[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710008192.0

[51] Int. Cl.
C12N 15/06 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/08 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 7 月 25 日

[11] 公开号 CN 101003800A

[51] Int. Cl. (续)
A61P 25/14 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 13/02 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

[22] 申请日 1998.6.24

[21] 申请号 200710008192.0
分案原申请号 98807691.8

[30] 优先权
[32] 1997. 7. 3 [33] US [31] 08/888,283

[71] 申请人 马萨诸塞大学
地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 S·L·司蒂斯 J·西柏利
J·M·罗贝尔 P·戈吕克
F·A·彭斯迪莱昂 D·J·杰瑞

[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 2 页 说明书 24 页

[54] 发明名称

使用来自无血清饥饿的分化细胞的供体细胞核进行克隆

[57] 摘要

本发明提供涉及将来自无血清饥饿的细胞的供体分化的细胞核移植入与供体细胞相同种的去核卵母细胞的核移植改进方法。 得到的核移植单位通过胎儿和后代的产生用于基因型和转基因基因型的繁殖以及等基因 CICM 细胞包括人等基因胚胎或干细胞的产生。 由于可对供体细胞核的分化细胞来源进行遗传修饰和克隆繁殖，通过本发明可促进遗传工程或转基因哺乳动物胚胎、胎儿和后代的产生。

1. 产生 CICM 细胞系的方法，包括:

(i)在适于核移植(NT)单位形成的条件下，将所需的无血清饥饿的、分化的哺乳动物细胞或细胞核插入与分化的细胞或细胞核相同种的去核哺乳动物卵母细胞;

(ii)活化得到的核移植单位; 并且

(ii)培养从所述培养的 NT 单位获得的细胞以获得 CICM 细胞系。

2. 根据权利要求 1 的方法获得的 CICM 细胞系。

3. 根据权利要求 1 的方法，其中在所述分化的哺乳动物细胞或细胞核中插入、去除或修饰目的 DNA，从而导致遗传改变的 NT 单位的产生。

4. 根据权利要求 3 的方法获得的转基因 CICM 细胞系。

5. 根据权利要求 1 的方法，其中诱导得到的 CICM 细胞系分化。

6. 根据权利要求 5 的方法获得的人分化细胞。

7. 一种治疗方法，包括给予需要细胞移植治疗的病人以根据权利要求 6 所述的等基因分化细胞。

8. 根据权利要求 7 的方法，其中进行所述的细胞移植治疗以治疗以下疾病或病症: 帕金森病、亨廷顿舞蹈病、阿尔茨海默病、ALS、脊髓缺陷或损伤、多发性硬化、肌营养不良、囊性纤维化、肝脏疾病、糖尿病、心脏疾病、软骨缺陷或损伤、烧伤、足溃疡、血管疾病、尿道疾病、AIDS 和癌症。

9. 一种治疗方法，包括给予需要细胞移植治疗的病人以根据权利要求 6 所述的人分化细胞。

10. 根据权利要求 9 的方法，其中进行所述的细胞移植治疗以治疗以下疾病或病症: 帕金森病、亨廷顿舞蹈病、阿尔茨海默病、ALS、脊髓缺陷或损伤、多发性硬化、肌营养不良、囊性纤维化、肝脏疾病、糖尿病、心脏疾病、软骨缺陷或损伤、烧伤、足溃疡、血管疾病、尿道疾病、AIDS 和癌症。

11. 根据权利要求 7 的方法，其中分化的人细胞是造血细胞或神经

细胞。

12. 根据权利要求 7 的方法，其中疗法是用于治疗帕金森病并且分化细胞是神经细胞。

13. 根据权利要求 7 的方法，其中疗法是用于治疗癌症并且分化细胞是造血细胞。

14. 根据权利要求 1 的方法，进一步包括将克隆的 NT 单位与受精胚胎结合以产生嵌合体。

15. 根据权利要求 14 的方法，进一步包括使嵌合的 CICM 细胞系发育成嵌合胚胎。

16. 根据权利要求 15 的方法，进一步包括使嵌合胚胎发育成嵌合胎儿。

17. 根据权利要求 16 的方法，进一步包括使嵌合胎儿发育成嵌合后代。

18. 根据权利要求 14 的方法，其中在所述分化的哺乳动物细胞或细胞核内插入、去除或修饰目的 DNA，由此导致遗传改变的 NT 单位的产生。

19. 根据权利要求 18 的方法，进一步包括使嵌合的 CICM 细胞发育成嵌合胚胎。

20. 根据权利要求 19 的方法，进一步包括使嵌合胚胎发育成嵌合胎儿。

21. 根据权利要求 20 的方法，进一步包括嵌合胎儿发育成嵌合后代。

使用来自无血清饥饿的分化细胞的供体细胞核进行克隆

本分案申请是基于申请号为98807691.8，申请日为1998年6月24日，发明名称为“使用来自无血清饥饿的分化细胞的供体细胞核进行克隆”的中国专利申请的分案申请。

发明领域

本发明涉及将来自无血清饥饿的、分化的哺乳动物细胞的细胞核移植哺乳动物入与供体细胞核相同种的去核哺乳动物卵母细胞的克隆方法。对此细胞核进行程序重调以指导克隆的胚胎发育，然后可以将其移植入雌性受体以产生胎儿或后代或者用于产生培养的内细胞团细胞(CICM)。此克隆的胚胎也可与受精的胚胎结合以产生嵌合胚、胎儿和/或后代。

发明背景

已有报道使用有蹄动物的内细胞团(ICM)细胞进行核移植。例如，Collas等在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进行牛ICMs的核移植。Collas等公开了将胚在体外培养七天产生的十五个胚细胞转移入牛受体时使其中四头怀孕及两头生产。并且，Keefer等在Biol.Reprod.,50:935-939(1994)中公开了在核移植方法中将牛的ICM细胞作为供体核产生的胚细胞移植入牛的受体时，产生了一些可存活的后代。并且，Sims等在美国国家科学院院报90: 6143-6147(1993)中公开了通过将在体外短期培养的牛ICM细胞核转移入去核的成熟卵母细胞可生产小牛。

也有报道称移植培养的胎盘细胞核后可产生能存活的小羊(Campbell等，自然，380:64-68(1996))。更进一步地，已有报道核移植中牛多能胚细胞的使用和嵌合胎儿的产生(Stice等，Biol.Reprod,54:100-110(1996)；Collas等，Mol.Reprod.Dev.，38:264-267(1994))。Collas等证明颗粒细胞(成体细胞)可用于牛克隆方法以产生胚胎。但是，未能证明胚胎早期(胚泡期)之后的发育。并且，颗粒细胞不易培养并仅能从雌性获得。Collas等未尝试在培养中繁殖颗粒细胞或试图遗传修饰那些

细胞。Wilmut 等(自然，365:810-813(1997))从胎儿成纤维细胞产生核移植绵羊后代，并且从成体绵羊细胞产生了一个后代。

在产生转基因猪的领域中也存在问题。通过现有方法，将异源 DNA 引入在胎儿中分化成各种细胞类型并最终发育成转基因动物的早期胚或胚细胞系。但是，产生一个转基因动物需要许多早期胚，因此该方法是非常低效的。并且，没有在花费时间和经费将胚放入代理雌性体内之前筛选转基因胚的简单及有效的方法。此外，基因导向技术不易于用早期胚转基因技术完成。

小鼠中的胚胎干细胞使研究人员能够筛选转基因细胞并进行基因导向。这导致与其它转基因技术相比将更多地使用遗传工程。但是，必需将胚胎干细胞系和其它胚细胞系维持在未分化状态，这需要饲养层和/或在培养基中添加细胞因子。即使采取了这些预防措施，这些细胞仍会经常发生自发分化并且不能通过现有可获得的方法产生转基因后代。并且，一些胚细胞系必须以不利于基因导向方法的方式进行繁殖。

从早先预移植的小鼠胚中体外获得胚胎干(ES)细胞系的方法为大家所熟知。(见，例如 Evans 等，自然，29:154-156(1981)；Martin，美国国家科学院院报，78:7634-7638(1981))。假如由于成纤维细胞的饲养层(Evans 等，Id.)或分化抑制源(Smith 等，生物学进展，121:1-9(1987))存在的话，能使 ES 细胞以未分化状态传代。

以前已报道 ES 细胞具有许多应用。例如，已报道 ES 细胞可用作分化的体外模型，特别可用于研究早期发育调节中涉及的基因。当将小鼠 ES 细胞引入预移植的小鼠胚时可产生种系嵌合体，从而证明了它们的多能性(Bradley 等，自然，309:255-256(1984))。

由于 ES 细胞将其基因组传递到下一代的能力，它们具有通过使用带有或不带有所需的遗传修饰的 ES 细胞进行家畜动物种系操作的潜在用途。并且，在家畜动物如有蹄动物中，来自如预移植家畜胚的核可促进去核卵母细胞的发育(Smith 等，Biol.Reprod.，40:1027-1035(1989)；和 Keefer 等，Biol.Reprod.，50: 935-939(1994))。相反，据报道来自小鼠超过 8 细胞阶段的胚的核在转移后并不促进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 细胞是非常理想的，因为它们可提供经遗传操作的全能性供体核的潜在来源或用于核移植方法。

一些研究小组已报道了称为多能性胚细胞系的分离。例如，Notarianni 等在 J.Reprod.Fert.Suppl., 43:255-260(1991)中报道了来自猪和绵羊胚泡的认为稳定的全能性细胞系的建立，该细胞系表现出一些与从绵羊胚泡免疫外科分离的内细胞团的初级培养物的细胞相似的形态学和生长特性。同时，Notarianni 等也在 J.Reprod.Fert.Suppl., 41:51-56(1990)中公开了来自猪胚泡的推定是全能性胚细胞系的培养物的维持和分化。Gerfen 等在动物生物技术，6(1):1-14(1995)中公开了从猪胚泡分离胚细胞系。这些细胞可在不使用条件培养基的小鼠胚的成纤维细胞饲养层中稳定维持，并且据报道在培养过程中分化成几种不同的细胞类型。

并且，Saito 等在 Roux's Arch.Dev.Biol.,201:134-141(1992)中报道培养的牛胚胎干细胞样细胞可存活三代，但在第四次传代后死亡。Handyside 等在 Roux's Arch.Dev.Biol.,196:185-190(1987)中公开了在分离来自小鼠 ICMs 的小鼠 ES 细胞系的条件下培养免疫外科分离的绵羊胚的内细胞团。Handyside 等报道在这样的条件下，绵羊 ICMs 附着、扩散并发育出 ES 细胞样和内胚层细胞样细胞的区域，但在进行更长时间的培养后仅有内胚层样细胞明显可见。

近来，Cherny 等在 Theriogenology, 41:175(1994)中报道了来自称为多能性牛原生殖细胞的细胞系可在长期培养过程中维持。这些细胞，在培养约 7 天后，产生碱性磷酸酶(AP)染色为阳性的 ES 样集落，表现形成胚状体的能力，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，这确信是专门由 ES 细胞表达的同源异型框基因的模式。

并且，近来 Campbell 等在自然，380:64-68(1996)中报道了将来自在促进小鼠中 ES 细胞系分离的条件下培养的 9 天龄绵羊胚的培养的胎盘(ED)细胞进行核移植之后，可产生存活的小羊。作者得出结论，来自 9

天龄绵羊胚的 ED 细胞在经过核移植后是全能性的，并且这种全能性可在培养过程中得到维持。

Van Stekelenburg-Hamers等在Mol. Reprod. Dev., 40:444-454(1995)中报道了来自牛胚泡内细胞团细胞的称为永久细胞系的分离和特性鉴定。作者在不同条件下分离并培养来自 8 或 9 天龄的牛胚泡的 ICM 以测定哪一种辅助细胞和培养基在促进牛 ICM 细胞的附着和生长中最为有效。他们得出结论培养的 ICM 细胞的附着和生长可通过使用 STO(小鼠成纤维细胞)辅助细胞(代替牛的子宫内皮细胞)和使用补充以活性碳－解吸的血清(而不是标准血清)的培养基得到增强。然而，Van Stekelenburg 等报道了他们的细胞系更类似于上皮细胞而不是多能性 ICM 细胞。

Smith 等于 1994 年 10 月 27 日公开的 WO 94/24274、Evans 等于 1990 年 4 月 5 日公开的 WO 90/03432 和 Wheeler 等于 1994 年 11 月 24 日公开的 WO 94/26889 报道了认为可用于获得转基因动物的动物干细胞的分离、筛选和繁殖。Evans 等也报道了来自猪和牛物种的认为对产生转基因动物有用的称为多能性干细胞的衍生。并且，Wheeler 等于 1994 年 11 月 24 日公开的 WO 94/26884 也公开了认为对制备嵌合的和转基因的有蹄动物有用的胚胎干细胞。

因此，基于前面所述的内容，可明显看出许多小组由于 ES 细胞系在克隆或转基因胚的产生和核移植中的潜在应用，已尝试制备 ES 细胞系。

尽管，以前文献已有报道，仍需要克隆哺乳动物的改进方法。

发明目的和概述

本发明的目的是提供用于产生克隆的哺乳动物(如胚胎、胎儿和后代)的新的和改进的方法。

本发明更具体的目的是提供用于克隆哺乳动物的涉及将无血清饥饿的、分化的哺乳动物细胞的细胞核移植入相同种去核卵母细胞的新方法。

本发明的另一目的是提供用于繁殖具有已证实的遗传优越性或其它理想性状的成年哺乳动物的方法。

本发明的另一目的是提供用于产生遗传工程或转基因的哺乳动物(即胚胎、胎儿、后代)的改进方法。本发明还提供通过这种方法产生的遗传

工程或转基因的哺乳动物。

本发明的更具体的目的是提供通过在使用分化的细胞或细胞核形成NT单位之前在分化的哺乳动物细胞或细胞核内插入、去除或修饰目的DNA序列来产生遗传工程或转基因的哺乳动物的方法。本发明还提供用这种方法产生的遗传工程或转基因的哺乳动物。

本发明的另一目的是提供通过将无血清饥饿的、转基因的、分化的细胞的细胞核移植入与分化细胞相同种的去核卵细胞来产生遗传工程或转基因的哺乳动物的方法。本发明还提供用这种方法产生的遗传工程或转基因的哺乳动物。

本发明的另一目的是提供涉及将无血清饥饿的、分化的细胞的细胞核移植入与分化细胞相同种的去核卵母细胞来产生哺乳动物 CICM 细胞的新方法。

本发明的另一目的是提供通过将无血清饥饿的、分化的哺乳动物细胞的细胞核移植入与分化的细胞相同种的去核卵母细胞而产生的 CICM 细胞。

本发明更具体的目的是提供涉及将无血清饥饿的人细胞如人成体细胞的细胞核移植入去核的人卵母细胞来产生人CICM细胞的方法。

本发明的另一目的是使用这样的CICM细胞用于治疗或诊断。

本发明的具体目的是使用这样的CICM细胞包括人和有蹄动物的CICM细胞用于治疗或诊断任何其中细胞、组织或器官移植在治疗上或诊断上有益的疾病。这些CICM细胞可在相同种或杂交种内使用。

本发明的另一目的是使用来源于 NT 胚胎、胎儿或后代的细胞或组织包括人和有蹄动物组织用于治疗或诊断任何其中细胞、组织或器官移植在治疗上或诊断上有益的疾病或损伤包括帕金森病、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、肝脏疾病、心脏疾病、软骨置换、烧伤、血管疾病、尿道疾病以及用于免疫缺陷、骨髓移植、癌症等其它疾病的治疗。这些组织可在相同种或杂交种内使用这些组织。

本发明的另一具体目的是使用按照本发明产生的 CICM 细胞用于产生

分化的细胞、组织或器官。

本发明更具体的目的是使用按照本发明产生的人 CICM 细胞用于产生分化的人细胞、组织或器官。

本发明的另一具体目的是体外使用按照本发明产生的 CICM 细胞例如用于细胞分化的研究和试验目的如用于药物研究。

本发明的另一目的是提供移植疗法的改进方法，包括从按照本发明产生的 CICM 细胞产生的等基因或同基因细胞、组织或器官的应用。这样的治疗方法包括例如疾病和损伤包括帕金森病、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、肝脏疾病、心脏疾病、软骨置换、烧伤、血管疾病、尿道疾病的治疗以及免疫缺陷、骨髓移植、癌症等其它疾病的治疗。

本发明的另一目的是提供通过在使用该分化的细胞或细胞核形成 NT 单位之前在分化的哺乳动物细胞或细胞核中插入、去除或修饰目的 DNA 序列而产生的遗传工程或转基因的 CICM 细胞。

本发明的另一目的是使用按照本发明产生的转基因或遗传工程 CICM 细胞用于基因治疗、尤其用于上述疾病和损伤的治疗和/或预防。

本发明的另一目的是使用按照本发明产生的 CICM 细胞或者转基因或基因工程的 CICM 细胞作为用于核移植的细胞核供体。

因此，一方面，本发明提供用于克隆哺乳动物(如胚胎、胎儿、后代)的方法。方法包括:

(i)在适于核移植(NT)单位形成的条件下，将所需的无血清饥饿的、分化的哺乳动物细胞或细胞核插入与分化的细胞或细胞核相同种的去核哺乳动物卵母细胞;

(ii)活化得到的核移植单位; 并且

(iii)将所述培养的 NT 单位移植入宿主哺乳动物以使 NT 单位发育成胎儿。

优选地，培养活化的核移殖单位直至超过 2-细胞发育阶段。

这些胎儿的细胞、组织和/或器官可方便地用于细胞、组织和/或器官移植领域。

本发明还包括通过在将分化的哺乳动物细胞或细胞核插入去核卵母细胞之前在分化的哺乳动物细胞或细胞核中插入、去除或修饰目的 DNA 序列来克隆遗传工程或转基因的哺乳动物的方法。

本发明还提供的是按照上述方法获得的哺乳动物和那些哺乳动物的后代。

本发明优选地用于克隆有蹄动物。

另一方面，本发明提供产生 CICM 细胞的方法。方法包括:

(i)在适于核移植(NT)单位形成的条件下，将所需的无血清饥饿的、分化的哺乳动物细胞或细胞核插入与分化的细胞或细胞核相同种的去核哺乳动物卵母细胞;

(i)活化得到的核移植单位; 并且

(iii)培养从所述培养的 NT 单位获得的细胞以获得 CICM 细胞。

优选地，培养活化的核移植单位直至超过 2－细胞发育阶段。

CICM 细胞可方便地用于细胞、组织和器官移植领域。

关于上述和下文将更明显的本发明的其他目的、优点和特点，本发明的特征可通过参考下面本发明优选实施方案的详细描述和附加的权利要求得到更清楚地理解。

发明详述

本发明提供通过核移植或核转移克隆哺乳动物的改进方法。本申请中，核转移或核移植或 NT 可互换使用。

根据本发明，将来自无血清饥饿的、分化的哺乳动物细胞的细胞核移植入与供体细胞核相同种的去核哺乳动物卵母细胞中。对细胞核进行程序重调以指导克隆的胚胎发育，然后可将其移植入雌性受体以产生胎儿和后代或用于产生 CICM 细胞。克隆的胚胎也可与受精的胚胎结合以产生嵌合胚胎、胎儿和/或后代。

现有技术的方法已在克隆方法中使用胚细胞类型。这包括 Campbell 等(自然,380:64-68,1996)和 Stice 等(Biol. Reprod.,54:100-110,1996)的工作。在这些研究的两个中，胚细胞系来自妊娠少于 10 天的胚胎。在这两个研究中，细胞在饲养层上维持以防止克隆方法所用供体细胞的明

显分化。已发现本发明使用胎儿或成体细胞都有效。

未曾料到带有胎儿或成体供体细胞核的克隆胚胎能发育到高级胚胎和胎儿阶段。科学教条曾经是只有早期胚胎细胞类型可指导此类发育。未曾料到大量克隆胚胎可从胚胎或成体细胞产生。还有，新的转基因胚胎细胞系可方便地从转基因克隆胚胎得到这一事实是出乎意料的。

来自羊的成体细胞和胎儿成纤维细胞已有目的地用于生产绵羊后代(Wilmut 等，1997)。然而在那一研究中，强调的是使用静止期的血清饥饿的细胞核供体细胞对于 Wilmut 克隆方法的成功是重要的。对于本发明，不存在这样的对血清饥饿或静止的要求。相反，使用无血清饥饿的、分化的哺乳动物细胞实现了克隆。而且，根据本发明，克隆效率同样与使用胎儿或成体供体细胞无关，而 Wilmut 等(1997)报道用成体供体细胞的克隆效率更低。

因此，根据本发明，哺乳动物包括有蹄动物的优越的基因型的繁殖是可能的。这将允许具有已证实的基因优越性或其它理想的性状的成体动物的繁殖。例如在许多重要有蹄动物种中将加速改进。通过本发明，可以有无数可以在克隆方法中收获并利用的胎儿或成体细胞。这将可能在短时间内产生许多相同后代。

还有推测 Wilmut 等的方法将导致转基因动物的产生(见 MacQuitty, Nature Biotech., 15:294(1997))。但是，没有理由推测例如来自已转染了外源 DNA 的成体细胞的核能在核移植过程中存活。在这一点上，已知通过体外操作改变小鼠胚胎干(ES)细胞的特性从而得到它们形成存活嵌合胚的能力。因此，在本发明之前，转基因动物的克隆没有得到预测。

本发明还可通过对能克隆繁殖的细胞来源进行操作来简化转基因方法。这排除了将细胞维持在未分化状态的需要，因此，包括随机整合和基因导向的遗传修饰更易于实现。此方法还通过将核移植与体外修饰和选择细胞的能力结合变得比以前的转基因胚胎技术更有效。根据本发明，这些细胞能在无细胞因子、条件培养基和/或饲养层时克隆繁殖，进一步简化并有利于转基因方法。当根据本发明在克隆方法中使用转染细胞时，可产生能发育成胎儿和后代的转基因胚。并且，这些转基因的克隆胚可

用于产生 CICM 细胞系或其它胚细胞系。因此，本发明排除了为有利于遗传工程技术在体外衍生和维持未分化细胞系的需要。

本发明还可用于产生可用于例如细胞、组织和器官移植的 CICM 细胞、胎儿或后代。通过从动物取胎儿或成体细胞并将它用于克隆方法，可以在它们发育成器官形成中从克隆的胎儿获得多种细胞、组织和可能的器官。细胞、组织和器官也可从克隆的后代分离。这种方法可提供用于许多医学和兽医学治疗法包括细胞和基因治疗的“材料”来源。如果这些细胞移植回到细胞所来自的动物内，那么就避免了免疫排斥。而且，由于多种细胞类型可从这些克隆分离，其它方法系统如造血的嵌合状态可用来避免相同种内以及种间动物的免疫排斥。

因此，一方面，本发明提供克隆哺乳动物的方法。一般地，哺乳动物通过包括下列步骤的核移植方法产生:

(i)获得所需的无血清饥饿的、分化的哺乳动物细胞作为供体细胞核的来源;

(ii)从与供体细胞核来源细胞相同种的哺乳动物获得卵母细胞;

(iii)将所述的卵母细胞去核;

(iv) 例如通过融合或注射将所需的分化细胞或细胞核移植入去核的卵母细胞内以形成 NT 单位;

(v)活化得到的 NT 单位; 并且

(vi)将所述培养的 NT 单位移殖入宿主哺乳动物以使 NT 单位发育成胎儿。

优选地，培养活化的核移植单位直至超过 2-细胞发育阶段。

本发明还包括通过在将分化的哺乳动物细胞或细胞核插入去核卵母细胞之前在分化的哺乳动物细胞或细胞核内插入、去除或修饰目的 DNA 序列来克隆遗传工程或转基因的动物的方法。

本发明还提供的是按照上述方法得到的哺乳动物以及那些哺乳动物的后代。本发明优选地用于克隆有蹄动物。

本发明进一步提供在细胞、组织和器官移植领域内 NT 胎儿和 NT 及嵌合后代的应用。

另一方面，本发明提供产生 CICM 细胞的方法。方法包括:

(i)在适于核移植单位形成的条件下，将所需的无血清饥饿的、分化的哺乳动物细胞或细胞核插入与分化的细胞或细胞核相同种的去核哺乳动物卵母细胞;

(ii)活化得到的核移植单位; 并且

(iii)培养从所述培养的 NT 单位获得的细胞以获得 CICM 细胞。

优选地，培养活化的核移植单位直至超过 2－细胞发育阶段。

CICM 细胞有利地用于细胞、组织和器官移植领域或者用于产生胎儿或后代包括转基因胎儿或后代。

如此处所用的，胎儿是从子宫中取出的未出生的幼小的胎生动物。因此，牛的胎儿期是从受孕后 35 天直到出生。猪的胎儿期是从受孕后 30 天直到出生。哺乳动物是从出生到死亡的成体。

优选地，NT 单位培养到至少 2～400 个细胞大小，更优选地 4～128 个细胞，并且最优选地至少约 50 个细胞大小。

核转移技术或核移植技术在文献中有描述并在发明背景中引用的许多参考文献中也有描述。特别见: 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，美国国家科学院院报，90:6143-6147(1993); WO 94/26884; WO 94/24274 和 WO 90/03432，在这里将它们完全引用作为参考。并且，美国专利号为 4,944,384 和 5,057,420 的专利也描述了牛的核移植的方法。

分化的是指具有与周围的结构或原始的细胞不同的特点或功能的细胞。分化的哺乳动物细胞是那些经过了早期胚胎阶段的细胞。更具体地，分化的细胞是那些来自至少已经过胎盘阶段(牛胚胎发生的第 10 天)的细胞。分化的细胞可来自外胚层、中胚层或内胚层。

哺乳动物细胞包括人的细胞可通过众所周知的方法获得。可用于本发明的哺乳动物细胞包括例如上皮细胞、神经细胞、表皮细胞、角化细胞、造血细胞、黑色素细胞、软骨细胞、淋巴细胞(B 和 T 淋巴细胞)、红细胞、巨噬细胞、单核细胞、单核的细胞、成纤维细胞、心肌细胞和其

它肌肉细胞等。并且，用于核移植的哺乳动物细胞可从不同器官如皮肤、肺、胰脏、肝脏、胃、肠、心脏、生殖器官、膀胱、肾脏、尿道和其它泌尿器官等获得。这些仅是适当的供体细胞的例子。适当的供体细胞，即在本发明中有用的细胞可从身体的任何细胞或器官中获得。这包括所有的体细胞或生殖细胞。

成纤维细胞是所需的细胞类型，因为它们可大量地从发育的胎儿和成体动物获得。成纤维细胞有一定程度的分化，因此以前认为它们是用于克隆方法中的较差细胞类型。但重要地是，这些细胞能在体外以快速的倍增时间轻易繁殖并能够克隆繁殖以用于基因寻靶的方法中。本发明是新颖的也是因为使用了分化的细胞类型。本发明是有优点的，因为细胞易于在体外繁殖、遗传修饰和筛选。

其它报道的克隆方法(如 Wilmut 等，1997)依赖于应用血清饥饿的细胞。然而本发明中，供体细胞不是在血清饥饿状态。根据 Wilmut 等(1997)，血清饥饿的细胞是静止的，即，退出生长期的。其他方法(化学的、温度等)也可产生静止细胞。本发明中所用的供体细胞不是静止细胞。

卵母细胞的适当哺乳动物来源有绵羊、牛、猪、山羊、马、家兔、豚鼠、小鼠、仓鼠、大鼠、灵长类动物等。卵母细胞优选地从有蹄动物、最优选地从牛获得。

分离卵母细胞的方法在本领域众所周知。基本上，这包括从哺乳动物如牛的卵巢或生殖道分离卵母细胞。易于获得的牛卵母细胞的来源是屠宰场材料。

为使如遗传工程、核移植和克隆的技术成功使用，一般卵母细胞在用作核移植的受体细胞之前，及在它们可由精子细胞受精以发育成胚之前必须在体外成熟。此过程一般需要从哺乳动物卵巢如在屠宰场获得的牛卵巢收集未成熟的(前期 I)卵母细胞，并使其在受精或去核之前在成熟培养基中成熟直至卵母细胞到达中期 II 阶段，这一般发生在吸取牛卵母细胞约 18－24 小时后。为达到本发明的目的，这一时间段称为“成熟期”。如这里所用到的，为了计算时间段，“吸取”是指从卵巢滤泡中吸取未成熟的卵母细胞。

并且，在体外已成熟的中期 II 阶段的卵母细胞已成功地用于核移植技术中。基本上，成熟的中期 II 卵母细胞已从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 到 48 小时的非超排卵或超排卵的母牛或小母牛中外科收集。

已有报道称去核和核移植中的卵母细胞的成熟阶段对 NT 方法的成功是重要的。(见例如，Prather 等，分化，48,1-8,1991)。一般地，成功的哺乳动物胚克隆方法用中期 II 阶段的卵母细胞作为受体卵母细胞是因为确信在这一阶段的卵母细胞能够或足以得到“活化”以像处理受精的精子一样处理引入的核。在家畜中，卵母细胞活化期一般是在吸取后约 16 - 52 小时，优选约 28 - 42 小时。

例如，可在如 Seshagine 等，生殖生物学 40,544 - 606，1989 中所描述的 HEPE 缓冲的仓鼠胚胎培养基(HECM)中洗未成熟的卵母细胞，然后就将其置于 39℃薄层石蜡或硅层下的含有 50 微升的包含适当的促性腺激素如黄体生成素(LH)和卵泡刺激激素(FSH)和雌二醇的 10%胎牛血清的组织培养基(TCM)199 的成熟培养基滴中。

从约 10 - 40 小时，以及优选约 16 - 18 小时的一段固定的成熟时间之后，将卵母细胞去核。在去核之后，优选移动卵母细胞并且在除去卵立细胞之前将卵母细胞置于含有 1 毫克每毫升的透明质酸酶的 HECM 中。这可通过用很细孔的吸管重复吸打或短暂的旋转来完成。然后，筛选裸露的卵母细胞的极体，并且根据极体的存在而确定的选的分裂中期的卵母细胞就用于核移植。随后去核。

去核可通过已知方法来进行，如在美国专利号为 4,994,384 的专利中所述，在这里引用作为参考。例如，可将中期 II 的卵母细胞置于选择性地每毫升含有 7.5 微克细胞松弛素 B(CB)的 HECM 中用于立即去核，或者可置于合适的培养基中，例如胚胎培养基如 CR1aa，加 10%动情期牛血清，然后晚些去核，优选不超过 24 小时后，以及更优选 16 - 18 小时。

可用微量移液管去除极体和周围细胞质来显微外科地完成去核。筛选鉴定出那些已成功去核的卵母细胞。此筛选可通过用 HECM 中每毫升 1 微克的 33342 Hoechst 染料染色，然后在紫外线照射下 10 秒内观察卵母

细胞来进行。然后成功去核的卵母细胞可置于合适的培养基中，如加 10% 血清的 CR1aa。

本发明中，受体卵母细胞优选在人外成熟开始后约 10－40 小时的时间内去核，更优选在体外成熟开始后约 16－24 小时，并且最优选体外成熟开始后约 16－18 小时。

与去核的卵母细胞相同种的单个哺乳动物细胞随后被转移进入用来产生 NT 单位的去核的卵母细胞的卵周隙中。根据本领域已知的方法，哺乳动物细胞和去核的卵母细胞将被用来产生 NT 单位。例如，采用电融合融合细胞。通过提供足以引起质膜瞬时击穿的电脉冲完成电融合。由于膜迅速修复，质膜击穿非常短暂。因此，如果两相邻的膜被诱导击穿以及它们的脂双分子层混合修复之后，两细胞间的小通道将开放。由于这些小的开放的热力学不稳定性，它扩大直到两个细胞成为一个。将 Prather 等的美国专利 4,997,384 作为参考(在此全文引入作为参考)用来进一步讨论此方法。可用多种电融合介质包括如，蔗糖、甘露醇、山梨糖醇和磷酸盐缓冲溶液。也可应用 Sendai 病毒作为融合剂完成融合(Graham, Wistor Inot. Symp. Monogr., 9,19,1969)。

并且，在某些情况下(例如用较小的供体核时)将核直接注射到卵母细胞中比用电融合来进行融合可能更为优选。此技术在 Collas 和 Barnes, Mol. Reprod. Dev., 38:264-267(1994)中公开，在这里完全引用作为参考。

优选地，哺乳动物细胞和卵母细胞在卵母细胞成熟开始后约 24 小时、在含有融合介质(0.25M D－山梨糖醇，100μm 乙酸钙，0.5mM 乙酸镁、1.0g/L BSA(无脂肪酸)pH7.2)的 500μM 室中，应用 90－120V 的电脉冲、约 15 微秒进行电融合。融合之后，得到的融合的 NT 单位就置于合适的培养基如 Cr1aa 培养基中直至活化。典型的活化将其后很短时间，典型地少于 24 小时，优选地约 2~9 小时后完成。

NT 单位可通过已知的方法进行活化。这些方法包括，例如，在亚生理温度培养 NT 单位，实质上通过应用冷的，或实际上较凉的温度冷击 NT 单位。最方便地可通过在室温培养 NT 单位达到此目的，室温相对于胚所

正常暴露的生理温度条件是较冷的。

选择性地，可利用已知的活化试剂完成活化。例如，在受精过程中精子穿入卵母细胞已表现出活化预融合卵母细胞以在核移植获得更多的可存活的妊娠和多类基因一致的小牛。还有，处理方法如电和化学休克可用来在融合后活化 NT 胚胎。合适的卵母细胞的活化方法是 Susk-Parrish 等的美国专利号 5,496,720 的内容，在此全文引入作为参考。

另外，活化也可同时或随后进行:

(i)提高卵母细胞中二价阳离子的水平，及

(ii)降低卵母细胞中细胞蛋白的磷酸化作用。这一般可通将二价阳离子导入卵母细胞细胞质来进行，如，镁、锶、钦或钙，如以离子载体的形式。其他升高二价阳离子水平的方法包括应用电休克、用乙醇处理和用捕获的螯合剂处理。

可采用已知的方法降低磷酸化作用，如，加入激酶抑制剂，如丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂如 6-二甲氨基嘌呤、星形孢菌素、2-氨基嘌呤和鞘氨醇。

选择性地，可将磷酸酶和磷酸酶 2A 和磷酸酶 2B 导入卵母细胞来抑制细胞蛋白的磷酸化作用。

一个实施方案中，可采用在融合后约 24 小时内，以及优选融合后约 2-9 小时内将融合的 NT 单位短暂地暴露于含有 5μM 离子霉素和 1mg/ml BSA 的 TL-HEPES 培养基中，随后在含有 30mg/ml BSA 的 TL-HEPES 中洗来完成 NT 的活化。

活化的 NT 单位随后培养在合适的体外培养基中直到 CICM 细胞和细胞集落产生。本领域熟知适合于胚胎培养和成熟的培养基。可用于牛胚胎培养和维持的已知培养基的实例包括 Ham's F-10 加 10%胎牛血清(FCS)、组织培养基-199(TCM-199)加 10%胎牛血清、蒂罗德-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。用于卵母细胞收集和成熟的最普通的培养基之一是 TCM-199，和补充有 1-20%血清包括胎牛血清、新牛小牛血清、动情期母牛血清、小羊血清或公牛血清。优选的维持培养基包括含 Earl 盐、

10%胎牛血清、0.2mM 丙酮酸钠和 50μg/ml 硫酸庆大霉素的 TCM-199 培养基。上述中任意一种也可参与与多种细胞类型如颗粒细胞、输卵管细胞、BRL 细胞和子宫细胞和 STO 细胞的共同培养。

在此引入作为参考的 Roenkrans, Jr 等的美国专利 5,096,822 中描述了另一种维持培养基。这种名为 CR1 的胚胎培养基含有支持胚胎所必需的营养物质。

CR1 含有量从 1.0mM 到 10mM 的，优选 1.0mM 到 5.0mM 的 L-乳酸半钙。L-乳酸半钙是带有半钙盐与其结合的 L-乳酸。L-乳酸半钙是重要的，因为一个单个成分满足培养基两个主要求：(i)用于紧密的细胞骨架排列所必需的钙需求；和(ii)代谢和电子转运所必需的乳酸需求。L-乳酸半钙也可作为胚胎生存所必需的培养基的矿物质和能量来源。

有利的是，CR1 培养基不含血清，如胎牛血清，并且不需要应用动物细胞共培养或者其他生物培养基，即含有动物细胞如输卵管细胞的培养基。生物培养基有时候可能是不利的，因为它们可能含有对胚胎有害的并且难于检测、鉴定和消除的微生物或者微量因子。

CR1 培养基中的主要成分的例子包括 L-乳酸半钙、氯化钠、氯化钾、碳酸氢盐和微量无脂肪酸的牛血清白蛋白(sigma A-6003)。另外，可向培养基中加入规定量的必需和非必需氨基酸。含有氨基酸的 CR1 以缩写“CR1aa”而知。

CR1 培养基优选地含有如下含量的下列成分:

氯化钠	-114.7mM
氯化钾	-3.1mM
碳酸氢钠	-26.2mM
L-乳酸半钙	-5mM
不含脂肪酸的 BSA	-3mg/ml

在一个实施方案中，将活化的 NT 胚胎单位置于含有 1.9mM DMAP 的 CR1aa 培养基中约 4 小时，随后在 HECM 中洗并且然后在含有 BSA 的 CR1aa 中培养。

例如，可将活化的 NT 单位转移到含有 2.0mM DMAP(Sigma)的 CR1aa

培养基中并且在环境条件如约 38.5℃，5%CO_2 下培养适当时间如约 4－5 小时。

之后，优选地洗培养的 NT 单位并随后置于合适的培养基如含有 10%FCS 的 CRlaa 培养中，并且 6mg/ml 包含在优选地含有合适的融合饲养层的孔板 。合适的饲养层包括，例如，戊纤维细胞如来自有蹄动物的成纤维细胞和子宫上皮细胞、鸡成纤维细胞、鼠(如小鼠或大鼠)的成纤维细胞、STO 和 SI－m220 饲养细胞系，以及 BRL 细胞。

在一个实施方案中，饲养细胞包括小鼠胚胎成纤维细胞。合适的成纤维细胞饲养层制备的描述见后面的实施例并且在本领域技术人员中熟知。

在饲养层($5x10^5$ 细胞/ml)上培养 NT 单位直到 NT 单位达到适合于转移到受体雌性的大小，或者适合于获得可用于生产 CICM 细胞或细胞集落的细胞的大小。优选地，培养这些 NT 细胞直至至少约 2－400 个细胞，更优选地约 4－128 个细胞，以及最优选地至少约 50 个细胞。培养在合适的条件下，即，约 38.5℃及 5%CO_2 进行，为优化生长，典型的约每 2－5 天、优选的约每 3 天更换培养基。

本发明中用于胚胎移植和受体动物处理的方法是胚胎移植产业中所用的标准方法。同步移植对于本发明的成功是重要的，即 NT 胚胎的时期与受体雌性动物的动情周期是同步的。优点以及如何供养受伯评价见 Sieolel，G.E.Jr.(体外受精和胚胎发育中的“牛胚胎移植方法的鉴定性评论”(1981) L. Mastroianni，Jr 和 J.D.Biggers 编，Plenum 出版社，纽约，NY，323 页)，其内容在此引用作为参考。

通过本发明，用来自成体细胞的胞核的克隆效率可能与用来自胎儿细胞的胞核的相同。例如，用来自母牛胎儿和成体细胞的发育成桑椹胚期和胚泡期胚胎的效率相同的。

本发明还可用于克隆遗传工程或转基因猪。如上面所解释的，本发明具有优点是因为转基因方法可通过对能克隆繁殖的分化的细胞来源进行操作加以简化。特别地，用作供体核的分化细胞带有插入、去除或修饰的所需的 DNA 序列。然后将那些遗传改变的、分化的细胞用于去核卵

母细胞的核移植。

任何已知用于插入、去除或修饰哺乳动物细胞的目的 DNA 序列的方法都可用于改变欲用作核供体的分化细胞。这些方法可去除所有或部分 DNA 序列，并且 DNA 序列可以是异源的。所包括的技术有同源重组，可在细胞基因组中的一个或多个特定位点插入、去除或修饰 DNA 的一个或多个序列。

本发明因此可用于提供带有所需的基因型的成体猪。带有确定的遗传优势或其它所需的性状的成体猪的增加是特别有用的，包括转基因或遗传工程动物，和嵌合动物。因此，本发明可产生单种性别的后代，也可产生肉产量增加、具有复现的性状和疾病抗性的猪。并且，来自 NT 胎儿，包括转基因和/或嵌合胎儿的细胞和组织可用于治疗如下所述的与使用 CICM 细胞相关联的多种疾病的细胞、组织和器官移植。因此，转基因猪具有作为包括疾病、细胞和器官的异种移植和生产药用蛋白的模型的用途。

为产生 CICM 细胞和细胞系，在获得理想大小的 NT 单位之后，手工操作从区域中去除细胞，然后使用。此过程优选地通过以下步骤进行：取含有 NT 单位的细胞团，该 NT 单位典型地包含至少约 50 个细胞，洗涤这些细胞，并将细胞平板接种于饲养层上，例如扩散的成纤维细胞。典型地，用于获得干细胞或细胞集落的细胞可从培养的优选地有至少 50 个细胞大小的 NT 单位的最靠内部分得到。但是，较少或较大数目细胞的 NT 单位或来自 NT 单位的其它部分的细胞也可用于获得 ES 细胞和细胞集落。将细胞维持在适当的生长培养基，例如，补充以 10％FCS 和 0.1mM β-巯基乙醇(Sigma)和 L-谷氨酰胺的α-MEM 中的饲养层里。为了有利于生长每当需要时可更换培养基，例如大约每 2-3 天更换一次。

此培养方法导致 CICM 细胞或细胞系的形成。当需要时本领域技术人员可改变培养条件以利于特定的 CICM 细胞的生长。并且，可根据本发明产生遗传工程或转基因猪的 CICM 细胞。即，所说的方法可用于产生引入了一个或多个所需的 DNA 序列的 NT 单位，或者产生其中一个或多个内源 DNA 序列的全部或部分已去除或修饰的 NT 单位。然后那些遗传工程或转

基因 NT 单位可用于产生遗传工程或转基因 CICM 细胞包括人的细胞。

得到的 CICM 细胞和细胞，优选人的 CICM 细胞和细胞系，具有许多治疗上和诊断上的用途。其特别的是，这些 CICM 细胞可用于细胞移植治疗。人 CICM 细胞可用于许多疾病的治疗。人 NT 单位本身也可用于疾病的治疗。

考虑到这一点，已知小鼠的胚胎干(ES)细胞能分化成几乎任何细胞类型，例如造血干细胞。因此，根据本发明产生的猪的 CICM 细胞应具有相似的分化能力。本发明所述的 CICM 细胞可经诱导而分化，以根据已知方法得到所需的细胞类型。例如，通过在分化培养基中和在供细胞分化的条件下培养这些细胞，可诱导试验的猪 CICM 细胞分化成造血干细胞、神经细胞、肌肉细胞、心肌细胞、肝细胞、软骨细胞、上皮细胞、尿道细胞、神经细胞等。导致 CICM 细胞分化的培养基和方法为本领域所知，称为适当的培养条件。

例如，Palacios 等在美国国家科学院院报 92:7530-7537(1995)中教授了通过对干细胞进行如下诱导从胚细胞系中产生造血干细胞，该诱导方法包括：首先将这些细胞的聚集体培养在缺乏视黄酸的悬浮培养基中，然后再培养于含有视黄酸的相同培养基中，再将细胞聚集体转移到使细胞附着的基质上。

并且，Pedersen, J. Reprod.Fertil.Dev., 6:543-552(1994)是参考了大量文章的综述文章，所参考的文章公开了胚胎干细胞在体外分化产生多种分化的细胞类型包括造血干细胞、肌肉、心肌、神经细胞等的方法。

并且，Bain 等在生物学进展，168:342-357(1995)中教授了使胚胎干细胞在体外分化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从胚或干细胞中获得分化细胞的方法的范例。这些参考文献特别是其中所公开的涉及使胚胎干细胞分化的方法的内容在这里完全引用作为参考。

因此，使用已知的方法和培养基，本领域技术人员可培养本主题的 CICM 细胞，包括遗传工程或转基因的 CICM 细胞，以获得所需的分化细胞

类型，例如神经细胞、肌肉细胞、造血细胞等。

本主题的 CICM 细胞可用于获得任何所需的分化细胞类型。这些分化细胞的治疗用途是前所未有的。例如，造血干细胞可用在需要骨髓移植的医学治疗中。此方法可用来治疗多种疾病，例如晚期癌症如卵巢癌和白血病，及调和免疫系统的疾病如艾滋病。造血干细胞是可获得的，例如可通过将癌症或艾滋病病人的成熟体细胞如上皮细胞或淋巴细胞与去核的卵母细胞融合，获得如上所述的 CICM 细胞，并在利于分化的条件下培养该细胞，直至获得造血干细胞。这样的造血干细胞可用在包括癌症和艾滋病的疾病的治疗中。

选择性地，来自神经失调的病人的成年体细胞可与去核的卵母细胞融合，从中获得人的 CICM 细胞，并且将这些细胞培养在分化条件下以产生神经细胞系。通过移植这些人神经细胞治疗的特定疾病包括例如帕金森病、阿尔茨海默病、ALS 和大脑麻痹等。在帕金森病的特殊病例中，已表明移植的胎儿脑神经细胞与周围的细胞正常连接并产生多巴胺。这可长期逆转帕金森病的症状。

本发明的显著优点是提供了适合于移植的等基因或同基因的人的细胞的主要的无限的供应。因此，它将消除与现行的移植方法相关的重要问题即，由于宿主对移植物或移植对宿主的排斥造成的可能发生的移植组织的排斥。传统地，通过给予抗－排斥药物如环孢菌素来预防或降低排斥。然而，这些药物具有显著的不良副作用如免疫抑制、致癌性以及非常昂贵。本发明应消除，或者至少大大减少对抗排斥药物的要求。

其它可用等基因细胞治疗的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、心脏疾病、软骨置换、烧伤、足溃疡、胃肠疾病、血管疾病、肾脏疾病、尿道疾病和老龄相关疾病和病症。

此方法可用于置换缺陷基因，如，缺陷的免疫系统基因、囊性纤维化基因，或者导入到起治学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，可将编码脑源性生长因子的 DNA 序列导入人 CICM 细胞，这些细胞分化成神经细胞，并且将这些神经细胞移植

到帕金森病人以阻止疾病过程中神经细胞的丧失。

以前，用 BDNF 转染的细胞类型原代细胞系和固定细胞系是不同的，不是神经来源的就是非神经(成肌细胞和成纤维细胞)来源的细胞。例如，已采用逆转录病毒载体用 BDNF 基因转染星形胶质细胞，并将这些细胞移植进入帕金森病的大鼠模型中(Yoshimoto 等，脑研究，691:25－36,(1995))。

移植 32 天后，这种来自体内的治疗降低了大鼠的帕金森症状高达 45%。还有，将酪氨酸羟化酶基因置入星形胶质细胞有相似的结果(Lundberg 等，发育神经生物学，139:39－53(1996)及其中引入的参考)。

然而，这自来自体内的系统有问题。特别是，目前所用的逆转录病毒载体在体内下调并且转移的基因只是瞬时表达(Mulligan，的综述，科学，260:26－932(1993))。而且，这些研究中所用的原代细胞，星形胶质细胞有有限的生命期并且复制缓慢。这些特性不利地影响了转染的速度并且妨碍稳定转染的细胞的筛选。而且，繁殖大量的同源重组技术中所用的基因导向的原代细胞几乎是不可能的。相反，应用利用分化的细胞和 CICM 细胞的哺乳动物的克隆应消除与逆转录病毒系统有关的难道。

可引入本主题的 CICM 细胞的 DNA 序列包括，例如，那些编码表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、神经胶质衍生的神经营养性生长因子、胰岛素样的生长因子(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(白介素、干扰素、集落刺激因子、肿瘤坏死因子(α和β)等)、治疗用的酶等的 DNA 序列。

除了细胞、组织和器官移植中人的 NT 单位和 CICM 细胞的应用之外，本发明还包括人的疾病治疗中非人的细胞的应用。因此，任意种的 CICM 细胞、NT 胎儿和 NT 及嵌合后代(转基因的或非转基因的)可用于细胞、组织和器官移植是正当的人疾病的治疗。一般来说，根据本发明的 CICM 细胞、胎儿和后代可用于相同种(自体的、同基因的或同种异体移植)或者种与种(异种移植)之间。例如，来自牛 NT 胎儿的脑细胞可用于治疗帕金森病。

并且，本主题的 CICM 细胞也可用作分化，特别是与早期发育调节相

关的基因的研究的体外模型。并且，用本主题的 CICM 细胞分化出的细胞、组织和器官也可用于药物研究中。

并且，本主题的 CICM 细胞可用作产生其它 CICM 细胞和细胞集落的核供体。

为了更清楚地描述本发明，提供了下面的实施例。

实施例 1　　牛和猪胚胎和成体牛成纤维细胞的原代培养物的分离

牛和猪成纤维细胞的原代培养物从胎儿(牛受孕 45 天以及猪胎儿 35 天)获得。无菌去除头、肝脏、心脏和消化道，切碎胎儿并在预保温的胰蛋白酶 EDTA 溶液(0.05%胰蛋白酶/0.02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY)中于 37℃培养 30 分钟。将成纤维细胞接种于组织培养皿中并在含有 10%胎牛血清(FCS) (Hyclone, Logen, UT)、青霉素(100IU/ml)和链霉素(50μl/ml)的α－MEM 培养基(BioWhittaker, Walkersville, MD)中培养。成纤维细胞于 37℃湿润条件下在含 5%CO_2 的空气中培养并维持。细胞达到铺满时常规传代。

成体成纤维细胞从奶牛(约五岁龄)的肺和皮肤分离。切碎的肺组织于 10℃在胰蛋白酶 EDTA 溶液(0.05%胰蛋白酶/0.02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY)中培养过夜。第二天，组织和任何脱离的细胞于 37℃在预保温的胰蛋白酶 EDTA 溶液(0.05%胰蛋白酶/0.02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY)中培养 1 小时并且进行三次连续洗涤和胰蛋白酶培养(1 小时)。将成纤维细胞接种于组织培养皿中并在增补的α－MEM 培养基(BioWhittaker, Walkersville, MDC)中培养大约从胚盘期后发育至动物成年期的一段时间(牛受精后 12－15 天到 10 岁－15 岁的动物)。此方法也可用于从其他哺乳动物包括小鼠分离成纤维细胞。

将标记基因(外来的异源 DNA)导入胚胎及成体成纤维细胞。

对胚胎(牛和猪)和成体(牛)成纤维细胞进行下面的电穿孔操作。标准显微注射方法也可用于将异源 DNA 导入成纤维细胞，然而，由于操作更容易，所以本实施例中采用电穿孔操作。

将含有正在繁殖的成纤维细胞的培养板置于胰蛋白酶 EDTA 溶液(0.05%胰蛋白酶/0.02/EDTA; GIBCO, Grand Island, NY)中培养直至细

胞成为单个细胞悬浮液。在 500xg 下旋转沉淀细胞并用磷酸盐缓冲盐水(PBS)重新悬浮细胞使每毫升含 $5x10^6$ 个细胞。

报告基因构建体包含巨细胞病毒启动子和β－半乳糖苷酶、新霉素磷酸转移酶融合基因(β－GEO)。将报告基因和终浓度为 50μg/ml 的细胞加到电穿孔小室中。电穿孔脉冲之后，将成纤维细胞转移回到生长培养基(含有 10%胎牛血清(FCS) (Hyclone, Logen, UT)、青霉素(100IU/ml)、链霉素(50μl/ml)的α－MEM 培养基(BioWhittaker, Walkersville, MFD))中。

电穿孔之后，筛选贴壁的成纤维细胞用于报告基因的稳定整合。将 G418(400μg/ml)加入生长培养基中作用 15 天(范围: 3 天直到培养的细胞的生命期末)。这种药物杀死所有没有β－GEO 基因的细胞，原因是它们不表达 neo 抗性基在。在这段时间末期，出现稳定的转基因细胞的集落。每个集落互相之间独立地繁殖。用 X－gal 将转基因成纤维细胞染色以观察β－半乳糖苷酶的表达并且证实为阳性用于应用β－GEO 基因的 PCR 扩增的整合并且在琼脂糖凝胶上跑带。

在核移植方法中使用转基因成纤维细胞以创建 CICM 细胞系和转基因胎儿

将来源于牛胚胎成纤维细胞后个集落的一个细胞系(CL－1)用作核移植(NT)方法中的供体胞核。上面描述了 NT 的一般方法。

屠宰场卵母细胞在体外成熟。这些卵母细胞被剥去立细胞并且在成熟后约 18 到 20 小时(hpm)用倾斜的微量加液器去核。在 TL－HEPES 培养基加 Hoechst 33342(3μg/ml; Sigma)中证实去核。然后将单个供体细胞(成纤维细胞)置于受体卵母细胞的卵周隙中。应用电融合技术将牛卵母细胞细胞质与供体核(NT 单位)融合在一起。在 500μm 充满融合培养基的间隙小室中作用于 NT 单位的一次融合脉冲为 120V 15 秒。这发生在成熟后 24hpm。将 NT 单位置于 CR1aa 培养基中直到 26 到 27hpm。

上面已描述了用于人工活化卵母细胞的一般方法。NT 单位的活化在 26 和 27hpm 时开始。简言之，将 NT 单位暴露于含有 1mg/ml BSA 的 TL－HEPES 中的离子霉素(5μM; CalBiochem, La Jolla, CA)4 分钟并且用含有 30mg/ml BSA 的 TL－HEPES 洗 5 分钟。在离子霉素处理过程中，也将

NT 单位置于 2mM DMAP(Sigma)中。冲洗之后，将 NT 单位转移到含有 2mM DMAP(Sigma)的 CRlaa 培养基微滴中并且在 38.5℃、5%CO_2 下培养 4 到 5 小时。冲洗胚胎并且然后置于含有小鼠胚胎成纤维细胞融合饲养层的四孔培养板的 CRlaa 培养基加 10%FCS 和 6mg/ml BSA 中。在 38.5℃和 5%CO_2 条件下培养 NT 单位 3 天以上。每三天更换一次培养基直到活化后 5 到 8 天。此时胚细胞期 NT 胚胎可用于生产转基因 CICM(培养的内细胞团)细胞系或胎儿。可分离这些 NT 单位的内细胞团并种植在饲养层上。而且，将 NT 单位转移到受体雌性动物中。在受孕后 35－48 天中止妊娠。这产生所有检查的组织中具有β－GEO 基因的 7 个克隆的转基因胎儿。通过超声波观察检测到 7 个胎儿中有 6 个具有正常的心跳。而且，胎儿的组织切片未表现显著异常。此方法一般有助于基因导向 CICM 细胞系和胎儿。

下表总结了这些实验的结果。

供体细胞类型	n	卵裂(%)	胚细胞(%)	CICM 系* (%)	重新获得的转基因胎儿(%)	40 天后维续妊娠
CL－1 牛胎成纤维细胞(bGEO)	412	220(53%)	40(10%)	22(55%)	N/A	N/A
CL－1 牛胎成纤维细胞(bGEO)	3625	2127(59%)	46(9%)	N/A	7 胎儿+	8≠
来自 CL－1 NT 胚胎的 CICM 细胞系	709		5(0.7%)	N/A	0	0
成年牛成纤维细胞	215	119(55%)	20(9%)	N/A	N/A	N/A

* 19 个系是β－GEO 阳性，2 个阴性并且一个在 PCR 检测前死亡。

+ 妊娠 35 天的发育中，一个胎儿死亡，另一个发育轻度迟缓。妊娠 38－45 天重新获得的 5 个胎儿正常。所有胎儿证实为转基因的。

≠ 第一个后代生于 1997 年 10 月。

实施例 2 来源于转基因 CICM 细胞的嵌合胎儿和后代。转基因 CICM 细胞系最初来自转基因 NT 单位(分化细胞)。

来源于转基因 NT 胚胎(将 CL-1 细胞转移进入去核的卵母细胞)的 CICM 细胞系用来产生嵌合胚胎和胎儿。用 1-5mg/ml 链霉蛋白酶或 0.05% 胰蛋白酶/EDTA 结合机械解聚方法使转基因 CICM 细胞集落解聚，以便产生 5 个或更少的细胞团。通过用 30~100%胎牛血清多次冲洗细胞使胰蛋白酶或链霉蛋白酶活性失活。将这些解聚的细胞置于含有 TL-HEPES 培养基的显微操作板中。也将受精的胚胎置于这些板中并应用显微操作工具来产生嵌合胚胎。将 8 到 10 个转基因 CICM 细胞注射进入 8-16 个细胞期的受精胚胎中。体外培养这些胚胎到胚泡期并且随后移植进入受体动物中。

总共 6 个胚泡期嵌合胚胎非外科地移植进入两个受体雌性动物中。怀孕 5 周后，重新获得 3 个胎儿。这三个胎儿的几个组织包括性腺的生殖细胞(表示种系嵌合体)的筛选是通过对β-半乳糖苷酶片段的 PCR 扩增和扩增产物的 Southern 印迹杂交。这三个胎儿中，两个是来自转基因 CICM 细胞 contribution 阳性。这两个胎儿都有转基因 CICM contribution 性腺。

允许 10 个嵌合胚胎到足日，其中 7 个产下后代。作耳切迹并从每个小牛分离 DNA。PCR 扩增一，其中一个证实为转基因嵌合后代。

转基因 NT 胚胎来自转基因 CICM 细胞系。转基因 CICM 细胞系最初来自转基因 NT 单位(分化的细胞)

相同的转基因 CICM 细胞系用于产生 NT 胚胎。除了用作供体细胞与去核的卵母细胞融合的是 CICM 细胞而不是成纤维细胞之外，应用了实施例 1 是所描述的 NT 方法。用 1-5mg/ml 链霉蛋白酶或者 0.05%胰蛋白酶/EDTA 结合机械的解聚方法使转基因 CICM 细胞集落解聚以便产生 5 个或更少的细胞团。其将细胞移植进入去核卵母细胞之前，通过对细胞进行 30-100%胎牛血清的多次冲洗来使胰蛋白酶或链霉蛋白酶活性失活。表 1 中报道了结果(第三组)。产生了五个胚泡期胚胎。