需求。

等基因细胞疗法可以治疗的其它疾病和病症包括例如脊髓损伤，多发性硬化，肌营养不良，糖尿病，肝病，即高胆固醇血症，心脏病，软骨替换，烧伤，足溃疡，胃肠病，血管病，肾病，泌尿道病和与年龄增大有关的疾病和病症。

本发明产生的人胚细胞或干细胞样细胞可用于产生经基因工程改造的或转基因的人分化细胞。实质上，通过导入所需的一个或多个基因(所述基因可以是异源基因)，或除去本发明产生的人胚细胞或干细胞样细胞的全部或部分内源性基因，使该细胞分化成所需的细胞类型即可达到上述目的。获得这种修饰的优选方法是通过同源重组，因为可使用该技术插入，缺失或修饰干细胞样细胞基因组之一个或多个特定位点处的一个或多个基因。

可使用该方法学取代缺损基因，例如缺损的免疫系统基因，囊性纤维化基因，或导入导致具有治疗作用之蛋白质的表达的基因，所述蛋白质如生长因子，淋巴因子，细胞因子，酶等。例如，可将编码得自脑的生长因子的基因导入人胚细胞或干细胞样细胞，细胞分化成神经细胞，将该细胞植入帕金森氏病患者体内可阻止患病过程中神经细胞的损失。

患者的治疗性细胞。例如，被胸苷激酶(TK)基因转染的供体细胞可导致产生含有TK基因的胚细胞。这些细胞的分化可导致也表达TK基因的所需治疗性细胞的分离。通过施用9-(1,3-二羟-2-丙氧甲基)鸟嘌呤可在任何时间从患者体内选择性清除治疗性细胞。该负选择系统描述于美国专利5,698,446(列入本文作为参考)。

本发明的胚细胞或干细胞样细胞，优选为人细胞也可用作体外分化模型，尤其是用于研究参与调节早期发育的基因。

使用本发明的胚细胞或干细胞样细胞得到的分化细胞组织和器官也可用于药物研究。

另外，本发明的胚细胞或干细胞样细胞可用作核供体以产生其它胚细胞或干细胞样细胞和细胞集落。

为了更清楚地描述本发明，特给出下列实施例。

实施例 1

材料和方法

核转移所用的供体细胞

用标准的玻璃载玻片从愿意接受实验的成人口腔内壁轻轻刮取上皮细胞。将细胞从玻片上洗入含有磷酸盐缓冲盐水但不含Ca或Mg的培养皿中。用小孔移液管重复吸取细胞，从而将细胞团打散成单细胞悬浮液。然后将细胞转移至覆盖有油层的含有10%胎牛血清(FCS)的TL-HEPES培养基微滴中，以用于对去核的牛卵母细胞进行核转移。

核转移方法

以前曾描述过基本的核转移方法。简单地说，在体外使得自屠宰场的卵母细胞成熟之后，从一堆细胞中剥离卵母细胞，并在成熟后约18小时(hpm)用成斜角的微型移液管去核。在含有bisbenzimidazole(Hoechst 33342, 3µg/ml; Sigma)的TL-HEPES培养基中证实去核。然后将各个供体细胞置于受体卵母细胞的卵周隙内。使用电融合技术将牛卵母细胞的胞质和供体核(NT单位)融合在一

起。对 NT 单位使用一次由 90V 15 微秒组成的融合脉冲。该步骤在卵母细胞开始成熟后 24 小时 (hpm) 进行。将 NT 单位置于 CR1aa 培养基中直至 28hpm。

用于人工激活卵母细胞的方法已描述于别处。NT 单位激活于 28hpm 进行。激活方法的简单描述如下：将 NT 单位暴露于添加有 1mg/ml BSA 的 TL- HEPES 中的离子霉素 (5 μ M; CalBiochem, La Jolla, CA) 达 4 分钟，然后用添加有 30mg/ml BSA 的 TL- HEPES 洗涤 5 分钟。再将 NT 单位转移至含有 0.2mM DMAP (Sigma) 的 CR1aa 培养基微滴中，于 38.5 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 中培养 4 至 5 小时。洗涤 NT 单位，然后将其置于含有铺满的小鼠胚胎成纤维细胞饲养层 (将在下文描述) 的 4 孔培养板中的 CR1aa 培养基 + 10% FCS + 6mg/ml BSA 中。于 38.5 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 中将 NT 单位培养 3 天以上。每隔 3 天更换一次培养基直至激活期第 12 天为止。此时，用器械从带中取出达到所需细胞数目，即约 50 个细胞数目的 NT 单位，并用于产生胚细胞系。按上述得到的 NT 单位的照片示于图 1。

成纤维细胞饲养层

胚胎成纤维细胞的原代培养物得自 14 至 16 天龄的胎鼠。无菌取出头，肝脏，心脏和消化道之后，将胚胎较碎，于 37 $^{\circ}$ C 在预温的胰蛋白酶 EDTA 溶液 (0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY) 中保温 30 分钟。将成纤维细胞铺于组织培养瓶中，在添加有 10% 胎牛血清 (FCS) (Hyclone, Logan, UT)，青霉素 (100IU/ml) 和链霉素 (50 μ l/ml) 的 α -MEM 培养基 (BioWhittaker, Walkersville, MD) 中培养。传代后 3 至 4 天，照射 35 \times 10 Nunc 培养皿 (Baxter Scientific, McGaw Park, IL) 中的胚胎成纤维细胞。于 37 $^{\circ}$ C，在含有 5% CO₂ 的潮湿空气中培养和维持经照射的成纤维细胞。然后使用具有均一细胞单层的培养板培养胚细胞系。

产生胚细胞系

Eistetter 等, *Devel. Growth and Differ.*, 31:275-282(1989); 牛, Stice 等, 1996)。因此, 预期 4 至 16 细胞阶段的 NT 单位应该也能产生胚细胞或干细胞样细胞和细胞集落。

通过将成人角质细胞的细胞系与在含有 ACM, 尿苷, 葡萄糖和 1000IU LIF 的培养基中培养的去核牛卵母细胞融合也可得到相似的结果。在 50 个重构的胚胎中, 有 22 个被裂解, 有 1 个在约第 12 天发育成胚泡, 将该胚泡铺平, 即开始产生 ES 细胞系。

尽管参照多种特定的材料, 方法和实施例描述和阐明了本发明, 但应理解本发明并不局限于特定的材料, 材料组合和为此选定的方法。多种如此详细的变化是本领域技术人员可以预见和了解的。

说明书附图

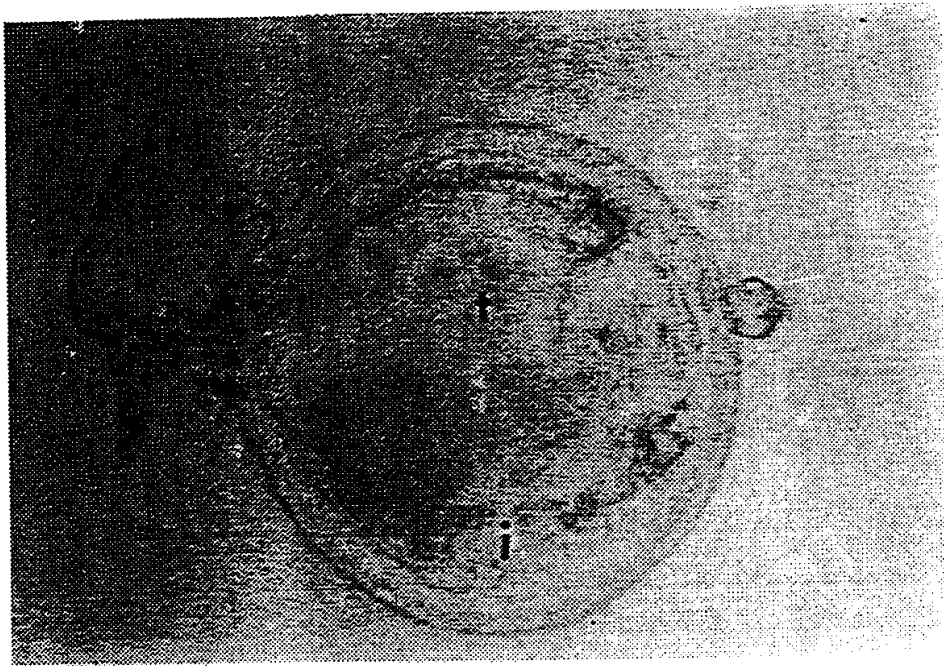


图 1

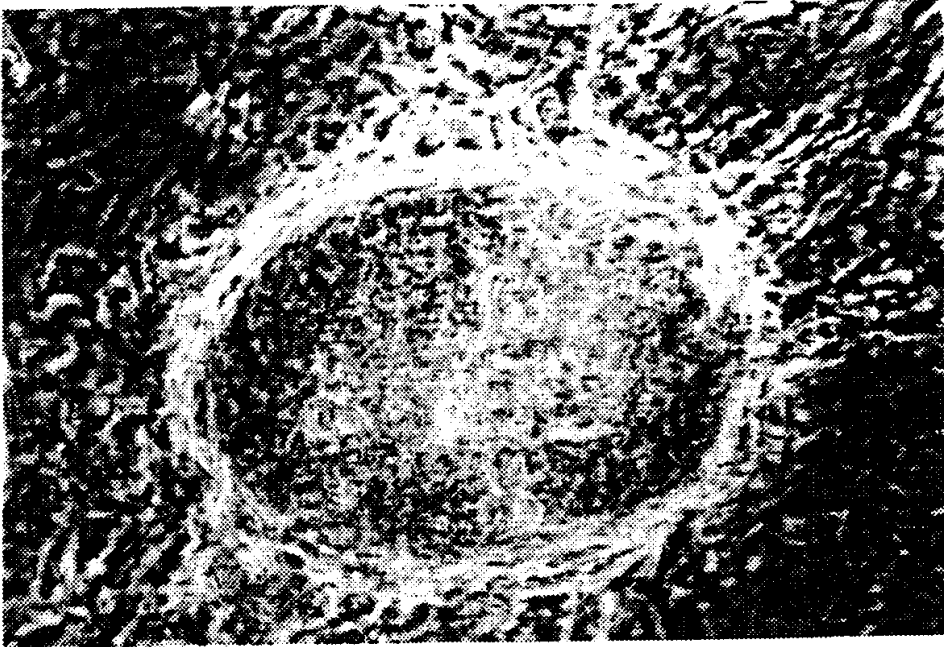


图 4

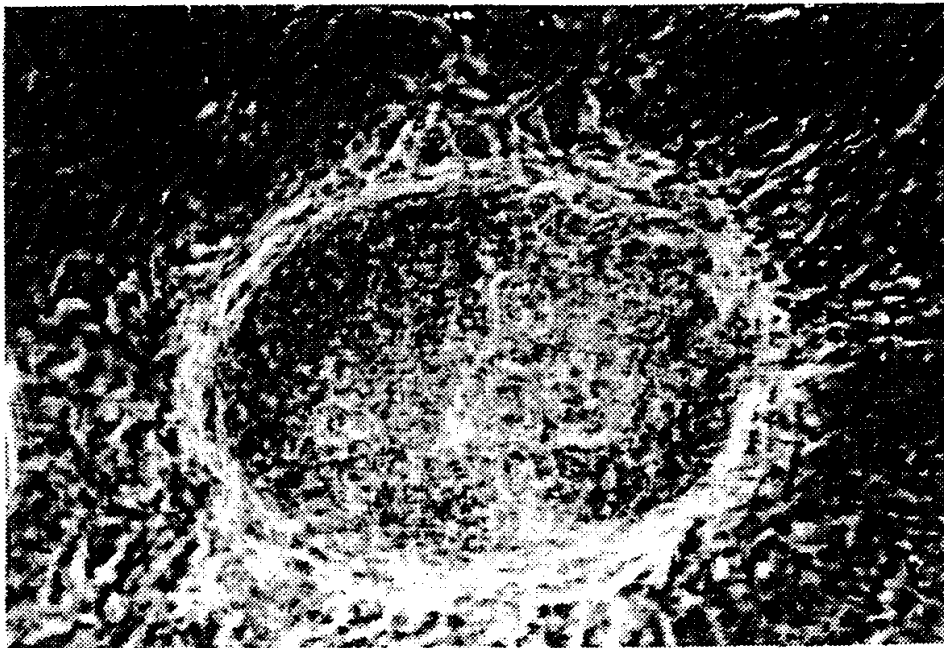


图 5