



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105441385 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201510660811. 9

(22) 申请日 2008. 02. 22

(30) 优先权数据

60/902, 970 2007. 02. 23 US

60/918, 543 2007. 03. 16 US

60/993, 772 2007. 09. 14 US

61/009, 432 2007. 12. 28 US

(62) 分案原申请数据

200880013190. 3 2008. 02. 22

(71) 申请人 奥卡塔治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 R·兰扎 Y·程

(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 11038

代理人 郑天松

(51) Int. Cl.

G12N 5/0735(2010. 01)

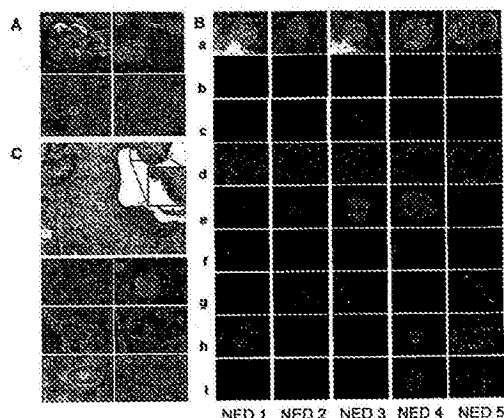
权利要求书2页 说明书80页 附图13页

(54) 发明名称

重编程分化细胞和从重编程的细胞产生动物
和胚胎干细胞的高效方法

(57) 摘要

本发明总体来说涉及体细胞核移植 (SCNT) 领域, 以及克隆动物和细胞的产生。本公开内容涉及使用卵母细胞和受精胚胎克隆哺乳动物、获得多能细胞比如胚胎干细胞或用于重编程哺乳动物细胞的方法。



1. 一种产生胚胎干(ES)细胞的方法,其包括:
 - (a)将从哺乳动物母体胚胎活体解剖的哺乳动物卵裂球和所述母体胚胎一起培养6~12小时、6~18小时、6~24小时、12~18小时、12~24小时或18~24小时;
 - (b)将所述卵裂球转移至进一步包含层粘连蛋白的胚泡培养基;及
 - (c)培养(b)的卵裂球,直至产生ES细胞。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括(d)测定ES细胞或源于其的细胞的核型。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述母体胚胎保持有活力。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(b)的胚泡培养基接种有小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(c)包括在降低卵球形成的条件下培养。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述胚泡培养基包含至少2.5 μ g/ml层粘连蛋白。
7. 根据权利要求5所述的方法,其中步骤(c)包括在胚泡培养基中培养5天。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(c)进一步包括:培养至所述卵裂球形成约20个细胞的细胞团块,并将所述细胞团块转移至接种有ES细胞的培养基。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述ES细胞表达标志物或被标记。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述母体胚胎被转移至胚泡培养基并被允许发育成胚泡。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述卵裂球是通过包括下列步骤的方法从胚胎分离的:
 - (a)固定所述胚胎;和
 - (b)轻打固定的胚胎直至卵裂球分离。
12. 一种产生胚胎干(ES)细胞的方法,其包括:
 - (a)培养从哺乳动物母体胚胎活体解剖的卵裂球,其中所述母体胚胎保持有活力;
 - (b)将所述卵裂球转移至进一步包含层粘连蛋白的胚泡培养基;
 - (c)培养(b)的卵裂球,直至产生ES细胞;及
 - (d)测定ES细胞或源于其的细胞的核型。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中步骤(c)包括在降低卵球形成的条件下培养。
14. 根据权利要求12所述的方法,其中所述胚泡培养基包含至少2.5 μ g/ml层粘连蛋白。
15. 根据权利要求12所述的方法,其中所述母体胚胎被转移至胚泡培养基并被允许发育成胚泡。
16. 根据权利要求12所述的方法,其中所述卵裂球是通过包括下列步骤的方法从胚胎分离的:
 - (a)固定所述胚胎;和
 - (b)轻打固定的胚胎,直至卵裂球分离。
17. 根据权利要求12所述的方法,其中(a)的卵裂球与所述哺乳动物母体胚胎一起培养。
18. 根据权利要求12所述的方法,其中所述卵裂球不与先前得到的人类干细胞一起培养。

19. 一种产生胚胎干(ES)细胞的方法,其包括:

(a) 将从哺乳动物母体胚胎活体解剖的卵裂球在多能细胞、胞外基质或两者的存在下培养,其中所述母体胚胎保持有活力;

(b) 将所述卵裂球转移至胚泡培养基,并培养直至所述卵裂球产生卵裂球后代细胞的团簇,和

(c) 培养(b)的卵裂球,直至产生ES细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述卵裂球在选自下列的多能细胞的存在下培养:胚胎干细胞、胚胎生殖细胞和胚胎癌细胞。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中步骤(c)包括在降低卵球形成的条件下培养。

22. 根据权利要求19所述的方法,其中所述卵裂球在选自下列的胞外基质的存在下培养:纤连蛋白、胶原、生腱蛋白、弹性蛋白、玻连蛋白、黏结蛋白聚糖、蛋白聚糖或层粘连蛋白、或者它们的组合。

23. 根据权利要求21所述的方法,其中步骤(c)包括在接种有MEF细胞的胚泡培养基中培养5天。

24. 根据权利要求19所述的方法,其中步骤(c)进一步包括:培养至所述卵裂球形成约20个细胞的细胞团块,并将所述细胞团块转移至接种有ES细胞的培养基。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述ES细胞表达标志物或被标记。

26. 根据权利要求19所述的方法,其中所述母体胚胎被转移至胚泡培养基并被允许发育成胚泡。

27. 根据权利要求19所述的方法,其中所述卵裂球是通过包括下列步骤的方法从胚胎分离的:

(a) 固定所述胚胎;和

(b) 轻打固定的胚胎直至卵裂球分离。

28. 组合物,其包含:

(a) 至少一种分离的哺乳动物卵裂球,或所述至少一种卵裂球的多能性或分化的后代细胞;及

(b) 至少一种细胞或因子,其促进所述至少一种卵裂球或其多能性或分化的后代细胞的生长。

29. 权利要求28的组合物,其中所述促进所述至少一种卵裂球或其多能性或分化的后代细胞的生长的细胞是ES细胞、EC细胞或胚胎成纤维细胞。

30. 权利要求28的组合物,其中所述促进所述至少一种卵裂球或其多能性或分化的后代细胞的生长的细胞对于所述卵裂球或其后代是自体的。

31. 权利要求28的组合物,其中所述促进所述至少一种卵裂球或其多能性或分化的后代细胞的生长的因子是细胞外基质蛋白。

32. 权利要求31的组合物,其中所述细胞外基质蛋白是纤连蛋白、胶原、腱糖蛋白、弹性蛋白、玻连蛋白、多配体聚糖、蛋白聚糖、或层粘连蛋白、或其组合。

重编程分化细胞和从重编程的细胞产生动物和胚胎干细胞的高效方法

[0001] 本申请是2008年2月22日提交的同名发明专利申请200880013190.3的分案申请。

【发明领域】

[0002] 本发明总体来说涉及体细胞核移植(SCNT)领域,以及动物和细胞的产生。

【相关申请】

[0004] 本申请要求2007年2月23日提交的美国临时申请第60/902,970号、2007年3月16日提交的美国临时申请第60/918,543号、2007年9月14日提交的美国临时申请第60/993,772号和2007年12月28日提交的美国临时申请第61/009,432号的权益,其内容通过引用整体并入。

【发明背景】

[0006] 干细胞技术比如人类胚胎干细胞(“hES”细胞)的分离和体外增殖的进步构成了医学研究的重要新领域。hES细胞具有证实的以未分化状态增殖然后接着被诱导分化为人体的任何以及全部细胞类型(包括复杂的组织)的潜能。这已导致由细胞功能异常造成的许多疾病可以通过施用各种分化类型的hES衍生细胞来治疗的提议(Thomson等人,Science 282:1145-1147(1998))。核移植研究已证实,可能将分化的体细胞转化回到全能状态,比如胚胎干细胞(“ES”)的全能状态(Cibelli等人,Nature Biotech 16:642-646(1998))或胚胎衍生的(“ED”)细胞的全能状态。重编程体细胞回到全能ES细胞状态的技术的发展,比如通过将体细胞的基因组移植到去核卵母细胞并随后培养所重构建的胚胎以产生ES细胞,通常被称为体细胞核移植(“SCNT”),提供了移植具有患者的核基因型的ES衍生的体细胞的方法(Lanza等人,Nature Medicine 5:975-977(1999))。预期此类细胞和组织将不会被排斥,虽然存在异基因线粒体(Lanza等人,Nature Biotech 20:689-696,(2002))。核移植还允许通过重新活化早期胚胎中的端粒末端转移酶催化组分来重建细胞中的端粒重复序列长度(Lanza等人,Science 288:665-669,(2000))。尽管如此,仍需要对重编程动物细胞的方法进行改进,以增加成功和完全重编程的频率。也需要降低对人类卵母细胞可用性的依赖。

[0007] 长期以来一直需要具有某些期望的性状或特性,比如增加的重量、乳含量(milk content)、乳产生体积、泌乳间隔长度和疾病抗性的动物。传统的育种方法能够产生具有一些明确需要的性状的动物,但是这些性状通常伴有许多不期望的特性,并且通常开发太过耗时、成本高且不可靠。此外,这些方法完全不能允许特定的动物品系产生相关物种的遗传互补体(genetic complement)中完全不存在的基因产物,比如期望的蛋白治疗剂(即,牛奶中人类或人源化的血浆蛋白或其他分子)。

[0008] 能够产生转基因动物的技术的开发提供了异常精确地生产动物的手段,所述动物被改造为携带特定性状或设计为表达具有治疗、科学或商业价值的某些蛋白或其他分子化合物。也就是说,转基因动物是携带感兴趣的基因的动物,所述感兴趣的基因在发育的早期阶段被有意引入现有体细胞和/或种系细胞。随着动物的发育和生长,改造到动物的蛋白产物或特定的发育变化变得明显,并存在于它们的遗传互补体和它们的后代的遗传互补体。

[0009] 与现有干细胞技术有关的另一个问题是使用晚期人类胚胎(advanced human embryos)获得干细胞的伦理考虑。因此,在早期获得克隆胚胎对于限制伦理关注将是高度有益的。

[0010] 总之,本发明解决了有关效率的长期突出的问题、伦理困境,和如何不用卵母细胞克隆胚胎的问题。

[0011] 【发明概述】

[0012] 本发明整体来说涉及使用受精胚胎作为接受者克隆体细胞的方法。在某些实施方案中,卵母细胞为初始接受者,而受精胚胎是第二接受者。在某些实施方案中,本公开内容涉及克隆哺乳动物、获得多能细胞或重编程哺乳动物细胞的方法。

[0013] 在某些方面,本公开内容提供重编程分化细胞的核的方法,所述方法包括如下步骤:提供动物的分化细胞、去核的MII阶段卵,并提供动物的去核的2-细胞阶段胚胎,其中所述MII阶段卵和所述胚胎是同步的;将所述分化细胞的核注射入所述去核的卵;活化包含所述核的所述卵;允许包含所述核的所述活化的卵发育至2-细胞阶段;取出前一步骤的所述活化的2-细胞阶段卵的至少一个核和至少一部分周围细胞质;将前一步骤中取出的所述至少一个核融合入所述去核的2-细胞阶段胚胎(优选地通过将所述核放置到所述2-细胞阶段胚胎的2个细胞之间),以产生含有所述分化细胞的重编程的核的单个细胞。

[0014] 在某些方面,本公开内容提供产生动物的方法,所述方法包括提供动物的分化细胞、去核的MII阶段卵,并提供动物的去核的2-细胞阶段胚胎,其中所述MII阶段卵和所述胚胎是同步的;将所述分化细胞的核注射入所述去核的卵;活化包含所述核的所述卵;允许包含所述核的所述活化的卵发育至2-细胞阶段;取出前一步骤的所述2-细胞阶段卵的至少一个核和至少一部分周围细胞质;将前一步骤中取出的所述至少一个核融合入所述去核的2-细胞阶段胚胎,以产生单个细胞;并培养来自前一步骤的所述单个细胞以允许发育成动物。在某些实施方案中,培养包括将所述培养的细胞植入动物的子宫。在某些实施方案中,所植入的细胞和它们所植入的动物是相同物种。

[0015] 在某些方面,本公开内容提供产生胚胎干细胞的方法,所述方法包括如下步骤:提供动物的分化细胞、去核的MII阶段卵,并提供动物的去核的2-细胞阶段胚胎,其中所述MII阶段卵和所述胚胎是同步的;将所述分化细胞的核注射入所述去核的卵;活化包含所述核的所述卵;允许包含所述核的所述活化的卵发育至2-细胞阶段;取出前一步骤的所述2-细胞阶段卵的核和周围细胞质;将前一步骤中取出的所述核融合入所述去核的2-细胞阶段胚胎(优选地通过将所述核放置到所述2-细胞阶段胚胎的2个细胞之间,以产生单个细胞;和将来自前一步骤的所述单个细胞培养至其中可衍生胚胎干细胞的发育阶段。

[0016] 在某些实施方案中,所述胚胎干细胞是MHC等位基因半合的或纯合的,其中所述分化细胞是MHC等位基因半合的或纯合的,或所述胚胎干细胞通过同源重组或通过损失杂合性或二者被改造为MHC等位基因半合的或纯合的,并且其中所述相同物种是人类。在某些实施方案中,重复所述方法许多次以产生胚胎干细胞的库,每个胚胎干细胞是与所述库的其他胚胎干细胞不同的MHC等位基因半合的或纯合的。

[0017] 在某些方面,本公开内容的方法进一步包括将从前述方法获得的单个细胞培养至卵裂球、桑椹胚或胚泡阶段的步骤。在某些方面,本公开内容的方法进一步包括至卵母细胞的连续核移植。在某些方面,本公开内容的方法进一步包括至胚胎的连续核移植。

[0018] 在某些实施方案中,所述卵被放线酮(cyclohexamide)、CsCl₂、钙离子载体(ionopore)、离子霉素、精子因子(sperm factors)、精子部分或组分、6-DMAP、SrCl₂、松胞菌素B或其组合活化。在某些实施方案中,所述卵被这些试剂的组合活化。在一优选的实施方案中,所述卵被离子霉素和6-DMAP的组合活化。在另一优选的实施方案中,所述卵被钙离子载体和6-DMAP的组合活化。在另一优选的实施方案中,所述卵被SrCl₂和松胞菌素B的组合活化。

[0019] 在某些实施方案中,所述融合步骤是电执行的。在某些实施方案中,所述电融合是以两个步骤执行的:其中将所述核与阳极对齐并电冲击的第一步骤,和其中将所述胚胎和所述核旋转大约90度并电冲击的第二步骤。在某些实施方案中,所述胚胎和所述核在冲击前未旋转。在某些实施方案中,所述融合步骤是使用仙台病毒执行的。

[0020] 在某些实施方案中,所述MII阶段卵是人类卵。在某些实施方案中,所述去核的2-细胞阶段胚胎是人类胚胎。在某些实施方案中,所述分化细胞是人类细胞。在某些实施方案中,本公开内容的细胞可来自任何哺乳动物。在又一实施方案中,所述哺乳动物选自小鼠、大鼠、猫、狗、兔、山羊、仓鼠、猪、绵羊、非人灵长类或灵长类。

[0021] 在某些实施方案中,所述MII阶段卵和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自任何动物。在某些实施方案中,所述MII阶段卵和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。在某些实施方案中,所述分化细胞和所述MII阶段卵来自相同物种。在某些实施方案中,所述分化细胞和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。在某些实施方案中,所述分化细胞、所述MII-阶段卵和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。在某些实施方案中,所述相同物种是人类。

[0022] 在某些方面,本公开内容涉及克隆哺乳动物、获得多能细胞或重编程哺乳动物细胞的方法。在某些实施方案中,所述方法由以下步骤组成:(a)从哺乳动物细胞获得供体核;(b)从哺乳动物获得受精胚胎;(c)将所述供体核移植到所述受精胚胎的一个细胞;(d)对所述受精胚胎的原始核进行去核,使所述供体核居留于所述受精胚胎;和(e)培养所述受精胚胎。

[0023] 在某些实施方案中,本申请方法的去核步骤在核移植步骤的3和6小时之间、核移植步骤的4和6小时之间、核移植步骤的5和6小时之间、核移植步骤的3和4小时之间、核移植步骤的3和5小时之间或核移植步骤的4和5小时之间执行。在某些实施方案中,所述去核步骤在核移植步骤的3小时内、核移植步骤的2小时内或核移植步骤的1小时内执行。在某些实施方案中,所述去核步骤在核移植步骤的1和2小时之间、核移植步骤的1和3小时之间、核移植步骤的1和4小时之间、核移植步骤的1和5小时之间、核移植步骤的1和6小时之间、核移植步骤的2和3小时之间、核移植步骤的2和4小时之间、核移植步骤的2和5小时之间,或核移植步骤的2和6小时之间执行。

[0024] 在本公开内容的某些实施方案中,培养克隆的胚胎造成胚泡或胚泡样细胞集群(collection)的发育。在某些实施方案中,胚胎干细胞可衍生自这些胚泡或胚泡样细胞集群。在某些其他实施方案中,培养克隆的胚胎造成4-8细胞阶段胚胎或桑椹胚阶段胚胎的发育。在某些实施方案中,胚胎干细胞可衍生自所有或部分此类早期分裂阶段或桑椹胚阶段胚胎。在某些其他实施方案中,培养克隆的胚胎造成在2-细胞阶段之后继续分裂的胚胎的发育。在某些实施方案中,衍生并建立了胚胎干细胞系。

[0025] 在本公开内容的某些方面,受精胚胎来自与哺乳动物供体细胞相同物种的哺乳动物。在本公开内容的某些实施方案中,受精胚胎来自与哺乳动物供体细胞为近缘物种的哺乳动物。在本公开内容的某些实施方案中,受精胚胎是前核阶段胚胎。在某些实施方案中,所述受精胚胎是2-细胞阶段胚胎。在本公开内容的某些实施方案中,哺乳动物供体细胞是ES细胞。在某些实施方案中,所述哺乳动物细胞是分化细胞。在某些实施方案中,所述分化哺乳动物细胞是卵丘细胞。在某些实施方案中,所述哺乳动物细胞是鼠细胞。在某些实施方案中,所述哺乳动物细胞是牛细胞。在某些实施方案中,所述哺乳动物细胞是人类细胞。在某些实施方案中,细胞可来自其它哺乳动物物种,包括但不限于,马、犬、猪、羊来源;或可使用啮齿动物物种比如小鼠。在某些实施方案中,受精胚胎经历低温保存,并在核移植步骤前融化。

[0026] 在某些实施方案中,供体核是标记的。在某些实施方案中,所述核通过表达荧光转基因标记。

[0027] 某些方面,本公开内容涉及克隆哺乳动物细胞的方法,所述方法包括如下步骤:(a)从哺乳动物细胞获得供体核;(b)从哺乳动物获得第一受精胚胎;(c)将所述供体核移植到所述第一受精胚胎;(d)对所述第一受精胚胎的原始核进行去核,使所述供体核居留于所述受精胚胎;(e)培养所述受精胚胎;(f)对第二受精的哺乳动物胚胎进行去核;(g)使步骤(e)的所述第一受精胚胎的细胞分开,并将至少一个细胞移植到去核的第二受精胚胎;(h)使所述移植的细胞与所述去核的第二受精胚胎的细胞融合,以形成单个细胞胚胎;和(i)培养所述克隆的单个细胞胚胎。

[0028] 在某些实施方案中,步骤(f)-(i)循环超过一次,其用步骤(g)中获得的受精胚胎,从前一循环的步骤(i)开始。在某些实施方案中,步骤(h)(融合步骤)通过电融合实现。在某些实施方案中,步骤(g)包括将步骤(e)的受精胚胎的至少一个核移植到去核的第二受精胚胎。

[0029] 在某些实施方案中,本公开内容的第二受精胚胎与第一受精胚胎处于相同的发育阶段。在某些实施方案中,本公开内容的第二受精胚胎与第一受精胚胎处于相似的发育阶段。相似的阶段可包括处于相同的总阶段比如囊胚阶段的胚胎或具有相似的细胞数阶段发育时间的胚胎。在某些实施方案中,所述第二受精胚胎和所述第一受精胚胎处于2-细胞阶段,并且仅移植两个细胞中的一个。

[0030] 在某些方面,本公开内容涉及克隆哺乳动物、获得多能细胞或重编程哺乳动物细胞的方法,所述方法包括如下步骤:(a)从哺乳动物细胞获得期望的供体核;(b)从哺乳动物获得至少2-细胞阶段的至少一个受精胚胎;(c)将供体核移植到所述受精胚胎的一个或多个但不是所有细胞,每个细胞一个供体核;(d)对其中移植了供体核的所述胚胎的每个细胞的原始核进行去核,使所述供体核留在所述细胞中;和(e)培养所述受精胚胎。

[0031] 在某些实施方案中,本公开内容的受精胚胎是2-细胞阶段胚胎,且供体核仅移植到所述胚胎的两个细胞中的一个。在各种实施方案中,本公开内容的受精胚胎可以是任何阶段的胚胎。在某些实施方案中,本公开内容的活化的卵母细胞是2细胞阶段核移植的接受者。在某些实施方案中,所述卵母细胞是任何阶段的。在某些实施方案中,所述卵母细胞和所述胚胎处于同步。

[0032] 在某些实施方案中,移植供体核步骤刚好在去核步骤之前执行。

[0033] 在某些方面,本公开内容涉及衍生自受精胚胎的胚胎,其中所述受精胚胎是通过本公开内容的任何方法产生的。在某些实施方案中,本公开内容涉及通过本公开内容的任何方法产生的囊胚。

[0034] 在前述任何的某些实施方案中,胚胎干细胞或胚胎干细胞系可使用克隆胚胎的全部或部分产生。例如,胚胎干细胞或细胞系可使用胚胎阶段克隆胚胎的全部或部分或使用早期分裂阶段或桑椹胚阶段胚胎的全部或部分产生。

[0035] 在某些方面,本公开内容涉及产生胚胎干细胞的方法,所述方法包括如下步骤:(a)提供动物的分化细胞、去核的MII阶段卵,并提供动物的去核的2-细胞阶段胚胎,其中所述MII阶段卵和所述胚胎是同步的;(b)将所述分化细胞的核注射入所述去核的卵;(c)活化包含所述核的所述卵;(d)允许包含所述核的所述活化的卵发育至2-细胞阶段;(e)取出步骤(d)的所述2-细胞阶段卵的核和周围细胞质;(f)将步骤(e)中取出的所述核融合入所述去核的2-细胞阶段胚胎(优选地通过将所述核放置到所述2-细胞阶段胚胎的2个细胞之间),以产生单个细胞;和(g)培养来自步骤(f)的所述单个细胞至可衍生胚胎干细胞的发育阶段,其包括:(i)培养来自(f)的所述单个细胞至桑椹胚阶段以产生桑椹胚;(ii)从所述桑椹胚分离卵裂球;(iii)培养所述卵裂球以产生两个或多个卵裂球的团簇;(iv)使培养的两个或多个卵裂球的团簇与胚胎细胞或胎儿细胞直接或间接接触;和(v)培养(iv)的两个或多个卵裂球的团簇,直至产生ES细胞。

[0036] 在某些方面,本公开内容涉及产生胚胎干(ES)细胞的方法,所述方法包括:(a)将从哺乳动物母体胚胎取出或活体解剖的卵裂球和所述哺乳动物母体胚胎一起培养12至18小时;(b)将所述卵裂球转移至进一步包含层粘连蛋白并接种有小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的胚胎培养基,和(c)培养(b)的卵裂球,直至产生ES细胞。

[0037] 在某些方面,本公开内容涉及产生胚胎干(ES)细胞的方法,所述方法包括:(a)将从哺乳动物母体胚胎取出或活体解剖的卵裂球和所述哺乳动物母体胚胎一起培养;(b)将所述卵裂球转移至进一步包含层粘连蛋白或纤连蛋白的胚胎培养基,和(c)培养(b)的卵裂球,直至产生ES细胞。

[0038] 在某些方面,本公开内容涉及产生胚胎干细胞的方法,所述方法包括如下步骤:(a)提供动物的去核的MII-阶段卵、动物的分化细胞和去核的2-细胞阶段胚胎,其中所述MII阶段卵和所述胚胎是同步的;(b)将所述分化细胞的核注射所述去核卵;(c)活化包含所述核的所述卵;(d)允许包含所述核的所述活化的卵发育至2-细胞阶段;(e)取出步骤(d)的所述2-细胞阶段卵的核和周围细胞质;(f)将步骤(e)中取出的所述核融合入所述去核的2-细胞阶段胚胎(优选地通过将所述核放置到所述2-细胞阶段胚胎的2个细胞之间),以产生单个细胞;(g)培养来自步骤(f)的所述单个细胞以产生桑椹胚;(h)从所述桑椹胚(如,为母体胚胎的桑椹胚)分离卵裂球;(i)将所述卵裂球和所述母体胚胎一起培养12至18小时;(j)将所述卵裂球转移至进一步包含层粘连蛋白或纤连蛋白并接种有小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的胚胎培养基,和(k)培养(j)的卵裂球,直至产生ES细胞。

[0039] 在某些实施方案中,MEF被减数分裂灭活。在某些实施方案中,步骤(c)包括在降低卵球形成的条件下培养。

[0040] 在某些实施方案中,所述胚胎培养基包含2.5 μ g/ml层粘连蛋白。在某些实施方案中,所述胚胎培养基包含10 μ l/ml层粘连蛋白。在某些实施方案中,所述胚胎培养基包含约

2.5、5、7.5、10、15或20 μ g/ml层粘连蛋白。在某些实施方案中,所述培养基补充有1-5、1-10、5-10、10-20或1-20 μ g/ml层粘连蛋白。在某些实施方案中,所述培养基补充有至少1、2.5、5、7.5、10、15或20 μ g/ml层粘连蛋白。

[0041] 在某些实施方案中,上述方法的步骤(c)包括在接种有MEF细胞的胚泡培养基中培养5天。在某些实施方案中,在接种有MEF细胞的胚泡培养基中的培养进行1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天。在某些实施方案中,上述方法的步骤(c)进一步包括培养至所述卵裂球形成约20个细胞的细胞团块,并将所述细胞团块转移至接种有ES细胞的培养基。在某些实施方案中,细胞团块是约5、10、15、20、30、40或50个细胞。在某些实施方案中,所述ES细胞表达标志物或被标记。在某些实施方案中,所述ES细胞表达GFP。在某些实施方案中,将所述母体胚胎转移至胚泡培养基,并允许其发育成胚泡。在某些实施方案中,所述卵裂球是从胚胎分离的,包括:(a)固定所述胚胎;和(b)轻打固定的胚胎直至卵裂球分离。

[0042] 在某些实施方案中,从母体胚胎中取出或活体解剖多于一个卵裂球。例如,可从母体胚胎活体解剖两个卵裂球,并将其用于衍生ES细胞。

[0043] 在某些实施方案中,使用不需要和/或不造成胚胎破坏的方法产生胚胎干细胞。例如,当从桑椹胚阶段母体胚胎的单个卵裂球产生胚胎干细胞时,所述母体胚胎的剩余部分可随后冷冻以便长期或永久贮藏,或用于产生怀孕。

[0044] 在某些实施方案中,将从哺乳动物母体胚胎取出或活体解剖的卵裂球和所述哺乳动物母体胚胎一起培养约6至12、6至18、6至24、12至18、12至24或18至24小时。

[0045] 本申请考虑了单独使用这些方面的任何一个,或使用本发明任何前述或以下方面和实施方案的组合。

[0046] **【附图简述】**

[0047] 图1A-1B显示通过连续克隆(serial cloning)程序克隆的小鼠胚胎。GFP阳性ES细胞核注射入接受者胚胎。胚胎在明视野(A)和紫光显微术(B)下显示。

[0048] 图2A-2C显示在辅助细胞存在下,2细胞克隆的胚胎的发育。注射的GFP阳性ES细胞核形成能够发育至4-细胞阶段(A)、8-细胞阶段(B)和胚泡阶段(C)的镶嵌胚胎。

[0049] 图3显示克隆的F2GFP小鼠。10周龄F2GFP小鼠在紫外线(箭头)下发射绿色紫光。

[0050] 图4显示GFP克隆小鼠遗传组成的确认。

[0051] 图5显示DBA2克隆1指纹分析。

[0052] 图6显示F2GFP卵丘细胞克隆的胚胎中的H19基因表达。

[0053] 图7显示F2GFP卵丘细胞克隆的胚胎中的IGF-2基因表达。

[0054] 图8显示F2GFP卵丘细胞克隆的胚胎中的Oct-4基因表达。

[0055] 图9A-9C显示连续克隆胚胎的ES细胞标志物和ES细胞畸胎瘤形成。(A)ES细胞标志物。(B)畸胎瘤。(C)嵌合幼畜。

[0056] 图10显示核移植和连续核移植方法的示意图。

[0057] 图11A-C显示单个卵裂球的hESC系的衍生和表征而不破坏胚胎。图板A:从单个卵裂球的hES细胞衍生阶段。(a)-卵裂球活组织检查,(b)-活体解剖的卵裂球(箭头)和母体胚胎正彼此临近发育,(c)-MEF上单个卵裂球的初始生长晕,6天,放大x200,(d)-单个卵裂球衍生的hES细胞的集落,放大x200。图板B:活体解剖的母体胚胎形成的胚泡(a)和单个卵裂球衍生的hES细胞系中的多能性标志物(b-i);(b)碱性磷酸酶,(c)-Oct-4,(d)-DAPI,对应

于Oct4和Nanog,(e)-Nanog,(f)-SSEA-3,(g)-SSEA-4,(h)-TRA-1-60,(i)-TRA-1-81;原始放大:图板A(a),400x,图板A(b-d)和B,200x,除了NED5g&h,100x。图板C:单个卵裂球衍生的hESC在体内(a-d)和体外(e-g)分化成三个胚层。(a)-畸胎瘤显示所有三个胚层的衍生物。Cre,纤毛呼吸道上皮,包括以更高放大显示纤毛的插图;int,肠上皮;cart,软骨;ne,结合视网膜色素上皮(rpe)的柱状神经上皮。(b-d),来自其他畸胎瘤的实例。(b)支气管巢(bronchiolar nests);c)平滑肌肌动蛋白染色的肌肉;(d)cdx2染色的肠上皮。(e-g)-体外分化衍生物的实例:(e)具有造血和内皮两种潜能的成血管细胞集落,(f)具有搏动的心脏细胞的胚状体;(g),视网膜色素上皮。放大:a-f 200x,g 100x。

[0058] 图12A-12I显示单个卵裂球衍生的hES细胞分化成三个胚层(a-c)和具有治疗价值的细胞类型(d-i)的实例。用针对三个胚层的以下标志物的抗体免疫染色:微管蛋白 β III(a)、平滑肌肌动蛋白(b)、甲胎蛋白(c)。分化衍生物的实例:具有造血和上皮两种潜能的成血管细胞集落(d)。上皮细胞的免疫染色,使用针对KDR(e)和CD31(f)的抗体;具有搏动的心脏细胞的胚状体(g),视网膜色素上皮(h,i)。RT-PCR显示RPE标志物PEDF(泳道1,300bp)和RPE65(泳道2,285bp)、阳性对照GAPDH(泳道3,465bp)。放大:a-c,e,f-20x;d,g-10x,h-40x。

[0059] 图13A-13B显示单个卵裂球衍生的hES细胞的微卫星和PCR分析。A-DNA PCR确认单个卵裂球衍生的hES细胞中不存在GFP。泳道1,阳性对照WA01(H1)hES细胞系,泳道2,阴性对照(无模板),泳道3,NED1,泳道4,NED 2,泳道5,NED 3,泳道6,NED4。B-单个卵裂球衍生的hES细胞系的微卫星分析。

[0060] 图14显示单个卵裂球衍生的hES细胞系的核型。

[0061] 图15A-15I显示层粘连蛋白对单个卵裂球发育和hES细胞的效应。(A-C)不存在层粘连蛋白时滋养外胚层样(trophectoerm-like)小泡的形成。(A)霍夫曼调制对比(Hoffman modulation contrast),(B)cdx2免疫染色,(C)细胞角蛋白8免疫染色。(D-F)存在层粘连蛋白时ICM样生长晕的形成。(D)相差(phase contrast),(E)Oct-4免疫染色,(F)对应的DAPI图像。(G-I)层粘连蛋白对hESC的去极化效应。(G,H)对照(G)和层粘连蛋白(H)覆盖的hESC(WA07)用紧密连接标志物ZO-1(绿色)和多能标志物Oct-4(红色)共染色的共焦显微术。(I)对照(左)和层粘连蛋白覆盖的(右)hESC集落(WA09)的横切面的超微结构分析(半薄切片)。对照集落组织成分层的上皮。顶微绒毛(mv)和紧密连接(数据未显示)的存在指示上皮样极化典型的结构特化。层粘连蛋白覆盖诱导细胞去极化,如细胞表面缺乏微绒毛和细胞堆积形成多层结构所示的。放大:(A-F)200x,(G,H)630X,(I)400x。

[0062] 【发明详述】

[0063] 【定义】

[0064] 术语“胚胎干细胞”(ES细胞)指衍生自己像细胞系一样连续传代的胚泡或桑椹胚的内细胞团的细胞。ES细胞可衍生自精子或DNA使卵细胞受精、核移植、孤雌生殖或通过产生在MHC区具有纯合性的hES细胞的手段而衍生。术语“人类胚胎干细胞”(hES细胞)指人类ES细胞。

[0065] 术语“多能干细胞”指能够分化成多于一种分化细胞类型的动物细胞。此类细胞包括hES细胞、人类胚胎衍生的细胞(hEDC)和成人衍生的细胞,包括间充质干细胞、神经干细胞和骨髓衍生的干细胞。多能干细胞可以是遗传修饰或未遗传修饰的。遗传修饰的细胞可包括标志物比如紫光蛋白以便于它们在卵内的鉴定

[0066] 如本文所用的术语“分化细胞”指分化成体细胞谱系过程中的或已最终分化的任何细胞。例如,胚胎细胞可分化成衬于肠的上皮细胞。分化细胞可分离自例如胎儿或胎生的动物。

[0067] 如本文所用的术语“植入”在提及胚胎时指用本文所述的胚胎使雌性动物受孕。这一技术是本领域普通技术人员熟知的。参见,如Seidel和Elsden,1997,Embryo Transfer in Dairy Cattle(奶牛胚胎移植),W.D.Hoard&Sons,Co.,Hoard's Dairyman。可允许所述胚胎在子宫中发育,或替代地,可在分娩前将胎儿从子宫环境中取出。

[0068] 如本文所用的术语“同步的(synchronized)”或“同步的(synchronous)”在提及动情周期时,指本领域普通技术人员熟知的辅助生殖技术。这些技术充分地描述于上一段引用的参考文献中。通常,利用雌激素和孕酮激素来同步雌性动物的动情周期和胚胎的发育周期。如本文所用的术语“发育周期”指本发明的胚胎和所述胚胎内每次细胞分裂之间的时间段。这一时间段对胚胎来说是可预测的,并且可与接受者动物的动情周期同步。

[0069] 如本文所用的术语“培养”就胚胎而言指包括将胚胎置于培养基的实验室程序。可将胚胎置于培养基适当的时间量以允许所述胚胎保持静态但在所述培养基中具有功能,或允许所述胚胎在所述培养基中生长。适合培养胚胎的培养基是本领域技术人员熟知的。参见,如美国专利第5,213,979号,题为“In vitro Culture of Bovine Embryos(牛胚胎的体外培养)”,First等人,1993年5月25日授予,和美国专利第5,096,822号,题为“Bovine Embryo Medium(牛胚胎培养基)”,Rosenkrans,Jr.等人,1992年3月17日授予,通过引用以其整体(包括所有插图、表和附图)并入本文。

[0070] 如本文所用的术语“合适的培养基”指允许细胞增殖的任何培养基。合适的培养基不需要促进最大增殖,而仅为可测量的细胞增殖。

[0071] 如本文所用的术语“克隆的”指细胞、胚胎细胞、胎儿细胞和/或动物细胞具有与另一细胞、胚胎细胞、胎儿细胞和/或动物细胞的核DNA序列大致相似或相同的核DNA序列。本文描述了术语“大致相似”和“相同”。克隆的胚胎可产生自一次核移植,或替代地,克隆的胚胎可产生自包括至少一个再克隆步骤的克隆过程。如果克隆的胚胎产生自包括至少一个再克隆步骤的克隆程序,则所述克隆的胚胎可间接产生自无限增殖化的全能细胞,因为所述再克隆步骤可利用从胚胎分离的胚胎细胞,所述胚胎产生自无限增殖化的全能细胞。如本文所用的术语“全能的”在提及胚胎时指可以发育成胎生动物的胚胎。

[0072] 如本文所用的术语“大致相似”在提及核DNA序列时指两个核DNA序列几乎相同。所述两个序列的差异可为核DNA复制过程中通常发生的复制错误差异。大致相似DNA序列优选地大于97%相同,更优选地大于98%相同,以及最优选地大于99%相同。同一性是通过两个序列中的相同残基的数目除以残基的总数目然后将结果乘以100来测量的。因此,序列完全相同的两个拷贝具有100%同一性,而较不高度保守和具有缺失、添加或取代的序列具有较低程度的同一性。本领域普通技术人员将理解有多个计算机程序可用于执行序列比较和确定序列同一性。

[0073] 术语“母体胚胎”用于指从其中取出或活体解剖单个卵裂球的胚胎。活体解剖后,剩余的母体胚胎(母体胚胎减去活体解剖的卵裂球)可与所述卵裂球一起培养以帮助促进所述卵裂球的增殖。剩余的、有活力的母体胚胎随后可冷冻以便长期或永久贮藏,或供将来使用。替代地,所述有活力的母体胚胎可用于产生怀孕。替代地,可以毁坏所述有活力的母

体胚胎。在某些实施方案中,母体胚胎是通过本发明的连续移植方法产生的克隆胚胎。在其他实施方案中,母体胚胎是通过受精产生的胚胎。

[0074] 【总述】

[0075] 虽然哺乳动物克隆对基础科学和治疗用途两方面都有巨大的潜能,但是通过体细胞核移植(SCNT)的哺乳动物克隆的效率仍然低。SCNT后成活幼崽的出生率低于10%,无论所用的物种、供体细胞类型、方案或技术如何。相似地,克隆胚胎的发育率也低于正常的受精胚胎的发育率,造成不良的胚泡发育和较小的胚泡细胞数目。这些缺陷还导致从克隆的小鼠胚胎建立ES细胞系的相对较低的成功率,与小鼠品系或供体细胞类型无关,所述成功率为大约5%,相比之下,使用正常胚胎的成功率为大约30%。克隆胚胎的无能力很大程度上是由于不完整的核编程,如早期发育阶段过程中几个基因的异常表达所证明的。

[0076] 为了克服SCNT的低效率,已尝试了数种方法。最近,Kishigami等人(2006)报道了用组蛋白脱乙酰酶抑制剂制滴菌素A处理重建的小鼠卵的改进的小鼠克隆技术,制滴菌素A降低了不正常的DNA高甲基化。另一种方法是使用前核(PN)阶段合子或2-细胞阶段体内受精胚胎作为第二胞质体接受者的连续克隆。当将PN阶段的小鼠体细胞克隆的胚胎重克隆入去核的体内受精的PN阶段合子时,克隆胚胎的体外发育和成活幼畜率有一定程度的改进。事实上,相似的方法也成功用于第一次猪体细胞克隆。2-细胞阶段的体内受精胚胎也已用于成功的连续克隆。当将2-细胞阶段SCNT胚胎重克隆入2-细胞阶段体内胚胎时,它们的体外发育得到改进,并且在成活的幼畜中达到顶点。然而,这些研究无一研究过所述改进的分子基础,且所述核供体细胞是ES细胞或预处理的体细胞。此外,克隆胚胎发育的改进并不显著。供体细胞的预处理以各种方法解决了染色质重建以及核供体细胞和受体卵母细胞之间的细胞周期同步,这再次造成了一定程度改进的克隆效率。然而,无论应用何种方法,克隆效率仍保持很低,以致不能广泛用于基础科学研究、某些品系的小鼠的实用繁殖、治疗用克隆或干细胞衍生。此外,我们不知晓有任何组采用连续克隆成功衍生了可从其中衍生胚胎干细胞的胚泡或胚泡样团簇,或成功衍生了胚胎干细胞或干细胞系。相似地,我们也不知晓有任何组采用连续克隆成功衍生了桑椹胚阶段胚胎(大致等同于并对应于发育的桑椹胚阶段的NT团簇)。此类桑椹胚阶段胚胎可用作母体胚胎,可从所述母体胚胎中取出或活体解剖一个或多个卵裂球并用于产生ES细胞。

[0077] 本申请的另一方面使用可从其中取出或活体解剖一个或多个卵裂球并用于产生ES细胞的胚胎。

[0078] 【核移植方法】

[0079] 本发明的一个目标是提供更有效地克隆体细胞并且不引起伦理问题的手段。本公开内容的方法可用于克隆哺乳动物、获得多能细胞或重编程哺乳动物细胞。

[0080] 人类或动物细胞优选地哺乳动物细胞可通过众所周知的方法获得和培养。可用于本发明的人类和动物细胞包括,例如,上皮、神经细胞、表皮细胞、角质形成细胞、造血细胞、黑素细胞、软骨细胞、淋巴细胞(B和T淋巴细胞)、其他免疫细胞、红细胞、巨噬细胞、黑素细胞、单核细胞、单核的细胞、成纤维细胞、心肌细胞、卵丘细胞和其他肌肉细胞等。此外,用于核移植的人类细胞可获自不同的器官,如皮肤、肺、胰腺、肝、胃、肠、心、生殖器官、膀胱、肾、尿道和其他泌尿器官等。这些仅是合适的供体细胞的实例。合适的供体细胞,即可用于本发明的细胞,可获自身体的任何细胞或器官。这包括所有体细胞或生殖细胞如,原生殖细胞、

精细胞。优选地,供体细胞或核是活跃分裂即非静息的细胞,因为已报道这样会增加克隆效力。此类细胞包括处于G1、G2S或M细胞期的那些。替代地,可使用静息细胞。另外优选地,此类供体细胞将处于G1细胞周期。在某些实施方案中,本申请的供体和/或接受者细胞不经历2-细胞阻滞(2-cell block)。在某些实施方案中,供体细胞或核在核移植前不进行预处理。在某些实施方案中,供体细胞或核在核移植前未用精胺、鱼精蛋白,或腐胺预处理。

[0081] 在某些实施方案中,本发明的接受者受精胚胎可来自任何哺乳动物物种。在某些实施方案中,使用冻存的受精胚胎作为接受者细胞。在某些实施方案中,这些胚胎是人类的。低温保存和融化是本领域技术人员已知的(参见Tucker等人,Curr Opin Obstet Gynecol.1995年6月;7(3):188-92)。

[0082] 在某些实施方案中,可以标记供体核。细胞可以用编码易于显现的蛋白质比如绿色荧光蛋白(Yang,M.等人,2000,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,97:1206-1211)或它的衍生物之一的转基因遗传修饰,或用构建自萤火虫(北美萤火虫,Photinus pyralis)荧光素酶基因(Fluc)(Sweeney,TJ.等人1999,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,96:12044-12049)的转基因,或用构建自软体珊瑚虫海肾(Sea Pansey Renilla reniformis)荧光素酶基因(Rluc)(Bhaumik,S.和Ghambhir,S.S.,2002,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:377-382)的转基因修饰。可使用“看家基因”启动子使报告转基因组成型表达,以使报告基因在许多或所有细胞中以高水平表达,或可使用组织特异性或发育阶段特异性基因启动子表达报告转基因,以使仅有已定位至特定小生境(niches)和发育成特定组织或细胞类型的细胞可被显现。另外的标记试剂包括但不限于,荧光标记的大分子(包括荧光蛋白类似物和生物传感器)、发光大分子嵌合体(包括用绿色荧光蛋白和其突变体形成的那些)、与参与生理响应的细胞内抗原反应的发光标记的初级或二级抗体、发光着色剂、染料和其他小分子。来自嵌合胚胎的标记细胞可例如通过流式细胞术分选,以分离克隆的群体。

[0083] 核移植(Nuclear transfer)技术或核移植(nuclear transplantation)技术在文献中是已知的。参见,尤其是Campbell等人,Theriogenology,43:181(1995);Collas等人,Mol.Report Dev.,38:264-267(1994);Keefer等人,Biol.Reprod.,50:935-939(1994);Sims等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,90:6143-6147(1993);WO 94/26884;WO 94/24274和WO 90/03432,其通过引用以其整体并入本文。另外,美国专利第4,944,384和5,057,420号描述了用于牛的核移植的程序。另外参见Cibelli等人,Science,Vol.280:1256-1258(1998)。

[0084] 将供体核移植入接受者受精胚胎可通过显微注射设备进行。在某些实施方案中,有最小量的细胞质随核移植。最小量的细胞质移植在使用显微注射移植核时是可实现的,而通过细胞融合方法则不行。在一个实施方案中,显微注射设备包括压电单元(piezo unit)。典型地,压电单元可操作地连接至针以向所述针传递振动。但是,可向针传递振动的压电单元的任何配置都包括在本发明范围内。在某些情况下,压电单元可辅助针进入目标。在某些实施方案中,压电单元可用于随核移植最小量细胞质。可使用适合用于所述目的的任何压电单元。在某些实施方案中,压电单元是Piezo显微操作控制器PMM1 50(PrimeTech, Japan)。

[0085] 去核可通过已知方法实现,比如美国专利第4,994,384号(其通过引用并入本文)中描述的。例如,将中期II卵母细胞置于HECM(任选地含有7.5μg/ml松胞菌素B)以立即去

核,或可将中期II卵母细胞置于合适的培养基(例如CR1aa加10%动情期牛血清),然后于稍后去核。

[0086] 去核可通过显微手术实现,使用微量加液器除去极体和邻近的细胞质。然后可筛选细胞以鉴定已成功去核的那些。此筛选可通过用于HECM中的1 μ g/ml 33342赫希斯特染料染色细胞,然后在低于10秒钟的紫外照射下观察细胞来实现。然后可将成功去核的细胞置于合适的培养基。

[0087] 有关哺乳动物中去核的非侵入方法的报导非常少,而在两栖类动物中,紫外线照射用作常规的程序(Gurdon Q.J.Microsc.Soc.101 299-311(1960))。尚未有此方法在哺乳动物中使用的详细报道,尽管在使用DNA-特异性紫光染料过程中,注意到小鼠卵母细胞暴露于紫外线超过30秒钟降低了细胞的发育潜能(Tsunoda等人,J.Reprod.Fertil.82 173(1988))。

[0088] 本发明可利用“诱导去核”,其指通过使减数分裂纺锤体的微管去稳定(如去多聚化)破坏减数分裂纺锤体装置,进而使卵母细胞去核(参见美国专利申请第20060015950号)。微管的去稳定防止了染色单体的分离(如,防止了成功的核分裂),并诱导卵母细胞基因组(如,核染色质)在减数分裂成熟过程中不均等分离(如,歪斜),藉此卵母细胞的几乎所有内源染色质都汇集于第二极体。

[0089] 在某些实施方案中,可使用玻璃吸管使卵裂球解离。在一些实施方案中,解离可在0.25%胰蛋白酶存在下发生(Collas和Robl,43BIOL.REPROD.877-84,1992;Stice和Robl,39BIOL.REPROD.657-664,1988;Kanka等人,43MOL.REPROD.DEV.135-44,1996)。

[0090] NT单元(NT单元)可通过已知方法活化。此类方法包括,如在亚生理温度下培养NT单元,在本质上通过应用冷或实际上凉的温度来冲击NT单元。最方便地,这可通过在室温下培养NT单元进行,室温相对于胚胎正常接触的生理温度条件来说是冷的。

[0091] 替代地,活化可通过应用已知的活化剂实现。例如,已显示受精过程中精子穿透卵母细胞活化融合前卵母细胞,以在核移植后产生更大数量的有活力的受孕和多个遗传相同的小牛。另外,处理比如电冲击和化学冲击或放线酮处理也可用于在融合后活化NT胚胎。合适的卵母细胞活化方法是授予Susko-Parrish等人的美国专利第5,496,720号(其通过引用并入本文)的主题。

[0092] 例如,卵母细胞活化可通过同时或顺序进行以下操作而实现:

[0093] (i)增加卵母细胞中二价阳离子的水平,和

[0094] (ii)降低卵母细胞中细胞蛋白质的磷酸化。

[0095] 这一般可通过向卵母细胞细胞质引入二价阳离子实现,如、镁、锶、钡或钙,如以离子载体的形式。增加二价阳离子水平的其他方法包括使用电冲击、用乙醇处理和用笼蔽螯合剂(caged chelator)处理。

[0096] 磷酸化可通过已知方法降低,如通过添加激酶抑制剂,如丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂,比如6-二甲基氨基-嘌呤、星形孢菌素、2-氨基嘌呤和鞘氨醇。

[0097] 替代地,细胞蛋白质的磷酸化可通过向卵母细胞引入磷酸酶来抑制,如磷酸酶2A和磷酸酶2B。

[0098] 活化方法的具体实例列于下文。

[0099] 1.通过洛诺霉素和DMAP活化

- [0100] 1--将卵母细胞置于洛诺霉素(5uM)和2mM DMAP中4分钟;
- [0101] 2--将卵母细胞移至含2mM DMAP的培养基4小时;
- [0102] 3--漂洗四次并进行培养。
- [0103] 2.通过洛诺霉素、DMAP和Roscovitin的活化
- [0104] 1--将卵母细胞置于洛诺霉素(5uM)和2mM DMAP中4分钟;
- [0105] 2--将卵母细胞移至含2mM DMAP和200μM Roscovitin的培养基3小时;
- [0106] 3--漂洗四次并进行培养。
- [0107] 3.通过暴露于洛诺霉素,接着是松胞菌素和放线酮的活化。
- [0108] 1--将卵母细胞置于洛诺霉素(5μM)中4分钟;
- [0109] 2--将卵母细胞移至含有5ug/ml松胞菌素B和5μg/ml放线酮的培养基5小时;
- [0110] 3--漂洗四次并进行培养。
- [0111] 4.通过电脉冲的活化
- [0112] 1--将卵置于含有100uM CaCl_2 的甘露醇介质;
- [0113] 2--给予三次 1.0kVcm^{-1} 、20uSec的脉冲,每次脉冲间隔22分钟;
- [0114] 3--将卵母细胞移至含有5ug/ml松胞菌素B的培养基3小时。
- [0115] 5.通过暴露于乙醇,接着是松胞菌素和放线酮的活化
- [0116] 1--将卵母细胞置于7%乙醇中1分钟;
- [0117] 2--将卵母细胞移至含有5ug/ml松胞菌素B和5ug/ml放线酮的培养基5小时;
- [0118] 3--漂洗四次并进行培养。
- [0119] 6.通过显微注射adenophostine的活化
- [0120] 1--用10至12p1含有10uM adenophostine的溶液注射卵母细胞;
- [0121] 2--培养卵母细胞。
- [0122] 7.通过显微注射精子因子的活化
- [0123] 1--用10至12p1分离自,如灵长类、猪、牛、绵羊、山羊、马、小鼠、大鼠、兔或仓鼠的精子因子注射卵母细胞;
- [0124] 2--培养卵。
- [0125] 8.通过显微注射重组精子因子的活化。
- [0126] 9.通过暴露于DMAP,接着是放线酮和松胞菌素B的活化
- [0127] 10.通过暴露于 SrCl_2 和松胞菌素B的活化。
- [0128] 在某些实施方案中,将卵母细胞或NT单元(典型地成熟后约22至28小时)置于约2mM DMAP中约1小时,接着在5pg/ml松胞菌素B和20ug/ml放线酮中温育约2-12小时,优选地约8小时。
- [0129] 在某些实施方案中,重构建的卵母细胞的活化在不含 Ca^{++} 的含有10mM SrCl_2 和5μg/ml松胞菌素B的CZB中执行,6小时,于高湿度的5.5% CO_2 培养箱中。
- [0130] 如所述的,活化可在核移植之前、同时或之后实现。一般而言,活化将在核移植和融合之前约40小时至核移植和融合之后约40小时,更优选地核移植和融合之前约24小时至核移植和融合之后约24小时,以及最优选地核移植和融合之前约4至9小时至核移植和融合之后约4至9小时实现。活化优选地在接近卵母细胞体外或体内成熟时或之后,如大约同时或成熟约40小时内、更优选地成熟约24小时内实现。

[0131] 在某些实施方案中,本发明的一个步骤是使克隆的核与种系细胞的去核胞质体融合,所述种系细胞比如卵裂球、桑椹胚细胞、内细胞团细胞、ES细胞,包括hES细胞、EG细胞、EC细胞,如本领域已知的(Do&Scholer, *Stem Cells* 22:941-949(2004))。胞质体与核的融合使用许多本领域已知的技术执行,包括聚乙二醇(参见Pontecorvo“Polyethylene Glycol(PEG)in the Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids(哺乳动物体细胞杂种产生中的聚乙二醇(PEG)”*Cytogenet Cell Genet.*16(1-5):399-400(1976)),直接注射核、仙台病毒介导的融合(参见美国专利第4,664,097号和Graham Wistar Inst.Symp.Monogr.919(1969)),或本领域已知的其他技术比如电融合。细胞的电融合包括使细胞近距离在一起并将它们暴露于交变电场。在适当的条件下,细胞被推到一起,并且细胞膜融合,然后是融合细胞或杂种细胞的形成。细胞的电融合和执行细胞的电融合的器械描述于例如,美国专利第4,441,972、4,578,168和5,283,194号,国际专利申请第PCT/AU92/00473[W0 93/05166]号,Pohl, “Dielectrophoresis(介电电泳)”,Cambridge University Press,1978和Zimmerman等人,*Biochimica et Biophysica Acta* 641:160-165,1981。

[0132] 克隆的核与连接至如本领域熟知的物理基质(Wright&Hayflick, *Exp. Cell Res.*96:113-121,(1975);&Wright&Hayflick, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72:1812-1816,(1975)的种系细胞(比如hES细胞)的无核胞质泡的融合可与本发明公开内容组合。简单而言,在操作之前,通过添加10 μ M松胞菌素B增加种系细胞的胞质体积20小时、胰蛋白酶消化并重铺板于涂有促进连接的材料(如聚二甲基硅氧烷)的无菌的18mm盖玻片、圆筒(cylinders)或其他物理基质上。将细胞以一定密度铺板,以使经过37 $^{\circ}$ C温育过夜并用培养基轻轻冲洗一次之后,细胞覆盖所述盖玻片或其他基质的表面积的一部分,优选地约90%。然后以一定位置将基质置于离心管中,以使离心将造成从胞质体中取出核,所述离心含有8mL 10%Ficoll-400溶液,并在20,000g下于36 $^{\circ}$ C离心60分钟。然后将克隆的核以至少胞质体的密度、优选地至少胞质体密度的五倍铺于盖玻片或基质上。胞质体与核的融合使用聚乙二醇执行(参见Pontecorvo“Polyethylene Glycol(PEG)in the Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids(哺乳动物体细胞杂种产生中的聚乙二醇(PEG)”*Cytogenet Cell Genet.*16(1-5):399-400(1976)。简单而言,将1mL于培养基中的预温的50%聚乙二醇1500(Roche)置于盖玻片或基质上1分钟。然后在5分钟的时间段内逐滴添加20mL培养基,以缓慢除去聚乙二醇。然后将整个介质吸出,并用培养基置换。也可使用离心之外的技术,比如振动或使用微量加液器物理取出核。

[0133] 已暗示通过核移植衍生的胚胎不同于正常的胚胎,并且有时得益于或甚至要求不同于通常培养胚胎条件的体内培养条件(至少在体内)。对此的原因尚不清楚。在牛胚胎的常规操作中,重构建的胚胎(其中许多立即)已经在绵羊输卵管中培养5至6天(如Willadsen,在*Mammalian Egg Transfer(哺乳动物卵移植)*(Adams, E.E. 编)185CRC Press, Boca Raton, Fla.(1982)中所述)。在某些实施方案中,在移植之前,可将胚胎镶嵌在保护性介质比如琼脂中,然后在从临时接受者中回收之后从所述琼脂中切离。保护性琼脂或其他介质的功能是双重的:首先,它通过把透明带保持在一起而充当胚胎的结构辅助;并且第二,它充当到接受者动物免疫系统的细胞的屏障。虽然此方法增加了形成胚泡的胚胎的比例,但是缺点是可能损失许多胚胎。

[0134] 活化的NT单元可在合适的体外培养基中培养,直至产生胚胎细胞或干细胞样细胞

和细胞集落。适合胚胎的培养和成熟的培养基是本领域熟知的。可用于牛胚胎培养和维持的已知培养基的实例包括Ham's F-10+10%胎牛血清(FCS)、组织培养基-199(TCM-199)+10%胎牛血清、Tyrodes-白蛋白-乳酸盐-丙酮酸盐(TALP)、Dulbecco磷酸缓冲盐水(PBS)、Eagle培养基和Whitten培养基。用于卵母细胞的收集和成熟的最常用的培养基之一是TCM-99和1至20%血清补充物,包括胎牛血清、新生血清、动情牛血清、羔羊血清或阉牛血清(steer serum)。一种优选的维持培养基包括TCM-199和Earl盐、10%胎牛血清、0.2M丙酮酸盐和50ug/ml硫酸庆大霉素。上述任一种还可包括与各种细胞类型共培养,比如卵泡细胞、输卵管细胞、BRL细胞和子宫细胞和STO细胞。

[0135] 特别地,人类子宫内膜的上皮细胞在预植入和植入阶段间分泌白血病抑制因子(LIF)。因此,向培养基添加LIF可能在增强重构建的胚胎的体外发育中具有重要作用。LIF用于胚胎细胞或干细胞样细胞培养已在美国专利第5,712,156号(其通过引用并入本文)中描述。

[0136] 另一种维持培养基在授予Rosenkrans, Jr.等人的美国专利第5,096,822号(其通过引用并入本文)中描述。此胚胎培养基(命名为CR1)含有支持胚胎必需的营养物质。CR1含有量在1.0mM至10mM、优选地1.0mM至5.0mM范围的半钙L-乳酸盐。半钙L-乳酸盐是其上并入半钙盐的L-乳酸盐。

[0137] 另外,维持培养的人类胚胎细胞的合适的培养基如Thomson等人,Science,282:1145-1147(1998)和Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,92:7844-7848(1995)中所讨论。

[0138] 之后,将培养的NT单元优选地进行冲洗,然后置于合适的培养基,如CR1aa培养基、Ham's F-10、组织培养基-199(TCM-199)、Tyrodes-白蛋白-乳酸盐-丙酮酸盐(TALP)、Dulbecco's磷酸缓冲盐水(PBS)、Eagle培养基或Whitten培养基,优选地含有约10%FCS。此类培养将优选地在含有合适的融合饲养层的孔板中实现。合适的饲养层包括,例如成纤维细胞和上皮细胞,如衍生自有蹄类动物的成纤维细胞和子宫上皮细胞、鸡成纤维细胞、鼠(如小鼠或大鼠)成纤维细胞、STO和SI-m220饲养细胞系和BRL细胞。

[0139] 在优选的实施方案中,饲养细胞将包含小鼠胚胎成纤维细胞。制备合适的成纤维细胞饲养层的方法在下面的实施例中描述,并且完全在普通技术人员的能力之内。

[0140] 从胚泡阶段的胚胎(或其等同物)衍生ES细胞的方法是本领域熟知的。此类技术可用于从克隆的胚胎衍生ES细胞。另外或替代地,可在更早的发育阶段从克隆的胚胎衍生ES细胞。

[0141] 【应用】

[0142] 在某些实施方案中,本公开内容获得的胚泡或胚泡样团簇可用于获得胚胎干细胞系。此类系可根据例如Thomson等人,Science,282:1145-1147(1998)和Thomson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,92:7544-7848(1995)(通过引用以它们整体并入本文)报导的培养方法获得。

[0143] 多能胚胎干细胞还可从单个卵裂球产生,所述卵裂球从胚胎取出而不干扰胚胎正常发育到出生。参见以下美国申请:2004年11月4日提交的60/624,827;2005年3月14日提交的60/662,489;2005年6月3日提交的60/687,158;2005年10月3日提交的60/723,066;2005年10月14日提交的60/726,775;2005年11月4日提交的11/267,555;2005年11月4日提交的PCT申请第PCT/US05/39776号,其公开内容通过引用以它们整体并入;还参见Chung等人,

Nature, 2005年10月16日(印刷前电子公开的)和Chung等人, Nature, 第439卷, 第216-219页(2006), 其各自的完整公开内容通过引用以其整体并入。

[0144] 在本发明的一个方面, 所述方法包括在研究和在治疗中利用衍生自本发明重编程细胞的细胞。此类重编程的多能或全能细胞可分化成身体中的任何细胞, 包括但不限于皮肤、软骨、骨、骨骼肌、心肌、肾、肝、血液和血液形成、血管前体(vascular precursor)和血管上皮、胰腺 β -神经元、神经胶质、视网膜、内耳滤泡(inner ear follicle)、肠、肺细胞。

[0145] 特别地, 重编程的细胞可分化成具有皮肤学出生前基因表达模式的细胞, 所述细胞是高度产生弹性的(elastogenic)或能够再生而不引起瘢痕形成。哺乳动物胎儿皮肤的真皮成纤维细胞, 特别是对应于覆盖物从高水平的弹性中获益的区域, 比如在围绕关节的区域, 负责从头合成弹性纤维的复杂构造, 所述弹性纤维行使功能许多年而不需周转。此外, 早期胚胎皮肤能够再生而无瘢痕形成。从本发明的重编程细胞制备的胚胎发育的此时间点的细胞可用于促进皮肤的无瘢痕再生, 包括形成正常的弹性蛋白构造。这在治疗正常的人类衰老过程中的症状或肌动蛋白性皮肤损伤中特别有用, 其中存在皮肤的深刻弹性裂解, 造成衰老的外表, 包括皮肤的下垂和起皱。

[0146] 在本发明的另一实施方案中, 重编程细胞暴露于一种或多种分化诱导子, 以产生治疗上有用的其他细胞, 比如视网膜色素上皮、造血祖先和成血管细胞祖先以及外胚层、中胚层和内胚层的许多其他有用的细胞类型。此类诱导子包括但不限于: 细胞因子, 比如白细胞介素- α A、干扰素- α A/D、干扰素- β 、干扰素- γ 、干扰素- γ -诱导蛋白-10、白细胞介素-1-17、角质形成细胞生长因子、瘦蛋白、白血病抑制因子、巨噬细胞集落刺激因子和巨噬细胞炎性蛋白-1 α 、1- β 、2、3 α 、3 β 和单核细胞趋化蛋白1-3、6kine、活化素A、双调蛋白、血管生成素-B-上皮细胞生长因子、 β 动物纤维素、脑源神经营养因子、C10、心肌营养蛋白-1、睫状神经营养因子、细胞因子诱导的嗜中性粒细胞化学引诱物-1、嗜酸细胞活化趋化因子(eotaxin)、表皮生长因子、上皮嗜中性粒细胞活化肽-78、红细胞生成素、雌激素受体- α 、雌激素受体- β 、成纤维细胞生长因子(酸性和碱性)、肝素、FLT-3/FLK-2配体、神经胶质细胞系衍生的神经营养因子、Gly-His-Lys、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、GRO- α /MGSA、GRO- β 、GRO- γ 、HCC-1、肝素结合表皮生长因子、肝细胞生长因子、调蛋白- α 、胰岛素、胰岛素生长因子结合蛋白-1、胰岛素样生长因子结合蛋白-1、胰岛素样生长因子、胰岛素样生长因子II、神经生长因子、神经营养蛋白-3、4、制癌蛋白M、胎盘生长因子、多效营养因子、rantes(表达和分泌的调节活化蛋白)、干细胞因子、基质细胞衍生因子1B、血小板生成素(thromopoietin)、转化生长因子-(α 、 β 1, 2, 3, 4, 5)、肿瘤坏死因子(α 和 β)、血管上皮生长因子和骨形态发生蛋白, 改变激素和激素拮抗剂的表达的酶, 比如17 β -雌二醇、促肾上腺皮质激素、肾上腺髓质素、 α -促黑素细胞激素、绒毛膜促性腺激素、皮质类固醇结合球蛋白、皮质酮、地塞米松、雌三醇、促卵泡激素、促胃液素1、胰高血糖素、促性腺激素、L-3, 3', 5'-三碘甲腺原氨酸、促黄体生成激素(leutinizing hormone)、L-甲状腺素、褪黑激素、MZ-4、催产素、甲状旁腺激素、PEC-60、垂体生长激素、孕酮、促乳素、促胰液素、性激素结合球蛋白、促甲状腺激素、促甲状腺素释放因子、甲状腺素(thyroxin)结合球蛋白和血管升压素、胞外基质组分比如纤连蛋白、纤连蛋白的蛋白水解片段、层粘连蛋白、生腱蛋白、血小板反应蛋白(thrombospondin)和蛋白聚糖比如聚集蛋白聚糖、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、硫酸软骨素(chondroitin)蛋白聚糖和黏结蛋白聚糖。其他诱导子包括来自确定组织的细胞或

衍生自细胞的组分,其用于向衍生自本发明的重编程细胞的分化细胞提供诱导信号。此类诱导子细胞可衍生自人类、非人类哺乳动物或禽类,比如无特定病原(SPF)的胚胎细胞或成年细胞。

[0147] 在本发明的某些实施方案中,将克隆细胞引入它们正常居留的组织以展现治疗效用。例如,可将通过本发明的方法衍生的细胞的克隆产生群体引入组织。在某些其他实施方案中,将克隆细胞引入全身或距期望的治疗效用部位(cite)一定的距离。在此类实施方案中,克隆细胞可在距离期望部位一定距离处或是在期望部位起作用。

[0148] 在本发明的某些实施方案中,通过本发明方法衍生的克隆细胞用于诱导其他多能干细胞的分化。产生能够在体外增殖而保持胚胎基因表达模式的单个细胞衍生的细胞群体可用于诱导其他多能干细胞的分化。细胞-细胞诱导是指导早期胚胎分化的常用方法。许多潜在地医学有用的细胞类型受正常胚胎发育过程中的诱导信号的影响,包括脊髓神经元、心脏细胞、胰腺 β 细胞和终末造血细胞。能够在体外增殖而保持胚胎基因表达模式的单个细胞衍生的细胞群体可在诱导其他多能干细胞分化成期望的细胞或组织类型的各种体外、卵内(in ovo)或体内培养条件下培养。

[0149] 主题胚胎细胞或干细胞样细胞可用于获得任何期望的分化细胞类型。此类分化的人类细胞的治疗用途是无与伦比的。例如,人类造血干细胞可用于需要骨髓移植的医学治疗中。此类程序用于治疗许多疾病,如、晚期癌症,比如卵巢癌和白血病,以及危及免疫系统的疾病,比如AIDS。可通过如下获得造血干细胞,如使癌症或AIDS患者的成年体细胞(如上皮细胞或淋巴细胞)与去核卵母细胞(如牛卵母细胞)融合,如上所述获得胚胎细胞或干细胞样细胞,并在有利于分化的条件下培养此类细胞,直至获得造血干细胞。此类造血细胞可用于治疗包括癌症和AIDS的疾病。

[0150] 替代地,具有神经疾患的患者的成年体细胞可与去核动物卵母细胞(如灵长类动物或牛卵母细胞)融合,由此获得人类胚胎细胞或干细胞样细胞,并将此类细胞在分化条件下培养,以产生神经细胞系。可通过移植此类人类神经细胞治疗的特异性疾病包括,例如,帕金森病、阿尔茨海默氏病、ALS和大脑麻痹以及其他疾病。在帕金森病的具体情形中,已证实移植的胎儿脑神经细胞与周围细胞正确连接并产生多巴胺。这可造成帕金森病症状的长期逆转。

[0151] 为了允许特异性选择分化细胞,可用通过诱导型启动子表达的选择标志物转染供体细胞,藉此允许在诱导分化时选择或富集特定的细胞谱系。例如,CD34-neo可用于选择造血细胞,Pw1-neo用于肌肉细胞,Mash-1-neo用于交感神经元、Mal-neo用于人类大脑皮层灰质的CNS神经元等。

[0152] 本发明的很大优势在于提供适合于移植的等基因的或同基因的(syngenic)人类细胞的基本上无限制的供应。因此,它将消除与现行移植方法有关的显著问题,即排斥所移植的组织,其发生可能是由于宿主抗移植物或移植物抗宿主排斥。常规地,通过施用抗排斥药物比如环孢菌素来防止或降低排斥。然而,此类药物具有显著的不利副作用,如免疫抑制、致癌特性、以及非常昂贵。本发明应该消除或至少极大地降低对抗排斥药物的需要,比如环孢菌素(cyclosporine)、咪唑硫嘌呤(imulan)、FK-506、糖皮质激素和纳巴霉素和其衍生物。

[0153] 等基因细胞疗法可治疗的其他疾病和病症包括,例如脊髓损伤、多发性硬化、肌肉

萎缩、糖尿病、肝疾病、即高胆固醇血症、心脏疾病、软骨替代、残废、脚溃疡、胃肠疾病、血管疾病、肾疾病、尿道疾病以及衰老相关疾病和病症。

[0154] 从克隆的胚胎克隆哺乳动物的方法是本领域熟知的。用于克隆哺乳动物的两个主要程序是Roslin方法和Honolulu方法。这些程序是按1996年苏格兰Roslin研究的绵羊Dolly(Campbell, K.H. 等人(1996)Nature 380:64-66)和1998年honolulu的夏威夷大学的小鼠Cumulina(Wakayama, T. 等人(1998)Nature 394:369-374)的产生而命名的。

[0155] 在其他实施方案中,本发明方法可用于产生可用作母体胚胎的克隆的分裂阶段胚胎或桑椹胚阶段胚胎。此类母体胚胎可用于产生ES细胞。例如,可从此类母体胚胎中取出或活体解剖卵裂球(1、2、3、4个卵裂球),并且此类卵裂球可用于衍生ES细胞。

[0156] 【卵裂球培养】

[0157] 诱导分离的人类卵裂球发育成多能胚胎干细胞的先前尝试是失败的(Geber S. 等人, Hum. Reprod. 10:1492-1496(1995))。本发明部分基于如下发现:使用本文公开的新方法,可从胚胎产生干细胞而不影响所述胚胎的活力。在一个实施方案中,这些方法利用与目前植入前遗传诊断(PGD)中使用的那些有关的体外技术来从胚胎分离单个卵裂球,而不破坏所述胚胎或以其他方式显著改变它们的活力。如本文所证实的,可从单个卵裂球产生多能人类胚胎干(hES)细胞和细胞系,所述单个卵裂球取自胚胎而不干扰所述胚胎的正常发育至出生。

[0158] 本文描述的方法具有许多重要的用途,这些用途将促进干细胞研究和发育生物学领域。ES细胞、ES细胞系、TS细胞和细胞系和由此分化的细胞可用于研究基础发育生物学,并可治疗性地用于许多疾病和病症的治疗中。另外,这些细胞可用于筛选测定中,以鉴定可用于调节这些细胞的生长、分化、存活或迁移的因子和条件。鉴定的试剂可用于调控体外和体内的细胞行为,并可形成细胞或无细胞治疗的基础。

[0159] 为了使本文描述的发明可得到完全的理解,列出了下面的详细描述。

[0160] 除非另外指明,本文使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属的技术领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。虽然与本文描述的方法和材料相似或等同的那些可用于本发明或本发明的测试,但是下面描述了合适的方法和材料。所述材料、方法和实施例仅是例证性的,而非意在限制。

[0161] 本文提及的所有出版物、专利、专利公布和申请以及其他文件通过引用以其整体并入。

[0162] 贯穿本说明书,词语“包含(comprise)”或变体比如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”将被理解为意指包括所述的整数或整数组,但是不排除任何其他整数或整数组。

[0163] 冠词“一个(a)”和“一种(an)”在本文用于指所述冠词的语法对象的一个或多于一个(即至少一个)。例如,“一种元件”意为一种元件或多于一种元件。

[0164] 术语“卵裂球”始终指从胚胎获得的至少一个卵裂球(如1、2、3、4个等)。术语“两个或多个卵裂球的团簇”与“卵裂球衍生的生长物”可互换地使用,指在卵裂球的体外培养过程中产生的细胞。例如,从胚胎获得卵裂球并将其初始培养后,它通常分裂至少一次以产生两个或多个卵裂球的团簇(也称为卵裂球衍生的生长物)。所述团簇可与胚胎细胞或胎儿细胞进一步培养。最终,卵裂球衍生的生长物将继续分裂。从这些结构起,ES细胞、TS细胞和

部分分化的细胞类型将在培养方法的过程中发育。

[0165] 如上所概述的,本发明提供了从早期胚胎的单个卵裂球衍生ES细胞、ES细胞系和分化细胞类型,而无需破坏所述胚胎的方法。所述方法的各种各种特征详细描述于下文。考虑了上文和下文详细描述的本发明的各个方面和实施方案的所有组合。

[0166] **【卵裂球的取出】**

[0167] 卵裂球可在植入之前的各个发育阶段从胚胎取出,包括但不限于:桑椹胚致密化之前、桑椹胚致密化过程中、桑椹胚致密化之后、囊胚腔形成之前或胚泡阶段过程中。在某些实施方案中,在4-16细胞阶段、或4-10细胞阶段、或4-8细胞阶段从胚胎中取出卵裂球(一个卵裂球、两个卵裂球或多于两个卵裂球)。

[0168] 在一个实施方案中,本发明提供了活体解剖胚泡的方法,其将产生胚胎干细胞,而胚泡的剩余部分被植入并造成怀孕和稍后的活产。在这种情形的一个实例中:通过本领域普通技术人员已知的任何方法从胚泡取出透明带,然后活体解剖胚泡。

[0169] 在另一实施方案中,与人类ES细胞的衍生有关的论争是通过使用与植入前遗传诊断(PGD)中使用的技术类似的技术解决的,其中从胚胎中取出单个卵裂球。在一个实施方案中,所述单个卵裂球在桑椹胚致密化之前取出。可允许活体解剖的卵裂球经历细胞分裂,并且一个后代细胞用于遗传测试,而剩余的细胞用于产生人类干细胞。活体解剖的胚胎还可在胚泡阶段植入,或冷冻以在稍后的时间植入。

[0170] 在某些实施方案中,活体解剖(如从胚胎中取出卵裂球)由两个阶段组成。第一阶段是在包围胚胎的透明带上打一个洞或在一些情形下完全除去它。打洞后,即可接着将细胞(优选地一个或两个)从人类胚胎中取出。在某些优选的实施方案中,所述方法包括除去透明带或在 其上产生提取洞,并且所述方法可通过一种或多种技术执行,比如物理操作、化学处理和酶促消化。可使用的示例性技术包括:

[0171] 部分带切割法(PZD):使用微量加液器部分切割透明带;

[0172] 钻带法(Zona drilling):通过用Tyrode酸部分消化在透明带上化学开口;

[0173] 钻带法:通过用链霉蛋白酶或其他蛋白酶部分消化在透明带上酶促开口;

[0174] 透明带变薄法:用Tyrode酸或激光使透明带变薄;

[0175] 用激光对透明带进行点状开口;

[0176] 用Piezo显微操作器对透明带进行点状机械开口。

[0177] 为了简要说明一个实施方案,所述程序使用8-10细胞阶段胚胎执行。通过用保持吸液管保持胚胎,将其置于矿物油下的一滴活体解剖介质中。通过经由辅助孵化吸液管(assistant hatching pipette)释放酸化的Tyrode溶液(Sigma, St. Louis, Mo. 63178),局部消化透明带。打洞后,可经由所述洞将细胞(卵裂球)吸出。

[0178] 为了说明另一实施方案,可通过用一种或多种酶或酶的混合物比如链霉蛋白酶处理来至少部分消化胚泡的透明带。对具有完整透明带的胚泡进行短暂链霉蛋白酶(Sigma)处理造成透明带的去除。也可以使用与链霉蛋白酶具有相同或相似蛋白酶活性的其他类型的蛋白酶。

[0179] 还可通过在不含Ca⁺⁺/Mg⁺⁺的PBS中解聚剥除透明带的胚胎来获得单个卵裂球。

[0180] 本发明还提供了分离单个卵裂球的新颖且更有效的方法。固定胚胎,然后轻打固定的胚胎,直至单个卵裂球从胚泡释放。此方法不限于人类胚胎,并可在其他物种的胚胎上

执行,包括但不限于非人类胚胎,比如非人类哺乳动物、小鼠、兔、猪、牛、绵羊、狗和灵长类。

[0181] 胚胎可通过本领域技术人员已知的任何方法固定。在一个实施方案中,使用微量加液器固定胚胎,并轻打微量加液器把柄以分离卵裂球。在另一实施方案中,在不含钙和镁的培养基中培养胚胎。所述胚胎可以是2-细胞阶段至16细胞阶段。在一个实施方案中,所述胚胎是4细胞阶段至10细胞阶段。在另一实施方案中,所述胚胎是6-8细胞阶段胚胎。在又一实施方案中,所述胚胎是8-10细胞阶段胚胎。在某些实施方案中,轻打包括产生足以取出至少一个卵裂球,而不充分降低胚胎剩余部分的活力的力度。活力的维持可通过例如将剩余胚胎培养至少一天,并证实剩余胚胎可继续在培养下分裂来显示。

[0182] 任何前述方法均可用于从胚胎获得卵裂球(一个卵裂球或多于一个卵裂球)。具体的方法可单独或与有助于取出卵裂球的另一方法组合使用。

[0183] 在某些实施方案中,所述胚胎是哺乳动物胚胎。在某些实施方案中,所述哺乳动物胚胎是人类胚胎。示例性哺乳动物包括但不限于,小鼠、大鼠、兔、牛、狗、猫、绵羊、仓鼠、猪、非人灵长类和人类。

[0184] 在某些前述的任何实施方案中,从胚胎取出卵裂球而不破坏胚胎的剩余部分。可培养和/或冷冻保存剩余的胚胎(胚胎减去取出的卵裂球)。在某些实施方案中,将剩余的胚胎培养充分的时间,以证实所述剩余的胚胎可继续分裂(如,仍是有活力的),然后当证实活力后,将所述剩余的胚胎冷冻保存。在某些其他实施方案中,剩余的胚胎立即进行冷冻保存。

[0185] 在某些其他实施方案中,从单个胚胎中取出多个卵裂球,并且所述胚胎在取出多个卵裂球的过程中或之后被破坏。多个卵裂球可一起用于一个实验,例如,通过在初始卵裂球培养中聚集多个卵裂球。替代地,多个卵裂球可用于分开的实验,以努力使可从单个胚胎产生的系或细胞类型的数目最大化。

[0186] 从其中获得卵裂球的胚胎可通过有性或无性方法产生。在某些实施方案中,所述胚胎通过用精子使卵受精产生。在某些其他实施方案中,所述胚胎通过体细胞核移植、孤雌生殖、孤雄发育或其他无性技术产生。注意衍生自无性技术的胚胎可能与通过受精产生的胚胎看起来不相同。但是,尽管外观上存在任何差异,术语胚胎意在包括无性繁殖的产物和受精或其他有性繁殖方法的产物。

[0187] **【培养卵裂球和ES细胞的产生】**

[0188] 从胚胎中取出后,分离的卵裂球可在任何类型的培养基上进行初始培养,如胚胎培养基,比如Quinn's分裂培养基(Cooper Surgical Inc.Cat#ART1529)。可使用支持胚胎生长的任何培养基,包括但不限于任何商业制剂。如本文所用的,术语“胚胎培养基”用于指促进卵裂球(尤其是人类卵裂球)在培养下的存活的培养基。在某些实施方案中,所述胚胎培养基是含有低于5mM葡萄糖的培养基。在某些实施方案中,所述胚胎培养基是具有低于310mosm的摩尔渗透压浓度的培养基。在某些其他实施方案中,所述胚胎培养基是含有低于5mM葡萄糖并具有低于310mosm的摩尔渗透压浓度的培养基。在某些实施方案中,用于初始培养卵裂球的培养基具有低于300mosm、低于280mosm或低于260mosm的摩尔渗透压浓度,并任选地含有低于5mM葡萄糖。在某些实施方案中,用于初始培养卵裂球的培养基具有约260-280mosm的摩尔渗透压浓度,并任选地含有低于5mM葡萄糖。注意,无论用于初始培养卵裂球的培养基中的摩尔渗透压浓度和葡萄糖具体浓度如何,所述培养基还可补充通常发现于商

业培养基制剂的抗生素、矿物质、氨基酸和其他因子。

[0189] 卵裂球在标准ES细胞培养基中的初始生长可能不好。不过,如本文中详细描述,在某些胚胎细胞或胎儿细胞的存在下培养卵裂球和/或允许其分裂一次或多次后,可任选地在ES细胞培养基中培养卵裂球团簇,或可通过逐渐替换培养基将其缓慢地从胚胎培养基转移至ES细胞培养基。如本文所用的、术语“ES细胞培养基”用于指促进ES细胞在培养下的维持,并且随着它们继续分裂和产生ES细胞、ED细胞等,可用于培养卵裂球团簇的培养基。此类培养基至少在某种程度上针对ES细胞进行了优化。在某些实施方案中,ES细胞培养基含有至少5mM葡萄糖(相对高的葡萄糖)。在某些其他实施方案中,ES细胞培养基具有至少310mosm的摩尔渗透压浓度。在某些其他实施方案中,所述培养基含有至少5mM葡萄糖并具有至少310mosm的摩尔渗透压浓度。在某些实施方案中,此培养基具有至少320mosm或至少330mosm的摩尔渗透压浓度,并任选地含有至少5mM葡萄糖。在某些实施方案中,此培养基具有约310-340mosm的摩尔渗透压浓度,并任选地含有至少5mM葡萄糖。ES细胞培养基还可以补充本领域已知的促进ES细胞生长的因子,并且所述培养基可含有通常发现于商业培养基制剂的抗生素、矿物质、氨基酸和其他因子。在某些实施方案中,在Quinn's分裂培养基(Cooper Surgical)中培养前核阶段人类胚胎。

[0190] 在某些实施方案中,前核阶段人类胚胎培养至多达8-细胞阶段。在某些实施方案中,前核阶段胚胎可培养至多达约2-细胞阶段、4-细胞阶段或16-细胞阶段。在某些实施方案中,前核阶段胚胎可培养至多达2-细胞阶段和4-细胞阶段、2-细胞阶段和8-细胞阶段、2-细胞阶段和16-细胞阶段、4-细胞阶段和8-细胞阶段、4-细胞阶段和16-细胞阶段或8-细胞阶段和16-细胞阶段之间。在某些实施方案中,在补充有0.05%PVA的不含Ca⁺⁺和Mg⁺⁺的磷酸缓冲盐水中预温育胚胎。在某些实施方案中,胚胎在室温下预温育约5、10、15、20、25、30、5-10、5-15、5-30、10-15、10-30或15-30分钟。在某些实施方案中,将胚胎转移至Quinn's hepes培养基以进行操作。

[0191] 在某些实施方案中,使用PIEZO从胚胎分离单独的卵裂球。在某些实施方案中,在插入活体解剖吸液管之前,在透明带上打一个洞(直径500μm)。在某些实施方案中,所述洞可通过应用几次PIEZO脉冲使用小的(20μm)吸液管进行打制。在某些实施方案中,将活体解剖吸液管(500μm)插入穿过所述洞,以应用温和的负压抓住卵裂球。在某些实施方案中,当卵裂球的2/3在吸液管内部时,即将所述卵裂球(blasomeres)拉走。在某些实施方案中,卵裂球的1/3、1/2或3/4在吸液管内部。在某些实施方案中,卵裂球的1/3至1/2、1/3至2/3、1/3至3/4、1/2至2/3、1/2至3/4或2/3至3/4在吸液管内部。

[0192] 在某些实施方案中,活体解剖后,可将母体胚胎和卵裂球返回到原始培养滴(culture drops)(Quinn's分裂培养基)中并一起培养12至18小时。在某些实施方案中,活体解剖后,可将母体胚胎和卵裂球返回到原始培养滴(Quinn's分裂培养基)中并一起培养约6至12、6至18、6至24、12至18、12至24或18至24小时。在某些实施方案中,将母体胚胎转移至胚泡培养基(Quinn's胚泡培养基)。在某些实施方案中,将卵裂球转移至含有MEF的小培养滴中(50μl)。在某些实施方案中,卵裂球培养基可补充有层粘连蛋白、纤连蛋白或基质胶(Matrigel)。在某些实施方案中,将卵裂球培养约3、4、5、6、7或8天。在某些实施方案中,在同一培养基中将卵裂球培养至它们形成包含大约20个细胞的细胞团块。在某些实施方案中,可将GFP ES细胞培养滴与卵裂球培养滴合并,以允许这两种培养基混合在一起。在某些

实施方案中,可取出一些或全部卵裂球团块,并于约12、18、24、36或48小时后铺板于相同的培养滴。

[0193] 在某些实施方案中,卵裂球从人类或其他哺乳动物胚胎获得,并在胚胎培养基中培养。优选地,将卵裂球在胚胎培养基中培养至少一天或直至卵裂球分裂至少一次。但是,可将卵裂球在胚胎培养基中培养多于1天(至少2、3、4天等),和/或在分裂产生卵裂球(blastoemre)团簇之前,将卵裂球在接触胚胎细胞或胎儿细胞下培养。当在胚胎培养基中培养时,卵裂球可分裂一次或多次,或产生两个或多个卵裂球的团簇。进一步培养卵裂球团簇包括与其后代一起培养卵裂球。在某些实施方案中,卵裂球发生分裂,并将其后代作为聚集物培养。

[0194] 在一个实施方案中,可在微滴中培养卵裂球。每个微滴可含有单个卵裂球或多个卵裂球。约至少1天、至少2-3天或至少4天之后,培养的卵裂球可发生分裂并形成小泡或聚集物。在直接或间接接触胚胎细胞之前培养卵裂球的好处是防止胚胎细胞过度生长卵裂球。

[0195] 初始培养卵裂球产生两个或多个卵裂球的团簇之后,使培养的两个或多个卵裂球的团簇与胚胎细胞或胎儿细胞直接或间接接触,或替代地与在不存在胚胎细胞或胎儿细胞下的促进卵裂球进一步成熟的培养基接触。此类培养基包括用胚胎细胞或胎儿细胞调节的培养基(条件培养基)或补充有促进卵裂球成熟的生长因子或细胞因子的培养基。在某些实施方案中,所述培养基补充有ACTH(促肾上腺皮质激素)。

[0196] 对于其中使用与胚胎细胞或胎儿细胞的直接或间接培养的实施方案,所述胚胎细胞或胎儿细胞可衍生自例如哺乳动物。在某些实施方案中,所述胚胎细胞或胎儿细胞是小鼠或人类细胞。示例性胚胎细胞或胎儿细胞包括但不限于,胚胎干(ES)细胞(无论是衍生自胚泡、卵裂球还是通过其他方法衍生,且无论是使用体细胞核移植还是其他无性繁殖衍生)、胚胎生殖细胞、胚胎癌细胞、胎盘细胞、滋养层/滋养外胚层细胞、滋养层干细胞、原生生殖细胞胚胎生殖细胞、羊膜液细胞、羊膜干细胞、胎盘细胞、胎盘干细胞和脐带细胞。在其中卵裂球直接或间接接触胚胎细胞或胎儿细胞的某些实施方案中,培养卵裂球的培养基进一步补充有ACTH或促进卵裂球成熟的其他生长因子或细胞因子。

[0197] 当使用时,可在存在或不存在细胞饲养层下培养胚胎细胞或胎儿细胞。饲养细胞可用于帮助维持胚胎细胞或胎儿细胞和防止它们分化。具体的饲养细胞可基于使用的特定胚胎细胞或胎儿细胞选择。示例性饲养细胞包括但不限于成纤维细胞饲养细胞。此类成纤维细胞饲养细胞可衍生自与胚胎细胞或胎儿细胞相同的物种,或它们可衍生自不同的物种。相似地,饲养细胞和胚胎细胞或胎儿细胞可衍生自与卵裂球相同的物种或不同的物种。在某些实施方案中,饲养细胞受过辐射或其他方式处理,以防止相对于胚胎细胞或胎儿细胞的过度生长。示例性饲养细胞包括但不限于,小鼠胚胎成纤维细胞(MEF细胞)、人类胚胎成纤维细胞、人类包皮成纤维细胞、人类皮肤成纤维细胞、人类子宫内膜成纤维细胞、人类输卵管成纤维细胞和胎盘细胞。还考虑了衍生自其他动物(哺乳动物、鸡等)的相似细胞类型。

[0198] 在一个实施方案中,所述饲养细胞和/或胚胎细胞是人类细胞,其是衍生自与卵裂球同一胚胎的自体同源细胞。

[0199] 胚胎细胞或胎儿细胞在ES细胞培养基或支持胚胎细胞或胎儿细胞生长的任何培

培养基,如Knockout DMEM(Invitrogen Cat#10829-018)中生长。示例性胚胎细胞或胎儿细胞包括但不限于,胚胎干细胞(比如来自已建立的系)、胚胎癌细胞、鼠胚胎成纤维细胞、其他胚胎样细胞、胚胎起源的细胞或衍生自胚胎的细胞,其中许多是本领域已知的,并可从美国典型培养物保藏中心(Manassas,VA 20110-2209,USA)和其他来源获得。

[0200] 胚胎细胞或胎儿细胞可直接加入培养的卵裂球,或可于接近但不直接接触培养的卵裂球下生长。各种直接和间接共培养系统可能有助于向培养的卵裂球提供来自胚胎细胞或胎儿细胞的因子或信号。如本文所用的,“接触培养的两个或多个卵裂球的团簇”指直接或间接接触或共培养的任何方法。

[0201] 在某些实施方案中,接触两个或多个卵裂球的团簇包含使卵裂球团簇与胚胎细胞或胎儿细胞聚集。在某些其他实施方案中,接触包括共培养两个或多个卵裂球的团簇,以使所述细胞与胚胎细胞或胎儿细胞直接接触但不与之聚集。在其他实施方案中,接触包括将两个或多个卵裂球的团簇与胚胎细胞或胎儿细胞共培养,以使所述细胞处于间接接触例如保持在同一培养容器中但不会有细胞的直接接触,或保持为连续的微滴。

[0202] 在某些实施方案中,所述方法包括用胚胎细胞或胎儿细胞直接或间接接触培养的两个或多个卵裂球的团簇的步骤,条件是所述接触不是通过使培养的卵裂球与胚胎细胞聚集而进行,如Chung等人,Nature(2006)439:216-9所述。替代地,间接连接或合并卵裂球的培养物和胚胎细胞或胎儿细胞的培养物。这可通过本领域已知的任何方法实现,包括,例如在位于轻质矿物油比如Cooper Surgical ACT#ART4008、石蜡油或Squibb's油下的两滴之间拖动操作吸液管。可通过使用玻璃毛细管或相似设备进行所述连接。培养的卵裂球和胚胎细胞之间的此类间接连接允许胚胎培养基(其中培养了卵裂球)和ES细胞培养基(其中培养了人类胚胎细胞)的逐渐混合。在另一实施方案中,卵裂球可与剩余的胚胎共培养。例如,将卵裂球和剩余的胚胎在微滴培养系统或本领域已知的不允许细胞-细胞接触但允许细胞-分泌的因子和/或细胞-基质接触的其他培养系统中共培养。可减小微滴的体积(如从50 μ l至约5 μ l)以加强信号。在另一实施方案中,胚胎细胞可来自不是人类的物种,如非人灵长类或小鼠。

[0203] 在某些实施方案中,用于培养卵裂球、两个或多个卵裂球的团簇和胚胎细胞或胎儿细胞的特定培养基制剂可根据物种而略有不同。另外,初始卵裂球培养是否从与用于培养卵裂球的团簇或胚胎细胞的培养基制剂不同的培养基制剂中获益也可根据物种而略有不同。

[0204] 在某些实施方案中,用于单独培养卵裂球的培养基和用于培养胚胎细胞或胎儿细胞的培养基无需相同。在所述培养基不同的实施方案中,卵裂球或卵裂球的团簇初始暴露于与初始培养卵裂球的培养基不同的培养基将需要一段时间(如,所述细胞将缓慢地暴露于培养胚胎细胞或胎儿细胞的培养基)。在此类实施方案中,可逐渐转移两个或多个卵裂球的团簇(其现在已分裂多次以产生细胞群和细胞生长晕)(例如通过交换培养基),并将其培养在具有ES细胞培养基特性的培养基。

[0205] 约3-4天后,卵裂球表现出ES细胞的特性。具体说,随着细胞继续分裂并且卵裂球后代簇集,各种细胞类型出现,并可根据表型鉴定。其中出现的细胞类型包括滋养外胚层样细胞、ES细胞和部分或终末分化的ED细胞。同样地,这些方法可用于产生ES细胞、TS或其他滋养外胚层细胞或ED细胞。虽然不希望受任何特定理论的束缚,但是认为,经过几天或几周

后,培养的卵裂球表现出ES细胞生长,可能是胚胎细胞或胎儿细胞分泌的或胞外基质分泌的因子的结果。进一步,分裂的卵裂球团簇的后代在一些方面类似于植入前胚泡的发育过程中观察到的变化。这样,在这些培养中出现的细胞类型在一定程度上重演了铺板完整胚泡或ICM时观察到的细胞类型。

[0206] 在某些实施方案中,卵裂球培养条件可包括使细胞接触可抑制或相反地加强细胞分化,如阻止细胞分化成非ES细胞、滋养外胚层或其他细胞类型的因子。此类条件可包括使培养的细胞接触肝素或将Oct-4引入细胞(比如通过将Oct-4包括在培养基中)或活化细胞中的内源Oct-4。在又一实施方案中,通过本领域已知的任何方法阻止cdx-2的表达,包括而不限将CDX-2RNAi引入卵裂球,藉此抑制卵裂球向TS细胞的分化。

[0207] 在某些实施方案中,卵裂球培养基补充有抑制向非ES细胞的分化的因子。在某些实施方案中,向培养基中添加层粘连蛋白以抑制向非ES细胞的分化。在某些实施方案中,培养基中补充有约2.5、5、7.5、10、15,或20 μ g/ml层粘连蛋白。在某些实施方案中,培养基补充有1-5、1-10、5-10、10-20或1-20 μ g/ml层粘连蛋白。

[0208] 在某些实施方案中,培养基补充有中断紧密连接的因子。在某些实施方案中,向培养基中添加层粘连蛋白以中断紧密连接。

[0209] 在某些实施方案中,培养基补充有抑制滋养外胚层分化途径的因子。在某些实施方案中,向培养基中添加层粘连蛋白以抑制滋养外胚层分化途径。

[0210] 在某些实施方案中,培养基补充有使细胞去极化的因子。在某些实施方案中,向培养基中添加层粘连蛋白以使细胞去极化。在某些实施方案中,去极化是通过细胞表面缺乏微绒毛确定的。在某些实施方案中,去极化是通过细胞堆积形成多层结构确定的。

[0211] 如上详述的,把发明提供了从获自胚胎的卵裂球产生ES细胞、ED细胞和TS细胞的方法。此方法可用于产生ES细胞、ED细胞和TS细胞以及细胞系,而无需破坏从中获得所述卵裂球的胚胎。

[0212] **【培养卵裂球和ED细胞的产生】**

[0213] 过去使用内细胞团细胞的长期培养来产生胚胎干细胞系。随后培养胚胎干细胞,进行条件遗传修饰,诱导分化以产生用于治疗性的细胞。美国专利申请第11/025,893号(公布为US 2005/0265976A1),整体并入本文,描述了直接诱导内细胞团细胞或桑椹胚衍生的细胞的分化从这些细胞产生分化的祖先细胞而无需产生胚胎干细胞系的方法和所述分化的细胞、组织和器官在移植疗法中的用途。因为这些细胞衍生自胚胎的细胞而不是ES细胞系,所以我们将此类细胞命名为胚胎衍生的(ED)细胞。卵裂球衍生的ED细胞比使用本领域已知的方法产生的人类ES细胞具有更宽的分化潜能,原因是可容易地使用本领域已知的技术将ED细胞分化成种系细胞,如使用将鼠ES细胞系分化成种系细胞的方法。相反,预期衍生自内细胞团(inner mass cells)的人类ES细胞系不能够分化成种系细胞。已经在衍生自动物比如猪、牛、鸡和大鼠中的内细胞团(inner mass cells)的ES细胞中观察到了这一现象,并且这很可能是由于种系是分化中发生分枝的第一细胞谱系之一。

[0214] 在本发明的一些方法中,来自具有至少两个细胞的胚胎的卵裂球在胚胎进入致密化桑椹胚发育阶段之前被诱导直接分化成分化的祖先细胞,所述祖先细胞然后用于细胞治疗和产生用于移植的细胞、组织和器官。如果需要,遗传修饰可,例如,在核移植以产生桑椹胚或胚泡前引入体细胞,或在通过将所述体细胞的DNA与能够重编程所述体细胞的因子并

置(juxtaposition)来将所述体细胞重编程为未分化的细胞之前引入体细胞,或引入使用这些方法制备的ES细胞系。参见美国专利申请第10/831,599号(公布为US 2004199935)、2006年8月3日提交的PCT/US06/30632和美国临时专利申请第60/705,625、60/729,173和60/818,813号,其公开内容通过引用整体并入本文。因此,本发明的分化的祖先细胞不拥有胚胎干细胞或胚胎生殖细胞的多能性,并且本质上是组织特异性的、部分或完全分化的细胞。这些分化的祖先细胞可从三个胚胎胚层(即内胚层、中胚层和外胚层)的任何一个产生细胞。例如,分化的祖先细胞可分化成骨、软骨、平滑肌、具有出生前基因表达模式并能够促进无瘢痕伤口修复的皮肤以及造血细胞或成血管细胞(中胚层),终末内胚层、肝、原始消化管、胰腺 β 细胞和呼吸上皮(内胚层);或神经元、神经胶质细胞、毛囊或眼细胞(包括视网膜神经元和视网膜色素上皮)。

[0215] 此外,本发明的分化祖先细胞无需表达端粒末端转移酶(TERT)的催化组分,并且无需是永生的,或所述祖先细胞无需表达发现于胚胎干细胞的细胞表面标志物,比如灵长类动物胚胎干细胞的特征性细胞表面标志物:SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、碱性磷酸酶活性为阳性,而SSEA-1为阴性。此外,本发明的分化的祖先细胞不同于胚状体,即胚状体衍生自胚胎干细胞,而本发明的分化干细胞衍生自卵裂球。

[0216] 优选地,通过在不存在胚胎干细胞下培养卵裂球衍生的细胞来产生本发明的分化细胞。例如,可通过分化诱导剂的存在下培养卵裂球或通过向细胞引入遗传修饰以使胚胎干细胞的生长受到阻止来防止未分化的胚胎干细胞的生长。

[0217] 任何脊椎动物胚胎可用作卵裂球或在发育上等同于哺乳动物卵裂球的细胞的来源。特别地,人类卵裂球在产生基于人类细胞的治疗中具有重要效用。原始的胚胎可通过体外受精产生,通过正常的有性生殖在生殖道内受精、人工授精或配子输卵管内移植(GIFT)并随后恢复来衍生,通过体细胞核移植衍生。

[0218] 【分化】

[0219] 本文已经描述了分离卵裂球的方法。分离的卵裂球可被直接或经由细胞或细胞系诱导,以在存在分化诱导条件下分化,所述分化诱导条件包括在产生特定的期望分化细胞类型中有用的生长因子、血清、激素、胞外基质的各种组合,如本领域已知的(有关示例性分子的列表,请参见表1),或如以下未决的申请中公开的:2006年4月11日提交的PCT/US2006/013573、2006年8月3日提交的美国申请第60/835,779号、2006年4月14日提交的60/792,224、2006年5月19日提交的60/801,993、2006年4月11日提交的PCT/US2006/013519、美国申请第11/025,893号(公布为US 20050265976)、2005年8月4日公布的W02005/070011和2006年8月3日公布的W0 2006/080952,其公开内容通过引用并入本文。例如,可在各种诱导子细胞类型比如那些作为单个细胞衍生的细胞群体而分离的细胞上,或在特定的胞外基质组分和其他分化诱导因子比如下面的表1所示的因子或因子的组合上培养卵裂球或ES细胞。

[0220] 【表1】

[0221] 【培养变量】

[0222] 【EGF配体】

[0223] 1)双调蛋白

[0224] 2) β 动物纤维素

[0225] 3)EGF

- [0226] 4)表原(Epigen)
- [0227] 5)表皮调节素(Epiregulin)
- [0228] 6)HB-EGF
- [0229] 7)神经调节蛋白-3
- [0230] 8)NRG1同种型GGF2
- [0231] 9)NRG1同种型SMDF
- [0232] 10)NRG1- α /HRG1- α
- [0233] 11)TGF- α
- [0234] 12)TMEFF1/Tomoregulin-1
- [0235] 13)TMEFF2
- [0236] 14)EGF配体集合(上面的1-13)
- [0237] **【EGF R/ErbB受体家族】**
- [0238] 15)EGF受体
- [0239] 16)ErbB2
- [0240] 17)ErbB3
- [0241] 18)ErbB4
- [0242] 19)EGF/ErbB受体集合(上面的15-18)
- [0243] **【FGF配体】**
- [0244] 20)FGF酸性
- [0245] 21)FGF碱性
- [0246] 22)FGF-3
- [0247] 23)FGF-4
- [0248] 24)FGF-5
- [0249] 25)FGF-6
- [0250] 26)KGF/FGF-7
- [0251] 27)FGF-8
- [0252] 28)FGF-9
- [0253] 29)FGF-10
- [0254] 30)FGF-11
- [0255] 31)FGF-12
- [0256] 32)FGF-13
- [0257] 33)FGF-14
- [0258] 34)FGF-15
- [0259] 35)FGF-16
- [0260] 36)FGF-17
- [0261] 37)FGF-18
- [0262] 38)FGF-19
- [0263] 39)FGF-20
- [0264] 40)FGF-21

- [0265] 41) FGF-22
- [0266] 42) FGF-23
- [0267] 43) FGF配体集合(上面的20-38)
- [0268] **【FGF受体】**
- [0269] 40) FGF R1
- [0270] 41) FGF R2
- [0271] 42) FGF R3
- [0272] 43) FGF R4
- [0273] 44) FGF R5
- [0274] 45) FGF受体集合(上面的40-44)
- [0275] **【FGF调节物】**
- [0276] 46) FGF-BP
- [0277] 刺猬因子(Hedgehogs)
- [0278] 47) 沙漠刺猬因子
- [0279] 48) 音猬因子
- [0280] 49) 印度刺猬因子
- [0281] 50) 刺猬因子集合(上面的47-49)
- [0282] **【刺猬因子调节物】**
- [0283] 51) Gas1
- [0284] 52) Hip
- [0285] 53) 刺猬因子调节物集合(上面的51-52)
- [0286] **【IGF配体】**
- [0287] 54) IGF-I
- [0288] 55) IGF-II
- [0289] 56) IGF配体集合(上面的54-55)
- [0290] **【IGF-I受体(CD221)】**
- [0291] 57) IGF-I R
- [0292] **【GF结合蛋白(IGFBP)家族】**
- [0293] 58) ALS
- [0294] 59) IGFBP-4
- [0295] 60) CTGF/CCN2
- [0296] 61) IGFBP-5
- [0297] 62) Endocan(内皮细胞特异性分子)
- [0298] 63) IGFBP-6
- [0299] 64) IGFBP-1
- [0300] 65) IGFBP-rp1/IGFBP-7
- [0301] 66) IGFBP-2
- [0302] 67) NOV/CCN3
- [0303] 68) IGFBP-3

- [0304] 69)GF结合蛋白家族集合(上面的58-68)
- [0305] **【受体酪氨酸激酶】**
- [0306] 70)Ax1
- [0307] 71)C1q R1/CD93
- [0308] 72)DDR1
- [0309] 73)Flt-3
- [0310] 74)DDR2
- [0311] 75)HGF R
- [0312] 76)Dtk
- [0313] 77)IGF-II R
- [0314] 78)Eph
- [0315] 79)胰岛素R/CD220
- [0316] 80)EphA1
- [0317] 81)M-CSF R
- [0318] 82)EphA2
- [0319] 83)Mer
- [0320] 84)EphA3
- [0321] 85)MSP R/Ron
- [0322] 86)EphA4
- [0323] 87)MuSK
- [0324] 88)EphA5
- [0325] 89)PDGF R α
- [0326] 90)EphA6
- [0327] 91)PDGF R β
- [0328] 92)EphA7
- [0329] 93)Ret
- [0330] 94)EphA8
- [0331] 95)ROR1
- [0332] 96)EphB1
- [0333] 97)ROR2
- [0334] 98)EphB2
- [0335] 99)SCF R/c-kit
- [0336] 100)EphB3
- [0337] 101)Tie-1
- [0338] 102)EphB4
- [0339] 103)Tie-2
- [0340] 104)EphB6
- [0341] 105)TrkA
- [0342] 106)TrkB

- [0343] 107)TrkC
- [0344] 108)VEGF R1/F1t-1
- [0345] 109)VEGF R2/F1k-1
- [0346] 110)VEGF R3/F1t-4
- [0347] 111)受体酪氨酸激酶集合(上面的70-110)
- [0348] **【蛋白聚糖】**
- [0349] 112)聚集蛋白聚糖
- [0350] 113)腔蛋白聚糖
- [0351] 114)双糖链蛋白聚糖
- [0352] 115)Mimecan
- [0353] 116)饰胶蛋白聚糖
- [0354] 117)NG2/MCSP
- [0355] 118)Endocan
- [0356] 119)Osteoadherin
- [0357] 120)Endorepellin
- [0358] 121)黏结蛋白聚糖-1/CD138
- [0359] 122)磷脂酰肌醇蛋白聚糖2
- [0360] 123)黏结蛋白聚糖-3
- [0361] 124)磷脂酰肌醇蛋白聚糖3
- [0362] 125)睾丸蛋白聚糖1/SPOCK1
- [0363] 126)磷脂酰肌醇蛋白聚糖5
- [0364] 127)睾丸蛋白聚糖2/SPOCK2
- [0365] 128)磷脂酰肌醇蛋白聚糖6
- [0366] 129)睾丸蛋白聚糖3/SPOCK3
- [0367] 130)硫酸乙酰肝素蛋白聚糖
- [0368] 131)肝素
- [0369] 132)硫酸软骨素蛋白聚糖
- [0370] 133)透明质酸
- [0371] 134)硫酸皮肤素蛋白聚糖
- [0372] **【蛋白聚糖调节物】**
- [0373] 135)芳基硫酸酯酶A/ARSA
- [0374] 136)HAPLN1
- [0375] 137)Exostosin样2
- [0376] 138)HS6ST2
- [0377] 139)Exostosin样3
- [0378] 140)IDS
- [0379] 141)蛋白聚糖调节物集合(上面的135-140)
- [0380] **【SCF、F1t-3配体&M-CSF】**
- [0381] 142)F1t-3

- [0382] 143)M-CSF R
- [0383] 144)Flt-3配体
- [0384] 145)SCF
- [0385] 146)M-CSF
- [0386] 147)SCF R/c-kit
- [0387] 148)集合的因子(上面的142-147)
- [0388] **【活化素】**
- [0389] 149)活化素A
- [0390] 150)活化素B
- [0391] 151)活化素AB
- [0392] 152)活化素C
- [0393] 153)集合活化素(上面的149-152)
- [0394] **【BMP(骨形态发生蛋白)】**
- [0395] 154)BMP-2
- [0396] 155)BMP-3
- [0397] 156)BMP-3b/GDF-10
- [0398] 157)BMP-4
- [0399] 158)BMP-5
- [0400] 159)BMP-6
- [0401] 160)BMP-7
- [0402] 161)BMP-8
- [0403] 162)Decapentaplegic
- [0404] 163)集合的BMP(上面的154-162)
- [0405] **【GDF(生长分化因子)】**
- [0406] 164)GDF-1
- [0407] 165)GDF-2
- [0408] 166)GDF-3
- [0409] 167)GDF-4
- [0410] 168)GDF-5
- [0411] 169)GDF-6
- [0412] 170)GDF-7
- [0413] 171)GDF-8
- [0414] 172)GDF-9
- [0415] 173)GDF-10
- [0416] 174)GDF-11
- [0417] 175)GDF-12
- [0418] 176)GDF-13
- [0419] 177)GDF-14
- [0420] 178)GDF-15

- [0421] 179)GDF集合(上面的164-178)
- [0422] **【GDNF家族配体】**
- [0423] 180)Artemin
- [0424] 181)Neurturin
- [0425] 182)GDNF
- [0426] 183)Persephin
- [0427] 184)GDNF配体集合(上面的180-183)
- [0428] **【TGF- β 】**
- [0429] 185)TGF- β
- [0430] 186)TGF- β 1
- [0431] 187)TGF- β 1.2
- [0432] 188)TGF- β 2
- [0433] 189)TGF- β 3
- [0434] 190)TGF- β 4
- [0435] 191)TGF- β 5
- [0436] 192)LAP(TGF- β 1)
- [0437] 193)潜在的TGF- β 1
- [0438] 194)TGF- β 集合(上面的185-193)
- [0439] **【其他TGF- β 超家族配体】**
- [0440] 195)Lefty
- [0441] 196)Nodal
- [0442] 197)MIS/AMH
- [0443] 198)其他TGF- β 配体集合(上面的195-197)
- [0444] **【TGF- β 超家族受体】**
- [0445] 199)活化素RIA/ALK-2
- [0446] 200)GFR α -1
- [0447] 201)活化素RIB/ALK-4
- [0448] 202)GFR α -2
- [0449] 203)活化素RIIA
- [0450] 204)GFR α -3
- [0451] 205)活化素RIIB
- [0452] 206)GFR α -4
- [0453] 207)ALK-I
- [0454] 208)MIS RII
- [0455] 209)ALK-7
- [0456] 210)Ret
- [0457] 211)BMPRII/ALK-3
- [0458] 212)TGF- β RI/ALK-5
- [0459] 213)BMPRII/ALK-6

- [0460] 214)TGF- β R11
- [0461] 215)BMPR-11
- [0462] 216)TGF- β R11b
- [0463] 217)内皮糖蛋白/CD105
- [0464] 218)TGF- β R111
- [0465] 219)TGF- β 家族受体集合(上面的199-218)
- [0466] **【TGF- β 超家族调制剂】**
- [0467] 220)Amnionless
- [0468] 221)GASP-2/WF1KKN
- [0469] 222)BAMBI/NMA
- [0470] 223)Gremlin
- [0471] 224)Caronte
- [0472] 225)NCAM-1/CD56
- [0473] 226)Cerberus 1
- [0474] 227)头蛋白
- [0475] 228)脊索发生素
- [0476] 229)PRDC
- [0477] 230)脊索发生素样1
- [0478] 231)脊索发生素样2
- [0479] 232)Smad1
- [0480] 233)Smad4
- [0481] 234)Smad5
- [0482] 235)Smad7
- [0483] 236)Smad8
- [0484] 237)CRIM1
- [0485] 238)Cripto
- [0486] 239)Crossveinless-2
- [0487] 240)Cryptic
- [0488] 241)SOST
- [0489] 242)DAN
- [0490] 243)潜在TGF- β bp1
- [0491] 244)TMEFF1/Tomoregulin-1
- [0492] 245)FLRG
- [0493] 246)TMEFF2
- [0494] 247)促滤泡素抑制素
- [0495] 248)TSG
- [0496] 249)促滤泡素抑制素样1
- [0497] 250)Vasorin
- [0498] 251)GASP-1/WF1KKNRP

- [0499] 252)TGF调制剂集合(上面的220-251)
- [0500] **【VEGF/PDGF家族】**
- [0501] 253)神经毡蛋白-1
- [0502] 254)PlGF
- [0503] 255)PlGF-2
- [0504] 256)神经毡蛋白-2
- [0505] 257)PDGF
- [0506] 258)VEGF R1/F1t-1
- [0507] 259)PDGF R α
- [0508] 260)VEGF R2/F1k-1
- [0509] 261)PDGF R β
- [0510] 262)VEGF R3/F1t-4
- [0511] 263)PDGF-A
- [0512] 264)VEGF
- [0513] 265)PDGF-B
- [0514] 266)VEGF-B
- [0515] 267)PDGF-C
- [0516] 268)VEGF-C
- [0517] 269)PDGF-D
- [0518] 270)VEGF-D
- [0519] 271)PDGF-AB
- [0520] 272)VEGF/PDGF家族集合(上面的253-271)
- [0521] **【Dickkopf蛋白&Wnt抑制剂】**
- [0522] 273)Dkk-1
- [0523] 274)Dkk-2
- [0524] 275)Dkk-3
- [0525] 276)Dkk-4
- [0526] 277)Soggy-1
- [0527] 278)WIF-1
- [0528] 279)集合的因子(上面的273-278)
- [0529] **【Frizzled&相关蛋白】**
- [0530] 280)Frizzled-1
- [0531] 281)Frizzled-2
- [0532] 282)Frizzled-3
- [0533] 283)Frizzled-4
- [0534] 284)Frizzled-5
- [0535] 285)Frizzled-6
- [0536] 286)Frizzled-7
- [0537] 287)Frizzled-8

- [0538] 288)Frizzled-9
- [0539] 289)sFRP-1
- [0540] 290)sFRP-2
- [0541] 291)sFRP-3
- [0542] 292)sFRP-4
- [0543] 293)MFRP
- [0544] 294)因子集合(上面的280-293)
- [0545] **【Wnt配体】**
- [0546] 295)WnM
- [0547] 296)Wnt-2
- [0548] 297)Wnt-3
- [0549] 298)Wnt-3a
- [0550] 299)Wnt-4
- [0551] 300)Wnt-5
- [0552] 301)Wnt-5a
- [0553] 302)Wnt-6
- [0554] 303)Wnt-7
- [0555] 304)Wnt-8
- [0556] 305)Wnt-8a
- [0557] 306)Wnt-9
- [0558] 307)Wnt-10a
- [0559] 308)Wnt-10b
- [0560] 309)Wnt-11
- [0561] 310)Wnt配体集合(上面的295-309)
- [0562] **【其他Wnt-相关分子】**
- [0563] 311) β -联蛋白
- [0564] 312)LRP-6
- [0565] 313)GSK-3
- [0566] 314)ROR1
- [0567] 315)Kremen-1
- [0568] 316)ROR2
- [0569] 317)Kremen-2
- [0570] 318)WISP-1/CCN4
- [0571] 319)LRP-1
- [0572] 320)集合的因子(上面的311-319)
- [0573] **【其他生长因子】**
- [0574] 321)CTGF/CCN2
- [0575] 322)NOV/CCN3
- [0576] 323)EG-VEGF/PK1

- [0577] 324)骨织素(Osteocrin)
[0578] 325)Hepassocin
[0579] 326)PD-ECGF
[0580] 327)HGF
[0581] 328)颗粒蛋白前体(Progranulin)
[0582] 329) β -NGF
[0583] 330)血小板生成素
[0584] 331)集合的因子(上面的321-330)
[0585] **【类固醇激素】**
[0586] 332) 17β -雌二醇
[0587] 333)睾酮
[0588] 334)可的松(Cortisone)
[0589] 335)地塞米松
[0590] **【胞外/膜蛋白】**
[0591] 336)血浆纤连蛋白
[0592] 337)组织纤连蛋白
[0593] 338)纤连蛋白片段
[0594] 339)I型胶原蛋白(明胶)
[0595] 340)II型胶原蛋白
[0596] 341)III型胶原蛋白
[0597] 342)生腱蛋白
[0598] 343)基质金属蛋白酶1
[0599] 344)基质金属蛋白酶2
[0600] 345)基质金属蛋白酶3
[0601] 346)基质金属蛋白酶4
[0602] 347)基质金属蛋白酶5
[0603] 348)基质金属蛋白酶6
[0604] 349)基质金属蛋白酶7
[0605] 350)基质金属蛋白酶8
[0606] 351)基质金属蛋白酶9
[0607] 352)基质金属蛋白酶10
[0608] 353)基质金属蛋白酶11
[0609] 354)基质金属蛋白酶12
[0610] 355)基质金属蛋白酶13
[0611] 356)ADAM-1
[0612] 357)ADAM-2
[0613] 358)ADAM-3
[0614] 359)ADAM-4
[0615] 360)ADAM-5

[0616] 361)ADAM-6
[0617] 362)ADAM-7
[0618] 363)ADAM-8
[0619] 364)ADAM-9
[0620] 365)ADAM-10
[0621] 366)ADAM-11
[0622] 367)ADAM-12
[0623] 368)ADAM-13
[0624] 369)ADAM-14
[0625] 370)ADAM-15
[0626] 371)ADAM-16
[0627] 372)ADAM-17
[0628] 373)ADAM-18
[0629] 374)ADAM-19
[0630] 375)ADAM-20
[0631] 376)ADAM-21
[0632] 377)ADAM-22
[0633] 378)ADAM-23
[0634] 379)ADAM-24
[0635] 380)ADAM-25
[0636] 381)ADAM-26
[0637] 382)ADAM-27
[0638] 383)ADAM-28
[0639] 384)ADAM-29
[0640] 385)ADAM-30
[0641] 386)ADAM-31
[0642] 387)ADAM-32
[0643] 388)ADAM-33
[0644] 389)ADAMTS-1
[0645] 390)ADAMTS-2
[0646] 391)ADAMTS-3
[0647] 392)ADAMTS-4
[0648] 393)ADAMTS-5
[0649] 394)ADAMTS-6
[0650] 395)ADAMTS-7
[0651] 396)ADAMTS-8
[0652] 397)ADAMTS-9
[0653] 398)ADAMTS-10
[0654] 399)ADAMTS-11

- [0655] 400)ADAMTS-12
- [0656] 401)ADAMTS-13
- [0657] 402)ADAMTS-14
- [0658] 403)ADAMTS-15
- [0659] 404)ADAMTS-16
- [0660] 405)ADAMTS-17
- [0661] 406)ADAMTS-18
- [0662] 407)ADAMTS-19
- [0663] 408)ADAMTS-20
- [0664] 409)Arg-Gly-Asp
- [0665] 410)Arg-Gly-Asp-Ser
- [0666] 411)Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ser-Lys-Pro
- [0667] 412)Arg-Gly-Glu-Ser
- [0668] 413)Arg-Phe-Asp-Ser
- [0669] 414)SPARC
- [0670] 415)Cys-Asp-Pro-Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg
- [0671] 416)
- [0672] Cys-Ser-Arg-Ala-Arg-Lys-Gln-Ala-Ala-Ser-Ile-Lys-Val-Ser-Ala-Asp-Arg
- [0673] 417)弹性蛋白
- [0674] 418)原弹性蛋白(Tropelastin)
- [0675] 419)Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys
- [0676] 420)Gly-Arg-Gly-Asp-Thr-Pro
- [0677] 421)层粘连蛋白
- [0678] 422)Leu-Gly-Thr-Ile-Pro-Gly
- [0679] 423)Ser-Asp-Gly-Arg-Gly
- [0680] 424)玻连蛋白
- [0681] 425)超级纤连蛋白(Superfibronectin)
- [0682] 426)血小板反应蛋白
- [0683] 427)TIMP-1
- [0684] 428)TIMP-2
- [0685] 429)TIMP-3
- [0686] 430)TIMP-4
- [0687] 431)纤调蛋白
- [0688] 432)Flavoridin
- [0689] 433)胶原蛋白IV
- [0690] 434)胶原蛋白V
- [0691] 435)胶原蛋白VI
- [0692] 436)胶原蛋白VII
- [0693] 437)胶原蛋白VIII

- [0694] 438)胶原蛋白IX
[0695] 439)胶原蛋白X
[0696] 440)胶原蛋白XI
[0697] 441)胶原蛋白XII
[0698] 442)巢蛋白
[0699] 443)肌原纤蛋白
[0700] 444)黏结蛋白聚糖-1
[0701] 445)硫酸角质素蛋白聚糖
[0702] **【环境氧】**
[0703] 446)0.1-0.5%氧
[0704] 447)0.5-1%氧
[0705] 448)1-2%氧
[0706] 449)2-5%氧
[0707] 450)5-10%氧
[0708] 451)10-20%氧
[0709] **【动物血清】**
[0710] 452)0.1%牛血清
[0711] 453)0.5%牛血清
[0712] 454)1.0%牛血清
[0713] 455)5.0%牛血清
[0714] 456)10%牛血清
[0715] 457)20%牛血清
[0716] 458)10%马血清
[0717] **【白细胞介素】**
[0718] 459)IL-1
[0719] 460)IL-2
[0720] 461)IL-3
[0721] 462)IL-4
[0722] 463)IL-5
[0723] 464)IL-6
[0724] 465)IL-7
[0725] 466)IL-8
[0726] 467)IL-9
[0727] 468)IL-10
[0728] 469)IL-11
[0729] 470)IL-12
[0730] 471)IL-13
[0731] 472)IL-14
[0732] 473)IL-15

- [0733] 474)IL-16
- [0734] 475)IL-17
- [0735] 476)IL-18
- [0736] **【蛋白酶】**
- [0737] 477)MMP-1
- [0738] 478)MMP-2
- [0739] 479)MMP-3
- [0740] 480)MMP-4
- [0741] 481)MMP-5
- [0742] 482)MMP-6
- [0743] 483)MMP-7
- [0744] 484)MMP-8
- [0745] 485)MMP-9
- [0746] 486)MMP-10
- [0747] 487)MMP-11
- [0748] 488)MMP-12
- [0749] 489)MMP-13
- [0750] 490)MMP-14
- [0751] 491)MMP-15
- [0752] 492)MMP-16
- [0753] 493)MMP-17
- [0754] 494)MMP-18
- [0755] 495)MMP-19
- [0756] 496)MMP-20
- [0757] 497)MMP-21
- [0758] 498)MMP-22
- [0759] 499)MMP-23
- [0760] 500)MMP-24
- [0761] 501)组织蛋白酶B
- [0762] 501)组织蛋白酶C
- [0763] 503)组织蛋白酶D
- [0764] 504)组织蛋白酶G
- [0765] 505)组织蛋白酶H
- [0766] 506)组织蛋白酶L
- [0767] 507)胰蛋白酶
- [0768] 508)胃蛋白酶
- [0769] 509)弹性蛋白酶
- [0770] 510)羧肽酶A
- [0771] 511)羧肽酶B

- [0772] 512)羧肽酶G
[0773] 513)羧肽酶P
[0774] 514)羧肽酶W
[0775] 515)羧肽酶Y
[0776] 516)胰凝乳蛋白酶
[0777] 517)纤维蛋白溶酶原
[0778] 518)纤维蛋白溶酶
[0779] 519)u-型纤维蛋白溶酶原激活物
[0780] 520)t-型纤维蛋白溶酶原激活物
[0781] 521)纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂-1
[0782] 522)羧肽酶Z
[0783] **【氨基酸】**
[0784] 522)丙氨酸
[0785] 523)精氨酸
[0786] 524)天冬酰胺
[0787] 525)天冬氨酸
[0788] 526)半胱氨酸
[0789] 527)谷氨酰胺
[0790] 528)谷氨酸
[0791] 529)甘氨酸
[0792] 530)组氨酸
[0793] 531)异亮氨酸
[0794] 532)亮氨酸
[0795] 533)赖氨酸
[0796] 534)甲硫氨酸
[0797] 535)苯丙氨酸
[0798] 536)脯氨酸
[0799] 537)丝氨酸
[0800] 538)苏氨酸
[0801] 539)色氨酸
[0802] 540)酪氨酸
[0803] 541)缬氨酸
[0804] **【前列腺素】**
[0805] 542)前列腺素A1
[0806] 543)前列腺素A2
[0807] 544)前列腺素B1
[0808] 545)前列腺素B2
[0809] 546)前列腺素D2
[0810] 547)前列腺素E1

- [0811] 548)前列腺素E2
- [0812] 549)前列腺素F1 α
- [0813] 550)前列腺素F2 α
- [0814] 551)前列腺素H
- [0815] 552)前列腺素I2
- [0816] 553)前列腺素J2
- [0817] 554)6-酮-前列腺素F1 α
- [0818] 555)16,16-二甲基-前列腺素E2
- [0819] 556)15d-前列腺素J2
- [0820] 557)前列腺素集合(上面的542-556)
- [0821] **【类视黄醇受体激动剂/拮抗剂】**
- [0822] 558)烯虫酯酸(Methoprene Acid)
- [0823] 559)全反视黄酸
- [0824] 560)9-顺视黄酸
- [0825] 561)13-顺视黄酸
- [0826] 562)类视黄醇激动剂集合(上面的558-561)
- [0827] 563)类视黄醇拮抗剂
- [0828] 564)视黄酸受体同种型RAR α
- [0829] 565)视黄酸受体同种型RAR β
- [0830] 566)视黄酸受体同种型RAR γ
- [0831] 567)类视黄醇(Retinoic)X受体同种型RXR α
- [0832] 568)类视黄醇X受体同种型RXR β
- [0833] 569)类视黄醇X受体同种型RAR γ
- [0834] **【其他诱导子】**
- [0835] 570)植物凝集素
- [0836] 571)细菌凝集素
- [0837] 572)毛喉素
- [0838] 573)乙酸肉豆蔻酸佛波醇
- [0839] 574)聚-D-赖氨酸
- [0840] 575)1,25-二羟基维生素D
- [0841] 576)抑制素
- [0842] 577)调蛋白
- [0843] 578)糖原
- [0844] 579)孕酮
- [0845] 580)IL-1
- [0846] 581)血清素
- [0847] 582)纤连蛋白-45kDa片段
- [0848] 583)纤连蛋白-70kDa片段
- [0849] 584)葡萄糖

- [0850] 585)β巯基乙醇
- [0851] 586)肝素酶
- [0852] 587)垂体提取物
- [0853] 588)绒毛膜促性腺激素
- [0854] 589)促肾上腺皮质激素
- [0855] 590)甲状腺素
- [0856] 591)铃蟾肽
- [0857] 592)神经调节肽B
- [0858] 593)胃泌素释放肽
- [0859] 594)肾上腺素
- [0860] 595)异丙基肾上腺素
- [0861] 596)乙醇
- [0862] 597)DHEA
- [0863] 598)烟酸
- [0864] 599)NADH
- [0865] 600)催产素
- [0866] 601)血管升压素
- [0867] 602)加压催产素
- [0868] 603)血管紧张素I
- [0869] 604)血管紧张素II
- [0870] 605)血管紧张素I转变酶
- [0871] 606)血管紧张素I转变酶抑制剂
- [0872] 607)软骨素酶AB
- [0873] 608)软骨素酶C
- [0874] 609)脑钠肽
- [0875] 610)降钙素
- [0876] 611)钙离子载体I
- [0877] 612)钙离子载体II
- [0878] 613)钙离子载体III
- [0879] 614)钙离子载体IV
- [0880] 615)缓激肽
- [0881] 616)白蛋白
- [0882] 617)Plasmonate
- [0883] 618)LIF
- [0884] 619)PARP抑制剂
- [0885] 620)溶血磷脂酸
- [0886] 621)(R)-METH花生四烯酸乙醇酰胺
- [0887] 622)1,25-二羟基维生素D3
- [0888] 623)1,2-二癸酰-甘油(10:0)

- [0889] 624)1,2-二辛酰-SN-甘油
- [0890] 625)1,2-二油酰-甘油(18:1)
- [0891] 626)10-羟基喜树碱
- [0892] 627)11,12-环氧二十碳三烯酸
- [0893] 628)12(R)-HETE
- [0894] 629)12(S)-HETE
- [0895] 630)12(S)-HPETE
- [0896] 631)12-甲氧十二烷酸
- [0897] 632)13(S)-HODE
- [0898] 633)13(S)-HPODE
- [0899] 634)13,14-二氢-PGE1
- [0900] 635)13-酮十八碳二烯酸
- [0901] 636)14,15-环氧二十碳三烯酸
- [0902] 637)1400W
- [0903] 638)15(S)-HETE
- [0904] 639)15(S)-HPETE
- [0905] 640)15-酮二十碳四烯酸
- [0906] 641)17-烯丙基氨基-格尔德霉素
- [0907] 642)17-十八碳炔酸
- [0908] 643)17-苯基-TRINOR-PGE2
- [0909] 644)1-酰基-PAF
- [0910] 645)1-十六烷基-2-花生四烯酰-522)646)甘油
- [0911] 647)1-十六烷基-2-甲基甘油基-3PC
- [0912] 648)1-十六烷基-2-O-乙酰基-甘油
- [0913] 649)1-十六烷基-2-O-甲基-甘油
- [0914] 650)1-十八烷基-2-甲基甘油基-3PC
- [0915] 651)1-油酰-2-乙酰基-甘油
- [0916] 652)1-硬脂酰-2-亚油酰-甘油
- [0917] 653)1-硬脂酰-2-花生四烯酰-甘油
- [0918] 654)2,5-二叔丁基氢醌
- [0919] 655)24(S)-羟基胆固醇
- [0920] 656)24,25-二羟基维生素D3
- [0921] 657)25-羟基维生素D3
- [0922] 658)2-花生四烯酰甘油
- [0923] 659)2-氟棕榈酸
- [0924] 660)2-羟基肉豆蔻酸
- [0925] 661)2-甲氧基抗霉素A3
- [0926] 662)3,4-二氯异香豆素
- [0927] 663)粒酶B抑制剂

- [0928] 664)4-氨基吡啶
- [0929] 665)4-羟基苯基视黄酰胺
- [0930] 666)4-氧杂四月桂酸
- [0931] 667)5(S)-HETE
- [0932] 668)5(S)-HPETE
- [0933] 669)5,6-环氧二十碳三烯酸
- [0934] 670)5,8,11,14-二十碳四炔酸
- [0935] 671)5,8,11-二十碳三炔酸
- [0936] 672)5-羟基癸酸
- [0937] 673)5-碘杀结核菌素
- [0938] 674)5-酮二十碳四烯酸
- [0939] 675)5'-N-乙基酰胺腺苷(NECA)
- [0940] 676)6,7-ADTN HBr
- [0941] 677)6-甲酰吡啶并[3,2-B]呋唑
- [0942] 678)7,7-二甲基二十碳二烯酸
- [0943] 679)8,9-环氧二十碳三烯酸
- [0944] 680)8-甲氧甲基-IBMX
- [0945] 681)9(S)-HODE
- [0946] 682)9(S)-HPODE
- [0947] 683)9,10-十八碳烯酰胺
- [0948] 684)A-3
- [0949] 685)AA-861
- [0950] 686)乙酰基(N)-s-法尼基-1-半胱氨酸
- [0951] 687)乙酰基-法尼基-半胱氨酸
- [0952] 688)Ac-Leu-Leu-Nle-CHO
- [0953] 689)乌头碱
- [0954] 690)放线菌素D
- [0955] 691)肾上腺酸(22:4,n-6)
- [0956] 692)1mM
- [0957] 693)AG-1296
- [0958] 694)AG1478
- [0959] 695)AG213(酪氨酸磷酸化抑制剂47)
- [0960] 696)AG-370
- [0961] 697)AG-490
- [0962] 698)AG-879
- [0963] 699)AGC
- [0964] 700)AGGC
- [0965] 701)Ala-Ala-Phe-CMK
- [0966] 702)丙甲甘肽

- [0967] 703)阿司他丁
- [0968] 704)AM 92016
- [0969] 704)AM-251
- [0970] 706)AM-580
- [0971] 707)金刚烷胺(AMANTIDINE)
- [0972] 708)氨氯吡嗪脒
- [0973] 709)氨基-1,8-萘酰亚胺[4-氨基-1,8-522)萘酰亚胺]
- [0974] 710)氨基苯甲酰胺(3-ABA)[3-522)氨基苯甲酰胺(3-ABA)]
- [0975] 711)乙胺碘呋酮
- [0976] 712)花生四烯酸乙醇酰胺(18:2,n-6)
- [0977] 713)花生四烯酸乙醇酰胺(20:3,n-6)
- [0978] 714)花生四烯酸乙醇酰胺(20:4,n-6)
- [0979] 715)花生四烯酸乙醇酰胺(22:4,n-6)
- [0980] 716)茴香霉素
- [0981] 717)蛭蛭菌素
- [0982] 718)花生四烯酰胺
- [0983] 719)花生四烯酸(20:4,n-6)
- [0984] 720)花生四烯酰-PAF
- [0985] 721)马兜铃酸
- [0986] 722)Arvanil
- [0987] 723)子囊霉素(FK-520)
- [0988] 724)B581
- [0989] 725)BADGE
- [0990] 726)巴佛洛霉素(bafilomycin)A1
- [0991] 727)BAPTA-AM
- [0992] 728)BAY 11-7082
- [0993] 729)BAY K-8644
- [0994] 730)BENZAMIL
- [0995] 731)BEPRIDIL
- [0996] 732)苯丁抑制素
- [0997] 733) β -拉杷醌(lapachone)
- [0998] 734)桦木酸
- [0999] 735)苯扎贝特(bezafibrate)
- [1000] 736)Blebbistatin
- [1001] 737)BML-190
- [1002] 738)Boc-GVV-CHO
- [1003] 739)米醇菌酸
- [1004] 740)布雷菲德菌素A
- [1005] 741)溴-7-硝基吡啶[3-溴-7-硝基吡啶]

- [1006] 742)溴-cAMP[8-溴-cAMP]
- [1007] 743)溴-cGMP[8-溴-cGMP]
- [1008] 744)布美他尼(bumetanide)
- [1009] 745)BW-B 70C
- [1010] 746)C16神经酰胺
- [1011] 747)C2神经酰胺
- [1012] 748)C2二氢神经酰胺
- [1013] 749)C8神经酰胺
- [1014] 750)C8 CERAMINE
- [1015] 750)C8二氢神经酰胺
- [1016] 751)CA-074-Me
- [1017] 753)calpeptin
- [1018] 754)抑激酶素C
- [1019] 755)花萼海绵诱癌素A
- [1020] 756)喜树碱
- [1021] 757)斑蝥素
- [1022] 758)CAPE
- [1023] 759)辣椒碱(capsacin(E))
- [1024] 760)抗辣椒碱
- [1025] 761)卡巴环素(CARBACYCLIN)
- [1026] 762)栗碱
- [1027] 763)CDC
- [1028] 764)浅蓝菌素
- [1029] 765)CGP-37157
- [1030] 766)血根碱
- [1031] 767)环格列酮(CIGLITAZONE)
- [1032] 768)西马特罗(CIMATEROL)
- [1033] 769)CinnGEL 2Me
- [1034] 770)色拉唑啉(CIRAZOLINE)
- [1035] 771)CITCO
- [1036] 772)氯苯丁酯
- [1037] 773)氯压定
- [1038] 774)氯前列烯醇钠(CLOPROSTENOL Na)
- [1039] 775)氯氮平
- [1040] 776)C-PAF
- [1041] 777)姜黄色素
- [1042] 778)环[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val]
- [1043] 779)放线酮
- [1044] 780)蛋白质合成抑制剂

- [1045] 781)放线酮-N-乙酸乙酯
- [1046] 782)环巴胺(cyclopamine)
- [1047] 783)环匹阿尼酸(CYCLOPIAZONIC ACID)
- [1048] 784)环孢菌素A
- [1049] 785)氯氰菊酯(cypermethrin)
- [1050] 786)松胞菌素B
- [1051] 787)松胞菌素D
- [1052] 788)D12-前列腺素J2
- [1053] 789)D609
- [1054] 790)虎刺醛
- [1055] 791)硝苯呋海因
- [1056] 792)德夸菌素
- [1057] 793)癸基泛醌
- [1058] 794)脱氧甘露糖野尻霉素(deoxymannojirimycin)(1)
- [1059] 795)脱氧野尻霉素(deoxynorjirimycin)(1)
- [1060] 796)丙炔苯丙胺(Deprenyl)
- [1061] 797)二氮嗪(DIAZOXIDE)
- [1062] 798)二丁酰环AMP
- [1063] 799)二丁酰环GMP
- [1064] 800)二氯苯扎明(DICHLOROBENZAMIL)
- [1065] 801)二高- γ -亚麻酸
- [1066] 802)二氢鞘氨醇
- [1067] 803)二吡啶甲烷
- [1068] 804)硫氮酮
- [1069] 805)二亚苯基碘氯
- [1070] 806)双嘧达莫(dipyridamole)
- [1071] 807)DL-二氢鞘氨醇
- [1072] 808)DL-PDMP
- [1073] 809)DL-PPMP
- [1074] 810)二十二碳六烯酸(22:6n-3)
- [1075] 811)二十二碳五烯酸
- [1076] 812)二十二碳三烯酸(22:3n-3)
- [1077] 813)阿霉素
- [1078] 814)DRB
- [1079] 815)E-4031
- [1080] 816)E6小檗胺
- [1081] 817)E-64-d
- [1082] 818)苯并硒唑酮
- [1083] 819)EHNA HCl

- [1084] 820)二十碳-5,8-二烯酸(20:2n-12)
- [1085] 821)二十碳二烯酸(20:2n-6)
- [1086] 822)二十碳五烯酸(20:5n-3)
- [1087] 823)二十碳三烯酸(20:3n-3)
- [1088] 824)对映-PAF C16
- [1089] 825)地棘蛙素(epibatidine)(+/-)
- [1090] 826)表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷
- [1091] 827)法尼基硫代乙酸
- [1092] 828)FCCP
- [1093] 829)氟虫腈(FIPRONIL)
- [1094] 830)FK-506
- [1095] 831)氟卡尼(FLECAINIDE)
- [1096] 832)氟芬那酸(FLUFENAMIC ACID)
- [1097] 833)氟桂利嗪(FLUNARIZINE)
- [1098] 834)氟前列醇(FLUPROSTENOL)
- [1099] 835)氟司必林(FLUSPIRILINE)
- [1100] 836)FPL-64176
- [1101] 837)串珠镰孢菌素B1
- [1102] 838)氧化呋咱(Furoxan)
- [1103] 839) γ -亚麻酸(18:3n-6)
- [1104] 840)格尔德霉素
- [1105] 841)染料木黄酮
- [1106] 842)GF-109203X
- [1107] 843)姜醇
- [1108] 844)胶霉毒素
- [1109] 845)格列吡嗪(GLIPIZIDE)
- [1110] 846)格列本脲(GLYBURIDE)
- [1111] 847)GM6001
- [1112] 848)Go6976
- [1113] 849)木藜芦毒素III
- [1114] 850)GW-5074
- [1115] 851)GW-9662
- [1116] 852)H7]
- [1117] 853)H-89
- [1118] 854)H9
- [1119] 855)HA-1004
- [1120] 856)HA1077
- [1121] 857)HA14-1
- [1122] 858)HBDDE

- [1123] 859)土木香灵
- [1124] 860)4-异丙基环庚二烯酚酮
- [1125] 861)组胺
- [1126] 862)HNMPA-(AM)3
- [1127] 863)Hoechst 33342(可渗透细胞)(二苯酰亚胺)
- [1128] 864)石杉碱A[(-)-石杉碱A]
- [1129] 865)IAA-94
- [1130] 866)IB-MECA
- [1131] 867)IBMX
- [1132] 868)ICRF-193
- [1133] 869)斑鸠霉素
- [1134] 870)靛玉红
- [1135] 871)靛玉红-3'-单肟
- [1136] 872)吡啶美辛
- [1137] 873)胡桃醌
- [1138] 874)K252A
- [1139] 875)醉椒素(+/-)
- [1140] 876)KN-62
- [1141] 877)KT-5720
- [1142] 878)L-744,832
- [1143] 879)红海海绵素B
- [1144] 880)熏草菌素A
- [1145] 881)L-顺-硫氮酮
- [1146] 882)白细胞毒素A(9,10-EODE)
- [1147] 883)白细胞毒素B(12,13-EODE)
- [1148] 884)白三烯B4
- [1149] 885)白三烯C4
- [1150] 886)白三烯D4
- [1151] 887)白三烯E4
- [1152] 888)抑酶醛肽
- [1153] 889)LFM-A 13
- [1154] 890)利多卡因
- [1155] 891)亚油酰胺
- [1156] 892)亚油酸
- [1157] 893)亚麻酸(18:3n-3)
- [1158] 894)脂氧素A4
- [1159] 895)L-NAME
- [1160] 896)L-NASPA
- [1161] 897)氯苯哌酰胺(LOPERAMIDE)

- [1162] 898)LY-171883
- [1163] 899)LY-294002
- [1164] 900)LY-83583
- [1165] 901)石蒜碱
- [1166] 902)LYSO-PAF C1 6
- [1167] 903)Manoalide
- [1168] 904)手霉素A
- [1169] 905)D-红-MAPP,
- [1170] 906)L-红-MAPP,
- [1171] 907)肥大脱粒肽
- [1172] 908)MBCQ
- [1173] 909)MCI-186
- [1174] 910)MDL-28170
- [1175] 911)蜂蜜酸(20:3n-9)
- [1176] 912)蜂蜜乙醇酰胺(MEAD ETHANOLAMIDE)
- [1177] 913)氨甲喋呤
- [1178] 914)甲氧异搏定
- [1179] 915)抑甲羟酶素(洛伐他丁)
- [1180] 916)MG-132
- [1181] 917)米力农
- [1182] 918)米诺地尔(MINOXIDIL)
- [1183] 919)硫酸米诺地尔
- [1184] 920)米索前列醇(MISOPROSTOL),游离酸
- [1185] 921)丝裂霉素C
- [1186] 922)ML7
- [1187] 923)ML9
- [1188] 924)MnTBAP
- [1189] 925)单星素
- [1190] 926)莫能星
- [1191] 927)MY-5445
- [1192] 928)霉酚酸
- [1193] 929)N,N-二甲基鞘氨醇
- [1194] 930)N9-异丙基抑激酶素
- [1195] 931)N-乙酰基-白三烯E4
- [1196] 932)NapSul-Ile-Trp-CHO
- [1197] 933)N-花生四烯酰甘氨酸
- [1198] 934)硝吡胺甲酯
- [1199] 935)硝苯吡啶
- [1200] 936)氟甲烟酸

- [1201] 937) 尼日利亚菌素
- [1202] 938) 尼古地平(NIGULDIPINE)
- [1203] 939) 尼美舒利(Nimesulide)
- [1204] 940) 尼莫地平(NIMODIPINE)
- [1205] 941) 尼群地平(NITRENDIPINE)
- [1206] 942) N-亚油酰甘氨酸
- [1207] 943) 诺可唑
- [1208] 944) N-苯基邻氨基苯甲酸(CL)
- [1209] 945) NPPB
- [1210] 946) NS-1619
- [1211] 947) NS-398
- [1212] 948) NSC-95397
- [1213] 949) OBAA
- [1214] 950) 冈田酸
- [1215] 951) 寡霉素A
- [1216] 952) 抑激酶素
- [1217] 953) 乌本苷
- [1218] 954) PAF C16
- [1219] 955) PAF C18
- [1220] 956) PAF C18:1
- [1221] 957) 棕榈酰乙醇酰胺
- [1222] 958) 小白菊内酯(Parthenolide)
- [1223] 959) 蕈青霉素
- [1224] 960) PCA 4248
- [1225] 961) PCO-400
- [1226] 962) PD 98059
- [1227] 963) 青霉震颤素(PENITREM)A
- [1228] 964) 胃蛋白酶抑制剂
- [1229] 965) PHENAMIL
- [1230] 966) 菲二酮[6(5H)-菲二酮]
- [1231] 967) 苯氧苄胺
- [1232] 968) 酚妥拉明
- [1233] 969) 苯妥英
- [1234] 970) 二棕榈酰磷脂酸
- [1235] 971) 白皮杉醇(Piceatannol)
- [1236] 972) p53抑制素(pifithrin)
- [1237] 973) 哌迷清(PIMOZIDE)
- [1238] 974) 吡那地尔(PINACIDIL)
- [1239] 975) 吡罗昔康(piroxicam)

- [1240] 976)PP1
- [1241] 977)PP2
- [1242] 978)prazosin
- [1243] 979)孕烯醇酮16 α 腈
- [1244] 980)PRIMA-1
- [1245] 81)普鲁卡因胺
- [1246] 982)普罗帕酮(PROPAFENONE)
- [1247] 983)碘化丙啶
- [1248] 984)心得安(S-)
- [1249] 985)嘌呤霉素
- [1250] 986)栌精
- [1251] 987)奎尼定
- [1252] 988)奎宁
- [1253] 989)QX-314
- [1254] 990)纳巴霉素
- [1255] 991)白藜芦醇
- [1256] 992)视黄酸,全反
- [1257] 993)REV-5901
- [1258] 994)RG-14620
- [1259] 995)RHC-80267
- [1260] 996)RK-682
- [1261] 997)Ro 20-1724
- [1262] 998)Ro 31-8220
- [1263] 999)洛利普兰(Rolipram)
- [1264] 1000)roscovitine
- [1265] 1001)野桐霉素(Rottlerin)
- [1266] 1002)RWJ-60475-(AM)3
- [1267] 1003)兰诺定
- [1268] 1004)SB 202190
- [1269] 1005)SB 203580
- [1270] 1006)SB-415286
- [1271] 1007)SB-431542
- [1272] 1008)SDZ-201106
- [1273] 1009)S-法尼基-L-半胱氨酸ME
- [1274] 1010)紫草宁
- [1275] 1011)氰胍佐旦(siguazodan)
- [1276] 1012)SKF-96365
- [1277] 1013)SP-600125
- [1278] 1014)鞘氨醇

- [1279] 1015) Splitomycin
- [1280] 1016) SQ22536
- [1281] 1017) SQ-29548
- [1282] 1018) 星形孢菌素
- [1283] 1019) SU-4312
- [1284] 1020) 苏拉明
- [1285] 1021) 苦马豆素
- [1286] 1022) 三苯氧胺
- [1287] 1023) 丹参醌IIA
- [1288] 1024) 红豆杉醇(taxol)=紫杉醇(paclitaxel)
- [1289] 1025) 四氢大麻酚-7-酸
- [1290] 1026) 粉防己碱
- [1291] 1027) 沙立度胺(thalidomide)
- [1292] 1028) 毒胡萝卜素
- [1293] 1029) 硫代瓜氨酸[L-硫代瓜氨酸HCl]
- [1294] 1030) Thiorphan
- [1295] 1031) TMB-8
- [1296] 1032) 妥拉磺脲(TOLAZAMIDE)
- [1297] 1033) 甲苯磺丁脲
- [1298] 1034) 甲苯磺酰-Phe-CMK(TPCK)
- [1299] 1035) TPEN
- [1300] 1036) 曲喹辛(Trequinsin)
- [1301] 1037) 制滴菌素-A
- [1302] 1038) 三氟拉嗪
- [1303] 1039) TRIM
- [1304] 1040) 雷公藤内酯
- [1305] 1041) TTNPB
- [1306] 1042) 衣霉素
- [1307] 1043) 酪氨酸磷酸化抑制剂1
- [1308] 1044) 酪氨酸磷酸化抑制剂9
- [1309] 1045) 酪氨酸磷酸化抑制剂AG-126
- [1310] 1046) 酪氨酸磷酸化抑制剂AG-370
- [1311] 1047) 酪氨酸磷酸化抑制剂AG-825
- [1312] 1048) 酪氨酸磷酸化抑制剂-8
- [1313] 1049) U-0126
- [1314] 1050) U-37883A
- [1315] 1051) U-46619
- [1316] 1052) U-50488
- [1317] 1053) U73122

- [1318] 1054)U-74389G
- [1319] 1055)U-75302
- [1320] 1056)缬氨霉素
- [1321] 1057)丙戊酸
- [1322] 1058)异搏定
- [1323] 1059)藜芦定
- [1324] 1060)长春花碱
- [1325] 1061)长春西汀(vinpocetine)
- [1326] 1062)W7
- [1327] 1063)WIN 55,212-2
- [1328] 1064)Wiskostatin
- [1329] 1065)渥曼青霉素
- [1330] 1066)WY-14643
- [1331] 1067)Xestospongin C
- [1332] 1068)Y-27632
- [1333] 1069)YC-I
- [1334] 1070)育亨宾
- [1335] 1071)扎普司特(Zaprinast)
- [1336] 1072)扎达维林(Zardaverine)
- [1337] 1073)ZL3VS
- [1338] 1074)ZM226600
- [1339] 1075)ZM336372
- [1340] 1076)Z-脯氨酰-脯氨醛
- [1341] 1077)zVAD-FMK
- [1342] 1078)抗坏血酸
- [1343] 1079)5-氮胞苷
- [1344] 1080)5-氮脱氧胞嘧啶
- [1345] 1081)六亚甲基二乙酰胺(HMBA)
- [1346] 1082)丁酸钠
- [1347] 1083)二甲基亚砷
- [1348] 1084)Goosecoid
- [1349] 1085)糖原合酶激酶-3
- [1350] 1086)半乳凝集素-1
- [1351] 1087)半乳凝集素-3
- [1352] **【细胞黏着分子】**
- [1353] 1086)钙黏着蛋白1(E-钙黏着蛋白)
- [1354] 1087)钙黏着蛋白2(N-钙黏着蛋白)
- [1355] 1088)钙黏着蛋白3(P-钙黏着蛋白)
- [1356] 1089)钙黏着蛋白4(R-钙黏着蛋白)

- [1357] 1090)钙黏着蛋白5(VE-钙黏着蛋白)
- [1358] 1091)钙黏着蛋白6(K-钙黏着蛋白)
- [1359] 1092)钙黏着蛋白7
- [1360] 1093)钙黏着蛋白8
- [1361] 1094)钙黏着蛋白9
- [1362] 1095)钙黏着蛋白10
- [1363] 1096)钙黏着蛋白11(OB-钙黏着蛋白)
- [1364] 1097)钙黏着蛋白12(BR-钙黏着蛋白)
- [1365] 1098)钙黏着蛋白13(H-钙黏着蛋白)
- [1366] 1099)钙黏着蛋白14(与钙黏着蛋白18相同)
- [1367] 1100)钙黏着蛋白15(M-钙黏着蛋白)
- [1368] 1101)钙黏着蛋白16(KSP-钙黏着蛋白)
- [1369] 1102)LI钙黏着蛋白

[1370] 前述是可用于促进ES细胞或ED细胞沿特定发育谱系分化的示例性因子和条件。部分或终末分化的内胚层、中胚层或外胚层细胞类型可用于筛选测定中,以研究发育和干细胞生物学或产生治疗剂。部分或终末分化的细胞类型可任选地进行大致纯化、制成药物制品和/或冷冻保存。

[1371] **【ES细胞的多能性】**

[1372] 通过本发明任何方法产生的人类ES细胞或细胞系的多能性可通过检测人类ES细胞标志物蛋白的表达来确定。此类蛋白的实例包括但不限于八聚体结合蛋白4(Oct-4)、阶段特异性胚胎抗原(SSEA)-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81和碱性磷酸酶。在一些实施方案中,推定的ES细胞系在多于13、20、30、40、50、60、70、80、90或100个世代后保持多能性。还可测定ES细胞正常核型的维持。也可使用本领域已知的方法使通过本发明方法产生的ES细胞分化成外胚层、内胚层和中胚层谱系的细胞来确认多能性。多能性也可通过在体内移植ES细胞,例如到免疫缺陷的小鼠(比如SCID小鼠)并评估畸胎瘤形成来测试。

[1373] 在某些实施方案中,产自卵裂球的ES细胞或细胞系表达一种或多种ES细胞标志物蛋白。另外或替代地,在某些实施方案中,所述细胞保持正常的核型。另外或替代地、在某些实施方案中,所述细胞在多于13、20、30、40、50、60、70、80、90或100个世代后保持多能性。

[1374] 对于前述的任何一个,从卵裂球产生的ES细胞或细胞系可以产生而不破坏从中获得用于产生所述细胞或系的卵裂球的胚胎。所述细胞的此特性将这些细胞与目前可得的ES细胞和系区分开来,后者是使用必须破坏根本的胚胎的方法产生的。

[1375] **【TS细胞的产生】**

[1376] 本发明还提供在产生ES细胞系之前和不产生ES细胞系下从分离的卵裂球直接分化细胞类型的方法。在一个实例中,人类滋养层干(“TS”)细胞通过使卵裂球生长晕接触FGF-4产生,所述卵裂球生长晕在形态上类似于滋养层和/或胚胎外的内胚层,但不类似于ES细胞。例如,向生长晕的培养基中加入FGF-4。TS细胞可通过使用本领域标准程序测定蛋白比如cdx-2、fgfr2、PL-1和人类绒毛膜促性腺激素(hCG)的表达来检测。TS细胞鉴定还可通过不存在蛋白比如但不限于Oct-4和甲胎蛋白的表达证明。

[1377] **【纯化的制品和细胞系的产生】**

[1378] 在某些实施方案中,可以产生细胞系。例如,在培养物中鉴定了包含两个或多个卵裂球的团簇(卵裂球衍生的生长晕)的特定细胞类型之后,可将该细胞与所述培养物的剩余部分分开以进一步使用。分开后,期望的细胞即可作为纯化的或大致纯化的群体进行增殖,或者可将它保持为细胞系。

[1379] 在某些实施方案中,将从培养获自胚胎的卵裂球产生的ES细胞与卵裂球衍生的生长晕的培养物分开,并使用从胚泡阶段胚胎建立ES细胞系时开发的标准技术建立ES细胞系。在其他实施方案中,可基于例如形态学选择感兴趣的部分分化的ED细胞,并且可以将该细胞与所述培养物分开并纯化或不纯化而进一步进行分析。

[1380] 示例性细胞系包括稳定的细胞系。以此方法建立的ES细胞系可具有现有ES细胞系的特性,例如分化潜能、蛋白质表达、核型和类似特性。替代地,以此方法建立的ES细胞系可以一种或多种方式不同于现有ES细胞系。

[1381] **【ES和ED细胞的治疗用途】**

[1382] 本发明的ES或ED细胞适合于ES细胞有用的任何用途。本发明提供了应用细胞疗法治疗疾患的方法,所述方法包括向受影响的受治疗者施用治疗有效量的ES细胞。

[1383] 在一个实施方案中,本发明的方法用于在植入人类胚胎之前取出卵裂球,此后将按如上描述的培养所述卵裂球,以衍生和贮藏人类ES细胞用于使用细胞疗法的治疗用途,如果从人类胚胎得到的后代在将来需要,例如疾病治疗、组织修复、移植、细胞无活力的治疗或细胞功能异常的治疗。

[1384] 在本发明的另一实施方案中,衍生自卵裂球、前致密化桑椹胚、致密化桑椹胚或切片的胚泡的细胞直接在体外或体内分化,以产生分化中(differentiating)或分化的细胞,而不产生胚胎干细胞系。参见2005年12月1日公布的美国专利公布第20050265976号,和2001年4月26日公布的国际专利公布第W00129206号,其有关直接分化方法的公开内容通过引用并入本文。本发明的细胞可用于医学、兽医学和生物学研究以及通过提供细胞用于细胞疗法如异基因细胞治疗的疾病治疗中。

[1385] 在另一实施方案中,ES细胞或细胞系衍生自卵裂球,并且诱导所述ES细胞或细胞系分化以产生一种或多种中胚层、内胚层或外胚层细胞类型。示例性细胞类型包括但不限于,RPE细胞、造血干细胞、造血细胞类型(如RBC、血小板等)、胰腺 β 细胞、皮肤细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、上皮细胞、肝细胞、神经元、神经胶质、骨骼肌细胞、血管细胞和类似细胞。虽然ES细胞自身可用于疾病或疾患的治疗,但是本发明还考虑了可用于治疗的分化细胞类型的产生。

[1386] 本发明的方法可用于从卵裂球产生干细胞,其中所述干细胞是MHC抗原半合的或纯合的。这些细胞可用于在移植和细胞疗法过程中降低免疫原性。如此产生的干细胞可组装成具有降低的MHC基因复杂度的库。本发明的卵裂球可衍生自MHC抗原半合的或纯合的胚胎。这些胚胎可以选择为MHC抗原半合的或纯合的,或通过本领域已知的任何方法加工为MHC抗原半合的或纯合的。替代地,衍生自卵裂球的干细胞可通过如基因寻靶加工为MHC抗原半合的或纯合的。参见,如2003年3月6日公布的WO 03/018760和美国临时专利申请第60/729,173号,其公开内容整体并入本文。

[1387] 通过上文提及的新技术产生的ES细胞和人类胚胎衍生的细胞用于细胞生物学、药物发现相关的研究和细胞疗法中,包括但不限于,产生造血和成血管细胞以治疗血液疾患、

血管疾患、心脏疾病、癌症 和创伤愈合,产生胰腺 β 细胞以用于治疗糖尿病,产生视网膜细胞比如神经细胞和视网膜色素上皮细胞以用于治疗视网膜疾病比如色素性视网膜炎和黄斑变性,产生神经元以用于治疗帕金森病、阿尔茨海默氏病、慢性疼痛、中风、精神病学疾患和脊髓损伤,产生心肌细胞以用于治疗心脏疾病比如心力衰竭,产生皮肤细胞以用于治疗创伤(无瘢痕创伤修复)、烧伤、促进创伤修复和治疗皮肤衰老,产生肝细胞以治疗肝脏疾病比如肝硬化疾病,产生肾细胞以治疗肾脏疾病比如肾衰竭,产生软骨以治疗关节炎,产生肺细胞以治疗肺部疾病和产生骨细胞以用于治疗骨疾患比如骨质疏松症。

[1388] 此类细胞疗法方法可包括组合使用本发明的ES细胞和增殖因子、谱系定向因子或感兴趣的基因或蛋白。治疗方法可包括提供干细胞或适当的祖先细胞以直接用于移植,其中在体内再生组织,或在体外再造期望的组织,然后向受影响的受治疗者提供所述组织。

[1389] **【药物制品】**

[1390] 本发明提供产生ES细胞、ES细胞系、TS细胞和各种部分和终末分化细胞和细胞系的方法。可在体外和体内研究如此产生的细胞和细胞系。在某些实施方案中,对这些细胞的研究提供关于基础发育生物学和干细胞生物学的信息。在某些其他实施方案中,对这些细胞和/或可用于操纵这些细胞的增殖、分化和存活的因子的研究,可用于开发基于干细胞的疗法,以治疗或缓解各种疾病或疾患的任何一种。在其他实施方案中,通过这些方法产生的细胞和细胞系可用于筛选测定中,以鉴定可用于治疗的试剂和条件。鉴定的治疗剂可用于开发细胞疗法,或它们自身在递送于患者时可以有用的。

[1391] 在某些实施方案中,ES细胞、ES细胞系、TS细胞、TS细胞系或部分或终末分化的细胞可通过将所述细胞与药学可接受载体或赋形剂组合而配制成药物制品。在某些实施方案中,所述药物制品含有每单位体积载体一定数目的细胞,以使可以施用细胞疗法来递送特定剂量的细胞。例如,药物制品可配制为允许在适于所治疗的病症和施用 路径的载体体积内递送,例如 1×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 或大于 1×10^7 个细胞。

[1392] **【进行研究的方法】**

[1393] 如上详述的,胚胎干细胞研究已受到政治和伦理反对破坏胚胎的部分阻碍。本发明不仅提供了有效产生细胞和细胞系(包括ES细胞和细胞系)的替代方法,而且本发明还提供了不需要将摧毁新胚胎作为ES细胞衍生过程的一部分的方法。剩余胚胎可冷冻保存和永久保存或保存以供其它的、将来的研究用途。

[1394] 对于一些,衍生ES细胞和细胞系(或从ES细胞分化的、或直接从胚胎分化的部分或终末分化的细胞类型)而无需摧毁新胚胎的能力将在这些方法中反映出的显著技术优势之外,提供重要的益处。这样,本发明提供进行胚胎干细胞研究而无需摧毁人类胚胎的新方法。所述方法可以获得衍生自人类胚胎的人类ES细胞或ES细胞系,但是无需摧毁所述人类胚胎。所述ES细胞或细胞系可使用本文公开的任何方法从获自人类胚胎的卵裂球产生。衍生ES细胞或细胞系之后,所述方法进一步可以使用人类ES细胞或ES细胞系进行胚胎干细胞研究。所述方法提供了进行ES细胞研究而无需摧毁新的胚胎的途径。

[1395] 在某些实施方案中,胚胎干细胞研究包括检查ES细胞或细胞系的分化潜能的研究。例如,研究可包括使人类ES细胞或ES细胞系接触一种或多种因子,并鉴定促进所述ES细胞或ES细胞系分化成一种或多种中胚层、内胚层或外胚层细胞类型的因子。在其他实施方案中,胚胎干细胞研究包括ES细胞或从其分化的细胞可能的治疗用途的研究。

[1396] 无论具体的研究用途如何,此方法可扩展与世界各地的研究者、特别是在有法律管制胚胎破坏的国家工作的研究者合作的机会。

[1397] 除非另外定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。如果有冲突,则以本说明书包括定义为准。

[1398] 此外,除非上下文另外要求,单数术语将包括复数,复数术语将包括单数。

[1399] 总体来说,本文描述的与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、发育生物学、细胞生物学有关的所用命名和技术是本领域熟知并且通常使用的那些。

[1400] 示例性方法和材料在下面描述,虽然与本文描述的方法和材料相似或等同的那些也可用于实施或测试本发明。

[1401] 本文提及的所有出版物、专利、专利公布和其他参考文献通过引用整体并入。

[1402] 在整个说明书和权利要求书中,词语“包括(comprise)”或变体比如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”将被理解为意指包括一个指定的整数或整数组,但是不排除任何其他整数或整数组。

[1403] 以下的实施例意在是说明性的,而非以任何方式进行限制。

[1404] 【示例说明】

[1405] 【实施例1.延迟核注射和去核之间的时间对前核(PN)阶段合子的影响】

[1406] 对64个PN阶段胚胎执行核注射。将GFP阳性小鼠ES细胞核移植到PN阶段合子。然后在原始前核进行去核之前,将胚胎培养3、6、9或12小时。接下来培养克隆的胚胎并观察它们的发育。所有时间点的高百分比的胚胎达到2细胞阶段,但是仅有在核移植3小时后去核的胚胎达到4细胞阶段(参见表2)。

[1407] 【表2.延迟核注射和去核之间的时间对PN阶段小鼠合子的影响】

[1408]

注射后时间(小时)	合子总数	2C	4C	<8C
3	19	11	2	0
6	19	11	0	0
9	14	9	0	0
12	9	6	0	0

[1409] 【实施例2.使用PN阶段合子和2-细胞阶段胚胎的连续克隆】

[1410] 为了达到克隆胚胎的进一步发育,执行了连续克隆。核注射的执行如实施例1所述。然后在原始前核进行去核之前,将胚胎培养3小时。接下来将克隆的胚胎培养至2-细胞阶段。

[1411] 在第一次克隆18小时后,将解离的各个克隆胚胎细胞移植入正常的受精2-细胞阶段小鼠胚胎。在核移植之前对接受者胚胎进行去核。将各个克隆的卵裂球细胞移植入去核2-细胞阶段胚胎的卵周隙(perivitellin space)。移植的卵裂球和所述去核胚胎的电融合通过给予15微秒的150V DC的单次脉冲执行。

[1412] 连续克隆胚胎在KSOM培养基中培养并监控进一步的发育。六个胚胎中的两个发育成胚泡(图1-B)。作为对照,用小鼠ES细胞核(GFP阳性)注射PN阶段合子,然后在3小时后对它们的核进行去核,并于5%CO₂下培养。这些胚胎中没有胚胎继续发育成胚泡。

[1413] 【表3.连续克隆对克隆胚胎发育的影响】

[1414]

处理	合子总数	2C	4C	8C-M	胚泡
连续克隆	6	5	4	2	2
对照	6	4	0	0	0

[1415] 【实施例3.使用2细胞阶段小鼠胚胎的体细胞克隆】

[1416] 曾假设镶嵌胚胎中的克隆的卵裂球可被非克隆细胞刺激以进一步发育。2-细胞阶段小鼠胚胎的两个卵裂球中的一个被去核,并在去核后立即向所述去核卵裂球注射ES细胞核。胚胎在KSOM中培养而不进行任何进一步操作。

[1417] 克隆的卵裂球在第二天分裂,并促进GFP阳性细胞形成镶嵌胚胎(图2A-C)。当这些胚胎发育至8-细胞阶段时,从所述克隆的卵裂球得到了至少3个卵裂球(图2B)。这些克隆胚胎中的四个发育成胚泡(参见表4)。GFP阳性卵裂球并入部分胚泡中。

[1418] 【表4.2-细胞阶段克隆胚胎中与克隆的卵裂球位于相同透明带内部的辅助细胞的影响】

2 细胞总数	幸存的注射数	4C	8C-M	胚泡
14	8	4	4	

[1419]

[1420] 【实施例4.实施例1-3的材料和方法】

[1421] 所有实验使用小鼠品系CD-1进行。使用的操作介质是CZB。使用的培养基是KSOM。所有核供体细胞是GFP阳性小鼠ES细胞(CD-1X Sv129F1)。核注射使用PIEZO钻进行。卵裂球使用玻璃吸液管解离。去核使用微量加液器显微手术执行,以取出PN阶段胚胎中的极体和相邻细胞质或2-细胞阶段胚胎的可见核。

[1422] 【实施例5.克隆胚泡的发育】

[1423] 发育率显著受克隆方法的影响。表5和6记录了使用体内2-细胞阶段胚胎时,衍生自单个克隆与连续核移植的F2GFP NT胚胎的植入前发育。最显著的发育差异发现于2-细胞向4-细胞转变时:单个克隆与连续克隆分别为59%与97%发育。在近交品系中也观察到磨损(attrition)。此外,几乎所有F2GFP分裂的连续克隆胚胎在初始克隆后的4天内发育至扩大的或孵化的胚泡阶段。此发育率与KSOM中培养的体内受精的B6D2F1胚胎(95%)相同。衍生自近交品系DBA2和C57BL/6的克隆显示与F2GFP相比较差的有效发育;但是胚泡率与单个NT组相比显著增加($P<0.001$)。

[1424] 【表5.F2GFP连续克隆胚胎的发育】

组	总数	胚胎发育					
		1个细胞	(占1个细胞的百分比)				
			分裂的	4C	8C	M	EB
体内受精的*	186	98.8	98.6	95.5	95.5	95.5	95.5
单个克隆	181	91.7	59.1	49.2	43.7	36.5	33.2
连续克隆	133	98.5	97.7	97.7	97.7	95.5	95.5

[1426] 同一列中不同的上标代表显著差异($P < 0.01$)。

[1427] *体内受精的B6D2F1胚胎。

[1428] 【表6.连续克隆后近交小鼠克隆胚胎的发育】

组	总数	胚胎发育					
		1个细胞 (占1个细胞的百分比)					
		分裂的	4C	8C	M	EB	B/HB
体内受精的*	130	98.6	98.5	98.5	98.5	96.2	96.2
DBA2 单个**	89	92.2	45.5	35.5	32.3	12.5	9.8
DBA2 连续	90	94.4	88.2	86.4	84.7	76.5	73.1
B6 单个***	102	93.2	37.6	29.3	27.6	11.4	7.8
B6 连续	98	94.3	87.3	85.2	85.4	72.3	69.5

[1430] 同一列中不同的上标代表显著差异($P < 0.01$)。

[1431] *体内受精的B6D2F1胚胎。

[1432] **DBA2近交品系。***C57BL/7近交品系。

[1433] 【实施例6.成活幼畜发育】

[1434] 为了评估终末发育的能力,将使用F2GFP卵丘细胞核通过连续核移植构建的总计35个2-细胞阶段胚胎移植到4个假怀孕的雌性(0.5d.p.c)。在妊娠19.5天时通过剖宫产回收了总计6只成活幼畜。所有6只幼畜成功地得到了替代母亲的抚养并正常长大和成熟(图3)。相反,来自使用相同的F2GFP卵丘细胞核的单个移植技术的克隆产生仅在98个移植胚胎中得到了1只幼畜(表7)。

[1435] 为了研究相同的技术是否可用于产生小鼠的近交品系,我们使用了DBA2和C57BL/6近交小鼠。在妊娠19.5天时通过剖宫产从DBA2连续克隆回收了2只幼畜(1.6%),但是无论使用的克隆方法如何,未在C57BL/6克隆中发现成活幼畜。在所述2只DBA2幼畜中,1只幼畜在回收后几分钟内死于呼吸缺陷。剩余的幼畜未显示任何呼吸困难迹象,但是在引导至养母(foster mother)后几小时被抛弃并被部分吃掉(表7)。

[1436] 为了确认克隆的小鼠衍生自F1GFP和DBA2小鼠的卵丘细胞,我们证实了先前描述的两个小鼠微卫星标志物D1MIT46的存在,并通过线粒体DNA(19)的限制片段长度多态性(RFLP)分析了Nd3C9461T多态性(图4&5)。这些研究证实克隆的小鼠与制备卵丘细胞的供体小鼠在遗传上相同。克隆小鼠的线粒体RFLP与细胞质供体B6D2F1品系的相同(图4&5),为细

胞质的来源(接受者)提供了直接证据。F2GFP克隆在紫外线下发射绿色紫光,为克隆的遗传来源提供了进一步的证据(图3)。

[1437] 【表7.克隆胚胎移植的结果】

	小鼠品系					
	GFP CD-1/129		DBA2		C57BL/6	
	单个	连续	单个	连续	单个	连续
[1438] 移植的总数	98	35	102	120	107	115
植入数	35	18	9	28	7	17
成活幼畜数	1	6	0	2	0	0
成活幼畜百分比	1	17	0	4	0	0

[1439] 未观察到克隆动物的出生后生长和行为发育的总异常。令人感兴趣的是,使用核回植克隆的动物未表达成年克隆小鼠中记录的肥胖表型。成年克隆小鼠的肥胖归因于NT和胚胎培养过程中的基因表达异常和表观遗传修饰,并反映了除开始于8-10周龄的较大的体型之外的脂肪组织的增加。使用核回植克隆的小鼠的平均重量($\pm$ SD)是6个月时 34.9 ± 0.8 克,这与正常的对照动物(33.6 ± 1.9)无差异($P > 0.1$)。相比之下,使用传统的SCNT克隆的动物在三至六月龄时重 54.8 ± 2.6 克(表8)。

[1440] 【表8.使用传统的SCNT与核回植克隆的小鼠的体重】

小鼠	动物数量	3-6个月的重量(克)	
		平均值	$\pm$ SD
[1441] BDF1 传统的 SCNT	5	54.8 ^a	2.6
BDF1 回植	2**	26.3 ^b	2.9
BDF1 正常对照	7	24.9 ^b	0.3

[1442] *具有不同上标的平均值存在差异($P < 0.01$)。

[1443] **1个克隆是3个月大,另一个是6个月大。单个克隆的小鼠和正常小鼠为至少6个月大。

[1444] 【实施例7.克隆的胚泡阶段胚胎的基因表达谱】

[1445] 许多研究强烈表明重构建的胚胎中不完善的表观遗传重编程,这可以说明移植后它们在体外培养和体内发育中的不好表现。因为我们的连续克隆造成克隆胚胎发育至孵化的胚泡阶段的异常增加,所以我们假设数个基因的基因表达模式可与正常的体内受精胚胎的相同。为了检查我们的假设,我们分析了两个印迹基因H19和IGF2和一个多能性相关基因OCT-4在4-细胞、8-细胞和胚泡阶段的表达。如图6至8所呈现的,与单个克隆胚胎相比,连续克隆胚胎中所有三个基因的表达更类似于体内B6D2F1对照胚胎。特别地,连续克隆胚泡中的H19基因表达显著不同于单个克隆的对等物,并且更接近于B6D2F1对照(图6)。与单个克隆胚胎相比,连续克隆的8细胞阶段胚胎显著上调了IGF2表达,更接近于B6D2F1对照中的水平(图7)。在研究的所有发育阶段中也发现了OCT-4表达的相似趋势(图8)。

[1446] 【实施例8. 胚泡阶段胚胎的细胞数计数】

[1447] 胚泡阶段克隆中的异常基因表达模式与低于细胞正常数量的一半符合,并且更高的细胞数与OCT-4的提高了的克隆效率和正确表达有关。核回植显著增加了克隆胚泡的总细胞数以及内细胞团(ICM)细胞数二者(表9)。传统的SCNT($n=14$ 个胚胎)产生了 32.3 ± 4.6 个细胞(8.3 ± 5.9 个ICM细胞)/胚泡,对比正常体内受精胚胎($n=15$, $P<0.001$)的 67.4 ± 6.5 个细胞(28.7 ± 4.8 个ICM细胞)。通过核回植($n=15$)产生的胚泡含有总计 49.8 ± 6.9 个细胞和 16.2 ± 7.1 个ICM细胞,分别代表大约1.5倍和2倍的提高。平均ICM/滋养外胚层(TE)细胞比值也从0.33增加至0.48(45%)($P<0.01$)(表9)。更高的ICM/TE比值和细胞数可至少部分说明移植到替代母亲后的植入后发育和成活出生的显著改进。

[1448] 【表9. 通过单个或连续核移植后胚泡的内细胞团(ICM)和滋养外胚层(TE)细胞的差异染色进行的胚泡质量分析】

胚泡数		总细胞数 (平均值 $\pm$ SD)		ICM (平均值 $\pm$ SD)		TE (平均值 $\pm$ SD)		ICM/TE比值 (平均值 $\pm$ SD)
[1449]	单个	14	32.3 4.6	8.3 5.9	24.3 9.7	0.33		
	连续	15	49.8 6.9	16.2 7.1	33.5 8.6	0.48		
	BDF1	15	67.4 6.5	28.7 4.8	39.6 5.7	0.71		

[1450] 【实施例9. 衍生自克隆胚胎的胚胎干细胞和它们的表征】

[1451] 总计35个单个克隆的F2GFP胚泡和30个连续克隆的胚泡经受ES细胞分离。在这些中,建立了1个来自单个克隆胚胎的ES细胞系(3%)和5个来自连续克隆胚胎的ES细胞系(17%)(表10)。所有建立的细胞系为碱性磷酸酶、OCT-4和SSEA1阳性(图9A)。此外,所有这些核移植ES细胞系在体外形成胚状体,并在肌内注射至后肢时形成畸胎瘤(图9B)。两个样品显示起源于所有三个胚层的分化组织。此外,当这些ntES细胞被注射入8-细胞阶段CD-1胚胎并移植到替代雌性时(2.5d.p.c),产生了几只具有确定的点状灰色皮毛和用紫外线照射时发射绿色紫光(指示F2GFP基因型)的嵌合小鼠(图9C)。

[1452] 【表10. 从克隆胚胎衍生胚胎干细胞的效率】

[1453]

	铺板的胚泡数	初始生长晕数	建立的 ES 细胞系数(%)
单个	35	35	1(3%)
连续	30	27	5(17%)
SV129	24	22	7(29%)

[1454] 【实施例10.实施例5-9的材料和方法】

[1455] 【动物】

[1456] 雌性DBA2、C57BL/6和F2GFP杂交小鼠用作核供体。为了产生F2GFP小鼠,雌性129/SV小鼠与携带并表达绿色荧光蛋白(GFP)基因的129/CD F1雄性(129/Sv x CD-1)杂交。对于初始和连续克隆,去核的BDF1(C57BL/6x DBA/2)卵母细胞和去核的2细胞阶段BDF1胚胎分别用作接受者。CD-1雌性用作替代母亲以孕育克隆的胚胎。

[1457] 【培养基】

[1458] 卵母细胞和胚胎在含有氨基酸、葡萄糖和1mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的KSOM(Specialty Media,USA)中于37℃下在高湿度孵化器(incubator)、含5%CO₂的空气中培养。卵母细胞去核在M2培养基(Specialty Media,USA)中执行,并且对于初始克隆,细胞注射在Hepes缓冲的CZB培养基中于室温下执行。重建的卵母细胞的活化在含有 10mM SrCl₂和5ug/ml松胞菌素B的无Ca²⁺CZB中进行,以防止排出极体。核回植在37℃下在补充有7.5ug/ml松胞菌素B和0.4ug/ml诺可唑(一种微管聚合酶抑制剂)以便于显微操作的M2培养基(Specialty Media,USA)中执行。重建的胚胎在基于甘露醇的融合培养基中经受脉冲作用,所述融合培养基包括0.27mM甘露醇、100μm MgSO₄和50μm CaCl₂,并补充有0.3%牛血清白蛋白。

[1459] 【卵丘细胞、卵母细胞和2-细胞阶段胚胎的分离】

[1460] 超数排卵使用8-10周龄的成熟BDF1、DBA2、C57BL/6和F2GFP雌性小鼠执行。向小鼠注射马绒毛膜促性腺激素(eCG)(5IU)和人类绒毛膜促性腺激素(hCG)(5IU),间隔48小时。hCG注射后13小时,从输卵管收集卵丘-卵母细胞复合体,并且通过用于M2中的0.1%(w/v)牛睾丸透明质酸酶(150USP单位/ml)在37℃处理5分钟来分散卵丘细胞。分散的卵丘细胞在新鲜的M2中洗涤并重悬于3%聚乙烯吡咯烷酮(PVP;Mr 360,000,ICN Biochemicals,USA),保存在冰箱(4℃)中待用。hCG注射后36小时,通过用连接至27G钝针的1ml注射器洗涤输卵管,从塞住的雌性(在M2培养基中)收集2-细胞阶段胚胎。

[1461] 【克隆和连续克隆】

[1462] 核移植按照Chung等人(29)报告的方法执行。去核使用配备有Narshige注射器(Narshige,日本)的Nikon倒置显微镜(TE300,日本)执行。使用10-12um吸液管,通过使用Piezo显微操作控制器PMM150(PrimeTech,日本)吸气,在含有5ug/ml松胞菌素B的M2培养基滴中取出B2DF1卵母细胞的中期II纺锤体。去核卵母细胞在CZB培养基中充分洗涤,并保存在孵化器中待用。使用小口径注射器吸液管(内径7um)在3%PVP中除去细胞质之后,单独地注射卵丘细胞的核。执行细胞质去除是为了使仅有少量细胞质保留在裸露的核周围。重建的卵母细胞的活化在含有10mM SrCl₂和5μg/ml松胞菌素B的 无Ca²⁺CZB中在高湿的5.5%CO₂孵化器中执行6小时。活化后,在KSOM培养基中培养重建的卵母细胞。

[1463] 连续克隆的程序描绘于图4。对于第二次克隆,取出2细胞阶段克隆胚胎的一个核(带有微量细胞质),并将其移植到去核2-细胞阶段体内受精B6D2F1胚胎(于补充有7.5ug/ml松胞菌素B和0.4ug/ml诺可唑的M2培养基中)中。将所述核置于两个2-细胞阶段胞质体之间。2-细胞阶段胞质体和克隆核的融合使用BTX 2001电融合仪,以2次2.4kV/cm、15usec的DC脉冲,在上述基于甘露醇的融合培养基中执行。第1次脉冲在对齐重构建的卵之后给予,对齐是为了使移植的核朝向负极导线,而两个卵裂球朝向正极导线。第一次脉冲之后,通过5伏AC对齐脉冲将重构建的卵旋转90度,以使两个卵裂球朝向相反的极,并施用次脉冲。在充分洗涤之后将经过脉冲的重构建的胚胎在KSOM中培养,并在第二次脉冲之后30分钟确认它们的融合。我们通常在第一次脉冲之后观察到超过98%的融合。只有融合的胚胎另外培养三天。

[1464] 【克隆的后代的产生】

[1465] 当一些克隆的胚胎发育至2-细胞阶段时,将它们移植到假怀孕的CD-1养母(交配后0.5天)的输卵管,所述养母已在一天前与切除输精管的CD-1雄性交配。接受者雌性在交配后19.5天(d.p.c)被施以安乐死,并检查它们的子宫中胎儿的存在和植入位点。成活的幼畜由在同一天分娩的养母(CD-1)养育。

[1466] 【胚泡中的细胞计数】

[1467] 在用如先前所述的核苷酸特异性荧光染料差异染色之后,计数胚泡的总细胞数以及TE和ICM细胞数。简要而言,使在初始克隆后4.5天已发育至扩大的胚泡的胚胎暴露于酸性Tyrode's溶液(pH 2.1)以除去透明带。裸露的胚泡在M2培养基中洗涤,然后用于M2中的三硝基苯磺酸(TNBS;Sigma P-2297)在4℃下标记10分钟。除去过量的TNBS后,使胚泡在37℃下暴露于溶于M2中的抗二硝基酚抗体10分钟。然后,在37℃下暴露于在M2中用2ug/ml碘化丙啶(PI)1:4稀释的豚鼠补体10分钟之前,通过充分洗涤除去过量的抗体。然后将胚泡在补充有5ug/ml碘化丙啶的无蛋白质Hepes CZB培养基中快速洗涤,然后在冰冷的无水乙醇中固定5分钟。然后在4℃下将胚泡移至于乙醇的10ug/ml Hoechst 33258至少10分钟。将染色的胚泡在100%甘油中固定,并通过荧光显微术(Nikon TE200,日本)评估。蓝色的核计作内细胞团(ICM),而红色的核视作滋养层(TE)细胞。

[1468] 【ntES细胞系的建立】

[1469] 当F2GFP克隆胚胎已发育至胚泡阶段时,将它们用于建立ntES细胞系,如先前所述并有较小的修改。简要而言,在铺板之前通过短暂暴露于酸性Tyrode's溶液和强力的洗涤除去透明带。将一组3或4个裸露的胚泡置于在4-孔盘(Nunc lon, USA)的一个孔中生长的丝裂霉素-C处理的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)单层,所述孔具有补充了2000单位/ml白血病抑制因子(Chemicon, USA)和50μM MEK-1抑制剂(Cell Signaling Tech, USA)的500ul小鼠ES细胞培养基。当内细胞团形成初始生长晕时(通常在3天内),通过用0.05%胰蛋白酶/EDTA处理此细胞团块并用小口径吸液管吸液将它们分割成小片。将起源于同一胚胎的分割的细胞团块和分散的细胞转移至新鲜MEF,所述MEF在覆盖了组织培养矿物油的50ul小鼠ES细胞培养基滴中生长。每日观察培养基滴中ES细胞生长晕的存在。然后将生长晕传递至含有新鲜MEF的4-孔盘的孔中。

[1470] 【DNA分离】

[1471] 按照生产商的建议使用DNeasy组织试剂盒从以下动物的尾尖分离DNA(QIAGEN,

USA):养母品系CD-1、卵母细胞供体品系B6D2F1、核供体品系(F2GFP和DBA2)和体细胞核移植衍生的动物(F2GFP的克隆1-6和DBA2的克隆1)。使用Nanodrop分光光度计(NanoDrop, USA)定量DNA。

[1472] 【线粒体DNA RFLP分析】

[1473] Nd3C9461T多态性通过如先前所述的限制片段长度多态性(RFLP)分析(19)确认。简要而言,通过PCR扩增含有9461位点的204bp片段。引物产生的突变与C9461野生型形式一起产生BclI的识别位点。结果,T9461多态性的存在破坏了所述识别位点。通过在4%琼脂糖凝胶中电泳分析片段。

[1474] 【核GFP DNA PCR分析】

[1475] 如上所述地从尾尖分离F2GFP克隆的基因组DNA,并且每个反应100ng用于通过PCR扩增GFP基因。我们使用GFP基因的正向引物(5'-ttgaattcgccaccatggtgagc-3')和反向引物(5'-ttgaattcttacttgtacagctcgtcc-3'),反应参数为95℃9分钟(1个循环),和94℃45秒、59℃1分钟、72℃1.5分钟,37个循环。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶中分离,并通过溴化乙锭染色显现。

[1476] 【DNA分型】

[1477] 通过使用MapPairs测定B219正向和反向未标记引物(Invitrogen,USA),使用D1Mit46简单序列重复(SSR)多态性对来自尾尖DNA的核DNA进行基因分型。反应参数包括20ng模板、1X FailSafe预混物(Premix)K(EpiCentre,USA)、0.2μM各种引物、0.5单位的FailSafe PCR酶混合物(EpiCentre,USA),和96℃2分钟(1个循环),94℃45秒、55℃45秒、72℃1分钟(30个循环),和72℃7分钟的循环条件。PCR产物在4%琼脂糖凝胶上分离,并通过溴化乙锭染色显现。PCR执行30个循环,产物通过3%琼脂糖凝胶分离,并通过溴化乙锭染色显现。

[1478] 【印迹基因表达分析】

[1479] 使用TRIzol提取柱和PureLink纯化柱(Invitrogen,USA),从20至30个4-细胞、8-细胞和孵化的胚泡阶段胚胎中分离总RNA。总RNA使用供应商推荐的cDNA库试剂盒(archive kit)(Applied Biosystems,USA)反转录,并用作定量实时PCR的模板,所述模板使用TaqMan化学,预定的H19、IGF2、OCT-4和内源看家基因GAPDH的基因表达测定,和供应商推荐的ABI SDS 7900HT仪器(Applied Biosystems,USA)。基因表达的相对定量使用先前描述的比较阈值循环法(comparative threshold cycle method)执行,并使用生产商(Applied Biosystems,USA)推荐的RQ Manager和Excel。

[1480] 【统计分析】

[1481] 结果使用根据持续性校正的卡方检验评估。

[1482] 【实施例11.不破坏胚胎下产生的人类胚胎干细胞系】

[1483] 使用用于临床目的IVF产生的残留胚胎执行一系列九个实验。胚胎是在完全知情同意下获得的,其使用遵守先进细胞技术道德咨询委员会(EAB)和机构审查委员会(IRB)。前核阶段胚胎融化,并在Quinn's分裂培养基中于6%CO2下培养至8-细胞阶段。胚胎使用标准系统进行评分,并且总计41个I或II级胚胎用于两组实验中(表11)。和PGD中一样,使用先前描述的(Klimanskaya等人Nature 2006;444(7118):481-485)活体解剖程序从每个胚胎中取出仅一个(或在少数[7/41]案例中,两个)卵裂球。在第一组实验中,母体胚胎和卵裂球

二者在原始微滴中一起培养12小时,然后转移至Quinn's胚泡培养基培养另外48小时。26个活体解剖胚胎中的22个(85%)继续发育至胚泡阶段,并且大多数(21/31)单个卵裂球分裂,形成细胞团块或包含4-8个细胞的“卵球”。将它们转移至补充有层粘连蛋白和纤连蛋白并接种了有丝分裂灭活的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的胚泡培养基微滴。第二天,将所述微滴与如前述的含有表达绿色荧光蛋白(GFP)的hES细胞的微滴合并。大多数单个卵裂球衍生的细胞聚集物形成空化的卵球,如果它们在铺板28小时内没有自发连接,则通过用26G针拨弄它们,强制使它们连接。

[1484] 在第二组实验中,母体胚胎和卵裂球在活体解剖程序后一起共培养低于12小时。将母体胚胎移至Quinn's胚泡培养基,其中允许它们继续发育至胚泡阶段。将活体解剖的卵裂球(无论细胞分裂与否)转移至如上所述的卵裂球微滴,并培养大约5天而不与含有其他GFP ES细胞的滴合并。重要地,在这些条件下不形成“卵球”,但是几乎所有的(9/11)卵裂球衍生的细胞聚集物产生生长晕(表11)。

[1485] 在两组实验中,母体胚胎均被允许发育至胚泡阶段并冷冻。80-85%的活体解剖胚胎形成健康的胚泡(表11和图11C),这一比值与先前报道的活体解剖和非活体解剖胚胎两种情况(Geber和Sampaio.Hum Reprod 1999;14(3):782-786;Palmer等人Hum Reprod 2002;17(1):25-31)的比值一致或更高。

[1486] 33个中的29个(88%)卵裂球衍生的聚集物产生细胞生长晕,4/20(20%)和4/9(44%)的来自第一组和第二组的生长晕在形态上类似于hES细胞(表11和图11a)。在第一组实验中,26个胚胎中仅有1个(3.8%)产生稳定的hES细胞系,这与先前报道的低效率(Klimanskaya等人Nature 2006;444(7118):481-485)一致。但是,在第二组实验中,当将活体解剖的卵裂球置于利于hES细胞生长的条件时,15个胚胎中的3个(20%)产生稳定的hES细胞系,此衍生率与使用胚泡获得的衍生率相当。

[1487] 当卵裂球衍生的(hES细胞样)集落达到大约50个细胞或更多时,将它们机械分散,并将分散的细胞铺板于初始生长晕旁边。同样允许二级集落生长至相似大小,并每3-5天将它们机械传代至新鲜MEF,直至它们适合用胰蛋白酶的常规传代,并可被冷冻(通常在7-10次传代之后),如先前所述(Klimanskaya和McMahon.Handbook of Stem Cells(干细胞手册).San Diego:Elsevier Academic Press;2004p.437-449)。在每次传代时,在荧光显微镜下筛选不存在GFP-阳性细胞的集落。所有4个hES细胞系是Oct-4、nanog、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81和碱性磷酸酶阳性的(图11b)。体外分化确认了来自所有三个胚层的衍生物,即造血和上皮细胞、神经元、视网膜色素上皮(RPE)、搏动的心肌细胞和治疗重要的其它细胞类型的存在(图12)。为了评估体内分化潜能,将细胞注射到NOD-SCID小鼠的肾小囊下面,它们将在大约6至8周后在那里形成畸胎瘤,分化成所有三个胚层的结构。

[1488] 所有4个新建立的hES细胞系拥有正常的核型(没有胚胎破坏[NED]1,46 XY;NED2,46 XY;NED3,46 XX;和NED4 46 XY(图14)。PCR分析确认不存在GFP DNA,这消除了与共培养使用的GFP+hES细胞交叉污染或融合的可能性(图13a)。进一步基因分型分析显示所述新hES细胞系独特的身份,排除了与我们实验室中目前保持的其他hES细胞系交叉污染的任何可能(图13b)。在第一系列实验中,所述胚胎中的21个活体解剖了1个卵裂球,而5个(来自实验编号1&3)取出了两个单个卵裂球。在第二系列实验中,所述胚胎中的13个活体解剖了1个卵裂球,而2个胚胎(来自实验8&9)取出了两个单个卵裂球。

[1489] 【表11.不破坏胚胎下从单个卵裂球的hES细胞衍生】

实验编号	活体解剖的胚胎数	发育成胚胎的数	分裂的卵裂球数	生长率数	hES细胞生长率数	建立的hES细胞系数
原始方法						
1	6	5	5/9	5	1	0
2	6	6	6/6	5	1	1*
3	4	4	4/6	4	0	0
4	4	3	3/4	3	0	0
5	6	4	3/6	3	2	0
总计	26	22 (85%)	21/31 (67%)	20	4	1 (4%)
新方法						
6	4	3	3/4	2	2	1*
7	3	3	2/3	2	0	0
8	4	3	3/5	3	1	1**
9	4	3	3/5	2	1	1*
总计	15	12 (80%)	11/17 (65%)	9	4	3 (20%)

[1491] *hES细胞系衍生自活体解剖单个卵裂球的胚胎

[1492] **hES细胞系衍生自两个活体解剖卵裂球中的一个

[1493] 【实施例12.卵裂球活体解剖和培养】

[1494] 在另外一组实验中,使用了双倍剂量的层粘连蛋白,并且卵裂球 在具有MEF细胞的胚泡培养基中生长延长的时间段(5天)以防止卵球形成。

[1495] 前核阶段人类胚胎在Quinn's分裂培养基(Cooper Surgical)中在5%CO₂孵化器中培养至8-细胞阶段。使用PIEZO如先前所述地从胚胎分离单独的卵裂球。简要而言,将8-细胞胚胎在补充有0.05%PVA的无Ca⁺⁺和Mg⁺⁺的磷酸缓冲盐水中于室温下预温育15分钟,以促进单独的卵裂球分离。然后将胚胎转移至Quinn's hepes培养基以供操作。在插入活体解剖吸液管之前,通过应用几次PIEZO脉冲使用小(20μm)吸液管在透明带上打洞(直径500μm)。为了分离单个的卵裂球,将吸液管(500μm)插入穿过所述洞,并应用温和的负压抓住卵裂球。当卵裂球的2/3在吸液管内部时,即将所述卵裂球拉出。活体解剖后,将母体胚胎和卵裂球返回到原始培养滴(Quinn's分裂培养基),并一起培养12至18小时。然后分开卵裂球和母体胚胎:将母体胚胎转移至胚泡培养基(Quinn's胚泡培养基)以允许它们发育成胚泡,同时将卵裂球转移至含有MEF的小培养滴中(50μl)。所述卵裂球培养基补充有层粘连蛋白(10μl/ml)、纤连蛋白(10μl/ml)或基质胶(10μl/ml)。将它们在相同培养基中培养5天,或至它们形成包括大约20细胞的细胞团块。然后使邻近的GFP ES细胞培养滴与卵裂球培养滴合并,以允许这两种培养基混合在一起。大约24小时后,取出1/2的卵裂球团块,并将其铺板于相同的培养滴。每天检查ES集落形成,并且每天用新鲜培养基更换1/2的培养基。然后分开ES集落并机械转移至新鲜的ES细胞培养皿,多达第4代,然后使ES细胞逐渐接受胰蛋白酶解作用,以用于大规模培养。

[1496] 卵裂球发育至卵球后,几乎所有的卵裂球都变成滋养层样细胞,滋养层样细胞没有变成ES细胞的潜能。通过阻止卵球形成和添加更高的层粘连蛋白(其干扰细胞极性),大多数8-细胞卵裂球被指导为变成ES细胞(表12)。

[1497] 【表12.从单个卵裂球的ES细胞系衍生】

[1498]

处理	卵裂球数	分裂的卵裂球数	初始生长晕数	ES 细胞系数
层粘连蛋白	6	5	4	4
纤连蛋白	6	5	3	1
基质胶	6	4	0	0

[1499] 【实施例13.hESC共培养不是hESC系衍生所必需的】

[1500] 在另一组实验中,检查GFP-hESC共培养以确定共培养是否是成功的衍生所必需的。实验使用2个冷冻的分裂阶段胚胎执行,所述分裂阶段胚胎在活体解剖卵裂球之前融化并在胚泡培养基中培养2小时。从一个胚胎取出单个卵裂球,并从第二个胚胎取出两个卵裂球。允许剩余的活体解剖胚胎继续发育,并于胚泡阶段将其冷冻。取出的卵裂球在与实施例11的第二组实验所述相同但是不存在GFP-hESC的条件下培养。两种卵裂球衍生的聚集物均产生细胞生长晕,而所述两个胚胎中的一个(50%)产生稳定的hESC系。对从此集落(NED5)建立的稳定hESC系的免疫染色确认多能性标志物的表达,包括Oct-4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81和碱性磷酸酶(图11C)。新建立的hESC系拥有正常的雄性(46XY)核型(图14),并从所有三个胚层分化出衍生物,包括用针对微管蛋白BIII(外胚层)、平滑肌肌动蛋白(中胚层)、甲胎蛋白(原始内胚层)抗体免疫染色。

[1501] 【实施例14.层粘连蛋白指导卵裂球向ICM的分化】

[1502] 进行单独的研究以调查增强的卵裂球向ICM的分化机制。在不存在层粘连蛋白和纤连蛋白时,解离的单个卵裂球均一地分化成滋养外胚层(16/16[100%]的卵裂球生长晕含有滋养外胚层细胞,而0/16[0%]含有ICM样细胞)。相反,当向培养基添加层粘连蛋白时,仅有1/14(7%)的卵裂球衍生的聚集物产生滋养外胚层样小泡,而13/14(93%)产生ICM样细胞。单独添加纤连蛋白则对谱系特化有很小或没有影响(5/6[83%]的生长晕含有滋养外胚层细胞,而1/6[17%]含有ICM样细胞)。这暗示层粘连蛋白可能在指导卵裂球向ICM分化中起关键作用。为了检验这一假设,我们对在不存在层粘连蛋白下形成的卵裂球衍生的小泡(图15A),和在层粘连蛋白存在下衍生的ICM样细胞(图15D),分别进行滋养外胚层标志物和ICM/ESC标志物的免疫染色。如所预期的,在无层粘连蛋白时形成的卵裂球衍生的小泡表达关键的滋养外胚层标志物,包括细胞角蛋白8和cdx2(图15B、C),而在层粘连蛋白存在下形成的ICM样生长晕表达Oct-4(图15E)。令人感兴趣的是,紧密连接标志物ZO-1的免疫染色和通过透射电子显微术和半薄切片的超微结构分析(图15G-I)揭示向建立的hESC系的培养基添加层粘连蛋白破坏紧密连接,并使ESC去极化,诱导它们呈现ICM-样表型。此外,ZO-1染色确认向卵裂球的培养基添加层粘连蛋白破坏紧密连接并抑制滋养外胚层分化途径。

[1503] 【实施例15.实施例11-14的材料和方法】

[1504] 【单个卵裂球活体解剖】

[1505] 用于临床目的IVF产生的残留胚胎是在完全知情同意下获得的,其使用遵守先进细胞技术道德咨询委员会(EAB)和机构审查委员会(IRB)。捐赠的前核阶段胚胎使用胚胎融化试剂盒(Cooper Surgical,CAT#ART-8016)按照生产商的指导进行融化。所有程序在室温下执行。简要而言,将胚胎卸载到0.5M蔗糖融化培养基并在其中保持10分钟之前,将其在空气中融化2分钟,接着是37°C3分钟。然后在重新移至预平衡的胚胎培养基之前,将胚胎移至0.3M蔗糖融化培养基并温育10分钟,接着在胚胎融化稀释剂中洗涤数次。融化的胚胎在

20ul滴的Quinn's分裂培养基中、在空气中含6%CO₂的高湿度孵化器中于37℃下培养。仅有在融化后48小时内发育至8-细胞阶段的胚胎经受单个卵裂球活体解剖。在活体解剖之前,使用PIEZO钻在所有胚胎的透明带上打一小洞(直径50μm),接着在补充有0.05%PVA(聚乙烯醇)的无Ca⁺⁺和Mg⁺⁺的PBS中温育15分钟。卵裂球活体解剖在37℃下、在补充有5%SPS(血清蛋白替代品,Cooper Surgical)的Quinn's Hepes培养基中、使用PIEZO钻如前所述执行。从每个胚胎中取出仅单个卵裂球(在少数情形下,两个卵裂球)。在实验组1中,母体胚胎和活体解剖的卵裂球共培养12-24小时,然后转移至Quinn's胚泡培养基并共培养另外48小时。共培养后,母体胚胎被冷冻,卵裂球团块移至MEF滴以如下所述地进一步生长。在实验组2中,母体胚胎和卵裂球共培养低于12小时。然后将它们分开,并在冷冻之前将胚胎在Quinn's胚泡培养基中培养另外48小时。实验2中的卵裂球在补充有来自人类胎盘的层粘连蛋白(Sigma)和纤连蛋白(来自人类血浆,Sigma)的Quinn's胚泡培养基中于MEF细胞上培养5天。

[1506] 【胚泡冷冻】

[1507] 确认囊胚腔形成之后,母体胚胎使用胚泡冷冻试剂盒(Cooper Surgical,Cat# ART-8015)按照生产商的指导冷冻。所有程序在室温下执行。简要而言,在移至最终的9%甘油加0.2M蔗糖冷冻溶液之前,胚胎用稀释培养基冲洗并在其中培养5分钟,然后转移至5%甘油冷冻培养基10分钟。然后在冷冻之前,将每个胚胎加载于0.25ml胚胎冷冻吸管(IMV-ZA475,France)。胚胎冷冻使用胚胎冷冻仪(Freeze Control CL-869,Australia)执行。以2℃/分钟使胚胎从25℃的起始温度到-6.5℃。然后在以0.3℃/分钟冷却至-45℃并转移至液氮储存罐之前,手动接种它们,并在-6.5℃保持10分钟。

[1508] 【ESC衍生】

[1509] hESC培养的执行如先前所述(Klimanskaya等人,2006;Klimanskaya等人,2007;Klimanskaya和McMahon,2004)。在实验组1中,卵球铺板之前两天,将MEF细胞铺板于明胶处理的60mm细胞培养皿中排成行的50ul滴中。将MEF细胞滴安排为2或3滴(“辅助滴”)围绕一个“卵裂球滴”(指定用于卵裂球生长晕的滴)。第二天,将GFP+hES细胞的小团块转移至“辅助滴”并培养过夜,将这些滴中的MEF铺板培养基替换为hESC培养基。第三天,将“卵裂球滴”中的培养基替换为新鲜制备的补充有5ug/ml纤连蛋白和2.5ug/ml层粘连蛋白的Quinn's胚泡培养基。在转移卵球之前,将培养皿在6%CO₂孵化器中预温育至少3小时。卵球转移后的第二天,通过用小的玻璃吸液管在两滴之间拖动培养基,将每个卵球培养滴与2或3个周围的GFP-hESC滴连接起来。再一天,用吸液管加宽连接通道,并在两天后用如上所述的衍生培养基替换胚泡培养基。初始生长晕形成大到足以进行分散的集落后(通常铺板后3-5天),将其切成两片并重铺板于相同的滴。

[1510] 在实验组2中,在与母体胚胎共培养第一个12小时后,卵裂球在Quinn's胚泡培养基的50ul滴中培养,所述Quinn's胚泡培养基补充有5ug/ml纤连蛋白和5ug/ml层粘连蛋白,并含有MEF细胞(如实验组1中制备的)。5天内不连接卵裂球培养滴和周围的GFP ESC培养滴。在此时间内,大多数卵裂球形成类似于内细胞团的包含20-30个细胞的细胞团块。铺板后第6天,如实验组1中那样将卵裂球培养滴和周围的GFP ESC培养滴连接起来,并在第7天用衍生培养基替换胚泡培养基。每日检查初始生长晕,并如实验组1中那样执行生长晕的增殖。每隔一天替换培养基原始体积的一半。当观察到hESC的稳定生长后,从培养基中去除血

清。详细的程序如Klimanskaya等人,2007(Klimanskaya等人,2007)中所述。

[1511] 实验组3遵循与组2相同的程序,但是没有hESC-GFP共培养。

[1512] 【免疫染色】

[1513] 免疫染色使用标准染色方案执行。简要而言,样品用2%多聚甲醛固定10分钟(细胞)或40分钟(小泡),用0.1%NP-40进行渗透处理,用含有各10%的山羊和驴血清的PBS封闭1小时,并与初级抗体在4℃下温育过夜。每次抗体温育之后,执行3次洗涤,每次10分钟。添加荧光标记的或生物素化的二级抗体(Jackson ImmunoResearch或Molecular Probes)1小时,然后添加荧光标记的链霉抗生物素(Molecular Probes)15分钟,以显现生物素化的二级抗体。样品以DAPI固定于Vectashield(Vector Laboratories,Burlingame,CA),并使用倒置式荧光显微镜(Nikon)拍照。畸胎瘤切片的过氧化物酶染色使用标准方案执行。简要而言,载玻片在二甲苯中脱蜡三次。以100%乙醇除去二甲苯,内源过氧化物酶活性以3% H₂O₂封闭,且载玻片在如上所述的含有0.1%Triton X-100的封闭剂中温育一小时,接着在以相同封闭剂稀释的初级抗体中于4℃下温育过夜。使用了针对以下抗原的初级抗体:Oct-4(Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz,CA)、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81(Chemicon,Temecula,CA)、Nanog(Kamiya)、βIII微管蛋白(Covance)、甲胎蛋白、平滑肌肌动蛋白(Dako)、cdx2(Abcam)、ZO-1(Zymed)、细胞角蛋白8(Developmental Studies Hybridoma Bank)

[1514] 【畸胎瘤形成】

[1515] 使用6-8周龄的NOD-SCID雄性小鼠(Jackson Laboratories,Bar Harbor,ME)。将50-100个细胞的小团块注射至肾小囊下面,并且在移植后7-12周处死小鼠,肾在4%多聚甲醛中固定过夜,在石蜡中包埋,切片,免疫染色或苏木精伊红染色,并分析所有三个胚层的衍生物的存在。

[1516] 【GFP序列的PCR分析】

[1517] WA01-GFP(H1-GFP)、NED1、NED2、NED3和NED4细胞的基因组DNA使用MicroDNA试剂盒(Qiagen)分离,且GFP-特异性PCR反应的执行如先前所述(Klimanskaya等人,2006)。作为PCR反应的内部对照,成肌蛋白引物包括于所有PCR反应中,其产生所述的(Klimanskaya等人,2006)245bp片段。PCR产物在3%琼脂糖凝胶上分离,并通过溴化乙锭染色显现。

[1518] 【从NED hES细胞产生母细胞】

[1519] 从具有造血和上皮两种潜能的NED hESC产生母细胞的执行如先前所报道的(Lu等人,2007)。简要而言,3.5日龄胚状体(EB)产生自在补充有形态发生素和早期造血细胞因子的组合的StemLine II无血清培养基中培养的hESC,将早期阶段EB解离,并将各个细胞铺板于无血清的半固体母细胞集落(blast-colony)生长培养基7天。挑取葡萄样母细胞集落(grape-like blast colonies)并铺板以用于造血细胞和上皮细胞两种细胞的分化。

[1520] 【上皮祖先测定】

[1521] 对于上皮祖先测定,将母细胞铺板于纤连蛋白包被的平板(BD Bioscience)的EGM-2完全培养基(Lonza)中3-5天。对于Ac-LDL摄取,hES-BC细胞在纤连蛋白包被的孔中培养3-5天,并与10μg/ml Alexa Fluor 594-标记的Ac-LDL(Invitrogen)温育6-8小时。然后细胞用1X PBS洗涤3次,并用4%多聚甲醛固定30分钟。Ac-LDL的摄取在荧光显微镜下显现。对于vWF(Dako)、PECAM-1(CD31)(Cell Signalling Technologies)、VE-钙黏着蛋白(R&D

Systems)和KDR(Cell Signalling Systems)表达,细胞进行渗透处理,然后与初级抗体在4℃下温育过夜,然后与FITC标记的相应二级抗体(Jackson Laboratory)温育30-60分钟。最后洗涤之后,在紫光显微镜下检查细胞。

[1522] 【核型分析】

[1523] 细胞以1:6比值铺板于明胶上。当细胞为大约50%汇合时,向培养基中添加0.12ug/ml秋水仙酰胺(Invitrogen)40分钟。细胞通过胰蛋白酶收获,在0.075M KCl中于37℃下温育12分钟,用3:1甲醇和乙酸固定。扩散分析由Cell Line Genetics,Inc.(对于hESC系NED1-NED4)和奥克兰儿童医院的细胞遗传学实验室使用G-显带技术执行。

[1524] 【基因分型】

[1525] 新衍生的hESC系的鉴定由Seq Wright,Inc.使用AmpF1STR Identifiler试剂盒(Applied Biosystems)执行。

[1526] 【RNA分离和通过PCR的基因表达分析】

[1527] 总RNA分离自大约100个hESC,并使用RNAeasy Micro Kit(Qiagen,Valencia,CA)按照供应商建议的程序洗脱于80ul DEPC-H₂O中。使用Superscript II反转录酶(Clontech),以SMART IIA和SMART CDS引物IIA(Clontech)对RNA进行第一链cDNA合成,并使用Super SMART cDNA合成试剂盒(Clontech)按供应商的建议构建cDNA库。5ul cDNA库用于分析OCT-4和Nanog表达,以次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)基因作为阳性对照。分离自H1ES细胞的总RNA用作阳性对照,且H₂O用作阴性对照。10μl PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶上分离,并通过溴化乙锭染色显现。

[1528] 【参考文献】

[1529] Ioue K,等人(2003).Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning(供体细胞类型和基因型对小鼠体细胞克隆效率的影响).Biol Reprod 69:1394-4000.

[1530] Rybouchkin A,等人(2002).Developmental potential of cloned mouse embryos reconstructed by a conventional technique of nuclear injection(通过常规核注射技术重建的克隆小鼠胚胎的发育潜能).Reproduction 124:197-207.

[1531] Wakayama S,等人(2005).Establishment of male and female nuclear transfer embryonic stem cell lines from different mouse strains and tissues(从不同的小鼠品系和组织建立雄性和雌性核移植胚胎干细胞系).Biol Reprod 72:932-936.

[1532] Tong G,等人(2006).Aberrant profile of gene expression in cloned mouse embryos derived from donor cumulus nuclei(衍生自供体卵丘核的克隆小鼠胚胎的基因表达异常谱).Cell Tissue Res:231-243.

[1533] Sebastiano V,等人(2005).Cloned pre-implantation mouse embryos show correct timing but altered levels of gene expression(克隆的植入前小鼠胚胎显示正确的计时但是改变的基因表达水平).Mol Reprod Dev70:146-154.

[1534] Chung Y,等人(2003).Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos(克隆小鼠胚胎中DNA甲基转移酶表达的异常调节).Biol Reprod 69:146-153.

- [1535] Kishigami S,等人(2006).Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer(通过在体细胞核移植后用制滴菌素A处理显著改进了小鼠克隆技术).*Biochem Biophys Res Commun* 340:183-189.
- [1536] Heindryckx B,等人(2002).Serial nuclear transfer increases the developmental potential of in vitro-matured oocytes in mouse cloning(连续核移植增加了小鼠克隆中体外成熟的卵母细胞的发育潜能).*Biol Reprod* 67:1790-1795.
- [1537] Ono Y,等人(2001).Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer(通过连续核移植从在中期捕获的胎儿成纤维细胞克隆小鼠).*Biol Reprod* 64:44-50.
- [1538] Polejeva I,等人(2000).Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells(通过核移植从成年体细胞产生的克隆猪).*Nature* 407:86-90.
- [1539] Amano T,等人(2001).Mouse cloned from embryonic stem cells synchronized in metaphase with Nocodazole(从用诺可唑同步于中期的胚胎干细胞克隆的小鼠).*J Exp Zoology* 287:139-145.
- [1540] Yabuchi A,等人(2001).Nuclear transfer of mouse follicular epithelial cells pretreated with spermine,protamine,or putrescine(用精胺、鱼精蛋白或腐胺预处理的小鼠卵泡上皮细胞的核移植).*J Exp Zoology* 289:208-212.
- [1541] Sullivan E,等人(2004).Cloned calves from chromatin remodeled in vitro(从体外重建的染色质克隆小牛).*Biol Reprod* 70:146-153.
- [1542] Enright B,等人(2003).Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine(通过用制滴菌素A或5-氮-2'-脱氧胞嘧啶处理从供体细胞克隆的胚胎的表观遗传特征和发育).*Biol Reprod* 69:896-901.
- [1543] Campbell K,等人(1996).Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer(通过核移植的胚胎克隆中细胞周期的协调).*Reviews Reprod* 1:40-46.
- [1544] Chartot C,等人(1989).An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro(改进的培养基支持随机杂交的1-细胞小鼠胚胎体外发育).*J Reprod Fertil* 86:679-688.
- [1545] Chung,等人(2006).Optimization of procedure for cloning by somatic cell nuclear transfer in mice(小鼠中通过体细胞核移植的克隆程序的优化).*Method Mol Biol* 348:111-124.
- [1546] Chung Y和Becker S(2006).Embryonic stem cells using nuclear transfer(使用核移植的胚胎干细胞).*Method Enz* 418:135-147.
- [1547] Bayona-Bafaluy MP,等人(2003).Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence(再访小鼠线粒体DNA序列).*Nucleic Acids Res.* 31:5349-5355.
- [1548] Wakayama T,等人(1998).Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei(来自注射卵丘细胞核的去核卵母细胞的

小鼠的足月发育).Nature 394:369-374.

[1549] Livak K和Schmittgen T(2001).Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method(使用实时定量PCR和 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法的相对基因表达数据的分析). Methods 25:402-408.

[1550] Shi W,等人(2004).Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in in vitro fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos(体外受精和克隆的兔植入前胚胎中的甲基化重编程和染色体非整倍性).Biol Reprod 71:340-347.

[1551] Mann M,等人(2003).Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos(克隆的植入前阶段小鼠胚胎中印记基因甲基化和表达的破坏).Biol Reprod 69:902-914.

[1552] Dean W,等人(2001).Conservation of methylation reprogramming in mammalian development:aberrant reprogramming in cloned embryos(哺乳动物发育中甲基化重编程的保守性:克隆胚胎中异常的重编程).PNAS 98:13734-13738.

[1553] Rideout III W,等人(2001).Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome(基因组的核克隆和表观遗传重编程).Science 293:1093-1098.

[1554] Wakayama T,等人(1998).Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei(来自注射卵丘细胞核的去核卵母细胞的小鼠的足月发育).Nature 394:369-374.

[1555] Chung Y,等人(2002).Nuclear-cytoplasmic"tug of war"during cloning: effects of somatic cell nuclei on culture medium preferences of preimplantation cloned mouse embryos(克隆过程中的核-细胞质"拔河":体细胞核对植入前克隆的小鼠胚胎的培养基偏好的影响).Biol Reprod 66:1178-84.

[1556] Heindryckx B,等人(2001).Effects of culture media on invitro deveopelment of cloned mouse embryos(培养基对克隆小鼠胚胎的体外发育的影响).Cloning 3:41-50.

[1557] Kishikawa H,等人(1999).Comparison of oocyte activating agents for mouse cloning(用于小鼠克隆的卵母细胞活化剂的比较).Cloning 1:153-159.

[1558] Miyoshi K,等人(2003).Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipeient oocytes and donor cells(可通过增加接受者卵母细胞和供体细胞的均一性改进克隆效率).Biol Reprod 68:1079-1086.

[1559] Boiani M,等人(2003).Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation:epigenetic complementation?(通过克隆-克隆聚集克服克隆中的多能性缺陷:表观遗传互补?)EMBO J 22:5304-5312.

[1560] Gibbons J,等人(2002).Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells(衍生自roscovitine处理的成年体细胞的克隆小牛的增强的生存能力).Biol Reprod 66:895-900.

[1561] Eggan K,等人(2001).Hybrid vigor,fetal overgrowth,and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation(通过核克隆和四倍体胚胎互补衍生的小鼠的杂交活力、胎生长晕和生存力).

- [1562] Van Thuan N,等人(2006).Injection of somatic cell cytoplasm into oocytes before intracytoplasmic sperm injection impaires full-term development and increases placental weight in mice(在胞浆内精子注射前向卵母细胞注射体细胞细胞质削弱了小鼠的足月发育但增加了胎盘重量).Biol Reprod
- [1563] Ono Y,等人(2001).Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer(通过连续核移植从在中期捕获的胎儿成纤维细胞克隆小鼠).Biol Reprod.64:44-50.
- [1564] Latham K,等人(1992).Acquisition of transcriptionally permissive state during the 1-cell stage of mouse embryogenesis(小鼠胚胎发生的1-细胞阶段过程中转录许可状态的获得).Dev Biol 149:457-462.
- [1565] Gao S,等人(2003).Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei(用培养的成肌细胞核制备的克隆小鼠胚胎的体细胞样特征).Biol Reprod 69:48-56.
- [1566] Simerly C,等人(2003).Molecular correlates of primate nuclear transfer failures(灵长类动物核移植失败的分子关联).Science300:297.
- [1567] Kim J,等人(2002).Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic cell nuclear transfer(通过体细胞核移植重建的胚胎中染色质重建机制的分析).Biol Reprod 67:760-766.
- [1568] Boiani M等人(2002).Oct4distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency(小鼠克隆中的Oct4分布和水平:多能性的结果).Genes Dev 16:1209-1219.
- [1569] Klimanskaya I,Chung Y,Becker S,Lu SJ,Lanza R.Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres(衍生自单个卵裂球的人类胚胎干细胞系).Nature 2006;444(7118):481-485.
- [1570] Lanza R,Thomas ED,Thomson JA,Pedersen R.Essentials of Stem Cell Biology(干细胞生物学的本质).San Diego:Elsevier Academic Press;2006.
- [1571] Thomson JA,Itskovitz-Eldor J,Shapiro SS等人.Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts(衍生自人类胚胎的胚胎干细胞系).Science 1998;282(5391):1145-1147.
- [1572] Cowan CA,Klimanskaya I,McMahon J等人.Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts(从人类胚胎衍生胚胎干细胞系).N Engl J Med 2004;350(13):1353-1356.
- [1573] Reubinoff BE,Pera MF,Fong CY,Trounson A,Bongso A.Embryonic stem cell lines from human blastocysts:somatic differentiation in vitro(来自人类胚胎的胚胎干细胞系:体外体细胞分化).Nat Biotechnol 2000;18(4):399-404.
- [1574] Lanzendorf SE,Boyd CA,Wright DL,Muasher S,Oehninger S,Hodgen GD.Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines.(从匿名供体获得的人类配子用于产生人类胚胎干细胞系的用途).Fertil Steril 2001;76(1):132-137.

- [1575] Hovatta O、Mikkola M、Gertow K等人.A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells(使用人类包皮成纤维细胞作为饲养细胞的培养系统允许产生人类胚胎干细胞).Hum Reprod 2003;18(7):1404-1409.
- [1576] Klimanskaya I、Chung Y、Meisner L、Johnson J、West MD、Lanza R.Human embryonic stem cells derived without feeder cells(无饲养细胞下衍生的人类胚胎干细胞).Lancet 2005;365(9471):1636-1641.
- [1577] Strelchenko N、Verlinsky O、Kukharensko V、Verlinsky Y.Morula-derived human embryonic stem cells(桑椹胚衍生的人类胚胎干细胞).Reprod Biomed Online 2004;9(6):623-629.
- [1578] Dickey-Wicker Amendment.Publication L No.104-99,paragraph 128, 110Statute 34.1996.
- [1579] Neuber E、Rinaudo P、Trimarchi JR、Sakkas D.Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development(顺序评估单独培养的人类胚胎作为随后的高质量胚泡发育的指示).Hum Reprod 2003;18(6):1307-1312.
- [1580] Veeck LL.An Atlas of Human Gametes and Conceptuses(人类配子和孕体图集).New York,New York:Parthenon Publishing Group;1999.
- [1581] Klimanskaya I、Chung Y、Becker S、Lu SJ、Lanza R.Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres(衍生自单个卵裂球的人类胚胎干细胞系).Nature Protocols.出版中.
- [1582] Geber S、Sampaio M.Blastomere development after embryo biopsy:a new model to predict embryo development and to select for transfer(胚胎活体解剖后的卵裂球发育:预测胚胎发育和选择用于移植的新模型).Hum Reprod 1999;14(3):782-786.
- [1583] Palmer GA、Traeger-Synodinos J、Davies S等人.Pregnancies following blastocyst stage transfer in PGD cycles at risk for beta-thalassaemic haemoglobinopathies.(PGD周期中胚泡阶段移植后的怀孕有 β -地中海贫血性血红蛋白病风险).Hum Reprod 2002;17(1):25-31.
- [1584] Simon C、Escobedo C、Valbuena D等人.First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines:use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions(西班牙第一例人类胚胎干细胞系衍生:使用长期冷冻保存的胚胎和无动物条件).Fertil Steril 2005;83(1):246-249.
- [1585] Klimanskaya I、McMahon J.Approaches for Derivation and Maintenance of human ES cells:detailed procedures and alternatives(衍生和维持人类ES细胞的方法:详细程序和替代方案).于:Lanza R、Gearhart J、Hogan B,编辑.Handbook of Stem Cells(干细胞手册).San Diego:Elsevier Academic Press;2004p.437-449.
- [1586] Krtolica A、Genbacev O、Escobedo C等人.Disruption of Apical-Basal Polarity of Human Embryonic Stem Cells Enhances Hematoendothelial

Differentiation(破坏人类胚胎干细胞的顶-基极性增强了血液上皮分化).Stem Cells 2007.

[1587] Weber DJ.Manufacturing considerations for clinical uses of therapies derived from stem cells(衍生自干细胞的疗法的临床使用的生产考虑).Methods Enzymol 2006;420:410-430.

[1588] Klimanskaya I,McMahon J.Approaches for Derivation and Maintenance of human ES cells:detailed procedures and alternatives(衍生和维持人类ES细胞的方法:详细程序和替代方案).于:Lanza R,Gearhart J,Hogan B,编辑.Handbook of Stem Cells(干细胞手册).San Diego:Elsevier Academic Press;2004p.437-449.

[1589] Klimanskaya I,Chung Y,Becker S,Lu SJ,Lanza R.Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres(衍生自单个卵裂球的人类胚胎干细胞系).Nature 2006;444(7118):481-485.

[1590] Klimanskaya I,Chung Y,Becker S,Lu SJ,Lanza R.Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres(衍生自单个卵裂球的人类胚胎干细胞系).Nature Protocols.出版中.

[1591] Lu SJ,Feng Q,Caballero S等人.Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells(从人类胚胎干细胞产生功能性成血管细胞).Nat Methods 2007;4(6):501-509

[1592] 本说明书还包括下列内容:

[1593] 1.一种用于重编程分化细胞的核的方法,其包括如下步骤:

[1594] (a)提供动物的分化细胞、去核的MII阶段卵,并提供动物的去核的2-细胞阶段胚胎,其中所述MII阶段卵和所述胚胎是同步的;

[1595] (b)将所述分化细胞的核注射入所述去核的卵;

[1596] (c)活化包含所述核的所述卵;

[1597] (d)允许包含所述核的所述活化的卵发育至2-细胞阶段;

[1598] (e)取出步骤(d)的所述活化的2-细胞阶段卵的至少一个核和至少一部分周围细胞质;和

[1599] (f)通过将所述核放置到所述2-细胞阶段胚胎的2个细胞之间,将步骤(e)中取出的所述至少一个核融合入所述去核的2-细胞阶段胚胎,以产生含有所述分化细胞的重编程的核的单个细胞。

[1600] 2.根据实施方式1所述的方法,其中在步骤(c)中,所述卵被放线酮、CsCl₂、钙离子载体、离子霉素、精子因子、6-DMAP、SrCl₂、松胞菌素B或其任何组合活化。

[1601] 3.根据实施方式1所述的方法,其中在步骤(f)中,所述融合步骤是电执行的。

[1602] 4.根据实施方式3所述的方法,其中所述电融合是以两个步骤执行的:其中将所述核与阳极对齐并电冲击的第一步骤,和其中将所述胚胎和所述核旋转大约90度并电冲击的第二步骤。

[1603] 5.根据实施方式1所述的方法,其进一步包括步骤(g)将所述从步骤(f)获得的单个细胞培养至卵裂球、桑椹胚或胚泡阶段。

[1604] 6.根据实施方式1所述的方法,其中所述MII阶段卵是人类卵。

- [1605] 7. 根据实施方式1所述的方法,其中所述去核的2-细胞阶段胚胎是人类胚胎。
- [1606] 8. 根据实施方式1所述的方法,其中所述分化细胞是人类细胞。
- [1607] 9. 根据实施方式1所述的方法,其中所述MII阶段卵和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1608] 10. 根据实施方式1所述的方法,其中所述分化细胞和所述MII阶段卵来自相同物种。
- [1609] 11. 根据实施方式1所述的方法,其中所述分化细胞和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1610] 12. 根据实施方式1所述的方法,其中所述分化细胞、所述MII阶段卵和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1611] 13. 根据实施方式10所述的方法,其中所述相同物种是人类。
- [1612] 14. 一种产生动物的方法,其包括:
- [1613] (a)提供动物的分化细胞、去核的MII阶段卵,并提供动物的去核的2-细胞阶段胚胎,其中所述MII阶段卵和所述胚胎是同步的;
- [1614] (b)将所述分化细胞的核注射入所述去核的卵;
- [1615] (c)活化包含所述核的所述卵;
- [1616] (d)允许包含所述核的所述活化的卵发育至2-细胞阶段;
- [1617] (e)取出步骤(d)的所述2-细胞阶段卵的至少一个核和至少一部分周围细胞质;
- [1618] (f)将步骤(e)中取出的所述至少一个核融合入所述去核的2-细胞阶段胚胎,以产生单个细胞;和
- [1619] (g)培养来自步骤(f)的所述单个细胞以允许发育成动物。
- [1620] 15. 根据实施方式14所述的方法,其中在步骤(c)中,所述卵被放线酮、CsCl₂、钙离子载体、离子霉素、精子因子、6-DMAP、SrCl₂、松胞菌素B或其任何组合活化。
- [1621] 16. 根据实施方式14所述的方法,其中在步骤(f)中,所述融合步骤是电执行的。
- [1622] 17. 根据实施方式16所述的方法,其中所述电融合是以两个步骤执行的:其中将所述核与阳极对齐并电冲击的第一步骤,和其中将所述胚胎和所述核旋转大约90度并电冲击的第二步骤。
- [1623] 18. 根据实施方式14所述的方法,其中所述MII阶段卵是人类卵。
- [1624] 19. 根据实施方式14所述的方法,其中所述去核的2-细胞阶段胚胎是人类胚胎。
- [1625] 20. 根据实施方式14所述的方法,其中所述分化细胞是人类细胞。
- [1626] 21. 根据实施方式14所述的方法,其中所述MII阶段卵和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1627] 22. 根据实施方式14所述的方法,其中所述分化细胞和所述MII阶段卵来自相同物种。
- [1628] 23. 根据实施方式14所述的方法,其中所述分化细胞和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1629] 24. 根据实施方式14所述的方法,其中所述分化细胞、所述MII阶段卵和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1630] 25. 根据实施方式22所述的方法,其中所述相同物种是人类。

- [1631] 26. 一种产生胚胎干细胞的方法,其包括如下步骤:
- [1632] (a)提供动物的分化细胞、去核的MII阶段卵,并提供动物的去核的2-细胞阶段胚胎,其中所述MII阶段卵和所述胚胎是同步的;
- [1633] (b)将所述分化细胞的核注射入所述去核的卵;
- [1634] (c)活化包含所述核的所述卵;
- [1635] (d)允许包含所述核的所述活化的卵发育至2-细胞阶段;
- [1636] (e)取出步骤(d)的所述2-细胞阶段卵的核和周围细胞质;
- [1637] (f)通过将所述核放置到所述2-细胞阶段胚胎的2个细胞之间,将 步骤(e)中取出的所述核融合入所述去核的2-细胞阶段胚胎,以产生单个细胞;和
- [1638] (g)将来自步骤(f)的所述单个细胞培养至其中可衍生胚胎干细胞的发育阶段。
- [1639] 27. 根据实施方式26所述的方法,其中在步骤(c)中,所述卵被放线酮、CsCl₂、钙离子载体、离子霉素、精子因子、6-DMAP、SrCl₂、松胞菌素B或其任何组合活化。
- [1640] 28. 根据实施方式26所述的方法,其中在步骤(f)中,所述融合步骤是电执行的。
- [1641] 29. 根据实施方式28所述的方法,其中所述电融合是以两个步骤执行的:其中将所述核与阳极对齐并电冲击的第一步骤,和其中将所述胚胎和所述核旋转大约90度并电冲击的第二步骤。
- [1642] 30. 根据实施方式26所述的方法,其中所述MII阶段卵是人类卵。
- [1643] 31. 根据实施方式26所述的方法,其中所述去核的2-细胞阶段胚胎是人类胚胎。
- [1644] 32. 根据实施方式26所述的方法,其中所述分化细胞是人类细胞。
- [1645] 33. 根据实施方式26所述的方法,其中所述MII阶段卵和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1646] 34. 根据实施方式26所述的方法,其中所述分化细胞和所述MII阶段卵来自相同物种。
- [1647] 35. 根据实施方式26所述的方法,其中所述分化细胞和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1648] 36. 根据实施方式26所述的方法,其中所述分化细胞、所述MII阶段卵和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1649] 37. 根据实施方式34所述的方法,其中所述相同物种是人类。
- [1650] 38. 根据实施方式26所述的方法,其中所述胚胎干细胞是MHC等位基因半合的或纯合的,其中所述分化细胞是MHC等位基因半合的或纯合的,或所述胚胎干细胞通过同源重组或通过损失杂合性或二者被改造为MHC等位基因半合的或纯合的,并且其中所述相同物种是人类。
- [1651] 39. 根据实施方式38所述的方法,其中所述方法被重复多次以产生胚胎干细胞的库,每个胚胎干细胞是与所述库的其他胚胎干细胞不同的MHC等位基因半合的或纯合的。
- [1652] 40. 根据实施方式14所述的方法,其中步骤(g)包括将所述培养的细胞植入到动物的子宫。
- [1653] 41. 根据实施方式40所述的方法,其中被植入的细胞和它们被植入到其中的动物是相同的物种。
- [1654] 42. 根据实施方式26所述的方法,其中步骤(g)包括:

- [1655] (i)将来自步骤(f)的所述单个细胞培养至桑椹胚阶段；
- [1656] (ii)从所述桑椹胚中分离卵裂球；
- [1657] (iii)培养所述卵裂球,以产生两个或多个卵裂球的团簇；
- [1658] (iv)使所培养的两个或多个卵裂球的团簇与胚胎细胞或胎儿细胞直接或间接接触；和
- [1659] (v)培养(iv)的两个或多个卵裂球的团簇培养,直至产生ES细胞。
- [1660] 43.一种产生胚胎干(ES)细胞的方法,其包括：
- [1661] (a)将从哺乳动物母体胚胎活体解剖的卵裂球和所述母体胚胎一起培养12至18小时；
- [1662] (b)将所述卵裂球转移至进一步包含层粘连蛋白并接种有小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的胚泡培养基,和
- [1663] (c)培养(b)的卵裂球,直至产生ES细胞。
- [1664] 44.根据实施方式43所述的方法,其中MEF被减数分裂灭活。
- [1665] 45.根据实施方式43所述的方法,其中步骤(c)包括在降低卵球形成的条件下培养。
- [1666] 46.根据实施方式45所述的方法,其中所述胚泡培养基包含2.5 μ g/ml层粘连蛋白。
- [1667] 47.根据实施方式45所述的方法,其中步骤(c)包括在接种有MEF细胞的胚泡培养基中培养5天。
- [1668] 48.根据实施方式43所述的方法,其中步骤(c)进一步包括：培养至所述卵裂球形成约20个细胞的细胞团块,并将所述细胞团块转移至接种有ES细胞的培养基。
- [1669] 49.根据实施方式48所述的方法,其中所述ES细胞表达标志物或被标记。
- [1670] 50.根据实施方式43所述的方法,其中所述母体胚胎被转移至胚泡培养基并被允许发育成胚泡。
- [1671] 51.根据实施方式43所述的方法,其中所述卵裂球是从胚胎分离的,包括：
- [1672] (a)固定所述胚胎；和
- [1673] (b)轻打固定的胚胎直至卵裂球分离。
- [1674] 52.一种产生胚胎干细胞的方法,其包括如下步骤：
- [1675] (a)提供动物的分化细胞、去核的MII阶段卵,并提供动物的去核的2-细胞阶段胚胎,其中所述MII阶段卵和所述胚胎是同步的；
- [1676] (b)将所述分化细胞的核注射入所述去核的卵；
- [1677] (c)活化包含所述核的所述卵；
- [1678] (d)允许包含所述核的所述活化的卵发育至2-细胞阶段；
- [1679] (e)取出步骤(d)的所述2-细胞阶段卵的核和周围细胞质；
- [1680] (f)通过将所述核放置在所述2-细胞阶段胚胎的2个细胞之间,将步骤(e)中取出的所述核融合入所述去核的2-细胞阶段胚胎,以产生单个细胞；
- [1681] (g)培养来自步骤(f)的所述单个细胞以产生桑椹胚,所述桑椹胚可用作母体胚胎；
- [1682] (h)从所述桑椹胚分离卵裂球；
- [1683] (i)将所述卵裂球和所述母体胚胎一起培养12至18小时；

- [1684] (j)将所述卵裂球转移至进一步包含层粘连蛋白并接种有小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的胚泡培养基,和
- [1685] (k)培养(j)的卵裂球,直至产生ES细胞。
- [1686] 53.根据实施方式52所述的方法,其中MEF是减数分裂灭活的。
- [1687] 54.根据实施方式52所述的方法,其中步骤(k)包括在降低卵球形 成的条件下培养。
- [1688] 55.根据实施方式54所述的方法,其中所述胚泡培养基包含2.5 μ g/ml层粘连蛋白。
- [1689] 56.根据实施方式54所述的方法,其中步骤(k)包括在接种有MEF细胞的胚泡培养基中培养5天。
- [1690] 57.根据实施方式52所述的方法,其中步骤(k)进一步包括:培养至所述卵裂球形成约20个细胞的细胞团块,并将所述细胞团块转移至接种有ES细胞的培养基。
- [1691] 58.根据实施方式57所述的方法,其中所述ES细胞表达标志物或被标记。
- [1692] 59.根据实施方式52所述的方法,其中所述母体胚胎被转移至胚泡培养基,并被允许发育成胚泡。
- [1693] 60.根据实施方式52所述的方法,其中所述卵裂球是从桑椹胚分离的,包括:
- [1694] (a)固定所述桑椹胚;和
- [1695] (b)轻打固定的桑椹胚,直至卵裂球分离。
- [1696] 61.根据实施方式52所述的方法,其中在步骤(c)中,所述卵被放线酮、CsCl₂、钙离子载体、离子霉素、精子因子、6-DMAP、SrCl₂、松胞菌素B或其任何组合活化。
- [1697] 62.根据实施方式52所述的方法,其中在步骤(f)中,所述融合步骤是电执行的。
- [1698] 63.根据实施方式62所述的方法,其中所述电融合是以两个步骤执行的:其中将所述核与阳极对齐并电冲击的第一步骤,和其中将所述胚胎和所述核旋转大约90度并电冲击的第二步骤。
- [1699] 64.根据实施方式52所述的方法,其中所述MII阶段卵是人类卵。
- [1700] 65.根据实施方式52所述的方法,其中所述去核的2-细胞阶段胚胎是人类胚胎。
- [1701] 66.根据实施方式52所述的方法,其中所述分化细胞是人类细胞。
- [1702] 67.根据实施方式52所述的方法,其中所述MII阶段卵和所述去 核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1703] 68.根据实施方式52所述的方法,其中所述分化细胞和所述MII阶段卵来自相同物种。
- [1704] 69.根据实施方式52所述的方法,其中所述分化细胞和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1705] 70.根据实施方式52所述的方法,其中所述分化细胞、所述MII阶段卵和所述去核的2-细胞阶段胚胎来自相同物种。
- [1706] 71.根据实施方式70所述的方法,其中所述相同物种是人类。
- [1707] 72.根据实施方式52所述的方法,其中所述胚胎干细胞是MHC等位基因半合的或纯合的,其中所述分化细胞是MHC等位基因半合的或纯合的,或所述胚胎干细胞通过同源重组或通过损失杂合性或二者被改造为MHC等位基因半合的或纯合的,并且其中所述相同物种是人类。

- [1708] 73. 根据实施方式72所述的方法, 其中所述方法被重复多次以产生胚胎干细胞的库, 每个胚胎干细胞是与所述库的其他胚胎干细胞不同的MHC等位基因半合的或纯合的。
- [1709] 74. 根据实施方式52所述的方法, 其中所述胚胎培养基包含能够抑制分化成非ES细胞的因子。
- [1710] 75. 根据实施方式52所述的方法, 其中所述胚胎培养基包含能够破坏紧密连接的因子。
- [1711] 76. 根据实施方式52所述的方法, 其中所述胚胎培养基包含能够抑制滋养外胚层分化途径的因子。
- [1712] 77. 根据实施方式52所述的方法, 其中所述胚胎培养基包含能够使细胞去极化的因子。
- [1713] 78. 一种产生胚胎干(ES)细胞的方法, 其包括:
- [1714] (a) 培养从哺乳动物母体胚胎活体解剖的卵裂球;
- [1715] (b) 将所述卵裂球转移至进一步包含层粘连蛋白的胚胎培养基; 和
- [1716] (c) 培养(b)的卵裂球, 直至产生ES细胞。
- [1717] 79. 根据实施方式78所述的方法, 其中步骤(c)包括在降低卵球形 成的条件下培养。
- [1718] 80. 根据实施方式78所述的方法, 其中所述胚胎培养基包含2.5 μ g/ml层粘连蛋白。
- [1719] 81. 根据实施方式78所述的方法, 其中所述母体胚胎被转移至胚胎培养基并被允许发育成胚胎。
- [1720] 82. 根据实施方式78所述的方法, 其中所述卵裂球是从胚胎分离的, 包括:
- [1721] (a) 固定所述胚胎; 和
- [1722] (b) 轻打固定的胚胎, 直至卵裂球分离。
- [1723] 83. 根据实施方式78所述的方法, 其中(a)的卵裂球与所述哺乳动物母体胚胎一起培养。
- [1724] 84. 根据实施方式78所述的方法, 其中所述卵裂球不与先前得到的人类干细胞一起培养。

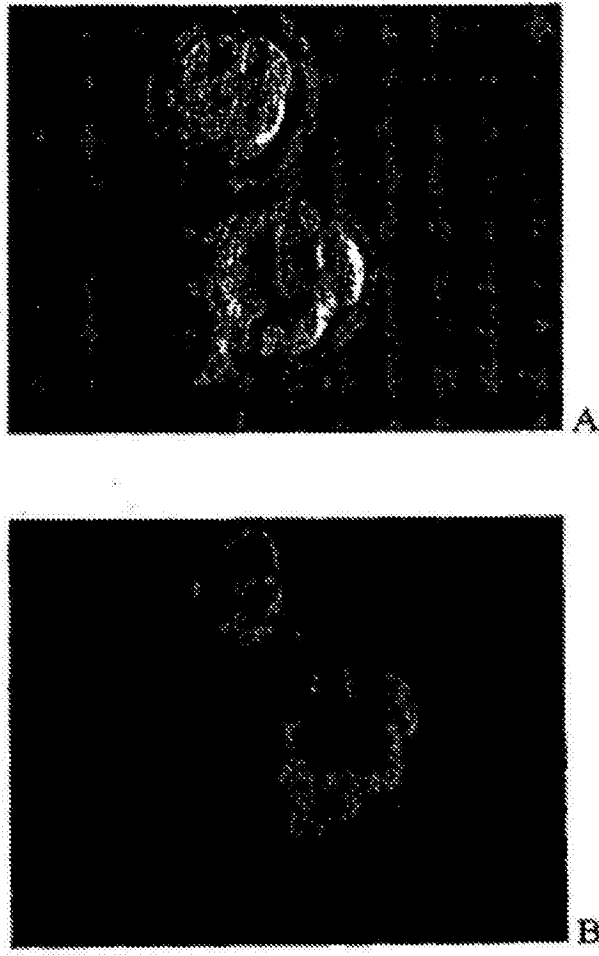


图1A-1B

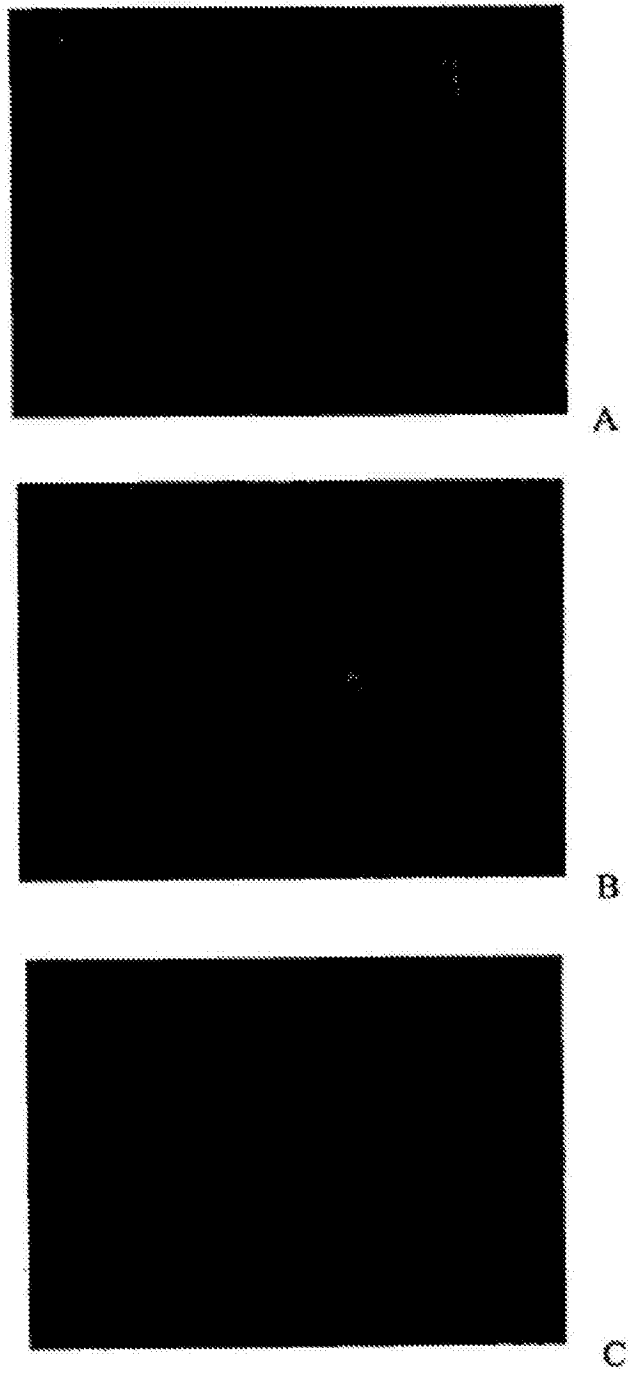


图2A-2C

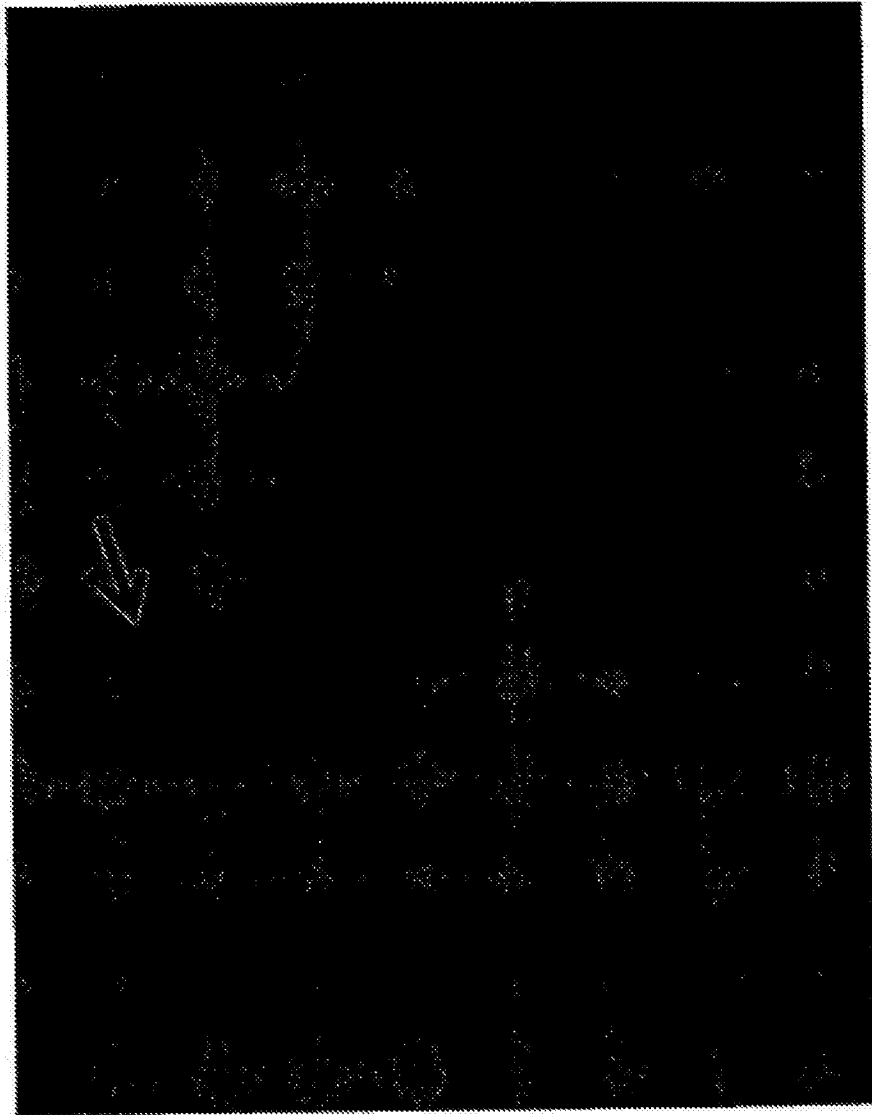
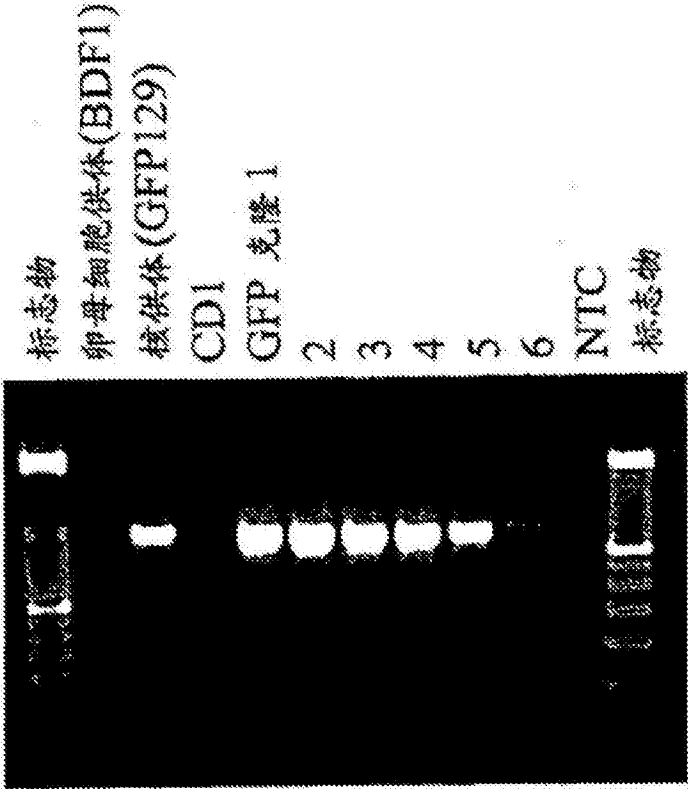
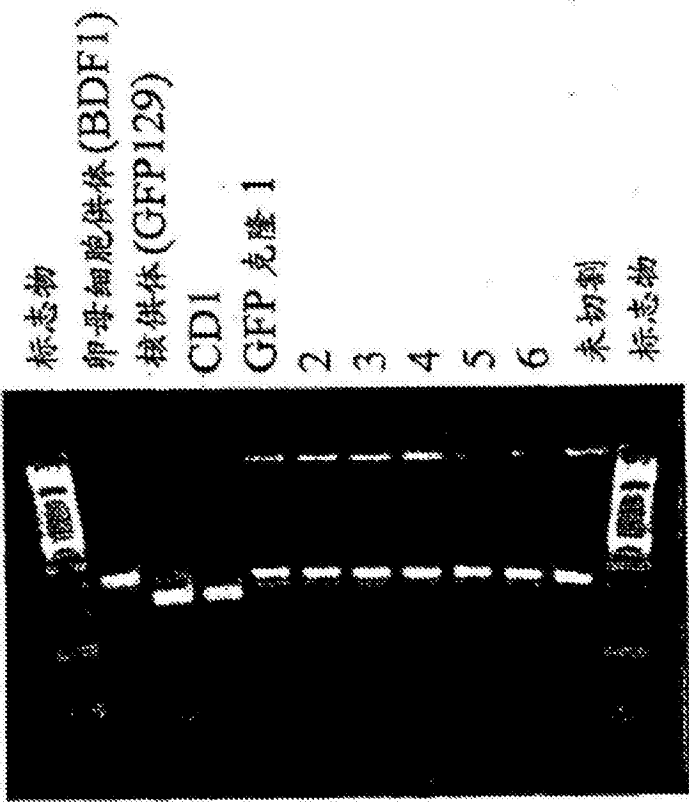


图3



基因组 DNA



线粒体 DNA

图4

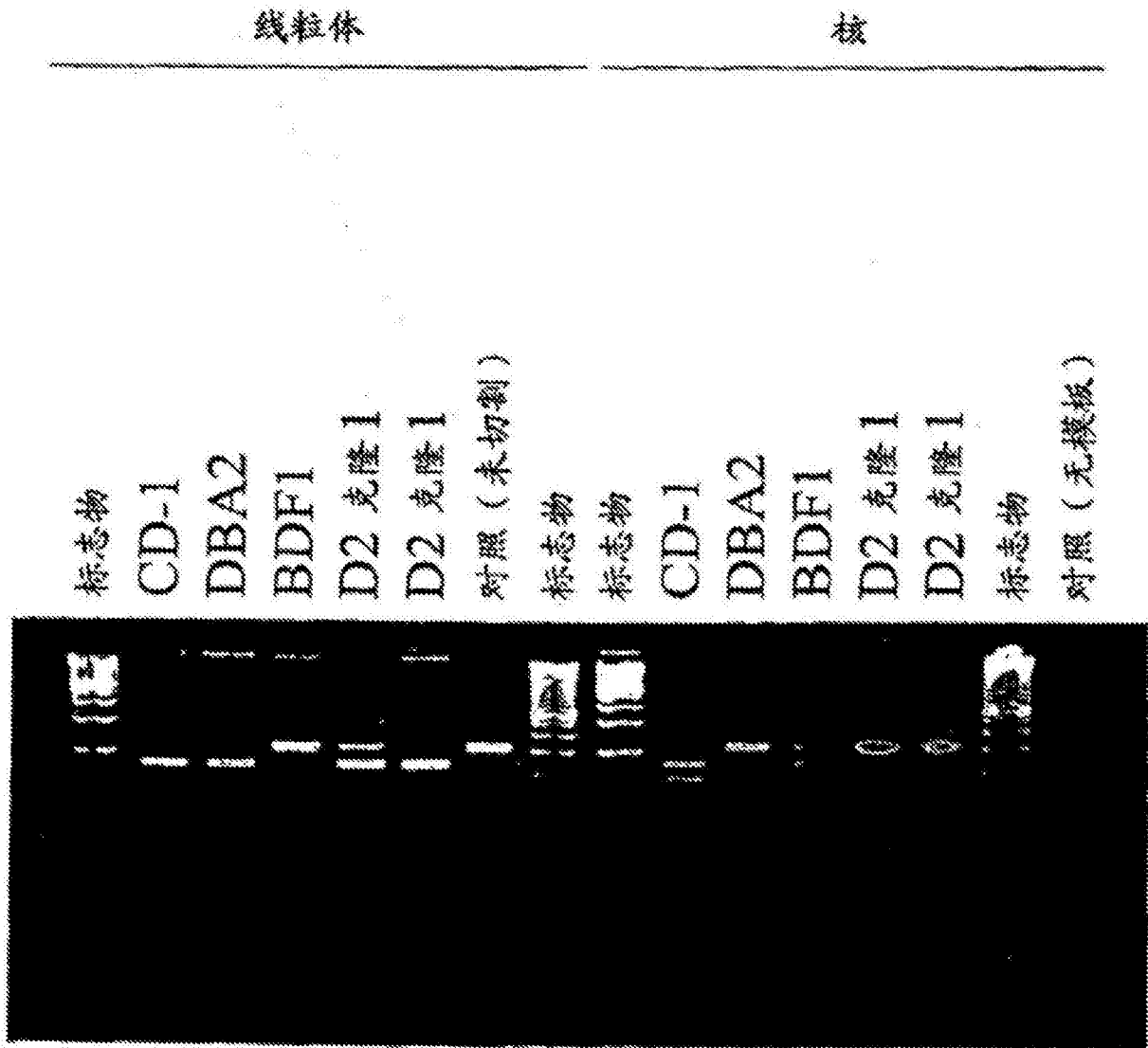
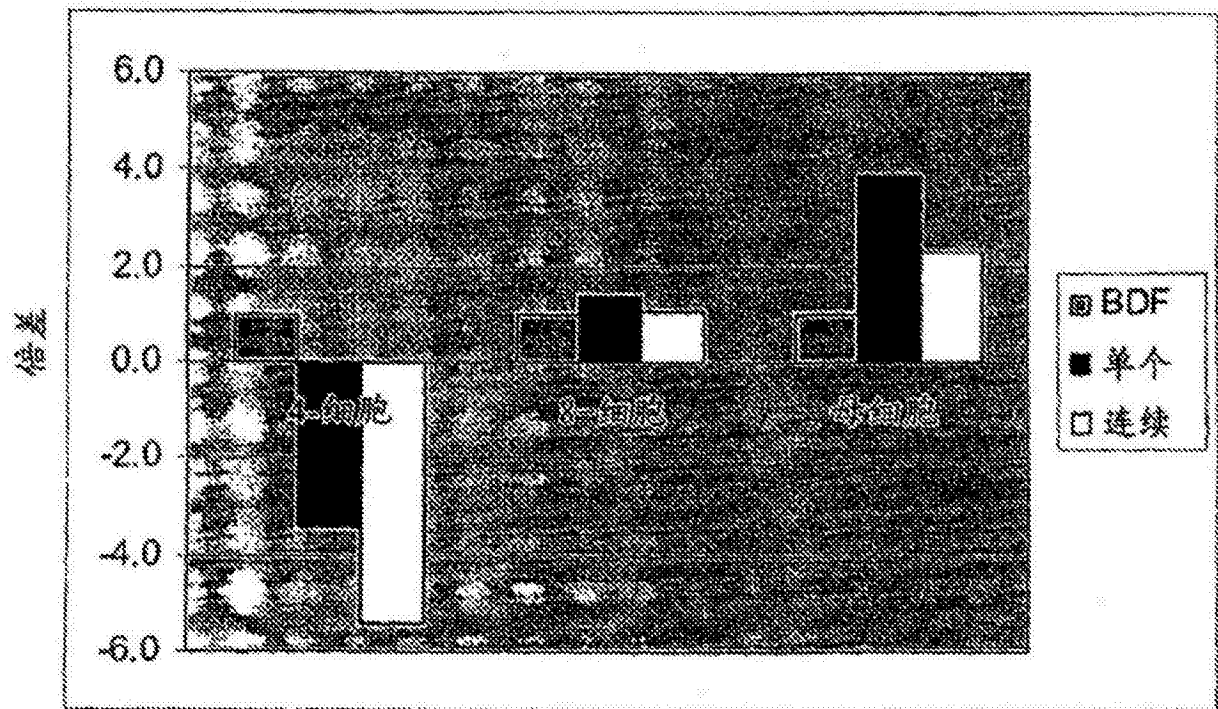
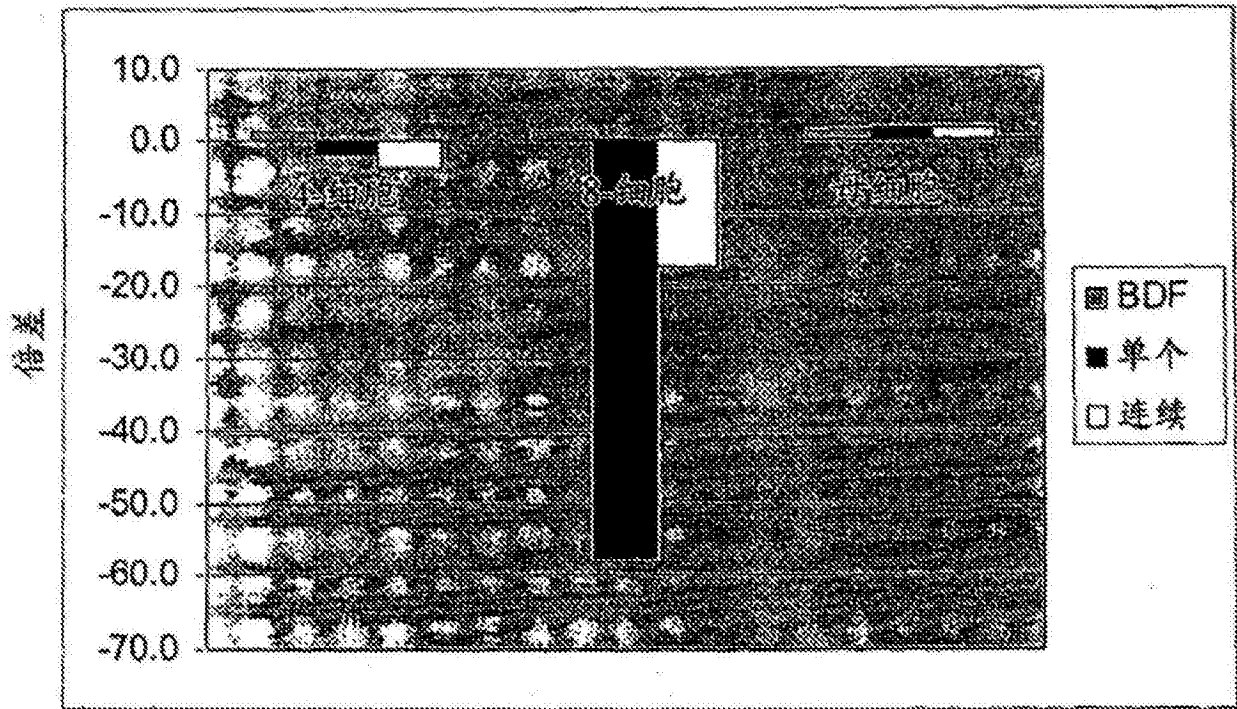


图5



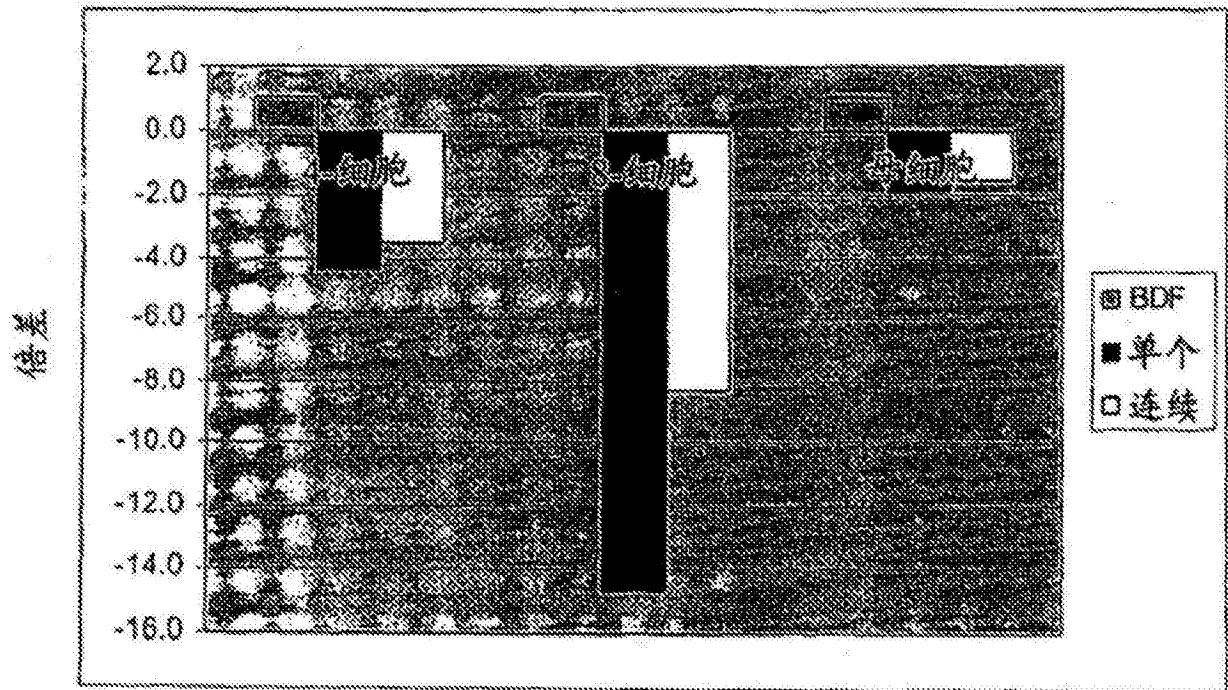
BDF: B6D2F1 体内受精的胚胎。
单个: F2GFP 卵丘细胞克隆的胚胎。
连续: F2GFP 卵丘细胞连续克隆的胚胎。
每个发育阶段有2-3个重复。

图6



BDF: B6D2F1 体内受精的胚胎。
单个: F2GFP 卵丘细胞克隆的胚胎。
串行: F2GFP 卵丘细胞连续克隆的胚胎。
每个发育阶段有2-3个重复。

图7



BDF: B6D2F1 体内受精的胚胎。
单个: F2GFP 卵丘细胞克隆的胚胎。
串行: F2GFP 卵丘细胞连续克隆的胚胎。
每个发育阶段有2-3个重复。

图8

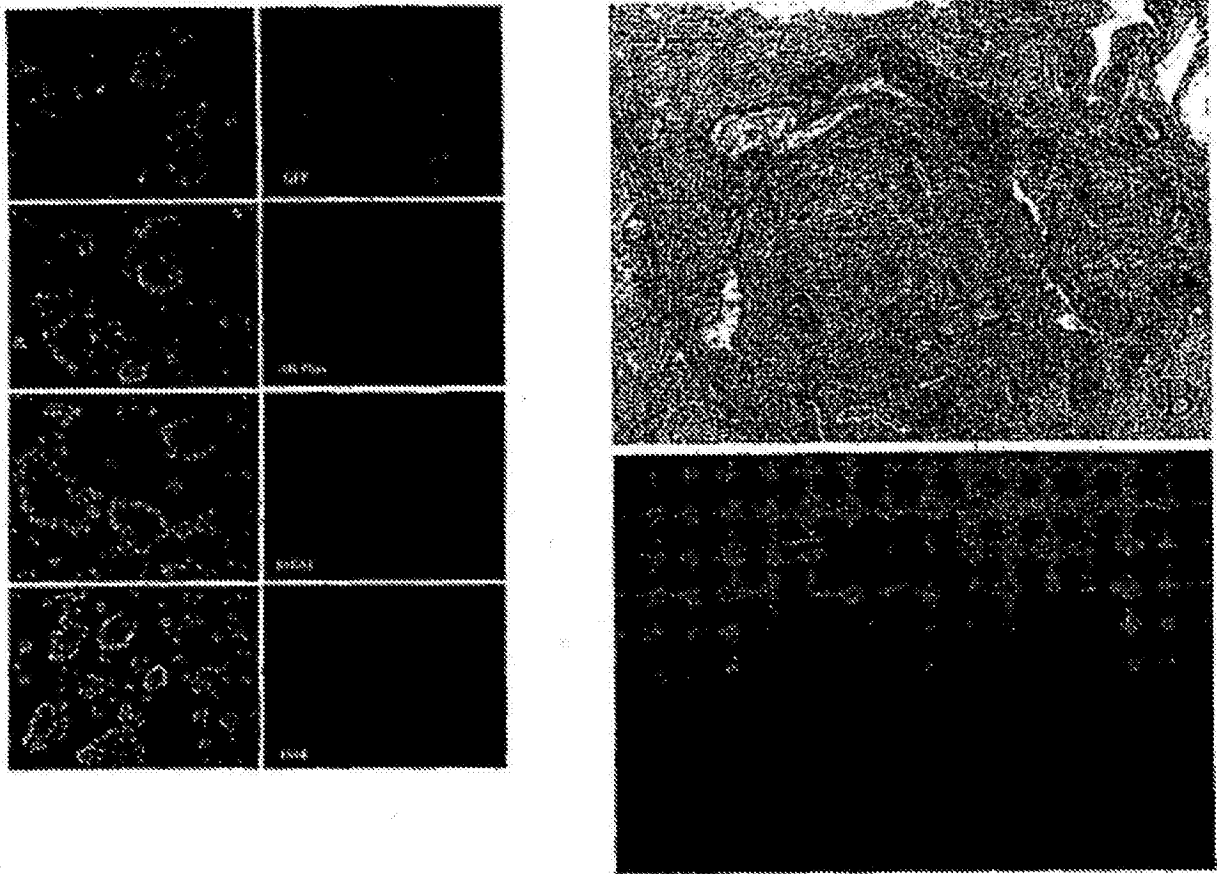


图9A-9C

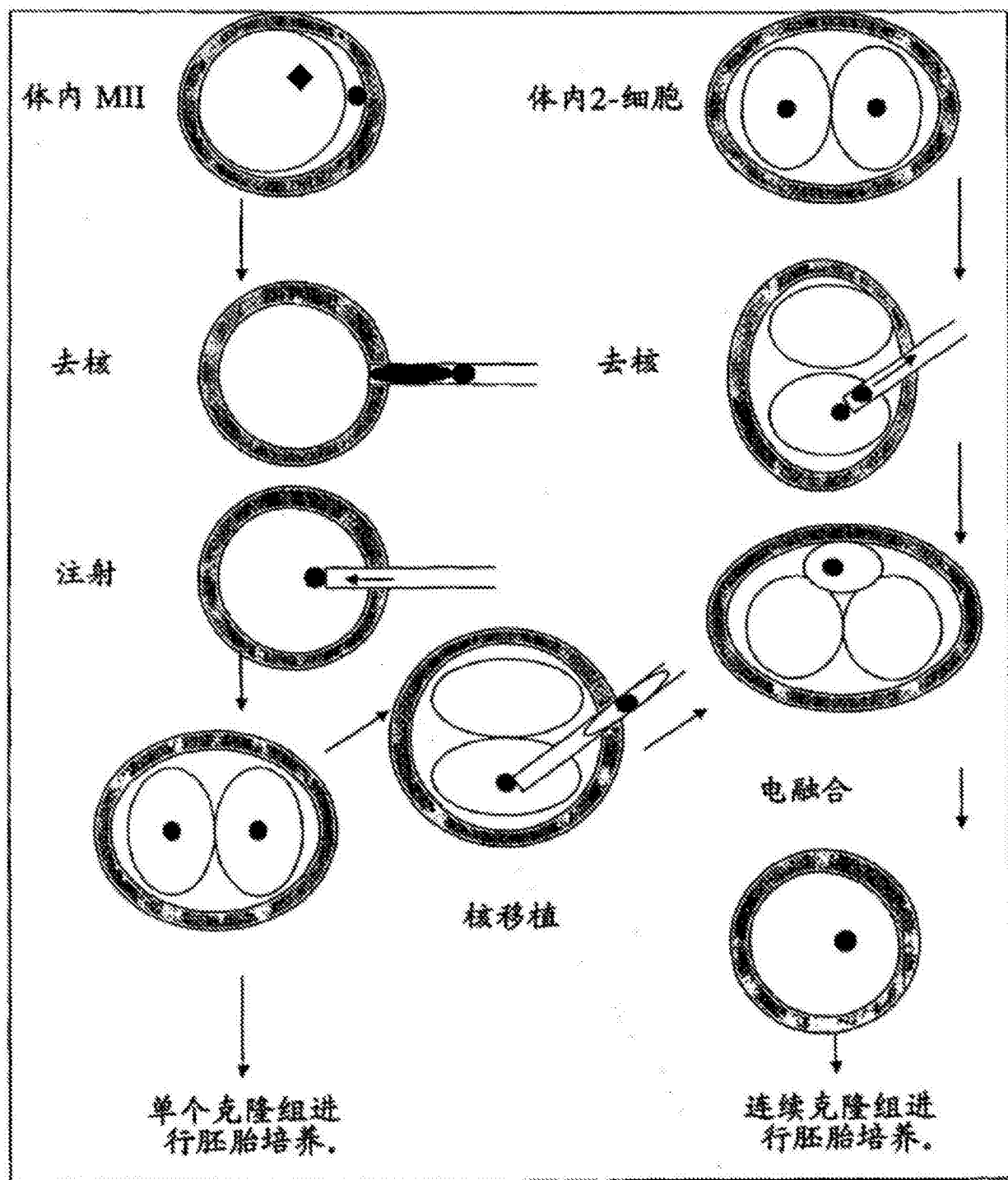


图10

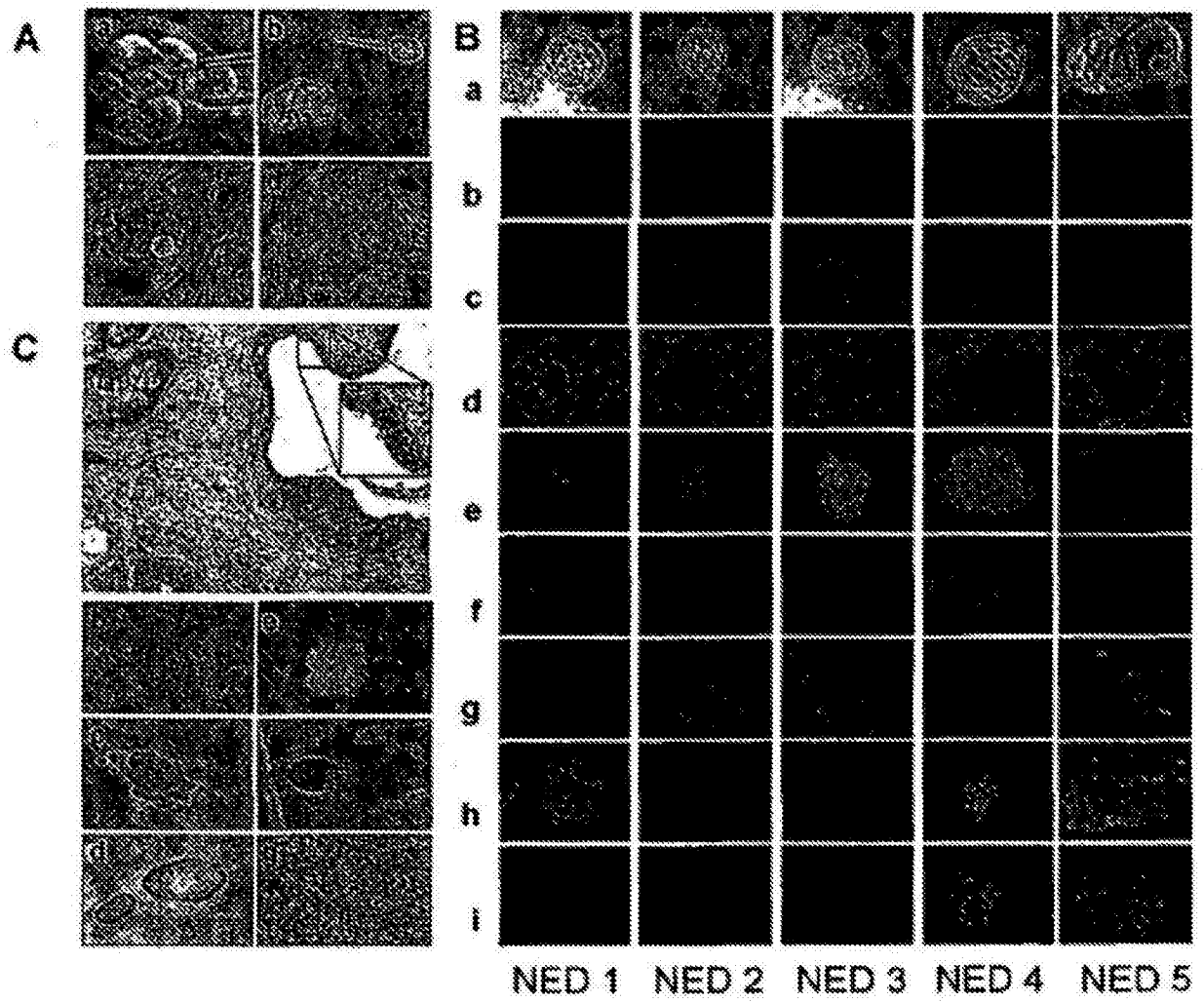


图11A-11C

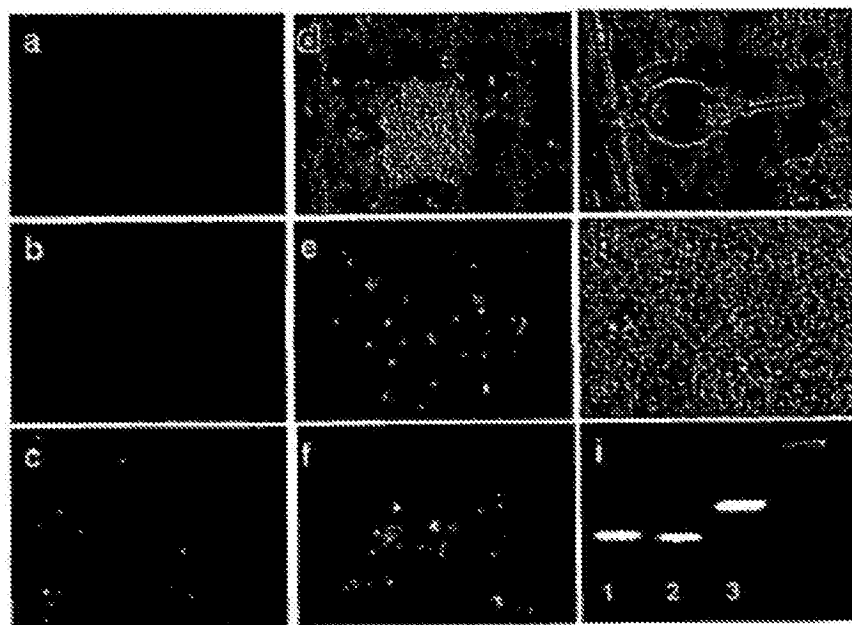


图12A-12I

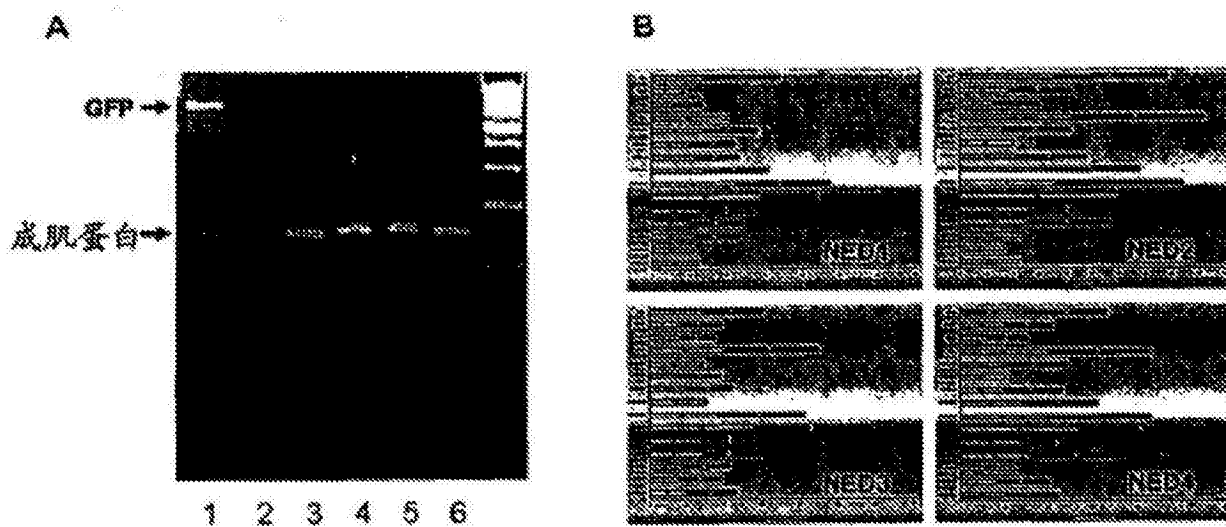


图13A-13B

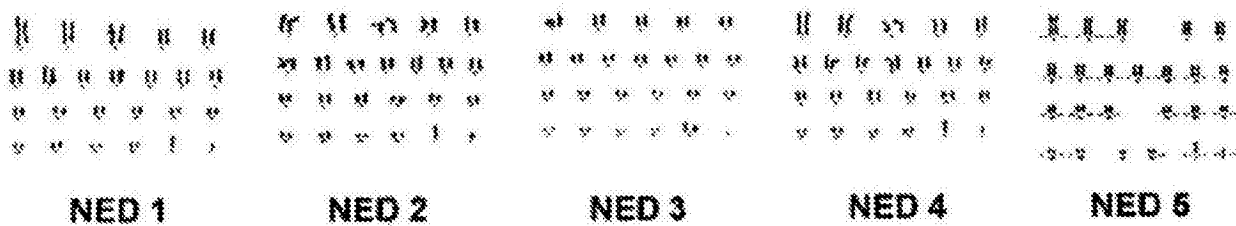


图14

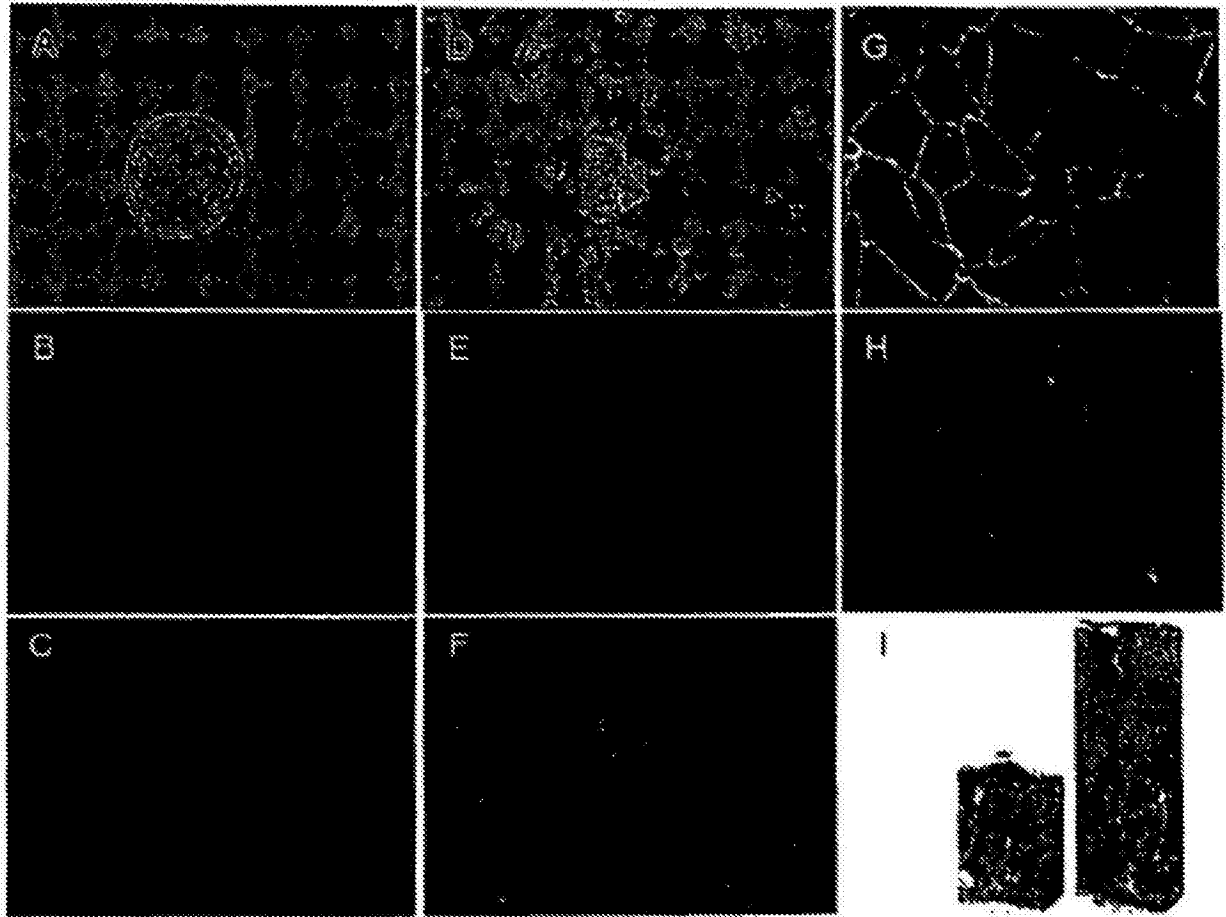


图15A-15I