

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/09

C12N 15/63 C12N 15/00

C12N 15/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818280.9

[43] 公开日 2003 年 6 月 18 日

[11] 公开号 CN 1425064A

[22] 申请日 2000.5.10 [21] 申请号 00818280.9

[30] 优先权

[32] 1999.12.20 [33] US [31] 09/467,076

[86] 国际申请 PCT/US00/12631 2000.5.10

[87] 国际公布 WO01/46401 英 2001.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.9

[71] 申请人 马萨诸塞大学

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 J·希伯特 R·兰嘉 J·罗布尔

[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 唐伟杰

权利要求书 4 页 说明书 43 页 附图 3 页

[54] 发明名称 通过交叉物种核移植制备的胚胎或干样细胞

[57] 摘要

本发明提供一种核转移的方法，涉及将分化的供体细胞核与相容的(与供体细胞相同物种的)细胞质和/或线粒体一起移植到与供体细胞不同物种的去核卵母细胞中。所获核移植单位用于制备等基因胚胎干细胞，尤其是人等基因胚胎细胞或干细胞。这些胚胎细胞或干样细胞对于制备目的分化细胞以及，例如通过同源重组在该细胞的基因组特异位点处，引入、除去或修饰目的基因是有用的。这些细胞可以含有异源基因，在细胞移植治疗和细胞分化的体外研究中尤其有用。通过导入相容的细胞质或线粒体 DNA(供体细胞或细胞核相同物种的)提高核转移的效率。本发明还提供了通过遗传改变供体细胞以抑制细胞凋亡，选择特定的细胞周期和/或在增强胚胎生长和发育的条件下培养，提高核移植效率的方法。

ISSN 1008-4274

1. 制备胚胎或干样细胞的方法，包括以下步骤：

(i) 在适于核转移(NT)单位形成的条件下，将供体人或哺乳动物分化细胞或细胞核插入受体动物卵母细胞中，其中该卵母细胞来源于不同于该人或哺乳动物细胞的动物物种，其中内源卵母细胞细胞核在供体细胞或细胞核的导入之前，与之同时，或之后被去除或失活；

(ii) 激活所获的核转移单位；

(iii) 此外向所述卵母细胞中插入源于供体细胞或细胞核相同物种卵母细胞或卵裂球的细胞质（“相容的细胞质”）；

(iv) 培养所述激活的核转移单位直到其超过二细胞发育阶段为止；和

(v) 培养从所述培养的 NT 单位获得的细胞以获取胚胎或干样细胞。

2. 权利要求 1 的方法，其进一步包括将供体细胞或细胞核相同物种的线粒体 DNA 导入到受体卵母细胞中（“相容的线粒体”）。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞质在供体细胞或细胞核的导入之前，与之同时，或之后被导入。

4. 权利要求 4 的方法，其中所述导入在供体细胞或细胞核的导入约 6 小时之内实施。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述卵母细胞是未成熟的卵母细胞。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述卵母细胞是未成熟的人卵母细胞。

7. 权利要求 5 的方法，其中所述未成熟人卵母细胞在从其分离细胞质之前在体外成熟。

8. 权利要求 4 的方法，其中所述未成熟的卵母细胞在从其分离细胞质之前在体外激活。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述在体外激活包括将所述卵母细胞与能提高钙水平的化合物接触。

10. 权利要求 2 的方法，其中在从供体细胞或细胞核相同物种的所述至少一个卵母细胞或卵裂球中导入细胞质之前去除受体卵母细胞

的全部或部分细胞质。

11. 权利要求 1 的方法，其中插入到去核动物卵母细胞中的细胞是人细胞。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述人细胞是成年细胞。

13. 权利要求 11 的方法，其中所述人细胞是上皮细胞，角质形成细胞，淋巴细胞或成纤维细胞。

14. 权利要求 11 的方法，其中所述卵母细胞从哺乳动物获得。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述动物卵母细胞从有蹄动物获得。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述有蹄动物选自：牛、绵羊、猪、马、山羊、和水牛。

17. 权利要求 1 的方法，其中使所述去核卵母细胞在去核前成熟。

18. 权利要求 1 的方法，其中在体外激活该融合的核转移单位。

19. 权利要求 1 的方法，其中将该激活的核转移单位在饲养层培养物上培养。

20. 权利要求 19 的方法，其中该饲养层包含成纤维细胞。

21. 权利要求 1 的方法，其中在步骤(v)中将来自具有 16 个或多个细胞的 NT 单位的细胞培养在饲养细胞层上。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述饲养细胞层包含成纤维细胞。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述成纤维细胞包含小鼠的胚胎成纤维细胞。

24. 权利要求 1 的方法，其中诱导所获胚胎或干样细胞分化。

25. 权利要求 11 的方法，其中诱导所获胚胎或干样细胞分化。

26. 权利要求 1 的方法，其中通过电融合实现融合。

27. 根据权利要求 1 的方法获得的胚胎或干样细胞。

28. 根据权利要求 11 的方法获得的人胚胎或干样细胞。

29. 根据权利要求 12 的方法获得的人胚胎或干样细胞。

30. 根据权利要求 13 的方法获得的人胚胎或干样细胞。

31. 根据权利要求 14 的方法获得的人胚胎或干样细胞。

32. 根据权利要求 15 的方法获得的人胚胎或干样细胞。

33. 通过权利要求 25 的方法获得的分化的人细胞。
34. 权利要求 33 的分化的人细胞, 该细胞选自: 神经细胞、造血细胞、胰细胞、肌细胞、软骨细胞、泌尿细胞、肝细胞、脾细胞、生殖细胞、皮肤细胞、肠细胞、和胃细胞。
35. 权利要求 33 的分化的人细胞, 其含有和表达插入的基因。
36. 权利要求 1 的方法, 其中在所述胚胎或干样细胞中插入, 去除或修饰目的基因。
37. 权利要求 36 的方法, 其中目的基因编码治疗性酶, 生长因子或细胞因子。
38. 权利要求 37 的方法, 其中所述胚胎或干样细胞是人胚胎或干样细胞。
39. 权利要求 36 的方法, 其中通过同源重组去除、修饰或缺失该目的基因。
40. 权利要求 1 的方法, 其中对该供体细胞进行遗传修饰以损害内胚层、外胚层和中胚层中至少一个的发育。
41. 权利要求 1 的方法, 其中对该供体细胞进行遗传修饰以提高分化效率。
42. 权利要求 40 的方法, 其中将该培养的核转移单位培养在含有至少一种 capsase 抑制剂的培养基中。
43. 权利要求 1 的方法, 其中该供体细胞表达能指示特定细胞周期蛋白表达的可检测标记。
44. 权利要求 40 的方法, 其中该供体细胞已被修饰改变了选自以下组的基因的表达: 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。
45. 权利要求 41 的方法, 其中所述供体细胞已被遗传修饰导入了提供 Q7 和/或 Q9 基因表达的 DNA。
46. 权利要求 45 的方法, 其中将所述基因与可调节启动子可操作地连接。
47. 权利要求 1 的方法, 其中该供体细胞已被遗传修饰以抑制细

胞凋亡。

48. 权利要求 47 的方法，其中通过改变选自以下组的一或多个基因的表达减少细胞凋亡：Bad、Bok、BH3、Bik、Blk、Hrk、BNIP3、Gim1、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。

49. 权利要求 48 的方法，其中将至少一个所述基因与诱导型启动子可操作地连接。

50. 哺乳动物的体细胞，其表达编码可检测标记的 DNA，其中该标记的表达与特定的细胞周期蛋白相连。

51. 权利要求 50 的细胞，其中该细胞周期蛋白选自细胞周期蛋白 D1、D2、D3、B1、B2、E、A 和 H。

52. 权利要求 50 的细胞，其中该可检测标记是荧光多肽。

53. 权利要求 52 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、有蹄动物、犬和猫的细胞。

54. 权利要求 52 的细胞，其中所述细胞是人、牛或灵长类动物的细胞。

通过交叉物种核移植制备的 胚胎或干样细胞

发明领域

一般地，本申请涉及通过将来自动物或人细胞的细胞核移植至不同于供体核的物种的去核动物卵母细胞中，制备胚胎细胞或干样细胞。更具体地，本发明涉及通过将灵长类或人细胞的细胞核移植至去核的动物卵母细胞例如灵长类或有蹄动物卵母细胞中，在优选实施方案中移植至牛去核卵母细胞中，制备灵长类或人胚胎或干样细胞。

本发明还涉及所获胚胎或干样细胞，优选灵长类或人胚胎细胞或干样细胞在治疗、诊断应用、制备也可以用于治疗或诊断的分化细胞、以及制备转基因胚胎或转基因分化细胞、细胞系、组织和器官中的用途。而且，根据本发明获得的胚胎或干样细胞本身可以在用于制备嵌合体或克隆，优选转基因克隆化或嵌合动物的核移植或核转移方法中作为核供体。

发明背景

从植入前早期鼠胚胎体外获取胚胎干(ES)细胞系的方法是熟知的。(见例如 Evans 等, Nature, 29:154-156 (1981); Martin, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78:7634-7638 (1981))。ES 细胞可以以未分化状态进行传代，只要存在成纤维细胞构成的饲养细胞层(Evans 等, 同上)或分化抑制源(Smith 等, Dev. Biol., 121:1-9 (1987))即可。

以前已报道过 ES 细胞具有多种用途。例如，已报道 ES 细胞能够用作分化、尤其是参与早期发育调节的基因研究的体外模型。当被引入植入前鼠胚胎中时，鼠 ES 细胞可以导致种系嵌合体，由此说明它们的多能性(Bradley 等, Nature, 309:255-256 (1984))。

鉴于 ES 细胞能够将它们的基因组转移到下一代，通过使用带有或

未带有目的遗传修饰的 ES 细胞, 它们对于家畜动物的种系操作有着潜在用途。而且, 对于家畜动物例如有蹄动物而言, 来自同样的植入前家畜胚胎的细胞核支持去核卵母细胞发育至分娩 (Smith 等, *Biol. Reprod.* 40:1027-1035 (1989); 和 Keefer 等, *Biol. Reprod.*, 50:935-939 (1994))。这与鼠胚胎细胞核是不同的, 据报道 8 细胞期之后的该细胞核在移植后不支持去核卵母细胞的发育 (Cheong 等, *Biol. Reprod.*, 48:958 (1993))。因此, 来自家畜动物的 ES 细胞由于可以提供全能供体细胞核的潜在来源, 该供体细胞核是经遗传操作的或否, 对于核移植程序是极为理想的。

一些研究组报道分离了据称是多能的胚胎细胞系。例如, Notarianni 等, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 43:255-260 (1991), 报道从猪和绵羊胚泡建立了据称稳定的多能细胞系, 这些细胞系在一些形态学和生长特性上表现出类似于用免疫手术从绵羊胚泡(同上)分离的内细胞团的原代培养物细胞。而且, Notarianni 等, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 41: 51-56 (1990) 公开了来自猪胚泡的推测多能胚胎细胞系在培养中的维持和分化。另外, Gerfen 等, *Anim. Biotech*, 6(1):1-14(1995) 公开了猪胚泡的胚胎细胞系的分离。不需使用条件培养基, 这些细胞可以在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层中稳定维持。据报道, 这些细胞在培养期间分化成几种不同的细胞类型 (Gerfen 等, 同上)。

而且, 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, 该细胞系存活传了三代, 但在第 4 次传代后丢失。更进一步地, Handyside 等, *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 196: 185-190 (1987) 公开了在允许从小鼠 ICM (内细胞团) 分离小鼠 ES 细胞系的条件下免疫手术法分离的绵羊胚胎内细胞团的培养。Handyside 等, (1987) (同上) 报道了在这些条件下, 绵羊 ICM 附着、分布、和发育成 ES 细胞样和内胚层样细胞区域, 但在长期培养后仅内胚层样细胞明显。(同上)。

近来, Cherny 等, *Theriogenology*, 41:175 (1994) 报道了长期

培养中维持的据称是多能的牛原始生殖细胞来源的细胞系。这些细胞在培养大约7天后产生碱性磷酸酶(AP)染色阳性的ES样集落,表现出形成胚状体的能力,并自发地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,据信是仅由ES细胞表达的同源盒基因模式。

而且近来,Campbell等,Nature,380:64-68(1996)报道,将培养在促进小鼠ES细胞系分离的条件下的9日龄绵羊胚胎的培养胚盘(ED)细胞核移植后,产生了活羊羔。作者基于他们的结果推断,通过核移植后9日龄绵羊胚胎的ED细胞具有全能性而且全能性可以在培养中维持。

Van Stekelenburg-Hamers等,Mol. Reprod. Dev.,40:444-454(1995)报道从牛胚泡的内细胞团细胞中分离和表征了据称的永久细胞系。作者分离并在不同的条件下培养来自第8-9日牛胚泡的ICM,以确定何种饲养细胞和培养基对于支持牛ICM细胞的附着和发展最有效。基于他们的结果他们推论,采用STO(小鼠成纤维细胞)饲养细胞(而非牛子宫上皮细胞),以及采用活性炭吸附过的血清(而非正常血清)补加培养基,可以增强培养的ICM细胞的附着和发展。然而, Van Stekelenburg等报道,他们的细胞系更象上皮细胞而不是多能ICM细胞。(同上)

进而,Smith等,WO 94/24274,1994年10月27日公开,Evans等,WO 90/03432,1990年4月5日公开,和Wheeler等,WO 94/26889,1994年11月24日公开,报道了据称可以用于获得转基因动物的动物干细胞的分离、筛选和增殖。而且,Evans等WO 90/03432,1990年4月5日公开,报道了来自猪和牛物种的据称的多能胚胎干细胞的衍生,这些细胞被声称对转基因动物的制备是有用的。而且,Wheeler等WO 94/26884,1994年11月24日,公开了声称对于嵌合和转基因有蹄动物的制备有用的胚胎干细胞。因此,基于上述,明显地许多研究组一直在尝试制备ES细胞系,原因有例如它们在制备克隆化或转基因胚胎和核移植中的潜在应用。

有蹄动物 ICM 细胞在核移植中的应用也已有报道。例如, Collas 等, *Mol. Reprod. Dev.*, 38:264-267 (1994) 公开了通过将裂解的供体细胞显微注射至去核成熟卵母细胞中进行的牛 ICM 的核移植。该参考文献公开了体外培养胚胎 7 天产生的 15 个胚泡, 当移植至牛受体后它们导致 4 头牛怀孕和 2 头牛的生产。而且, Keefer 等, *Biol. Reprod.*, 50:935-939 (1994) 公开了牛 ICM 细胞在核移植程序中用作供体核以制备胚泡, 这些胚泡在移植至牛受体后产生了几头活的幼兽。而且, Sims 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6143-6147 (1993), 公开了通过将短期体外培养的牛 ICM 细胞的细胞核转移至去核成熟卵母细胞, 产生了牛犊。

在培养的胚盘细胞的核移植后活羊羔的产生也已有报道 (Campbell 等, *Nature*, 380:64-68 (1996))。进而, 牛多能干细胞在核移植和嵌合胚胎制备中的应用也已有报道 (Stice 等, *Biol. Reprod.*, 54:100-110 (1996); Collas 等, *Mol. Reprod. Dev.*, 38:264-267 (1994))。

而且, 以前有过制备交叉物种 (cross species) NT 单位的尝试 (Wolfe 等, *Theriogenology*, 33:350 (1990))。具体地, 牛胚胎细胞与野牛卵母细胞融合, 产生了一些可能含有内细胞团的交叉物种 NT 单位。然而, 在此核移植过程中采用了胚胎细胞而非成年细胞作为供体核。规律是胚胎细胞比成年细胞更容易重新编程。这可追溯至在蛙中进行的早期 NT 研究 (Diberardino 的综述, *Differentiation*, 17:17-30 (1980))。该研究还涉及系统发生上极为相似的动物 (牛细胞核和野牛卵母细胞)。相反地, 以前在 NT 期间进行更不同的物种融合 (牛细胞核进入仓鼠卵母细胞) 时, 没有获得内细胞团结构。而且, 以前也从未报道过来自 NT 单位的内细胞团可以用于形成能够增殖的 ES 细胞样集落。

而且, Collas 等 (同上) 指出了粒层细胞 (成年体细胞) 在制备牛核移植胚胎中的使用。然而, 与本发明不同, 这些实验不涉及交叉物种核移植。而且, 与本发明不同, 它们没有获得 ES 样细胞集落。

近来，转让给 Wisconsin Alumni Research Foundation 的、1998 年 12 月 1 日授权给 James A. Thomson 的美国专利 5,843,780 声称公开了灵长类胚胎干细胞的纯化制备物，所述胚胎干细胞 (i) 能够在体外培养中增殖一年以上；(ii) 在长期培养过程中维持核型，其中灵长类物种特有的所有染色体均存在而且没有发生可注意到的改变；(iii) 在整个培养中保持分化成内胚层、中胚层和外胚层组织衍生物的潜力；和 (iv) 当培养在成纤维细胞饲养层上时不会分化。据报道，这些细胞是 SSEA-1 标志阴性、SEA-3 标志阳性、SSEA-4 标记阳性的，表达碱性磷酸酶活性，具有多能性、并且其核型包括了存在的灵长类物种典型的所有染色体，而且其中没有一个染色体发生改变。而且，这些细胞是明显的 TRA-1-60 和 TRA-1-81 标志阳性。据称，当被注射至 SCID 小鼠中后，这些细胞分化成内胚层、中胚层和外胚层细胞。而且，Thomson 等，*Science* 282:1145-1147 和 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844-7848 (1995)，讨论了来源于人或灵长类胚胎的推测胚胎干细胞。

因此，Thomson 公开了据称是非人灵长类和人胚胎或干样细胞的细胞以及它们的制备方法。然而，考虑到人胚胎或干样细胞的显著治疗和诊断潜力，对于制备预期移植受体自体的这些细胞仍存在显著需要。

在此方面，已经鉴定了许多可以通过细胞移植治疗的人疾病。例如，由于黑质中多巴胺能神经元的退化引起帕金森疾病。对于帕金森病的治疗标准包括施用 L-DOPA，该药物可暂时缓解多巴胺的丧失，但引起严重的副作用而且最终不能逆转疾病进程。治疗帕金森病并预示将在治疗许多脑疾病和中枢神经系统损伤中具有广泛的适用性的另一方法包括将来自胚胎或新生动物的细胞或组织移植至成年脑中。来自不同脑区的胎儿神经元可以整合在成年脑中。这些移植物已表现出减轻了实验动物的实验诱导行为缺陷，包括复杂的认知功能。来自人临床试验的最初实验结果也是有前途的。然而，从流产获得的人胎细胞或组织的供应量是极为有限的。而且，从流产胚胎获取细胞或组织有高度争议。

目前没有现成的方法可以用于从患者制备“胎样”细胞。而且，同种异体移植组织也不易获得，同种异体移植和异种移植组织受到移植排斥。而且，在某些情况下，移植前在细胞或组织中进行遗传修饰将是有益的。然而，期望进行这些修饰的许多细胞或组织在培养中分裂不好，而多数类型的遗传转化要求快速的分裂细胞。

因此，在本领域存在着一个明显的需要：提供人胚胎或干样非分化细胞用于移植和细胞及基因治疗。

发明目的

本发明一个目的是提供新的和改良的制备胚胎细胞或干样细胞的方法。

本发明的一个更为具体的目的是提供制备胚胎细胞或干样细胞的新方法，所述方法涉及将哺乳动物或人细胞的细胞核移植至不同物种的去核卵母细胞中。

本发明的另一具体目的是提供制备非人灵长类或人胚胎细胞或干样细胞的新方法，所述方法涉及将哺乳动物或人细胞的细胞核移植至去核的动物或人卵母细胞例如有蹄动物、人或灵长类去核卵母细胞中。

本发明的另一目的是通过导入与供体细胞或细胞核相容（同种）的卵母细胞，卵裂球或其它胚胎细胞的细胞质，提高交叉物种核转移的效力。

本发明的一个更具体目的是通过导入细胞质与供体细胞或细胞核相容（相同或紧密相关的种）的一个或多个不成熟卵母细胞的细胞质，提高交叉物种核移植的效力。这种不成熟的卵母细胞在收集细胞质和将细胞质导入到受体去核卵母细胞中之前可以可选择地在体外成熟和/或体外激活。

本发明的再一目的是通过将来源于供体细胞相同或相近物种（优选同一供体）的线粒体 DNA 在去核前或后掺入用于核移植的不同物种的卵母细胞中，或掺入核移植单位中（引入供体细胞后），提高交叉物种核移植的效力。

本发明的再一目的是通过去核体细胞（例如去核的人体细胞）（核体（karyoplast））与激活的或未激活的、去核的或未去核的不同物种卵母细胞例如牛卵母细胞的融合，或与激活的或未激活的、可以是分裂或非分裂的交叉物种 NT（核转移）单位融合，提高交叉物种核移植的效力。

本发明的另一目的是提供制备谱系缺陷的非人灵长类或人胚胎或干样细胞的新方法，所述方法涉及将非人灵长类或人细胞例如人成年细胞的细胞核移植至去核的非人灵长类或人卵母细胞中，其中该细胞经过遗传工程改造不能分化成特定的细胞谱系，或经过修饰以致细胞是“必死的”，因此不会产生可存活子代，改造方法有例如通过工程化表达反义或核酶端粒酶基因。

本发明的再一目的是通过遗传改造用于核移植的供体体细胞以提供增强胚胎发育的基因例如 MHC I 家族的基因，尤其是 Ped 基因如 Q7 和/或 Q9 的表达，提高核移植的效率，尤其是促进由核移植制备的植入前胚胎的发育。

本发明的另一目的是通过在核移植前或后引入转基因，增强核移植胚胎，例如交叉物种核移植胚胎的产生，其中该转基因可表达编码细胞死亡基因如 BAX、Apaf-1、或 capsase 或其部分、或脱甲基酶的反义 DNA。

本发明的再一目的是通过 IVP 增强核转移胚胎的产生，更具体地，通过遗传改变用于核移植的供体细胞以致该细胞可抵抗细胞凋亡，例如通过引入可表达抑制细胞凋亡的基因如 Bcl-2 或 Bcl-2 家族成员的 DNA 结构，和/或通过表达特异针对早期胚胎发育中诱导细胞凋亡的基因的反义核酶，增强核移植胚胎的产生。

本发明的再一目的是通过遗传改造供体细胞以致它们表达编码某一具体细胞周期蛋白以及相连的可检测标记例如编码可视（如荧光标签）标记蛋白的可检测标记的 DNA 结构，改良对处于特定细胞周期阶段如 G1 期的供体细胞的选择，来提高核移植效率。

本发明再一目的是通过将体外制备的胚胎在存在一或多种蛋白酶

抑制剂，优选地一或多种 capsase 抑制剂，而藉此抑制细胞凋亡的条件下进行培养，促进该胚胎的发育。

本发明的再一目的是提供通过将动物或人细胞细胞核移植至不同物种的去核卵母细胞中而制备的胚胎或干样细胞。

本发明的一个更为具体的目的是提供通过将灵长类或人细胞的细胞核移植至去核动物卵母细胞如人、灵长类或有蹄动物去核卵母细胞中制备的灵长类或人胚胎或干样细胞。

本发明的另一目的是将这些胚胎或干样细胞应用于治疗或诊断。

本发明的一个具体目的是采用这些灵长类或人胚胎或干样细胞治疗或诊断其中细胞、组织或器官的移植在治疗或诊断上有益的任何疾病。

本发明的再一目的是采用根据本发明制备的胚胎或干样细胞产生分化细胞、组织或器官。

本发明的一个更为具体的目的是采用根据本发明制备的灵长类或人胚胎或干样细胞，生产分化的人细胞、组织或器官。

本发明的再一具体目的是采用根据本发明制备的胚胎或干样细胞，制备遗传改造的胚胎或干样细胞，这些细胞可以用于产生遗传改造的或转基因的分化人细胞、组织或器官，例如在基因治疗中 useful。

本发明的再一具体目的是将根据本发明体外制备的胚胎或干样细胞，用于例如细胞分化的研究和测定目的如药物研究。

本发明再一目的是提供移植治疗的改良方法，包括使用从根据本发明制备的胚胎或干样细胞产生的等基因或同基因细胞、组织或器官。这些治疗包括以下示例的疾病和损伤的治疗，它们包括：帕金森病、亨廷顿舞蹈病、阿尔茨海默病、ALS、脊髓损伤、多发性硬化、肌营养不良、糖尿病、肝疾病、心脏病、软骨的置换、烧伤、血管疾病、尿道疾病，以及用于治疗免疫缺陷、骨髓移植、癌症、及其它疾病。

本发明另一目的是采用根据本发明制备的转基因或遗传改造的胚胎或干样细胞进行基因治疗，尤其是治疗和/或预防以上所述的疾病和损伤。

本发明的另一目的是采用根据本发明制备的胚胎或干样细胞或采用根据本发明制备的转基因或遗传改造胚胎或干样细胞作为核移植的核供体。

本发明再一目的是采用根据本发明制备的遗传改造 ES 细胞制备转基因动物，例如非人灵长类、啮齿类动物、有蹄动物等。这些转基因动物可以用于制备例如研究人类疾病的动物模型，或用于制备目的多肽如治疗药物或营养药物。

本发明的上述和其它目的、优点和特征通过下文描述将是清晰的，参考以下本发明优选实施方案的详述和所附权利要求，可以更为清楚地理解本发明的性质。

附图简述

图 1 是通过将成年人细胞转移至去核的牛卵母细胞中产生的核移植 (NT) 单位的照片。

图 2-5 是来源于图 1 所示的 NT 单位的胚胎干样细胞的照片。

发明详述

本发明提供通过核转移或核移植制备胚胎或干样细胞、更具体地非人灵长类或人胚胎或干样细胞的新方法。在本申请中，核转移或核移植或 NT 可互换使用。

正如以上讨论的，通过核转移或核移植分离真正的胚胎或干样细胞还从未有过报道。相反地，以前报道的 ES 样细胞的分离一直来自于受精胚胎。而且，涉及遗传不同的物种的细胞或 DNA、或更具体地涉及一个物种（如人）的成年细胞或 DNA 和另一不相关物种的卵母细胞的成功核转移还从未有过报道。而且，尽管报道过通过紧密相关物种的细胞融合制备的胚胎，例如牛-山羊和牛-野牛，但它们不产生 ES 细胞。(Wolfer 等, Theriogenology, 33 (1):350 (1990))。而且，从未报道过制备来自非胎儿组织来源的灵长类或人 ES 细胞的方法。相反地，目前可利用的有限人胎细胞和组织必须从自然流产组织和流产胎儿获得或来源。

而且，在本发明之前，没有人通过交叉物种核移植获得过胚胎或

干样细胞。

极为出乎预料地，本发明人发现可以通过将人细胞例如成年分化人细胞的细胞核转移至用于制备核转移(NT)的去核动物卵母细胞中，通过培养这些细胞产生人胚胎或干样细胞和细胞集落，从而获得人胚胎或干样细胞和细胞集落。该结果极为令人惊奇，因为这第一次显示了涉及将分化供体细胞或细胞核引入遗传上不同的物种的去核卵母细胞中的有效交叉物种核移植，例如将来自分化动物或人细胞如成年细胞的细胞核移植至不同动物物种的去核卵中，以产生含有如下细胞的核移植单位，这些细胞当培养在适合条件下可产生胚胎或干样细胞和细胞集落。

优选地，受体卵母细胞将用(i)供体细胞或细胞核以及(ii)相容的线粒体DNA或相容的细胞质中的至少一个的组合移植。本发明中“相容的”代表线粒体的DNA或细胞质是来源于供体细胞或细胞核相同物种，或者与供体细胞或细胞核紧密相关的物种的细胞。例如，如果供体细胞或细胞核是人细胞或细胞核，那么线粒体DNA或细胞质就应该是来源于人或者来源于高等灵长类例如黑猩猩，大猩猩或者狒狒。相似地，如果供体细胞或细胞核是牛细胞或细胞核，那么相容的细胞质应该是来自紧密相关的有蹄动物例如水牛。最优选地，相容的线粒体DNA和/或细胞质应该来源于供体相同物种的细胞，最优选是供体细胞或细胞核自体的。

在一个优选实施方案中，细胞质来源于不成熟的卵母细胞或卵裂球，其中这种不成熟的卵母细胞在收集其细胞质之前可选择地在体外成熟和/或在体外激活。体外激活卵母细胞包括人卵母细胞的方法，在下文描述。相似地，体外成熟卵母细胞的方法已在文献中报道。

优选地，将用于制备ES样细胞的NT单位培养至具有至少2-400个细胞，优选4-128个细胞的大小，更优选地具有至少约50个细胞的大小。

在本发明中，胚胎或干样细胞是指根据本发明制备的细胞。本申请将这些细胞称为干样细胞而非干细胞，是因为它们制备的典型方式，

即它们是通过交叉物种核转移制备的。尽管这些细胞预期具有与正常干细胞相似的分化能力，但由于它们的制备方式，它们可能有一些无关紧要的差异。例如，这些干样细胞可能具有用于核转移的卵母细胞的线粒体，而且可能与常规的胚胎干细胞表现和形态发生不一致。

本发现的基础是观察到成年人细胞，尤其是从人供体的口腔获得的人上皮细胞的细胞核，当被转移至去核牛卵母细胞中后，该核移植导致了核移植单位的形成，通过培养其中的细胞产生了人干样或胚胎细胞和人胚胎或干样细胞集落。此结果近来通过将成人的角质形成细胞移植至去核牛卵母细胞中成功产生胚泡和 ES 细胞系，得到了重复。基于此，本发明人推测，牛卵母细胞和人卵母细胞、以及可能一般哺乳动物在胚胎发育过程中必须经历成熟过程，该过程十分相似或保守以致使得牛卵母细胞可以作为有效的人卵母细胞的替代品或代用品发挥作用。显然，卵母细胞一般含有在适合条件下诱导胚胎发育的因子，这些因子在性质上可能是蛋白质或核酸，而且它们可以在不同物种中起到相同或极为相似的作用。这些因子可能包含 RNA 和/或端粒酶物质。

基于人细胞的细胞核可以有效地被移植至牛卵母细胞中这个事实，预期人细胞可以被移植至其它不相关物种如其它有蹄动物以及其它动物的卵母细胞中是合理的。尤其是，其它有蹄动物应当是适合的，例如猪、绵羊、马、山羊等。来自其它来源的卵母细胞也应当是合适的，例如来源于其它灵长类如黑猩猩、短尾猿、狒狒、大猩猩、恒河猴、两栖动物、啮齿动物、兔、豚鼠等的卵母细胞。而且，采用相似的方法，应当可以将人细胞或细胞核转移至人卵母细胞中并使用所获胚泡制备人 ES 细胞。

因此，在本发明最广泛的实施方案中，本发明涉及通过注射或融合，将动物或人细胞核或动物或人细胞移植至不同于供体细胞核的动物物种的卵母细胞（优选去核的）中，可选择地进一步向所述受体卵母细胞注射相容的线粒体 DNA 和/或细胞质（优选供体细胞或细胞核相同物种的），以制备含有可以用于获得胚胎或干样细胞和/或细胞培养

物的细胞的 NT 单位。去核（除去内源卵母细胞细胞核）可以在核转移之前或之后实施。例如，本发明可以涉及通过注射或融合将有蹄动物细胞核或有蹄动物细胞移植到另一物种，如其它有蹄动物或非有蹄动物，的去核卵母细胞中，该细胞和/或核组合起来产生 NT 单位，然后该 NT 单位在适当的条件下培养以获得多细胞 NT 单位，该单位优选包含至少约 2 - 400 个细胞，更优选 4 - 128 个细胞，最优选至少约 50 个细胞。这些 NT 单位的细胞通过培养可以用于产生胚胎或干样细胞或细胞集落。

本发明的优选实施方案包含通过将供体人细胞或人细胞的细胞核移植至去核人、灵长类、或非灵长类动物卵母细胞如有蹄动物卵母细胞中，在一个优选实施方案中移植至牛去核卵母细胞中，制备非人灵长类或人胚胎或干样细胞。优选地，去核卵母细胞还注射人细胞质（例如来自至少一个不成熟或成熟卵母细胞或卵裂球），或者与核体（karyoplast）（去核的人卵母细胞或卵裂球，或高级灵长类的那些）和/或人线粒体 DNA 融合。

一般，可以通过包括如下步骤的核转移方法制备胚胎或干样细胞：

(i) 获取用作供体细胞核来源的目的人或动物细胞（可以是遗传改变的）；

(ii) 从合适的来源如哺乳动物，最优选灵长类或有蹄动物来源如牛，获取卵母细胞，

(iii) 通过除去内源性细胞核使所述卵母细胞去核；

(iv) 通过例如融合或注射，将人或动物细胞或细胞核转移至不同于供体细胞或细胞核的动物物种的去核卵母细胞中，

其中步骤(iii)和(iv)可以按任何顺序实施；

(v) 培养所获 NT 产物或 NT 单位以产生多细胞结构（具有可辨别的内细胞团的胚胎样结构）；和

(vi) 培养从所述胚胎获得的细胞以获取胚胎或干样细胞和干样细胞集落。

如指明的，核转移方法优选包括导入相容的线粒体 DNA 和/或细胞

质，即来源于与供体细胞或细胞核相同物种或紧密相关物种的线粒体DNA和/或细胞质。该步骤可在供体细胞或细胞核导入到受体卵母细胞之前，与之同时，或在其之后实施。优选地，相容的细胞质和/或线粒体DNA的导入可以前后紧接供体细胞或细胞核向受体卵母细胞的导入，就是说，在该导入的约24小时内，更优选地在该导入的约6小时内，最优选在该导入的约2-4小时内。

相容细胞质的来源尤其包括不成熟卵母细胞，其可从卵母细胞大量制备。例如，就人而言，卵母细胞可从自愿捐献者例如子宫切除的妇女的卵巢获取。

这种不成熟卵母细胞可选择地在收集其细胞质之前进行体外成熟。卵母细胞体外成熟的实施方法在美国专利5,945,577中说明，在此将其全文并入作为参考。

另外，这种不成熟卵母细胞还可进一步可选择地在收集其细胞质之前在体外被激活。孤雌生殖地激活卵母细胞包括人卵母细胞的方法是公知的。美国系列号08/888057中描述了实施体外激活卵母细胞的示例方法，在此将其全文并入作为参考。优选的体外激活实施方法包括使用DMAP和离子霉素，以及使用环己酰亚胺和离子霉素。

导入到受体卵母细胞中的细胞质的量优选是增加其细胞体积最多5倍，优选不超过约2倍，最优选不超过约1.5倍的量。这可以通过将来自相容的卵母细胞的细胞质注射到受体卵母细胞中实施，或者，可通过融合受体卵母细胞和相容的卵质体（受体卵母细胞相同或紧密相关物种的去核的卵母细胞）实施。可任选地，受体卵母细胞的全部或部分细胞质可被去除，以提供更多的细胞体积导入相容细胞质。涉及该方面，有文献认为维持合适的细胞核/细胞质比率和细胞体积对于胚胎的形成和发育很重要。（Karyikova等，Reprod., Nutr. Devel. 38(6): 665-670）

尽管本发明的发明人不愿受到他们理论的束缚，假说认为卵母细胞细胞质中存在一些促进胚胎发生的成分，如核酸序列和/或蛋白，而这些因子被认为在系统发生上趋异的物种中或多或少是保守的，有理

论认为物种差异如此显著以至于该差异抑制了交叉物种核转移的效率。所以，本发明希望通过导入含有相同或紧密相关物种中促进胚胎发生的成分的相容细胞质来解决这种低效率问题。

如上所说明，改善克隆效率可以通过导入相容线粒体 DNA，即该线粒体 DNA 来自供体细胞或细胞核相同或紧密相关物种。该步骤可在供体细胞或细胞核的导入之前，同时，或之后进行实施。基本上，本发明的另一目的是通过在核转移之前或之后，在激活之前或之后，以及在融合和卵裂之前或之后，将供体细胞或细胞核相同物种或非常近似物种的线粒体 DNA 导入到受体卵母细胞，以改善核移植如交叉物种核移植的效率。优选地，如果供体细胞是人，那么线粒体 DNA 应来源于该具体捐献者的细胞，如肝细胞和组织。

本领域公知线粒体的分离方法。线粒体可分离自组织培养的细胞或分离自组织。该具体细胞或组织依赖于供体细胞的具体物种。可用作线粒体源的细胞或组织的例子包括成纤维细胞，上皮细胞，肝，肺，角质形成细胞，胃，心脏，膀胱，胰脏，食道，淋巴细胞，单核细胞，单核的细胞，卵丘细胞，子宫细胞，胎盘细胞，肠细胞，造血细胞，卵母细胞，以及含有这些细胞的组织。

例如，线粒体可分离自组织培养的细胞和大鼠肝脏。预期可以使用相同或类似的方法从其它细胞和组织，即，人细胞和组织分离线粒体。如上所述，优选的线粒体源包括人肝脏组织，因为这种细胞含有大量线粒体。本领域技术人员根据具体细胞系或组织，可在必要时对这些方法进行改变。如果需要，分离的 DNA 可通过已知的方法如密度梯度离心进一步纯化。

所获的分离线粒体 DNA 优选被注射到受体卵母细胞中。优选地，分离自一个或几个细胞的完整线粒体 DNA 被导入以确保受体卵母细胞具有完全的一套相容线粒体 DNA。优选地，线粒体 DNA 是来自自体的来源，即，制备自作为供体细胞或细胞核来源的人，或与其遗传上相容的人，如近亲的细胞或组织。同样，相容的线粒体可来源于不成熟的卵母细胞，与相容的细胞质一起被导入。

可用于本发明的具体核转移技术或核移植技术是本领域已知的，描述于“发明背景”中引用的许多参考文献中。尤其是，见 Campbell 等, *Theriogenology*, 43:181 (1995); Collas 等, *Mol. Report. Dev.*, 38:264-267 (1994); Keefer 等, *Biol. Reprod.*, 50:935-939 (1994); Sims 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6143-6147 (1993); WO 94/26884; WO 94/24274 和 WO 90/03432, 它们均完整地并入本文作为参考。美国专利 4,944,384 和 5,057,420 还描述了用于牛核移植的程序。也见 Cibelli 等, *Science*, Vol. 280: 1256-1258 (1998), 美国专利 5,945,577; WO97/07669; WO97/07668 和 WO96/07732, 它们均完整地并入本文作为参考。

人或动物细胞，优选哺乳动物细胞，可以通过熟知的方法获得和培养。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、角质形成细胞、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、单核的细胞、干细胞、成纤维细胞、心肌细胞、和其它肌肉细胞等。而且，用于核转移的人细胞可以从不同器官如皮肤、肺、胰脏、肝、胃、小肠、心脏、生殖器官、膀胱、肾、尿道和其它尿道器官等获取。这些只是适合的供体细胞的例子。

适合的供体细胞，即本发明中有用的细胞可以从身体的任何细胞或器官获取。这包括所有的体细胞和生殖细胞。优选地，供体细胞或细胞核可以含有活跃分裂的，即非静止的细胞（G₁, S 或 M 细胞周期），因为据报道这可增强克隆效率。而且优选地，这类供体细胞处于 G₁ 细胞周期。但是，静止的供体细胞（G₀）也在本发明的范围之内。静止细胞可在例如合适的培养条件下，通过血清饥饿制备。

所获胚泡可以根据 Thomson 等, *Science*, 282:1145-1147 (1998) 及 Thomson 等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92:7544-7848 (1995) 报道的培养方法（这些文献完整地并入本文作为参考），用于获得胚胎干细胞系。

或者，所获具有可辨别内细胞团的胚泡可根据美国专利 5,905,042

中公开的方法培养，在此将其全文并入作为参考。该方法基本包括在饲养层上培养整个或部分内细胞团，在培养过程中一直维持其与饲养层的接触。该培养方法进一步包括当培养进行时取出一部分培养的内细胞团，即，含有具有ES样外观的细胞的培养内细胞团最外层部分。该细胞集落的最外层然后被导入另一饲养层，典型地胎儿成纤维细胞之上。该方法被发现可以提供在组织培养中维持不分化的（胚胎干）细胞，即，显示出ES样形态的细胞，该细胞从饲养层上分离之后可分化成其它细胞类型。

在以下的实施例中，用作核转移供体的细胞是来源于人供体口腔的上皮细胞和成年人角质形成细胞。然而，正如讨论的，本公开方法适用于其它的人细胞或细胞核。而且，该细胞核可以从人体细胞和生殖细胞中获得。

还可以在核转移前采用本领域已知的适合技术使供体细胞停留在有丝分裂期。美国专利 5,262,409 对将细胞周期停止在不同阶段的方法作了彻底地综述，该文献并入本文作为参考。具体地，尽管已报道过环己酰亚胺对有丝分裂有抑制作用(Bowen 和 Wilson (1955) *J. Heredity*, 45:3-9)，但当与电脉冲处理联合时也可以将其用于成熟牛滤泡卵母细胞的改良激活(Yang 等, (1992) *Biol. Reprod.* 42 (Suppl. 1): 117)。

合子基因的激活与组蛋白 H4 的超乙酰化 (hyperacetylation) 有关。制滴菌素 A 表现出可以以可逆方式抑制组蛋白脱乙酰酶(Adenot 等, 在 1 细胞小鼠胚胎原核中父本和母本染色质的差异 H4 乙酰化先于 DNA 复制和不同的转录活性。Development (1997 年 11 月) 124(22): 4615-4625; Yoshida 等, 制滴菌素 A 和 trapoxin: 探测组蛋白乙酰化在染色质结构和功能中作用的新化学探针。Bioessays (1995 年 5 月) 17(5): 423-430)，其它化合物具有这种同样作用。

例如，丁酸也被认为可以通过抑制组蛋白脱乙酰酶引起组蛋白的超乙酰化。一般地，丁酸表现出可修饰基因表达，并且在几乎所有情况下将其加入培养细胞中均似乎可阻断细胞生长。丁酸在此方面的应

用描述于美国专利 5,681,718, 该文献并入本文作为参考。因此, 可以在融合前将供体细胞暴露于制滴菌素 A 或其它适合的脱乙酰酶抑制剂, 或者可以在基因组激活前将此类化合物加入培养基中。

此外, DNA 的去甲基化也被认为是转录因子正确接近 DNA 调节序列所必须的。在植入前胚胎中从 8 细胞期至胚泡期的 DNA 整体去甲基化以前已有过描述(Stein 等, *Mol. Reprod. & Dev.*, 47(4): 421-429)。而且, Jaenisch 等(1997)报道了可以使用 5-氮胞苷降低细胞中 DNA 的甲基化水平, 潜在地导致转录因子与 DNA 调节序列的接近增加。因此, 可以在融合前将供体细胞暴露于 5-氮胞苷(5-Aza), 或可以在 8 细胞期到胚泡的过程中向培养基加入 5-Aza。或者, 可以采用其它已知的影响 DNA 甲基化的方法。

用于核转移或用于收集相容细胞质的卵母细胞可以从动物, 包括哺乳动物和两栖动物中获得。卵母细胞的适合哺乳动物来源包括绵羊(sheep)、牛、绵羊(ovine)、猪、马、兔、山羊、豚鼠、小鼠、仓鼠、大鼠、灵长类动物、人等。在优选实施方案中, 卵母细胞获自灵长类动物或有蹄动物如牛。如果是人卵母细胞, 合适的来源包括自愿妇女如子宫切除的妇女的卵巢。

分离卵母细胞的方法是本领域熟知的。基本上, 这包括从哺乳动物或两栖动物如牛的卵巢或生殖道中分离卵母细胞。一个易于获得的牛卵母细胞来源是屠宰场原料。

为了遗传工程、核转移和克隆等技术的成功使用, 卵母细胞在用作核转移受体细胞之前一般必须先进行体外成熟。该方法一般要求从动物卵巢如屠宰场获得的牛卵巢中收集未成熟(分裂前期 I)卵母细胞, 并在受精前或去核前使卵母细胞在成熟培养基中成熟直到卵母细胞达到中期 II 阶段, 对于牛卵母细胞而言这一般发生在吸引术(aspiration)后约 18-24 小时。为了本发明的目的, 将该时间期称作“成熟期”。为了该时间期的计算, 正如本文所用, “吸引术”是指从卵巢滤泡中吸出未成熟卵母细胞。

此外, 体内成熟的分裂中期 II 阶段卵母细胞已被成功地用于核转

移技术中。基本上是在动情期开始后或注射人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 或类似激素后 35-48 小时, 通过手术从非超排或超排的母牛或未产过犊的母牛中收集分裂中期 II 的成熟卵母细胞。同样, 体内成熟的卵母细胞可从其它物种如绵羊, 马, 山羊, 猪等中获取。

已经报道, 卵母细胞在去核和核移植时的成熟阶段对于 NT 方法的成功具有重要意义。(见例如 Prather 等, *Differentiation*, 48, 1-8, 1991)。一般地, 以前成功的哺乳动物胚胎克隆操作采用了中期 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被足够“激活”, 以象作用于受精精子一样作用于引入的细胞核。在家畜动物, 尤其是牛中, 卵母细胞的激活期一般从吸引术后约 16 小时-52 小时, 优选在吸引术后约 28-42 小时。

例如, 可以按 Seshagine 等, *Biol. Reprod.*, 40, 544-606, 1989 中描述的方法在 HEPES 缓冲的仓鼠胚胎培养基 (HECM) 中洗涤未成熟卵母细胞, 然后将其置于由 50 μ l 含有 10% 胎牛血清的组织培养基 (TCM) 199 构成的成熟培养基液滴中, 该培养基中还含有适当的促性腺激素例如黄体生成素 (LH) 和促滤泡激素 (FSH), 和雌二醇, 并 39 $^{\circ}$ C 置于一层轻石蜡或硅下。

固定时间的成熟期, 典型地约 10 小时-40 小时, 优选地约 16-18 小时之后, 优选地将卵母细胞去核, 其中该成熟期可在体内或体外发生。去核前, 优选地将卵母细胞取出并在除去卵丘细胞前置于含有 1mg/ml 透明质酸酶的 HECM 中。这可以通过重复抽吸经过极细内径的移液管或通过短暂涡旋来实现。然后筛选有极体的剥离的卵母细胞, 通过极体存在确定的所选分裂中期 II 卵母细胞然后被用于核转移。之后进行去核。但是, 可以在引入供体细胞或细胞核之前或之后进行去核, 因为供体细胞核与内源性细胞核易于区分。

去核可以按已知方法进行, 例如美国专利 4,994,384 所描述的方法, 将其并入本文作为参考。例如, 将分裂中期 II 的卵母细胞置于可任选地含有每毫升 7.5 毫克细胞松弛素 B 的 HECM 中以便立即去核, 或可以置于加有 10% 动情期母牛血清的适合培养基例如 CR1aa 中, 然后

在稍后时期，优选不超过 24 小时后，更优选 16 - 18 小时后进行去核。

去核可以通过显微手术采用微量移液管除去极体和相邻细胞质来完成。然后可以筛选卵母细胞以鉴定已成功去核的那些。此筛选可以通过用溶于 HECM 的 1mg/ml 33342 Hoechst 染料染色卵母细胞，然后在小于 10 秒的紫外辐射下观察卵母细胞来实现。然后可以将成功去核的卵母细胞置于适合培养基中。

在本发明中，典型地在体外成熟起始后约 10 小时—约 40 小时，更优选体外成熟起始后约 16 小时—约 24 小时，最优选体外成熟起始后约 16 小时—18 小时的时候进行受体卵母细胞的去核。去核可以在核转移之前、同时或之后进行。也可以在激活前、后或同时进行去核。

由此获得的单个动物或人细胞或细胞核典型地与去核卵母细胞异源，然后可以被转移至典型地经过去核的、用于制备 NT 单位的卵母细胞的卵周隙中。然而，作为替代也可以在核转移后去除内源性细胞核。该动物或人细胞或细胞核和此去核卵母细胞可以根据本领域已知的方法用于制备 NT 单位。例如，可以通过电融合将这些细胞融合在一起。电融合是通过提供足以引起质膜瞬时破坏的脉冲电流来实现的。由于膜的快速重新形成，质膜的这种破坏是极为短暂的。基本上是，如果诱导两个相邻膜破损，在重新形成时脂质双层相互混合，并在两个细胞之间打开小的通道。由于此类小通道的热动力学不稳定性，它会扩大直到两个细胞成为一个。对于此过程的进一步探讨，参考 Prather 等的美国专利 4,997,384（完整地并入本文作为参考）。可以采用多种电融合介质，包括例如蔗糖、甘露醇、山梨糖醇和磷酸缓冲溶液。也可以采用仙台 (Sendai) 病毒作为融合剂进行融合 (Graham, Wister Inot. Symp. Monogr., 9, 19, 1969)。

而且，在某些情况下（例如采用小供体核时），优选地可以将细胞核直接注射至卵母细胞中而不采用电穿孔融合。这些技术公开于 Collas 和 Barnes, Mol. Reprod. Dev., 38:264-267 (1994)，并特此完整地并入本文作为参考。

优选地，在卵母细胞成熟起始后约 24 小时，在 500 μm 的小室中

采用 90—120V 的电脉冲作用约 15 μ sec, 电融合人或动物细胞和卵母细胞。融合后, 优选地在激活前, 例如以下定义的激活前, 将所获融合的 NT 单位置于适合培养基中。典型地之后不久, 典型地不到 24 小时后, 优选地约 4-9 小时后, 进行激活。然而, 也可以在核转移前或接近核转移时(同时)激活受体卵母细胞, 该受体卵母细胞可以去核也可以不去核。例如, 可以在核转移前约 12 小时至核转移后约 24 小时, 进行激活。更典型地, 在核转移同时或不久后, 例如约 4-9 个小时后进行激活。

NT 单位的激活可以通过已知方法来实现。这些方法包括例如在亚生理温度下培养 NT 单位, 本质上是对 NT 单位进行冷的或实际上凉的温度休克。最为方便地这可以通过室温培养 NT 单位来实现, 所述室温相对胚胎正常所暴露的生理温度条件较冷。

或者, 可以通过使用已知的激活剂实现激活。例如, 在受精过程中精子穿入卵母细胞已显示出可激活融合前的卵母细胞, 以致在核转移后产生更大量的可存活妊娠和多个遗传上一致的牛犊。而且, 处理例如电和化学休克或环己酰亚胺处理也可以被用于在融合后激活 NT 胚胎。适合的卵母细胞激活方法是 Susko-Parrish 等的美国专利 5,496,720 的主题, 该专利特此并入本文作为参考。

例如, 可以同时或相继采用以下方法激活卵母细胞:

- (i) 增加卵母细胞内二价阳离子的水平, 和
- (ii) 减少卵母细胞内细胞蛋白质的磷酸化。

一般地这可以通过例如以离子载体的形式向卵母细胞细胞质引入二价阳离子如镁、锶、钡或钙来实现。增加二价阳离子水平的其它方法包括使用电休克、采用乙醇处理和采用笼形螯合物。

磷酸化可以通过已知方法如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、星形孢菌素和 2-氨基嘌呤和鞘氨醇来减少。

或者, 可以通过向卵母细胞中引入磷酸酶如磷酸酶 2A 和磷酸酶 2B 来抑制细胞蛋白质的磷酸化。

以下列出了激活方法的具体实例。

1. 通过离子霉素和 DMAP 激活

1-将卵母细胞置于含有 2mM DMAP 的离子霉素 (5 μ M) 中 4 分钟;

2-将卵母细胞转移至含有 2mM DMAP 的培养基中 4 小时;

3-洗涤 4 次然后进行培养。

2. 通过离子霉素 DMAP 和 Roscovitin 激活

1-将卵母细胞置于含有 2mM DMAP 的离子霉素 (5 μ M) 中 4 分钟;

2-将卵母细胞转移至含有 2mM DMAP 和 200 μ M Roscovitin 的培养基中 3 个小时;

3-洗涤 4 次然后进行培养。

3. 通过暴露于离子霉素及随后的细胞松弛素和环己酰亚胺进行激活

1-将卵母细胞置于离子霉素 (5 μ M) 中 4 分钟;

2-将卵母细胞转移至含有 5 μ g/ml 细胞松弛素 B 和 5 μ g/ml 环己酰亚胺的培养基中 5 个小时;

3-洗涤 4 次然后进行培养。

4. 通过电脉冲激活

1-将卵置于含有 100 μ M CaCl₂ 的甘露醇培养基中;

2-施加三次持续 20 μ sec 的 1.0 kVcm⁻¹ 脉冲, 每次脉冲相隔 22 分钟;

3-将卵母细胞转移至含有 5 μ g/ml 细胞松弛素 B 的培养基中 3 个小时。

5. 通过暴露于乙醇及随后的细胞松弛素和环己酰亚胺进行激活

1-将卵母细胞置于 7% 乙醇中 1 分钟;

2-将卵母细胞转移至含有 5 μ g/ml 细胞松弛素 B 和 5 μ g/ml 环己酰亚胺的培养基中 5 个小时;

3-洗涤 4 次然后进行培养。

6. 通过显微注射 adenophostine 激活

1-给卵母细胞注射含有 10 μ M adenophostine 的 10-12 皮升溶液;

2-进行卵母细胞培养。

7. 通过显微注射精子因子激活

1-给卵母细胞注射 10 - 12 皮升分离的精子因子，例如从灵长类动物、猪、牛、绵羊、山羊、马、小鼠、大鼠、兔或仓鼠中分离的；

2-进行卵的培养。

8. 通过显微注射重组精子因子激活。

9. 通过暴露于 DMAP 及随后的环己酰亚胺和细胞松弛素 B 进行激活
典型地在成熟后约 22 - 28 小时，将卵母细胞或 NT 单位置于约 2mM DMAP 中约 1 小时，然后在 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 细胞松弛素 B 和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 环己酰亚胺中孵育约 2 - 12 小时，优选地约 8 小时。

以上激活方法是用于核转移程序（例如包括采用灵长类动物或人供体细胞或卵母细胞的那些）的示例性方法。然而，当供体细胞和细胞核之一或两者是有蹄动物来源例如绵羊、水牛、马、山羊、牛、猪来源时，和/或其中卵母细胞是有蹄动物来源例如绵羊、猪、水牛、马、山羊、牛来源等时，也可以采用以上激活方法，同样这些方法也可以用于其它物种。

正如所提及的，可以在核转移之前、同时、或之后进行激活。一般地，在核转移和融合前约 40 小时至核转移和融合后约 40 小时，更优选地在核转移和融合前约 24 小时至核转移和融合后约 24 小时，最优选在核转移和融合前约 4 - 9 小时至核转移和融合后约 4 - 9 小时，进行激活。优选地，在卵母细胞体外或体内成熟之后或附近的时间，例如与成熟几乎同时或在成熟的约 40 个小时内，更优选地在成熟的约 24 小时内，进行激活。

可以将激活的 NT 单位培养在适合的体外培养基中直到产生胚胎或干样细胞和细胞集落。适于胚胎培养和成熟的培养基是本领域熟知的。可以用于牛胚胎培养和维持的已知培养基的例子包括 Ham 氏 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-丙酮酸 (TALP)、Dulbecco 氏磷酸缓冲盐水 (PBS)、Eagle 氏和 Whitten 氏培养基。用于卵母细胞收集和成熟的最为常见的培养

基之一是 TCM-199, 并补加 1-20% 血清, 包括胎牛血清、新生动物血清、动情期母牛血清、羊羔血清或去势牛血清。优选的维持培养基包括含有 Earl 盐、10% 胎牛血清、0.2 Ma 丙酮酸和 50 μ g/ml 硫酸庆大霉素的 TCM-199。以上任何一种均还可以涉及和多种细胞类型如粒层细胞、输卵管细胞、BRL 细胞和子宫细胞及 STO 细胞的共培养。

特别地, 人子宫内膜的上皮细胞在植入前和植入期间分泌白血病抑制因子(LIF)。因此, 在培养基中加入 LIF 可能对于增强重建胚胎的体外发育是重要的。美国专利 5,712,156 中描述了 LIF 在胚胎或干样细胞培养中的用途, 该专利并入本文作为参考。

另一种维持培养基描述于 Rosenkrans Jr. 等的美国专利 5,096,822, 该专利并入本文作为参考。此胚胎培养基命名为 CR1, 含有支持胚胎所必需的营养物质。CR1 含有 1.0 mM 至 10 mM、优选 1.0mM 至 5.0mM 量的 L-乳酸半钙(hemicalcium L-lactate)。L-乳酸半钙是其上带有半钙盐的 L-乳酸。

而且, Thomson 等, Science, 282:1145-1147 (1998) 和 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:7844-7848 (1995), 讨论了组织培养中维持人胚胎细胞的适合培养基。进一步地, NT 单元可以在生物液如腹水, 羊水, 玻璃体/水性液和淋巴液中培养。

然后, 优选地洗涤培养的 NT 单位, 并置于优选地含有约 10% FCS 的适合培养基中, 如 CR1aa 培养基、Ham 氏 F-10、组织培养基-199 (TCM-199)、Tyrodes-白蛋白-乳酸-丙酮酸(TALP)、Dulbecco 氏磷酸缓冲盐水(PBS)、Eagle 氏和 Whitten 氏培养基。该培养将优选在含有适合的汇合饲养细胞层的多孔板中进行。适合的饲养细胞层包括例如成纤维细胞和上皮细胞如来源于有蹄动物的成纤维细胞和子宫上皮细胞、小鸡成纤维细胞、鼠源(例如小鼠或大鼠)成纤维细胞、STO 和 SI-m220 饲养细胞系、和 BRL 细胞。

在优选实施方案中, 饲养细胞含有小鼠胚胎成纤维细胞。制备适合成纤维细胞饲养层的方法描述于之后的实施例中, 是本领域技术人员熟知的。

将 NT 单位培养在饲养层上，直到该 NT 单位达到一定大小以适合获得可以用于制备胚胎干细胞或细胞集落的细胞。优选地，培养这些 NT 单位直到它们达到具有至少约 2-400 个细胞、优选地约 4-128 个细胞、最优选地至少约 50 个细胞的大小。培养在适合条件下进行，即约 38.5℃ 和 5% CO₂，并且典型地约每 2-5 天，优选地约每 3 天更换一次培养基以最优化生长。

对于人细胞/去核牛卵母细胞来源的 NT 单位，足以制备 ES 细胞集落的细胞为典型地约 50 个细胞的数量级，可以在卵母细胞激活起始后约 12 天获得。然而，这可以随用作核供体的具体细胞、具体卵母细胞的物种、及培养条件而改变。本领域技术人员可以容易地基于培养的 NT 单位的形态通过观察确定何时获得了期望的足量细胞。

对于人/人核转移胚胎、或采用非人灵长类动物供体或卵母细胞制备的其它胚胎，使用已知对于组织培养维持人和其它灵长类动物细胞有用的培养基是有利的。适合人胚胎培养的培养基的例子包括 Jones 等，*Human Reprod.*, 13 (1):169-177 (1998) 中报道的培养基、P1 (目录号 #99242) 培养基、和 P-1 (目录号 #99292) 培养基 (两者均来自 Irvine Scientific, Santa Ana, California)、以及 Thomason 等 (1998) 和 (1995) 所使用的那些培养基，这些文献均完整地并入本文作为参考。

另一种优选培养基含有 ACM+尿苷+葡萄糖+1000 IU 的 LIF。

还有另一合适的培养基包括天然形成的生物液如腹水，玻璃体/水性体液，羊水和淋巴液。

正如以上讨论的，用于本发明的细胞优选包含哺乳动物体细胞、最优选来源于活跃增殖的(非静止的)哺乳动物细胞培养物的细胞。在一个尤其优选的实施方案中，供体细胞通过目的 DNA 序列的加入、缺失或替代进行遗传修饰。例如，可以采用提供目的基因产物如治疗性多肽表达的 DNA 结构，转染或转化供体细胞如角质形成细胞或成纤维细胞，例如人、灵长类动物或牛来源的。目的基因产物实例包括淋巴因子如 IGF-I、IGF-II、干扰素、集落刺激因子、结缔组织多肽如胶

原蛋白、遗传因子、凝血因子、酶、酶抑制剂等。同样，目的基因可以通过同源重组被“敲入”或“敲除”。

而且，正如以上讨论的，可以在核转移前修饰供体细胞，以便例如削弱细胞谱系的发育、增强胚胎发育和/或抑制细胞凋亡。期望的修饰的例子将在以下作进一步讨论。

本发明一方面涉及供体细胞如人细胞的遗传修饰，以便其成为谱系缺陷的，并由此当用于核转移时不能产生可存活的子代。对于人核转移胚胎而言这尤其理想，其中由于伦理原因，可存活胚胎的制备可能是不希望的结果。这可以通过遗传改造人细胞以便当用于核转移时它不能分化出特定细胞谱系来实现。具体地，可以遗传修饰细胞以便当用作核转移供体时所获“胚胎”不含有或基本上缺少中胚层、内胚层或外胚层组织的至少一种。

这可以通过例如敲除或削弱一种或多种中胚层、内胚层或外胚层特异性基因的表达来实现。其实例包括：

中胚层：SRF、MESP-1、HNF-4、 β -I 整联蛋白、MSD；

内胚层：GATA-6、GATA-4；

外胚层：RNA 解旋酶 A、H β 58。

以上所列旨在作为参与中胚层、内胚层和外胚层发育的已知基因的示例而非排他性的。中胚层缺陷、内胚层缺陷和外胚层缺陷的细胞和胚胎的制备以前在文献中已有报道。见例如 Arsenian 等，EMBO J.，第 17 卷(2):6289-6299 (1998)；Saga Y, Mech. Dev., 第 75 卷(1-2):53-66 (1998)；Holdener 等，Development, 第 120 卷(5):1355-1346 (1994)；Chen 等，Genes Dev., 第 8 卷(20):2466-2477 (1994)；Rohwedel 等，Dev. Biol., 201 (2): 167-189 (1998) (中胚层)；Morrisey 等，Genes. Dev., 第 12 卷(22): 3579-3590 (1998)；Soudais 等，Development, 第 121 卷(11):3877-3888 (1995) (内胚层)；和 Lee 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第 95 卷(23): 13709-13713 (1998)；和 Radice 等，Development, 第 111 卷(3): 801-811 (1991) (外胚层)。

一般地，可以对期望的体细胞如人角质形成细胞、上皮细胞或成纤维细胞进行遗传修饰，以便具体细胞谱系所特异的一或多种基因被“敲除”和/或这些基因的表达被显著削弱。这可以通过已知方法来实现，例如同源重组。Capecchi 等在美国专利 5,631,153 和 5,464,764 中公开了实现目的基因“敲除”的一个优选遗传系统，他们报道了能够在目的哺乳动物基因组中定向修饰 DNA 序列的正-负筛选(PNS)载体。该遗传修饰导致当用作核移植供体时不能分化出特定细胞谱系的细胞。

此遗传修饰细胞可用于制备谱系缺陷性核转移胚胎，即该胚胎不能发育具有功能的中胚层、内胚层或外胚层中的至少一种。藉此，所获胚胎，即使被植入例如人子宫中，也不会产生可存活的子代。然而，由该核转移产生的 ES 细胞仍是有用的，因为它们可以产生剩下的一或两种未损伤谱系的细胞。例如，外胚层缺陷的人核转移胚胎仍可产生中胚层和内胚层来源的分化细胞。外胚层缺陷的细胞可以通过缺失和/或破坏 RNA 解旋酶 A 或 H β 58 基因之一或两者来产生。

这些谱系缺陷性供体细胞还可以经过遗传修饰表达另一种期望的 DNA 序列。由此，该遗传修饰供体细胞可产生谱系缺陷的胚泡，该胚泡一旦被接种后将分化出至多两种胚层。

或者，可以修饰供体细胞以使它是“永生的”。这可以通过表达反义或核酶端粒酶基因来实现。这可以通过已知遗传方法提供反义 DNA 或核酶的表达，或通过基因敲除来进行。这些“永生”细胞当用于核转移时将不能分化成可存活子代。

本发明的另一优选实施方案是制备在组织培养中生长更为有效的核转移胚胎。这是有利的，因为这将减少制备 ES 细胞和/或子代（如果胚泡要植入雌性替代母体中）的必需时间和必要的融合。而且，由于观察到来自核转移的胚泡和 ES 细胞可能损伤发育的潜能，因此这也是期望的。尽管这些问题通常可以通过改变组织条件来缓解，但替换解决方案是通过增强参与胚胎发育的基因的表达来加强胚胎发育。

例如，已有报道，Ped 型，其为 MHC I 家族成员，的基因产物对于

胚胎发育是极为重要的。更特别地，已有报道，对于小鼠的植入前胚胎 Q7 和 Q9 基因负责“快速生长”表型。因此，可以预料，在供体细胞中引入提供这些和相关基因、或它们的人或其它哺乳动物对应物的表达的 DNA，将导致生长更快速的核转移胚胎。对于可能在组织培养中发育效率低于同一物种细胞或细胞核融合制备的核转移胚胎的交叉物种核转移胚胎而言，这尤其有利。

具体地，可以将含有 Q7 和/或 Q9 基因的 DNA 结构在核转移前引入供体体细胞中。例如，可以构建含有如下成分的表达结构：可操作地与 Q7 和/或 Q9 基因连接的强组成型哺乳动物启动子、IRES、一或多个合适的可选择标记如新霉素、ADA、DHFR、和 polyA 序列，如 bGH polyA 序列。而且，通过包括间隔序列进一步增强 Q7 和 Q9 基因表达可能是有利的。可以预料这些基因将在胚泡发育的早期表达，因为这些基因在不同的物种，如牛、山羊、猪、狗、猫和人中是高度保守的。而且，可以预料，可以对供体细胞进行改造以影响其它增强胚胎发育的基因。因此，这些遗传修饰供体细胞应更为有效地产生胚泡和植入前阶段的胚胎。

本发明的再一方面涉及构建抵抗细胞凋亡即程序化细胞死亡的供体细胞。文献中已有报道，植入前阶段的胚胎中存在细胞死亡相关基因(Adams 等, Science, 281(5381):1322-1325 (1998))。据报道可诱导细胞凋亡的基因包括例如 Bad、Bok、BH3、Bik、Hrk、BNIP3、Bim_L、Bad、Bid 和 EGL-1。相反地，据报道可以保护细胞使之避免程序化细胞死亡的基因包括例如 Bcl-XL、Bcl-w、Mcl-1、A1、Nr-13、BHRF-1、LMW5-HL、ORF16、Ks-Bcl-2、E1B-19K 和 CED-9。

因此，可以构建如下供体细胞，该供体细胞中诱导细胞凋亡的基因被“敲除”或其中保护细胞免受细胞凋亡的基因的表达在胚胎发育期间得以增强或打开。

例如，这可以通过引入 DNA 结构以提供在胚胎发育期间这些保护性基因如 Bcl-2 或相关基因的被调节的表达来实现。藉此，可以通过将胚胎培养在特定的生长条件下“开启”基因。或者，可以将该基因

与组成型启动子连接在一起。

更具体地，可以构建含有可操作地与调节型或组成型启动子如 PGK、SV40、CMV、泛素、或 β 肌动蛋白的启动子、IRES、适合的选择标记、和 polyA 序列连接的 Bcl-2 基因的 DNA 结构，并将该结构导入期望的供体哺乳动物细胞如人角质形成细胞或成纤维细胞中。

这些供体细胞当被用于制备核转移胚胎时，应抵抗细胞凋亡并藉此在组织培养中更有效地分化。藉此，可以增加核转移制备的适合植入前胚胎的速度和/或数量。

获得相同结果的另一种方式是削弱诱导细胞凋亡的一个或多个基因的表达。这可以通过敲除或通过使用反义或核酶对抗胚胎发育早期表达和诱导细胞凋亡的基因来实现。其实例见上。可以以反义方向表达的细胞死亡基因包括 BAX、Apaf-1 和 capsase。此外，可以以有义或反义方向引入编码甲基化酶或脱甲基酶的转基因。编码甲基化酶和脱甲基酶的 DNA 是本领域熟知的。再有，可以构建含有此两种修饰的供体细胞，即削弱细胞凋亡诱导基因和增强阻断或妨碍细胞凋亡的基因的表达。美国专利 5,646,008 公开了影响细胞凋亡的基因的构建和选择、以及表达这些基因的细胞系，该专利并入本文作为参考。已经有许多促进或抑制细胞凋亡的 DNA 的报道，它们是一些专利的主题。

增强克隆效率的另一个方式是选择处于特殊细胞周期的细胞作为供体细胞。已有报道，这会显著影响核转移效率 (Barnes 等, *Mol. Reprod. Devel.* 36 (1):33-41 (1993))。已经报道了用于选择处于特定细胞周期阶段的细胞的不同方法，它们包括血清饥饿 (Campbell 等, *Nature*, 380:64-66 (1996); Wilmut 等, *Nature*, 385:810-813 (1997))、和化学同步化 (Urbani 等, *Exp. Cell Res.*, 219(1):159-168 (1995))。例如，可以将特定的细胞周期蛋白 DNA 与调节序列以及可检测标记，如绿色荧光蛋白 (GFP)，可操作地连接在一起，随后连接细胞周期蛋白破坏盒、以及任选地连接增强细胞周期和标记蛋白表达的间隔序列。藉此，可以容易地通过观察检测和筛选处于期望的细胞周期的细胞用作核转移供体。一个例子是用于筛选 G1 期细胞的细胞周期蛋

白 D1 基因。然而，任何细胞周期蛋白基因应当都适用于本发明。（见例如 King 等，*Mol. Biol. Cell*，第 7 卷(9):1343-1357 (1996)）。

然而，对于制备处于期望细胞周期阶段的细胞而言需要一种侵入性较小或更为有效的方法。可以预料，这可以通过遗传修饰供体细胞以便其在可检测条件下表达特定的细胞周期蛋白来实现。藉此，具有特定细胞周期的细胞可以容易地与其它细胞周期辨别开来。

细胞周期蛋白是仅在细胞周期的特殊阶段才表达的蛋白质。它们包括 G1 期的细胞周期蛋白 D1、D2 和 D3、G2/M 期的细胞周期蛋白 B1 和 B2、以及 S 期的细胞周期蛋白 E、A 和 H。这些蛋白质在 cytogolcytosol 中易于翻译和遭到破坏。这些蛋白质的这种“瞬时”表达部分是由于“破坏盒”的存在引起的，该“破坏盒”是一段短氨基酸序列，该序列是作为标签起作用以指导这些蛋白质通过泛素途径迅速降解的蛋白质的一部分。（Adams 等，*Science*，281 (5321):1322-1326 (1998)）。

本发明中，可以构建在易于检测的条件下，优选地例如通过使用荧光标记可进行观察的条件下，表达一或多个该细胞周期蛋白基因的供体细胞。例如，可以将特定的细胞周期蛋白 DNA 可操作地与调节序列以及可检测标记如绿色荧光蛋白(GFP)连接，并之后连接细胞周期蛋白破坏盒、以及任选地连接增强细胞周期蛋白和/或标记基因表达的间隔序列。藉此，可以容易地通过观察检测和筛选处于期望的细胞周期的细胞，用作核转移供体。这样的一个例子是能够用于筛选 G1 期细胞的细胞周期蛋白 D1 基因。然而，任何细胞周期蛋白基因都应适合用于本发明。（见例如 King 等，*Mol. Biol. Cell*，第 7 卷(9):1343-1357 (1996)）。

正如讨论的，本发明提供提高核转移效率，优选地提高交叉物种核转移方法效率，的不同方法。尽管本发明人已阐述了，当将一个物种的细胞核或细胞插入不同物种的去核卵母细胞或与之融合时，可以产生能形成胚泡的核转移胚胎，该胚胎可以产生 ES 细胞系，然而该方法的效率十分低。因此，典型地需要进行许多融合来制备其细胞可以

经培养产生 ES 细胞和 ES 细胞系的胚泡。促进核转移胚胎体外发育的另一方式是优化培养条件。达到此结果的一个方式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,已经发现,蛋白酶如 capsase 可以通过类似于其它细胞类型的细胞凋亡造成细胞死亡。(见 Jurisicosva 等, Mol. Repod. Devel., 51(3):243-253 (1998))。

可以预料,通过在用于核转移和维持胚泡或培养植入前阶段胚胎的培养基中包含一或多种 capsase 抑制剂,可以促进胚泡的发育。这些抑制剂包括例如 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。它们的用量为能够有效抑制细胞凋亡的量,例如按培养基的重量计 0.00001 - 5.0%;更优选地按培养基重量计 0.01% - 1.0%。因此,前述方法可以通过增强随后的胚泡和胚胎在组织培养中的发育用于提高核转移效率。

获得期望大小的 NT 单位后,通过机械方式从区带中取出这些细胞,然后用于制备胚胎或干样细胞和细胞系。优选地这通过如下方式进行:采取含有 NT 单位(该 NT 单位典型地含有至少约 50 个细胞)的细胞团,洗涤这些细胞,然后将这些细胞接种在饲养层如经辐射过的成纤维细胞上。典型地,用于获得干样细胞或细胞集落的细胞可以从培养的 NT 单位(该 NT 单位优选地至少有 50 个细胞大小)的最内部部分获得。然而,也可以采用具有较少或较多细胞数量的 NT 单位以及来自 NT 单位的其它部分的细胞来获得 ES 样细胞和细胞集落。

可以进一步预测,将供体细胞 DNA 更长时间地暴露于卵母细胞的胞质溶胶可以促进脱分化过程。这可以通过重新克隆,即通过从重新构建的胚胎采取卵裂球并与新的去核卵母细胞融合,来实现。或者,可以使供体细胞与去核卵母细胞融合并在 4-6 小时后未激活时取出染色体并与较年青的卵母细胞融合。激活可以此后进行。

将细胞维持在饲养细胞层和适合的生长培养基如补加 10% FCS 和 0.1mM β 巯基乙醇(Sigma)及 L-谷氨酰胺的 α -MEM 中。按照优化生长所必需的频率经常,例如约每 2-3 天一次,更换生长培养基。

该培养过程导致胚胎或干样细胞或细胞系的形成。对于人细胞/牛卵母细胞来源的 NT 胚胎,在 α -MEM 培养基中培养约第二天后可观察到集落。然后,此时间可以随具体的核供体细胞、特定的卵母细胞和培养条件而改变。本领域技术人员可以按需要改变培养条件以优化特定胚胎或干样细胞的生长。本文还公开了其它适合的培养基。

获得的胚胎或干样细胞和细胞集落典型地表现出与用作核细胞供体的物种而非供体卵母细胞物种的胚胎或干样细胞相似的外观。例如,对于通过将人核供体细胞转移至去核牛卵母细胞获得的胚胎或干样细胞,该细胞表现出与小鼠胚胎干细胞而非牛 ES 样细胞更为相似的形态。

更具体地,人 ES 系细胞集落的单个细胞不十分明确,而且该集落的外周折光且外观平滑。而且,该细胞集落具有较长的细胞倍增时间,约是小鼠 ES 细胞的两倍。而且,与牛和猪来源的 ES 细胞不同,该集落不具有上皮样外观。

正如以上讨论的,Thomson 在美国专利 5,843,780 中报道了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 (+)。可以预料,根据本发明方法制备的人和灵长类动物 ES 细胞将表现出相似的或一致的标记表达。

或者,可以基于这些细胞产生所有中胚层、外胚层和内胚层组织的能力,确证它们是确实的人或灵长类动物胚胎干细胞。这可以通过在合适的条件下如 Thomsen 在美国专利 5,843,780 (将其完整地并入本文作为参考)中所公开的条件,培养根据本发明制备的 ES 细胞来证明。或者,可以通过将根据本发明制备的这些细胞注射至动物如 SCID 小鼠或大的农业动物中,然后获取来源于所述植入细胞的组织,证实这些细胞具有多能性这一事实。这些植入的 ES 细胞应产生所有不同类型的分化组织即中胚层、外胚层和内胚层组织。

所获胚胎或干样细胞和细胞系,优选地人胚胎或干样细胞和细胞系,具有许多治疗和诊断用途。最特别的是,这些胚胎或干样细胞可以用于细胞移植治疗。人胚胎或干样细胞可以用于治疗许多疾病。

在此方面，已知小鼠胚胎干(ES)细胞能够分化出几乎所有的细胞类型如造血干细胞。因此，根据本发明制备的人胚胎或干样细胞应具有相似的分化能力。根据本发明的胚胎或干样细胞可以根据已知方法诱导分化以获得期望的细胞类型。例如，可以通过在分化培养中在可提供细胞分化的条件下培养本发明的人胚胎或干样细胞，诱导这些细胞分化为造血干细胞、肌肉细胞、心肌细胞、肝细胞、软骨细胞、上皮细胞、尿道细胞等。导致胚胎肝细胞分化的培养基和方法以及适合的培养条件是本领域已知的。

例如，Palacios等，*Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 92:7530-7537 (1995)指出了可以通过将干细胞置于如下诱导程序中从胚胎细胞系产生造血干细胞，该程序包括首先在缺少视黄酸的悬浮培养基中培养这些细胞的聚集体，之后在含有视黄酸的同样培养基中培养，再后将细胞聚集体转移至可提供细胞附着的基质上。

而且，Pedersen, *J. Reprod. Fertil. Dev.*, 6:543-552 (1994)综述文章参考了许多文献，在这些文献中公开了胚胎干细胞体外分化以制备各种分化细胞类型包括尤其是造血干细胞、肌肉、心肌、神经细胞的方法。

而且，Bain等，*Dev. Biol.*, 168:342-357 (1995)指出了如何使胚胎干细胞体外分化以产生具有神经元性质的神经细胞。这些参考文献是从胚胎或干样细胞获得分化细胞的报道方法的例子。这些参考文献以及尤其是其中关于胚胎细胞分化方法的公开被完整地并入本文作为参考。

因此，采用已知方法和培养基，本领域技术人员可以培养本发明的胚胎或干样细胞以获得期望的分化细胞类型，例如神经细胞、肌肉细胞、造血细胞等。此外，可诱导的 Bcl-2 或 Bcl-x1 的使用可能对于体外增强特定细胞谱系的发育是有用的。在体内，Bcl-2 阻断发生在淋巴和神经发育过程中的许多，但不是所有，形式的细胞凋亡式细胞死亡。关于 Bcl-2 表达可以如何用于在供体细胞转染后抑制相关细胞谱系的细胞凋亡的深入讨论公开于美国专利 5,646,008，该文献特此

并入本文作为参考。

本发明胚胎或干样细胞可以用于获得任何期望的分化细胞类型。这些分化的人细胞的治疗用途是空前未有的。例如，可以将人造血干细胞用于需要骨髓移植的医学治疗中。可以采用这些方法治疗许多疾病，如晚期癌症如卵巢癌和白血病、以及损伤免疫系统的疾病如 AIDS。可以通过如下方式获得造血干细胞：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卵母细胞如牛的卵母细胞融合，获得以上讨论的胚胎或干样细胞，并在利于分化的条件下培养这些细胞直到获得造血干细胞为止。这些造血细胞可以用于治疗包括癌症和 AIDS 在内的疾病。

或者，可以将患有神经系统疾病的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，由此获得人胚胎或干样细胞，并在分化条件下培养这些细胞以制备神经细胞系。通过移植这些人神经细胞可进行治疗的具体疾病包括例如尤其是帕金森病、阿尔茨海默病、ALS 和脑性麻痹。在帕金森病的具体病例中，已经阐明移植的胎儿脑神经细胞可以和周围细胞形成正确连接并产生多巴胺。这可以导致帕金森病症状的长期逆转。

为了允许进行分化细胞的特定筛选，可以用经诱导型启动子表达的选择标记转染供体细胞，籍此在诱导分化时允许具体细胞谱系的筛选和富集。例如，CD34-neo 可以用于筛选造血细胞、Pw1-neo 可用于筛选肌肉细胞、Mash-1-neo 可用于筛选交感神经元、Mal-neo 可用于筛选人大脑皮层灰质的 CNS 神经元等。同样，使用基质来促进组织发育可以是有利的。

本发明的一大优点是它提供了适合移植的等基因或同基因人细胞的基本上无限的供应。因此，这将消除与目前移植方法有关的显著问题，即可能由于宿主对移植物或移植物对宿主排斥引起的移植组织排斥。常规地，排斥可以通过施用抗排斥药物如环孢菌素预防或减轻。然而，这些药物有显著的不良副作用，如免疫抑制、致癌性质、以及极为昂贵。本发明应消除或至少极大地降低对抗排斥药物如环孢菌素、

imulan、FK-506、糖皮质激素和雷帕霉素、及它们的衍生物的需要。

可通过等基因细胞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、肝脏疾病即高胆固醇血症、心脏病、软骨替换、烧伤、足溃疡、胃肠道疾病、血管疾病、肾病、尿道疾病、和老化相关的疾病和病症。

同样，根据本发明制备的人胚胎或干样细胞也可以用于制备遗传改造的或转基因的人分化细胞。基本上，这可以通过如下方式实施：引入期望的基因或多个基因，该基因可以是异源的，或除去根据本发明制备的人胚胎或干样细胞的内源性基因或多个基因的全部或部分，并允许这些细胞分化为期望的细胞类型。实现此修饰的一个优选方法是同源重组，因为可以采用该技术在干样细胞的基因组中特定位置插入、缺失或修饰基因。

可以采用该方法学替代缺陷性基因如缺陷性免疫系统基因、囊性纤维化基因，或引入导致治疗上有益的蛋白质如生长因子、淋巴因子、细胞因子、酶等表达的基因。例如，可以将编码大脑来源的生长因子的基因导入人胚胎或干样细胞中，使该细胞分化为神经细胞，并将这些细胞移植至帕金森病患者体内以延缓该疾病过程中神经细胞的损失。

以前，BDNF 转染的细胞类型是多样的，从原代细胞至永生化细胞系，有神经或非神经（成肌细胞和成纤维细胞）来源的细胞。例如，已采用逆转录载体使星形胶质细胞转染了 BDNF，并将这些细胞移植入帕金森病的大鼠模型中(Yoshimoto 等, Brain Research, 691:25-36, (1995))。

此离体治疗在转移后 32 天减轻了高达 45% 大鼠的帕金森病样症状。而且，将酪氨酸羟化酶基因放入星形胶质细胞中也获得相似结果(Lundberg 等, Develop. Neurol., 139:39-53 (1996)和其中引用的参考文献)。

然而，这些离体系统存在问题。尤其是，目前使用的逆转录载体在体内被下调，而且转基因仅进行瞬时表达 (Mulligan 的综述，

Science, 260:926-932 (1993))。而且, 这些研究采用的是具有有限生命期限且复制缓慢的原代细胞: 星形胶质细胞。这些性质不利地影响了转染率并妨碍了对稳定转染细胞的筛选。而且, 几乎不可能增殖获得可在同源重组技术中使用的基因定向的大的原代细胞群。

相反, 与逆转录系统相关的难题应当可以通过使用人胚胎或干样细胞来消除。本发明受让人先前已阐明, 可以转染牛和猪的胚胎细胞系并对其筛选稳定整合的异源 DNA。这些方法描述于共同转让的美国专利 5,905,042, 该申请被完整地并入本文作为参考。因此, 采用这些方法或其它已知方法, 可以将目的基因导入本发明的人胚胎或干样细胞中, 并使这些细胞分化为期望的细胞类型如造血细胞、神经细胞、胰脏细胞、软骨细胞等。

可以引入本发明胚胎或干样细胞的基因包括例如表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胶质细胞来源的神经营养生长因子、胰岛素样生长因子(I 和 II)、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4/5、睫状神经营养因子、AFT-1、细胞因子基因(白介素、干扰素、集落刺激因子、肿瘤坏死因子(α 和 β)等)、编码治疗性酶、胶原蛋白、人血清白蛋白的基因, 等。

此外, 还可以采用目前本领域已知的负选择系统之一, 在必要时从患者体内除去治疗性细胞。例如, 转染了胸苷激酶(TK)基因的供体细胞可以导致含有 TK 基因的胚胎细胞的产生。这些细胞的分化将导致同样表达 TK 基因的目的治疗性细胞的分离。这些细胞可以通过施用 gancyclovir 随时被选择性地清除。此负选择系统描述于美国专利 5,689,446 中, 该文献并入本文作为参考。

本发明胚胎或干样细胞, 优选人细胞, 还可以用作体外分化模型, 尤其是用于研究参与早期发育调节的基因。

还可以采用用本发明胚胎或干样细胞制备的分化细胞组织和器官进行药物研究。

而且, 本发明细胞可以用于表达重组 DNA。

再有, 本发明胚胎或干样细胞可以用作制备其它胚胎或干样细胞

和细胞集落的核供体。

而且，可以将根据本发明制备的培养内细胞团、或干细胞导入动物如 SCID 小鼠、母牛、猪的如肾囊下或肌肉内，并用于在其中产生畸胎瘤。此畸胎瘤可以用于获取不同的组织类型。而且，通过 X 物种核转移制备的内细胞团可以联合生物可降解的生物相容性聚合物基质一起导入，这些基质为形成三维组织提供了条件。组织形成后，聚合物降解，理想地仅留下供体组织如心脏、胰脏、神经、肺、肝。在某些情况下，将生长因子和促进血管发生的蛋白质包括在内可能是有利的。或者，可以通过采用适合的培养基和条件、生长因子、及生物可降解聚合物基质，完全在体外实现组织的形成。

为了更为清楚地描述本发明，我们提供了以下实施例。

实施例 1

材料和方法

用于核转移的供体细胞

采用标准玻片从同意的成年人口腔内轻轻刮下上皮细胞。将这些细胞从玻片上冲洗至含有磷酸缓冲盐且不含 Ca 或 Mg 的培养皿中。小内径移液器抽吸细胞以将细胞团块破碎为单个细胞悬液。然后将这些细胞转移至位于油下的含有 10% 胎牛血清 (FCS) 的 TL-HEPES 微液滴中，用于核转移至去核牛卵母细胞中。

核转移程序

以前已描述了基本的核转移程序。简而言之，在获自屠宰场的卵母细胞体外成熟后，将卵母细胞从卵丘细胞中剥离出来并在成熟后约 18 小时 (hpm) 采用成斜角的微量移液器去核。在加有 bisbenzimidazole (Hoechst 33342, 3 μ g/ml; Sigma) 的 TL-HEPES 培养基中证实了去核。然后将单个的供体细胞置于受体卵母细胞的卵周隙中。采用电融合技术将牛卵母细胞细胞质与供体细胞核 (NT 单位) 融合在一起。向 NT 单位应用由 90V 15 μ sec 构成的一次融合脉冲。这发生在卵母细胞成熟起始后 (hpm) 24 小时。将 NT 单位置于 CR1aa 培养基中直到 28 hpm 为止。

用于人为激活卵母细胞的程序在其它地方已有描述。NT 单位在 28 hpm 激活。激活程序的简要描述如下：在补加 1mg/ml BSA 的 TL-HEPES 中将 NT 单位暴露于离子霉素 (5 μ M; CalBiochem, La Jolla, CA) 4 分钟，然后在补加 30mg/ml BSA 的 TL-HEPES 中洗涤 5 分钟。然后将 NT 单位转移至含有 0.2mM DMAP (Sigma) 的 CR1aa 培养基微液滴中，于 38.5 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养 4-5 小时。洗涤 NT 单位，然后将之置于含有小鼠胚胎成纤维细胞汇合饲养层(见下述)的 4 孔板内加有 10% FCS 和 6 mg/ml BSA 的 CR1aa 培养基中。在 38.5 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 下再培养 NT 单位 3 天。每 3 天一次更换培养基直到激活时间后第 12 天为止。这时从区带 (zona) 中以机械方式取出达到期望细胞数量即约 50 个细胞数的 NT 单位，并用于制备胚胎细胞系。图 1 中包含了按以上描述的方法获得的 NT 单位的照片。

成纤维细胞饲养层

从 14-16 日龄胎鼠中获取胚胎成纤维细胞的原代培养物。无菌取出头、肝、心脏和消化道后，切碎胚胎并于预热的胰蛋白酶 EDTA 溶液 (0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY) 中 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。将成纤维细胞接种在组织培养瓶中，并于补加 10% 胎牛血清 (FCS) (Hyclone, Logan, UT)、青霉素 (100 IU/ml) 和链霉素 (50 μ g/ml) 的 α -MEM 培养基 (BioWhittaker, Walkersville, MD) 中培养。传代后 3-4 天，在 35 \times 10 Nunc 培养皿 (Baxter Scientific, McGaw Park, IL) 中辐射胚胎成纤维细胞。将经辐射的成纤维细胞于 37 $^{\circ}$ C 培养并维持在含有 5% CO₂ 的湿润空气中。然后将具有均匀单层细胞的培养板用于培养胚胎细胞系。

胚胎细胞系的制备

洗涤按以上所述获得的 NT 单位细胞，并直接将其接种在辐射过的饲养成纤维细胞上。这些细胞包括 NT 单位内部的那些细胞。在由补加 10% FCS 和 0.1mM β -巯基乙醇 (Sigma) 的 α MEM 组成的生长培养基中维持细胞。每 2-3 天更换一次生长培养基。到培养的第二天观察到最初的集落。对该集落进行增殖，并且其表现出与前面所公开的小鼠胚

胎干(ES)细胞相似的形态。集落中的单个细胞并不十分明确,而且集落外周折光且外观平滑。该细胞集落表现出比小鼠ES细胞具有较慢的细胞倍增时间。而且,与牛和猪来源的ES细胞不同,该集落至今没有上皮细胞外观。图2-5是按上述获得的ES样细胞集落的照片。

分化的人细胞的制备

将获得的人胚胎细胞转移至分化培养基中并进行培养直到获得分化的人细胞类型。

结果

表1. 人细胞作为NT单位产生和发育中的供体细胞核

表1

细胞类型	制备的 NT 单位数量	2 细胞阶段的 NT 单位数量 (%)	4-16 细胞阶段的 NT 单位数量 (%)	16-400 细胞阶段的 NT 单位数量 (%)
淋巴细胞	18	12 (67%)	3 (17%)	0
口腔上皮细胞	34	18 (53%)	3 (9%)	1 (3%)
成年成纤维细胞	46	4 (9%)	12 (4 细胞; 26%) 8 (8-16 细胞; 17.4%)	----

将发育出具有多于16个细胞的结构的一个NT单位向下接种在成纤维细胞饲养层上。该结构附着于饲养层并开始增殖形成具有ES细胞样形态的集落(见例如图2)。而且,尽管没有采用4-16细胞阶段的结构来尝试制备ES细胞集落,但以前已经显示该阶段能够产生ES或ES样细胞系(小鼠, Eistetter等, *Devel. Growth and Differ.*, 31:275-282 (1989); 牛, Stice等, 1996)。因此,预期4-16细胞阶段的NT单位应当也可以产生胚胎或干样细胞和细胞集落。

而且,当成年人角质形成细胞系和去核牛卵母细胞进行融合时也获得了相似结果,其中所述卵母细胞培养在含有ACM、尿苷、葡萄糖和100 IU LIF的培养基中。50个重建的胚胎中,22个分裂并且一个

在约第 12 天发育成胚胎。接种了此胚胎，并且现在正在进行 ES 细胞系的制备。

实施例 2

A. 从细胞中分离线粒体的操作方法

本实施例涉及线粒体的分离和其在增强交叉物种核移植中的应用。每个细胞的线粒体数目在细胞系与细胞系之间是变化的。例如，小鼠的 L 细胞每细胞含有约 100 个线粒体，而在 HeLa 细胞中有此数目的至少两倍的线粒体。在低渗缓冲液中溶胀细胞，并在 Dounce 匀浆器中采用紧密吻合的研棒研几次进行破碎，然后通过差速离心分离线粒体。

溶液、管子和匀浆器均应在冰上预冷。所有的离心步骤在 40℃ 进行。该方法是以起始的 1-2 ml 经洗涤细胞沉淀为基础的。将细胞沉淀重悬于 11ml 冰冷 RSB 中，并将其转移至一个 16ml 的 Dounce 匀浆器中。

RSB 缓冲液

RSB (用于溶胀组织培养细胞的低渗缓冲液)

10 mM NaCl

1.5 mM MgCl₂

10 mM Tris-HCl, pH 7.5

MgCl₂

使细胞溶胀 5-10 分钟。采用相差显微镜保持溶胀进程。优选地采用研棒进行几次研磨，以重置溶胀细胞。之后立即加入 8ml 2.5×MS 缓冲液至 1×MS 的终浓度。然后用 Parafilm 覆盖匀浆器的顶部，并通过数次颠倒进行混合。

2.5× MS 缓冲液

525 mM 甘露糖醇

175 mM 蔗糖

12.5 mM Tris-HCl, pH 7.5

215 mM EDTA pH 7.5

1×MS 缓冲液

210 mM 甘露糖醇

70 mM 蔗糖

5 mM Tris-HCl, pH 7.5

1 mM EDTA, pH 7.5

MS 缓冲液是维持细胞器张力及防止凝集的等渗缓冲液。

之后, 将匀浆物转移至离心管中进行差速离心。采用小量的 MS 缓冲液洗涤匀浆器, 然后加入匀浆物中。用 MS 缓冲液将体积调节至 30ml。然后以 1300 g 离心匀浆物 5 分钟以除去细胞核、未破碎的细胞和大的膜碎片。然后将上清液倒入干净的离心管中。重复两次向下离心细胞核。然后将上清液转移至干净离心管中, 并以 17,000 g 离心含有线粒体的沉淀 15 分钟。丢弃上清液并采用 Kimwipe 擦干管子内壁。通过将沉淀物重新悬浮在 1 ×MS 中并重复此 17,000g 沉积作用以洗涤线粒体。丢弃上清液并将沉淀重新悬浮在缓冲液中。可以将线粒体在 -80℃ 长期保存, 例如长达一年, 但优选地之后不久将其用于 NT。

可以对此基本操作程序进行修改。尤其是, 可能期望进一步分离线粒体 DNA 并同样用于 NT。在此情况下, 细胞核而非小细胞器污染可能是一个问题, 因此可以作如下修改。例如, 可以在静止生长期收获细胞, 该时期活跃分裂的细胞最少, 并且可以采用 CaCl_2 替代 RSB 中的 MgCl_2 以稳定核膜。如同密度梯度纯化一样, 省去对线粒体沉淀的洗涤。相反地, 简单地重悬线粒体沉淀并进行裂解, 从任何残余的细胞核 DNA 中纯化出线粒体 DNA。正如所提及的, 纯化线粒体和线粒体 DNA 的适合方法是本领域熟知的。

如果将细胞重悬在细胞沉淀至少 5-10 × 体积的溶液中, 而且如果细胞悬液将匀浆器填充了至少半满, 则匀浆效果最好。将匀浆器的研棒直接向下压至管底, 维持一个坚实而稳定的压力。Dounce 匀浆器通过压力改变破碎溶胀的组织培养细胞。当研棒下压时, 细胞周围的压力增加; 当细胞滑过研棒末端时, 突然的压力减少导致细胞破碎。如果研棒十分紧密的吻合, 则同时可能有一些机械破碎。

B. 从组织中分离线粒体

基于具体的组织选择线粒体分离的操作方法。例如，应当针对组织优化匀浆缓冲液，并采用最佳方式匀浆组织。适合的方法是本领域熟知的。

由于易于获得、易于匀浆、而且细胞含有巨大量的线粒体(每细胞1000-2000个)，所以大鼠肝是最为常用的线粒体制备用组织。例如，可以采用动力驱动的Teflon和玻璃Potter-Elvehjem匀浆器。或者，如果组织足够柔软，则可以采用带有松研棒的Dounce匀浆器。线粒体制品的产量和纯度受到制备方法、制备速度、和动物年龄和生理条件的影响。正如所提及的，纯化线粒体的方法是熟知的。

优选地，预先冷却缓冲液、管子和匀浆器。预冷玻璃和Teflon型匀浆器将在管子和研棒之间产生合适的间隙。离心步骤优选在40℃进行。

基本上，该程序包括取出肝脏、小心不要破碎胆囊。将其置于冰上的烧杯中，取出所有的结缔组织。确认组织并将其放回烧杯中，例如采用极锋利的剪刀、解剖刀、或刀片将其切成1-2片。然后采用匀浆缓冲液(1×MS)洗涤这些组织片，优选进行两次，以除去大多数血液，并将该组织转移至匀浆器的管子中。加入足量的匀浆缓冲液，以制备1:10 (w/v)匀浆物。

应用分离的线粒体或线粒体DNA增强NT效率

本发明人推理，交叉物种核转移的效力可以通过引入与供体细胞或细胞核相同的物种的线粒体或线粒体DNA来增强。因此，所获NT单位的细胞核DNA将是物种相容性的。

典型地通过注射，将通过以上或其它已知程序分离的线粒体掺入以下任意一种物质中(对于人供体细胞/牛卵母细胞的核转移而言)：

- (i) 未激活的、未去核牛卵母细胞；
- (ii) 未激活的、去核牛卵母细胞；
- (iii) 激活的、去核牛卵母细胞；
- (iv) 未激活的、(与人供体细胞或细胞核)融合的牛卵母细胞；
- (v) 激活的、融合并分裂的重建(母牛卵母细胞/人细胞)胚胎；或

(vi) 激活的、融合的单细胞重建(母牛卵母细胞/人细胞)胚胎。

同样的程序也可以增强其它交叉物种 NT。基本上是,再次将与供体细胞或细胞核相同物种的线粒体导入 (i) - (vi)之任一种中,而且该卵母细胞可以具有不同的物种来源。一般将约 1 - 200 皮升的线粒体悬液注射至上述之任一个中。该线粒体的导入将导致其中线粒体和供体 DNA 相容的 NT 单位。

实施例 3

提高交叉物种核转移效率的另一方法包括使(与供体细胞或细胞核同一物种的)一或多个去核体细胞,典型地人的体细胞,与下列任一个融合:

- (i) 未激活的、未去核(例如牛的)卵母细胞;
- (ii) 未激活的、去核(例如牛的)卵母细胞;
- (iii) 激活的、去核(例如牛的)卵母细胞;
- (iv) 未激活的、(与人细胞)融合的卵母细胞(典型地牛的卵母细胞);
- (v) 激活的、融合并分裂的重建(例如母牛卵母细胞/人细胞)胚胎;
- (vi) 激活的、融合的单细胞重建(母牛卵母细胞/人细胞)胚胎;或
- (vii) 未激活的、融合(例如与人细胞)的卵母细胞(典型地牛卵母细胞)。

优选地通过电脉冲或采用仙台病毒进行融合。制备去核细胞(例如人细胞)的方法是本领域已知的。优选的操作程序如下。

去核程序:

采用细胞松弛素 B 大规模进行细胞去核的方法是本领域熟知的。去核优选地采用单层细胞技术来完成。该方法使用附着于培养皿生长表面的少数细胞,而且如果可获得有限数量的供体细胞这是理想的。另一适合方法是梯度技术,该方法要求通过 Ficoll 梯度离心细胞,最适合于大量细胞($>10^7$)的去核。

单层细胞技术。单层细胞技术实际上对于生长附着于生长表面的任何细胞均是理想的。

带有螺旋顶盖的 250ml 广口聚碳酸酯或聚丙烯离心瓶通过高压灭菌。盖子优选与瓶子分开进行高压灭菌以防止离心瓶损坏。通过向每个瓶子中无菌加入 30ml DMEM、2ml 牛血清和 0.32 ml 细胞松弛素 B (1mg/ml)，预备用于去核程序的瓶子。将盖子放置在瓶子上，并在使用前将瓶子保持在 37℃。

将待去核的细胞(从几百至约 10^5 个细胞)接种在培养皿(35×15 mm; Nunc Inc., Naperville, IL)上。典型地，在培养皿上培养细胞至少 24 个小时，以促进细胞与生长表面的最大附着。优选地，防止细胞汇合。为了灭菌目的用 70% (v/v) 乙醇擦拭(含有细胞的)培养皿下半部分的外侧，以预备进行离心的培养皿。或者，可以通过将培养皿保持在一个更大的无菌培养皿中在细胞培养期间保持培养皿的无菌。从培养皿中除去培养基并在离心瓶中上下倒置该培养皿(没有盖子)。

离心转头(GSA, DuPont, Wilmington, DE)和离心机优选通过 8000rpm 离心 30 - 45 分钟预热至 37℃。或者可以采用 HS-4 吊桶式转头(DuPont)。离心的最佳时间和速度对于每一种细胞类型是不同的。对于成肌细胞和成纤维细胞，将带有培养皿的离心瓶放置在预热的转头中并离心约 20 分钟(转头达到期望速度时和离心机关闭时之间的间隔)。优选地，使用 6500-7200 rpm 的速度。

离心后，从转头上取下离心瓶，并用钳子从瓶子上取下培养板。在培养板中保留少量的培养基以保持细胞的湿润，以便维持细胞的生存力。培养皿的外侧，包括顶边在内，均采用无菌擦拭工具擦拭，然后用 95% (v/v) 乙醇弄湿以除去所有培养基并使之干燥。将无菌盖子置于培养皿之上。如果不打算立即使用去核细胞，则应在培养皿中加入完全培养基(补加了适合浓度血清的培养基)，并将细胞放置在 CO₂ 孵育器中。所获去核细胞(核体)与以上(i) - (viii)之任一个融合。

尽管本文通过参考各种具体的材料、方法和实例对本发明进行了描述和说明，但应当理解，本发明并不局限于为此目的选择的具体的材料、材料组合、和方法。可以包含这些细节的许多变体，并且这些变体将是本领域技术人员理解的。

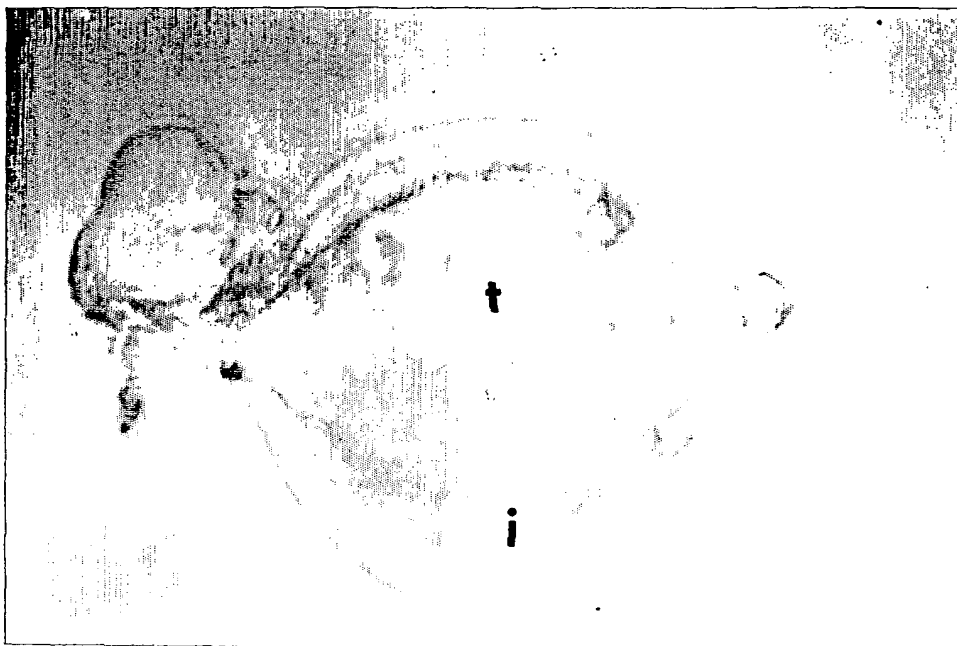


图 1

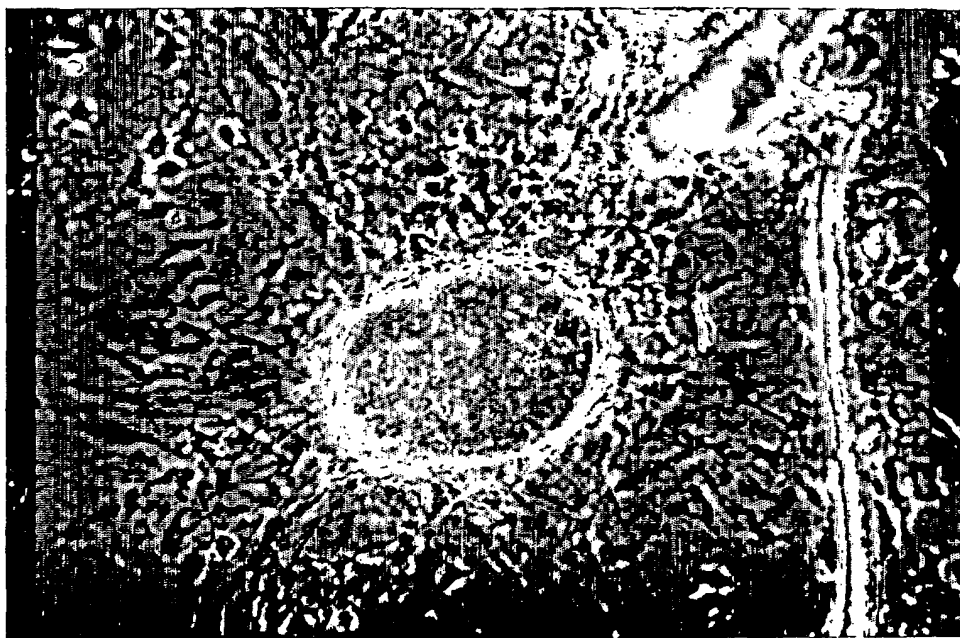


图 2

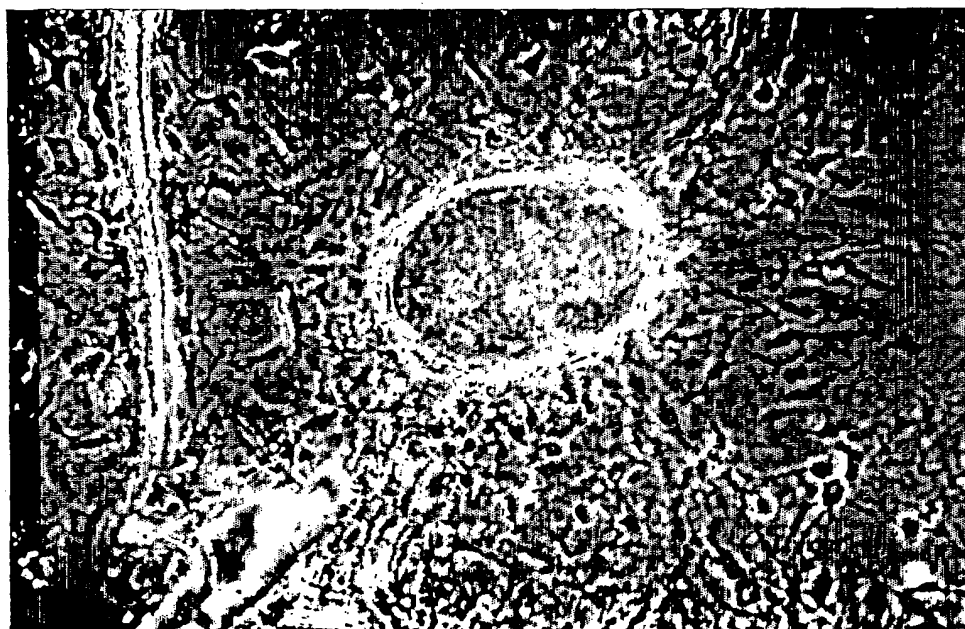


图 3

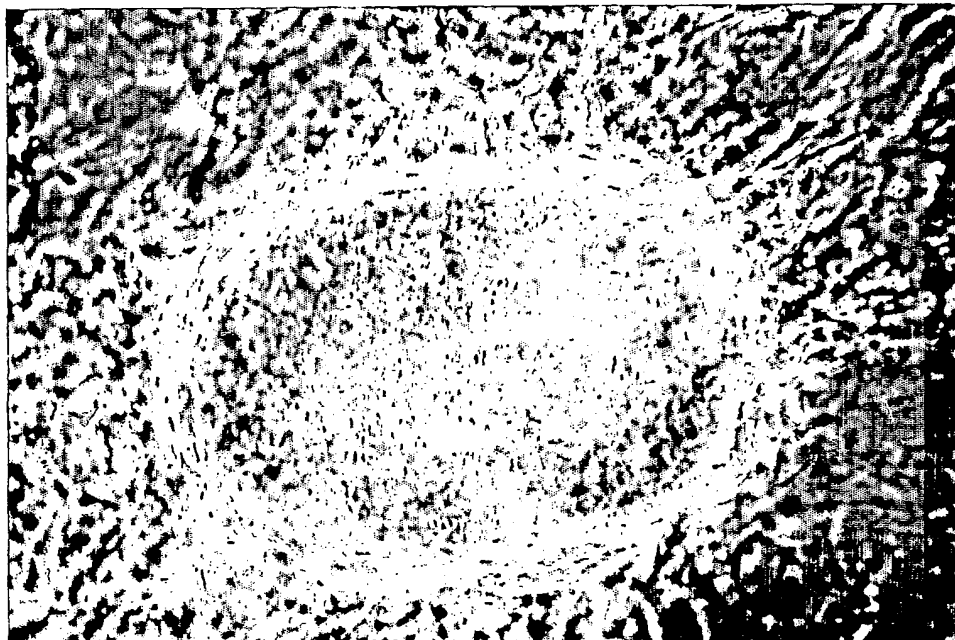


图 4



图 5