

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/02

C12Q 1/68 C12N 5/00

C12N 15/00 A61K 38/00

A61K 31/70 C07K 1/00

C07K 14/00 C07K 17/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813712.9

[43] 公开日 2002 年 10 月 30 日

[11] 公开号 CN 1377424A

[22] 申请日 2000.9.6 [21] 申请号 00813712.9

[30] 优先权

[32] 1999.9.7 [33] US [31] 60/152,340

[32] 2000.2.1 [33] US [31] 60/179,486

[32] 2000.3.16 [33] US [31] 09/527,026

[32] 2000.4.5 [33] US [31] 09/520,879

[86] 国际申请 PCT/US00/24393 2000.9.6

[87] 国际公布 WO01/18236 英 2001.3.15

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.1

[71] 申请人 先进细胞技术公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 M·维斯特 R·L·兰扎

J·希柏利

[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 樊卫民

权利要求书 8 页 说明书 34 页 附图页数 8 页

[54] 发明名称 由衰老体细胞克隆的动物中的端粒恢复
和细胞寿命延长

[57] 摘要

本发明涉及复壮正常体细胞和生产与目的正常体细胞有相同基因型的不同类型正常体细胞的方法。这些细胞在细胞和组织移植中特别有用。也包括再克隆克隆动物的方法,特别是克隆动物的后代与其克隆亲代相比遗传改变(例如是“超年轻的”)的方法。这些动物应比其克隆亲代更健康并具有希望的特性。也包括激活内源端粒酶、EPC-1 活性和/或 ATL 途径和/或延长正常体细胞寿命的方法,以及与细胞增殖能力老化有关的其它基因。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种复壮原代细胞的方法, 包括:
 - a. 将原代细胞、原代细胞的核或原代细胞的染色体移植到受体卵母细胞或卵中, 以产生胚胎;
 - b. 使用该胚胎获得内细胞团、胚盘和/或干细胞;
 - c. 将内细胞团、胚盘和/或干细胞注射到无免疫应答的动物中, 形成畸胎瘤;
 - d. 分离得到的畸胎瘤;
 - e. 为了鉴定特异细胞型, 分离不同的胚层;
 - f. 分离与原代细胞相同类型的细胞。
2. 权利要求 1 的方法, 其中所述原代细胞是一种衰老细胞或接近衰老的细胞。
3. 权利要求 1 的方法, 其中从核移植畸胎瘤中分离的细胞含有与不是通过核移植技术产生的同龄对照畸胎瘤的细胞平均至少一样长的端粒。
4. 权利要求 3 的方法, 其中所述端粒平均长于不是通过核移植技术产生的同龄对照畸胎瘤的细胞。
5. 权利要求 2 的方法, 其中所述原代细胞是一种成纤维细胞。
6. 权利要求 1 的方法, 其中所述无免疫应答动物是 SCID 或裸鼠。
7. 权利要求 1 的方法, 其中所述原代细胞至少具有基因组上的一个改变。
8. 一种产生与不同细胞型的第一种细胞有相同基因型的原代细胞的方法, 包括:
 - a. 将第一种细胞的核移植到受体卵母细胞中, 以产生胚胎;
 - b. 使用该胚胎获得内细胞团、胚盘和/或干细胞;
 - c. 将内细胞团、胚盘和/或干细胞注射到无免疫应答的动物中, 形成畸胎瘤;
 - d. 分离得到的畸胎瘤;

- e. 为了鉴定特异细胞型, 分离不同的胚层;
- f. 分离与第一种细胞不同类型的细胞, 其中新原代细胞的端粒至少与不是通过核移植技术产生的畸胎瘤中同龄对照细胞的端粒一样长。
9. 权利要求 8 的方法, 其中所述第一种细胞是一种衰老细胞或接近衰老的细胞。
10. 权利要求 9 的方法, 其中所述第一种细胞是一种成纤维细胞。
11. 权利要求 8 的方法, 其中所述原代细胞是选自平滑肌、骨骼肌、心肌、皮肤和肾的类型。
12. 权利要求 8 的方法, 其进一步包括在生长因子的存在下培养不同类型的细胞, 以促进进一步的分化。
13. 权利要求 11 的方法, 其中用所述原代细胞产生组织 (用于向需要移植的患者中移植)。
14. 权利要求 8 的方法, 其中第一种细胞的基因组在核移植之前改变。
15. 通过权利要求 8 的方法分离的细胞。
16. 通过权利要求 13 的方法分离的组织。
17. 权利要求 7 的方法, 其中所述遗传改变包括至少一种异源基因的转染。
18. 权利要求 7 的方法, 其中所述遗传改变包括至少一种天然基因的破坏。
19. 权利要求 14 的方法, 其中所述遗传改变包括至少一种异源基因的转染。
20. 权利要求 14 的方法, 其中所述遗传改变包括至少一种天然基因的破坏。
21. 一种对原代细胞进行复合遗传操作的方法, 包括在遗传操作之间利用向受体卵母细胞中核移植复壮该原代细胞, 其中在核移植之前将该细胞传代为衰老或接近衰老的状态。
22. 一种对原代细胞进行复合遗传操作的方法, 包括在遗传操作之间利用向受体卵母细胞中核移植复壮该原代细胞, 其中在核移植之前将

该细胞诱导为衰老样或接近衰老样状态。

23. 权利要求 21 的方法，复壮由此产生含有的端粒平均与同龄对照胚胎细胞一样长的胚胎细胞。

24. 根据权利要求 21 的方法遗传改变的一种原代细胞。

25. 一种生产与权利要求 24 的细胞有相同基因型的遗传改变的动物的方法，包括：

- a. 将所述细胞的核移植到受体卵母细胞中，
- b. 用该具核卵母细胞产生胚胎或胚胎干细胞，
- c. 将胚胎或胚胎干细胞导入雌性受体中，和
- d. 使胚胎或胚胎干细胞完全发育，使得雌性分娩与原代细胞有相同基因型的新生动物。

26. 通过权利要求 25 的方法产生的遗传改变的动物，该动物含有平均至少与同龄对照动物一样长的端粒。

27. 一种用核移植技术再克隆一种克隆动物的方法，其中用来供应再克隆的核的供体细胞是一种衰老或接近衰老的细胞。

28. 权利要求 25 的方法，其中再克隆的动物与克隆动物相比遗传改变。

29. 一种生产至少含有两种遗传修饰的再克隆的内细胞团、胚胎、畸胎瘤、胚、胎或动物的方法，包括：

- a. 从目的动物中获得原代细胞，
- b. 通过插入异源 DNA 和/或缺失天然 DNA 对原代细胞进行第一次遗传修饰，
- c. 使遗传修饰的原代细胞增殖为衰老或接近衰老，
- d. 使用第一次遗传修饰的衰老或接近衰老的细胞作为核供体，用于向去核卵母细胞或去核受精卵中核移植，
- e. 获得具有第一种遗传修饰的克隆内细胞团、胚胎、畸胎瘤、胚、胎或动物，
- f. 由克隆的内细胞团、胚胎、畸胎瘤、胚、胎或动物获得克隆的原代细胞，

g. 通过插入异源 DNA 和/或缺失天然 DNA 对克隆的原代细胞进行第二次遗传修饰,

h. 使第二次克隆的原代细胞增殖直到衰老或接近衰老,

i. 使用具有第一次和第二次遗传修饰的衰老或接近衰老的克隆原代细胞作为核供体, 用于向去核卵母细胞或去核受精卵中核移植, 和

j. 获得具有第一次和第二次遗传修饰的再克隆的内细胞团、胚泡、畸胎瘤、胚、胎或动物。

30. 权利要求 29 的方法, 其进一步包括将再克隆的内细胞团、胚泡、畸胎瘤、胚、胎或动物再克隆的步骤, 其中进行第三次遗传修饰, 使得再克隆具有第一次、第二次和第三次的遗传修饰。

31. 权利要求 30 的方法, 其中通过核移植技术用衰老或接近衰老的供体细胞产生再克隆。

32. 权利要求 29 的方法, 其中所述再克隆含有至少与不是用核移植技术产生的同龄对照动物平均一样长的端粒。

33. 权利要求 31 的方法, 其中所述再克隆含有至少与不是用核移植技术产生的同龄对照动物平均一样长的端粒。

34. 权利要求 29 的方法, 其中遗传修饰涉及负责免疫功能的基因。

35. 权利要求 29 的方法, 其中目的动物是一种有蹄动物。

36. 权利要求 35 的方法, 其中目的动物是牛。

37. 一种复原衰老、关卡停滞或接近衰老的细胞寿命的方法, 包括将该细胞的核移植到受体卵母细胞中。

38. 权利要求 37 的方法, 其中受体卵母细胞与衰老或接近衰老的细胞是不同种的。

39. 权利要求 37 的方法, 其进一步包括由所述具核卵母细胞产生胚胎或胚胎干细胞。

40. 一种鉴定至少一种可直接或间接提高端粒酶活性的基因的方法, 包括针对可提高衰老或接近衰老细胞中端粒酶活性的成员, 筛查由胚胎或胚胎干细胞产生的 cDNA 或 mRNA 文库。

41. 权利要求 40 的方法, 通过测定增强的端粒酶报道基因表达测定

端粒酶活性的提高。

42. 权利要求 41 的方法，其中构建所述端粒酶报道基因，使之含有与一种报道基因融合的 hTRT 基因。

43. 权利要求 42 的方法，其中该构建体含有基因融合。

44. 权利要求 42 的方法，其中该构建体含有蛋白质融合。

45. 权利要求 40 的方法，通过 TRAPeze 试验测定提高的端粒酶活性。

46. 权利要求 40 的方法，在文库筛查之前，使所述 cDNA 或 mRNA 文库与来自衰老细胞的 cDNA 或 mRNA 文库进行扣除杂交。

47. 一种鉴定至少一种可直接或间接抑制端粒酶活性的基因的方法，包括针对可抑制胚胎干细胞中端粒酶活性的成员，筛查由衰老或接近衰老的细胞产生的 cDNA 或 mRNA 文库。

48. 权利要求 47 的方法，通过测定降低的端粒酶报道基因表达测定端粒酶活性的降低。

49. 权利要求 47 的方法，其中构建所述端粒酶报道基因，使之含有与一种报道基因融合的 hTRT 基因。

50. 权利要求 49 的方法，其中该构建体含有基因融合。

51. 权利要求 49 的方法，其中该构建体含有蛋白质融合。

52. 权利要求 47 的方法，端粒酶活性通过蛋白质相互作用降低，端粒酶活性的降低通过 TRAPeze 试验测定。

53. 权利要求 47 的方法，在文库筛查之前，使所述 cDNA 或 mRNA 文库与来自胚胎干细胞的 cDNA 或 mRNA 文库进行扣除杂交。

54. 一种鉴定可提高 EPC-1 和/或端粒酶活性的蛋白质的方法，包括：

a. 收集卵母细胞细胞质的级分，

b. 将其加入为衰老或接近衰老的细胞设计的无细胞系统中，和

c. 测定由于接触特异卵母细胞细胞质级分引起的端粒酶和/或 EPC-1 活性改变。

55. 一种通过权利要求 40 的方法鉴定的基因。

56. 一种通过权利要求 47 的方法鉴定的基因。

57. 一种通过权利要求 54 的方法鉴定的蛋白质。
58. 一种筛选可抑制端粒酶和/或 EPC-1 活性的化合物的方法，包括使通过核移植技术用衰老或接近衰老的供体细胞产生的胚胎干细胞接触一种化合物，以确定该化合物是否抑制端粒酶和/或 EPC-1 活性。
59. 一种通过权利要求 58 的方法鉴定的化合物。
60. 一种含有权利要求 55 的基因，或其部分或转录产物的药用组合物，目的在于提高需要提高活性的患者的端粒酶活性。
61. 一种含有权利要求 55 的基因编码的基因产物的药用组合物，目的在于提高需要提高活性的患者的端粒酶活性。
62. 一种含有权利要求 56 的基因，或其部分或转录产物的药用组合物，目的在于抑制需要抑制活性的患者的端粒酶活性。
63. 一种含有权利要求 56 的基因编码的基因产物的药用组合物，目的在于抑制需要抑制活性的患者的端粒酶活性。
64. 一种含有权利要求 58 的蛋白质的药用组合物，目的在于提高需要提高活性的患者的端粒酶活性。
65. 一种编码权利要求 58 的蛋白质的基因。
66. 一种含有权利要求 65 的基因的药用组合物，目的在于提高需要提高活性的患者的端粒酶活性。
67. 一种含有权利要求 59 的化合物的药用组合物，目的在于抑制需要降低活性的患者的端粒酶活性。
68. 一种为了延长原代细胞的寿命激活内源端粒酶和/或 EPC-1 的方法。
69. 一种具有复壮的增殖能力的细胞，它是通过使具有体细胞寿命的细胞或其 DNA 接触生殖细胞或胚胎细胞或其分级分离的化合物产生的。
70. 权利要求 69 的细胞，其中该细胞相对于年龄相当的同型同种体细胞具有提高的 EPC-1 活性和/或延长的端粒。
71. 权利要求 69 的细胞，其选自：人、牛、马、犬、猫、猪、小鼠、大鼠、山羊、绵羊、豚鼠、熊、兔。

72. 权利要求 69 的细胞，它是一种人类细胞。

73. 含有根据权利要求 60 的细胞产生的延长端粒的 DNA。

74. 权利要求 73 的 DNA，它来源于人体细胞。

75. 一种产生具有复壮的增殖能力的细胞的方法，方法是使属于体细胞系的细胞或其 DNA 接触卵、卵母细胞、胚胎细胞或从中分级分离的组分。

76. 权利要求 75 的方法，其中所述体细胞是衰老的、接近衰老的或关卡停滞的。

77. 权利要求 75 的方法，其中所述体细胞是一种人类细胞。

78. 权利要求 77 的方法，其中所述体细胞从患有衰老相关病症或与细胞更新增加有关的病症的人体中获得。

79. 权利要求 78 的方法，其中所述病症选自：AIDS、肌营养不良、神经变性疾病、高血压、免疫缺陷、骨关节炎和糖尿病。

80. 通过核移植产生的克隆非人类胚胎、动物细胞或非人类动物，其中供体细胞或核是一种衰老细胞或关卡停滞的细胞。

81. 一种改进的核移植方法，它可产生与年龄相当的对照相比端粒延长和/或 EPC-1 活性提高，和/或端粒酶活性提高，和/或增殖能力增强或寿命延长的非人类胚胎或动物或人类或非人类细胞，其中这种改进包括使用一种衰老、接近衰老、关卡停滞的供体细胞或 DNA 作为供体细胞或 DNA。

82. 一种鉴定可影响细胞老化或衰老的化合物的方法，包括：

(i) 产生一种 EPC-1 基因或 EPC-1 调节序列转染的细胞；和

(ii) 鉴定“开启”该调节序列的化合物。

83. 权利要求 82 的方法，其中所述 EPC-1 调节序列或基因与一种 DNA 有效连接，其表达是可检测的。

84. 一种真核细胞，它被与标记 DNA 有效连接的 EPC-1 基因或相关调节序列转染。

85. 一种真核细胞，它被与组成型或可调节强启动子有效连接的 EPC-1 基因转染。

86. 权利要求 85 的细胞，其中所述 EPC-1 基因与 CMV、PGK 或其它非 EPC-1 调节序列有效连接。

说明书

由衰老体细胞克隆的动物中的端粒恢复和细胞寿命延长

相关申请书的交叉引用

本申请书是美国系列号 09/527, 026 和 09/520, 879 的部分继续申请, 并要求临时申请 60/152, 340 和 60/153, 233 的权利。

发明领域

本发明涉及通过核移植技术复壮衰老、关卡停滞 (checkpoint arrested)、接近衰老或具有不希望的短细胞寿命的正常或修饰体细胞或细胞 DNA 的方法。这些方法特别可用于复壮由于复杂遗传操作后的克隆扩充或慢性组织损伤已经达到衰老或接近衰老的细胞, 从而提高这些细胞作为供体用于生产克隆转基因动物或用于人类细胞治疗的能力。

本发明也可用于复壮由于逐渐变老或由于与加重的细胞衰老有关的病症 (如肌营养不良或动脉粥样硬化、免疫衰老、BPH、神经变性疾病、巴雷特食道硬化、AMD 骨关节炎和皮肤溃疡) 而衰老或老化的细胞。通过核移植或有关技术可重新编程或恢复患者或动物的细胞, 使其再生并恢复为全能性。这些全能细胞可用于生产以下细胞型, 包括但不限于: 多能性细胞, 如间质或前间质干细胞、造血细胞、血管细胞等, 它们能移植到患者或动物或合适的供体中。这些细胞将在患者或动物组织中“播种”多种类型的健康可增殖细胞, 包括骨、血液、肌肉、神经元、免疫细胞和其它类型。

本发明的方法也包括由复壮的细胞和畸胎瘤产生分化的细胞, 该畸胎瘤含有来自任一个或全部三个胚层的细胞, 并可用于制备与目的原代细胞有相同基因型的不同类型的原代细胞。这些新产生的原代细胞在组织工程和器官移植治疗领域具有重要意义。也包括再克隆克隆的哺乳动物的方法, 特别是与克隆亲代相比, 克隆哺乳动物的后代遗传学改变的方法。

本发明也涉及鉴定可调节细胞老化和衰老的化合物和与之相关的基因的试验，特别是可影响端粒长度、EPC-I 活性、tPA、胶原酶活性、gas 基因、有丝分裂指数和细胞老化和增殖能力的其它指标的化合物。

发明背景

过去十年来的特征在于克隆科学的显著进步，目睹了克隆羊（即“多利”）（Roslin Bio-Med），被命名为“Mira”的三只克隆山羊（Genzyme Transgenics，利用 ACP 许可的技术）、几十只克隆牛（ACT）、数代克隆小鼠以及最近的 5 只克隆猪（PPL）的出生。克隆技术也取得进展，使得现在可以用来自成年、分化细胞的核克隆哺乳动物，科学家们现在知道它们在被导入去核卵母细胞中时经历“重新编程”。参见美国专利 5,945,577，在此引用作为参考。

可以用来自成年分化细胞的核产生胚胎细胞或胚胎干细胞这一事实对于器官、细胞和组织移植领域具有重要的意义。例如，可以由取自需要移植的患者的细胞的核产生胚胎干细胞，诱导分化为移植需要的细胞型。利用组织工程领域的技术，能由可用于移植的克隆分化细胞设计组织和器官。因为用于移植的细胞和组织与患者有相同的核基因型，将避免或减少移植物排斥的问题和使用免疫抑制药物所固有的危险。而且，工程细胞和组织可用异源 DNA 容易地修饰，或修饰使有害基因失活，使得移植的细胞和组织在必要时遗传学相关或改进。与本发明共有并同时申请的美国专利系列号_____讨论了遗传修饰供体核 DNA 和受体线粒体 DNA 的方法，在此完整引用作为参考。

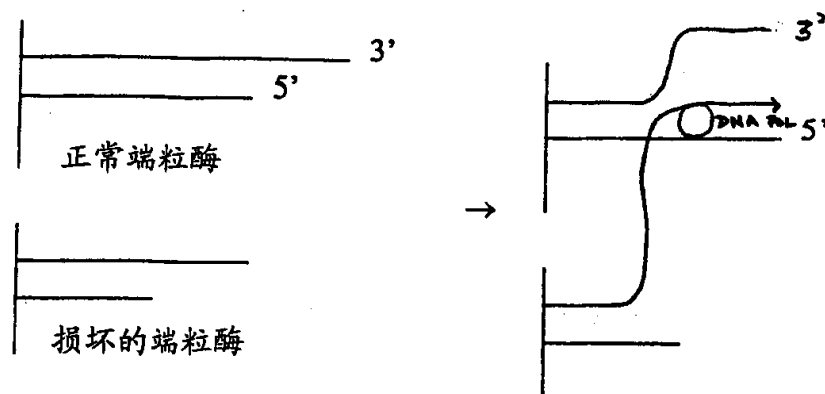
然而，近来有一些关于克隆细胞的遗传年龄的担心。最近 Shiels 等人（Nature (1999) 399:316）关于克隆羊多利的报道提示，核移植也许不能恢复端粒长度，在由胚、胎及成年细胞克隆的动物中发现的末端限制片段（TRF）大小反映了移植的核的死亡率。这些发现的含义与用于人类移植的置换细胞和组织的克隆特别有关（Lanza 等人（1999a）Nature Med. 5:975; Lanza 等人（1999b）Nature Biotechnol. 17:1171）。经历未成熟衰老的移植器官对于体内周围组织将成为破坏性的，实际上能加

重置细胞所要治疗的疾病。Shiels 等人的报道也提出了关于核移植产生的细胞是否经历未成熟衰老及核移植产生的克隆动物是否寿命减少的问题。这对高质量家畜的克隆和再克隆又具有严重的影响，而在该报道之前认为克隆优于传统的繁殖技术，后者依赖于在繁殖另一代之前达到交配年龄的动物。

至少二十年来，科学家们假定端粒丢失与老化过程有关。参见，Harley，“端粒丢失：有丝分裂时钟还是遗传定时炸弹？” *Mutation Res.* (1991)256:271-282。这一假说，最初被称为“marginotomy 理论”，即，染色体末端或端粒的逐渐丢失导致细胞周期退出，结果细胞衰老。参见，Olovnikov，“Marginotomy 理论” *J. Theor. Biol.*(1973) 41:181-190。这一假说最早提出了 DNA 聚合酶由于需要 RNA 引物复制后随链，因此不能完全复制染色体末端的预测。这一预测最后通过分子研究得到证实，研究表明人成纤维细胞染色体的末端限制片段的平均长度在体外以依赖复制的方式降低。参见，Harley 等人，“在人成纤维细胞老化过程中端粒缩短”， *Nature* (1990) 345:458-460。

支持端粒理论的进一步的证据与端粒酶有关。人细胞中的端粒酶活性于 1989 年第一次鉴定。参见，Morin，“人端粒末端转移酶是合成 TTAGGG 重复的一种核糖核蛋白” *Cell* (1989) 59:521-529。端粒酶用来在染色体末端建立，恢复端粒长度。其它研究表明，尽管端粒酶活性在体细胞分化过程中被抑制，但端粒酶在种系细胞复制的某些阶段有活性，因此在代与代之间在种系细胞中保持端粒长度。另外，显示端粒酶在转化细胞中也有活性。参见，Harley(1991)的综述。

曾经提出，分化细胞中端粒酶的抑制可能限制体细胞以不受控制的方式克隆扩充（象在癌症中一样）的能力。但某些肿瘤细胞系显示端粒酶阴性的永生性，这被称为“ALT”途径。发明者提出，这一备选途径，象肿瘤发生中端粒酶活性的获得一样，是种系性状的再现。发明者提出，受损的端粒在种系中被修复，不仅是通过端粒酶添加端粒重复，而且通过 DNA 聚合酶引起的同源链侵入和延伸。



因为核移植绕过了有性繁殖，即使用与种系细胞不同的体细胞作为核DNA的来源，当前关于克隆的假说是，克隆的端粒永远不会再生，克隆动物与它的亲代是同一“遗传年龄”的。事实上，已经注意到，在用于核移植之前的一定时间内与该技术有关。参见，BBC 新闻，“多利比她的年龄更老吗？”1999年5月27日，星期四。如果这一理论是正确的，将意味着克隆的细胞可能比通过有性繁殖产生的相同年龄的动物有更短的平均寿命，也许动物可能具有比其亲代更短的寿命。

这一理论不仅对于器官移植领域有严重的影响，而且对可以用于核移植的体细胞进行的遗传操作程度提出了怀疑。例如，核移植技术的一个主要优点是体细胞可以比胚胎干细胞更容易地在培养中保存和用转基因转染。这一特性有利于产生可产生治疗蛋白的动物，即，例如，由允许在牛奶中产生治疗蛋白的乳腺特异启动子表达转基因的母牛。同样，如果用于核移植的细胞由于老化的染色体而不能经受一系列遗传操作，则实际上不可能用多种遗传操作产生动物、细胞和组织。然而，进行这些复杂遗传操作的能力可能是必要的，例如，在这些细胞用于核移植和器官移植之前，改正来自具有有害突变的患者的供体细胞中的遗传异常。

解释为何一些研究人员发现端粒在核移植之后无法再生的一个假说是，端粒再生依赖于供体体细胞型的选择。最近的研究表明，端粒酶活性的重建导致端粒延长和正常人成纤维细胞和视网膜上皮细胞的无限增殖(Bodnar 等人(1998) Science 279:349; Vaziri 和 Benchimol(1998) Curr. Biol. 8:279)，而使用乳房上皮细胞的类似实验不能导致端粒的延长和复

制寿命的延长 (Kiyono 等人(1998) *Nature* 396:84)。细胞在端粒酶延长端粒的能力上或在适应培养后激活的信号传导途径上的差异用来解释这些不同 (de Lange 和 DePinho(1999) *Science* 283:947)。

一些研究人员提出,端粒酶活性可能是细胞周期依赖的。例如,在 1996 年, Dionne 报道了端粒酶活性细胞在静止期 (G_0 期) 端粒酶活性的下调,并假定端粒酶活性可能是细胞周期依赖的。见 <http://telomeres.virtualave.net/regulation.html>。类似的, Kruk 等人报道了当与细胞周期的其它时点相比时,在 S 早期有较高水平的端粒酶 (Biochem. Biophys. Res. Commun. (1997)233:717-722)。然而,其他研究人员报道了与之矛盾的结果,另外提出端粒酶活性与生长速率而不是与细胞周期有关 (Holt 等人, (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16(6):2932-2939; 参见同上文的网址,参考 Holt, 1997 和 Belair, 1997)。另外其他人提出,端粒酶激活由其它细胞激活信号介导,体外 B 细胞中端粒酶响应 CD40 抗体/抗原受体结合和接触白介素-4 上调证明了这一点 (同上文的网址,引用 Weng, 1997; 参见 Hiyama 等人 (1995) *J. Immunol.* 155(8):3711-3715)。但尽管对端粒酶和它在老化和细胞转化过程中的作用的兴趣越来越大,但对端粒酶活性的调节仍然所知甚少。参见,例如, Smaglik, “转向端粒酶: 当反义策略出现时,基本问题仍然存在” *The Scientist*, 1999 年 1 月 18 日, 13(2):8。

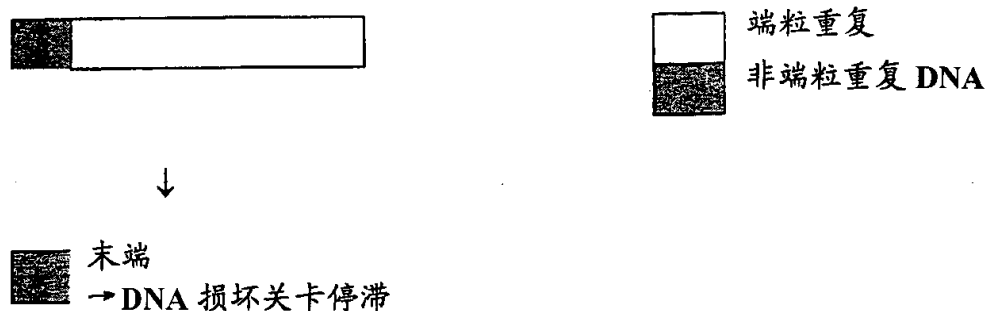
调节端粒酶活性的能力在医学界具有广泛的影响,并可能深深地影响比克隆动物中端粒再生更多的技术。具有调节端粒的能力将能够治疗许多年龄相关的和其它类型的疾病。例如,调节端粒的能力对于提高与癌症化疗有关的骨髓移植的效能可能是重要的;端粒酶治疗可用于替换免疫系统中的老化细胞,例如在眼睛视网膜中,在治疗血管层中,以利于预防心脏病发作或中风,延长肝细胞的寿命,治疗肝硬变,或延长成肌细胞的寿命,治疗肌营养不良。另外,调节端粒酶的能力可允许控制癌细胞。最后,端粒和端粒酶调节的体外模型,特别是细胞老化逆转的模型,将能够设计鉴定端粒调节、老化和癌症的分子机制的试验和筛选法。因此,对端粒酶调节的更深入了解除了保证克隆组织对于组织工程和移

植的效能，并确保甚至提高克隆和非克隆动物的寿命外，还能导致广泛的治疗。

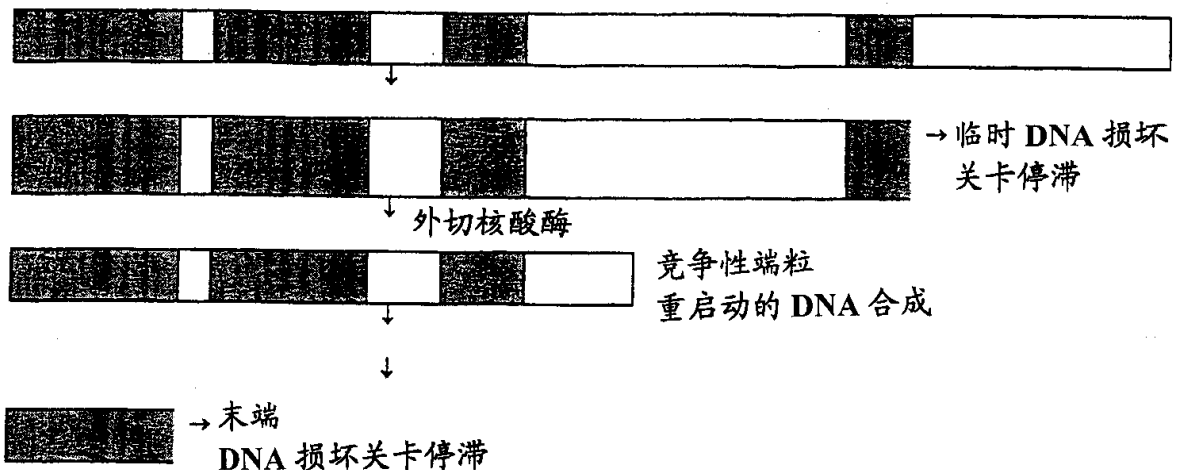
发明概述

本发明基于意外的发现，根据最近对于克隆哺乳动物遗传年龄的怀疑，核移植方法能够使衰老或接近衰老的细胞复壮，并修复（如端粒中的）串联重复的 DNA 序列，恢复基因表达的年轻模式，如提高 EPC-1 活性，和/或提高细胞寿命或细胞增殖能力。因此本发明使得根据最近对于核移植的担心认为是不可能的事成为可能；即，衰老或接近衰老的细胞，例如在接近衰老前培养生长的细胞，或从具有年龄相关缺陷或病症的人或动物中获得的细胞，仍可用于产生克隆的细胞、组织和动物，它们具有长度至少相当于或大于年龄相当的对照的端粒。这些细胞也具有年轻细胞的基因表达模式，如相对于供体细胞提高的 EPC-1 活性。而且，本发明确定，与最近提出的相反，产生克隆的克隆，即“再克隆”，是完全可行的，并且在理论上是可无限重复的，从而产生“超年轻的”细胞、组织、器官和动物。

目前认为端粒缩短导致双链不可区分的染色体末端断裂，从而发出 DNA 损伤关卡的信号（W.E. Wright 和 J.S. Shay 2000, Nat. Med. 6(8)849-851）。



然而，端粒可能含有含量越来越多的从端粒向着丝粒的简并或非端粒重复 DNA。



这些非端粒重复序列的出现引起暂时的 DNA 损伤关卡。修复（如通过核酸外切酶活性）后，细胞能再次进入细胞周期。利用随后的核移植使致死细胞生长为末期衰老引起自然中不总是存在的均匀端粒重复序列延伸阵列的合成。



↓ 核转移



延伸的和一致的端粒重复

含有具有这些延伸和均匀端粒重复序列的染色体的细胞和/或动物将被复壮，并且具有超年轻的独特特性，因为大量细胞在任一时间段在 DNA 损伤关卡有较少的细胞。

本发明基于如下发现：核移植技术可通过激活内源（细胞）端粒活性延长体细胞（例如衰老或接近衰老或关卡停滞的细胞）的寿命，通过修复串联重复 DNA 序列损伤增强基因表达的年轻模式。这与最近为解决核移植产生的动物中发现的端粒丢失提出的方法相比，具有特别的优点，其焦点在于克隆的端粒酶基因的外源表达，以解决克隆哺乳动物中的端粒缩短。

在这点上，Geron 公司和 Roslin 研究所的研究人员最近合作，用核移植合并了 Geron 克隆的端粒酶基因（hTERT），以期解决克隆中的端粒缩短。参见，例如，Business Wire, 1999 年 5 月 26 日。这一宣布先于

5月27日 Roslin 研究所的研究人员在 Nature 上的报道, 该报道称用核移植克隆的(多利之后的)另外两只绵羊也显示端粒短于年龄相当的对照。马萨诸塞州大学参与克隆牛的研究人员也认为, 用外源端粒酶基因转染的供体细胞可能在克隆动物的寿命上有优势, 尽管他们发现核移植似乎使衰老的供体细胞复壮。参见 [http://abcnews.go.com/sections/science/Daily News/clones980522.html](http://abcnews.go.com/sections/science/Daily%20News/clones980522.html)(1998)。

本发明优于为了由转染的端粒酶基因表达端粒酶而提出的方法, 因为激活端粒酶和在克隆细胞、组织和动物中再生端粒长度不需要遗传操作。另外, 用本发明达到的端粒酶活性的上调是短暂的, 当它足以延长端粒长度时, 不能给予组成型的无限增殖。假定发现端粒酶在许多类型的癌症细胞中组成型上调, 并且报道组成型端粒酶表达导致原癌基因 c-MYC 的上调, 则这一优点特别重要(D. Bead 的文章)。因此, 导入端粒酶之外的基因也引起了诱导细胞转化的可能性, 并将有可能需要随后旨在控制由转染基因表达端粒酶的措施。因此一种可用细胞自身调节机制控制端粒酶活性的方法优选地用来插入端粒酶基因的外源拷贝。

另外, 本发明优于端粒酶的外源表达, 因为导致端粒缩短及随后用核移植延长端粒的体细胞培养产生一群复壮的细胞, 它们全都具有一致的端粒重复性状。因此, 从这一群体中分离的个体细胞具有能增强增殖的较大可能性, 该群体将具有比天然细胞有更少关卡停滞细胞的独特性质, 从而是“超年轻的”。

因此, 本发明包括用核移植复壮或提高正常体细胞寿命的方法。得益于所公开的方法的体细胞包括任何体细胞, 例如由于达到群体倍增的自然限制, 或由于对复杂遗传改变或条件的苛刻选择条件, 使细胞暴露于高氧压力或可损伤端粒 DNA 的其它条件下, 而接近衰老的细胞。如上所述, 这特别包括来自具有年龄相关缺陷或病症的患者或动物的细胞, 如年龄相关的黄斑变性、免疫衰老神经变性疾病, 如帕金森氏症或阿尔茨海默氏病, 骨关节炎、肌营养不良、皮肤老化、肺气肿、动脉瘤、冠心病、动脉粥样硬化、高血压、白内障、成年发作的糖尿病。本发明也可用于与加速的细胞更新有关的病症, 如肌营养不良、带状疱疹、AIDS 和

肝硬化。这些方法适用于任何目的体细胞，和这些细胞作为核移植供体的用途。

本发明的方法允许人们将晚期传代的体细胞的核重新编程为胚胎状态。通过使胚胎细胞分化并发育为许多不同的细胞型，人们可重新分离复壮或“年轻”状态的目的原代细胞。并且，由于本发明的方法需要制备分化为所有不同细胞型的胚胎干细胞，所以用任何目的原代细胞可产生任何类型的细胞，只要体细胞的基因组未改变得以至影响细胞发育。因此，本发明提供一种有价值的方法，用以分析体外不同细胞型的等基因背景（即基因敲除或异源基因的表达）中相同遗传改变的影响。

例如，患者的体细胞可以用核移植相关技术重新编程、再生并恢复成全能性。由这些复壮的全能细胞能获得多能干细胞，如前间质、间质、enangioblasts、造血干细胞。能将这些多能细胞或由它们衍生的细胞移植到供体中，将在患者的组织中“播种”健康的可增殖细胞，如免疫细胞、血细胞、骨、肌肉、神经和其它类型。

本发明的方法也通过用所述细胞、它们的核或染色体作为核移植供体，提高希望的细胞（优选地哺乳动物细胞，更优选地是人细胞，例如需要复壮的细胞）的寿命。优选地，该方法可重复，从产生的克隆胚胎中获得的细胞、核或染色体自身将用作核移植供体。另外，供体细胞优选地是转基因的。

本发明的方法通过用所述细胞、由它们衍生的核或染色体作为核移植供体或使这些细胞的 DNA 暴露于胚胎细胞型，进一步使人们能恢复希望的细胞中的重复 DNA，并激活或调节（降低或增强表达）那些参与老化的基因，包括希望的细胞中的端粒酶，例如需要复壮的哺乳动物细胞和关卡停滞的细胞。如下文所详述，这是一个不平行的发现，因为本发明可提供一种鉴定参与细胞老化并调节细胞寿命的特异分子的方法。具体而言，本发明提供鉴定可恢复重复 DNA（如端粒）、激活或抑制细胞老化过程中改变的基因的化合物（如端粒酶、gas、tPA 等）的试验。

鉴于发明者关于核移植可用来复壮或延长哺乳动物细胞（例如衰老或接近衰老的细胞）的寿命的发现，不再担心克隆的哺乳动物、胎、畸胎

瘤或胚或内细胞团或胚泡具有其亲代的遗传年龄。因此，本发明也包括用核移植技术再克隆克隆的哺乳动物、胎、畸胎瘤或胚等的方法。这些再克隆方法特别可用于产生表达一种以上的异源基因或一种以上基因被敲除的转基因哺乳动物，因为能通过克隆技术产生这些动物，产生具有相同遗传背景的克隆的和再克隆的哺乳动物。这些方法不需要交配或繁殖，它们常产生其它遗传差异，并且不可能获得含有在基因组上紧密连锁从而一起遗传的改变基因的双敲除或双转基因哺乳动物。

附图简述

图 1. 核移植供体细胞细胞衰老的表征。(A) 细胞用相差显微镜观察。与前代 BFF 细胞 (a) 相比，供体细胞显示细胞大小和细胞质粒度增加 (b)。(B) BEF (a) 和供体 CL53 (b) 细胞的典型电子显微照片。注意 CL53 细胞的缠绕的核(n)。CL53 细胞大于 BEF 细胞，它们的细胞质含有丰富的溶酶体 (箭头) 和粗的原纤维。两张图片都是相同的放大率。线条代表 2 微米。线粒体(in)。(C) 前代 (a, BEF) 和晚代 (b, CL53) 细胞进入 DNA 合成, 如通过在 30 小时温育过程中的 ^3H -胸苷掺入测定的 (V.J. Cristofalo 和 B.B. Sharf(1973) Exp. Cell Res. 76:419)。处理细胞进行放射自显影，然后用显微镜观察，并对标记的核评分。按照建立的方案 (Cristofalo 和 Sharf (1973)) 计数至少 400 个核，以确定标记的核的百分数。(D) 通过 Northern 分析测定，供体 CL53 细胞显示 EPC-1 mRNA 水平降低。标出了前代 (Y) 和晚代 (O) 人成纤维细胞 (WI-38)、前代 (Y; BEF) 和晚代 (O; 供体 CL53) 牛成纤维细胞和从克隆的小牛皮肤成纤维细胞株分离的 RNA。在生长到汇合，并在无血清培养基中生长停滞 3 天后从细胞中提取 RNA (P. Chomczynski 和 N. Sacchi(1987) Anal. Biochem 162:156)。等量 RNA 用乙二醛处理，在琼脂糖凝胶上电泳分离，电泳转移到硝酸纤维素滤膜上，使用标准条件与全长 EPC-1 cDNA 杂交 (D.G. Phinney, C.L. Keiper, M.K. Francis, K. Ryder(1994) Oncogene 9:2353)。

图 2. 由衰老体细胞克隆的正常母牛。(A) 5 个月大的 CLS3-8、

CL53-209、CL53-10、CL53-11 和 CL53-12（昵称分别为 Lily、Daffodil、Crocus、Forsythia 和 Rose）；（B）10 个月大的 CL53-1（Persephone, insert）。

图 3。核移植恢复衰老供体细胞增殖寿命的能力。（A）原初 BEF 细胞株（*）的生长曲线与由晚期 BEF 细胞（CL53 细胞）克隆的胎（ACT99-002）（o）衍生的细胞的生长曲线相比较。（B）CL53 供体细胞的生长曲线，表明培养物中仍有大约 2 次群体倍增。（C）晚期 CL53 细胞（n=97）以克隆密度接种，比较 1 个月后的增殖能力。（D）与由晚期细胞衍生的克隆相反，来自前代 BFF 培养物（原初）和前代 ACT99-002（克隆）的单细胞克隆显示增殖扩充的能力。

图 4。端粒长度分析。（A）具核血细胞。来自克隆的和对照动物的外周血样在双盲实验中通过流式 FISH 分析（N. Rufer, W. Dragowska, G. Thornbury, E. Roosnek, P.M. Lansdorp (1998) *Nature Biotechnol.* 16:743）。用氯化铵渗透裂解红细胞后获得的双份具核细胞样品（合并的粒细胞和淋巴细胞）如上述通过流式 FISH 分析（N. Rufer 等人(1999) *J. Exp. Med.* 190:157）。通过用 FITC-标记端粒探针获得的平均荧光减去平均背景荧光，计算单核细胞的平均端粒荧光。注意正常母牛中端粒荧光值的年龄相关的降低，和克隆动物中相对较长的端粒。（B）末端限制片段的分析。从对照细胞（转染前 BFF 牛成纤维细胞）、衰老 CL53 细胞和通过核移植用衰老 CL53 细胞获得的 7 周龄克隆胎（ACT99-002）细胞的成纤维细胞中分离的基因组 DNA。用 *HinfI/RsaI* 消化后获得的 DNA 片段的 TRF 分析如上述在 0.5% 琼脂糖凝胶上进行 12 小时（端粒长度测定试剂盒，Pharmlngen, San Diego, CA）。道 1：来自 CEPH 类淋巴母细胞人细胞系 134105 的对照 DNA；道 2：生物素化的标记（Pharmlngen）；道 3：TeloLow 对照 DNA（Pharmlngen，平均 TRF 长度为 3.3kb）；道 4：衰老 CL53 细胞；道 5：BFF 成纤维细胞转染前；道 6：ACT99-002（克隆的）细胞。（C）在 0.5% 琼脂糖凝胶上电泳 24 小时后如 B 的 TRE 分析，道 1：ACT99-002 细胞（平均 TRF 长度为 19.3kb）；道 2：BFF056H 成纤维细胞转染前（平均 TRF 长度为 17.9kb）；道 3：衰老 CL53 细胞

(平均 TRF 长度为 16.2kb)；道 4: TeloHigh 对照细胞 (Pharmlngen, 平均 TRF 长度为 11.3kb)；道 5: 来自 CEPH 类淋巴母细胞人细胞系 134105 的对照 DNA；道 6: 用 HindIII 酶切的生物素化的 λ DNA (分子量标记物)。(D) 对转染前 BIT 牛成纤维细胞、衰老 CL53 细胞和 ACT99-002 成纤维细胞的流式 FISH 分析。在与或不与 FITC-3TA2) 3 肽核酸探针杂交后分析细胞 (分别为灰色和黑色直方图)。单细胞根据光散射性质门控。注意用作核供体的衰老 CL53 细胞的较高自身荧光。以线性等级测量荧光。在减去背景荧光后, ACT99-002 (克隆的) 细胞具有最高的荧光, 随后是 BFF (原始) 细胞。衰老 CL53 细胞似乎具有最低的特异荧光。

图 5. 在重建的胚胎中而不是在供体牛成纤维细胞中表达端粒酶。端粒酶活性用端粒重复扩增方法 (TRAP) 测定试剂盒 (Pharmlngen, San Diego, CA) 测定。成年供体衰老 (CL53) 成纤维细胞和第 7 天重建的牛胚 (n=15) 的裂解物在 TRAP 测定中获得并使用。道 1: 来自 4000 个 K562 人红白血病细胞的提取物；道 2: 20bp 标记；道 3: 无细胞提取物；道 4: 热处理的胚 (n=1) 提取物；道 5: n=10；道 6: n=1；道 7: n=0.1；道 8: n=0.01；道 9: 来自 4000 个供体 CL53 成纤维细胞的提取物；道 10-11: 成纤维细胞提取物对照 (分别无 TS 模板和热灭活的提取物)；道 12: 20bp 标记。所有道都含有内部控制 TRAP 反应物 (36bp)。

发明详述

本发明包括复壮正常体细胞的方法。“正常”体细胞是指属于体细胞系的这些细胞不是肿瘤产生的或转化的, 在该细胞或这种细胞的核或该细胞的染色体被移植到无核卵母细胞中或以其它方式接触种系细胞中存在的因子之后, 能被重新编程或利于胚胎发育。正常体细胞可以或可以不遗传修饰。“复壮”, 本发明是指至少下列之一: 所述体细胞的可能群体数量倍增; EPC-1 活性或细胞老化的其它标记逆转为年轻状态; 端粒酶上调, 和/或端粒增多。“超年轻”是指细胞群体具有比正常细胞年轻的细胞老化标志。“畸胎瘤”是指一组分化细胞, 含有由全能细胞

产生的中胚层、内胚层或外胚层衍生物。

在本发明的一个优选实施方案中，将要用于本发明的正常体细胞是衰老细胞、关卡停滞的细胞或接近衰老的细胞。然而，这些方法适用于任何希望的正常体细胞，优选地人类细胞。复制衰老是与由血清饥饿或年轻细胞生长的密度依赖的抑制引起的静止不可区分的一种生理状态（West 等人（1989）*Exp. Cell Res.* 184:138；West 等人（1996）*Exp. Gerontol.* 31:175；和 Pignolo 等人（1998）*Exp. Gerontol.* 33:67），似乎包括细胞周期中接近 G_1/S 边界的 G_1 晚期的阻断（Cristofalo 和 Pignolo（1996）*Exp. Gerontol.* 31:111；Gorman 和 Cristofalo（1986）*Exp. Cell Res.* 167:87；和 Cristofalo 等人（1992）老化和细胞防御机制，Franceschi 等人编（纽约科学院，纽约）187-194 页）。

衰老细胞可以用本领域周知的多种方法鉴定。例如，可以用相差光学显微镜和电子显微镜的超微结构分析证实成纤维细胞复制衰老的特征，包括与年轻细胞相比，明显的和活跃的高尔基体，内陷的和叶状的增多的核，大溶酶体，和细胞质微丝的增多（Lipetz 和 Cristofalo（1972）*J. Ultrastruct. Res.* 39:43）。另外，衰老细胞进入 S 期的能力降低，这通过 ^3H 胸苷掺入减少和衰老相关 β -半乳糖苷酶染色显著增加确定（G.P. Dimri 等人（1995）*Proc. Natl. Acad. USA* 92:9363）。衰老细胞也显示与前代细胞相比 EPC-1（早期群体倍增水平 cDNA-1）（Pignolo 等人（1993）*J. Biol. Chem.* 268:8949）mRNA 水平降低，与静止细胞相比 gasI 基因表达下调（Cowled 等人（1994）*Exp. Cell Res.* 211:197-202）。

能通过繁殖细胞直到达到不可逆的生长停滞来分离衰老细胞。对于“接近衰老”，本发明者是指这些细胞具有分裂不超过约 3-6 次的能力，优选地距复制衰老不到 2 或 3 次群体倍增。尽管产生用于核移植的衰老细胞的优选含义是传代正常体细胞直到完成寿命的约 90%-95% 以上，衰老和衰老样状态也能通过将细胞接触不同试剂（包括基因毒剂和 Cdk 抑制剂）诱导（McConnell 等人（1998）*Current Biol.* 8:351-354）。基因毒剂诱导类似于衰老的、不同于被称为 DNA 损伤关卡停滞的静止的生长停滞。此外，接近衰老的细胞也能从（例如，具有老化相关病症的）人

或动物中获得。

本发明的方法可使用细胞复壮产生克隆的动物，或者可用来为了其它目的复壮正常目的体细胞。这些方法可包括：

- a. 将所述体细胞、体细胞的核或体细胞的染色体移植到受体卵母细胞或卵或其它合适的受体细胞中，以产生胚胎；
- b. 使用该胚胎获得至少含有一种细胞的胚胎、内细胞团、胚盘和/或干细胞；
- c. 使胚胎、内细胞团、胚盘和/或干细胞分化为希望的细胞或组织类型；
- d. 分离得到的细胞或组织；
- e. 将所述细胞或组织移植到患者中。

根据本发明分离的分化的细胞畸胎瘤、内细胞团、胚盘和/或胚胎干细胞将具有即便不长于供体体细胞也至少与它一样长的端粒，这也是本发明的一个方面。这些分化的细胞也应具有年轻或超年轻的细胞老化标志。也预见了一种方法，该方法用分化的细胞或组织、畸胎瘤细胞、内细胞团、胚泡细胞或胚细胞作为随后的核供体。这种方法特别适用于分离具有多种转基因或遗传改变的正常体细胞、畸胎瘤、ES 细胞等，可无限重复直到达到希望数量的遗传改变。

本发明的方法使用的正常体细胞可以是任何细胞型。合适的细胞包括免疫细胞，如 B 细胞、T 细胞、树突细胞，皮肤细胞，如角质细胞、上皮细胞、软骨细胞、丘细胞、神经细胞、心细胞、食道细胞、皮肤成纤维细胞、不同器官（包括肝、胃、肠、肺、胰、角膜、皮肤、胆囊、卵巢、睾丸、其它生殖器官、肾等）的细胞。最合适的细胞一般是容易在组织培养中繁殖并能容易地转染的细胞。优选地，用于转染异源 DNA 和进行核移植的细胞型是成纤维细胞。

美国专利号 5, 945, 577; 1997 年 7 月 3 日申请的美国系列号 08/888, 057; 1997 年 7 月 3 日申请的美国系列号 08/888, 283; 1997 年 9 月 22 日申请的美国系列号 08/935, 052; 和 1999 年 9 月 13 日申请的美国系列号 09/394, 902 公开了实现核移植的方法和方案，所有专利和申请书都在

此引用作为参考。

体细胞可以来自任何类型的动物或哺乳动物，如猪、山羊、猫、狗、大鼠、小鼠、牛、水牛、绵羊、马、人、非人灵长类动物，但优选地是有蹄类动物细胞，最优选地是牛细胞。用于核移植的卵母细胞或卵将来自相似的来源，并且可以与供体细胞或 DNA 是相同或不同的种。

无免疫应答的动物可以是能支持畸胎瘤形成的任何动物，无免疫应答到不发生发育的畸胎瘤排斥的程度。例如，无免疫应答的动物可以是 SCID 或裸鼠。此外，细胞也可以是体内分化的或禽卵中的细胞。

该方法特别可用于分离具有复杂或复合操作（即一个以上的转染异源基因和/或基因敲除）的体细胞，可能难以将体细胞在培养中保持长得足以影响所有希望的遗传改变的时间。首先，体细胞，优选地通过核移植成为超年轻的细胞，用作基因打靶的底物。因此，能对体细胞进行第一次遗传操作，然后能按照本发明的方法复壮，然后可在遗传时钟“复位”后进行第二次遗传操作。因此，根据遗传操作的复杂性和复壮过程的时间长度，根据本发明复壮的体细胞可具有基因组的至少一个改变。也包括用本发明的方法产生的复壮的、遗传改变的细胞。

本发明也包括制备与不同细胞型的第一种细胞有相同基因型的体细胞的方法。复壮方法使这种方法成为可能，其实现方法是将第一种体细胞、第一种原代细胞的核或第一种原代细胞的染色体转移到去核受体卵母细胞或其它合适的受体细胞中，或者使体细胞接触卵母细胞中的蛋白质，以产生畸胎瘤或其它分化细胞团，其中含有外胚层、中胚层和内胚层之任一种的衍生物。也可使用在受精后立即去核的卵。因此，实际上可从畸胎瘤分离任何类型的细胞，或由畸胎瘤的细胞发育分化。特定目的细胞型独特的特异细胞标记在本领域中周知，可用来鉴定克隆的原代细胞。

制备与用于核移植的细胞不同类型的体细胞的方法一般包括：

- a. 将第一种细胞、每一种细胞的核或第一种细胞的染色体移植到受体卵母细胞或卵或其它合适的受体细胞中，以产生胚胎；
- b. 使用该胚胎获得至少含有一种细胞的胚胎、内细胞团、胚盘和/

或干细胞;

c. 将内细胞团、胚盘和/或干细胞注射到无免疫应答的动物血细胞培养物或禽卵中, 形成畸胎瘤;

d. 分离得到的畸胎瘤;

e. 为了鉴定特异细胞型, 分离不同的胚层;

f. 分离与第一种细胞不同类型的细胞。

在供体细胞、核或染色体来自人体的实施方案中, 可修饰原代细胞的基因组, 使细胞不能产生活的胚胎。其实现方法包括灭活或敲除形成三种胚层之一所需的一种或多种基因, 或者从发育调节启动子表达在非目的胚层所含细胞型中特异表达的“自杀”基因。此外, 基因敲除或自杀基因表达可针对哺乳动物子宫附着或发育特别需要的基因。

如上所述, 优选地, 第一种(核供体)细胞是一种成纤维细胞。该方法可以用任何细胞种构成, 特别可在人类治疗克隆中用于产生用于移植的克隆器官和组织。因此, 该方法可用人细胞施行, 可以用分离的原代细胞产生一种组织(用于向需要移植的患者中移植)。

通过公开的方法产生的优选原代细胞类型是: 神经元、骨骼成肌细胞、心肌、皮肤胰腺 β 细胞、内皮细胞、造血细胞、皮肤细胞、毛囊细胞、肾细胞和神经细胞。该方法进一步包括从畸胎瘤中分离细胞, 和在生长因子存在下培养该细胞, 以促进进一步的分化。特别是, 在核移植之前改变第一种细胞的基因组, 使得新的原代细胞和产生的工程组织表达至少一种治疗蛋白, 或者不能表达可能对供体患者有害的天然蛋白质。也包括由公开的方法产生的细胞和组织。

由此处公开的方法产生的细胞和组织的优选用途包括产生神经元、胰岛细胞、肝细胞、心肌细胞、造血细胞和其它希望的分化细胞型和组织。

这些细胞和组织(任选地可以是转基因的)可用于细胞、组织和器官移植, 例如, bum 的治疗、毛发移植、癌症、慢性痛、糖尿病、侏儒症、癫痫、心脏病如心肌梗塞、血友病、不育症、肾病、肝病、骨关节炎、骨质疏松症、中风、情感障碍、阿尔茨海默氏病、酶缺陷、亨廷顿

舞蹈症、低胆固醇血症、甲状旁腺功能减退症、免疫缺陷、Lou Gehrig 病、黄斑退化、多发性硬化症、肌营养不良、帕金森氏病、类风湿关节炎、脊髓损伤和其它创伤。

因为核移植技术在产生克隆哺乳动物以及克隆细胞和组织中 useful, 本发明的方法也可用于产生具有复杂或复合遗传改变的克隆哺乳动物。另外, 本发明也可用于生产年轻、更优选地超年轻的动物。特别是, 本发明包括一种再克隆克隆动物的方法, 其中再克隆的动物相比克隆动物遗传改变。该方法在本发明的发现之前未曾尝试, 这显示核移植可复活晚代细胞并恢复端粒长度。如果再克隆的哺乳动物与克隆的遗传动物有相同的遗传年龄 (即, 与第一种核供体相同的遗传年龄), 根据克隆代数, 该方法的可行性将降低。发明者迄今获得的结果表明这不是事实, 实际上再克隆能随意进行多次, 并将产生“超年轻的”动物、胚胎和细胞。超年轻的动物一般具有可产生抗体的增强的免疫系统, 和增强的表层色素沉着。

根据本发明的一种优选的再克隆方法包括下列步骤, 并且可用来产生至少具有两个遗传修饰的克隆动物:

- a. 从目的动物中获得原代细胞,
- b. 通过插入异源 DNA 和/或缺失天然 DNA 对原代细胞进行第一次遗传修饰,
- c. 使用第一次遗传修饰的原代细胞作为核供体, 用于向去核卵母细胞或卵或其它合适的受体细胞中核移植,
- d. 获得具有第一种遗传修饰的克隆胚、胎或动物,
- e. 由克隆胚、胎或动物获得克隆的原代细胞,
- f. 通过插入异源 DNA 和/或缺失天然 DNA 对克隆的原代细胞进行第二次遗传修饰,
- g. 使用第一次和第二次遗传修饰的克隆原代细胞作为核供体, 用于向去核卵母细胞或卵或其它合适的受体细胞中核移植,
- h. 获得具有第一种和第二种遗传修饰的再克隆的胚、胎或动物。

该方法可以重复任意多次。优选地, 至少一个再克隆步骤使用繁殖

为衰老或接近衰老或关卡停滞的供体细胞，使得再克隆的细胞的端粒在核移植后再生或恢复。特别是，本发明的方法进一步包括以下步骤：再次克隆再克隆的胚、胎或动物，进行第三次遗传修饰，使再克隆具有第一种、第二种和第三种遗传修饰。因此，该方法可用来产生大量基因被敲除、插入或置换的动物，并且可用来产生整个细胞系统被替换或修饰（即人免疫系统被替换为牛的免疫系统）、涉及复杂酶途径（如与凝集因子有关的途径，或补体级联等）的基因置换的动物。

本发明的再克隆方法将能产生复杂的动物模型，用于研究与多种基因和/或细胞型有关的疾病，也许不能被表达单转基因或目的单基因被敲除的典型动物模型复制。而且，可以用这些动物模型研究复杂遗传背景中治疗基因的作用。也可以用这些动物模型产生和检测可调节不同基因表达的产物，敲除参与引发免疫应答的基因，用同源相应物置换胶原基因或其它结构蛋白基因，等等。

本发明包括令人惊奇的发现：衰老细胞可以被复壮，EPC-1 活性和与老化有关的其它细胞标记可以提高，端粒酶可以被激活，端粒可以被延长，串联重复可以被修复，所有这些都是通过核移植方法。因此，本发明包括激活端粒酶活性和/或 EPC-1 活性的新途径的发现，其用途远远超出延长端粒和复制寿命。我们也预测对串联重复 DNA 序列的其它修复。特别是，本发明提供了一种分离端粒酶激活、EPC-1 激活或其它老化相关基因激活机制的方法，以及用鉴定的机制调节端粒酶或 EPC-1 或其它基因的方法。

例如，能分级分离卵母细胞的细胞质，使其与致死细胞或致死细胞核或端粒结合，测定端粒酶激活、EPC-1 激活（或与老化有关的其它细胞标记）和端粒延长。通过这种测定，能鉴定和分离卵母细胞中负责重新激活端粒酶、EPC-1 活性和/或其它年龄相关细胞标记的活性成分。类似地，能从卵母细胞中分离 RNA 或 cDNA，并转染致死细胞，或在用于检测端粒酶活性的无细胞系统中表达，并且可以鉴定证明有端粒酶活性的转染细胞或无细胞系统。这些方法能结合扣除杂交技术，以富集在胚胎形成过程中而不是在衰老过程中表达的 RNA。这样，可以鉴定编码可

能与端粒酶激活有关的酶的基因。

恰好在受精后阶段内的卵母细胞或卵可能含有一种以上的参与端粒酶激活的基因或蛋白质。不希望拘泥于任何特定理论，发明者认为，在卵母细胞或在卵母细胞发育产生的 ES 细胞或生殖细胞中存在至少一种调节蛋白或 RNA，它参与端粒酶活性的调节，和 ALT 途径，特别可响应衰老细胞环境的某些方面。这些蛋白质或 RNA 直接激活端粒酶或端粒酶基因表达是可能的，但这些蛋白质或 RNA 通过抑制端粒酶抑制剂或衰老或接近衰老细胞中存在或表达的 ALT 途径起作用也是可能的。一种可能的端粒酶激活剂是 Oct4 或 Rex。

例如，Xu 等人证明，肿瘤细胞中成视网膜细胞瘤蛋白的再次表达诱导衰老并抑制端粒酶活性（Oncogene (1997) 15:2589-2596）。最近的报道也表明，染色体 3 上的一个基因可能参与 hTERT（端粒酶的催化亚基）的转录抑制。参见 <http://claim.springer.de/EncRef/CancerResearch/samples/0001.htm>。也已经鉴定了几种可与端粒酶直接相互作用的蛋白质，如 p23/hsp90（分子伴侣）和 TEP1（端粒酶相关蛋白 1）。Lawrence Berkeley 国立实验室的研究人员宣称克隆了另外两种人端粒相关蛋白（Tin1 和 Tin2）。Federal Technology Report, 1999 年 12 月 30 日，Partnership Digest, Technology Watch, 第 9 页。因此，本方法确定的调节机制可通过结合或抑制端粒酶结合蛋白或端粒酶抑制剂的表达起作用，从而提高端粒酶活性，但也能通过上调基因表达或增强蛋白质稳定性调节端粒酶活性。

本发明包括鉴定至少一种可直接或间接增强端粒酶活性或 ALT 途径的基因的方法。这些方法包括针对可增强衰老或接近衰老的细胞中端粒酶或 ALT 活性的成员，筛查由胚胎或胚胎干细胞产生的 cDNA 或 mRNA 文库。这些方法也可包括鉴定至少一种可直接或间接抑制端粒酶或 ALT 活性的基因，包括，针对可抑制胚胎干细胞中的端粒酶活性的成员，筛查由衰老或接近衰老的细胞产生的 cDNA 或 mRNA 文库。端粒酶活性可以通过本领域周知的任一种方法测定，包括测定报道基因表达（如 hTRT 基因）或融合蛋白。一种优选的报道分子是绿色荧光蛋白（GFP）。端

粒酶活性也可以用 TRAPeze 试验测定。筛查方法可以与其它周知的方法结合，以提高筛查方法的效能，例如，如果测试文库由卵母细胞或 ES 细胞产生，则在文库筛查之前，使 cDNA 或 mRNA 文库与来自衰老细胞的 cDNA 或 mRNA 文库扣除杂交，反之亦然。

本发明也包括鉴定可提高端粒酶、年轻基因表达模式或 ALT 活性的蛋白质的方法，包括：（a）收集卵母细胞、胚胎或胚胎干细胞的细胞质的级分，（b）将其加入为衰老或接近衰老的细胞设计的无细胞系统中，和（c）测定接触特异卵母细胞或 ES 细胞质级分引起的端粒酶、年轻基因表达或 ALT 活性的改变。也包括筛选可抑制端粒酶或年轻基因表达的化合物的方法，包括使通过核移植技术用衰老或接近衰老的供体细胞产生的胚胎干细胞接触一种化合物，以确定该化合物是否抑制端粒酶、年轻基因表达或 ALT 活性。

本发明也包括生产已经用年轻基因或调节序列（优选地与合适的标记连接）转染的细胞，和用这些细胞鉴定可上调年轻基因表达的化合物的方法。这些筛选法鉴定可调节细胞增殖或老化的化合物。假设几种基因可能在调节细胞增殖和周期中起作用，包括 EPC-1、gas 基因（Ciccarelli 等人，Mol. Cell. Biol. 10(4):1525-1529(1990)，如 gas-2、-3、-5、-7）、PI-3 激酶（Tresini 等人，Cancer Res. 58(i):1-4(1998)）、胶原酶、tPA。

另一种筛选是修饰含有标记基因（即 GFP）的体细胞，更优选地一种老化体细胞，其中标记基因与其表达随细胞老化改变的基因即端粒酶融合或结合。端粒酶基因和/或启动子可以与标记基因以一系列截短的形式融合，然后可用标记构建体转染衰老或接近衰老的细胞。然后可利用核移植鉴定端粒酶基因中的区域或基因启动子或在核移植后参与激活端粒酶表达的上游区。

此外，本发明也包括将 EPC-1 和其它年轻基因置于异源（如可调节的，优选地强）启动子控制下，以及估计表达增强或降低对端粒酶活性和端粒的影响。

本发明也包括遗传修饰的体细胞确定端粒调节和 ALT 途径中基因作用的情况。例如，当在 ALT 之前在体细胞中敲除这些基因时，可根据

ALT 功能的丧失确定对于 ALT 功能关键的基因。

本发明也包括通过上述方法鉴定的调节化合物、蛋白质和核酸，和含有它们的药用组合物，它们可以被分离，并用作根据本发明的外源端粒酶激活剂和用于此处所述的用途，即，用于年龄相关疾病的治疗，老化组织（如视网膜细胞）的治疗，癌症的治疗，和提高骨髓移植的效能。

通过公开的实施例说明了本发明的范围和精神。

实施例 1——胎供体细胞

这一初步试验表明，能用体细胞核移植恢复原代培养细胞的寿命。当将来自 6 周龄胎的成纤维细胞培养至衰老时，它们经历约 30 次群体倍增，平均细胞周期为 28-30 小时。为了检验通过核移植是否能拯救这些细胞不再衰老，用距衰老 0.8 次群体倍增的细胞产生 40 天的胎。来自该胎的成纤维细胞经历 31 次群体倍增，与之相比，来自正常怀孕的同龄胎的成纤维细胞为 33 次倍增。数据表明，核移植能使衰老细胞复壮。

实施例 2

由衰老供体体细胞产生的克隆小牛

一种体细胞株来自 45 天的雌性牛胎（BFF），并用 PGK 引导的选择盒转染。用 G418 选择细胞 10 天，分离出 5 个新霉素抗性菌落，并用全长 cDNA 探针通过 Southern 印迹分析稳定转染。通过 FISH 分析确定一个细胞株（CL53）为 63%[总核]转基因阳性，挑选进行本研究中所述的核移植研究。

传代 CL53 成纤维细胞（其特征为细胞角蛋白阴性，波形蛋白阳性）直到完成其寿命的 95%以上。利用光学显微镜的细胞相差照片显示（图 1A），细胞的形态学与接近生命终点的细胞一致。用电子显微镜的更详细的超微结构分析证明，这些细胞显示复制衰老的其它特征，包括与年轻细胞相比突出且活跃的高尔基体，增多的内陷和叶状的核，大溶酶体，和细胞质微丝的增多（图 1B）（27）。另外，这些晚代细胞显示衰老表型，显示进入 S 期的能力降低，³H 胸苷掺入减少（图 1C）和衰老相关 β -

半乳糖苷酶 (SA- β -gal; 数据未显示) 染色显著增加 (28) 证实了这一点。而且, 这些细胞与前代牛 BEF 细胞相比也显示 EPC-1 (早期群体倍增水平 cDNA-1) (29) mRNA 水平降低, 降低方式类似于 WI-38 细胞老化过程中观察到的改变 (图 1D)。

如上所述 (13) 通过核移植用衰老 CL53 细胞重建了总共 1896 个牛卵母细胞。培养 1 周后鉴定出 87 个胚胎 (5%)。将大多数胚胎 ($n=79$) 移植到孕激素同步化的受体中, 移植 40 天后超声波检测 32 个受体中有 17 个 (53%) 怀孕。在妊娠的第 7 周选择性取出 1 个胎牛 (ACT99-002), 而剩余的 9 个受体 (29%) 仍然妊娠直到妊娠 12 周。这些母牛中的 3 个在妊娠第 252 天 (孪生)、第 253 天和第 278 天流产。剩余的 6 个受体继续发育至足月。将使用衰老 CL53 细胞的胚胎形成 (5%)、早孕 (53%) 和足月妊娠 (19%) 的比率与使用由前代 BFF 细胞获得的非衰老供体 (CL57) 细胞产生的对照胚胎 (分别为 5%、45% 和 13%) 相比较。

小牛 CL53-1、CL53-8、CL53-9、CL53-10、CL53-11 和 CL53-12 分别在妊娠第 280、273、273、273、266 和 266 天通过选择性剖宫产术分娩 (图 2)。基因组分析证实在两只动物 (CL53-1 和 CL53-12) 中以及在妊娠第 49 天选择性取出的胎牛中存在转基因。出生时, 克隆牛的表现与以前公开的报道一致 (13, 15, 30, 31)。出生体重 ($51.6\pm3.6\text{kg}$) 一般增加, 几只小牛在出生时经历了肺性高血压和呼吸窘迫, 以及在第 4 个月接种后的发热。在前 24 小时后, 牛已经精力充沛, 没有健康问题。然而, 我们注意到在前 2 个月中有中度的多尿/多饮和干料摄入减少。这些并发症的发生与供体细胞群体 (分离株 53 或 57) 和转基因整合的存在与否都无关。在大约 2 个月后, 所有小牛都表现良好, 类似于由体外受精和体骨胚胎移植产生的健康对照小牛。所有 6 只克隆动物在出生 5-10 个月后都存活并且正常。

从克隆小牛中分离皮肤成纤维细胞, mRNA 如图 1D 所述制备。细胞表达 EPC-1 mRNA 的水平相当于或高于前代胎细胞。为了排除一小部分未衰老细胞产生克隆动物的可能性, 以正常和克隆密度接种 CL53 供体细胞。如图 3B 所示, 细胞距复制衰老有 $2.01\pm0.11(\text{SEM})$ 的群体倍增。

以克隆密度接种的不到 12% (11/97) 和 3% (2/97) 的细胞分别经历 1 次或 2 次以上的群体倍增, 而没有细胞分裂超过 3 次 (图 3C)。相反, 前代 (转染前) BFF 细胞经历 47.8 ± 0.9 次群体倍增, 对数生长期中的平均细胞周期长度为 17.8 ± 0.7 (图 3A)。

为了检验体细胞核移植方法是否能恢复衰老供体细胞的增殖寿命, 我们培养了来自选择性取出的 7 周胎牛 (ACT99-002) 的成纤维细胞。细胞株经历了 85.3 ± 5.6 次群体倍增, 对数生长期中的平均细胞周期长度为 17.7 ± 0.8 (图 3A)。单细胞克隆 ($n=5$) 由克隆的 (ACT99-002) 和原始的 (BFF) 年龄相当的胎产生, 并分离通过免疫组化染色表征为成纤维细胞的培养物。这些单细胞克隆距克隆的和原始的胎分别 31.2 ± 3.4 和 25.9 ± 2.9 次群体倍增 (图 3D)。这些数据表明, 克隆能复原衰老细胞的寿命, 胎的细胞年龄不反映核移植前供体细胞在培养中倍增的次数。

为了进一步研究核移植拯救衰老细胞的能力, 在与直接 FITC-标记的 (CCCTAA) 肽核酸探针 (流式 FISH) 原位杂交后, 用流式细胞分析将克隆动物的具核血细胞中的端粒长度与年龄相当的对照动物 (新生小牛 (<2 周龄) 和老母牛 (10-19 岁)) 相比较 (32, 33)。两个独立实验的结果 (图 4A) 表明, 相对于年龄相当的对照, 克隆动物中端粒长度完全恢复 (63.4 ± 1.7 比 51.0 ± 3.1 kMESF [平均值 $\pm$ s.d., $P < 0.0001$, 实验 1], 和 75.7 ± 1.7 比 61.4 ± 3.2 kMESF [$P < 0.0001$, 实验 2])。确实, 克隆动物的端粒在统计学上长于 4 只新生小牛 (实验 2) (75.3 ± 1.2 比 66.9 ± 1.4 , $P < 0.0002$)。对于实验 1 和实验 2, 老牛的平均端粒长度分别为 47.7 ± 0.7 kMESF 和 52.0 ± 3.6 kMESF。

也利用末端限制片段的 Southern 分析 (34) 研究了衰老 (CL53)、对照 (转染前 BFF) 和克隆 (ACT99-002) 细胞中的端粒长度动力学。结果 (图 4B-D) 与具核血细胞的流式 FISH 分析一致。来自克隆胚的细胞的端粒 (19.3kb) 长于衰老和前代供体细胞 (分别是 16.2 和 17.9kb) (比较道 4、5、6, 图 4B)。对相同细胞端粒长度的流式细胞分析 (流式 FISH, ref 32) 证实了这些结果 (图 4D)。通过 TRAP 测定, 在重建 7 天的胚中也检测到高水平的端粒酶活性 (图 5, 道 5-8), 而在核移植

实验中用作供体细胞的牛成纤维细胞是阴性的（图 5，道 9）。

讨论

以前未曾描述克隆动物中的端粒恢复。我们的结果明显不同于 Sheils 等人的研究（20），其中绵羊中的端粒侵蚀在核移植后似乎不能修复。发现 3 只克隆动物——6LL3（多利，从成年供体细胞获得）、6LL6（由胚供体细胞产生）和 6LL7（由胎供体细胞产生）的端粒长度相对于年龄相当的对照动物降低。作者提出，由于这些动物的产生没有种系参与，所以端粒长度的完全恢复不能发生。他们还提出，多利的较短的 TRF 与核移植前供体细胞培养花费的时间一致。这些发现具有重要意义，不仅是因为由衰老的体细胞产生了活的后代，而且因为核移植方法似乎延长了动物的端粒，超过新生和年龄相当的对照动物。还不知端粒的量度是否能反映这些动物的寿命，尽管发现来自克隆胎的细胞比由相同年龄的原始未操作胎获得的细胞有更长的增殖寿命。实际上，在后者中观察到的平均 TRF 大小符合这些发现。

在关于克隆的讨论中，常常问到通过核移植产生的动物是否是使用某些稀有细胞而不是大多数培养细胞的结果。大量培养物含有可达到的最长细胞寿命不同的多个谱系（43）。实际上，本研究使用的晚期细胞代表最初具有最大寿命的细胞。如果在晚期培养物中仍有 20 或更多群体倍增的年轻细胞亚组，则它们增殖培养，如同在常见自发无限增殖的小鼠细胞培养物中所看到时。预期到这一相反意见，我们将供体细胞以克隆密度接种，并对每个细胞的增殖寿命评分。347 个细胞中的 339 个（98%）经历少于 3 PD，而 347/347（100%）经历 4 次或更低的 PD。而且，细胞在高血清（15%）浓度中培养，年轻细胞将快速增殖，在平皿中易于观察。样品中年轻细胞的可能性因而 $<1/347$ 。仍然从衰老的胎细胞群中克隆了 7 只动物（6 只足月动物和 1 只胎）。因而偶然由不可检测的年轻细胞克隆动物是不可能的（ $p < 0.001$ ，卡方）。

本研究与 Shiels 等人的报道（20）的不同可能是由于选择供体体细胞型上的不同。例如，Wilmut 等人（12）使用静止的（ G_0 ）供体乳房上皮细胞产生多利，而在本实验中使用衰老的（ G_1 ）成纤维细胞。实际上，

最近的研究显示，端粒酶活性的重建导致端粒延长和正常人成纤维细胞的无限增殖（35，36），而使用乳房上皮细胞的类似实验不引起端粒延长和复制寿命延长（37）。提出用细胞在端粒酶延长端粒的能力上或在适应培养后激活的信号传导途径上的差异来解释这些差异（38）。但是，其他研究者报道，hTERT 的外源表达可延长端粒并使人乳房上皮细胞无限增殖化（J. Shay, 个人通信）。

以前的研究证明在牛早期胚胎形成过程中端粒酶活性明显上调（39）。本研究中端粒的延长提示，通过核移植重建的牛胚具有端粒长度再生和保持的机制，只要在附着前和附着后的发育全过程中染色体稳定。

实施例 3

利用成年供体细胞的核移植

用胎成纤维细胞供体获得的上述数据与用成年动物获得的衰老细胞进行的实验一致。皮肤成纤维细胞由 3 个 Holstein steer 培养。分离单细胞克隆，计数群体倍增直到衰老。用这些衰老或接近衰老的成纤维细胞进行核移植。在妊娠第 6 周从子宫中取出胎儿，从中分离成纤维细胞，培养直到衰老。细胞通过免疫组化分析，显示是成纤维细胞。在核移植时成年动物（计数为衰老前的 PD 数）和由其产生的 6 周龄胎的原始细胞中群体倍增的次数在表 1 中列出。从克隆胎中分离的细胞株平均经历 89.4 ± 0.9 PD，与之相比，由正常年龄相当（6 周龄）的对照胎产生的细胞株为 60.5 ± 1.7 PD（ $P < 0.0001$ ）。这些数据表明，克隆能复原（实际上延长）体细胞的寿命，胎的细胞年龄不能反映核移植前供体细胞在培养中倍增的次数。

表 1

来自正常胎和成年衰老细胞克隆群体产生的胎的成纤维细胞的群体倍增

克隆的胎	原始成年细胞在核移植时的 PD	自胎分离的成纤维细胞的 PD
25-1	0.26	90.14
25-2	0.0	91.44
14-1	4.0	89.27
14-2	1.0	90.34
22-1	2.5	85.86
正常胎		
1-1	—	59.64
2-1	—	67.37
3-1	—	60.18
3-2	—	59.82
3-3	—	55.66

实施例 4

成年供体细胞型的分析

组织活检从成年母牛的所有三个胚层中获得（在屠宰时获得）。特别是至少收集下列细胞：

外胚层—角质细胞

中胚层—皮肤成纤维细胞

内胚层—肠上皮

立即评估上述三种细胞型的一部分，以确定端粒长度。这可通过不同方法实现。所有 3 种细胞型的剩余部分培养直到衰老。在培养过程中，保留并冻存每一群体的一部分。根据特殊的群体倍增标记冻存的不同细胞样品。

此后，评价不同细胞样品的端粒长度，尤其包括在衰老时获得的细胞。

实施例 5

由成年衰老供体体细胞产生的克隆小牛

将用由实施例 4 获得的细胞获得克隆牛胎。特别是，用全部 3 种细胞型，并使用不同群体倍增的细胞，即离衰老 0.8 群体倍增的细胞，产生牛克隆。克隆牛胎基本上按照美国专利 5, 945, 577 所公开的方法产生，在此引用作为参考。在 40 天时取出克隆胎，从中分离全部 3 种类型的细胞，例如，角质细胞、皮肤纤维细胞和肠上皮细胞。

另外，也用两个同龄（40 天）野生胎回收同样 3 种细胞作为对照。这些细胞，以及从克隆胎分离的细胞，培养至衰老。

此外，在从动物或从分离后冷冻的这些细胞中分离后，立即测量这些不同类型培养细胞的端粒长度。再次取出细胞，并从不同细胞群体中冷冻直到衰老。之后对在不同细胞群体倍增时获得的不同细胞型，对来自克隆和野生型胚的培养细胞，计算端粒长度。

结果与实施例 4 的结果比较。这些实验目前正在进行。

实施例 6

年轻细胞对比老细胞中的 EPC-1 表达

比较年轻或老的人、牛细胞、克隆动物和对照中的 EPC-1 表达。结果如下。

结果表明，来自克隆动物的年轻细胞比从正常动物获得的年轻细胞更年轻，如通过 EPC-1 表达测定的。在这些细胞中，作为一种标记的端粒长度也恢复到更年轻的水平。其解释可能是，端粒在永生系中保持较长长度时具有缺陷的性质，端粒不能经常接近内部序列。因此，当从端粒向着丝粒阅读序列时， $(T_2AG_3)_n$ 重复的保真性破坏。这在下面用图显示。

衰老次要问题已经用 3'5' 核酸外切酶修饰，然后再次暴露可恢复 TRF-2 结合的 T_2AG_3 。然而，在某种程度上，损伤引发了所谓的末期细胞衰老。

Wilmut 认为，由衰老细胞克隆在动物中可产生问题，因为端粒长度

反映了体细胞供体核的端粒缩短。然而，我们的结果提示实际上相反。培养细胞至衰老或接近衰老，或关卡停滞，使细胞丢失 T_2AG_3 ，用 3'5' 核酸外切酶消除次要损伤，可提供一个机会，即，将该基因移植到去核卵母细胞或其它胚胎细胞中，随后是端粒酶活性的爆发，重建纯 T_2AG_3 束（比正常存在的要长）。这些细胞将具有更长的寿命，而且，由于 T_2AG_3 的纯度，在临时细胞周期中很少有细胞停滞。这将导致高于正常有丝分裂细胞指数，包括基因扩充的“更年轻”模式。

为了更全面地研究，用年龄相当的哺乳动物的培养物和由年轻和衰老细胞和含或不含缩短的端粒的细胞克隆的克隆样品进行实验。这些细胞生长至衰老，每 15pd 冷冻。比较这些细胞的细胞衰老标记。通过周知的方法（例如 Northern 印迹或用合适的探针标记）比较这些细胞中的基因表达。

实施例 7

核移植产生的胚中升高的端粒酶水平

为了研究端粒酶延伸的机制，在牛系统中检测了核移植（NT）后早期胚胎发育中的端粒酶活性水平。类似于以前公布的关于正常（IVF）牛胚的结果（Betts 和 King, 1999, Dev. Genetics 25:397-403），端粒酶在所分析的早期发育的所有阶段都是可检测的。对于 NT 和 IVF 对照胚胎，端粒酶活性水平在 8-16 细胞年龄时降低，然后在桑椹胚和胚泡期升高（数据未显示）。然而，NT 胚泡中的端粒酶水平比相应的 IVF 胚泡高 2 倍。

实施例 8

相对于年龄相当的对照，克隆动物超年轻的免疫功能

为了研究核移植后免疫衰老逆转的程度，并确定克隆动物是否具有比年龄相当的对照增强的免疫功能，在体外接触不同有丝分裂原后，检测了来自克隆母牛的细胞相对于来自对照母牛的细胞的免疫应答。在对 TSST（毒性休克综合征毒素，一种可诱导 T 细胞增殖的细菌超抗原）的应答，和对可诱导 T 细胞和 B 细胞增殖的商陆原有丝分裂原（PWM）

的应答方面，克隆动物和对照动物有显著差异。在培养的第 2 天和第 3 天都观察到差异。对 PHA（另一种 T 细胞有丝分裂原）的应答也观察到差异，但变化更大。对 PHA 应答观察到的差异显著性可通过检测大量受试者来确定。对 ConA（一种 T 细胞有丝分裂原）的应答的差异较小，在统计学上不显著。对于 TSST 和 PWM，差异约为 2 倍，72 小时 TSST 系统显示 2.6 倍的影响。结果在下表中列出。

未检测对有丝分裂原的体内反应，假定在接种后观察到克隆动物有增强的敏感性。然而，对记忆抗原的皮肤延迟型过敏反应的体内试验将有较低的危險，并且能用来分析体内免疫应答。

也可使用可用于分离特异细胞型的试剂进行体外试验，以检测特异细胞型（即 T 细胞亚群、B 细胞、巨噬细胞等）的应答。也可用常规方法检测特异胞质分裂的产生水平。

78 小时培养物的平均值

牛	组	非	Con_2	Con_5	PWM	PHA	TSST
C245	对照	302	39038	35334	4435	3459	4011
C246	对照	142	27124	28010	7118	1188	6025
C247	对照	327	29154	38478	6555	2373	6945

C248	对照	512	30374	32072	8046	2972	9421
C249	对照	278	56841	49533	11016	11338	15039
C250	对照	147	29912	24270	11035	2334	13575
平均		285	35407	34616	8034	3944	9169
SD		137	11277	8889	2603	3701	4367
E1	Exptl	422	64492	61135	16851	12479	22185
E8	Exptl	234	47037	43113	13496	7986	15199
E9	Exptl	472	31735	34609	9511	7130	11320
E10	Exptl	569	43051	36157	14647	10788	23357
E11	Exptl	148	49339	41446	21701	2572	44759
E12	Exptl	352	54187	45248	18829	8795	25907
平均		366	48307	43618	15841	8292	23788
SD		155	10968	9501	4273	3411	11630
P - 值		0.032	0.06	0.09	0.00	0.05	0.01
影响尺寸:		29%	36%	26%	97%	110%	159%

结论和本发明的广泛用途

如我们在此公开的，根据 Wilmut，核移植引起的体细胞中端粒的延长本身是不明显的。但甚至根据以前的结果，从衰老细胞开始将产生更好的结果（更长的端粒，更长寿的细胞）这一事实是不明显的。

尽管现在，对于将端粒缩短翻译成细胞衰老表型的机制或细胞周期的中间减缓意见很不一致。以前的文章提出，端粒重复的逐渐丢失导致

端粒基因的丢失和关键细胞功能的丧失。Woodring E. Wright 在几年前提出了一种模型，即端粒缩短移动了与端粒有关的异染色质，使端粒基因沉默，随后导致衰老。Bryant Villeponteau 发表了几乎相反的意见，即，存在与端粒有关的锥形异染色质，它随端粒缩短而缩短，这激活接近端粒的基因。Titia de Lange 在最近关于 TRF2 和 T 环的文章中提出，衰老细胞不再能结合 TRF2 和形成 T 环。然而，另一种可能性是，在端粒中“散布”着非端粒序列，其中在端粒处有更多的纯 TTAGGG，在内部较少。当体细胞中端粒缩短时，细胞逐渐遇到端粒处的非端粒序列，它们不能结合 TRF2，最终提高激活的 p53(然后 p21)的水平，引起细胞周期的减缓和最终的停止。问题是，年轻细胞增殖和突然衰老可能不是全部的现象或者没有这种现象。可能是数量逐渐增多的损伤的端粒逐渐升高 p21。

我们的结果提示，通过衰老人工去除端粒，然后在核移植后快速重新合成正确的 TTAGGG，可产生在年轻的状态下比正常细胞更长时间增殖的细胞和动物。对于进化，选择将比需要繁殖的存活更长的细胞和动物没有任何原因。因此，对于种系，产生具有比需要的更均一的 TTAGGG 的体细胞没有原因。培养细胞至衰老的技术可有效地去掉好的和坏的端粒序列，然后核移植将给予细胞比正常具有的更好的寿命潜能。即使细胞具有与正常细胞相当的端粒长度，这也是事实。这将产生长期具有较高有丝分裂指数的细胞，和老化较慢和存活更长的动物。

因此，使用端粒延长乃至没有端粒延长的核移植方法可导致端粒中新的均一 TTAGGG 重新合成。不受假说的限制，发明者们认为这可通过单独的或与其它基因（如生长停滞序列（gas 基因）、胶原酶、tPA 等）结合的端粒酶、EPC-1 的上调发生。这将产生存活更长和更健康的动物，和用于人类治疗的“超年轻”的细胞。这是第一次证明超年轻细胞，即，具有总体表型的一群细胞和组织，即比正常混合的一群年轻细胞更年轻，即，基因表达模式和有丝分裂指数比正常年轻细胞更年轻。使用端粒酶仅仅延长端粒和细胞的寿命。然而，据发明者所知，所有公开报道都没有证据表明能获得总体表型更年轻或超年轻的细胞。实际上，许多研究

人员报道，已经减缓的老的但还不是衰老的细胞继续随端粒酶缓慢但无限地分裂。

本发明的一个优选用途是使端粒短到达到希望的寿命，但使TTAGGG的均匀性最高。这将优化寿命与癌症危险的微妙平衡，即，细胞将不是组成型无限增殖的，它们没有比必需的更长的端粒，以致限制异常细胞的克隆扩充。

预计用该技术由衰老细胞克隆的动物将具有独特的性质。例如，预计为了皮毛产生的动物将更均匀的毛色，将具有增强的免疫应答，将具有更强的疾病抗性，并且具有其它优点。

如我们所说，具体的医学用途可以是用于年龄相关的疾病，如年龄相关的黄斑退化、帕金森氏症、阿尔茨海默氏病，骨关节炎、免疫衰老、皮肤老化、肺气肿、动脉瘤、冠心病、高血压、白内障、成年发作的糖尿病，等等。另外，与细胞更新加速有关的疾病如肌营养不良、带状疱疹、AIDS和肝硬化也能通过施用再生的细胞治疗。

参考文献

1. L. Hayflick, *Exp. Cell Res.* 37,614 (1965).
2. L. Hayflick 和 P.S. Moorhead, *Exp. Cell Res.* 25, 585 (1961).
3. V.J. Cristofalo 和 R.J. Pignolo, *Physiol Rev* 73, 617 (1993).
4. M.D. West, O. Pereira-Smith, J.R. Smith, *Exp. Cell Res.* 184, 138 (1989).
5. M.D. West, *Arch. Dermatol.* 130, 87 (1994).
6. C.B. Harley, A.B. Futcher, C.W. Greider, *Nature* 345,458 (1990).
7. R.C. Allsopp 和 C.B. Harley, *Exp. Cell Res.* 219, 130 (1995).
8. H. Vaziri 等人, *EMBO J.* 16, 6018 (1997).
9. R.C. Allsopp 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 10114 (1992).
10. M.Z. Levy, R.C. Allsopp, A.B. Futcher, C.W. Greider, C.B. Harley, *J Mol. Biol.* 225,951 (1992).
11. M.D. West, J.W. Shay, W.E. Wright, M.H.K. Linskens, M.H.K, *Exp. Gerontol.* 31,175 (1996).

12. I. Wilmut, A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind, K.H.S. Campbell, *Nature* 385, 810 (1997).
13. J.B. Cibelli 等人, *Science* 280, 1256 (1998).
14. K.H.S. Campbell, J. McWhir, W.A. Ritchie, I Wilmut, *Nature* 380, 64 (1996).
15. Y. Kato 等人, *Science* 262, 2095 (1998).
16. T. Wakayama, A.C.F. Perry, M. Zuccotti, K.R. Johnson, R. Yanagimachi, *Nature* 394, 369 (1998).
17. A. Baguisi 等人, *Nature Biotech* 17, 456 (1999).
18. L. Meng, J.J. Ely, R.L. Stouffer, D.P. Wolf, *Biol. Reprod* 57, 454 (1997).
19. K.R. Bondioli, *Mol. Reprod. Dev* 36, 274 (1993).
20. P.G. Shiels 等人, *Nature* 399, 316 (1999).
21. R.P. Lanza, J.B. Cibelli, M.D. West, *Nature Medicine* 5, 975 (1999).
22. R.P. Lanza, J.B. Cibelli, M.D. West, *Nature Biotechnology* 17, 1171(1999).
23. R.J. Pignolo, B.G. Martin, J.H. Horton, A.N. Kalbach, V. I. Cristofalo, *Exp. Gerontol.* 33, 67 (1998).
24. V.I. Cristofalo 和 R.J. Pignolo, *Exp. Gerontol.* 31, 111(1996).
25. S.D. Gorman 和 V.J. Cristofalo, *Exp. Cell Res.* 167, 87 (1986).
26. V.J. Cristofalo, R.J. Pignolo, M.O. Rotenberg, 老化和细胞防御机制, C. Franceschi, G. Crepaldi, V.J. Cristofalo, I. Vijg, 编(纽约) 科学院, 纽约, 1992), 187-194 页.
27. J. Lipetz 和 V.I. Cristofalo, *Ultrastruct. Res.* 39, 43 (1972).
28. G.P. Dimri 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9363 (1995).
29. R.J. Pignolo, V.I. Cristofalo, M.O. Rotenberg, *J. Biol. Chem.* 268, 8949 (1993).
30. J.R. Hill 等人, *Theriogenology* 51, 1451 (1999).

31. J.P. Renard 等人, *Lancet* 353, 1489 (1999).
32. N. Rufer 等人, *J. Exp. Med.* 190, 157 (1999).
33. N. Rufer, W. Dragowska, G. Thornbuiy, E. Roosnek, P. M. Lansdorp, *Nature Biotechnol.* 16, 743 (1998).
34. C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider, *Nature* 345, 458 (1990).
35. A.G. Bodnar 等人, *Science* 279, 349 (1998).
36. H. Vaziri 和 S. Benchimol, *Curr. Biol.* 8, 279 (1998).
37. T. Kiyono 等人, *Nature* 396, 84 (1998).
38. T. de Lange 和 R.A. DePinho, *Science* 283, 947 (1999).
39. D.H. Betts 和 W.A. King, *Dev. Genetics* 25, 397 (1999).
40. V.J. Cristofalo 和 B.B. Sharf, *Exp. Cell Res.* 76, 419(1973).
41. P. Chomczynski 和 N. Sacchi, *Anal. Biochem* 162, 156 (1987).
42. D.G. Phiriney, C.L. Keiper, M.K. Francis, K. Ryder, *Oncogene* 9, 2353 (1994).
43. J.R. Smith, R.G. Whitney, *Science* 207, 82-84 (1979).

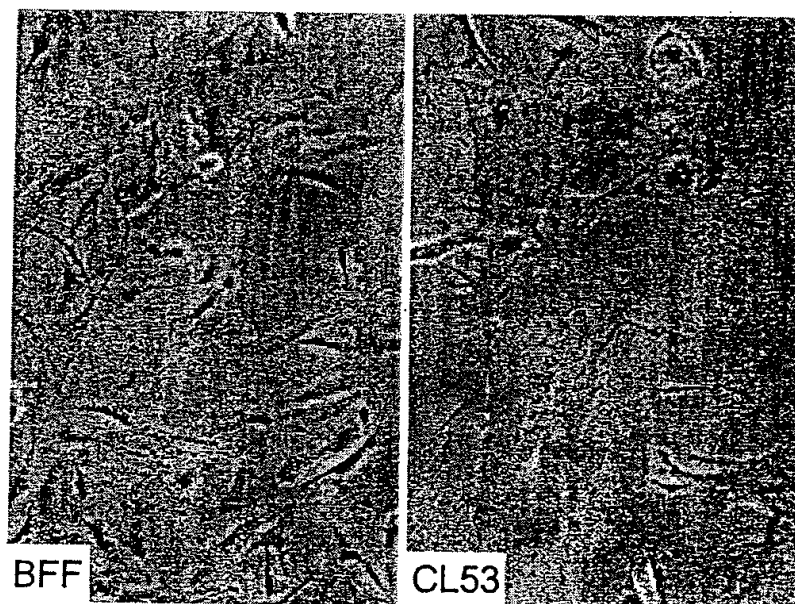


图1A

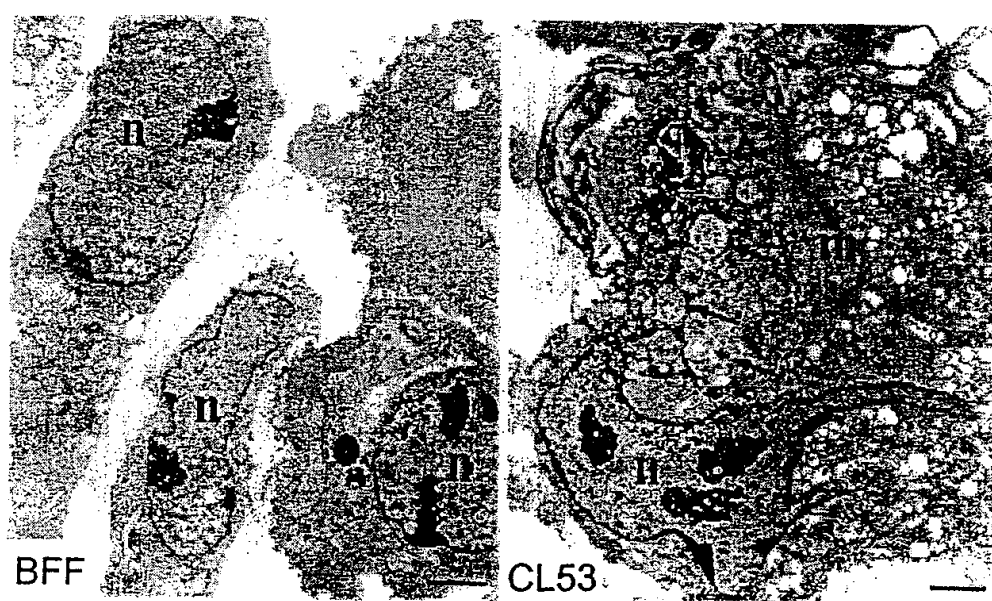


图1B

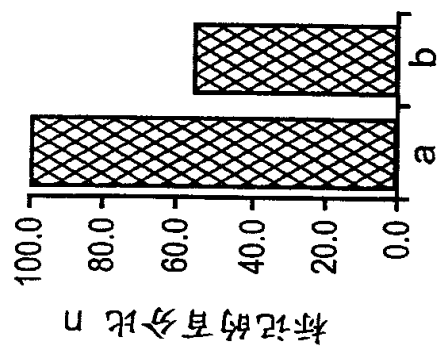


图1C

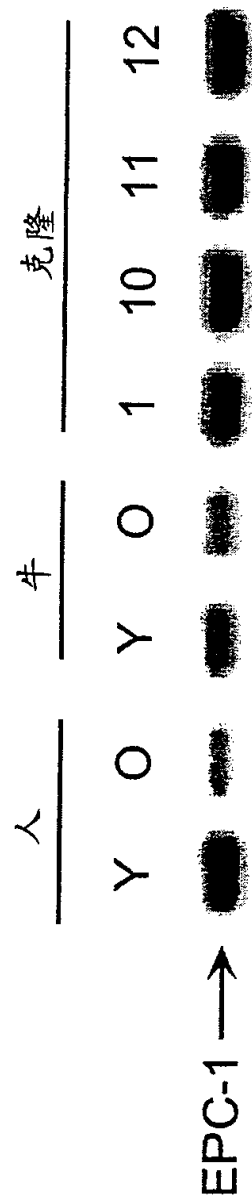


图1D



图2A

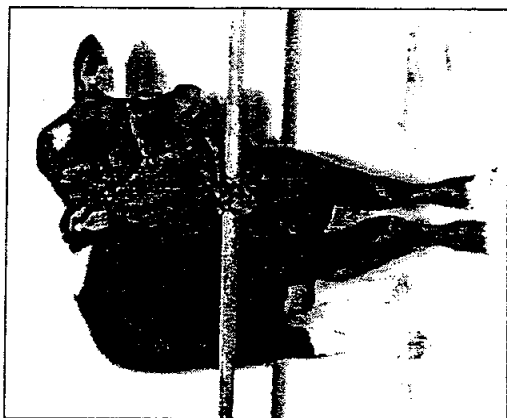


图2B

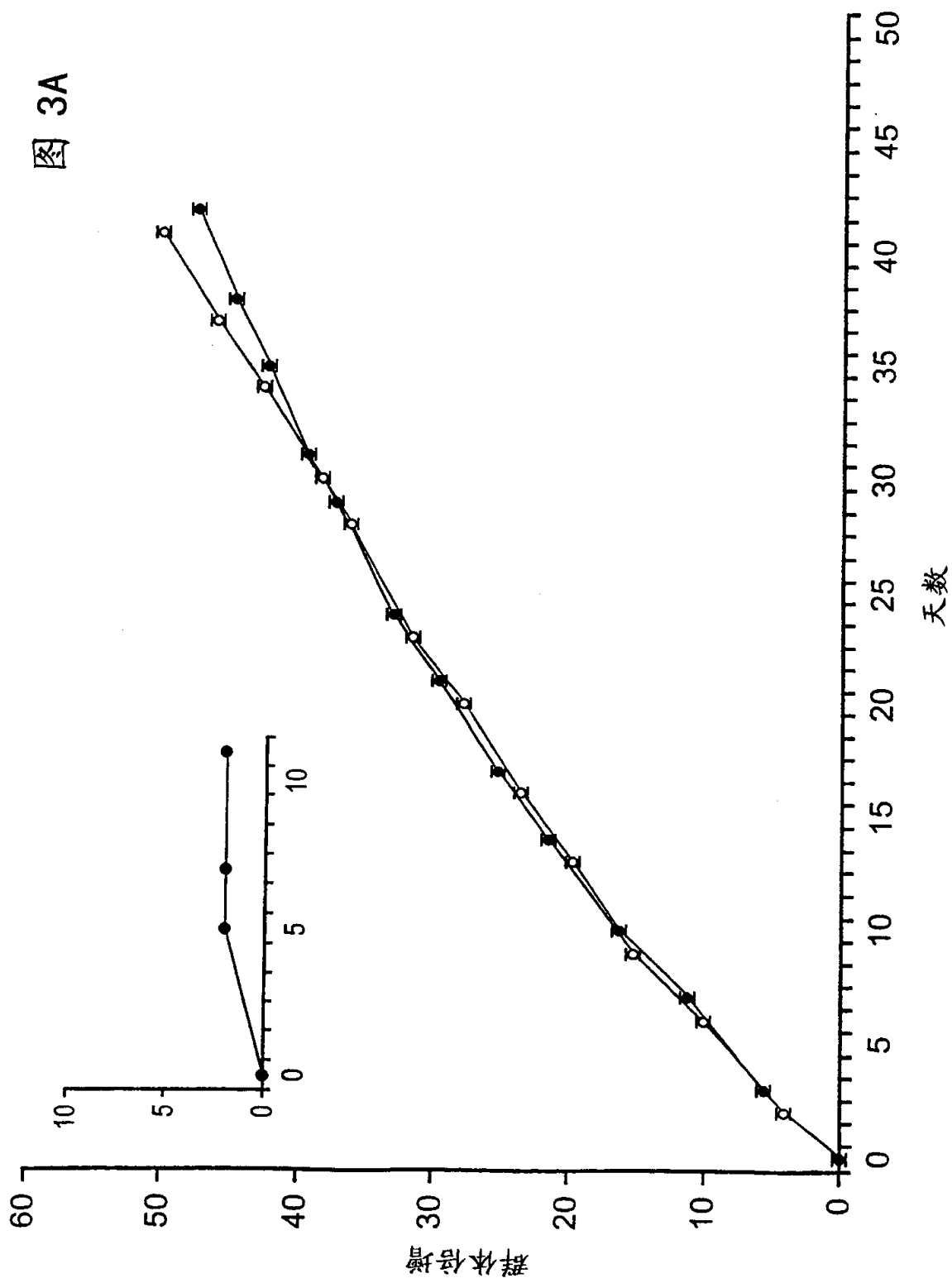


图 3A

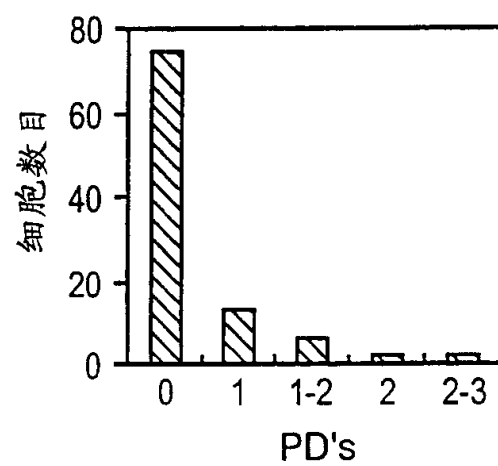


图3B

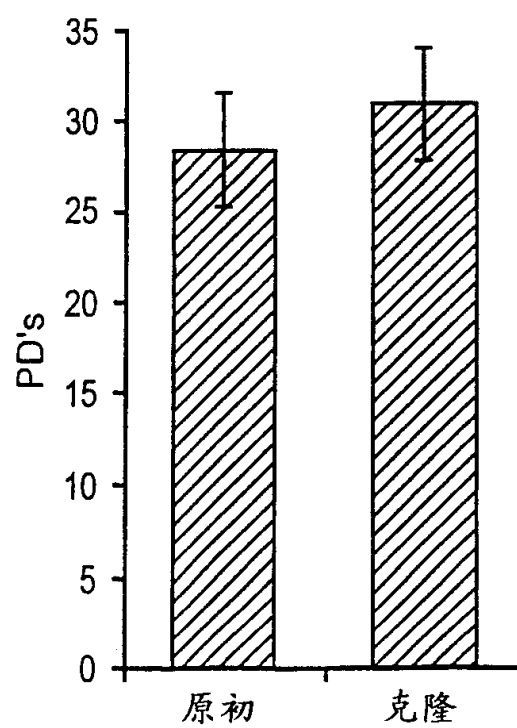


图3C

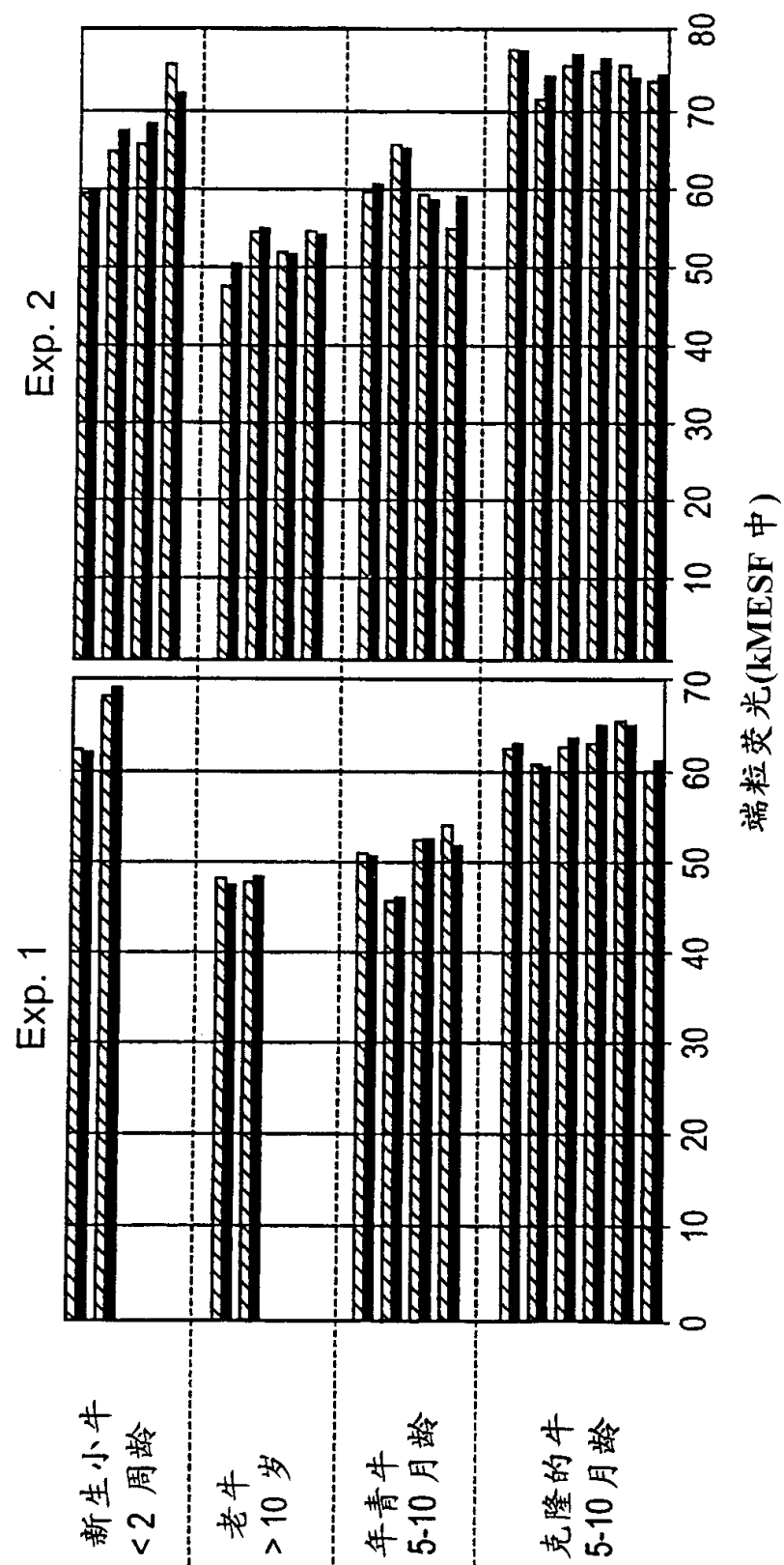


图4A

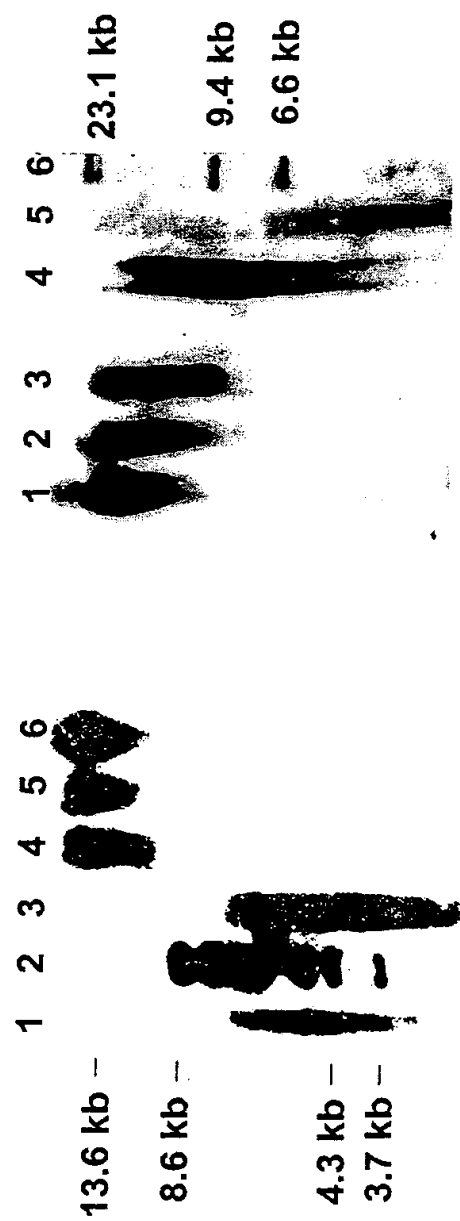


图4B

图4C

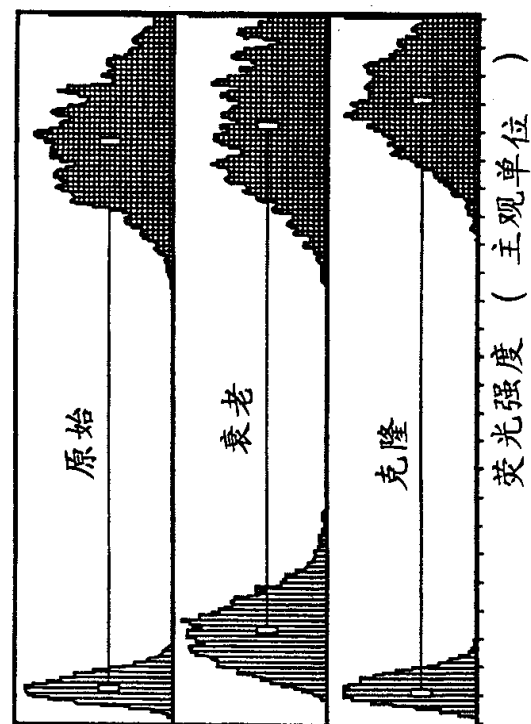


图 4D

K562	20 bp 梯度	无模板	热处理	1	1/10	1/100	1/1000	4000 细胞	无模板	热处理	20 bp 梯度
------	----------	-----	-----	---	------	-------	--------	---------	-----	-----	----------

胚	细胞系
---	-----

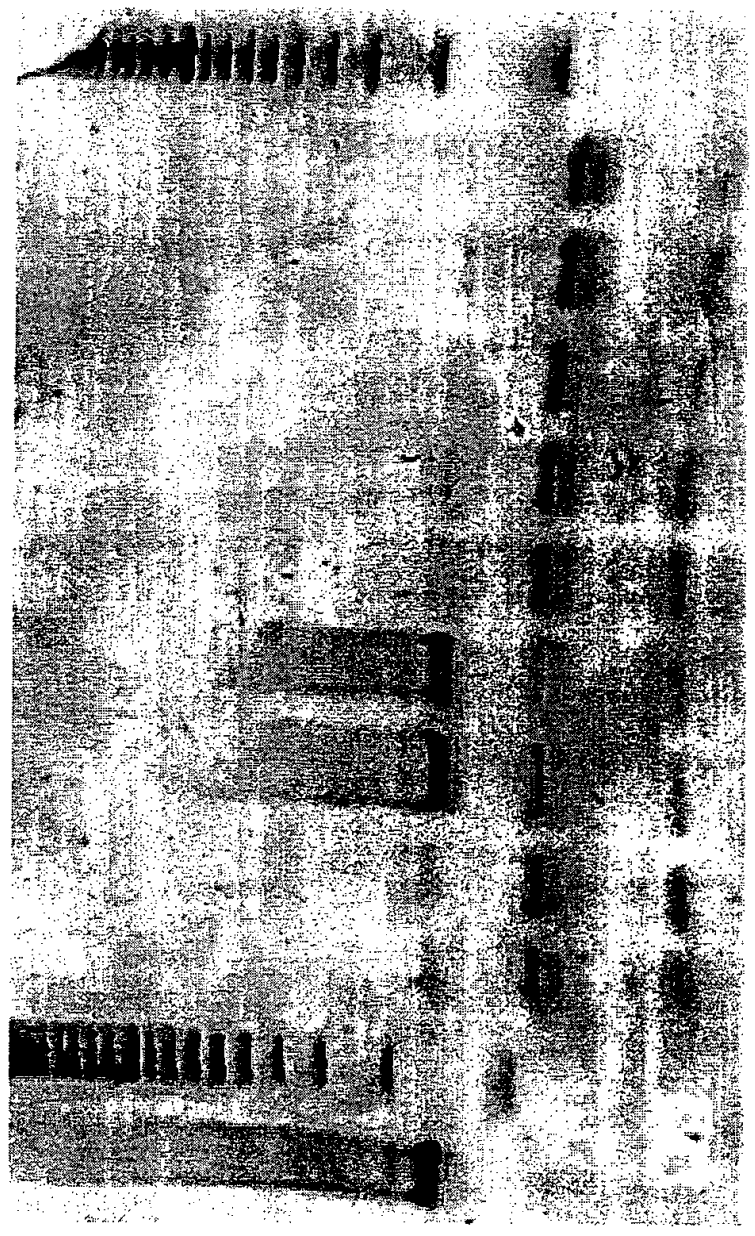


图5