

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97194755.4

[45] 授权公告日 2007 年 9 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100335625C

[22] 申请日 1997.3.24 [21] 申请号 97194755.4
[30] 优先权
[32] 1996.4.1 [33] US [31] 08/626,054
[86] 国际申请 PCT/US1997/004736 1997.3.24
[87] 国际公布 WO1997/037009 英 1997.10.9
[85] 进入国家阶段日期 1998.11.19
[73] 专利权人 马萨诸塞大学马萨诸塞州高等教育
公立研究所
地址 美国马萨诸塞州
[72] 发明人 S·L·斯蒂克 P·J·戈卢克
[56] 参考文献
WO9003432A 1990.4.5
审查员 李 岚

[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 黄革生

权利要求书 3 页 说明书 25 页 附图 5 页

[54] 发明名称

来自有蹄动物胚胎的培养内细胞团细胞系

[57] 摘要

本发明提供了来自有蹄动物尤其是猪和牛的新的培养内细胞团细胞和细胞系，以及它们的制备方法。在延长培养期间，本发明中的培养内细胞团(CICM)具有与未分化的发育中胚胎的内细胞团相似的形态，还与其相同或基本相似地表达细胞标记。可将异源 DNA 导入本发明的培养内细胞团(CICM)细胞和细胞系中以产生对转基因胚胎、胎儿和/或后代生产有用的转基因细胞，例如，通过核移植方法。

1. 用于产生有蹄类培养内细胞团 CICM 细胞的方法，该方法包括以下步骤：

(i) 由有蹄类胚泡获取内细胞团 ICM 或由有蹄类前胚泡期胚胎获取 ICM 祖细胞；

(ii) 在保证形成多层细胞集落的条件下，于饲养层培养物上培养所说的 ICM 或 ICM 祖细胞；

(iii) 从包含于培养的 ICM 或 ICM 祖细胞集落内的细胞中鉴别出具有以下特性的细胞：

(a) 细胞质/细胞核的体积比例较小，为大约 10/90-50/50；

(b) 具有胞质小泡；

(c) 单个细胞较小，直径为大约 10 - 20 μ m；

(iv) 将一个或一群所说的鉴定好的细胞与细胞集落的余下部分分离；和

(v) 在可使饲养细胞层与分离细胞或细胞群之间至少存在一些物理接触的条件下，将所说的已分离的 ICM 细胞或 ICM 祖细胞传代到另一饲养层培养物上，以产生 CICM 细胞。

2. 按照权利要求 1 的方法，其中所说的在步骤 (i) 中获得的 ICM 包括至少一部分滋养外胚层。

3. 按照权利要求 1 的方法，其中的饲养细胞层包含成纤维细胞。

4. 按照权利要求 3 的方法，其中所说的成纤维细胞是小鼠胚胎成纤维细胞。

5. 按照权利要求 4 的方法，其中所说的小鼠胚胎成纤维细胞是原代细胞。

6. 按照权利要求 3 的方法，其中所述含成纤维细胞的饲养细胞层是一长满的单层。

7. 按照权利要求 1 的方法，其中通过选自下组的方式维持步骤 (i) 的分离细胞和饲养细胞层间的物理接触：(i) 将分离后的 ICM 细胞置于

饲养细胞层上；(ii)将 CICM 细胞群挤压到饲养层上；(iii)将 CICM 细胞群置于饲养细胞层和培养板之间；和(iv)将 CICM 细胞或细胞群离心到饲养细胞层上。

8. 按照权利要求 1 的方法，其中至少利用以下方法之一从集落中分离已鉴定好的细胞：物理的或化学的或酶促方法。

9. 按照权利要求 8 的方法，其中所说的物理方法包括使用玻璃吸管、皮下针或剃刀片物理上地接触该集落。

10. 按照权利要求 9 的方法，其中还包括用胰蛋白酶或链霉蛋白酶处理分离后的细胞。

11. 按照权利要求 1 的方法，其中所说的分离细胞包含约 5-100 个细胞的细胞群。

12. 按照权利要求 1 的方法，其中重复进行了步骤(ii)至(v)。

13. 按照权利要求 1 的方法，其中所说的比例约为 25/75。

14. 按照权利要求 2 的方法，其中细胞直径小于约 15 μm 。

15. 按照权利要求 1 的方法，其中还包括将异源 DNA 导入 CICM 细胞的基因组中。

16. 按照权利要求 15 的方法，其中所述异源 DNA 包含编码选择标记的 DNA。

17. 按照权利要求 15 的方法，其中所述异源 DNA 包含编码多肽的 DNA。

18. 由权利要求 1-17 中任一项的方法得到的有蹄类 ICM 细胞。

19. 按照权利要求 18 的 CICM，其表达碱性磷酸酯酶。

20. 按照权利要求 18 的 CICM，其不表达细胞角蛋白 18。

21. 按照权利要求 18 的 CICM，其中所说的细胞在组织培养中呈现多层集落形态。

22. 按照权利要求 20 的 CICM，其中所说的多层集落形态含有一内部上皮型部分和一多层部分，该多层部分基本上围绕着所说的上皮样部分。

23. 按照权利要求 18 的 CICM，其中所说的有蹄动物胚胎来源于选

自猪、牛、绵羊、马和山羊的一种有蹄动物。

24. 按照权利要求 23 的 CICM, 其中所说的有蹄动物是猪。

25. 按照权利要求 23 的 CICM, 其中所说的有蹄动物是牛。

26. 从权利要求 18 的 CICM 中获得的培养内细胞团细胞系。

27. 按照权利要求 18 的 CICM, 其含有一个或多个可抑制所说的 CICM 分化的基因。

28. 按照权利要求 27 的 CICM, 其中所说的基因选自下述基因: tsA58、OCT3、LIF、LIF 受体、FGF-5、REX-1 和其它癌基因产物、T 抗原、细胞因子和转录因子。

29. 按照权利要求 18 的 CICM, 其含有一段已整合至其基因组中的异源 DNA。

30. 按照权利要求 29 的 CICM, 其中所说的异源 DNA 编码选择性标记。

31. 按照权利要求 29 的 CICM, 其中所说的异源 DNA 编码所需多肽。

来自有蹄动物胚胎的培养内细胞团细胞系

发明领域

本发明提供了新的培养内细胞团(CICM)细胞、细胞系,以及它们的制备方法。在延长培养期间,本发明的培养内细胞团(CICM)具有与发育中胚胎的内细胞团相似的形态,并与其同样或高度相似地表达细胞标记。这些培养内细胞团(CICM)是通过新的培养技术和/或通过导入可调节的分化抑制基因(DI)而产生的。可将本发明的培养内细胞团(CICM)细胞系用于生产分化细胞、组织、器官和/或整只动物,优选有蹄动物,理想的是那些已被遗传修饰从而基因组中含有合适的异源DNA、或已经选择得到的含有遗传理想性状的分化细胞、组织、器官和/或整只动物。这项工作是利用体外培养技术或通过嵌合或核移植胚胎、胎儿和/或后代来完成的。而且,此培养内细胞团(CICM)细胞也可用于克隆(核移植过程)以产生在遗传上完全相同的胚胎、胎儿和/或后代。

发明背景

在体外从早期植入前小鼠胚胎中得到胚胎干细胞系(ES cell lines)的方法是众所周知的(可见如, Evans 等, 自然, 29: 154-156 (1981); Martin, 美国国家科学院院报, 78: 7634-7638 (1981))。只要存在成纤维细胞饲养层(Evans,等, 出处同前)或分化抑制源(Smith 等, 发育生物学, 121: 1-9 (1987)), 即可在未分化状态下对 ES 细胞进行传代。

以前已有报道表明 ES 细胞有许多应用。例如,曾有报道说 ES 细胞可用做研究分化、尤其是研究参与早期发育调节的基因的体外模型。当小鼠 ES 细胞被引入植入前的小鼠胚胎中时,它们能产生种系嵌合体,这证明了小鼠 ES 细胞的多潜能性(Bradley 等, 自然, 309: 255-256(1984))。

由于 ES 细胞具有将其基因组传递给下一代的能力,通过利用含有或不含有所需遗传修饰的 ES 细胞,在牲畜的种系加工中具有潜在的效用。而且,就牲畜类动物如有蹄动物而言,来自类似植入前的牲畜胚胎的核可

以支持去核卵母细胞发育完整(Smith 等, Biol. Reprod., 40:1027-1035 (1989); 和 Keefer 等, Biol. Reprod., 50:935-939(1994))。这一情况与据报道 8 细胞期以外的小鼠胚胎的核转移后不能支持去核卵母细胞发育的结果相反(Cheong 等, Biol. Reprod., 48: 958 (1993))。因此, 由于来自牲畜类动物的 ES 细胞可以为核移植过程提供经遗传操作或未经操作的全能性供体核的可能来源, 这种 ES 细胞是非常合乎需要的。

许多研究组报道了据称为多能性的胚胎细胞系的分离。例如, Notarianni 等, J. Reprod. Fert. Suppl., 43: 255-260 (1991)报道了来自猪和绵羊胚泡的据称是稳定的多能性细胞系的建立, 该细胞系显示出与经免疫外科手术自绵羊胚泡分离的内细胞团的原代培养物中的细胞相似的一些形态和生长特性(出处同前)。还有, Notarianni 等, J. Reprod. Fert. Suppl., 41: 51-56 (1990)公开了来自猪胚泡的、被认为是多能性胚胎细胞系在培养中的维持和分化。此外, Gerven 等, 动物生物技术, 6 (1): 1-14 (1995)公开了从猪胚泡分离胚胎细胞的方法。在不使用条件培养基的情况下, 这些细胞可在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层中稳定地维持。据报道这些细胞在培养过程中分化为几种不同的细胞类型(Gerven 等, 出处同前)。

另外, Saito 等, Roux's Arch. Dev. Biol., 201: 134-141 (1992), 报道了培养的牛胚胎干细胞样细胞系, 该细胞系经过三次传代仍能存活, 但第 4 次传代后就会丢失。更进一步的是, Handyside 等, 在 Roux's Arch. Dev. Biol., 196: 185-190 (1987)公开了在可允许从小鼠内细胞团分离小鼠 ES 细胞系的条件下, 培养经免疫外科手术分离的绵羊胚胎内细胞团的方法。Handyside 等, (1987)(出处同前)报道了在这样的条件下, 绵羊内细胞团附着、铺开并发育成 ES 细胞样和内胚层样细胞区, 但在延长培养后, 只有内胚层样细胞是明显可见的(出处同前)。

最近, Cherny 等, Theriogenology, 41: 175 (1994)报道了长期培养物中维持的来源于牛原始生殖细胞的细胞系, 据称该细胞系是多能性的。在培养约 7 天后, 这些细胞产生对碱性磷酸酯酶(AP)呈阳性着色的 ES 样集落, 显示出形成胚状体的能力, 并自发分化成至少两种不同的细胞类

型。据报道这些细胞还表达转录因子 OCT4、OCT6 和 HES1 的 mRNA，这被认为是仅 ES 细胞中存在的同源框基因(homeobox genes)表达模式。

同样最近，在一个摘要中，Campbell 等 Theriogenology, 43: 181 (1995)报道了九日龄绵羊胚胎来源的、在可促进小鼠 ES 细胞系分离的条件下培养的胎盘(ED)细胞进行核移植后，可生产出活的小羊。基于他们的实验结果，作者断定来自第 9 天的绵羊胚胎的 ED 细胞在核移植中是全能的，而且高达 3 次传代后的培养物仍保持了全能性。

甚至更近一些，Campbell 等，自然, 380: 64-68(1996)报道了通过核移植从培养细胞系中克隆绵羊。他们使用的细胞与本发明的培养内细胞团(CICM)细胞不同。Campbell 等人所用的细胞在组织培养中形成单层，而本发明中的 CICM 细胞则并非如此。作者指出这些细胞好象“被弄平”了，或呈现出一种“上皮状”的外观。相反，本发明的 CICM 细胞在以未分化状态生长时，能继续保持为多层集落或集落部分。此外，Campbell 等人所用的细胞为细胞角蛋白和层粘连蛋白 A/C 阳性。相反地，本发明的 CICM 细胞为细胞角蛋白阴性。

此外，并无迹象显示 Campbell 等人的细胞是未分化的。确切地说，此参考文献只指出了这些细胞在核移植过程中是有用的。还有，这些细胞并非在与成纤维细胞饲养层保持经常接触的条件下培养的。确切地说，Campbell 等人(1996)的培养细胞在培养过程中明显地将成纤维细胞推到边上，而它们自己生长在培养板的上面。

Van Stekelenburg-Hamers 等人，Mol. Reprod. Dev.,40: 444-454 (1995)报道了来自牛胚泡内细胞团细胞的据称是永久细胞系的分离和鉴定。作者在不同的条件下从第 8 或 9 天的牛胚泡中分离和培养内细胞团(ICM)，以确定哪一种饲养细胞和培养基对支持牛内细胞团(ICM)细胞附着和生长是最有效的。基于其实验结果，他们断定，通过使用 STO(小鼠成纤维细胞)饲养细胞(取代牛子宫上皮细胞)和利用去炭血清(优于正常血清)补加到培养基中，培养 ICM 细胞的附着和生长能力得到了提高。然而，Van Stekelenbury 等人报道，他们的细胞系更象是上皮细胞，而不太象多能性 ICM 细胞(出处同前)。

更进一步的是, Smith 等人, 1994 年 10 月 27 日公开的 WO94/24274, Evans 等人, 1990 年 4 月 5 日公开的 WO90/03432, 以及 Wheeler 等人, 1994 年 11 月 24 日公开的 WO94/26889, 均报道了据称能用于制作转基因动物的动物干细胞的分离、筛选和增殖。公开于 1990 年 4 月 5 日的 WO90/03432(Evans 等人)也报道了来自猪和牛品种的、据称具有多能性的胚胎干细胞的获得, 据称该胚胎干细胞对于转基因动物的制作是有用的。此外, 发表于 1994 年 11 月 24 日的 WO94/26884 (Wheeler 等人)公开了据称对于嵌合体和转基因有蹄动物的制作有用的胚胎干细胞。因此, 从上述内容可以明显看到, 由于 ES 细胞系在如克隆胚胎或转基因胚胎的产生以及核移植中具有潜在应用, 许多研究小组已在试图生产 ES 细胞系。

有蹄动物内细胞团(ICM)细胞在核移植中的使用也已有报道。例如, Collas 等人在 Mol. Reprod. Dev.,38: 264-267 (1994)中公开了通过将裂解的供体细胞显微注射入去核的成熟卵母细胞中而进行的牛内细胞团细胞的核移植。该文述及, 将胚胎体外培养 7 天以产生十五个胚泡, 将这些胚泡植入牛受体后, 结果有 4 只受孕, 出生两只小牛。Keefer 等人在 Biol. Reprod., 50: 935-939(1994)中也公开了将牛内细胞团(ICM)细胞用作核移植中的核供体以产生胚泡, 将这些胚泡移植入牛受体后, 结果产生了若干活后代。此外, Sims 等人在 美国国家科学院院报, 90: 6143-6147 (1993)中述及, 通过将短期体外培养的牛内细胞团(ICM)细胞的核移植到去核的成熟卵母细胞中, 可产生小牛。

除此之外, 也有报道表明, 短期培养的胎盘细胞(多达三次传代)经核移植后产生了活的小羊(Campbell 等, Theriogenology, 43: 181 (1995))。另外还有有关在核移植中使用牛多能性胚胎细胞和产生嵌合胎儿的报道(Stice 等, Theriogenology,41:301 (1994))。

尽管前述文献已有有关报道, 然而, 对具有改良特性如与发育中胚胎、尤其是有蹄动物胚胎的 ICM 细胞的形态特征相同或基本相似, 且同样或基本相似地表达细胞标记的培养 ICM 细胞和细胞系仍然存在很大的需求。此外, 在本领域内对生产这些改良的培养 ICM 细胞和细胞系的方

法也有很大的需求。

发明目的

本发明的一个目的是提供新的和改良的培养内细胞团(ICM)细胞和细胞系。

本发明的较具体的目的是提供与发育中胚胎的 ICM 形态特征和表达细胞标记相同或基本相似的新的改良的培养 ICM 细胞和细胞系。

本发明的一个更具体的目的是提供具有一定的形态特征并与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 相同或基本相似地表达细胞标记的新的改良的有蹄动物培养 ICM 细胞和细胞系。

本发明的另一具体目的是提供改良的培养 ICM 细胞和细胞系, 优选来自有蹄动物的这类细胞和细胞系, 它们在延长培养期间具有一定的形态特征并与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 相同或基本相似地表达细胞标记。

本发明又一具体目的是提供分离和/或生产这类改良的有蹄动物培养 ICM 细胞和细胞系的新方法。

本发明的一个更具体的目的是提供分离和/或生产培养的有蹄动物 ICM 细胞或细胞系(长期培养物则更好)的新方法, 所说的 ICM 细胞或细胞系呈现一定的形态特征并与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 相同或基本相似地表达细胞标记。

本发明的一个具体目的是提供培养和筛选呈现一定的形态特征并与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 相同或基本相似地表达细胞标记的培养的有蹄动物 ICM 细胞或细胞系的新方法, 该方法包含以下步骤:

(i) 用机械和/或酶促方法获得胚泡的 ICM 或从前胚泡期胚胎中获得 ICM 祖细胞;

(ii) 在饲养层培养物上, 优选成纤维细胞上培养所说的 ICM; 和

(iii) 从所述培养细胞中鉴定出具有以下特征的细胞:

(a) 细胞质/细胞核体积比例较小;

(b) 有胞质小泡; 和

(c) 单个细胞较小;

(iv) 从剩下的培养细胞中分离出具有上述特性的细胞；和

(v) 在可使分离细胞与饲养层直接物理接触的条件下，将所述分离的细胞传代至饲养层、优选成纤维细胞上。

本发明的一个更具体目的是通过以下步骤生产改良的培养 ICM：

(i) 通过适当的机械和/或酶促方法获得胚泡期胚胎的 ICM，优选有蹄动物的胚泡期胚胎的 ICM；

(ii) 在长满的、优选厚的饲养细胞单层(优选含有成纤维细胞)上培养上述获得的 ICM；

(iii) 在可以产生多层细胞集落的条件下培养所述 ICM，所说的多层细胞集落包括第一种基本上位于内部的平整上皮样细胞群体，以及另一种基本上围绕着所述内层上皮样细胞的多层细胞群体，所说的多层细胞群体中含有具胞质小泡、细胞质/细胞核体积比例较小的、相对较小的细胞；

(iv) 通过适当的非降解性方法，即机械和/或酶促方法，将基本上包括在多层细胞集落周边的所说的第二种多层细胞群体分离出来；和

(v) 在可使分离细胞与饲养层直接物理接触的条件下，将所述分离的细胞传代到新的饲养层、优选包含成纤维细胞的饲养层上。

本发明的另一目的是通过含有下述步骤的方法，提供具有一定的形态特征并与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 相同或基本相似地表达细胞标记的培养 ICM：

(i) 获得有蹄动物 ICM 细胞或已建好的培养的有蹄动物 ICM 细胞系；

(ii) 将一个或多个抑制分化的基因(DI gene)导入所说的 ICM 细胞或所说的已建好的 ICM 细胞系的核中，优选这个(些)DI 基因在诱导型启动子控制下进行表达；

(iii) 在保证所述分化抑制基因(DI gene)表达的条件下，在饲养层上、优选长满的成纤维细胞层上培养获得的转基因 ICM 细胞或培养 ICM 细胞系；

在前述培养方法中使用可表达一个或多个 DI 基因的 ICM 细胞和细胞系也是本发明的一个目的。

本发明的另一具体目的是将本发明的改良的培养 ICM 用于 ICM 或培养 ICM 具有适用性的任何用途上, 此改良的培养 ICM 呈现一定的形态特征并与发育中的有蹄动物胚胎 ICM 相同或基本相似地表达细胞标记。这些用途包括诸如通过体外细胞培养技术生产分化细胞、器官和/或整只动物。

本发明的另一具体目的是将本文中的培养 ICM 或由此衍生的细胞系用于所需的异源 DNA 的整合中。

附图简述

图 1 是在无饲养层接触时生长的培养 CICM 细胞的照片, 从中可观察到胚状体。

图 2 是细胞角蛋白呈阳性的培养 CICM 细胞的照片。

图 3 是在成纤维细胞饲养层上的 CICM 细胞的照片。只经过两天的培养就可见多层细胞集落。

图 4 和图 5 是显示碱性磷酸酯酶阳性而细胞角蛋白阴性的 CICM 细胞集落的照片。

图 6 和图 7 显示了在 CICM 细胞培养期间获得的上皮样细胞。这些细胞是碱性磷酸酯酶(AP)阴性而细胞角蛋白阳性的。

图 8 是 CICM 细胞集落的照片。该照片显示出多层细胞集落正在变平成为上皮样细胞片。位于集落中间的细胞是碱性磷酸酯酶阴性并呈现扁平上皮样外观。相反, 周边细胞较小, 呈现多层的形态并具有胞质小泡。

图 9 显示了显微注射五天后表达 β 一半乳糖苷酶构建体的培养猪 CICM 细胞。

发明详述

在对本发明进行更详细的讨论之前，先提供下述定义。

内细胞团细胞(ICM 细胞): 这是早期胚胎发育过程中即胚泡期产生的两种截然不同的细胞类型中的一种，最终形成饲养层的一部分。这些细胞已知可应用于核移植技术中，以及嵌合和克隆后代的生产中。

滋养外胚层(TE 细胞): 指早期胚胎发育即胚泡期产生的两种截然不同的细胞类型中的另一种，最终形成为胎盘的一部分。

ICM 祖细胞: 这是前胚泡期胚胎中所含有的细胞，它们发育成 ICM 细胞。

培养内细胞团细胞: 指在体外培养了一个延长期时间的内细胞团细胞。

培养内细胞团(CICM 或培养 ICM)是呈现一定的形态特征并与发育中胚胎的内细胞团细胞相同或基本相似地表达细胞标记的细胞: 在本发明中，这是指与发育中胚胎如有蹄动物胚胎的 ICM 所呈现的形态相同或高度相似的培养 ICM 细胞。通常，这类细胞将以小的多层集落的形式生长；然而，如果一个集落大小超过大约 50 - 100 个细胞，一些细胞就可能分化。

与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 相同地表达细胞标记的 CICM，是指该 CICM 以发育中的有蹄动物胚胎的未分化 ICM 的特有方式表达或不表达细胞标记。可用于鉴别合适的 CICM 的适当细胞标记包括诸如细胞角蛋白，尤其是细胞角蛋白 8 和细胞角蛋白 18，酶类如碱性磷酸酯酶，以及其它一些在 ICM 中表达的细胞标记，如 rex-1、1 amin ac 和 oct4。理想的状况是，这些细胞标记的表达水平(如果有的话)与来自有蹄动物胚胎的未分化 ICM 的表达水平是一样的。

与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 基本相似地表达细胞标记的 CICM 是指该 CICM 所表达的细胞标记与未分化的发育中有蹄动物胚胎 ICM 所特有的细胞标记大部分相同，例如细胞角蛋白诸如细胞角蛋白 18，酶类诸如碱性磷酸酯酶，以及其它细胞标记诸如 rex-1 ac 和 oct4。基本相似是指与有蹄动物胚胎的未分化 ICM 相比，本发明的 CICM 中有些细胞标记的表达量可以有所改变，有些细胞标记的表达方式可以有所不同，只要

这种变化不会负面影响所产生的 CICM 按照本发明的方法进行培养和维持的能力。

总之，与发育中有蹄动物胚胎的 ICM 相同或基本相似地表达细胞标记的 CICM 细胞不会表达细胞角蛋白 18，但表达碱性磷酸酯酶。检测这些细胞标记及其它细胞标记表达的方法在本领域中是已知的(其中的一些在下文引作参考文献)，包括诸如免疫检测等方法。例如，基于细胞与适当免疫探针(如可提供特异性检测的标记抗体)的反应性，可利用这样的方法检测某种特殊细胞标记的表达与否。

然而，如下文所讨论的，细胞标记的表达可能会存在种类差异(例如，来自猪的 CICM 是碱性磷酸酯酶(AP)阳性的，而来自牛的 CICM 绝大多数是 AP 阴性的)。而且，本发明的培养 ICM 也可能包含正常情况下不包含于 ICM 中的基因，例如，编码所需产物的基因和/或一个或多个抑制分化的基因。

分化抑制基因：在本发明中，分化抑制基因通常是指可抑制 ICM 分化的任何核酸序列，包括诸如 tsA58 基因，以及编码其它 T 抗原和癌基因产物、细胞因子和转录因子如 OCT3、LIF 和 LIF 受体的其它基因。这些分化抑制基因在本领域中是已知的，并且在 WO91/13150、Okamoto 等，细胞，60：461(1990)；Rosner 等，自然，345：686(1990)和 Smith 等，自然，336：688(1988)中都有描述，所有这些文章都全文引入本文作为参考。其它的合适基因还包括 REX-1 (Rodgers 等，发育，113：815 - 824 (1991))和 FGF-5 (Herbert 等，发育，112：407 - 415 (1991))。

诱导型或可调型启动子：这是指当其结构与目的结构基因如分化抑制基因有效相连时可以被“打开”，即在特定条件下可启动转录的任何启动子。通常这要求在培养基中存在或缺乏一种或多种取代物，如金属离子，或要求有其它特殊的培养条件，如特殊的温度条件，等等。熟知的诱导型或可调型启动子的例子包括反应元件，诸如四环素(WO94/29442)、干扰素(Kimura 等，细胞，44：261(1986))、类固醇和金属硫蛋白的启动子(Yarranton, G.T., Curr. Opin. Biotech., 3：506(1992))、温度诱导型启

动子等等。这些文献均全文引入本文作为参考。

饲养细胞：指可被用于获取和/或增殖未分化的培养 ICM 细胞系的任何细胞。这些饲养细胞优选为成纤维细胞，更优选为小鼠胚胎成纤维细胞，例如来自 12—16 日龄的小鼠胎儿。其它合适饲养细胞包括诸如来自有蹄动物的成纤维细胞和子宫上皮细胞、小鸡成纤维细胞、大鼠成纤维细胞、STO 和 SI-m220 饲养细胞系，以及 BRL 细胞。

培养的多层 ICM 集落：指在饲养层上生长的培养 ICM 的多层集落，它呈现出具有两种不同且明显的细胞群体的多层结构。第一种细胞群体基本上构成了多层细胞集落的周边，并且是多层的，这样的细胞包括相对较小、具有胞质小泡并对 AP 活性着色呈强阳性的细胞。另一种细胞群体基本上包含于此细胞集落的中间，它基本上由扁平上皮样细胞群体组成，这类细胞的 AP 活性极小或者没有。

正如所述，本发明通常指与以前所报道的培养 ICM 相比具有改良特性的培养 ICM 细胞和细胞系。具体地说，这些培养 ICM 和细胞呈现一定的形态特征并与发育中胚胎的 ICM 相同或基本相似地表达细胞标记。

本发明提供了培养 ICM，其具有与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 相同或基本相似的新特性组合，该培养 ICM 具有上文所述的多层细胞集落形态，并与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 相同或基本相似地表达细胞标记，例如，它们不表达细胞角蛋白 18，可能表达或不表达碱性磷酸酯酶(取决于具体的品种来源)。

以前的研究者已将碱性磷酸酯酶标记或细胞角蛋白 18 标记独立地用于检测培养细胞是否与发育中的有蹄动物 ICM 具有原来推测的相似性(Piedrahita 等, Theriogenology,34: 879 (1990), Wheeler 等, Reprod. Fert. Dev., 6: 563 (1994)及 Talbot 等, Mol. Reprod. Dev., 36: 139 (1993))。因而，本文所制备的 CICM 中这些细胞标记的表达很好地证明了可将本发明的培养技术用于获取与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 相同或基本相似的 ICM。

这与以前所公开的培养 ICM 如 Talbot 等人(出处同前)的培养猪 ICM 相反，后者在体外培养仅两星期就会分化并失去 AP 活性。本发明的培养

ICM 与 Sims 等人(出处同前)的培养牛 ICM 也有所不同, 后者只短期培养, 但在细胞悬液体系中被解聚并以单个细胞的形式生长。本发明的培养 ICM 更不同于前文所述的 ES 样细胞, 后者以上皮单层形式生长, 且是 AP 阴性和细胞角蛋白阳性的。此外, 本发明的培养 ICM 也不同于 Wheeler, Reprod. Fert. Dev., 6: 563 (1994)和 WO94/26884 中的 ICM, 后二者尽管以多层集落形式生长且为细胞角蛋白阴性(与本发明的 CICM 细胞系相似), 但它们是饲养层非依赖型的。

因而, 本发明提供了新的 CICM 细胞和细胞系, 该 CICM 细胞和细胞系若具有正确的形态和细胞标记特征, 应是非常适合用于嵌合体和核移植的研究中, 以产生分化细胞、胎儿和后代。通常说来, 本文的新 CICM 细胞系是通过以下两种方法中的任意一种而产生的。

第一种方法包括获取胚胎的 ICM 或从前胚泡期胚胎中获取 ICM 祖细胞, 优选来自有蹄动物胚胎。有蹄动物包括许多重要的家畜类动物, 如猪、牛、绵羊、马和山羊。因此, 迫切需要可能适合有蹄动物生产的培养有蹄动物细胞。除此之外, 相比于其它已知可有效用于生产培养 ICM 和转基因动物或克隆动物的物种, 如啮齿类动物, 有蹄动物具有更大的优越性, 因为它们在免疫和生理上都与人类更相近。

胚泡或前胚泡期的有蹄动物胚胎可以通过熟知的方法得到。例如, 可以经外科剖腹术, 从死后的猪或牛等有蹄动物的生殖道通过外科手术收集胚泡或前胚泡胚胎, 或可通过非外科手术收集。通常这些胚胎为 2—15 日龄, 优选 8 日龄。收集到胚胎后, 部分分离胚泡或前胚泡期有蹄动物胚胎的 ICM(如将 ICM 与滋养层细胞分离)或任由其保持完整。如果进行部分分离, 通常是通过适当的机械和/或酶促方法如利用培养玻璃针和/或将它们与胰蛋白酶或链霉蛋白酶一起保温等方法来完成。

然后将部分分离的或完整的含有 ICM 和至少一部分滋养外胚层的胚泡 ICM 或来自前胚泡期胚胎的 ICM 祖细胞置于一合适的有饲养细胞层的培养基中。来自前胚泡期胚胎的全部细胞都置于合适的饲养层上。如前所述, 饲养细胞层包括可便于未分化 ICM 的筛选和/或增殖的任何细胞层。饲养细胞层优选包含成纤维细胞, 更优选来自小鼠胚胎成纤维细胞原

代培养物。然而，我们认为可以用成纤维细胞系或其他类型的成纤维细胞来代替。

本发明人发现，对于在培养中获取和增殖未分化 CICM 细胞系来说，饲养层的形态特征是一个重要因素。更具体地说，已发现用于培养 ICM 的培养板优选含有一层厚的长满的饲养细胞单层，更优选厚的长满的小鼠成纤维细胞单层。

如实施例中更为详细的论述，饲养层优选得自胚胎成纤维细胞的原代培养物，如来自 12—16 日龄的小鼠胎儿的细胞。成纤维细胞的分离方法在本领域中是众所周知的。例如，通过无菌去除合适小鼠胎儿的头、肝脏、心脏和消化道，然后切碎这些小鼠胎儿并在可保证细胞分离的合适条件（如将其与含有胰蛋白酶的组合物一起保温）下温育，然后将分离的成纤维细胞铺到含有合适培养基的组织培养板中，可收集到成纤维细胞。

可以使用适于维持培养的饲养细胞如小鼠成纤维细胞的任何培养基。具体地说，本发明人选择将成纤维细胞铺到组织培养板中，并在补充有 10% 胎牛血清(FCS)(Hyclone, Logan, UT)、青霉素(100IU/ml)和链霉素(50ug/ml)的 α -MEM 培养基(BioWhittaker, Walkersville, MD)中培养。然而，估计也可换用其它培养基，包括诸如补充有谷氨酰胺、葡萄糖、2-巯基乙醇、MEM 非必需氨基酸、5-20% 血清、抗体、核苷和谷氨酰胺的 DMEM 培养基(参见 Strojek 等, *Theriogenology* 33: 981 (1990); Notarianni 等, *J. Reprod. Fert.* 43 (Suppl): 255 (1990)), 以及 CM β 和 BRL 条件培养基(参见 Handyside 等, *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 196: 185 (1987))。

培养成纤维细胞至长满后，将其传代到其它的组织培养板上或直接用于培养 ICM 细胞和细胞系。优选地，在传代后加入 ICM 之前的某一时间也用一定量的包含于适当培养基如 α -MEM 中的抗生素如丝裂霉素 C 处理(丝裂霉素 C 的用量优选为 5-100ug/ml，更优选约 10ug/ml)、或者辐射处理饲养细胞如成纤维细胞以终止或阻碍成纤维细胞的生长。

优选在允许培养板中细胞长成铺满单层的条件下培养饲养细胞如成纤维细胞。例如，为此，可在 37 °C、湿润气氛中如含有 5%CO₂ 的空气

中培养成纤维细胞。然而，取决于各种因素如饲养细胞的类型、传代数、种类以及其它因素等，具体的培养条件可以有所变化。

如前文所述，随后将包含所需饲养层最好是厚且长满的细胞单层的培养平板用于获取和培养本发明的 CICM 细胞和细胞系。优选此过程包括将含有至少一部分滋养外胚层的部分分离的或完整的有蹄动物 ICM 直接铺到经丝裂霉素 C 处理过的长满饲养层上。这可通过可促使培养 ICM 和饲养细胞之间直接物理接触的任何方法来完成。为此，可用不同的方法。例如，可使用玻璃吸管起始 ICM 和成纤维细胞间的接触。或者，可通过将 ICM 细胞置于饲养层下面、培养板的底部，或通过离心 ICM 细胞以使它们直接铺于饲养细胞层上而达到饲养细胞层和培养 ICM 之间的物理接触。

利用可允许 ICM 的生长和维持并获得所需的多层集落形态的任何培养基，在饲养层上培养 ICM。优选在含有补加了 FCS 和 0.1mM β -巯基乙醇(Sigma)的 α -MEM 的生长培养基中维持 CICM 细胞和细胞系。然而，也可换用其它培养基，包括诸如前文所公开的培养基。

在培养期间，必要时将生长培养基换成新鲜培养基以利于细胞生长。通常每 2-3 天换液一次。然而，根据具体的饲养细胞和所选用的培养基的情况，换液间隔时间可以有所不同。培养数天(通常约 4 天)后，可观察到最早的培养 ICM 或 CICM 集落，然后在此后的某个时间，通常至少约 1 天后，可将培养 ICM 传代到含有成纤维细胞饲养层的其它培养板上。

也已发现，若将 CICM 细胞与一些相连的饲养细胞一起传代至新的饲养层上，其传代效率会有所提高。因此，新代细胞含有一些来自前代的饲养细胞。将 CICM 细胞与一些相连饲养细胞(成纤维细胞)一起传代时，已发现传代效率(可形成新集落的 CICM 细胞团的百分比)有了明显提高。

如上所述，本发明的一个重要内容包括发现优选对含有特定形态特征组合的 CICM 细胞进行传代，以及生产具有所需特性的培养 ICM 细胞和细胞系。具体地说，优选具有下述形态特征的细胞：

- (i) 细胞质/细胞核的体积比例较小(约 10/90-50/50，更优选约 10/90-

30/70, 最优选约 25/75);

(ii) 可见胞质小泡; 和

(iii) 单个细胞较小, 直径约 10-20 μm 、优选小于约 15 μm 。

在显微镜下观察培养细胞、适当测量并进行适当的体积计算, 可容易确定细胞质/细胞核体积比的计算值。类似地, 在培养细胞中可很容易观察到胞质小泡。最后, 通过测量包含于饲养层培养物上的 CICM 的细胞直径可容易地测出细胞大小。

本发明人已惊奇地发现, 对分离和增殖培养 ICM 细胞, 以及生产具有所期望的形态和细胞标记特性且在组织培养延长期间(即重复传代后)仍保持这些特性的细胞系而言, 上述形态特征是很重要的。

更具体地说, 本发明是基于观察到当 ICM 或传代的 CICM 细胞系开始附着于饲养层上时, 不久(通常约 2 天后)就可见到一些多层集落。可是, 当细胞在体外增殖时, 这些多层集落通常会开始变平形成上皮片状细胞。与此观察结果相关, 已发现包含于集落多层部分的细胞是 AP 阳性和细胞角蛋白 18 阴性的, 而扁平上皮样细胞则为 AP 阴性和细胞角蛋白 18 阳性。因此上皮样细胞与发育中胚胎的 ICM 表达细胞标记有所不同。相应地, 已发现在饲养细胞层上超时培养的 ICM 逐渐显示出与未分化的发育中胚胎的 ICM 不一致的形态和表达细胞标记情况。这种情况是不合乎需要的, 因为与发育中胚胎的未分化 ICM 特性相同或基本相似的 CICM 才有可能全能性的, 从而在嵌合和核移植(NT)技术中有所用处。

因此本发明的目标是开发可保持或回复这些 ICM 细胞集落以使它们含有所期望的多层集落形态的培养方法。根据所描述的 ICM 集落的形态可以推论, 应可分离出特定细胞并用于传代, 这些分离细胞有可能会生成具有所期望的多层形态的培养 ICM。

如上面所提到的, 观察到尽管生长的 ICM 细胞集落开始完全是多层的, 但它们很快变平并在集落中产生具有两种截然不同的细胞群体的上皮细胞片。第一类群体包含于细胞集落的外周并具有多层结构, 其中包括具有以下形态特征的细胞:

(i) 细胞尺寸较小(直径约为 10-20 μm , 优选小于 15 μm 的细胞);

(ii) 可观察到胞质小泡; 和

(iii) 细胞质/细胞核的体积比例较小(约 10/90-50/50, 优选约 10/90-30/70, 最优选约 25/75)。

也发现该细胞集落的外围部分对 AP 活性呈着色强阳性。相反地, 集落中间的细胞趋向于含有极少或无 AP 活性的扁平上皮样细胞。

基于可观察到 AP 活性和多层结构, 本发明人决定选择性地仅对或基本上仅对细胞集落的外周细胞特别是细胞质体积/细胞核的体积比例较小、其中可观察到胞质小泡并且细胞尺寸较小(如前文所限定)的细胞进行传代, 以期这些培养细胞可产生具有所期望形态的额外的多层 CICM 细胞集落。然而, 这一结果还未完全确定。相反地, 这种传代反而可能产生完全由扁平上皮样细胞组成的集落; 当观察到的上皮样外观和改变的细胞标记表达情况是在体外超延长期培养的结果或 ICM 细胞传代的结果时尤为如此。

相当令人惊奇的是, 本发明人发现, 对包含于多层细胞集落外围、具有上述形态特征的细胞选择性地传代, 产生了 ICM 多层集落。除此之外, 本发明人还惊奇地发现这些多层集落含有与发育中胚胎的 ICM 同样或基本相似地表达细胞标记的细胞。而且, 还发现本发明方法为理论上无限地生产与发育中的有蹄动物胚胎的 ICM 形态和表达细胞标记相同或基本相似的 CICM 提供了可能。按照本发明产生的 CICM 在培养的延长期间即经至少一次传代、优选约 5-10 次传代后、更优选约 10-50 次传代后仍保持这类特性。

可通过已知的细胞分离方法对具有所需形态特征的细胞进行选择性地传代。举例说, 可通过物理学途径如利用玻璃吸管或细针将构成集落周边的多层部分与集落中间部分分离, 随后可通过物理和/或化学和/或酶促方法进一步分离上面产生的大细胞团。例如, 可利用酶如胰蛋白酶或链霉菌蛋白酶实现细胞的分离。或者可通过利用细胞吸管反复吸取大的细胞群或细胞块, 或使用针或剃刀片将大细胞块切成更小块而对细胞进行机械分离。优选地, 这样的化学和/或机械细胞分离可产生适于传代的 CICM 群, 即包含约 5-100 个细胞的细胞群。

用于传代的分离细胞优选由包含于细胞集落的多层周边部分(优选具有上述形态特征)的细胞所组成。然而,在有些情况下,按本发明进行处理后,甚至来自细胞集落内部的细胞在传代至新的饲养层上后也能产生多层集落。

人们认为造成这一现象是由于传代过程或由于与新的饲养层之间重新建立了细胞-细胞间接触而使细胞回复到所期望的多层集落。但是,本发明人不希望被他们的观念所束缚。

在传代过程中,有必要将小的 ICM 细胞或细胞群直接与饲养层接触以阻止 CICM 集落分化。已发现如果这些细胞或细胞群生长时未与饲养层充分接触,将会产生胚状体。这样的胚状体可见于图 1 中,该图是一张显示了未与饲养层充分接触时生长的培养 ICM 细胞的图片。

为促进直接接触,可使用能保证传代 CICM 细胞和饲养细胞层间直接细胞接触的任何方法,该方法对 CICM 是非降解性的,而且对集落产生没有不利影响。效率最低的方法是简单地将小细胞块置于饲养层上面。更优选使用可确保 CICM 细胞和饲养层间更有效的细胞-细胞接触的方法。已发现这样能产生更多的多层 CICM 细胞集落。

可使用能促使 CICM 细胞和饲养细胞间形成更强的物理接触的任何物理学方法,但这种方法应不是过分破坏性的,即对产生所需多层类型细胞和 CICM 细胞系没有不利影响。举例来说,可提高传代的 CICM 与饲养层间直接接触的方法包括利用吸管将单个的细胞块压到饲养层上;将 CICM 细胞群置于饲养层下面以使该细胞夹在饲养层和平板底部之间;以及将细胞块离心到饲养层上,如在 100-5000g 离心约 10 分钟—5 小时以使细胞块贴到饲养层上。这些方法仅仅是可用于迫使 CICM 细胞块与饲养层紧密接触的多种方法中的几个示例。也可换用其它方法,只要那些方法对所期望的多层 CICM 细胞集落的形成没有不利影响。如前面所论述的,还发现通过将 CICM 细胞与一些相连的饲养细胞一起传代到新的饲养集落上可以进一步提高传代效率。显而易见,来自前代的一些饲养细胞的存在提高了产生新集落的 CICM 细胞块的百分比。

一般说来,以上培养 CICM 细胞的培养方法适用于任何有蹄动物来

源的 CICM 细胞。例如，最初发现适合培养猪 CICM 细胞的方法已发现也适用于牛 CICM 细胞。然而，可观察到的一个区别就是来自牛胚胎的大部分细胞是 AP 阴性，而来自猪胚胎的那些细胞则是 AP 阳性的。推测牛和猪 ICM 在 AP 表达上可能存在种间差异。但这一假设尚未证实，因为本发明人已生产出一个具有弱 AP 阳性且以小团块生长的牛细胞系(见图 2)。

而且，所述牛细胞与所述猪细胞不同之处还在于其集落边界不易区分。然而，与猪来源的细胞相似，包含于集群周边区的牛来源细胞是 AP 阳性的而集落中间的细胞则趋向于丧失 AP 活性。这一点也可通过重新参考图 2 而观察到。与猪来源的 CICM 类似，这些细胞是细胞角蛋白 18 阴性的。

如实施例所示和下文更详尽的描述，本发明的 CICM 在异源 DNA 的引入中是有用处的。具体地说，已经获得了基因组中包含有异源 DNA (β -半乳糖苷酶 DNA 构建体)的转基因 CICM 细胞系。本发明人最近使用上述培养方法也得到了与所述的 CICM 细胞在形态、分化能力、内源 β -半乳糖苷酶活性水平(更高)和表达 β -半乳糖苷酶 DNA 构建体的能力上稍微有些不同的细胞。另外，这些细胞从开始培养时就是 AP 阴性的，而前面提到的猪 CICM 细胞则是在培养过程中随时间推移而趋向于失去 AP 活性。在来自于牛的 CICM 中也观察到类似的细胞并对它们进行了增殖。尽管这些细胞没有 AP 活性，它们还是呈现出一些与 ICM 细胞一致的特性。因此，它们在转基因克隆胚胎的产生中、以及其它所说的 CICM 的应用中也可能是有用的。

本发明进一步提供了制备具有所期望的形态和细胞标记特征的培养 ICM 细胞和细胞系，如 AP 阳性和细胞角蛋白 18 阴性的 CICM。这第二种方法也包括获取和培养 ICM (优选从饲养层培养物上的有蹄动物胚胎或前胚胎期胚胎)。优选的培养技术和传代方法如上文所述。

然而，这第二种方法在事实上有所不同，其培养 ICM 细胞会表达分化抑制基因(DI gene) (更好是只在特定条件下进行表达)。为此，优选通过在培养或传代过程中的某一阶段将包含一分化抑制基因的核酸序列导

入 ICM 细胞而完成，更好是该分化抑制基因在诱导型或可调型启动子控制下进行表达。

如上文所提到的，DI 基因指可抑制 CICM 细胞集落中细胞分化并且对分离具有所期望的形态特征和细胞标记表达的 CICM 细胞系不会有不利影响的任何一个或多个基因。可将 DI 基因（优选以适当的阅读框架与可调型或诱导型启动子有效连接）导入传代过程中衍生 CICM 细胞系的胚胎细胞的核中，或者导入已建立好的 CICM 细胞系中。

可通过将 DI 基因（或准确地说是转基因）整合入胚胎 ICM 或培养 ICM 细胞或细胞系的基因组中的方式而达到上述目的。将目的 DNA 引入哺乳动物细胞尤其是胚胎细胞的方法在本领域中是已知的，包括诸如显微注射、电穿孔、脂转染、逆转录病毒插入、钙沉淀和脂质体插入等方法。到目前为止，显微注射看起来是将 DNA 引入 CICM 细胞系的最有效方法。然而，我们认为其它的方法经适当的优化后也将是有效的。

适用于本发明的抑制基因包括诸如 tsA58(见 WO91/13150)、已知可抑制分化的其它 T 抗原和癌基因产物(见 WO91/13150 中的实施例)、OCT3(Okamoto 等, 细胞, 60: 461 (1990)), Rosner 等, 自然, 345: 686(1990))、LIF 和 LIF 受体(Smith 等, 自然, 336: 688 (1988))等。这些 DI 基因仅仅是可用于本发明的 DI 基因的一些例子。

优选将 DI 基因置于诱导型或可调型启动子的控制下。正如所提到的，本领域熟知诱导型启动子的例子，包括诸如金属硫蛋白启动子(金属离子诱导型)，以及四环素、干扰素和类固醇的应答元件(见 WO94/29442; Kimura 等, 细胞, 44: 261 (1986); Yarranton, Curr. Opm. Biotech, 3: 506 (1992))。

转移基因被整合入胚胎或培养 ICM 细胞或细胞系中，并在饲养细胞培养物上建立起由此得到的转基因细胞后，通过诱导特定的诱导型启动子可启动 DI 基因。这通常是通过调整培养条件来完成。例如，如果该启动子是金属硫蛋白启动子，则可通过加入含有适当的可诱导(启动)该启动子的金属离子的培养基而进行诱导。因而，在诱导条件下培养时，该培养 ICM 细胞在组织培养物中应持续或长期保持所期望的 CICM 细胞形态和

基因表达特征。更具体地说,所述细胞应该具有所期望的多层细胞集落形态,并与发育中胚胎的 ICM 表达细胞标记相同或基本相似,即通常这些细胞是 AP 阳性和细胞角蛋白(细胞角蛋白 18)阴性。因此,应可以将诸如 ICM 细胞集落分化为 AP 阴性和细胞角蛋白 18 阳性的扁平上皮细胞片(当 ICM 在常规条件下培养时可观察到这些现象)之类的问题减到最小或甚至消除。而且这也可以避免 ICM 细胞在传代期间和维持培养期间发生分化。

用上述方法得到的培养 ICM 细胞和细胞系有许多用途。最特别的是,可将这些 CICM 细胞系用于产生具有全部或部分 CICM 遗传组成的后代。

通过将 CICM 细胞直接注射入受体胚胎的囊胚腔中或将其与前胚泡期胚胎相结合,可获得嵌合后代。随后将由此产生的嵌合胚胎植入雌性受体中。由此获得的后代在所有器官系统包括生殖器官的生殖细胞都应具有 CICM 的遗传组成。因此,嵌合动物能将 CICM 遗传信息传递给随后的各代后代。而且导入的 CICM 可能在它们的基因组中引入了一个或多个目的基因,从而有可能获得表达目的基因的嵌合后代。举例说,可将能提供强化牲畜特性的基因如编码激素的基因、提供疾病抗性的基因(如淋巴因子、病毒抗性基因、细菌抗性基因)、提高乳汁产量的基因、改变脂肪百分比的基因、增加体重的基因及其它强化特性的基因导入 CICM 中。同样,也可导入编码所需基因产物的基因,例如编码产物对人类治疗或异体移植有用的基因。

也可将本发明的 CICM 细胞用于核移植过程中,以获得核移植的胚胎、胎儿和后代。核移植技术在本领域中是已知的,并且在本发明的背景中述及的许多参考文章中都有描述。特别可参见以下文献: Campbell 等, Theriogenology, 43: 181 (1995); Colles 等, Mol. Reprod. Dev., 38: 264-267 (1994); Keefer 等, Biol. Reprod., 50: 935-939 (1994); Sims 等, 美国国家科学院院报, 91: 6143 (1994); Stice 等, Theriogenology, 43: 301 (1994); Sims 等, 美国国家科学院院报, 90: 6143-6147 (1993); WO94/26884; WO94/24274 和 WO90/03432, 这些

文献全文引入本文作为参考。同样，如果此 CICM 参与发育成胎儿生殖细胞，那么它的遗传信息就能被传递给随后的各代动物。类似地，可对 CICM 细胞进行遗传加工以在其基因组中整合入一个或多个所需基因，如可加强牲畜特性的基因，或编码所需基因产物，如人类治疗用或其它多肽的基因。

更进一步的是，可将核移植所产生的或来自嵌合胎儿或后代的分化细胞、组织或器官用于移植疗法中。例如，来源于含有抗排斥作用基因的 CICM 细胞的核移植或嵌合胎儿可提供一个在补充或取代人造血干细胞方面有用处的造血细胞源。这有可能对免疫损伤的病人如爱滋病人或其它会影响造血干细胞的疾病患者是有用的。此外，干细胞可能在亨廷顿病 (Huntington's)、帕金森 (Parkinson's) 病和阿尔茨海默病的治疗中有用处。还有，胰腺细胞可能在糖尿病的治疗中有用处。进一步移植的肝细胞可能在肝疾病的治疗中有用处。或者，有可能可以将完整柔软的器官从来源于已被遗传学改变之 CICM 的有蹄动物中移植到人体内 (见 Durling 等, Curr. Omp. Immunol., 6: 765(1994))，此文已在此全部引入作为参考。

除上述作用之外，本发明的 CICM 细胞系还可用做分化的体外模型，尤其是用于参与早期发育调节的基因的研究中。

以上只是按照本发明的方法所获得的 CICM 细胞系的可能应用中的一些范例。

本发明将在以下实施例中进一步描述。

实施例 1

按下述通用方法从前胚泡和胚泡期猪胚胎中生产 CICM 细胞系。首先，从 12-16 日龄的鼠胎儿中获取胚胎成纤维细胞的原代培养物。无菌切除其头、肝、心脏和消化道后，将胚胎切碎并在已预热好的胰蛋白酶 EDTA 溶液 (0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY) 中 37 °C 保温 30 分钟。将成纤维细胞铺于组织培养板中，并在补充有 10% 胎牛血清 (FCS) (Hyclone, Logan, UT)、青霉素 (100IU/ml) 和链霉素 (50ug/ml) 的 α -MEM 培养基 (BioWhittaker, Walkersville, MD) 中培养。传代 3-4 天后，将 35 × 10 Nunc 培养板 (Baxter Scientific, McGaw Park, IL) 中的胚

胎成纤维细胞经配制于补充 α -MEM培养基的丝裂霉素 C(10ug/ml, Sigma)处理至少3小时。成纤维细胞是在37℃, 空气中含有5%CO₂的潮湿气氛下培养和维持的。仅将具有厚且长满的单层细胞的培养平板用于培养CICM细胞系。对于获取和增殖未分化CICM细胞系来说, 饲养层的特性是一个重要因素。

从死后或外科剖腹术中的猪生殖道中外科手术式地收集猪胚胎。胚胎期胚胎的ICM或者用切割针从滋养层细胞中部分分离, 并用胰蛋白酶或链霉蛋白酶消化, 或者任由其以完整形式存在。将ICM和至少一部分滋养外胚层直接铺到经裂霉素 C 阻断的成纤维细胞上, 常用一玻璃吸管来起始ICM和成纤维细胞饲养层之间的接触。在含有补充了10%胎牛血清(FCS)和0.1mM β -巯基乙醇(Sigma)的 α -MEM的生长培养基中维持CICM细胞系。每2-3天更换生长培养基一次。培养至第4天可观察到初始集落, 并可在第5天后的任何时间对其传代。只分离具备以下三个形态特征的细胞用于传代: 细胞质/细胞核的体积比例较小、具有胞质小泡和单个细胞通常较小(直径小于15 μ m)。这些细胞常常分离自与饲养层保持直接接触的集落的多层部分。在传代到新的饲养层上后, 符合上述标准的集群部分常为AP阳性和细胞角蛋白阴性的。

当此ICM或传代的CICM细胞开始附着到饲养层上时, 经两天培养后可见由小细胞组成的多层集落, 如图3所示。这些多层集落是AP阳性和细胞角蛋白阴性的(见图4和图5)。但是, 有些集落开始形成上皮样细胞片。此上皮样细胞是AP阴性和细胞角蛋白阳性的(图6和7)。此外, 在体外增殖时, 多层集落经常开始变平成为上皮细胞片(图8)。

本发明人观察到, 正在生长的多层集落开始变扁平, 集落内形成具有两种截然不同的细胞群体的上皮细胞片。第一种细胞群体位于集落的周边区域, 集落的这一部分是多层的, 而且单个细胞较小并具有胞质小泡(图8)。这一区域对AP活性的着色也呈阳性。集落的另一区域包含扁平上皮样细胞群体。这些细胞趋向于位于集落中间。在显微镜下观察该集落时, 能看到这一细胞群体中的单个细胞和细胞边界(图8)。同样, 这些细胞具有极小的或根本没有AP活性。

推测为了维持所需的多层型细胞, 优选选择性地仅对周边的细胞进行传代以产生额外的多层集群。

利用玻璃吸管、剃刀或针切出集落的多层部分(周边细胞)很可能可以完成上述工作。可通过机械分离或利用胰蛋白酶(0.05%胰蛋白酶/0.2% EDTA)与机械分离相结合的方法对大块细胞进一步破碎。机械分离是通过用小孔径吸管反复上下吹吸细胞大团块来进行。或者可利用针或剃刀片将大块细胞切成小块。令人惊奇的是, 通过所有这些方法所获得的 CICM 块(5-100 个细胞)随后可传代到新的饲养层上从而产生具有所需多层形态的培养物。在有些情况下, 经过上述同样方式处理, 甚至来自集落内部的细胞在传代到新的饲养层上后也能产生多层集落。估计这是由于传代过程或由于与新饲养层之间重新建立了细胞与细胞的接触, 从而使这些细胞回复到多层集落状态。

我们观察到必须将这些小块细胞重新置于与饲养层直接接触的状态才能阻止 CICM 集落的分化。反之, 与饲养层无接触的状态下生长的细胞则形成了胚状体(图 1)。有几种方法可用于重新起始培养细胞与饲养层的接触。效率最低的方法是将细胞培养平板放回到培养箱中后, 让小团细胞自然沉降到饲养层表面上。优选的方法包括迫使 CICM 细胞与饲养层之间发生细胞与细胞接触。由此能产生更多的新形成的 CICM 细胞集落。迫使细胞与细胞接触的一种方法是用吸管将单个细胞团按压到饲养层顶部。另一方法是将 CICM 细胞团置于饲养层下面以迫使这些细胞处于饲养层和培养板底部之间。还有另一种方法是通过在 100-5000g 对饲养层顶部的细胞团离心 10 分钟—5 小时以迫使这些细胞贴在饲养层上。基本上, 可迫使传代的 CICM 细胞团与饲养层紧密接触的任何方法都会得到具有所需多层形态的 CICM 细胞集落的生成。此外, 如前面所述, 通过将 CICM 细胞与一些相连的饲养细胞一起传代到新的饲养层上可进一步提高传代效率。

实施例 2

将按照实施例 1 所得到的 CICM 细胞用于插入异源 DNA。具体地说, 将包含有置于 β -半乳糖苷酶基因和/或新霉素磷酸转移酶基因之前的

不同启动子的线性及超螺旋 DNA 构建体显微注射到这些细胞中。所用的具体启动子是巨细胞病毒启动子(CMV 启动子)、磷酸甘油酸激酶启动子(PGK 启动子)、乳腺启动子(MAM 启动子)、 reCMV 启动子和鸡 β -肌动蛋白启动子。这些基因构建体被稀释于缓冲液(含有 80mM KCl 和 70mM HEPES)中。然而,也可换用其它缓冲液,如 Tris-EDTA。溶液中的 DNA 构建体的浓度是 5-10 μ g/ml。但 0.1-100 μ g/ml 的浓度都应该是有效的。然后将这些 DNA 制备物显微注射入按实施例 1 得到的培养 CICM 细胞中。

在此过程中,通过倒置显微镜对集落进行观察而对集群内的单个 CICM 细胞进行定位。此后,用一带有 DNA 制备物的小注射针单独刺穿细胞膜或附带着刺穿核膜。针头开口约 1 μ m。选用这种直径的针以避免 CICM 细胞裂解。此外,通过使用附着于倒置显微镜的显微操作仪可简便地进行显微注射操作。

将注射针管插入核内后,注入近 700 拷贝的 DNA 到核中。随后将微吸管移离细胞。对 CICM 集落中的其它细胞重复这一处理过程。在理想的情况下,每小时可显微注射 1000 个细胞。

使用不同的启动子得到的结果总结于下表中。

显微注射的 CICM 细胞中异源基因的表达

启动子	注射两小时后的表达	注射五天后的表达
CMV	+++	++
PGK	++	无
reCMV	++	未检测
MAM	++	未检测
C-Actin	+	未检测

以上结果表明,含有任一种被检测启动子的载体均得到了可表达所插入的异源 DNA 的细胞。还观察到几个构建体一起显微注射对基因表达无

任何加和效果。

图9是含有CMV β -半乳糖苷酶构建体的显微注射的猪CICM细胞的X-gal染色结果。照片中可观察到表达 β -半乳糖苷酶的细胞群。这表明 β -半乳糖苷酶基因已被有效地掺入到细胞基因组中，并在子细胞中不断传递和表达。

上述结果是用猪CICM细胞得到的。此外，用类似方法，也将CMV和PGK- β -半乳糖苷酶构建体注射到牛CICM细胞中。这两种DNA构建体均得到了可表达 β -半乳糖苷酶的细胞。

因此，这些结果表明，可将按照本发明所培养的CICM成功地用于所需异源DNA的整合和表达中。同样，这些基因表达特性可传递给子细胞。

实施例3

在这种培养方法中，DI基因条件性地在CICM细胞集落中表达以阻止细胞的分化。细胞传代和培养技术与实施例1中所用的相同，但CICM细胞的基因组成有所不同。具体地说，此处DI基因被导入到衍生CICM细胞的胚胎细胞的细胞核中，或已建好的CICM细胞系中。随后将转基因整合到CICM细胞的基因组中。任何已知的、可将转基因导入胚胎细胞的方法都可使用，包括诸如显微注射、电穿孔、逆转录病毒插入、钙沉淀和脂质体插入等方法。

插入的转基因在诱导型启动子的控制下表达。诱导型启动子包括诸如四环素(WO94/29442)、干扰素(Kimura等, 1986)、类固醇和金属硫蛋白(Yarranton, 1992, 综述)等的应答元件。相应地，DI基因的插入的方式使其以适当的阅读框架与诱导型启动子有效相连。

嵌合基因构建体整合到胚胎细胞的基因组中并且建立起多层ICM细胞集落后，通过诱导型启动子进行诱导可促使DI基因表达。这种表达使ICM细胞集落持续地、或在组织培养的延长期间维持所期望的多层形态，并表达与发育中胚胎的ICM一致的基因。这样，可将诸如细胞分化为失去AP表达并表达细胞角蛋白18的扁平上皮细胞片之类的问题减到最小，或甚至可以完全避免。这一方法也可有效用于阻止在长期培养期间

发生的细胞分化。

尽管本发明已通过某些具体实施方案进行了描述，应理解本领域技术人员能对其进行许多改进和改变而不背离本发明的精神。因此所附权利要求涵盖在本发明实质和范围内的所有改进和改变。



图 1

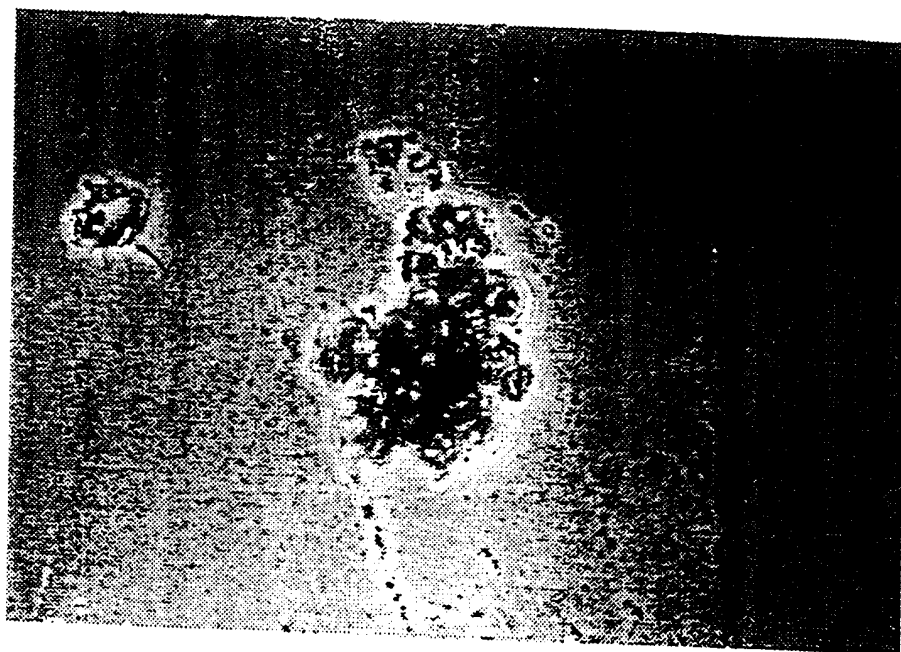


图 2



图 3



图 4

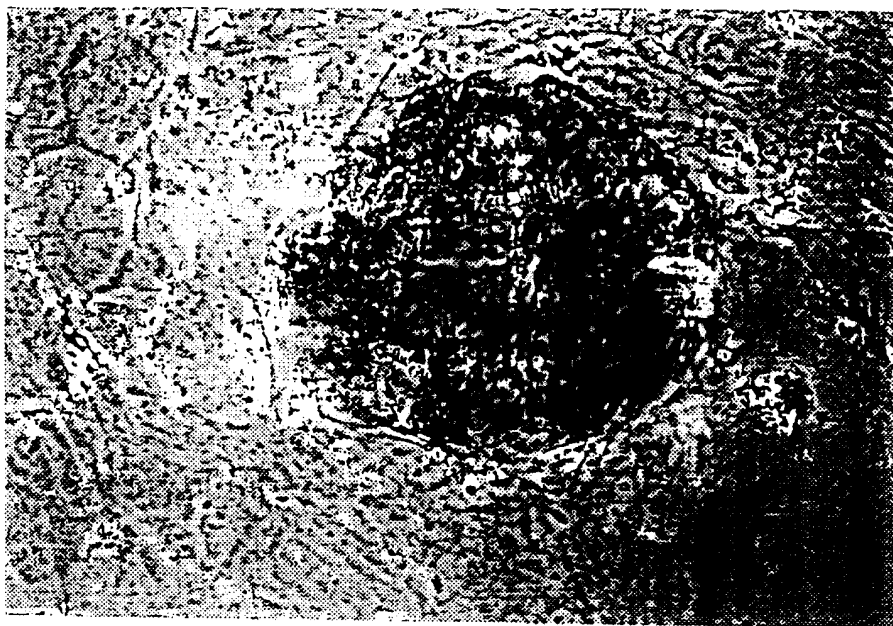


图 5

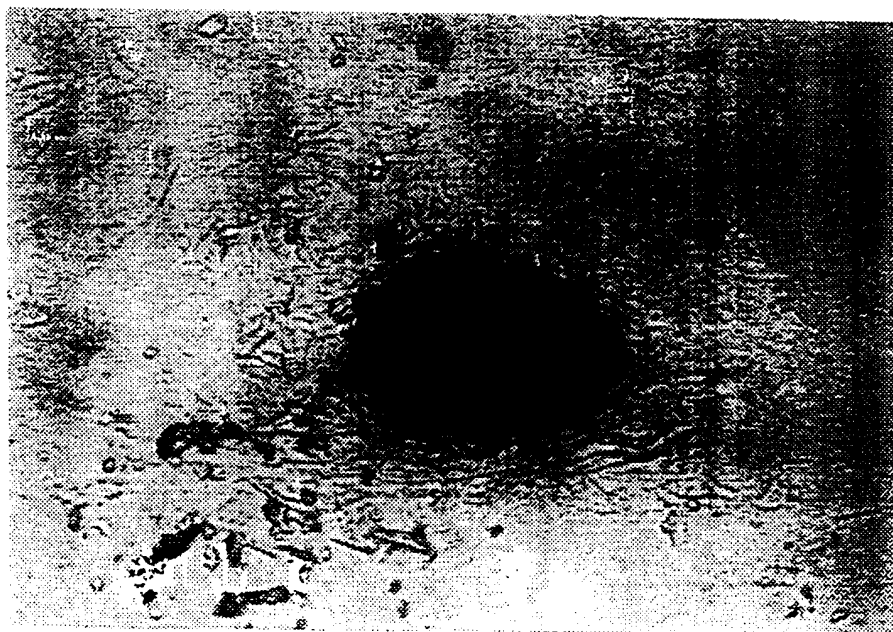


图 6

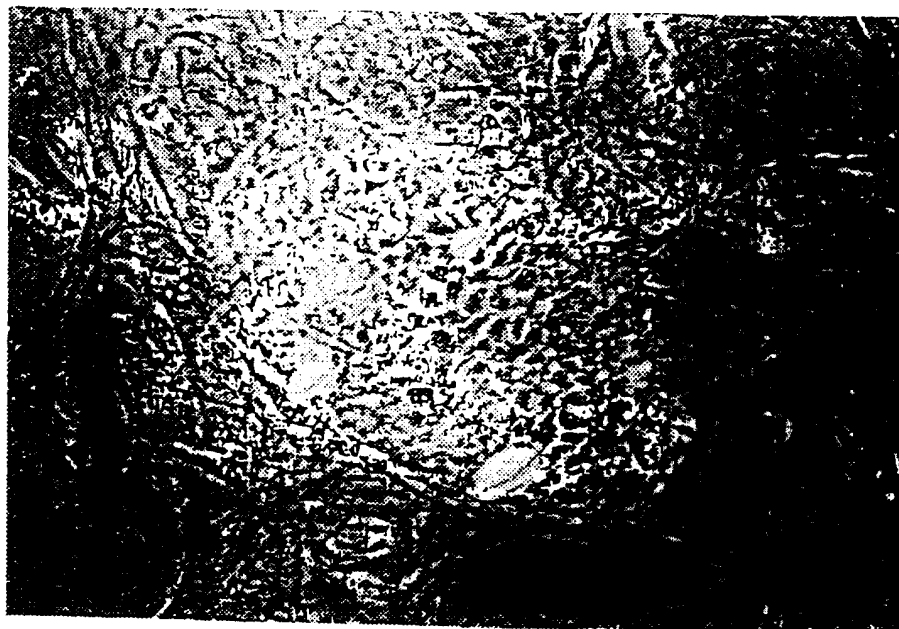


图 7

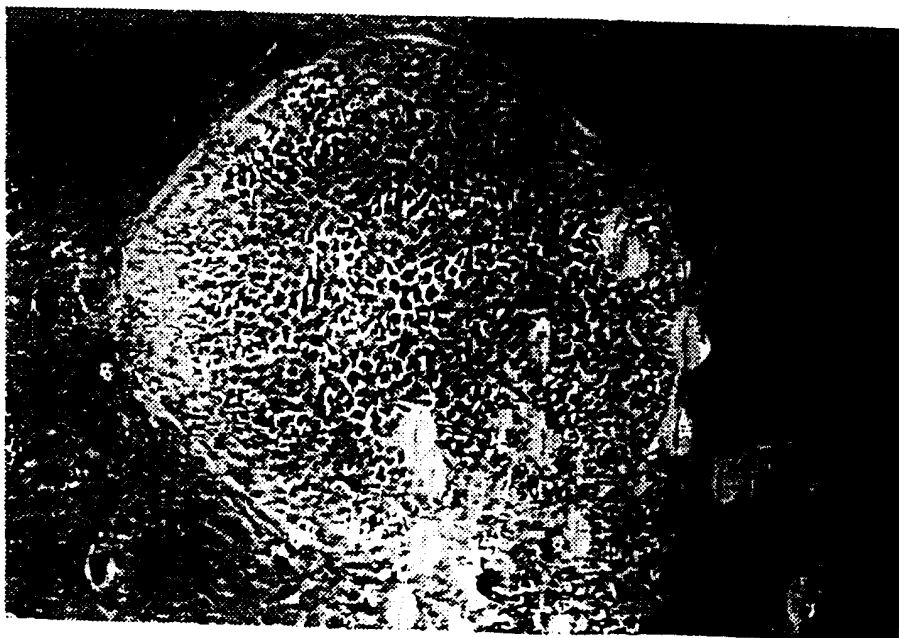


图 8

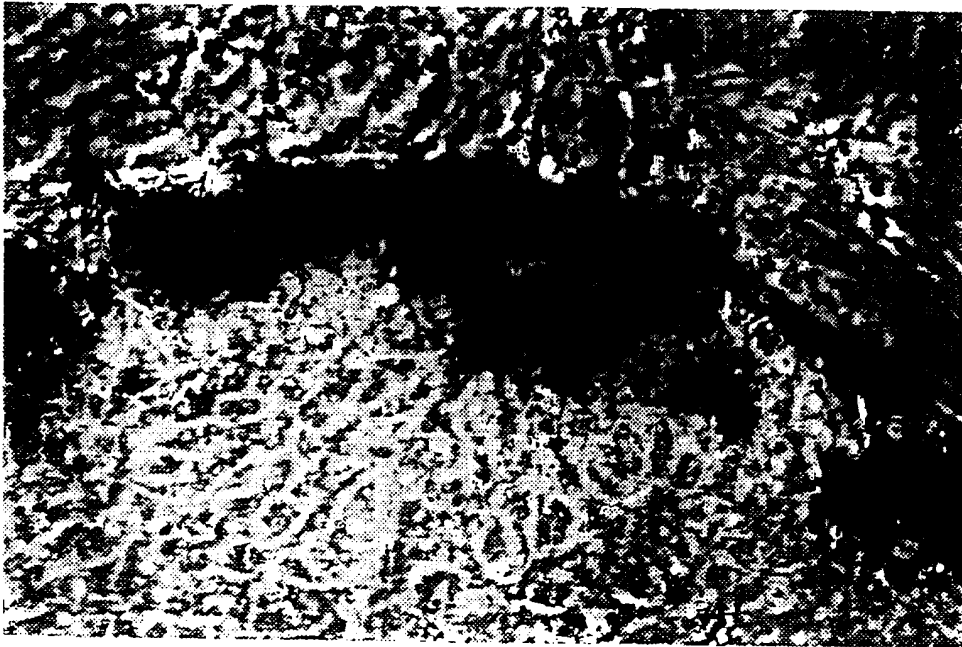


图 9