



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 37 270 T2** 2008.01.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 015 572 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 37 270.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/00002**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 903 349.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/030683**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.01.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **16.07.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **07.03.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/00** (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

781752 10.01.1997 US

(73) Patentinhaber:

**University of Massachusetts, a Public Institution
of Higher Education of The Commonwealth of
Massachusetts, Amherst, Mass., US**

(74) Vertreter:

Westphal, Mussnug & Partner, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**STICE, Steven L., Athens, GA 30606, US; CIBELLI,
Jose, East Lansing, MI 48823, US; ROBL, James,
Brandon, SD 57005, US; GOLUEKE, Paul,
Poynette, WI 53955, US; PONCE DE LEON, F. Abel,
Amherst, MA 01002, US; JERRY, D. Joseph,
Shutesbury, MA 01702, US**

(54) Bezeichnung: **KERNTRANSFER MIT DIFFERENZIIERTEN FÖTALEN UND ADULTEN SPENDERZELLEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Klonierungsverfahren, in welchen Zellkerne, die von differenzierten fötalen oder erwachsenen, bovinen Zellen abgeleitet sind, in enukleierte bovine Oozyten transplantiert werden. Die Zellkerne werden umprogrammiert, um die Entwicklung von klonierten Embryos zu steuern, welche dann in Empfängerweibchen transferiert werden können, um Föten und Abkömmlinge zu erzeugen, oder werden verwendet, um kultivierte innere Zellmasse-Zellen (CICM) zu erzeugen. Die klonierten Embryos können auch mit fertilisierten Embryos vereinigt werden, um chimäre Embryos, Föten und/oder Abkömmlinge zu erzeugen.

2. Hintergrund der Erfindung

[0002] Verfahren zum Ableiten von embryonalen Stamm (ES)-Zelllinien in vitro aus frühen Präimplantationsmausembryonen sind weithin bekannt. (Siehe z.B. Evans et al., *Nature*, 29:154–156 (1981); Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 78:7634–7638 (1981)). ES Zellen können in einen undifferenzierten Zustand überführt werden, vorausgesetzt, dass eine Fütterschicht (Feeder layer) von Fibroblastzellen (Evans et al., *Id.*) oder eine Differenzierungsinhibierende Quelle (Smith et al., *Dev. Biol.*, 121:1–9 (1987)) vorhanden ist.

[0003] Es ist zuvor von ES Zellen berichtet worden, dass sie zahlreiche Anwendungen besitzen. Beispielsweise ist berichtet worden, dass ES Zellen als ein in vitro Modell für die Differenzierung verwendet werden kann, insbesondere für die Untersuchung von Genen, die in die Regulation der frühen Entwicklung eingebunden sind. Maus ES Zellen können zu Keimbahn-Chimären führen, wenn sie in Präimplantationsmausembryos eingeführt werden, wodurch ihre Pluripotenz demonstriert wird (Bradley et al., *Nature*, 309:255–256 (1984)).

[0004] Angesichts ihrer Fähigkeit, ihr Genom auf die nächste Generation zu übertragen, besitzen ES Zellen einen potentiellen Nutzen für Keimbahnmanipulation von Vieh durch Verwendung von ES Zellen mit oder ohne einer gewünschten genetischen Modifikation. Im Fall von Vieh, z.B. Huftiere, unterstützen außerdem Zellkerne aus ähnlichen Präimplantationsviehembryos die bestimmungsgemäße Entwicklung von enukleierten Oozyten, (Smith et al., *Biol. Reprod.*, 40:1027–1035 (1989); und Keefer et al., *Biol. Reprod.*, 50:935–939 (1994)). Dies ist im Gegensatz zu Zellkernen aus Mausembryos, welche jenseits der Acht-Zellphase nach dem Transfer die Entwicklung von enukleierten Oozyten Berichten zufolge nicht unterstützen (Cheong et al. *Biol. Reprod.*, 48:958 (1993)). Deshalb sind ES Zellen aus Vieh äußerst wünschenswert, da sie eine potentielle Quelle von totipotenten Donatorzellkernen, genetisch manipuliert oder anderweitig, für Kerntransferverfahren bereitstellen

[0005] Einige Forschungsgruppen haben von der Isolierung von, angeblich, pluripotenten embryonalen Zelllinien berichtet. Zum Beispiel berichtet Notarianni et al., *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 43:255–260 (1991) die Etablierung von, angeblich, stabilen, pluripotenten Zelllinien aus Schweine- und Schafblastozysten, welche einige morphologische und Wachstumseigenschaften zeigen, die ähnlich zu jenen von Zellen in primären Kulturen von inneren Zellmassen sind, welche immunchirurgisch aus Schafblastozysten isoliert wurden. Notarianni et al., *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 41:51–56 (1990) offenbart auch die Aufrechterhaltung und Differenzierung in Kulturen von mutmaßlichen pluripotenten embryonalen Zelllinien aus Schweineblastozysten. Gerfen et al., *Anim. Biotech*, 6(1):1–14 (1995) offenbart die Isolierung von embryonalen Zelllinien aus Schweineblastozysten. Diese Zellen werden in embryonalen Mausfibroblasten Fütterschichten ohne die Verwendung von konditioniertem Medium stabil aufrechterhalten, und differenzieren Berichten zufolge in mehrere unterschiedliche Zelltypen während der Kultur.

[0006] Weiters berichtet Saito et al., *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 201:134–141 (1992) von kultivierten, bovinen embryonalen Stamzellen-ähnlichen Zelllinien, die drei Durchgänge überleben, jedoch nach dem vierten Durchgang verloren gingen. Handyside et al., *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 196:185–190 (1987) offenbart das Kultivieren von immunchirurgisch isolierten inneren Zellmassen von Schafembryonen unter Bedingungen, die die Isolierung von Maus ES Zelllinien, die von Maus ICMs abgeleitet sind, ermöglichen. Handyside et al. berichten, dass unter solchen Bedingungen sich die Schaf-ICMs anheften, ausbreiten und Bereiche von sowohl ES Zell-ähnlichen als auch Endoderm-ähnlichen Zellen entwickeln, dass aber nach verlängerter Kultur nur Endoderm-ähnliche Zellen offensichtlich sind.

[0007] Vor kurzem berichtete Cherny et al., *Theriogenology*, 41:175 (1994) von angeblich pluripotenten bovinen primordialen Keimzellen-abgeleiteten Zelllinien, die in Langzeitkulturen geführt wurden. Diese Zellen erzeugten nach etwa sieben Tagen in Kultur ES-artige Kolonien, welche sich für alkalische Phosphatase (AP) positiv färbten, die Fähigkeit zeigten, embryoide Körper zu bilden, und spontan in zumindest zwei unterschied-

lichen Zellarten differenzierten. Diese Zellen exprimieren auch Berichten zufolge mRNA für die Transkriptionsfaktoren OCT4, OCT6 und HES1, ein Muster von Homöobox-Genen, von welchen angenommen wird, dass sie ausschließlich durch ES Zellen exprimiert werden.

[0008] Ebenfalls kürzlich berichteten Campbell et al., *Nature*, 380:64–68 (1996) die Herstellung von lebenden Lämmern im Anschluss an den Kerntransfer von kultivierten embryonalen Scheiben (ED) Zellen von neun Tage alten Schafembryos, die unter Bedingungen kultiviert wurden, welche die Isolation von ES Zelllinien in der Maus fördern. Die Autoren schlussfolgerten, dass ED Zellen von neun Tage alten Schafembryos durch Kerntransfer totipotent sind und dass die Totipotenz in der Kultur bewahrt wird.

[0009] Van Stekelenburg-Hamers et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 40:444–454 (1995) berichteten die Isolierung und Charakterisierung von angeblich permanenten Zelllinien aus Zellen der inneren Zellmasse von bovinen Blastozysten. Die Autoren isolierten und kultivierten ICMs von 8 oder 9 Tage alten bovinen Blastozysten unter unterschiedlichen Bedingungen, um zu bestimmen, welche Futterzellen und Kulturmedien am wirksamsten beim Unterstützen der Anheftung und des Überwuchs von bovinen ICM Zellen sind. Sie schlussfolgerten, dass die Anheftung und der Überwuchs von kultivierten ICM Zellen durch die Verwendung von STO (Mausfibroblasten) Futterzellen (anstelle von bovinen Uterus-Epithelzellen) und durch die Verwendung von mit Aktivkohle behandeltem Serum (anstelle von normalem Serum), um das Kulturmedium zu ergänzen, verstärkt wird. Van Stekelenburg et al. berichteten jedoch, dass ihre Zelllinien mehr Epithelzellen ähneln als pluripotenten ICM Zellen.

[0010] Smith et al., WO 94/24274, veröffentlicht am 27. Oktober 1994, Evans et al., WO 90/03432, veröffentlicht am 5. April 1990 und Wheeler et al., WO 94/26889, veröffentlicht am 24. November 1994 berichten die Isolierung, Selektion und Vermehrung von tierischen Stammzellen, welche angeblich verwendet werden können, um transgene Tiere zu erhalten. Evans et al berichteten ebenfalls die Ableitung von angeblich pluripotenten embryonalen Stammzellen von Schweine- und Rinderspezies, welche angeblich für die Herstellung von transgenen Tieren nützlich sind. Ferner offenbart Wheeler et al, WO 94/26884, veröffentlicht am 24. November 1994 embryonale Stammzellen, welche angeblich für die Herstellung von chimären und transgenen Huftieren nützlich sind.

[0011] Es ist somit basierend auf dem vorangehenden offensichtlich, dass viele Gruppen versucht haben, ES Zelllinien zu erzeugen, z.B. aufgrund ihrer potentiellen Anwendung bei der Herstellung von klonierten oder transgenen Embryos und in der Kerntransplantation.

[0012] Die Verwendung von Zellen der inneren Zellmasse (ICM) von Huftieren für die Kerntransplantation wurde ebenfalls berichtet. Zum Beispiel offenbaren Collas et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 38:264–267 (1994) die Kerntransplantation von bovinen ICMs durch Mikroinjektion der lysierten Donatorzellen in enukleierte, reife Oozyten. Collas et al. offenbarten das Kultivieren von Embryos in vitro für sieben Tage, um fünfzehn Blastozysten zu erzeugen, welche, nach dem Transfer in bovine Empfänger, zu vier Schwangerschaften und zwei Geburten führten. Auch Keefer et al., *Biol. Reprod.*, 50:935–939 (1994) offenbarte die Verwendung von bovinen ICM Zellen als Donatorzellkerne in Kerntransferverfahren, um Blastozysten zu erzeugen, welche, nach der Transplantation in bovine Empfänger, zu mehreren lebenden Abkömmlingen führten. Weiters offenbarten Sims et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6143–6147 (1993) die Herstellung von Kälbern durch den Transfer von Zellkernen aus kurzzeitig in vitro kultivierten bovinen ICM Zellen in enukleierte, reife Oozyten.

[0013] Die Herstellung von lebenden Lämmern im Anschluss an den Kerntransfer von kultivierten embryonalen Scheibenzellen wurde ebenfalls berichtet (Campbell et al., *Nature*, 380:64–68 (1996)). Noch weiters wurde die Verwendung von bovinen pluripotenten embryonalen Zellen beim Kerntransfer und die Herstellung von chimären Föten berichtet (Stice et al., *Biol. Reprod.*, 54:100–110 (1996); Collas et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 38:264–267 (1994)). Collas et al demonstrierten, dass Granulosa-Zellen (erwachsende Zellen) in einem bovinen Klonierungsverfahren verwendet werden könnten, um Embryos zu erzeugen. Es gab jedoch keinen Beweis für die Entwicklung von über die frühen embryonalen Phasen hinausgehenden Phasen (Blastozysten-Phase). Außerdem sind Granulosa-Zellen nicht leicht zu kultivieren und sind nur von Weibchen erhältlich. Collas et al versuchten nicht, die Granulosa-Zellen in Kultur zu vermehren oder bemühten sich nicht, diese Zellen genetisch zu modifizieren.

[0014] Während Multiplikationen von Genotypen unter Verwendung von embryonalen Zellen als Donatoren möglich sind, gibt es Probleme mit derzeitigen Verfahren. Beispielsweise kann die Embryoklonierung mittels derzeitigen Verfahren nur unter Verwendung einer beschränkten Anzahl von embryonalen Donatorzellkernen (weniger als 100) oder mit in vitro Zelllinien durchgeführt werden. Es ist unbekannt, ob das embryonale Genom einen höheren Genotyp kodiert, bis das klonierte Tier erwachsen ist.

[0015] Es existieren auch Probleme im Bereich des Herstellens von transgenen Tieren. Mittels derzeitigen Verfahren wird heterologe DNA in entweder frühe Embryonen oder embryonale Zelllinien eingeführt, die in verschiedene Zellarten in dem Fötus differenzieren und sich letztendlich in ein transgenes Tier entwickeln. Jedoch werden viele frühe Embryonen benötigt, um ein transgenes Tier herzustellen, und somit ist dieses Verfahren sehr ineffizient. Es gibt auch kein einfaches und effizientes Verfahren zum Selektieren für einen transgenen Embryo vor dem Durchmachen des Zeit- und Kostenaufwandes für das Einführen der Embryonen in ein Leihweibchen. Zusätzlich können Gene-Targeting-Techniken nicht leicht mit frühen Embryo transgenen Verfahren durchgeführt werden.

[0016] Embryonale Stammzellen in Mäusen haben ermöglicht, dass Forscher transgene Zellen selektieren und das Gene-Targeting ausführen. Dies ermöglicht eine weitere gentechnologische Bearbeitung als mit anderen transgenen Techniken möglich ist. Jedoch müssen embryonale Stammzelllinien und andere embryonale Zelllinien in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden, welcher Fütterschichten und/oder den Zusatz von Zytokinen zu den Medien benötigt. Sogar wenn diese Vorsichtsmaßnahmen befolgt werden, machen diese Zellen häufig eine spontane Differenzierung durch und können nicht verwendet werden, um transgene Abkömmlinge mittels derzeitig verfügbaren Verfahren herzustellen. Einige embryonale Zelllinien müssen auch in einer Art und Weise vermehrt werden, die für die Gene-Targeting-Verfahren nicht förderlich ist.

[0017] Ungeachtet dessen was zuvor in der Literatur beschrieben wurde, existiert deshalb ein Bedarf an verbesserten Verfahren zum Klonieren von Säugetierzellen.

Ziele und Zusammenfassung der Erfindung

[0018] Es ist ein Ziel der Erfindung, neuartige und verbesserte Verfahren für das Herstellen von klonierten bovinen Zellen bereitzustellen.

[0019] Es ist ein spezifischeres Ziel der Erfindung, ein neuartiges Verfahren zum Klonieren von bovinen Zellen bereitzustellen, welches die Transplantation des Zellkerns einer sich vermehrenden, differenzierten bovinen Zelle in eine enukleierte Oozyte derselben Spezies beinhaltet.

[0020] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, ein Verfahren zum Multiplizieren von erwachsenen, bovinen Säugetieren mit einer bestätigten genetischen Überlegenheit oder anderen wünschenswerten Charakterzügen bereitzustellen.

[0021] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, ein verbessertes Verfahren zum Herstellen von genetisch hergestellten oder transgenen bovinen Säugetieren (d.h. Embryos, Föten, Abkömmlinge) bereitzustellen.

[0022] Es ist ein spezielleres Ziel der Erfindung, ein Verfahren zum Herstellen von genetisch hergestellten oder transgenen bovinen Säugetieren bereitzustellen, durch welches ein gewünschtes Gen in eine differenzierte bovine Fibroblastenzelle oder Zellkern eingeführt, entfernt oder modifiziert wird, vor der Verwendung dieser bovinen Fibroblastenzelle oder dieses Zellkern für die Bildung einer NT Einheit.

[0023] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, genetisch hergestellte oder transgene bovine Säugetiere (d.h. Embryonen, Föten, Abkömmlinge), die durch Transplantation des Kernes einer sich vermehrenden, differenzierten, bovinen Fibroblastenzelle in eine enukleierte Oozyte derselben Spezies wie die differenzierte Zelle erhalten wird, bereitzustellen.

[0024] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, ein neuartiges Verfahren zum Herstellen von Säugetier CICM Zellen bereitzustellen, welches die Transplantation eines Zellkerns einer sich vermehrenden, differenzierten, bovinen Fibroblastenzelle in eine enukleierte Oozyte derselben Spezies wie die differenzierte Zelle einschließt.

[0025] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, CICM Zellen bereitzustellen, die durch Transplantation des Zellkerns einer sich vermehrenden, differenzierten, bovinen Fibroblastenzelle in eine enukleierte Oozyte derselben Spezies wie die differenzierte Zelle hergestellt sind.

[0026] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, solche CICM Zelle für die Therapie oder Diagnose zu verwenden.

[0027] Es ist ein spezifisches Ziel der Erfindung, solche CICM Zellen für die Behandlung oder Diagnose von irgendeiner Krankheit zu verwenden, bei welcher Zell-, Gewebe-, oder Organtransplantation therapeutisch oder diagnostisch vorteilhaft ist. Die CICM Zellen können innerhalb derselben Spezies oder in unterschiedli-

chen Spezies verwendet werden.

[0028] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, Gewebe, die von NT Embryonen, Föten oder Abkömmlingen abgeleitet sind, für die Behandlung oder Diagnose von irgendeiner Krankheit zu verwenden, wobei die Zell-, Gewebe- oder Organtransplantation therapeutisch oder diagnostisch nützlich ist. Die Gewebe können innerhalb derselben Spezies oder in unterschiedlichen Spezies verwendet werden.

[0029] Es ist ein anderes spezifisches Ziel der Erfindung, die CIM Zellen, die gemäß der Erfindung hergestellt sind, für die Herstellung von differenzierten Zellen, Geweben oder Organen zu verwenden.

[0030] Es ist ein anderes spezifisches Ziel der Erfindung, die gemäß der Erfindung hergestellten CIM Zellen in vitro zu verwenden, z.B. für die Untersuchung der Zelldifferenzierung und für Untersuchungszwecke, z.B. für Arzneimittelstudien.

[0031] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, die isogenen oder snygenen Zellen, Geweben oder Organen, die aus den gemäß der Erfindung hergestellten CIM Zellen hergestellt sind, in verbesserten Verfahren der Transplantationstherapie zu verwenden. Solche Therapien können beispielsweise die Behandlung von Krankheiten und Verletzungen, einschließlich Parkinson, Huntington, Alzheimer, ALS, Rückenmarkverletzungen, Multiple Sklerose, Dystrophia musculorum, Diabetes, Leberkrankheiten, Herzkrankheiten, Knorpelersatz, Verbrennungen, vaskuläre Krankheiten, Harnwegserkrankungen, sowie für die Behandlung von Immundefekten, Knochenmarktransplantationen, Krebs, neben anderen Krankheiten, umfassen.

[0032] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, um genetisch hergestellte oder transgene CIM Zellen bereitzustellen, die durch Einfügen, Entfernen oder Modifizieren eines gewünschten Gens in einer sich vermehrenden, differenzierten, bovine Fibroblastenzelle oder Zellkern hergestellt sind, vor der Verwendung von dieser differenzierten Zelle oder dieses Zellkerns für die Bildung einer NT Einheit.

[0033] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, die transgenen oder genetisch hergestellten CIM Zellen, die gemäß der Erfindung hergestellt sind, für die Gentherapie, insbesondere für die Behandlung und/oder Verhinderung der Krankheiten oder Verletzungen, die oben identifiziert sind, zu verwenden.

[0034] Es ist ein anderes Ziel der Erfindung, die CIM-Zellen, die gemäß der Erfindung hergestellt sind, oder transgenen oder genetisch hergestellten CIM Zellen, die gemäß der Erfindung hergestellt sind, als Kerndonatoren für die Kerntransplantation zu verwenden.

[0035] Somit bietet die vorliegende Erfindung in einem ersten Aspekt ein Verfahren zum Klonieren eines bovinen Säugetiers (z.B. Embryos, Föten, Abkömmlinge). Das Verfahren umfasst:

- (i) Einführen einer gewünschten, sich vermehrenden, differenzierten bovinen Fibroblastenzellen oder Zellkern in eine enukleierte bovine Oozyte, unter Bedingungen, die für die Bildung einer Kerntransfer (NT)-Einheit geeignet sind;
- (ii) Aktivieren der resultierenden Kerntransfereinheit;
- (iii) Kultivieren besagter aktivierten Kerntransfereinheit, bis sie größer ist als das 2-Zell-Entwicklungsstadium; und
- (iv) Überführen besagter kultivierter NT-Einheit in ein bovines Wirtssäugetier, sodass sich die NT Einheit in einen Fötus entwickelt.

[0036] Die Zellen, Gewebe und/oder Organe des Fötus werden vorteilhafterweise im Bereich von Zell-, Gewebe- und/oder Organtransplantation verwendet.

[0037] Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Verfahren zum Klonieren eines genetisch hergestellten oder transgenen bovinen Säugetiers, bei welchem ein gewünschtes Gen in die differenzierte, bovine Fibroblastenzelle oder Zellkern vor der Einführung der differenzierten Säugetierzelle oder Zellkern in die enukleierte Oozyte eingefügt, entfernt oder modifiziert wird.

[0038] Ebenfalls bereitgestellt durch die vorliegende Erfindung sind Säugetiere, die mittels des obigen Verfahrens erhalten werden, und Abkömmlinge von diesen Tieren.

[0039] In einem anderen Aspekt bietet die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen von bovinen CIM Zellen. Das Verfahren umfasst:

- (i) Einführen einer gewünschten, sich vermehrenden, differenzierten bovinen Fibroblastenzelle oder Zell-

kern in eine enukleierte bovine Oozyte, unter Bedingungen, die für die Bildung einer Kerntransfer (NT)-Einheit geeignet sind;
 (ii) Aktivieren der resultierenden Kerntransfereinheit;
 (iii) Kultivieren besagter aktivierten Kerntransfereinheit, bis sie größer ist als das 2-Zell-Entwicklungsstadium; und
 (iv) Kultivieren der Zellen, die aus besagter kultivierter NT-Einheit erhalten werden, um eine bovine CICM Zelllinie zu erhalten.

[0040] Die CICM Zellen werden vorteilhafterweise im Bereich der Zell-, Gewebe- und Organtransplantation verwendet.

[0041] Mit den vorangehenden und anderen Zielen, Vorteilen und Merkmalen der Erfindung, die nachstehend offensichtlich werden, kann die Art der Erfindung durch die Bezugnahme auf die folgende detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung und den beigefügten Ansprüchen deutlicher verstanden werden.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0042] Die vorliegende Erfindung bietet verbesserte Verfahren zum Klonieren von bovinen Säugetieren durch Kerntransfer oder Kerntransplantation. In der gegenständlichen Anmeldung werden Kerntransfer oder Kerntransplantation oder NT austauschbar verwendet.

[0043] Gemäß der Erfindung werden Zellkerne, die von sich vermehrenden, differenzierten fötalen oder erwachsenen, bovinen Fibroblastenzellen abgeleitet sind, in enukleierte Säugetieroozyten derselben Spezies wie der Donatorzellkern transplantiert. Die Zellkerne werden umprogrammiert, um die Entwicklung von klonierten Embryonen zu steuern, welche dann in Empfängerweibchen transferiert werden können, um Föten und Abkömmlinge zu erzeugen, oder verwendet werden, um CICM Zellen zu erzeugen. Die klonierten Embryos können auch mit fertilisierten nicht-menschlichen Embryos kombiniert werden, um chimäre Embryonen, Föten und/oder Abkömmlinge zu erzeugen.

[0044] Verfahren des Standes der Technik haben embryonale Zelltypen in Klonierungsverfahren verwendet. Dies umfasst die Arbeit von Campbell et al. (Nature, 380:64–68, 1996) und Stice et al (Biol. Reprod., 54:100–110, 1996). In beiden von diesen Studien wurden embryonale Zelllinien von Embryonen von weniger als 10 Tage Gestation abgeleitet. In beiden Studien wurden die Zellen auf einer Futterschicht aufrechterhalten, um eine offenkundige Differenzierung der Donatorzelle, die in dem Klonierungsverfahren verwendet wird, zu verhindern. Die vorliegende Erfindung verwendet differenzierte Zellen.

[0045] Es war unerwartet, dass klonierte Embryos mit differenzierten Donatorzellkernen sich zu fortgeschrittenen embryonalen und fötalen Stadien entwickeln können. Das wissenschaftliche Dogma war, dass nur embryonale oder undifferenzierte Zellarten diese Art von Entwicklung lenken können. Es war unerwartet, dass eine große Anzahl von klonierten Embryos aus diesen differenzierten Zelltypen erzeugt werden konnte. Ebenfalls unerwartet war die Tatsache, dass neue transgene embryonale Zelllinien leicht aus transgenen klonierten Embryos abgeleitet werden konnten.

[0046] Somit ist in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung die Multiplikation von höheren Genotypen von bovinen Säugetieren möglich. Dies wird die Multiplikation von erwachsenen Tieren mit bestätigter genetischer Überlegenheit oder anderen wünschenswerten Charakterzügen ermöglichen. Der Fortschritt wird beispielsweise in vielen wichtigen Huftierspezies beschleunigt. Mit der vorliegenden Erfindung gibt es möglicherweise Milliarden von fötalen oder erwachsenen Zellen, die geerntet und in dem Klonierungsverfahren verwendet werden können. Dies führt eventuell zu vielen identischen Abkömmlingen in einer kurzen Zeitperiode.

[0047] Die vorliegende Erfindung ermöglicht auch die Vereinfachung von transgenen Verfahren, indem mit einer differenzierten Zellquelle gearbeitet wird, die klonal vermehrt werden kann. Die eliminiert die Notwendigkeit, die Zellen in einem undifferenzierten Zustand aufrechtzuerhalten, somit können genetische Modifikationen, sowohl zufällige Integration als auch Gene-Targeting, leichter durchgeführt werden. Durch Kombinieren des Kerntransfers mit der Fähigkeit, diese Zellen in vitro auszuwählen und zu modifizieren, ist dieses Verfahren auch effizienter als frühere transgene Embryo-Techniken. Gemäß der vorliegenden Erfindung können diese Zellen ohne Zytokine, konditionierten Medien und/oder Futterschichten klonal vermehrt werden, was das transgene Verfahren weiters vereinfacht und erleichtert. Wenn transfizierte Zellen in Klonierungsverfahren gemäß der Erfindung verwendet werden, werden transgene Embryos erzeugt, welche sich in Föten und Abkömmlinge

entwickeln können. Diese transgenen klonierten Embryos können auch verwendet werden, um CICM Zelllinien oder andere embryonale Zelllinien zu erzeugen. Deshalb eliminiert die vorliegende Erfindung die Notwendigkeit, eine undifferenzierte Zelllinie in vitro abzuleiten und aufrechtzuerhalten, welche für genetische Herstellungstechniken förderlich ist.

[0048] Die vorliegende Erfindung kann auch verwendet werden, um CICM Zellen, Föten oder Abkömmlinge zu erzeugen, welche beispielsweise in Zell-, Gewebe- oder Organtransplantation verwendet werden können. Durch Entnehmen einer fötalen oder erwachsenen Zelle von einem Tier und Verwenden dieser in dem Klonierungsverfahren kann eine Vielzahl von Zellen, Geweben und eventuell Organe von klonierten Föten erhalten werden, da sie sich durch die Organogenese entwickeln. Zellen, Gewebe und Organe können auch aus klonierten Abkömmlingen isoliert werden. Dieser Vorgang kann eine Quelle von „Materialien“ für viele medizinische und tierärztliche Therapien, einschließlich Zell- und Gentherapie bereitstellen. Wenn die Zellen zurück in das Tier transferiert werden, von welchem die Zellen abgeleitet wurden, dann wird eine immunologische Abstoßung verhindert. Da viele Zelltypen von diesen Klonen isoliert werden können, können andere Methodologien wie hämatopoetischer Chimärismus verwendet werden, um eine immunologische Abstoßung unter Tieren derselben Spezies sowie zwischen Spezies zu verhindern.

[0049] Somit bietet die vorliegende Erfindung in einem Aspekt ein Verfahren zum Klonieren eines bovinen Säugetiers. Im Allgemeinen wird das bovine Säugetier durch einen Kerntransfervorgang erzeugt, welcher die folgenden Schritte umfasst:

- (i) Erhalten von gewünschten, sich vermehrenden, differenzierten bovinen Fibroblastzellen, die als eine Quelle von Donatorzellkernen zu verwenden sind;
- (ii) Erhalten von Oozyten aus einem Säugetier derselben Spezies wie die Zellen, welche die Quelle von Donatorkernen sind;
- (iii) Eukleieren besagter Oozyten;
- (iv) Transferieren der gewünschten, differenzierten Zelle oder Zellkern in die enukleierte Oozyte, z.B. durch Fusion oder Injektion, um NT Einheiten zu bilden;
- (iii) Aktivieren der resultierenden Kerntransfereinheit;
- (iv) Kultivieren besagter aktivierter Kerntransfereinheit, bis sie größer ist als das 2-Zell-Entwicklungsstadium; und
- (v) Überführen besagter kultivierter NT-Einheit in ein bovines Wirtssäugetier, sodass sich die NT Einheit in einen Fötus entwickelt.

[0050] Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Verfahren zum Klonieren eines genetisch hergestellten oder transgenen bovinen Säugetiers, bei welchem ein gewünschtes Gen in die differenzierte bovine Fibroblastenzelle oder Zellkern vor der Einführung der differenzierten Säugetierzelle oder des Zellkernes in die enukleierte Oozyte eingeführt, entfernt oder modifiziert wird.

[0051] Ebenfalls durch die vorliegende Erfindung vorgesehen, sind bovine Säugetiere, die gemäß dem obigen Verfahren erhalten wurden, und Abkömmlinge dieser Tiere.

[0052] Die vorliegende Erfindung bietet weiters die Verwendung von NT Föten und NT und chimären Abkömmlingen im Bereich der Zell-, Gewebe- und Organtransplantation.

[0053] In einem anderen Aspekt bietet die Erfindung ein Verfahren zum Herstellen von bovinen CICM Zellen. Das Verfahren umfasst:

- (i) Einführen einer gewünschten, sich vermehrenden, differenzierten bovinen Fibroblastenzelle oder Zellkern in eine enukleierte bovine Oozyte, unter Bedingungen, die für die Bildung einer Kerntransfer (NT)-Einheit geeignet sind;
- (ii) Aktivieren der resultierenden Kerntransfereinheit;
- (iii) Kultivieren besagter aktivierter Kerntransfereinheit, bis sie größer ist als das 2-Zell-Entwicklungsstadium; und
- (iv) Kultivieren der Zellen, die aus besagter kultivierter NT-Einheit erhalten werden, um bovine CICM Zellen zu erhalten.

[0054] Die CICM Zellen werden vorteilhafterweise im Bereich der Zell-, Gewebe und Organtransplantation verwendet, oder bei der Herstellung von Föten oder Abkömmlingen, einschließlich transgenen Föten oder Abkömmlingen.

[0055] Vorzugsweise werden die NT Einheiten auf eine Größe von zumindest 2 bis 400 Zellen, vorzugsweise

4 bis 128 Zellen, und am meisten bevorzugt auf eine Größe von zumindest etwa 50 Zellen kultiviert.

[0056] Kerntransfertechniken oder Kerntransplantationstechniken sind in der Literatur bekannt und sind in vielen der Literaturangaben, die im Hintergrund der Erfindung zitiert sind, beschrieben. Siehe insbesondere Campbell et al. *Theriogenology*, 43:181 (1995); Collas et al, *Mol. Report Dev.*, 38:264-267 (1994); Keefer et al, *Biol. Reprod.*, 50:935-939 (1994); Sims et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:6143-6147 (1993); WO 94/26884; WO 94/24274, und WO 90/03432, welche durch Bezugnahme zur Gänze hierin aufgenommen sind. U.S. Patent Nrn. 4.944.384 und 5.057.420 beschreiben auch Verfahren für die bovine Kerntransplantation.

[0057] Differenzierte Säugetierzellen sind jene Zellen, welche nach dem frühen embryonalen Stadium sind. Insbesondere sind die differenzierten Zellen zumindest jene, die nach dem embryonalen Scheibenstadium (Tag 10 der bovinen Embryogenese) sind. Die differenzierten Zellen können vom Ektoderm, Mesoderm oder Endoderm stammen.

[0058] Fibroblastenzellen können durch weithin bekannte Verfahren erhalten werden.

[0059] Fibroblastenzellen sind eine ideale Zellart, da sie aus sich entwickelnden Föten und erwachsenen Tieren in großen Mengen erhalten werden können. Fibroblastenzellen sind einigermaßen differenziert und wurden somit früher als eine schlechte Zellart betrachtet, um in Klonierungsverfahren verwendet zu werden. Wesentlich ist, dass diese Zellen leicht in vitro mit einer schnellen Verdoppelungszeit vermehrt werden können und für die Verwendung in Gene-Targeting-Verfahren klonal vermehrt werden können. Wiederum ist die vorliegende Erfindung neuartig, da differenzierte Zelltypen verwendet werden. Die vorliegende Erfindung ist vorteilhaft, da die Zellen leicht in vitro vermehrt, genetisch modifiziert und selektiert werden können.

[0060] Die Oozyten werden von Rindern erhalten.

[0061] Verfahren zum Isolieren von Oozyten sind im Stand der Technik bekannt. Im Wesentlichen wird dies das Isolieren von Oozyten aus den Eierstöcken oder Fortpflanzungsstrakt eines Rindes aufweisen. Eine leicht verfügbare Quelle von bovinen Oozyten ist Schlachthofmaterialien.

[0062] Für die erfolgreiche Verwendung von Techniken wie Gentechnik, Kerntransfer und Klonierung, müssen die Oozyten im Allgemeinen in vitro gereift werden, bevor diese Zellen als Empfängerzellen für Kerntransfer verwendet werden können, und bevor sie durch die Spermazelle fertilisiert werden kann, um sich in einen Embryo zu entwickeln. Dieser Vorgang erfordert im Allgemeinen das Sammeln von unreifen (Prophase I) Oozyten aus bovinen Eierstöcken, die von einem Schlachthof erhalten werden, und Reifen der Oozyten in einem Reifungsmedium, vor der Fertilisation oder Enukleierung bis die Oocyte das Metaphase II Stadium erreicht, welche im Fall von bovinen Oozyten im Allgemeinen nach etwa 18-24 Stunden post-Aspiration auftritt. Für Zwecke der vorliegenden Erfindung ist diese Zeitperiode als „Reifungsperiode“ bekannt. Wie hierin für Berechnungen von Zeitperioden verwendet, betrifft „Aspiration“ die Aspiration der unreifen Oocyte aus Eierstockfollikeln.

[0063] Zusätzlich wurden Metaphase II Phase Oozyten, welche in vivo gereift wurden, erfolgreich in Kerntransfertechniken verwendet. Im Wesentlichen werden reife Metaphase II Oozyten chirurgisch aus entweder nicht-superovulierten oder superovulierten Kühen oder Färsen 35 bis 48 Stunden dem Östrusbeginn oder nach der Injektion von humanem Choriongonadotropin (hCG) oder ähnlichem Hormon gesammelt.

[0064] Die Phase der Reifung der Oocyte bei der Enukleierung und dem Kerntransfer wurde als signifikant für den Erfolg der NT Verfahren berichtet. (Siehe z.B. Prather et al., *Differentiation*, 48, 1-8, 1991). Im Allgemeinen verwenden erfolgreiche Säugetierembryo-Klonierungspraktiken die Metaphase II Phase Oocyte als die Empfängerocyte, da angenommen wird, dass die Oocyte in dieser Phase „aktiviert“ sein kann oder ausreichend „aktiviert“ ist, um den eingeführten Kern zu behandeln, wie fertilisierendes Spermatozoon es tut. In Haustieren und insbesondere Kühen reicht die Oozyten-Aktivierungsperiode im Allgemeinen von etwa 16-52 Stunden, bevorzugt etwa 28-42 Stunden post Aspiration.

[0065] Beispielsweise können unreife Oozyten in HEPES gepuffertem Hamsterembryo-Kulturmedium (HECM), wie in Seshagine et al., *Biol. Reprod.*, 40, 544-606, 1989 beschrieben, gewaschen werden und dann in Tropfen von Reifungsmedium bestehend aus 50 Mikrolitern Gewebekulturmedium (TCM) 1999, welches 10% fötales Kalbserum enthält, welches geeignete Gonadotropine wie luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel stimulierendes Hormon (FSH), und Estradiol, unter einer Schicht von Leichtgewicht-Paraffin oder Silizium bei 39°C enthält eingebracht.

[0066] Nach einer festgelegten Reifungszeitperiode, welche im Bereich von etwa 10 bis 40 Stunden, und vorzugsweise von etwa 16–18 Stunden liegt, werden die Oozyten enukleiert. Vor der E nukleierung werden die Oozyten vorzugsweise entfernt und vor der Entfernung von Cumulus-Zellen in HECM platziert, welches 1 Milligramm pro Milliliter Hyaluronidase enthält. Die kann durch wiederholtes Pipettieren durch Pipetten mit sehr feinen Bohrungen oder durch kurzes Vortexen bewirkt werden. Die enthüllten Oozyten werden dann auf polare Körper gescreent und die ausgewählten Metaphase II Oozyten, wie durch die Gegenwart von polaren Körpern bestimmt, werden dann für den Kerntransfer verwendet. Die E nukleierung folgt.

[0067] Die E nukleierung kann durch bekannte Verfahren, wie im US Patent Nr. 4.994.384 beschrieben, welches durch Bezugnahme hierin aufgenommen ist, bewirkt werden. Beispielsweise werden Metaphase II Oozyten entweder in HECM, welches gegebenenfalls 7,5 Mikrogramm pro Milliliter Cytochalasin B enthält, für die umgehende E nukleierung platziert, oder können in ein geeignetes Medium, wie ein Embryo-Kulturmedium wie CR1aa plus 10% Östrus Kuhserum eingebracht und dann später enukleiert werden, vorzugsweise nicht später als 24 Stunden, und noch mehr bevorzugt nicht später als 16–18 Stunden.

[0068] E nukleierung kann mikrochirurgisch unter Verwendung einer Mikropipette erreicht werden, um den polaren Körper und das benachbarte Cytoplasma zu entfernen. Die Oozyten können dann gescreent werden, um jene zu identifizieren, die erfolgreich enukleiert wurden. Dieses Screenen kann durch Färben der Oozyten mit 1 Mikrogramm pro Milliliter 33342 Höchst Farbstoff in HECM und dann Betrachten der Oozyten unter Ultravioletbestrahlung für weniger als 10 Sekunden bewirkt werden. Die Oozyten, die erfolgreich enukleiert wurden, können dann in ein geeignetes Kulturmedium wie beispielsweise CR1aa plus 10% Serum eingebracht werden.

[0069] In der vorliegenden Erfindung werden die Empfängeroozyten vorzugsweise zu einer Zeit im Bereich von etwa 10 Stunden bis etwa 40 Stunden nach der Initiierung der in vitro Reifung, noch mehr bevorzugt von etwa 16 Stunden bis etwa 24 Stunden nach der Initiierung der in vitro Reifung, und am meisten bevorzugt etwa 16–18 Stunden nach der Initiierung der in vitro Reifung enukleiert.

[0070] Eine einzelne bovine Fibroblastenzelle wird dann in den perivitellinen Raum der enukleierten bovinen Oozyte, die verwendet wurde, um die NT Einheit zu erzeugen, transferiert. Die bovine Fibroblastenzelle und die enukleierte Oozyte werden verwendet, um NT Einheiten gemäß den im Stand der Technik bekannten Verfahren herzustellen. Beispielsweise können die Zellen durch Elektrofusion fusioniert werden. Elektrofusion wird durch Bereitstellen eines Elektrizitätspulses erreicht, der ausreichend ist, um eine vorübergehende Unterbrechung der Plasmamembran zu verursachen. Diese Unterbrechung der Plasmamembran ist sehr kurz, da sich die Membran schnell zurückbildet. Wenn zwei benachbarte Membranen induziert werden, um aufzubrechen, und bei der Zurückbildung vermischen sich die Lipid-Doppelschichten, wodurch schmale Kanäle zwischen den zwei Zellen geöffnet werden. Aufgrund der thermodynamischen Instabilität einer solchen kleinen Öffnung, dehnt sie sich aus, bis die zwei Zellen eine werden. Für eine weitere Diskussion dieses Vorgangs wird auf das U.S. Patent 4.997.384 an Prather et al., (durch Bezugnahme zur Gänze hierin aufgenommen) verwiesen. Eine Vielzahl von Elektrofusionsmedien können verwendet werden, einschließlich beispielsweise Saccharose, Mannitol, Sorbitol und Phosphat-gepufferte Lösung. Die Fusion kann auch unter Verwendung von Sendai-Virus als ein fusogenes Agens erreicht werden (Graham, Wister Inot. Symp. Monogr., 9, 19, 1969).

[0071] In einigen Fällen (z.B. mit kleinen Donatorzellkernen) kann es auch bevorzugt werden, den Zellkern direkt in die Oozyte zu injizieren, anstelle der Elektroporationsfusion zu verwenden. Solche Techniken sind in Collas und Barnes, Mol. Reprod. Dev., 38:264–267 (1994) offenbart, welche durch Bezugnahme zur Gänze hierin aufgenommen sind.

[0072] Vorzugsweise werden die bovine Fibroblastenzelle und Oozyte in einer 500 µm Kammer durch Anwendung eines elektrischen Pulses von 90–120V für etwa 15 µs, etwa 24 Stunden nach der Initiierung der Oozytenreifung elektrofusioniert. Nach der Fusion werden die resultierenden fusionierten NT Einheiten in ein geeignetes Medium bis zur Aktivierung, z.B. CR1aa Medium eingebracht. Üblicherweise wird die Aktivierung kurz danach durchgeführt, typischerweise weniger als 24 Stunden später, und vorzugsweise etwa 4–9 Stunden später.

[0073] Die NT Einheit kann durch bekannte Verfahren aktiviert werden. Zu solchen Verfahren zählt beispielsweise das Kultivieren der NT-Einheit bei subphysiologischer Temperatur, im Wesentlichen durch Anwenden eines kalten oder tatsächlich kalten Temperaturschockes auf die NT Einheit. Dies kann am bequemsten durch Kultivieren der NT Einheit bei Raumtemperatur, welche bezüglich der physiologischen Temperaturbedingungen, zu welchen die Embryos normalerweise ausgesetzt sind, kalt ist, durchgeführt.

[0074] Alternativ kann die Aktivierung durch Anwendung von bekannten Aktivierungsmitteln erreicht werden. Beispielsweise hat die Penetration von Oozyten durch Spermien während der Fertilisation gezeigt, Perfusions-oozyten zu aktivieren, um höhere Zahlen von lebenden Schwangerschaften und mehreren genetisch identischen Kälbern nach dem Kerntransfer zu ergeben. Behandlungen wie elektrischer und chemischer Schock können auch verwendet werden, um NT Embryos nach der Fusion zu aktivieren. Geeignete Oozytenaktivierungsverfahren sind der Gegenstand des U.S. Patents Nr. 5.496.720 an Susko-Parrish et al., welches hierin zur Gänze durch Bezugnahme aufgenommen ist.

[0075] Zusätzlich kann die Aktivierung bewirkt werden durch gleichzeitiges oder sequentielles:

- (i) Erhöhen der Konzentrationen von divalenten Kationen in der Oozyte; und
- (ii) Reduzieren der Phosphorylierung von zellulären Proteinen in der Oozyte.

[0076] Dies wird im Allgemeinen durch Einführen von divalenten Kationen in das Oozyten-Cytoplasma bewirkt, wie beispielsweise Magnesium, Strontium, Barium, oder Kalzium, z.B. in der Form eines Ionophors. Andere Verfahren zum Erhöhen der divalenten Kationenkonzentration umfassen die Verwendung von elektrischem Schock, Behandlung mit Ethanol und Behandlung mit eingesperren Chelatoren.

[0077] Die Phosphorylierung kann durch bekannte Verfahren, wie beispielsweise durch die Zugabe von Kinasen-Inhibitoren, z.B. Serin-Threonin-Inhibitoren wie 6-Dimethylaminopurin, Staurosporin, 2-Aminopurin und Sphingosin, reduziert werden.

[0078] Alternativ kann die Phosphorylierung von zellulären Proteinen durch Einführen einer Phosphatase in die Oozyte z.B. Phosphatase 2A und Phosphatase 2B inhibiert werden.

[0079] In einer Ausführungsform wird die NT Aktivierung durch kurzes Aussetzen der fusionierten NT Einheit zu einem TL-HEPES Medium, welches 5 μ M Ionomycin und 1 mg/ml BSA enthält, gefolgt von Waschen in TL-HEPES, welches 30 mg/ml BSA enthält, innerhalb etwa 24 Stunden nach der Fusion und vorzugsweise etwa 4 bis 9 Stunden nach der Fusion erreicht.

[0080] Die aktivierten NT Einheiten können dann in einem geeigneten in vitro Kulturmedium bis zur Erzeugung von CICM Zellen und Zellkolonien kultiviert werden. Für das Kultivieren und die Reifung von Embryos geeignete Kulturmedien sind im Stand der Technik bekannt. Beispiele von bekannten Medien, welche für die bovine Embryokultur und Aufrechterhaltung verwendet werden kann, umfasst Ham's F-10 + 10% fötales Kalbsserum (FCS), Gewebekulturmedium-199 (TCM-199) + 10% fötales Kalbsserum, Tyrodes-Albumin-Lactat-Pyruvat (TALP), Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), Egale's und Whitten's Medien. Eines der am häufigsten Medien, welches für die Sammlung und Reifung von Oozyten verwendet wird, ist TCM-199, und 1 bis 20% Serumergänzung, einschließlich fötales Kalbsserum, Serum von Neugeborenen, östrisches Kuhserum, Lammserum und Ochsen Serum. Ein bevorzugtes Aufrechterhaltungsmedium umfasst TCM-199 mit Earl-Salzen, 10% fötalem Kalbsserum, 0,2 mM Na-Pyruvat und 50 μ g/ml Gentamicinsulphat. Jedes der obigen kann auch die Co-Kultur mit einer Vielzahl von Zelltypen wie Granulosa-Zellen, Eileiter-Zellen, BRL Zellen und Gebärmutterzellen und STO Zellen einschließen.

[0081] Ein anderes Aufrechterhaltungsmedium ist im US Patent 5.096.822 an Rosenkrans, Jr. et al., welches hierin durch Bezugnahme aufgenommen ist, beschrieben. Dieses Embryomedium mit der Bezeichnung CR1 enthält die Ernährungstoffe, die notwendig sind, um einen Embryo zu unterstützen.

[0082] CR1 enthält Hemicalcium L-Lactat in Mengen im Bereich von 1,0 mM bis 10 mM, vorzugsweise 1,0 mM bis 5,0 mM. Hemicalcium L-Lactat ist L-Lactat mit einem Hemicalciumsalz, welches darin eingebaut ist. Hemicalcium L-Lactat ist insofern signifikant, als dass eine einzelne Komponente zwei Hauptanforderungen im Kulturmedium erfüllt: (i) die Calcium-Anforderung ist für die Verdichtung und Zytoskelettanordnung notwendig, und (ii) die Lactatanforderung ist für den Metabolismus und Elektronentransport notwendig. Hemicalcium L Lactat dient auch als wertvolles Mineral und Energiequelle für das Medium, welche für die Viabilität der Embryos notwendig sind.

[0083] Vorteilhafterweise enthält das CR1 Medium kein Serum wie fötales Kalbsserum, und erfordert nicht die Verwendung einer Co-Kultur von tierischen Zellen oder anderen biologischen Medien, d.h. Medien, die tierische Zellen wie Eileiterzellen aufweisen. Biologische Medien können manchmal nachteilig sein, und zwar insofern, als sie Mikroorganismen oder Spurenfaktoren enthalten können, die für die Embryonen schädlich sein können und welche schwierig zu detektieren, charakterisieren und eliminieren sind.

[0084] Beispiele der Hauptkomponenten in CR1 Medium umfassen Hemicalcium L-Lactat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumbicarbonat und geringe Mengen an Fettsäure-freiem Rinderserumalbumin (Sigma A-6003). Zusätzlich kann eine definierte Menge von essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren zu dem Medium hinzugefügt werden. CR1 mit Aminosäuren ist durch die Abkürzung „CR1aa“ bekannt.

[0085] CR1 Medium enthält vorzugsweise die folgenden Komponenten in den folgenden Mengen:

Natriumchlorid – 114,7 mM

Kaliumchlorid – 3,1 mM

Natriumbicarbonat – 26,2 mM

Hemicalcium L-Lactat – 5 mM

Fettsäure-freies BSA – 3 mg/ml

[0086] In einer Ausführungsform wird die aktivierte NT Embryoneneinheit in CR1aa Medium, welches 1,9 mM DMAP enthält, für etwa 4 Stunden platziert, gefolgt von einer Waschung in HECM und dann in CR1aa, welches BSA enthält, kultiviert.

[0087] Beispielsweise können die aktivierten NT Einheiten in CR1aa Kulturmedium, welches 2,0 mM DMAP (Sigma) enthält, überführt werden und dann unter Umgebungsbedingungen, z.B. etwa 38,8°C, 5% CO₂ für eine geeignete Zeit wie etwa 4 bis 5 Stunden kultiviert werden.

[0088] Danach werden die kultivierte(n) NT Einheit oder Einheiten vorzugsweise gewaschen und dann in ein geeignetes Medium, z. B. CR1aa Medium enthaltend 10% FCS und 6 mg/ml eingebracht, welches in Kammerplatten enthalten ist, welche vorzugsweise ein geeignete konfluente Futerschicht enthalten. Geeignete Futerschichten umfassen zum Beispiel Fibroblasten und Epithelzellen, beispielsweise Fibroblasten und Gebärmutterepithelzellen, die von Huftieren, Huhn-Fibroblasten, murine (z.B. Maus oder Ratten) Fibroblasten, STO und SI-m220 Fütterzelllinien, und BRL Zellen.

[0089] In einer Ausführungsform weisen die Futterzellen embryonale Mausfibroblasten auf. Die Zubereitung einer geeigneten Fibroblasten Futerschicht ist in dem folgenden Beispiel beschrieben und ist innerhalb des Könnens des Durchschnittsfachmanns.

[0090] Die NT Einheiten werden auf der Futerschicht kultiviert, bis die NT Einheiten eine Größe erreichen, die für den Transfer in ein Empfängerweibchen oder für das Erhalten von Zellen, welche verwendet werden können, um CICM Zellen oder Zellkolonien zu erzeugen, geeignet sind. Vorzugsweise werden diese NT Einheiten bis zumindest etwa 2 bis 400 Zellen, mehr bevorzugt etwa 4 bis 128 Zellen, und am meisten bevorzugt etwa 50 Zellen kultiviert. Das Kultivieren wird unter geeigneten Bedingungen durchgeführt, d.h. etwa 38,5°C und 5% CO₂, wobei das Kulturmedium typischerweise jeden 2–5 Tag, vorzugsweise etwa jeden 3 Tag ausgetauscht wird, um das Wachstum zu optimieren.

[0091] Die Verfahren für Embryotransfer und Empfängertier-Management in der vorliegenden Erfindung sind Standardverfahren, die in der Embryotransfer-Industrie verwendet werden. Synchrone Transfers sind für den Erfolg der vorliegenden Erfindung wichtig, d.h. die Phase des NT Embryos ist in Synchronie mit dem Östruszyklus des Empfängerweibchens. Dieser Vorteil und wie Empfänger gehalten werden müssen, sind in Siedel, G.E., Jr. („Critical review of embryo transfer procedures with cattle“ in Fertilization and Embryonic Development in Vitro (1981) L. Mastroianni, Jr. und J.D. Biggers, Hrsg., Plenum Press, New York, NY, Seite 323) besprochen, deren Inhalt durch Bezugnahme hierin aufgenommen ist.

[0092] Die vorliegende Erfindung kann auch verwendet werden, um genetisch hergestellte oder transgene bovine Säugetiere zu klonieren. Wie oben erklärt, ist die vorliegende Erfindung insofern vorteilhaft, als transgene Verfahren vereinfacht werden können, indem mit einer differenzierten Zellquelle gearbeitet wird, welche klonal vermehrt werden kann. Insbesondere haben die für Dantatorzellkerne verwendeten differenzierten Zellen ein gewünschtes Gen eingefügt, entfernt oder modifiziert. Diese genetisch veränderten, differenzierten Zellen werden dann für die Kerntransplantation mit enukleierten Oozyten verwendet.

[0093] Jedes bekannte Verfahren zum Einführen, Deletieren oder Modifizieren eines gewünschten Gens von einer Säugetierquelle kann für das Ändern der differenzierten bovinen Fibroblastenzelle verwendet werden, um als den Kerndonor verwendet zu werden. Diese Verfahren können das gesamte oder einen Teil eines Gens entfernen und das Gen kann heterolog sein. Eingeschlossen ist die Technik der homologen Rekombination, welche die Insertion, Deletion oder Modifikation eines Gens oder Gene an einer spezifischen Stelle oder Stellen in dem Zellgenom ermöglicht.

[0094] Die vorliegende Erfindung kann dann verwendet werden, um erwachsene Säugetiere mit gewünschten Genotypen bereitzustellen. Die Multiplikation von erwachsenen Rindern mit bestätigter genetischer Überlegenheit oder anderen gewünschten Merkmalen ist besonders nützlich, einschließlich transgener oder genetisch hergestellter Tiere und chimäre Tiere. Weiters können Zellen und Gewebe von dem NT Fötus, einschließlich transgene und/oder chimäre Föten, in Zell-, Gewebe- und Organtransplantation für die Behandlung von zahlreichen Krankheiten verwendet werden, wie später in Zusammenhang mit der Verwendung von CICM Zellen beschrieben ist.

[0095] Für die Herstellung von CICM Zellen und Zelllinien, nachdem NT Einheiten der gewünschten Größe erhalten wurden, werden die Zellen mechanisch von der Zone entfernt und werden dann verwendet. Dies wird vorzugsweise durch Entnahme des Klumpens von Zellen, welche die NT Einheit aufweisen, welche typischerweise zumindest etwa 50 Zellen enthalten, Waschen solcher Zellen und Ausplattieren der Zellen auf die Fütterschicht, z.B. bestrahlte Fibroblastzellen durchgeführt. Typischerweise werden die Zellen, die verwendet werden, um die Stammzellen oder Zellkolonien zu erhalten, aus dem innersten Teil der kultivierten NT Einheit erhalten, welche vorzugsweise zumindest eine Größe von 50 Zelle ausweist. NT Einheiten mit kleineren oder größeren Zellzahlen sowie Zellen aus anderen Teilen der NT Einheit können jedoch auch verwendet werden, um ES Zellen und Zellkolonien zu erhalten. Die Zellen werden in der Fütterschicht in einem geeigneten Wachstumsmedium, z.B. alpha MEM, welches mit 10% FCS und 0,1 mM β -Mercaptoethanol (Sigma) und L-Glutamin ergänzt ist, aufrechterhalten. Das Wachstumsmedium wird so oft wie notwendig getauscht, um das Wachstum zu optimieren, d.h. zirka jeden 2–3 Tag.

[0096] Dieser Kultivierungsvorgang führt zu der Bildung von CICM Zellen oder Zelllinien. Ein Fachmann kann die Kultivierungsbedingungen variieren, und zwar wie gewünscht, um das Wachstum der jeweiligen CICM Zellen zu optimieren. Ebenfalls können genetisch hergestellte oder transgene bovine CICM Zellen gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt werden. D.h. die oben beschriebenen Verfahren können verwendet werden, um NT Einheiten zu erzeugen, in welchen ein gewünschtes Gen oder Gene eingeführt wurde(n), oder aus welchen ein gesamtes oder ein Teil eines endogenen) Gens oder Gene entfernt oder modifiziert wurden. Jene genetisch hergestellten oder transgenen NT Einheiten können dann verwendet werden, um genetisch hergestellte oder transgene CICM Zellen zu erzeugen.

[0097] Die resultierenden CICM Zellen und Zelllinien weisen zahlreiche therapeutische und diagnostische Anwendungen auf. Am speziellsten können solche CICM Zellen für Zelltransplantationstherapien verwendet werden. CICM Zellen finden Anwendung in der Behandlung von zahlreichen Krankheitszuständen. NT Einheiten selbst können ebenfalls bei der Behandlung von Krankheitszuständen verwendet werden.

[0098] In dieser Hinsicht ist es bekannt, dass embryonale Mausstamm (ES) Zellen in der Lage sind, in beinahe alle Zellarten, z.B. hämatopoietische Stammzellen zu differenzieren. Deshalb sollten CICM Zellen, die gemäß der Erfindung erzeugt sind, ähnliche Differenzierungskapazität besitzen. Die CICM gemäß der Erfindung werden induziert, um zu differenzieren, um die gewünschten Zellarten gemäß bekannten Verfahren zu erhalten. Beispielsweise können die gegenständlichen CICM Zellen induziert werden, um in hämatopoietische Stammzellen, Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Leberzellen, Knorpelzellen, Epithelzellen, Harnwegzellen, etc. zu differenzieren, indem solche Zellen in Differenzierungsmedium und unter Bedingungen kultiviert werden, welche die Zelldifferenzierung bieten. Medium und Verfahren, welche zu der Differenzierung von CICM Zellen führen, sind im Stand der Technik, ebenso wie geeignete Kultivierungsbedingungen bekannt.

[0099] So lehrt beispielsweise Palacios et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7530–7537 (1995) die Herstellung von hämatopoietischen Stammzellen aus einer embryonalen Zelllinie durch Unterziehen der Stammzellen einer Induktionsprozedur, welche das anfängliche Kultivieren von Aggregaten solcher Zellen in einem Suspensionskulturmedium, welchem Retinolsäure fehlt, gefolgt von dem Kultivieren in dem gleichen Medium, welches Retinolsäure enthält, gefolgt von dem Transfer von Zellaggregaten zu einem Substrat, welches die Zellanheftung vorsieht, aufweist.

[0100] Außerdem ist Pedersen, J. Reprod. Fertil. Dev., 6:543-552 (1994) ein Überblicksartikel, welcher zahlreiche Artikel zitiert, die Verfahren für die in vitro Differenzierung von embryonalen Stammzellen offenbaren, um verschiedene differenzierte Zelltypen zu erzeugen, einschließlich hämatopoietischen Zellen, Muskel, Herzmuskel, Nervenzellen, und andere.

[0101] Weiters lehrt Bain et al., Dev. Biol., 168:342–357 (1995) die in vitro Differenzierung von embryonalen Stammzellen, um Nervenzellen zu erzeugen, welche neurale Eigenschaften besitzen. Diese Referenzen sind beispielhaft für die berichteten Verfahren zum Erhalten von differenzierten Zellen aus embryonalen oder

Stammzellen. Diese Referenzen und insbesondere die Offenbarungen darin, welche Verfahren für das Differenzieren embryonaler Stammzellen betreffen, sind zur Gänze hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

[0102] Somit kann ein Fachmann unter Verwendung bekannter Verfahren und Kulturmedium die gegenständlichen CICM Zellen, einschließlich von genetisch hergestellten oder transgenen CICM Zellen kultivieren, um gewünschte differenzierte Zellarten zu erhalten, wie beispielsweise Nervenzellen, Muskelzellen, hämatopoietische Zellen, etc.

[0103] Die gegenständlichen CICM Zellen können auch verwendet werden, um irgendeine gewünschte differenzierte Zellart zu erhalten. Therapeutische Verwendungen von solchen differenzierten Zellen sind beispielsweise. Beispielsweise können hämatopoietische Stammzellen bei medizinischen Behandlungen verwendet werden, die Knochenmarktransplantation erfordern. Solche Verfahren werden verwendet, um viele Krankheiten zu behandeln, wie zum Beispiel Krebs im späten Stadium wie Eierstockkrebs und Leukämie sowie Krankheiten, die das Immunsystem betreffen, wie AIDS. Hämatopoietische Stammzellen können erhalten werden, z.B. durch Fusionieren erwachsener somatischer Zellen eines Krebs- oder AIDS Patienten, z.B. Epithelzellen oder Lymphozyten mit einer enukleierten Oozyte, wodurch CICM Zellen wie oben beschrieben erhalten werden, und Kultivieren solcher Zellen unter Bedingungen, welche die Differenzierung begünstigen, bis hämatopoietische Stammzellen erhalten werden. Solche hämatopoietische Zellen können beim Behandeln von Krankheiten einschließlich Krebs und AIDS verwendet werden.

[0104] Alternativ können erwachsene somatische Zellen von einem Patienten mit einer neurologischen Störung mit einer enukleierten Oozyte fusioniert werden, wodurch CICM davon erhalten werden, und solche Zellen werden unter Differenzierungsbedingungen kultiviert, um neurale Zelllinien zu erzeugen. Zu spezifischen Krankheiten, die durch Transplantation von solchen menschlichen neuronalen Zellen behandelbar sind, zählen beispielsweise Parkinson Krankheit, Alzheimer Krankheit, ALS und Zerebralparese, und andere. Im spezifischen Fall der Parkinson-Krankheit wurde demonstriert, dass transplantierte fötale Hirnnervenzellen die richtige Verbindung mit umgebenden Zellen bilden und Dopamin erzeugen. Dies kann zu der Langzeitumkehr von Symptomen der Parkinsonkrankheit führen.

[0105] Der große Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass sie einen im Wesentlichen unbegrenzten Vorrat an isogenen oder syngenischen menschlichen Zellen bereitstellt, welche für die Transplantation geeignet sind. Sie wird deshalb die signifikanten Probleme, die mit derzeitigen Transplantationsverfahren assoziiert sind, umgehen, d.h. Abstoßung des transplantierten Gewebes, welche aufgrund von Wirt-vs-Transplantat- oder Transplantat-vs-Wirt-Abstoßung eintreten kann. Herkömmlich wird die Abstoßung durch die Verabreichung von Antiabstoßungsarzneimitteln wie Cyclosporin verhindert oder reduziert. Jedoch weisen solche Arzneimittel signifikante schädliche Nebenwirkungen auf, wie beispielsweise Immununterdrückung, krebserregende Eigenschaften, sowie die hohen Kosten. Die vorliegende Erfindung sollte die Notwendigkeit für Antiabstoßungsarzneimittel eliminieren oder zumindest stark reduzieren.

[0106] Andere Krankheiten und Zustände, die durch isogene Zelltherapie behandelbar sind, zählen beispielsweise Rückenmarkverletzungen, Multiple Sklerose, Muskeldystrophie, Diabetes, Leberkrankheiten, d.h. Hypercholesterolemie, Herzkrankheiten, Knorpelersatz, Verbrennungen, Fußgeschwür, gastrointestinale Krankheiten, Herzkrankheiten, Nierenkrankheiten, Harnwegserkrankungen, und altersbedingte Krankheiten und Bedingungen.

[0107] Diese Methodologie kann verwendet werden, um defekte Gene, wie z.B. defekte Immungensystemgene, cystische Fibrose-Gene zu ersetzen oder um Gene einzuführen, welche zu der Expression von therapeutisch nützlichen Proteinen wie Wachstumsfaktoren, Lymphokine, Cytokine, Enzyme etc. führen. Beispielsweise kann das Gen, welches einen vom Hirn-abgeleitenden Wachstumsfaktor kodiert, in menschliche CICM Zellen eingeführt werden, wobei die Zellen in Nervenzellen differenzieren und die Zellen werden in einen Parkinson-Patienten transplantiert, um den Verlust von Nervenzellen während einer derartigen Krankheit zu verzögern.

[0108] Zuvor variierten Zelltypen, die mit BDNF transfiziert sind, von Primärzellen zu immortalisierten Zelllinien, entweder neural- oder nicht-neural-(Myoblast und Fibroblast) abgeleitete Zellen. Beispielsweise wurden Astrozyten mit BDNF Gen unter Verwendung von retroviralen Vektoren transfiziert, und die Zellen in ein Rattenmodell der Parkinson-Krankheit eingepflanzt (Yoshimoto et al., Brain Research, 691:25-36, (1995)).

[0109] Diese ex vivo Therapie reduzierte parkinsonartige Symptome in den Ratten um bis zu 45% 32 Tage nach dem Transfer. Ferner wurde das Tyrosin-Hydroxylase-Gen in Astrozyten mit ähnlichen Ergebnissen ein-

gebracht (Lundberg et al., Develop. Neurol., 139:39–53 (1996) und darin zitierte Referenzen).

[0110] Jedoch weisen solche ex vivo Systeme Probleme auf. Insbesondere werden derzeit verwendete retrovirale Vektoren in vivo herunter reguliert und das Transgen wird nur vorübergehend exprimiert (Review von Mulligan, Science, 260:926–932 (1993)). Ferner verwendeten solche Studien Primärzellen, Astrozyten, welche eine begrenzte Lebensdauer aufweisen und langsam replizieren. Solche Eigenschaften beeinflussen die Rate der Transfektion nachteilig und erschweren die Selektion von stabil transfizierten Zellen. Außerdem ist es beinahe unmöglich, eine große Population von Gene-targeted Primärzellen, die in homologen Rekombinationstechniken verwendet werden sollen, zu vermehren. Im Gegensatz dazu sollten die Schwierigkeiten, die mit retroviralen Systemen assoziiert sind, durch die Verwendung von Säugetier CICM Zellen eliminiert werden.

[0111] Gene, welche in die gegenständliche CICM Zellen eingeführt werden können, umfassen beispielsweise epidermaler Wachstumsfaktor, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor, Glial-abgeleiteter neurotropher Wachstumsfaktor, Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (I und II), Neurotrophin-3, Neurotrophin-4/5, ziliärer neurotropher Faktor, AFT-1, Zytokin-Gene (Interleukine, Interferone, Kolonie-stimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren (Alpha und Beta), etc.), Gene, die therapeutische Enzyme etc. kodieren.

[0112] Zusätzlich zu der Verwendung von CICM Zellen in Zell-, Gewebe- und Organtransplantation umfasst die vorliegende Erfindung auch die Verwendung von bovinen Zellen in der Behandlung von menschlichen Krankheiten. Somit können CICM Zellen, NT Föten und NT und chimäre Abkömmlinge (transgen oder nicht-transgen) von bovinen Spezies in der Behandlung von menschlichen Krankheitszuständen verwendet werden, bei welchen Zell-, Gewebe oder Organtransplantation zugesichert ist. Im Allgemeinen können CICM Zellen, Föten und Abkömmlinge gemäß der vorliegenden Erfindung innerhalb derselben Spezies (autolog, syn-gen oder Allotransplantat) oder zwischen Spezies (Heterotransplantat) verwendet werden. Zum Beispiel können Hirnzellen aus bovinen NT Föten verwendet werden, um Parkinson-Krankheit behandeln.

[0113] Ferner können die gegenständlichen CICM Zellen als ein in vitro Differenzierungsmodell verwendet werden, insbesondere für die Untersuchung von Genen, die in die Regulation der frühen Entwicklung eingebunden sind. Außerdem können differenzierte Zellgewebe und Organe unter Verwendung der gegenständlichen CICM in Arzneimittelstudien verwendet werden.

[0114] Weiters können die gegenständlichen CICM Zellen als Kerndonatoren für die Herstellung von anderen CICM Zellen und Zellkolonien verwendet werden.

[0115] Um die vorliegende Erfindung deutlicher zu beschreiben, sind die folgenden Beispiele vorgesehen.

Beispiel 1

[0116] Isolierung von primären Kulturen von bovinen und Schweine embryonalen und erwachsenen bovinen Fibroblastzellen.

[0117] Primäre Kulturen von Rinder- und Schweinefibroblasten wurden von Föten (45 Tage Schwangerschaft für Rinder- und 35 Tage für Schweineföten) erhalten. Der Kopf, die Leber, das Herz und Verdauungskanal wurden aseptisch entfernt, die Föten zerkleinert und für 30 Minuten bei 37°C in vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/0,02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY) inkubiert. Fibroblastzellen wurden in Gewebekulturschalen ausplattiert und in Alpha-MEM, Medium (BioWhittaker, Walkersville, MD) ergänzt mit 10% fötalem Kalbsserum (FCS) (Hyclone, Logen, UT), Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (50 µl/ml) kultiviert. Die Fibroblasten wurden in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ in der Luft bei 37°C gezüchtet und gehalten.

[0118] Erwachsene Fibroblastenzellen wurden aus der Lunge einer Kuh (etwa 5 Jahre alt) isoliert. Zerkleinertes Lungengewebe wurde über Nacht bei 10°C in Trypsin EDTA Lösung (0,05% Trypsin/0,02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY) inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde Gewebe und alle gelösten Zellen für eine Stunde bei 37°C in vorgewärmter Trypsin-EDTA Lösung (0,05% Trypsin/0,02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY) inkubiert und durch drei aufeinander folgende Waschungen und Trypsin-Inkubationen (eine Stunde) verarbeitet. Fibroblastenzellen wurden in Gewebekulturschalen ausplattiert und in Alpha-MEM Medium (BioWhittaker, Walkersville, MD) ergänzt mit 10% fötalem Kalbsserum (FCS) (Hyclone, Logen, UT), Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) kultiviert. Die Fibroblastenzellen können praktisch zu jedem Zeitpunkt in der Entwicklung isoliert werden, und zwar im Bereich von etwa post embryonalem Scheibenstadium bis zum erwachsenen Leben des Tieres (Rind, Tag 12 bis 15 nach der Fertilisation bis 10 bis 15 Jahre alte Tiere). Dieses Verfahren kann auch benutzt werden, um Fibroblasten aus anderen Säugetieren einschließlich Mäusen zu isolieren.

- [0119]** Einführung eines Markergens (fremde heterologe DNA) in embryonale und erwachsene Fibroblastenzellen.
- [0120]** Die folgende Elektroporationsprozedur wurde für sowohl embryonale (Rinder und Schweine) und erwachsene (Rinder) Fibroblastenzellen ausgeführt. Standard-Mikroinjektionsprozedur kann auch verwendet werden, um heterologe DNA in Fibroblastenzellen einzuführen, jedoch wurde in diese Beispiel die Elektroporation verwendet, da sie eine einfachere Prozedur ist.
- [0121]** Kulturplatten, die sich vermehrende Fibroblastenzellen enthalten, wurden in Trypsin EDTA Lösung (0,05% Trypsin/0,02% EDTA; GIBCO, Grand Island, NY) inkubiert, bis die Zellen in einer Einzelzellsuspension waren. Die Zellen wurden bei 500 × g zentrifugiert und bei 5 Millionen Zellen pro ml mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert.
- [0122]** Das Reportergenkonstrukt enthielt den Cytomegalievirus-Promotor und die Beta-Galactosidase, Neomycin-Phosphotransferase-Fusionsgen (Beta-GEO). Das Reportergen und die Zellen bei 50 µg/ml Endkonzentration wurden zu der Elektroporationskammer hinzugefügt. Nach dem Elektroporationspuls wurden die Fibroblastzellen zurück in das Wachstumsmedium (Alpha-MEM Medium (BioWhittaker, Walkersville, MD) ergänzt mit 10% fötalem Kalbsserum (FCS) (Hyclone, Logen, UT), Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (50 µg/ml)) transferiert.
- [0123]** Der Tag nach der Elektroporation wurden angeheftete Fibroblastenzellen auf stabile Integration des Reportergens selektiert. G418 (400 µg/ml) wurde zu dem Wachstumsmedium für 15 Tage hinzugefügt (Bereich: 3 Tage bis zum Ende der Lebensdauer der kultivierten Zellen). Dieses Arzneimittel tötet jegliche Zellen ohne das Beta-GEO Gen, da sie das Neo-Resistenzgen nicht exprimieren. Am Ende dieser Zeit waren Kolonien von stabilen transgenen Zellen vorhanden. Jede Kolonie wurde unabhängig voneinander vermehrt. Transgene Fibroblastenzellen wurden mit X-gal gefärbt, um die Expression von Beta-Galactosidase zu beobachten und bestätigten positiv für Integration unter Verwendung der PCR Amplifikation des Beta-GEO Gens und auf einem Agarosegel laufen gelassen.
- [0124]** Verwendung von transgenen Fibroblastzellen in Kerntransferverfahren, um CICM Zelllinien und transgene Föten zu erzeugen.
- [0125]** Eine Linie von Zellen (CL-1), welche von einer Kolonie von bovinen embryonalen Fibroblastzellen abgeleitet ist, wurden als Donatorkerne in dem Kerntransfer (NT)-Verfahren verwendet. Allgemeine NT Verfahren sind später beschrieben.
- [0126]** Schlachthaus-Oozyten wurden in vitro gereift. Die Oozyten wurden von Cumulus-Zellen abgestreift und mit einer abgeschrägten Mikropipette nach etwa 18 bis 20 Stunden nach der Reifung (hpm) enukleiert. Die E nukleierung wurden in TL-HEPES Medium plus Hoechst 33342 (3 µg/ml; Sigma) bestätigt. Individuelle Donatorzellen (Fibroblasten) wurden dann in den perivitellinen Raum der Empfängeroozyte eingebracht. Das bovine Oozytencytoplasma und der Donatorkern (NT Einheit) wurden unter Verwendung der Elektrofusionstechnik zusammenfusioniert. Ein Fusionspuls, der aus 120 V für 15 µs bestand, wurde in einer 50 µm Lückenkamer auf die NT Einheit angewendet. Dies fand bei 24 hpm statt. Die NT Einheiten wurden in CR1aa Medium bis 26 bis 27 hpm eingebracht.
- [0127]** Das allgemeine verwendete Verfahren, um Oozyten künstlich zu aktivieren, wurde oben beschrieben. NT Einheit Aktivierung wurden zwischen 26 und 27 hpm initiiert. In Kürze, NT Einheiten wurden für vier Minuten Ionomycin (5 µM; CalBiochem, La Jolla, CA) in TL-HEPES ergänzt mit 1 mg/ml BSA ausgesetzt und dann für fünf Minuten in TL-HEPES ergänzt mit 30 mg/ml BSA gewaschen. Während der gesamten Ionomycin-Behandlung wurden die NT Einheiten auch zu 2 mM DMAP (Sigma) ausgesetzt. Im Anschluss an die Waschung wurden dann die NT Einheiten in einen Mikrotropfen von CR1aa Kulturmedium, welches 2 mM DMAP (Sigma) enthält, transferiert und bei 38,5°C, 5% CO₂ für vier bis fünf Stunden kultiviert. Die Embryos wurden gewaschen und dann in CR1aa Medium plus 10% FCS und 6mg/ml BSA in Vierkammerplatten, welche eine konfluente Futterschicht von embryonalen Mausfibroblasten enthalten, eingebracht. Die NT Einheiten wurden für drei weitere Tage bei 38,5°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle drei Tage, bis zum 5. bis B. Tag nach der Aktivierung ausgetauscht. Zu diesem Zeitpunkt können die NT Embryos in dem Blastozystenstadium verwendet werden, um transgene CICM (kultivierte innere Zellmasse) Zelllinien oder Föten zu erzeugen. Die innere Zellmasse dieser NT Einheiten kann isoliert und auf eine Futterschicht aufgebracht werden. Außerdem wurden die NT Einheiten in Empfängerweibchen transferiert. Die Schwangerschaften wurden nach 25 Tagen Gestation abgebrochen. Dies führte zu zwei klonierten transgenen Föten mit dem Beta-GEO Gen in allen über-

prüften Geweben. Folglich ist dies ein schnelles und einfaches Verfahren zum Herstellen von transgenen C1CM Zelllinien und Föten. Dieses Verfahren ist im Allgemeinen für Gene-targeted-C1CM Zelllinien und Föten nützlich.

[0128] Die Tabelle unten fasst die Ergebnisse dieser Experimente zusammen.

Donatorzelltyp	n	Teilung (%)	Blastozysten (%)	C1CM* Linien (%)	transgene Föten (%)
CL-1 bovine embryonale Fibroblasten (bGEO)	412	220(53)	40(10%)	22(55%)	
CL-1 bovine embryonale Fibroblasten (bGEO)	505		46(9%)		4 Föten †/ 16 Embryos (20%)
C1CM Zelllinie, die von CL-1 NT Embryos abgeleitet ist	709		5(0.7%)		

* 19 Linien waren für Beta-GEO positiv, 2 waren negativ und eine Linie starb vor der PCR Detektion

+ Ein Fötus war tot und ein anderer war in der Entwicklung nach 35 Tagen der Gestation etwa gehemmt. Zwei Föten, die bei Tag 38 gewonnen wurden, waren normal. Alle Föten waren bestätigt transgen.

Beispiel 2

[0129] Chimäre Föten, die von transgenen C1CM Zellen abgeleitet sind. Die transgene C1CM Zelllinie wurde ursprünglich von einer transgenen NT Einheit (differenzierte Zelle) abgeleitet.

[0130] Eine C1CM Zelllinie, die von transgenen NT Embryos abgeleitet ist (eine CL-1 Zelle, die in eine enukleierte Oozyte transferiert wurde) wurde verwendet, um chimäre Embryos und Föten zu erzeugen. Kolonien von transgenen C1CM Zellen wurden entweder mittels 1–5 mg/ml Pronase oder 0,05% Trypsin/EDTA kombiniert mit mechanischen Disaggregationsverfahren disaggregiert, so dass Klumpen von fünf oder weniger Zellen erzeugt wurden. Trypsin oder Pronase-Aktivität wurde durch Durchleiten der Zellen durch mehrere Waschungen von 30 bis 100% fötales Kalbsserum inaktiviert. Die disaggregierten Zellen wurden in Mikromanipulationsplatten, die TL-HEPES Medium enthalten, eingebracht. Fertilisierte Embryos wurden ebenfalls in diese Platten eingebracht und Mikromanipulationswerkzeuge wurden verwendet, um die chimären Embryos zu erzeugen. Acht bis zehn transgene C1CM Zellen wurden in 8–16 Zellphase-fertilisierte Embryos injiziert. Diese Embryos wurden in vitro zu dem Blastozystenstadium kultiviert und dann in Empfängertiere transferiert.

[0131] Insgesamt wurden 6 chimäre Embryos in dem Blastozystenstadium nicht-chirurgisch in zwei Empfängerweibchen transferiert. Nach fünf Wochen von Gestation wurden 3 Föten gewonnen. Mehrere Gewebe der drei Föten, einschließlich Keimzellen der Keimdrüse (was auf Keimlinien-Chimäre hinweist) wurden durch PCR Amplifikation und Southern Blot-Hybridisierung des amplifizierten Produkts zu einem Beta-Galactosidase Fragment gescreent. Von den drei Föten waren zwei für die Mitwirkung aus den transgenen C1CM Zellen positiv. Beide dieser Föten hatten einen transgenen C1CM Beitrag zu der Keimdrüse.

[0132] Transgene NT Embryos, die von transgenen C1CM Zelllinien abgeleitet sind. Die transgene C1CM Zelllinie wurde ursprünglich von einer transgenen NT Einheit (differenzierte Zelle) abgeleitet.

[0133] Dieselben transgenen C1CM Zelllinien wurden verwendet, um NT Embryos zu erzeugen. Die NT Prozeduren, die in Beispiel 1 beschrieben sind, wurden verwendet, mit Ausnahme, dass C1CM Zellen anstelle von Fibroblastenzellen als die Donatorzelle, die mit der enukleierten Oozyte fusioniert ist, verwendet wurden. Kolonien von transgenen C1CM Zellen wurden unter Verwendung von entweder 1–5 mg/ml Pronase oder 0,05% Trypsin/EDTA kombiniert mit mechanischen Disaggregationsverfahren disaggregiert, so dass Klumpen von fünf oder weniger Zellen erzeugt wurden. Trypsin oder Pronase-Aktivität wurde durch Durchleiten der Zellen durch mehrere Waschungen von 30 bis 100% fötales Kalbsserum inaktiviert, bevor die Zellen in enukleierte Oozyten transferiert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 (dritte Gruppe) dargestellt. Fünf Embryos in dem

Blastozystenstadium wurden erzeugt.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Klonieren eines bovinen Säugetiers, welches aufweist:
 - (i) Einführen einer gewünschten, sich vermehrenden, differenzierten bovinen Fibroblastenzellen oder Zellkern in einen enukleierten bovinen Oozyten, unter Bedingungen, die für die Bildung einer Kerntransfer (NT)-Einheit geeignet sind;
 - (ii) Aktivieren der resultierenden Kerntransfereinheit;
 - (iii) Kultivieren besagter aktivierten Kerntransfereinheit, bis sie größer ist als das 2-Zell-Entwicklungsstadium; und
 - (iv) Überführen besagter kultivierter NT-Einheit in ein bovinen Wirtssäugetier, sodass sich die NT Einheit in einen Fötus entwickelt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die gewünschte DNA in besagte differenzierte bovine Fibroblastenzellen oder besagten Zellkern eingeführt, entfernt oder modifiziert wird, was dadurch zu der Herstellung einer genetisch veränderten NT-Einheit führt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Mikroinjektion oder Elektroporation verwendet wird, um eine heterologe DNA einzuführen.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, wobei die differenzierte bovine Fibroblastenzelle oder Zellkern vom Mesoderm, Ektoderm oder Endoderm stammt.
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die differenzierte bovine Fibroblastenzelle oder Zellkern eine erwachsene Zelle oder Zellkern ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die differenzierte bovine Fibroblastenzelle oder Zellkern eine embryonale oder fötale Zelle oder Zellkern ist.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der enukleierte Oozyte vor der E nukleierung gereift wird.
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die fusionierte Kerntransfereinheit aktiviert wird, indem sie Ionomycin und 6-Dimethylaminopurin ausgesetzt wird.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, welches weiters das Kombinieren der klonierten NT-Einheit mit einem fertilisierten nicht-menschlichen Embryo aufweist, um ein chimäres Embryo zu erzeugen.
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, welches weiters das Entwickeln des Fötus zu einem Nachkommen ausweist.
11. Verfahren zum Erzeugen einer bovinen CICM [kultivierten inneren Zellmasse] Zelllinie, welches aufweist:
 - (i) Einführen einer gewünschten, sich vermehrenden, differenzierten bovinen Fibroblastenzelle oder Zellkern in einem enukleierten bovinen Oozyten, unter Bedingungen, die für die Bildung einer Kerntransfer (NT)-Einheit geeignet sind;
 - (ii) Aktivieren der resultierenden Kerntransfereinheit;
 - (iii) Kultivieren besagter aktivierten Kerntransfereinheit, bis sie größer ist als das 2-Zell-Entwicklungsstadium; und
 - (iv) Kultivieren der Zellen, die aus besagter kultivierter NT-Einheit erhalten werden, um eine bovine CICM Zelllinie zu erhalten.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die gewünschte DNA in besagte differenzierte bovine Fibroblastenzelle oder besagten Zellkern eingeführt, entfernt oder modifiziert wird, was dadurch zu der Herstellung einer genetisch veränderten NT-Einheit führt.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei die resultierende bovine CICM-Zelllinie zum Differenzieren angeregt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 oder 12, welches weiters das Kombinieren der klonierten NT-Einheit mit einem fertilisierten nicht-menschlichen Embryo aufweist, um eine Chimäre zu erzeugen.

15. Verfahren nach Anspruch 14, welches weiters das Entwickeln der chimären bovinen CICM Zelllinie in ein chimäres bovines Embryo aufweist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, welches weiters das Entwickeln des chimären Embryos in einen chimären Fötus aufweist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, welches weiters das Entwickeln des chimären Fötus in einen chimären bovinen Nachkommen ausweist.

18. Verfahren zum Klonieren eines bovines Säugetiers, welches aufweist:

1. Einführen einer gewünschten, sich vermehrenden, differenzierten bovines CICM Zelle oder Zellkern in einen enukleierten bovines Oozyten, unter Bedingungen, die für die Bildung einer Kerntransfer (NT)-Einheit geeignet sind;
2. Aktivieren der resultierenden Kerntransfereinheit;
3. Kultivieren besagter aktivierten Kerntransfereinheit, bis sie größer ist als das 2-Zell-Entwicklungsstadium; und
4. Überführen besagter kultivierter NT-Einheit in ein bovines Wirtssäugetier, sodass sich die NT Einheit in einen Fötus entwickelt.

19. Verfahren nach Anspruch 18, welches weiters das Entwickeln des Fötus in einen Nachkommen aufweist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen