

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/00

C12N 5/02 C12N 5/08

C12N 15/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01808875.9

[43] 公开日 2003 年 7 月 2 日

[11] 公开号 CN 1427887A

[22] 申请日 2001.4.16 [21] 申请号 01808875.9

[30] 优先权

[32] 2000.4.14 [33] US [31] 60/197,407

[86] 国际申请 PCT/US01/12265 2001.4.16

[87] 国际公布 WO01/79445 英 2001.10.25

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.31

[71] 申请人 先进细胞技术公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 M·D·威斯特

[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 程 泳

权利要求书 3 页 说明书 16 页

[54] 发明名称 含有异源核和线粒体的多能细胞

[57] 摘要

提供如下的异源嵌合 ES 细胞，其含有来自一个物种的一个个体的核和来自相同物种的不同个体的线粒体。ES 细胞可用于分化为分化的细胞型，用于治疗，或研究在形成胚胎和分化中的不同发育过程。

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

1. 一种生产异源嵌合细胞的方法，其含有来自第一个人的线粒体和来自第二个不同的人的核，该方法包括：

将来自第一个人的卵母细胞去核；

将来自非人类的物种的核导入该去核卵母细胞中，产生第一种嵌合卵母细胞；

培养扩增第一种嵌合细胞，产生 NT 单位；

将该 ES 细胞植入相容的雌性宿主中，使该 NT 单位生长为至少一个含有第二种嵌合卵母细胞的胚胎；

收集并分离至少一个第二种嵌合卵母细胞；

将至少一个第二种嵌合卵母细胞去核，并将人的核导入该第二种嵌合卵母细胞中，产生异源嵌合 NT 单位；和

培养该异源嵌合 NT 单位，产生异源嵌合 ES 细胞。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中该异源嵌合 ES 细胞在导致产生分化细胞的条件下培养生长。

3. 根据权利要求 2 的方法，其中该分化细胞是神经元细胞、肌细胞或造血细胞。

4. 根据权利要求 2 的方法，其中该物种是有蹄类动物，该雌性宿主是有蹄类动物。

5. 根据权利要求 1 的方法，其中人的核来源于分化的人类细胞。

6. 根据权利要求 1 的方法，其中通过电融合导入来自非人类的物种的核。

7. 根据权利要求 1 的方法，另外包括遗传修饰该异源嵌合 ES 细胞的步骤。

8. 一种生产异源嵌合细胞的方法，其含有来自第一个人的线粒体和来自第二个不同的人的核，该方法包括：

将来自第一个人的卵母细胞去核；

将来自有蹄类动物的核导入该去核卵母细胞中，产生第一种嵌合

卵母细胞;

培养扩增第一种嵌合细胞, 产生至少 4 个 ES 细胞;

将该 ES 细胞植入与核来源相同的有蹄类动物中, 使该 ES 细胞生长为至少一个含有第二种嵌合卵母细胞的胚胎;

收集并分离至少一个第二种嵌合卵母细胞;

将至少一个第二种嵌合卵母细胞去核, 并将来自分化人类细胞的核导入该第二种嵌合卵母细胞中, 产生异源嵌合卵母细胞; 和

培养扩增该异源嵌合卵母细胞, 产生异源嵌合 ES 细胞。

9. 根据权利要求 8 的方法, 其中该异源嵌合 ES 细胞在产生神经元、肌肉或造血途径中的分化细胞的条件下培养生长。

10. 根据权利要求 8 的方法, 另外包括遗传修饰该异源嵌合 ES 细胞的步骤。

11. 一种治疗人类宿主中对异源嵌合细胞治疗敏感的适应证的方法, 该方法包括:

产生根据权利要求 2 的分化的异源嵌合细胞; 和

将该异源嵌合细胞导入人类宿主的的一个部位, 治疗该适应证。

12. 根据权利要求 11 的方法, 其中该异源嵌合 ES 细胞在分化之前经遗传修饰。

13. 根据权利要求 11 的方法, 其中人的核来源于该人类宿主。

14. 一种含有大量异源嵌合人类 ES 细胞的组合物。

15. 根据权利要求 14 的组合物, 其中培养该异源嵌合人类 ES 细胞。

16. 一种组合物, 其含有大量来自非人类宿主的分化的异源嵌合细胞。

17. 根据权利要求 16 的组合物, 其中培养该分化的异源嵌合细胞。

18. 根据权利要求 16 的组合物, 其中该分化的异源嵌合细胞处于神经元、肌肉或造血途径中。

19. 一种组合物, 其含有培养的异源嵌合 ES 细胞和异源嵌合分化细胞的混合物。

20. 一种组合物，由于在至少一个异源嵌合 ES 细胞中体外导入外源 DNA，其含有大量遗传修饰的异源嵌合 ES 细胞。

含有异源核和线粒体的多能细胞

发明领域

本发明的领域是对细胞的操作，以产生用于核移植方法的非人类卵母细胞，其中这些核移植单位含有来自相同种的两个不同细胞来源的异源核和线粒体。

发明背景

已经证实能将分化细胞的核移植到去核成熟（term）细胞中，产生去分化的多能细胞，这为生物学操作、研究和治疗提供了广泛的机会。应用能替代或补充生物缺陷或不利医学病症的细胞或器官纠正这些缺陷或病症的机会越来越多。至于移植，迄今仍依赖于从供体获得的器官，其中供体已经死亡，或者供体有两份器官而放弃其中一份。尽管积极鼓励人们在死后提供可以使用的器官，但是可以利用的器官仍然极其短缺，许多人排队等待。在替换缺陷器官失败可能致命的情况下，找到替代器官的时间十分有限。

不仅器官供应短缺，而且供体必须与受体组织相容。甚至在供体与受体之间有紧密的组织相容性匹配时，受体通常也必须依赖免疫抑制药物防止移植物排斥。这些药物对移植受体通常有严重的副作用，但是必须忍受，因为没有移植物将是致命的。由于手术能力已经扩展，细胞和器官移植物纠正大量适应证的可能性越来越大。

胚胎干（“ES”）细胞提供了按照需要生产分化细胞、器官和完整个体的机会，使人们可以克隆特定基因型。至于家畜，例如有蹄类动物，来自着床前家畜胚胎的核支持去核卵母细胞发育成熟（Smith等人，*Biol Reprod.* 40:1027-1035 (1989)；Keefe等人，同上 50:935-939 (1994)）。由于ES细胞的意义和重要性，有大量论文报道了该技术的不同方面。例如，Notarianni等人，*J. Reprod. Fert. Suppl.*

43:255-260 (1991)报道了来自猪和绵羊胚泡的稳定的多能细胞系的建立; Gerfen 等人, Anim. Biotech. 6:1-14 (1995)报道了从猪胚泡中分离胚胎细胞系, 这些细胞在培养过程中分化为几种不同的细胞型; Cherny 等人, Theriogenology 41:175 (1994)报道了长期培养保存的多能牛原始生殖细胞衍生的细胞系, 它们形成胚状体并自发分化为至少两种不同的细胞型; Campbell 等人, Nature 380:64-68 (1996)报道了在有利于分离小鼠中的 ES 细胞系的条件下培养绵羊胚胎, 在第 9 天对胚胎的胚盘 (“ED”) 细胞进行核移植, 产生活的羊羔; Van Stekelenburg-Hamers 等人, Mol. Reprod. Dev. 40:444-454 (1995)报道了从牛胚泡的内细胞团 (“ICM”) 细胞中分离并表征永久细胞系; Smith 等人, WO 94/24274, 1994 年 10 月 7 日公布, Wheeler 等人, WO94/26889, 1994 年 11 月 24 日公布, 报道了可用于生产转基因动物的牛和猪多能 ES 细胞的产生; Collas 等人, Mol. Reprod. Dev. 38:264-267 (1994)报道了通过向去核成熟卵母细胞中显微注射裂解的供体细胞, 对牛 ICM 进行核移植(参见, Keefer 等人, 同上文); Sims 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6143-6147 (1993)报道了通过将体外短期培养的牛 ICM 细胞的核移植到去核成熟卵母细胞中, 生产小牛(参见, Stice 等人, Biol. Reprod. 54:100-110 (1996))。最后, Robl 等人的 PCT/US97/12919 报道了由种间核移植产生的 ES 细胞。

ES 细胞操作提供的特殊机会保证了对 ES 细胞的特性、它们可来自的来源、它们增殖和成熟的方式等的持续研究和改进。因此, 十分关注寻找在细胞和器官或器官片段发育中广泛使用 ES 细胞的方法, 用于移植、动物饲养、研究导致细胞分化和类器官、器官及其部分形成的发育过程。

发明概述

提供如下的方法和组合物, 它们涉及能够培养增殖并分化为不同细胞型的修饰卵母细胞和 ES 细胞, 工程化 ES 细胞, 由其产生的分化细胞, 器官或其部分和由之产生的生物。该方法包括使用异源卵细胞,

其中异源是指用于细胞的最终物种（这些细胞去核并导入入异种核）产生含有来自一个种的细胞质和线粒体和来自不同种的核的嵌合细胞。在嵌合细胞增殖获得可产生 ES 细胞的核移植（NT）单位后，ES 细胞可用于进一步增殖和科学研究，或者可将 NT 单位移植到异源、同源或其它相容的异种宿主子宫中（基于原始卵母细胞）以备妊娠和分娩。然后可以收获来自该 F1 动物的卵母细胞，去核，导入异源核，产生一种卵细胞，该细胞能产生含有单一物种的蛋白质、有免疫能力的细胞，在植入异体宿主时排斥危险降低，因而能够接受。对于本申请，这些细胞及其后代被称为“异源嵌合的”（allochimeric）。特别关注将要施用分化异源嵌合细胞的宿主的核的用途。

具体实施方案描述

提供了如下的异源嵌合细胞，其含有来自第一个物种的第一个个体的线粒体和来自相同物种的第二个个体的核。一般来说，将产生能发育成胚胎或大量不同细胞型的多能细胞，其含有来自异源物种的线粒体（异源物种是指目的种），和异种的核（异种是指将要植入细胞的物种，或与细胞植入和细胞分化为胚胎相容的不同物种）。发育或成熟的胚胎然后可用于收获卵母细胞，使卵母细胞去核，并导入来自相同物种的核作为线粒体。产生的异源嵌合细胞可以在体外和体内用于研究分化，用于产生不同分化途径（例如外胚层、内胚层或中胚层）的细胞，和这些类别的细胞，如神经元细胞、神经元、星形细胞、神经胶质细胞、神经节等，造血细胞，例如淋巴细胞、巨噬细胞、NK 细胞、红细胞、巨核细胞等，成纤维细胞、成肌细胞等。

该方法包括下列主要步骤：

1. 收获卵细胞并去核。
2. 将来自不同于该卵细胞的物种的核线粒体基因导入不同物种的体细胞的核基因组中。
3. 将来自不同于该卵细胞的物种的核导入去核卵细胞中，产生嵌合细胞。

4. 扩增嵌合细胞，产生活性（competent）嵌合 ES 细胞，或者温育以发育核移植（NT）单位。
5. 将活性嵌合 NT 单位植入到相容的雌性宿主中。
6. 使嵌合 NT 单位生长为胚胎或至足月，产生新生动物。
7. 使新生动物生长到一定年龄，产生嵌合卵母细胞。
8. 从后代中收获嵌合卵母细胞。
9. 将嵌合卵母细胞去核，导入与卵母细胞线粒体异源的核，产生异源嵌合 NT 单位。
10. 培养异源嵌合 NT 单位产生 ES 细胞。
11. 任选地遗传修饰异源嵌合 ES 细胞。
12. 利用异源嵌合 ES 细胞生产其它细胞型。

现在将详述该方法的每一个步骤。

1. 收获卵细胞并去核。

卵细胞可从任何常规目的宿主中收获，希望含有来自目的物种的线粒体。因此，任何目的哺乳动物种都可用作卵细胞的来源，特别是家畜，更特别地是大型家畜，例如马、牛、绵羊、猪、猫、犬、兔、鼠等，和灵长类动物，例如人、猴和猿。卵母细胞可以用任何常规方法获得，取决于卵泡的来源是宰杀动物还是需要手术方法。特别关注的是灵长类动物细胞，更特别地是人类细胞，它们可用于产生分化的细胞。这些细胞可来自这些物种的任一成员，随后使用的核将决定物种和细胞的组织相容性。本发明尤其使用人类细胞，尽管也有异源嵌合细胞能起作用的其它物种的例子，例如珍稀动物、体外受精不可行的动物等。

人类细胞已经分离并去核。在 Zhang 等人, *J. Assist. Reprod. Genet.* 12:361-8 (1995)中，分离并冻存人类胎卵，在融解后发现能成熟形成极体。Messinis 等人, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 93:39-42 (1986); Pellicer 等人, *Hum. Reprod.* 4:536-40 (1989); Wahlstrom 等人, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 442:402-7 (1985); Wood 等人, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 88:756-60 (1981)描述了卵泡的吸出。去核技术使用用于其它物种的技

术，具体方式在实验部分描述。

卵细胞可以按照已知的方法使用合适的成熟培养基在体外成熟。含有极体的卵母细胞（中期 II 卵母细胞）可以用作宿主细胞。参见，例如，Prather 等人，*Differentiation* 48:1-8 (1991)和 Seshagine 等人，*Biol. Reprod.* 40:544-606 (1989)。

去核按照常规方法实现，方便地使用微量吸管吸出极体和周围的细胞质。然后选择卵母细胞完成成功的去核。

2. 将来自不同于该卵细胞的物种的核线粒体基因导入不同物种的体细胞的核基因组中。

通过导入对于卵细胞所含线粒体类型中的线粒体功能至关重要的基因可以构建体细胞核。本发明特别可用于向动物特别是牛的体细胞中导入人类核线粒体基因，以利于含有人类线粒体的动物细胞的细胞功能。

3. 将来自不同于该卵细胞的物种的核导入去核卵细胞中，产生嵌合细胞。

许多哺乳动物宿主可以用作核的来源，一个主要问题是方便。除了嵌合 NT 单位生长成熟的必要性之外，选择宿主来源的其它考虑有：易于从宿主获得卵母细胞，易于操作和培养生长，技术的成熟性，以前获得后代的成功率，易于宿主生长，产生的嵌合卵母细胞的生存力，可利用的卵母细胞数量，线粒体与宿主核的相容性，以及其它实际考虑。尽管可以使用任何哺乳动物宿主，但特别关注的是家畜，更特别地是大型家畜或非人类的灵长类动物。代表性哺乳动物包括有蹄类动物、牛和绵羊、猪、猫、马、兔、鼠、犬等。分离的卵母细胞在体外成熟，根据极体的存在筛选。

核可以来自任何适宜的来源，能用于产生后代的生殖细胞或体细胞。因此，核可以来自胎细胞、新生动物细胞、成熟细胞、培养基中产生的细胞等。一般不使用肿瘤细胞核，但是根据肿瘤的性质也可以使用。来源可以是分化的细胞，可以是休眠的， G_0 细胞，或者处于活性状态，如 G_1 或 G_2 细胞。细胞型包括单细胞胚胎（受精卵）或前核、

卵细胞、卵裂球、上皮细胞、内皮细胞、肌细胞、角质细胞、皮肤细胞、肺泡细胞、肝细胞、肾细胞、神经元细胞、造血细胞、成纤维细胞、内皮细胞、实质细胞、脂肪细胞、神经胶质细胞、卵泡细胞等，它们的选择可取决于与最终用途有关的许多因素。

有多种技术可用于向去核卵细胞中导入核。融合和注射已经表明是有效的，其中作为核来源的细胞置于去核卵母细胞的卵周隙中，利用电脉冲或使用细玻璃针在融合室中融合，供体核或来自受精卵母细胞的前核能被分离，并输送到受体卵的细胞质中。这些前核可以来自基因组已被修饰因而包含与受体卵母细胞相同的物种的核线粒体基因的动物。（参见，例如，Prather 等人，美国专利号 4,997,384。）融合也能利用电脉冲或使用不同融合剂（如仙台病毒）完成。（参见，例如，Graham, Wister Inot. Symp. Monogr. 9:19 (1969); Collas 和 Barnes, Mol. Reprod. Dev. 38:264-267 (1994)）。

4. 扩增嵌合细胞，产生活性嵌合 ES 细胞，或者温育以发育核移植（NT）单位。

融合后，将产生的融合核移植（“NT”）单位置于合适的培养基（如 CR1aa 培养基）中直到激活。一般在不久后即进行激活，通常在 24 小时内，更常见地是在 4-9 小时后。激活可以利用周知的对于哺乳动物细胞的方法完成，如在亚生理温度（如室温）下培养 NT 单位，精子穿透卵母细胞，电和化学休克等。参见，例如，Susko-Parrish 等人，美国专利号 5,496,720。其它方法包括利用电休克、乙醇处理或整合剂处理，同时或连续提高卵母细胞中二价阳离子的水平，例如钙、镁、钡或锶，适当的以离子载体的形式；或减少卵母细胞中细胞蛋白的磷酸化，使用激酶抑制剂，例如 6-二甲基氨基嘌呤（DAMP）、星形孢菌素、roscovitine、丁内酯、2-氨基嘌呤和鞘氨醇，或者向卵母细胞中导入一种或多种磷酸酶，如磷酸酶 2A 或 2B。一种重要的激活技术是：在成熟培养基中开始培养后 18-30 小时内激活 NT 单位。然后从培养基中取出 NT 单位，置于激活培养基（2mL TL HEPES，含 2mg 牛血清白蛋白、5mM 离子霉素和 2mM 6-DMAP）中，在载玻片加温

器上 4 分钟。4 分钟结束时，用 TL Hepes 漂洗 NT 单位，在 38.5℃ 和 5% CO₂ 下置于含有 2mM 6-DMAP 的培养基中 2-5 小时。结束时，用 TL Hepes 漂洗 NT 单位 4 次，放置培养。当达到希望的发育阶段时，将产生 ES 细胞，或者将 NT 单位转移到雌性受体中。

然后可在适当的体外或体内培养基中培养激活的嵌合细胞的 NT 单位，直到产生 ES 细胞和发育胚胎（如胚泡）的细胞集落。适于 ES 细胞和胚胎培养和成熟的培养基在本领域众所周知。嵌合细胞可以作为来自核的物种的细胞处理，核基因确定表面膜蛋白、细胞质和核蛋白。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、Tyrodesp 白蛋白-乳酸-丙酮酸（“TALP”）、Dulbecco 磷酸缓冲液（“PBS”）、Eagle 和 Whitten 培养基。常用的一种培养基是 TCM-199 或 DMEM 和 5-20%胎牛血清或支持生长的类似来源的因子，如新生血清、动情期母牛血清、羔羊血清或 steer 血清。一种代表性培养基是含有 Earl 盐、10%胎牛血清、0.2mM 丙酮酸钠和 50μg/ml 庆大霉素的 TCM-199。这些培养基可用于细胞系提供条件培养基，使用卵泡颗粒细胞、输卵管细胞、BRL 细胞、子宫细胞和 STO 细胞。此外，也可使用 Rosenkrans, jr., 美国专利号 5,096,822 所述的培养基。该培养基被称为 CR1，含有约 1-10mM、通常 1-5mM 的半钙（hemicalcium）L-乳酸、氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠和少量无脂肪酸牛血清白蛋白，当加入必需和非必需氨基酸时，培养基被称为 CR1aa。一种典型的 CR1 培养基含有 114.7mM NaCl、3.1mM KCl、26.2mM Na₂CO₃、5mM 半钙 L-乳酸和 3mg/ml 无脂肪酸牛血清白蛋白。

方便地将激活的 NT 单位嵌合 ES 细胞置于含 1.9mM DMAP 的 CR1aa 培养基中约 4 小时，随后用 HECM 洗涤，然后在约 38.5℃ 和 5% CO₂ 下在含有 BSA 的 CR1aa 中培养约 4-5 个小时。通常洗涤培养的 NT 单位，并置于合适的条件培养基中生长。一种有效的培养基是含有 10% FCS 和 6mg/ml BSA 的 CR1aa 培养基。合适的饲养层包含成纤维细胞和上皮细胞，特别是子宫上皮细胞，形成如有蹄类动物、

鸡、鼠、STO、SI-m220 和 BRL 细胞的来源。已经发现小鼠胚胎成纤维细胞特别有用。在足够的时间后（因核的物种而不同），获得嵌合 ES 细胞，现在可用于植入适当的宿主中。

5. 将活性嵌合 NT 单位植入到相容的雌性宿主中。

6. 使嵌合 NT 单位生长为胚胎或足月，产生新生动物。

许多物种（包括鼠和有蹄类动物）的这些阶段在文献中已经很好地表述。为了受精，将 NT 单位转移到子宫中。受精后，监视宿主，以确保 NT 单位成功植入。根据宿主的性质，可以约束宿主，以防止自发性流产。胎或新生动物的分娩可以是自然或人工流产、自然分娩或剖腹产。

7. 使新生动物生长到一定年龄，产生嵌合卵母细胞。

8. 从后代中收获嵌合卵母细胞。

上述阶段取决于宿主的性质。正常照顾宿主，使新生动物生长为健康宿主。卵母细胞的收获可以如上所述进行。

9. 将嵌合卵母细胞去核，导入与卵母细胞线粒体异源的核，产生异源嵌合 NT 单位。

去核和导入核的方法已经描述。提供核的物种的选择将取决于细胞的用途。细胞可用于克隆特定物种，特别是卵母细胞难以生长的物种，如人类或稀有物种，或者作为分化细胞的来源，其中细胞含有来自相同物种的核和线粒体。与人类不同，本发明使用的其它物种包括稀有和濒危动物的克隆。

10. 培养异源嵌合 NT 单位产生 ES 细胞。

NT 单位在饲养层上培养，直到 NT 单位达到适于分离 ES 细胞的大小，通常需要至少 4 个细胞，优选地至少 50 个细胞，一般不超过 400 个细胞。培养一般使用 38.5°C 和 5% CO₂ 的条件，大约每 1-5 天更换培养基。

最后阶段包括从培养物中机械取出 NT 单位，从 NT 单位内部分离细胞，尽管来自 NT 单位其它部分的细胞也可以使用，洗涤 NT 单位的细胞，将细胞接种于来自与核相同或不同的物种的饲养层上，例

如照射的成纤维细胞。细胞保存于适当培养基（例如补充 10% FCS、0.1mM β -巯基乙醇和 L-谷氨酰胺的 α -MEM）的饲养层上。大约每 1-3 天更换生长培养基。

对于人类异源嵌合 ES 细胞，个体细胞没有很好定义，集落的边界折射且外观光滑。集落没有上皮样外观。

可以使用 NT 单位细胞产生胚泡的内细胞团（ICM）细胞。ICM 细胞能利用饲养层（如含有活性炭吸附的血清的 STO（小鼠成纤维细胞））培养生长。

11. 任选地遗传修饰异源嵌合 ES 细胞。

ES 细胞可以按照常规技术用 DNA 修饰。利用合适的培养基、脂质体、转运序列、通透、电融合等，可以将裸 DNA、recA 包被的 DNA、病毒、质粒、YAC、染色体外 DNA、染色体片段、cDNA 或其它来源的希望的基因、调节序列等导入 ES 细胞中。参见，例如，Schneike 等人，*Science* 278:2130-3 (1997)。

修饰能提供特定产物的组成型或诱导型表达，例如胰岛素，血管生成因子，细胞因子，例如白介素、干扰素和集落刺激因子，血液因子，例如血清白蛋白、凝血酶、纤维蛋白原、血小板生成素、促红细胞生成素、组织纤溶酶原激活物等，激素，例如生长激素，生长因子，例如表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胶质细胞衍生的神经营养生长因子等，酶，酶抑制剂，例如 α -抗胰蛋白酶，端粒相关蛋白，例如 Sir、端粒酶等，神经元蛋白质，例如神经营养因子-3,4/5、睫状神经营养因子等，胰蛋白，碱性蛋白，味蕾蛋白，眼蛋白，血红蛋白，转录因子，脂蛋白，免疫球蛋白，表面膜受体，例如胰岛素受体，癌基因抑制剂，L-多巴胺和血管生成抑制剂。此外，为了纠正缺陷或不希望的表型，可以利用核的同源重组产生异源嵌合 ES 细胞。例如，可以遗传修饰来自镰状细胞性贫血患者的核，获得产生天然血红蛋白的细胞；血友病患者可纠正血液因子（如因子 VIIIc 或 VIIIvw，克里斯马斯因子）的突变基因；由于遗传因素易患病的患者可修饰核，产生对这些疾病（例如 AIDS、幼年型发病型糖尿病、肌营养不良、阿尔

茨海默病、帕金森氏病等) 敏感性较低的等位基因。

有时可能不导入遗传能力, 而是希望关闭遗传能力或使基因成为诱导型的。可以敲除的说明性基因包括癌基因、组织相容性蛋白、血型蛋白和显性表达导致病理的其它基因。可以利用同源重组或者筛选已经发生希望的敲除的细胞。

12. 利用异源嵌合 ES 细胞生产其它细胞型。

Pedersen, *Reprod. Fertil. Dev.* 6:543-52 (1994)综述了关于 ES 细胞分化的大量文章。作者报道了表达细胞型特异的 CD 标记物的分化细胞的产生, 和分化阶段或细胞产物, 细胞通常不以 ES 细胞分化的水平产生这些产物。ES 细胞向特定细胞型的发育可见 Bain 等人, *Dev. Biol.* 168:342-357 (1995) (神经细胞); Palacios 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7530-7537 (1995) (造血细胞); Rathjen 等人, *Reprod. Fertil. Dev.* 10:31-47 (1998)。

目的细胞包括: 造血细胞、神经元细胞、骨骼肌和心肌细胞、皮肤细胞、上皮细胞、内皮细胞、结构细胞、破骨细胞和成骨细胞、卵泡细胞、眼细胞、与感觉相关的细胞, 如味蕾、内耳细胞、骨细胞、肾细胞、肝细胞、胰细胞, 例如 β -胰岛细胞, 成纤维细胞和软骨细胞。

分化的 ES 细胞能有广泛用途。含有异源线粒体和核的细胞提供含有来自单一物种的 DNA 的正常细胞。这样避免了线粒体与核之间不相容性的问题, 细胞质中存在的蛋白质都来自相同物种, 核与线粒体的相互作用, 例如蛋白质的转运是自然的, 细胞表面存在的免疫显性序列全都来源于相同的物种。而且, 依赖于线粒体与其它胞内区室相互作用的细胞过程也是自然的。

ES 细胞和分化的细胞提供了分析细胞过程、对外源因素(例如基因、药物、因子等)的反应的许多机会, 用于筛选这些外源因素在药物开发中的作用, 确定与对这些外部因素的反应相关的特定等位基因或突变, 研究不同因素引起的转录和表达的变化。

另外, 因为 ES 细胞可以培养保存并能增殖, 所以能重复产生分化的细胞, 这些细胞将基于相同的基因型。本发明也提供用来自个体的

核进行研究和诊断的能力。因此，可以确定特定个体对外部因素（如致癌物、变应原、毒素和诱变剂）的敏感性，其中一个物种的一个完整细胞具有该物种的天然新陈代谢。也能研究对于特定方案（如药物方案）的细胞反应，以确定对特定患者正常细胞的影响。关于方案的慢性应用，有足够的时间使用贮存的目的物种的去核卵作为容器，导入来自该物种特定个体的分化细胞的核。然后可用 ES 细胞产生处于不同分化阶段的不同分化细胞，它们能作为检测的细胞接受该方案和改变。

本发明可用来研究线粒体与特定核的过程。例如，当个体可能含有在产生线粒体使用的蛋白质方面缺陷的核时，该方法可用于克隆这些细胞，观察分化对线粒体过程的影响和对生长模式、表型等的影响。

在 ES 细胞或 NT 单位用于胚胎成熟和新生动物产生的情况中，使用天然线粒体避免了产生的个体与同一物种的其它个体交配时的不相容性。因此，由于存在外源线粒体蛋白，胎被母体排斥的可能性较小，对宿主细胞免疫应答的可能性较小。

可用于本发明的组合物是分离并培养的含有来自一个物种的线粒体和来自不同物种的核的卵母细胞。大多数时候，核和线粒体来自于根本不同的物种，一般来自不同的属，甚至不同的科。方便地选择核，提供去核卵子的有用来源，如家畜（有蹄类动物），例如牛、绵羊和猪，和实验动物，如鼠。本发明也包括含有来自一个个体的线粒体和来自同一物种的不同个体的核的卵，由它产生的 ES 细胞，含有这些 ES 细胞的培养物，由其产生的分化细胞，和含有这些分化细胞的培养物。

这些组合物在用于细胞增殖的生长培养物中含有异源嵌合卵母细胞和 ES 细胞。这些组合物在用于细胞分化的培养基中也包含异源嵌合细胞和内细胞团分化细胞的混合物，或者伴随着 ES 细胞和分化细胞的生长或保存。

对于造血细胞，在 Costar 六孔培养板中，一种培养基含有丝裂霉素 C 处理的（5-10 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C, 3-4 小时）或照射的（2-4 $\times 10^3$ 拉德 γ

射线; 1 拉德=0.01Gy) RP.0.10 骨髓基质细胞单层, 含有重组白介素-3 (rIL-3) (100-300 单位/ml)、rIL-6 和 F (终浓度为 10% v/v), 铺满的 FLS4.1 胎肝基质细胞的 2 天培养物的上清液。FLS4.1 上清液含有 FLT3 配体、steel 因子和一种支持造血干细胞生长的新因子, 在 2-2.5ml 培养基[Iscove's Dulbecco's 改良培养基/50 μ M 2-巯基乙醇/2mM L-谷氨酰胺/50 μ g/ml 庆大霉素/7.5% v/v FCS]中, 37 $^{\circ}$ C, 7.5% CO₂/92.5%空气。每 5-7 天收集细胞, 在含有丝裂霉素 C 处理的 RP.0.10 基质细胞和新制备的含细胞因子培养基的新 Costar 六孔培养板中传代培养。(Palacios 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7530 (1995))。应当理解, 也可以使用提供类似的条件培养基的其它细胞系, 以及提供类似活性的其它成分。

对于神经元细胞, 对 ES 细胞进行 8 天诱导程序, 包括 4 天培养, 成为不含视黄酸 (RA) 的聚集物, 随后在 RA 存在下培养 4 天。培养基是 DMEM (含 L-谷氨酰胺、不含丙酮酸的高葡萄糖; GIBCO 11965-043)、10%胎牛血清、10%新生牛血清和核苷原液。

其它培养基也可用于引导向其它细胞型分化, 使用天然存在并且影响体内分化的因子, 如造血因子, 例如 G-CSF、M-CSF、GM-CSF、白介素、干扰素和其它细胞因子和生长因子。

全都含有相同线粒体的去核卵母细胞可以冻存于适当培养基中较长一段时间, 在使用前小心融化。

这些分化细胞无论遗传修饰与否, 均可在治疗中应用, 健康细胞能导入适当区室中行使希望的功能。例如, 肌细胞可用于向心肌组织或其它肌肉组织移植, 而天然或遗传修饰的细胞可能具有例如在肌营养不良中能修正突变蛋白质的优点。参见, 例如, 美国专利号 5,602,301。可向患者中输入造血细胞, 如淋巴细胞、自然杀伤细胞、巨核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞或其前体, 这些前体可用于特定细胞型或者可以是多能的, 并将分化为大量不同类型的细胞。 β -胰岛细胞可以移植到胰腺上, 或者置于保护容器中, 它们可以通过血液供应受神经支配, 用于糖尿病的治疗。神经元细胞可以导入脑腔中,

通过提供 L-多巴胺、NGE 或能影响脑功能的其它因子或其它组合物的来源,用于治疗帕金森症、阿尔茨海默病、大脑性瘫痪等。ES 细胞或其分化后代适用的其它适应证包括:脊髓损伤、多发性硬化症、肝病、血管疾病、烧伤软骨置换、心脏病、肾脏病、泌尿道疾病、前列腺疾病和老化引起的疾病。

这些细胞可以用于加强地组成型或诱导型供应特定因子。Pruschy 等人, *Chem. Biol.* 1:163-72 (1997)进行了改进,通过口服可激活转录因子的药丸诱导产物的产生。因此,对于心脏病发作,能诱导产生组织纤溶酶原激活物,对于糖尿病,产生胰岛素,对于感染,激活淋巴细胞,方法是导入非人类受体,如蜕皮激素受体等。

下列实施例是为了说明而不是限制。

实验

材料与方法

受体人卵母细胞

来自人胎的卵母细胞:在选择性流产后从 16-20 周妊娠的胎儿中获得胎儿卵巢。将卵巢组织切碎成~1mm 大小,在补充了 15% (v/v) 胎牛血清、0.03 IU/ml FSH 和 35ng/ml 胰岛素的 Waymouth 培养基中培养。组织在 37°C 和 5% CO₂ 空气中在 Falcon 平皿中培养 5-25 天,在 Costar Transwell-COL 膜上培养 3-40 天,之后在 LH 和人卵泡液存在下诱导最终成熟。由成纤维细胞组成的单层碎片在培养 2-3 天内形成新鲜组织。培养 1 周后,卵泡从卵巢组织中分出,但仍附着于单层。从组织中分出的最大数量的卵泡在开始培养约 1 周后出现。在 Costar 平皿中培养 40 天后,卵的主要部分直径达到 80 μ 以上,约三分之一被透明带包围。在诱导最终成熟后,在 Costar 平皿中生长 40 天的卵中观察到第一极体的挤压。可收集成熟的卵,直接进行去核。

来自成熟女性的卵母细胞。人卵利用 Trotnow 等人, *Arch. Gynecol.* 236:211-7 (1985)的技术获得。利用穿过套针的吸引针头,用 Disonics DS 1 扇形扫描仪的转换器进行操控吸附,对吸引针头进行连续超声成

像。患者施以硬膜外麻醉。

也可以使用其它技术，包括按照 Mercan 等人, *Hum. Reprod.* 12:1886-9 (1997)所述方案施用卵泡刺激激素。

卵母细胞然后可如下在体外成熟。用含有 3mg/ml 牛血清白蛋白(级分 V) 的 TL-HEPES 缓冲培养基洗涤未成熟的卵母细胞。将卵母细胞丘复合物在 39℃ 下置于含 10% 胎牛血清、LH 和/或 FSH 和雌二醇的 TCM-199 中。在成熟培养基中约 20 小时后，取出卵母细胞，置于含 1mg/ml 透明质酸酶的 TL-HEPES 中，通过细孔吸管重复吸液除去丘细胞。根据极体筛选剥离的卵母细胞，选择含有极体的卵母细胞(中期 II 卵母细胞)进一步应用。

牛供体细胞:

小母牛超排卵，人工授精。在动情期第 5 天或第 6 天从生殖道获取胚胎。用 PBS 从生殖道冲洗胚胎，并回收。在体外成熟、受精并培养的胚胎在受精后第 5 天用作供体胚胎。授精过程如 Keefer 等人, *Mol. Reprod. Dev.* 36:469-74 (1993)所述。

去核:

去核在成熟开始约 18 小时后 (hpm) 利用斜角微量吸管进行。去核在 TL-HEPES 培养基加双苯酚硫酸胺 (Hoechst 33342, 3µg/ml) 中证实。

核移植:

将个体供体细胞置于受体去核卵母细胞的卵周隙中。人卵母细胞细胞质和牛供体核 (NT 单位) 利用电融合技术融合在一起: 在卵母细胞成熟开始 24 小时后 90V 融合脉冲 25 微秒。将得到的 NT 单位置于 CR1aa 培养基中直到成熟开始后 28 小时，此时它们按照下列方法激活。NT 单位暴露于离子霉素-6-DMAP (2mM) 4 分钟，随后在补充了 1mg/ml 血清白蛋白的 TL-HEPES 中只在 DMAP(2mM) 中 4 小时，然后用补加 30mg/ml 血清白蛋白的 TL-HEPES 洗涤 5 分钟。然后将 NT 单位转移到 4 孔培养板上的一小滴 CR1aa 培养基加 10% FCS 和 6mg/ml 血清白蛋白中，其中含有铺满的小鼠胚胎成纤维细胞的饲养

层。NT 单位在 38.5℃ 和 5% CO₂ 下培养 3 天多。每 3 天更换一次培养基，直到激活开始后第 12 天。此时应当形成约 50 个细胞，从透明带中机械取出这些细胞，用于产生胚胎细胞系。

小鼠胚胎成纤维细胞饲养层：

小鼠胚胎成纤维细胞的初级培养物从 14-16 天的鼠胎中获得。在无菌去除头、肝、心脏和消化道后，将胚胎切碎，并在预温的胰蛋白酶 EDTA 溶液（0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY）中 37℃ 温育 30 分钟。成纤维细胞接种于组织培养瓶中，在补加 10% FCS、青霉素（100 IU/ml）和链霉素（50 μl/ml）的 α-MEM 培养基（BioWhittaker, Walkersville, MD）中培养。传代 3-4 天后，照射 35×10 Nunc 培养皿（Baxter Scientific, McGaw Park, IL）中的胚胎成纤维细胞。照射的成纤维细胞在含 5% CO₂ 的潮湿空气中 37℃ 生长并保存。含有均一细胞单层的培养板用来培养胚胎细胞系。

胚胎细胞系的产生：

洗涤如上所述获得的 NT 单位细胞，直接接种于照射的饲养成纤维细胞上（见上）。这些细胞包括 NT 单位的内部细胞。细胞保存于补加 10% FCS 和 0.1mM β-巯基乙醇的 α-MEM 生长培养基中。每 2-3 天更换一次培养基。到培养第 2 天或第 3 天观察到最初的集落。该集落增殖，显示与以前公开的小鼠和牛胚胎干（ES）细胞有类似的形态学。集落内的个体细胞没有很好定义，集落的边界可折射且外表光滑。这些细胞具有上皮外观。

嵌合牛 NT 单位的产生：

选择嵌合 NT 单位，按照下列方法植入母牛中：将 1-5 个 NT 单位植入子宫中。产生的小牛生长到卵母细胞发育的适当阶段，此时吸出并分离卵。此外，也可通过超排卵和超声指导的卵母细胞获取从成年雌性中或从宰杀的母牛卵巢中获得卵母细胞。

异源嵌合人细胞的产生：

如上所述获得的嵌合卵如上对于生长和去核所述处理，然后准备用于接受人的核。用标准载玻片从征得同意的成人口腔内轻轻刮下人

上皮细胞。将细胞从载玻片上冲洗到含有含 Ca 或 Mg 的 PBS 的培养皿中。通过小口径吸管吸取细胞，将细胞块破碎为单细胞悬液。然后将细胞转移到覆盖于油下的一小滴含 10% FCS 的 TL-HEPES 培养基中，利用上述方法向含有人线粒体的去核嵌合牛卵母细胞中进行核移植。

异源嵌合细胞可以使用来自基本上所有适合的人类细胞来源的核，如成纤维细胞、上皮细胞、角质细胞、血液淋巴细胞或膀胱上皮细胞。异源嵌合细胞培养生长，按照不同的分化模式，如 Stice 等人所述，(1998)，同上文，包括肌细胞的制备。

根据本发明，提供了含有来自不同个体的人类核和人类线粒体的异源嵌合人细胞。这些细胞具有广泛用途，因为它们提供了模拟自然人类细胞，用于研究胚胎发育和向分化细胞型分化中的细胞过程。这些细胞也能用于生产分化的细胞，用于细胞治疗或生产人类因子。这些细胞是只产生人类蛋白质，以致不太可能诱导免疫应答的细胞，允许对核的遗传操作，提供可以导入作为核来源的个体，但是为了治疗或其它用途核被修饰的人类细胞，并且提供基因型相同的细胞的来源，它们可用于特定基因型的克隆。

本申请书中引用的参考文献在此引用作为参考。包括所述的所有程序和方法，构成本申请书的方法部分，根据本领域技术人员，适用于本申请书的主题。

本发明现已完全描述，本领域技术人员应当明白，在不背离附加权利要求书的精神或范围的情况下，能对其进行许多改变和修改。