

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/00

C12N 15/09 C12N 15/63

C12N 5/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813394.8

[43] 公开日 2002 年 10 月 23 日

[11] 公开号 CN 1376196A

[22] 申请日 2000.9.6 [21] 申请号 00813394.8

[30] 优先权

[32] 1999.9.7 [33] US [31] 60/152,354

[32] 1999.9.22 [33] US [31] 60/155,107

[86] 国际申请 PCT/US00/24398 2000.9.6

[87] 国际公布 WO01/18193 英 2001.3.15

[85] 进入国家阶段日期 2002.3.26

[71] 申请人 先进细胞技术公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 R·兰扎

M·维斯特

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 7 页 说明书 24 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 采用核移植技术制备免疫相容细胞和组织的方法

[57] 摘要

本发明涉及制备用于移植和组织工程目的的免疫相容组织和细胞的方法,该方法采用了核移植和克隆技术。本发明还包括如下方法,通过该方法可以确定表达的转基因和其它遗传操作对工程化细胞和组织的免疫相容性产生的影响。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权利要求书

1. 在动物模型中测试克隆化细胞或组织的免疫相容性的方法，包括：
 - a. 从供体动物中获取细胞；
 - b. 将来自所述细胞的细胞核转移至受体卵母细胞或其它适合受体细胞中以产生胚胎；
 - c. 从所述胚胎分离具有至少一个细胞的胚胎、胚盘和/或干细胞；
 - d. 将所述胚胎、胚盘和/或干细胞与对照胚盘和/或干细胞同时注射至所述供体动物体内；和
 - e. 检查注射位置的畸胎瘤形成。
2. 权利要求 1 的方法，其中来自所述供体动物的所述细胞在核移植之前转染了异源基因。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述供体和对照胚盘和/或干细胞被注射至皮下或副腰筋膜中。
4. 权利要求 1 的方法，其中如果形成所述畸胎瘤的话，则将其取出并检测胚层的存在。
5. 权利要求 4 的方法，其中对该胚层，如果形成的话，进行分离以便检测或分离特定细胞类型。
6. 权利要求 1 的方法，其中从所述供体动物中获取的细胞是成纤维细胞。
7. 权利要求 2 的方法，其中所述异源基因是选自绿色荧光蛋白 (GFP)、 β -半乳糖苷酶、和萤光素酶的报告基因。

8. 权利要求 2 的方法，其中所述异源基因编码分泌蛋白。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述蛋白引起免疫应答的产生。

10. 权利要求 8 的方法，其中所述蛋白是治疗性蛋白。

11. 权利要求 5 的方法，其中该胚层细胞还被用于测定试验中以评估控制细胞分化的潜在发育信号。

12. 权利要求 5 的方法，其中采用在该胚层中发现的至少一类细胞来构建组织。

13. 权利要求 12 的方法，其中将所述工程化组织移植回所述供体动物体内以测试免疫相容性。

14. 权利要求 12 的方法，其中所述工程化组织选自平滑肌、骨骼肌、心肌、皮肤、肾和神经组织。

15. 制备用于移植的免疫相容组织的方法，包括：

a. 从目的移植受体中获取供体细胞；

b. 将来自所述细胞的细胞核转移至受体卵母细胞或其它适合受体细胞中以产生胚胎或胎儿；

c. 从该胚胎或胎儿分离移植所需类型的细胞；和

d. 从所述细胞构建组织。

16. 权利要求 15 的方法，在所述步骤(c)和(d)之间还包括以下步骤：

i. 从所述胚胎分离胚盘和/或干细胞；

- ii. 将所述胚盘和/或干细胞注射至无免疫应答动物体内;
- iii. 分离由此产生的畸胎瘤;
- iv. 从该畸胎瘤中分离移植所需类型的细胞; 其中所述畸胎瘤细胞被用于构建所述免疫相容组织。

17. 权利要求 15 的方法, 其中所述组织含有含等基因的细胞核 DNA 和同种异体的线粒体 DNA 的细胞。

18. 权利要求 15 的方法, 其中所述组织含有含等基因的细胞核 DNA 和同种异体与等基因的线粒体 DNA 的混合物的细胞。

19. 权利要求 15 的方法, 其中所述组织选自平滑肌、骨骼肌、心肌、皮肤、肾和神经组织。

20. 给需要移植的患者提供免疫相容性移植物的方法, 包括:
- a. 从所述患者获取供体细胞;
 - b. 将来自所述细胞的细胞核转移至受体卵母细胞或其它适合受体细胞中以产生胚胎;
 - c. 从所述胚胎分离胚盘和/或干细胞;
 - d. 将所述胚盘和/或干细胞注射至无免疫应答动物体内以便形成畸胎瘤;
 - e. 分离由此产生的畸胎瘤;
 - f. 从该畸胎瘤分离移植所需类型的细胞;
 - g. 从所述细胞构建组织; 和
 - h. 将所述工程化组织移植至所述患者体内。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述无免疫应答动物是 skid 鼠或裸鼠。

22. 权利要求 20 的方法，其中从所述预期移植受体获取的供体细胞是成纤维细胞。

23. 权利要求 20 的方法，其中所述工程化组织选自平滑肌、骨骼肌、心肌、皮肤、肾和神经组织。

24. 权利要求 20 的方法，其中所述工程化组织包含具有等基因的核 DNA 和同种异体的线粒体 DNA 的细胞。

25. 通过权利要求 20 的方法构建的组织。

26. 通过权利要求 20 的方法制备的分离的组织。

27. 权利要求 1 的方法，其中所述动物是有蹄动物。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述有蹄动物是牛。

29. 权利要求 15 的方法，其中所述动物是有蹄动物。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述有蹄动物是牛。

31. 权利要求 16 的方法，其中所述动物是有蹄动物。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述有蹄动物是牛。

33. 权利要求 20 的方法，其中所述预期移植受体是人。

34. 权利要求 16 的方法，其中所述患者是人。

35. 权利要求 16 的方法，其中所述供体细胞在核移植前进行遗传改变。

36. 权利要求 35 的方法，其中所述遗传改变包含转染至少一个异源基因。

37. 权利要求 35 的方法，其中所述遗传改变包含破坏至少一个自身基因。

38. 含有至少一个从克隆化细胞产生的畸胎瘤的动物。

39. 权利要求 38 的方法，其中所述动物是有蹄动物。

40. 权利要求 39 的方法，其中所述有蹄动物是牛。

41. 权利要求 38 的方法，其中所述至少一个畸胎瘤位于副腰筋膜内。

42. 权利要求 38 的方法，其中所述畸胎瘤不被该动物免疫系统排斥。

43. 权利要求 42 的方法，其中所述畸胎瘤包含具有等基因的核 DNA 和同种异体的线粒体 DNA 的克隆化细胞。

44. 从权利要求 38 的动物分离的畸胎瘤。

45. 权利要求 44 的畸胎瘤，其中该畸胎瘤含有来自所有三个胚层的细胞。

46. 权利要求 44 的畸胎瘤，其中所述畸胎瘤来源于克隆化的有蹄动物细胞。

47. 权利要求 46 的畸胎瘤，其中所述畸胎瘤来源于克隆化的牛细胞。

48. 权利要求 48 的畸胎瘤，其中所述畸胎瘤包含具有等基因的核 DNA 和同种异体的线粒体 DNA、或同种异体与等基因的线粒体 DNA 的混合物的克隆化细胞。

49. 含有等基因的核 DNA 和同种异体的线粒体 DNA 的稳定移植物。

50. 权利要求 49 的移植物，其中所述移植物的细胞是通过将等基因的体细胞的细胞核移植至同种异体的受体细胞中制备的。

51. 权利要求 49 的移植物，其中所述组织选自肾、心肌和骨骼肌。

52. 采用交叉物种核移植鉴定线粒体组织相容性抗原的方法，包括：

- a. 从供体哺乳动物获取细胞；
- b. 将来自所述供体哺乳动物的细胞核转移至不同于所述核供体的哺乳动物物种的至少两个受体卵母细胞或其它适合受体细胞中以产生胚胎，其中所述至少两个受体细胞就线粒体 DNA 而言是同种异体的；
- c. 从所述胚胎分离具有至少一个细胞的胚胎、胚盘和/或干细胞；
- d. 将所述胚胎、胚盘和/或干细胞独立地注射回所述供体哺乳动物体内以便产生特异的抗体和/或淋巴细胞组；和
- e. 比较响应所述同种异体线粒体背景产生的抗体和/或淋巴细胞组，以便鉴定被所述供体哺乳动物免疫系统识别的线粒体抗原和/或表位。

53. 权利要求 52 的方法，其中所述胚胎、胚盘和/或干细胞被注射至不同的哺乳动物中，这些哺乳动物与该核供体在核 DNA 和线粒体 DNA 方面均是等基因的。

54. 对权利要求 52 的方法中鉴定的线粒体抗原特异的抗体。

55. 对权利要求 52 的方法中鉴定的线粒体抗原特异的淋巴细胞。

说明书

采用核移植技术制备免疫 相容细胞和组织的方法

本申请要求 1999 年 9 月 7 日提交的美国临时专利申请 60/152,354 和 1999 年 9 月 22 日提交的美国临时专利申请 60/155,107 的权益。

发明领域

本发明将克隆、发育生物学和组织工程领域结合起来，创造了用于移植目的的免疫相容组织和细胞。此外，本发明公开了采用核移植技术制备用于移植的治疗性细胞和组织的方法，和验证或评价这些组织的免疫相容性的方法。

发明背景

克隆科学的显著进步是过去十年的特征，在这十年里我们见证了克隆羊即“多利” (Roslin BioMed)、称作“Mira”的三只克隆山羊组 (Genzyme Transgenics)、以及超过一打的克隆牛 (ACT) 的诞生。使得克隆成为可能的技术也已得到发展，以致目前可以采用来自成年分化细胞的细胞核克隆哺乳动物，科学家们现在知道该细胞核在被引入去核卵母细胞后要经历“重新编程”。见美国专利 5,945,577，该专利被完整地并入本文作为参考。

可以采用来自成年分化细胞的细胞核制备胚胎和胚胎干细胞这一事实，对于器官、细胞和组织移植领域有着令人激动的意义。目前有成千上万患者正在等待适合的器官供体，在他们对移植的等待中不仅要面临可获得性问题还要面临不相容性问题。如果可以从取自需要移植的患者的细胞的细胞核制备胚胎干细胞，并诱导其分化成移植所需的细胞类型，那么就可以排除移植排斥问题和免疫抑制性药物造成的危险。

胚胎干细胞已经可以被诱导发育成来自三个不同胚层的细胞。例如, Anderson 等证明, 当将来自牛和猪胚泡的内细胞团(ICM)和胚盘移植到无胸腺小鼠的肾囊下时, 它们可以发育成含有来自外胚层、中胚层和内胚层来源的分化细胞类型的畸胎瘤。 Animal Repro. Sci. 45:231-240 (1996)。而且, 引发细胞分化的发育信号正在开始破译。例如, Gourdie 等阐述了胚胎肌细胞向脉冲传导浦肯野纤维细胞的分化。 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6815-6818 (1998, 6月)。而且, University of Medicine and Dentistry of New Jersey (UMDNJ) 的研究者们最近报道了牛骨髓细胞向神经细胞的转化(Washington Post, 2000年8月15日, 第A6页)。因此, 应当可以从胚胎干细胞或畸胎瘤中分离出分化的细胞, 并诱导它们分化成用于移植的具体细胞类型。

此外, 通过采用组织工程领域中发展的技术, 可以从这些分化细胞设计出能够用于移植的组织和器官。例如, Shinoka 等通过将培养细胞接种在合成的生物可降解(polyglactin/polglycolic acid)管状支架上已设计出活的肺动脉自体移植物。 L. Thorac. Cardiovasc. Surg. 115: 536-546 (1998)。Zund 等证明, 在可再吸收网上接种人成纤维细胞后再接种内皮细胞可以有助于建立人组织如血管或贲门瓣。 Eur. J. Cardiac-Thorac. Surg. 13:160-164 (1998)。Freed 等显示, 在模拟的微重力条件下培养细胞有利于软骨和心脏组织的构建。 In Vitro Cell Dev. Biol. -Animal 33:381-385 (1997年5月)。

然而, 与细胞发育和分化、以及组织工程有关的领域是有缺陷的。例如, Anderson 等建立的畸胎瘤是从天然形成的胚胎建立的。因此, 这些胚胎的基因型对于各个胚胎而言都是独特的。这些细胞并不适合用于移植, 因为它们与任何同种异体组织一样当移植入供体动物后仍将诱导移植排斥。相反地, 大多数自体移植组织工程的研究已经采用来自实际受体动物的细胞来进行。该技术并不能给细胞或器官有缺陷的(即可能由于缺少基因表达或由于突变基因表达引起的)那些患者提供合适的移植器官。而且, 对于器官已几乎停止工作的患者, 从该

患者自身的细胞构建新器官将是不可能的。因此，在应用细胞分化和发育及组织工程的概念治疗移植患者的过程中仍有许多缺陷有待克服。

发明概述

本发明涉及在将工程化细胞和组织应用于移植的过程中仍有待克服的不确定性。本发明公开了将克隆化、免疫相容、发育上已分化的细胞构造成用于移植的组织的方法，和采用这些组织治疗需要移植的患者的方法。尤其是，可以对这些组织进行设计以表达治疗性蛋白质。由于这些用于移植的组织 and 细胞全是从相同来源的供体细胞通过核移植产生的，因此该工程化组织的所有细胞都将表达此目的异源基因。因此本发明方法还为组织定向的基因治疗提供了一种非常宝贵的可供选择的方案。

本发明还提供了确定具体的遗传工程化细胞是否可以作为移植提供免疫相容性器官的方法。例如，本发明公开了在动物模型中评价克隆化细胞的线粒体相容性、尤其是转基因发育上分化细胞的免疫相容性的方法。这些评价将提供有关治疗性组织在移植中的适合性的重要信息，并将为控制这些参数提供依据以便提供免疫相容组织。

发明详述

本发明指向采用克隆技术制备免疫相容组织的方法。通过本公开方法制备的细胞和工程化组织、以及通过移植该工程化组织产生的稳定移植物也包括在本发明内。稳定移植物被定义为当移植入核供体后不引起免疫应答或排斥、或至少在避免移植排斥方面比非克隆化的对照移植组织有了实质性进步的移植物。

由于核移植产生的克隆化细胞与供体细胞或动物并不完全一致，例如它们典型地缺少供体细胞的线粒体 DNA 而获得了受体去核卵母细胞或其它细胞的线粒体 DNA、而且典型地不是在完美地模拟胚胎发生条件的体内环境中产生的，因此就产生了当这些细胞被移植回供体动

物体内后它们是否具有彻底免疫相容性的问题。

例如，已经阐明，小鼠的线粒体肽，如来自 NADH 脱氢酶氨基端的 ND1 肽和由 COI 基因氨基端编码的 MiHA 肽，通过非经典的 MHC I 类分子(如 H2-M3)和 β -2 微球蛋白一起被呈递到细胞表面(Vyas 等, 1992, “H-2M3a 的生物化学专一性...”, *J. Immunol.* 149(11):3605-11; Morse 等, 1996, “COI 线粒体基因编码一个由 H2-M3 呈递的次要组织相容性抗原”, *J. Immunol.* 156(9):3301-7)。而且已经显示, ND1 肽中一个残基的等位基因变异就可使展示出异样等位基因的细胞易受到特异性细胞毒 T 细胞的裂解(Loveland 等, 1990, 60(6):971-80)。尽管在大鼠中负责组织相容性的线粒体肽与小鼠的等位 ND1 肽并不相同, 但在大鼠中也鉴定到类似系统(Davies 等, 1991, “对非典型抗原具有裂解特异性的 T 细胞的产生, I. 一种大鼠线粒体抗体”, *J. Exp. Med.* 173:823-32)。

因此, 鉴于已分别在小鼠和大鼠中鉴定出两个不同的系统, 展示在细胞表面的线粒体肽是能够充当组织相容性抗原的。没有理由认为类似的系统在其它哺乳动物中不存在。因此, 外源线粒体将预期导致通过核移植技术产生的治疗性组织受到排斥。然而, 本发明人在实施本发明方法的过程中惊奇地发现, 当实施本发明的方法时, 核移植产生的具有同种异体(allogeneic)线粒体的细胞在移植入核供体内后不被排斥。

尽管有此事实, 即具有同种异体线粒体的克隆化组织在移植后没有受到排斥, 但在这些细胞为了修饰、补充或支持移植组织的功能而转染了转基因或经历了某些其它的遗传操作后, 移植物的相容性问题变得甚至更为相关。因此, 本发明为在动物模型中测试克隆化细胞或组织的免疫相容性、及按需要增强这些细胞或组织的免疫相容性提供了方法和动物模型。一般地, 这些方法包括:

a. 从供体动物获取细胞;

b. 将来自所述细胞的细胞核转移至受体卵母细胞或其它适合受体细胞中以产生胚胎, 并任选地引入治疗性异源 DNA;

c. 从所述胚胎分离胚盘、内细胞团、和/或干细胞;

d. 将所述胚盘和/或干细胞与对照胚盘和/或干细胞同时注射入所述供体动物中; 和

e. 检查注射位置的畸胎瘤形成、和随后排斥信号。

为了本发明的目的，将畸胎瘤定义为含有由全能细胞产生的中胚层、内胚层或外胚层衍生物的一组分化细胞。对照胚盘、内细胞团、或干细胞是不用来自测试动物的供体细胞（同种异体或异种核 DNA）制备的那些，因此由这些胚盘或细胞产生的畸胎瘤预期将在供体动物中受到排斥，或者可能根本就不发育。采用来自供体动物的细胞核（等基因）和同种异体的受体卵母细胞或其它适合受体细胞制备的畸胎瘤也预期将在用于移植后由于线粒体等位基因作为组织相容性抗原的呈递而受到排斥。因此，这些治疗性组织没有引起移植排斥这一事实实际上是确实令人惊奇的。

一般地，将供体和对照的胚盘、内细胞团、和/或干细胞作肌内注射，引导至肾囊下、皮下或副腰筋膜(paralumbal fascia)中。在畸胎瘤形成的情况下，取出畸胎瘤并检测胚层的存在，为了检测或分离特异细胞类型还可以进一步分离这些胚层。尽管畸胎瘤的形成可以给出免疫相容性的初步指示，但为了进一步测试免疫相容性，尤其是在转染的异源基因由细胞类型特异性启动子驱动表达时，可以制备特异细胞类型并将它们重新导入供体动物中。考虑到具有同种异体线粒体的本发明克隆化组织未受到排斥，该系统对于测试转基因对组织相容性的影响是理想的，籍此可在核移植前采用异源基因转染来自所述供体动物的细胞。

一般地，本发明方法可以采用来自供体动物的任何细胞来进行。适合的细胞包括例如免疫细胞如 B 细胞、T 细胞、树突细胞，皮肤细胞如角质细胞，上皮细胞，软骨细胞，丘细胞，神经细胞，心细胞，食道细胞，原始生殖细胞，各种器官包括肝、胃、肠、肺、肾等的细胞。一般，最适合的细胞可以容易地在组织培养中繁殖，并能够容易地实现转染。优选地，用于转染异源 DNA 并实行核移植的细胞类型是

成纤维细胞。

动物模型可以是任何适于制备畸胎瘤和研究免疫相容性的动物。优选的动物是有蹄动物，更优选牛。或者，该动物可以是非人灵长类动物如狒狒或猕猴(*cynomolgus monkey*)。优选大动物，因为它们可以产生更大的畸胎瘤，由此提供更多用于免疫学评价和移植的细胞。适合的动物包括例如猪、狗、马、水牛和山羊。

本发明还包括例如当供体物种的细胞核被插入另一物种(异种)的受体卵母细胞或其它适合受体细胞时，在交叉物种(*cross-species*)动物模型中测试克隆化畸胎瘤的免疫相容性的方法。然后通过将胚盘、内细胞团、和/或干细胞注射入供体动物中，测试具有受体细胞线粒体的克隆化畸胎瘤的免疫相容性。尤其优选的是涉及紧密相关物种的交叉物种模型，在该模型中受体细胞的线粒体蛋白质预期将联合供体细胞核一起发挥功能。

例如，根据纽约时报(*New York Times*) 1998年11月12日的一则报道(Nicholas Wade, “科学家声称，人类细胞可回复胚胎状态”)，尽管牛的线粒体预期不会与人的细胞核一起工作，但黑猩猩和大猩猩的线粒体将预期在人类细胞中发挥作用。事实上，正如网址 www.globalchange.com 上提及的，科学家们已制备了嵌合“山绵羊(*geep*)”(组合的绵羊和山羊)、和“骆羊驼(*camas*)”(组合的骆驼和羊驼)，这提示紧密相关物种的细胞和细胞器在功能上是相容的(也参见“在嵌合体上传递讯息”，*The Daily Telegraph*, 1998年1月22日，第27页；“山绵羊：使山羊和绵羊杂交”，*Time*, 1984年2月27日，第71页；“遭遇山绵羊：部分山羊-部分绵羊”，*科学*(*Science*), 1984年5月，5:6)。根据Jakovcic等(1975, “不同真核生物线粒体DNA间的序列同源性”，*Biochem.* 14(10):2043-50)，似乎mtDNA序列的进化趋异发生速率类似于单一序列核DNA的进化趋异发生速率。

这些交叉物种模型尤其与异种移植(*xenotransplantation*)研究有关，并将为确定充当组织相容性抗原的线粒体蛋白质提供方便的模

型。如果采用畸胎瘤模型证明受体细胞的线粒体具有功能上，而不是在免疫学上的相容性时，则可能鉴定展示在细胞表面上但在单一物种中可能并不表现出等位变异的线粒体抗原和肽。该模型将有利于重组 DNA 方法学适于采用来自核移植供体的相关线粒体抗原替换受体细胞中的那些抗原，以便进一步增强用于移植治疗的克隆化细胞和组织的免疫相容性。

例如，当克隆化“交叉物种”畸胎瘤也表现出排斥信号时，可以依据本发明采取步骤，例如通过选择表达相容性线粒体抗原的受体细胞、或通过更换此组织相容性线粒体表位，以确保克隆化细胞和组织与细胞核供体相容。事实上，一组研究人员已报道了采用一种果蝇物种的线粒体 DNA 完全替换另一果蝇物种的内源性线粒体 DNA (Niki 等, 1989, 完全替换果蝇的线粒体 DNA, 自然(Nature) 341(6242): 551-2)。因此，应当可以构建对于任何具体核移植供体而言具有期望线粒体表型的受体细胞、或甚至是具有混合线粒体表型(即等基因和同种异体的，或等基因和交叉物种的)的受体细胞。

采用本发明方法—尤其是在交叉物种模型中—可以容易地鉴定出负责线粒体抗原组织相容性的线粒体基因或 DNA 区段。例如，可以将来自指定哺乳动物核供体的等基因细胞核转移至紧密相关物种的不同同种异体线粒体背景中，然后可以采用这些细胞免疫核移植供体，以便分离和鉴定对线粒体表位具有特异性的抗体和淋巴细胞。通过比较在免疫核供体时产生的抗体和淋巴细胞组的特异性，可以确定出在交叉物种模型中导致免疫识别和可能的移植物排斥的线粒体抗原和表位。这些线粒体抗原和表位的确定使得可以替换相应的编码 DNA，以致可以避免交叉物种核移植产生的克隆化组织受到移植排斥。

因此，本发明包括采用交叉物种核移植鉴定线粒体组织相容性抗原的方法，包括：

从供体哺乳动物获取细胞；

将来自所述供体哺乳动物的细胞核转移至不同于所述核供体的哺乳动物物种的至少两个受体卵母细胞或其它适合受体细胞中以产生胚

胎，其中所述至少两个受体细胞在线粒体 DNA 方面是同种异体的；

从所述胚胎分离胚盘和/或干细胞；

将所述胚盘和/或干细胞独立地注射回所述供体哺乳动物体内以便产生特异的抗体和/或淋巴细胞组；和

比较响应所述同种异体线粒体背景产生的抗体和/或淋巴细胞组，以便确定出被所述供体哺乳动物免疫系统识别的线粒体抗原和/或表位。

对该方法中确定出的线粒体抗原具有特异性的抗体和淋巴细胞（辅助 T 细胞及细胞毒 T 细胞和 B 细胞）也包括在本发明中，同样这些线粒体肽、抗原和编码它们的 DNA 或 DNA 片段也包括在本发明中。

重新克隆克隆化哺乳动物并产生对核和线粒体 DNA 均是等基因的克隆化哺乳动物系的能力使得可以同时将含有同种异体线粒体的交叉物种克隆化细胞注射至不同的哺乳动物中，由此方便对不同线粒体背景具有特异性的抗体和淋巴细胞组的回收。基于核移植可以用于使衰老细胞恢复活力这一观察而重新克隆克隆化哺乳动物的方法公开在与本申请同时提交的共同转让的共同待决申请_____中，该申请被完整地并入本文作为参考。当然，也可以通过采用来自单个受体哺乳动物或细胞系的多个卵母细胞或其它适合受体细胞进行来自单个供体的细胞核的移植，以制备具有等基因的线粒体 DNA 的克隆化哺乳动物。因此，本发明还可以按以下方式进行：其中将所述胚盘和/或干细胞注射至与核供体在细胞核和线粒体 DNA 方面均等基因的不同哺乳动物中，以便分离抗体和/或淋巴细胞组。

本发明还包括制备表达异源蛋白质的移植用治疗性克隆化组织的方法。在本发明方法中使用的异源 DNA 可以编码待在移植受体中表达的治疗性蛋白质，也可以是用于监测畸胎瘤中的基因表达的报告基因。该报告基因可以是任何便于监测基因表达的报告基因，但优选选自绿色荧光蛋白 (GFP)、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、它们的变体、抗生素抗性标记、或其它标记。

而且，组织特异性启动子或组织特异性增强子的使用为在期望组

织类型中表达异源 DNA 提供了一种选择手段。或者，可以根据细胞表面标记的表达特性选择细胞。例如可以根据 CD34 的表达选择造血干细胞。

尽管供体细胞也可以在基因组中含有破坏或改变自身基因表达的缺失和插入，但优选采用编码能在预期的移植受体中行使治疗功能的分泌蛋白的异源基因—即替代突变的或不表达的自身基因的异源基因—转染供体细胞。当发现该表达蛋白质引起免疫应答时，则可以采用在动物模型中用于测试免疫相容性的动物来评价该免疫应答并分离抗体或细胞毒 T 细胞克隆。

在用于测试克隆化组织的免疫相容性的动物中制备的畸胎瘤，对于研究控制细胞分化和发育的分子信号也将是有用的。例如，可以将采用推测的发育启动子、增强子、阻遏蛋白或其它基因控制序列设计的报道基因结构在核移植前插入供体细胞核中，然后通过目测或其它手段监测畸胎瘤以观察报道基因在何阶段得以开启表达。

正如上述，可以分离出分化的畸胎瘤细胞然后单独地用于测试特定细胞或组织的免疫相容性。一旦感兴趣的特定细胞类型得到鉴定后，即可以通过本文所述的和本领域已知的方法用其构建组织。本发明公开的动物模型对于测试组织工程中的新基质材料的免疫相容性是尤其有用的。本发明的优选工程化组织选自平滑肌、骨骼肌、心肌、皮肤、肾和神经组织。

因此，本发明还涉及制备用于移植的免疫相容组织的方法，包括：

- a. 从目的移植受体中获取供体细胞；
- b. 将来自所述细胞的细胞核转移至受体卵母细胞或其它适合受体细胞中以产生胚胎；
- c. 从所述胚胎分离胚盘、内细胞团、和/或干细胞；
- d. 将所述胚盘、内细胞团、和/或干细胞注射至无免疫应答 (immune compromised) 动物中；
- e. 分离所获畸胎瘤；
- f. 从畸胎瘤中分离移植所需类型的细胞，并任选地采用生长因子

体外扩增所述细胞；和

g. 从所述细胞或细胞的组合构建组织。

当细胞分化和发育的信号得到鉴定后，由于可以在体外指导具体细胞类型的发育，故不经过前面的畸胎瘤形成也可以制备用于组织工程和移植的期望细胞类型。或者，至少对于非人的哺乳动物，目前可以直接从生长的胚胎或胎儿中获取克隆化组织而不用制备畸胎瘤。然而，如果英国高级科学和伦理委员会近来提出的建议案得以立法（见 Weiss, “英国陪审团敦促允许人类胚胎克隆”，华盛顿邮报 (The Washington Post), 第 A26 页, 2000 年 8 月 17 日），那么至少对于收获在胚胎发生的头两周中产生的细胞类型而言，下一个就可以是人类。

组织工程可以采用例如三维支架或生物可降解聚合物如在可分解缝线的构建中使用的那些聚合物来实现。诸如 Tissue Engineering 公司和 Organogenesis 等公司已在专利和非专利文献中对这些方法进行了详尽报道。组织工程领域的专利和参考文献的例子包括美国专利 5,948,249、5,709,934、5,983,888、5,891,558、5,709,934、5,851,290、5,800,537、5,882,929、5,800,537、5,891,558、5,709,934、5,891,617、5,518,878、5,766,937、5,733,337、5,718,012、5,712,163 和 5,256,418，所有均完整地并入本文作为参考。此外可以参考组织再生研究领域的多产研究者 Robert Langer 和 John Vacanti 的众多专利和参考文献。正如许多这些专利中讨论的，可能期望包括利于血液组织发育的生物制品，即生长因子和其它促进血管发生的化合物。

尤其是，制备的免疫相容组织和细胞在给需要移植的患者提供免疫相容性移植物的方法中是有用的。该方法除了以上步骤外，还包括将所述工程化组织植入患者体内。本发明人所惊奇地发现的事实，即含有等基因的核 DNA 和同种异体的线粒体 DNA 的克隆化细胞不诱导移植排斥，尤其关系到用于替代例如肌萎缩性侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis) (ALS) 或莱伯遗传性视神经病 (LHON) 中线粒体遭

受破坏的天然细胞的移植物。在这些情况下，不诱导免疫反应的具有等基因的核 DNA 和同种异体的线粒体 DNA 的克隆化组织是用于移植的最理想组织，因为该组织不仅提供了最紧密的组织相容性匹配，而且由于替代了含有受损线粒体的组织还实现了线粒体的基因治疗。

例如，Dhaliwal 和同事近来证明，来自 ALS 患者的脑组织有高出 30 倍的“共同突变”发生率，所述“共同突变”是指在患有线粒体和其它紊乱的患者的各种组织中观察到的 4977 碱基对突变缺失（“ALS 脑中线粒体 DNA 缺失突变的水平上升”，*Mol. Neurosci.* 11(113):2507-9）。事实上，在健康老年个体的脑、心脏和肌肉中已经观察到 mtDNA⁴⁹⁷⁷ 的累积，提示这对这些组织中的老化进程有作用（Soong 和 Amheim, 1995, *Methods Neurosci.* 26: 105-28）。因此，具有同种异体的“年青”线粒体 DNA 的克隆化组织由于缺少年龄相关的线粒体突变可能会较患者自身细胞有利。

由于相对缺少 DNA 修复机制和组蛋白，线粒体 DNA 被认为比基因组 DNA 更易发生年龄相关突变（Dhaliwal 等，2000）。然而，也有经母系传递的遗传性线粒体突变，它们会在特殊组织中表现自己，并且将得益于本申请中的克隆和组织工程技术。

例如，莱伯遗传性视神经病（LHON）是一种罕见的视神经紊乱病，它引起该病大多数患者的法定盲。该病是由母系传递的线粒体 DNA 突变造成的，然而，它典型地在生命的后期显现（第一只眼的突然失明典型地发生在 10-50 岁）（Zickermann 等，1998，“致病性人类线粒体突变 ND1/3460 的分析，和其周围的严格保守残基的突变...”，*Biochem.* 37(34):11792-6）。Iowa 大学分子眼科学实验室的研究者已开发了一种检测该突变的改良方法，用于诊断 LHON。

本发明的克隆、组织工程和移植技术对于替换与线粒体突变有关的疾病组织将是尤其有价值的，因为该克隆化组织将典型地具有等基因的细胞核 DNA 和同种异体的线粒体 DNA。因此，例如，用于植入 LHON 患者的工程化神经组织将实现线粒体 DNA 的基因治疗，并同时替换患病的视神经组织。

如上所述，可以通过转染至少一个异源基因、或破坏或替换至少一个自身基因，在核移植前遗传改变所述供体细胞。当移植受体的自身基因组不能表达一种必需蛋白、或表达了突变蛋白以致原来的组织或器官无法正确地发挥功能时，这种基因组修饰将尤其有用。作为替代或此外，如果预先的免疫相容性试验提示，例如由于线粒体 DNA 的同种异体或异种差异，预期会有一些的排斥，则可以在核移植前用表达可阻止或降低免疫排斥的蛋白质的基因转染供体细胞。

本发明方法对于修复和替换在由自身肽的异常表达造成的自身免疫病中受损的组织是尤其有用的。例如，原发性胆汁性肝硬化 (PBC) 是一种慢性自身免疫肝病，其特征在肝内胆管的进行性炎症堵塞，最终导致肝硬变 (Melegh 等, 2000, “在一例儿科胆汁肝硬变中发现的抗丙酮酸脱氢酶和柠檬酸合成酶亚基的自身抗体”, *Gut* 2:753-6)。该疾病的特征在于对自身线粒体蛋白质的耐受性降低，并与高效价的抗线粒体抗体相关，这可以通过本领域已知的技术检测到 (Leung 等, 1991, “重组线粒体抗原设计在原发性胆汁肝硬变的诊断中的应用”, *Hepatol.* 15(3): 367-72)。肝移植已经成为晚期疾病患者的精选治疗方案 (Sebagh 等, 1998, “肝移植后预示原发性胆汁硬变复发的组织学特征”, *移植(Transplantation)* 65(10):1328-33)。

PBC 中的抗线粒体抗体典型地识别丙酮酸脱氢酶复合物 (PDC) 的 E2 亚基上的限制性表位，PDC 是一种细胞核编码蛋白质，正常情况下被运输至线粒体中并与线粒体内膜有松散的联系。尽管 PDC 蛋白在正常情况下避开了免疫系统，但已经显示 PBC 患者在胆上皮细胞的表面上表达 PDC-E2 (Joplin 等, 1992, “二氢硫辛酰胺乙酰转移酶 (E2) 在原发性胆汁肝硬变患者的肝和门淋巴结中的分布: 免疫组织化学研究”, *Hepatology* 14:442-7)。因此，关于 PBC 是如何被引起的一个理论是：细胞核的遗传改变影响了 PDC-E2 向线粒体的运输，即例如指导 E2 到达线粒体外膜的前导序列中的突变 (Bjorkland 和 Totterman, 1994, “原发性胆汁肝硬化是自身免疫病吗?”, *Scand. J. Gastroenterol.* 29 Suppl. 204: 32-9)。

因此，对于 PBC，可以在制备用于移植的肝细胞和组织前纠正核移植所产生细胞中导致自身免疫病的细胞核缺陷，即通过替换突变的前导序列来实现纠正。这样，用于植入 PBC 患者体内的克隆化细胞和组织将不仅提供最相近的免疫相容组织以避免排斥，而且实现了对与自身免疫病相关的核基因本身进行修复的基因治疗。本发明方法对于疾病过程相关核突变已获得鉴定的任何患病组织的移植和基因治疗同样具有价值，例如为了治疗烧伤、血液病、癌症、慢性疼痛、糖尿病、侏儒症、癫痫、心脏病如心肌梗死、血友病、不育症、肾病、肝病、骨关节炎、骨质疏松症、中风、情感障碍、阿尔茨海默氏病、酶缺陷、亨廷顿舞蹈病、低胆固醇血症(hypocholesterolemia)、甲状旁腺功能减退(hypoparathyroidism)、免疫缺陷、Lou Gehrig 氏疾病、黄斑变性、多发性硬化、肌营养不良、帕金森氏症、类风湿性关节炎、和脊髓损伤而进行的移植和基因治疗。

在此方面，有关的是，注意本发明人还发现本发明的克隆程序使得衰老细胞能够年轻化，由此放弃了对有关克隆化组织遗传年限的任何关注。与本申请有共同所有人的美国专利 09/___ 的公开文本报道了本发明人有关采用核移植使原始细胞年轻化的惊奇观察，该文献完整地并入本文作为参考。克隆程序使衰老细胞年轻化的这一发现，对于设计表达一个以上异源基因、或敲除一个以上基因的治疗性组织是尤其有关的，因为可以通过克隆和重新克隆具有同样遗传背景的原始细胞来制备这样的组织。

采用本领域已知技术还可以改变受体细胞的线粒体 DNA(见 Wheeler 等, 1997, 通过插入外源基因修饰小鼠的线粒体基因组, 基因 (Gene) 198(1-2):203-9; Yamaoka 等, 2000, Complete repopulation of mouse mitochondrial DNA-less cells with rat mitochondrial DNA..., 遗传学 (Genetics) 155 (1): 301-7)。这对于制备用于移植的免疫相容性细胞和组织可能是有用的, 尤其是在该克隆化细胞展示出线粒体抗原, 而且当该克隆化细胞被植回核供体后该抗原引起免疫应答的情况下。或者, 如果事前试验显示预期会出现

由于线粒体 DNA 差异导致的移植排斥,尤其是在异种线粒体的情况下,则可以根据线粒体的相容性具体地选择适合的受体细胞。

尽管任何动物都可以得益于通过本公开方法产生的细胞和组织,但优选的移植受体是人。当预期的移植受体是人时,由于是核供体(预期的移植受体)的基因组对细胞的发育重新编程,所以可以在核移植之后,即将来自所述人的成纤维细胞核移植入任何人类受体卵母细胞后,构建畸胎瘤。由人类核供体和受体产生的畸胎瘤可以在无免疫应答动物如重度联合免疫缺陷小鼠(skid mouse)或裸鼠中形成,并可以从该动物中分离出来。

正如上述,可以将产生的畸胎瘤取出并检查胚层的形成,然后可以对这些胚层作进一步分离或使它们分化成不同的细胞类型。然后可以采用这些不同的细胞类型构建用于移植的组织。优选地,所述组织选自平滑肌、骨骼肌、心肌、皮肤、肾和神经组织。通过本公开方法制备的组织 and 细胞也包括在本发明中。

人类的“治疗性克隆”这一概念是指将来自患者一个细胞如成纤维细胞的细胞核转移至去核的受体卵母细胞或其它适合的受体细胞中。在重新编程后,供体体细胞核重新获得了其全能性并能够起始一轮胚胎发育。来源于所产生胚胎的多能干细胞带有患者的细胞核基因组,然后可以诱导它们分化成替代细胞例如用于替换受损心脏组织的心肌细胞、用于糖尿病患者的产胰岛素 β 细胞、用于骨关节炎的软骨细胞、或用于治疗帕金森氏病的多巴胺能神经元。

本发明方法本应消除或至少基本上减轻与移植这些各种组织有关的免疫应答,并由此取消对免疫抑制性药物如环孢菌素、imoran、FK-506、糖皮质激素、和它们的变体的需求,这些药物有引起多种严重并发症的危险,包括癌症、感染、肾衰竭和骨质疏松。然而,至少在某些情况下,至少在开始时使用抗排斥药剂可能仍是明智的。正如以上所讨论的,移植细胞可能与移植受体的细胞在免疫学上并不一致,即使是采用受体的一个细胞的细胞核作为供体。这可能是由线粒体 DNA 差异(尤其是在异种线粒体的情况下)、或抗原差异(可能由转染的

异源 DNA 导致的或由于用于实现核移植的人为环境导致的)造成的。尤其是, 该环境没有一致地模拟胚胎发育过程中的细胞环境。

例如, 我们知道长期培养的细胞可能会由于培养出现抗原性差异(一种称作“抗原漂移”的现象)。因此, 可能仍然期望在移植前, 例如通过采用可溶性 CD40、CD40 配体拮抗剂进行处理、低温培养、使用掩盖供体抗原的抗体、或表达 UV 光(如胰岛), 使细胞或组织具有耐受性。

我们将参考以下讨论和实施例来说明本发明的范围和精神, 但这并不构成对本发明的限制。

实施例 1

本实验设计用于在临床前的大动物模型: 牛(*Bos taurus*)中测试核移植产生细胞的免疫相容性。

从 Thomas Morris 公司(Maryland)购买三头约 8-10 月龄的成年 Holstein 去势牛(重约 500-1000 lbs), 然后运至 Massachusetts 大学的 South Deerfield 牧场(Amherst)。为了获得核移植用的成纤维细胞, 通过耳朵切口从每只动物获取皮肤活检组织。将表达编码增强绿色荧光蛋白(eGFP)的报道基因的质粒转染至这些细胞中, 然后用新霉素筛选转染细胞。采用经 PCR 和/或 FISH 分析的纯化细胞按前文所述(Nature(1998) Biotechnol. 16:642-646, 并入本文作为参考)进行核移植。

然后将从牛胚胎/干细胞产生的、分离出来的具有一个以上细胞的胚胎, 或胚盘/内细胞团或干细胞注射至供体去势牛的副腰筋膜中(每只动物, 采用实验(相同动物的)干细胞注射两个位置、采用实验(相同动物的)胚盘注射两个位置、采用内细胞团注射两个位置、采用对照(不同动物的)干细胞注射四个位置)。两个月后, 测试肌肉的畸胎瘤形成。将所有鉴定到的肿瘤取出进行组织学分析。

该程序是对尾静脉中 IV 施用了 20mg 赛拉嗪/8mg 酒石酸环丁羟吗喃的站立动物进行的。用夹子夹住副腰筋膜区域, 并采用 100ml 2%

利多卡因作为副腰区域施用的局麻麻醉剂进行手术准备处理。作为预防措施应在术后持续三天给予动物抗生素 (Cefilofur Hcl 50mg/cc @ 1cc/100 磅)。可以在手术后立即肌内或在肾囊下一次注射氟尼辛甲基葡胺 (Flunixin Meglumine) @ 1cc/100 磅, 以控制手术部位的疼痛和肿胀。如果在副腰筋膜处没有形成畸胎瘤, 则可以分析其它位置即皮下。

预期与“不同动物的”干细胞不同, “相同动物的”干细胞将依据针对外源线粒体肽产生的细胞毒 T 细胞应答或其它免疫反应在受体 (细胞核供体) 动物中存活, 或至少存活得更好或更长。而且, 预期可以在“相同动物的”畸胎瘤中观察到来自所有三个胚层, 即外胚层、中胚层和内胚层的细胞。

实施例 2

本实施例设计用于在无免疫应答动物模型中测试畸胎瘤的形成。本实施例与如下方法有关, 通过该方法来自需要移植的患者的核移植产生细胞可以在 SCID 小鼠或其它无免疫应答动物体内生长, 以致产生分化细胞用于分离和设计移植用的工程化组织。

转染了 GFP 的 ES 细胞来源于两只成年 Holstein 去势牛 (从每只动物获取两个不同的 ES 细胞系)。ICM 来源于 12 天的胚泡。

细胞的准备和注射程序:

将细胞切成块 (每个不超过约 100 个细胞的切块) 并装入 1ml 的注射器中, 每个注射器不超过 200 μ l, 优选 100 μ l。

机械分离 ICMS 并按 100 - 500 μ l 的量装入 1ml 的注射器中。

将细胞于室温保持在 HECM-Hepes 中。

注射程序采用 22 号的针头。将细胞注射至 SCID 小鼠后腿的骨骼肌中。

小鼠 #	处理	量	观察
1	来自 25 号牛的第 14 天 ICM	6	100
2	来自 22 号牛的第 14 天 ICM	9	在注射器中发现留下 3 个 ICM
3	猴交叉物种 (在牛内的) 4-8 细胞胚胎	90	-
4	ES 22. B	一个平板 (30mm)	-
5	ES 22. B	三个平板	-
6	ES 22. C	一个平板	-
7	ES 22. C	三个平板	-
8	ES 25. E	一个平板	-
9	ES 25. E	三个平板	-
10 左	ES 25. F	一个平板	-
10 右	ES 25. F	三个平板	-

7-8 周 (尽管可以让细胞生长更长时间, 或更早地将它们取出) 后取回注射至 SCID 小鼠骨骼肌内的牛干细胞和 ICM。在接受 ES 细胞注射的两只小鼠中鉴定到一个小的结节状损伤 (第 7 和 9 号小鼠)。

整体检测:

从 7 号小鼠右后腿近坐骨神经处取回一个 2 × 2 mm 大小的奶白色结节。这对应于三个平板的 ES 22. C 的注射。在对应于三个平板的 ES 25. F 注射的 9 号小鼠的肌肉组织中鉴定到一个 1 × 1mm 大小的奶白色结节。

组织学分析:

7 号小鼠: 利用苏木精和伊红 (H&E)、番红-O、以及采用细胞角蛋白 (AE1/AE3) 和 α 平滑肌肌动蛋白抗体的免疫细胞化学法, 分析畸胎瘤

的组织学切片。

H&E: 注射的细胞在骨骼肌组织中形成一圆形组织块。该畸胎瘤由四个不同尺寸的区室和位于中间的细胞碎片组成。我们注意到在每个区室的壁上有组织形成（资料未显示）。在该畸胎瘤组织中观察到上皮（圆形细胞核）和基质细胞（纺锤形细胞核）（资料未显示）。没有软骨、骨或脂肪组织的迹象。

番红-O: 获得阴性染色，说明缺少软骨组织形成。

采用 AE1/AE3 抗体的免疫细胞化学法: 该畸胎瘤切片显示出阳性染色的上皮细胞（资料未显示）。

采用 α 平滑肌肌动蛋白抗体的免疫细胞化学法: 在畸胎瘤中观察到阳性染色的肌肉组织小岛（资料未显示）。取回的该组织显示出上皮、平滑肌和基质组织的成分。在该畸胎瘤中未鉴定到软骨、骨和脂肪组织。

9号小鼠: 对取回的结节的组织学分析说明为一骨骼肌块。显微镜检查显示没有其它组织形成。

实施例 3

为了认清治疗性克隆的全部潜能，在体外重新构建更为复杂的组织和器官将是重要的。尽管克隆可以消除或极大地缓解最为关键性的问题—免疫相容性，但还有一项艰巨的工作，即将这些细胞装配在一起以产生或重新产生功能性结构。

例如，心肌梗死是发生在西方国家就医的患者中的最为常见的诊断之一。尽管注射单个或小群的心肌细胞可以帮助治疗小的局部性梗塞，但对于有更大危险出现瘢痕形成、心脏破裂和其它并发症的、患有更大程度局部缺血损伤的患者，此方法不可能有价值。组织工程提供了将细胞组织成能够用于修复心脏破损部分的三维心肌“补丁”的可能性。对于心肌和其它相对简单的组织如皮肤和血管替代物，这可能涉及到在多块或多片聚合物支架上接种细胞。而构建更为复杂的要害器官例如肾、肝或甚至整个心脏则要求以更大的组合复杂性组装不

同的细胞类型和材料。

为了构建用于动物模型的组织，可以按以上所述制备牛内细胞团/胚盘/干细胞，然后将它们注射至裸鼠或 SCID 小鼠的后腿肌肉中。注射后 7-8 星期，取出产生的畸胎瘤，并分离出不同的细胞类型，通过培养使它们生长。可以从这些克隆化细胞制备许多组织，包括平滑肌和/或骨骼肌、心肌细胞片或“补丁”、弹性软骨、皮肤(包括毛囊的放置)、和肾(包括排泄尿液的小型肾)。然后将这些组织/器官结构移植回用于获取供体细胞活检组织的原来成年动物体内。

以下数据显示，具有等基因的细胞核 DNA 和同种异体的线粒体 DNA 的组织在核移植宿主中形成不引起免疫应答的稳定移植物。这支持了这些克隆化细胞和组织在许多医学应用中的使用，考虑到在不同物种的小鼠中观察到的响应线粒体组织相容性抗原而出现的针对线粒体抗原的细胞毒 T 细胞应答，这是十分令人惊奇的。

细胞培养和接种

从克隆化的和同种异体的(对照)40 天龄胎儿中获取牛肾、心、骨骼肌、软骨和皮肤的细胞，并分别在体外扩增。

肾:

采用锋利的腱切割术剪将肾组织切成小块(1mm³)。采用胶原酶分散酶(1mg/ml) 37℃消化这些肾组织块 30 分钟。回收的细胞采用磷酸缓冲盐洗涤后铺在培养皿中。细胞在含有 DMEM、3.1g/l HEPES、Pen/Strep (5ml/500ml)、146mg/L L-谷氨酰胺和 10% FBS (Sigma, St. Louis, MO) 的培养基中生长。

肌肉:

采用补加了 10% 胎牛血清的 Dulbecco 氏修改的 Eagle 氏培养基 (DMEM; HyClone Laboratories 公司, Logan, Utah), 通过组织外植技术处理心肌和骨骼肌细胞。细胞在含有 5% CO₂ 并维持在 37℃ 的潮湿气室中孵育。对两种肌细胞类型作单独扩增，直到获得期望的细胞数量。细胞经胰蛋白酶消化后，被收集起来，洗涤并计数以用于接种。

聚合物:

采用无纺聚乙醇酸 (polyglycolic acid) 聚合物片 (1×2 cm) 作为细胞递送载体。该聚合物网由直径 15 μ m 的纤维组成, 纤维间距离为 0 - 200 μ m, 孔隙度为 95%。该支架被设计在 8 - 12 周内通过水解作用降解。这些聚合物在氧化乙烯中灭菌并在细胞递送前放置在无菌环境中。

植入

无胸腺小鼠:

为了测定从胎牛组织获得的细胞是否可以在体内形成组织, 在无胸腺小鼠的背部皮下空隙中植入接种在聚合物支架上的心肌细胞、骨骼肌细胞和软骨细胞。在植入后 1 周、1 个月和 3 个月时处死动物用于分析 (n=4)。

去势牛:

每种细胞类型以 50×10^6 个细胞/ cm^3 的浓度单独地接种在聚乙醇酸聚合物 (1×2 cm) 上 (每种细胞类型 n=4)。将细胞-聚合物支架植入与克隆细胞时所用相同的去势牛的肋腹皮下空间。将从对照 (异种细胞核) 胎儿获得的细胞植入该去势牛的对侧肋腹。6 周后取回所有的植入物进行分析。

分析

在无胸腺小鼠中的植入:

将甲醛固定石蜡包埋组织切成 5 微米厚的切片, 并用苏木精和伊红 (H&E) 染色。为了鉴定取回的组织的细胞类型, 采用特异抗体进行免疫细胞化学分析。采用醛暗褐菌素 (fuschin)-爱茜蓝进行组织化学分析、并采用单克隆抗胶原蛋白 II 抗体 (Chemicon, St. Louis, MO) 进行免疫细胞化学研究, 以鉴定工程化软骨结构。单克隆肌节原肌球蛋白抗体 (Sigma, St. Louis, MO) 和肌钙蛋白 I 抗体 (Chemicon, Temecula, CA) 被分别用于检测骨骼肌和心肌纤维。采用亲和素-生物

素检测系统进行免疫标记。切片采用甲基绿进行复染。

在去势牛中的植入:

免疫细胞化学和组织学分析:

将甲醛固定石蜡包埋组织切成 5 微米厚的切片, 并用苏木精和伊红(H&E)染色。为了鉴定取回的组织的细胞类型, 采用特异抗体进行免疫细胞化学分析。采用过碘酸希夫试剂(Sigma, St. Louis, MO)进行组织化学分析, 并采用多克隆抗碱性磷酸酶和抗骨桥蛋白抗体(Chemicon, Temecula, CA)进行免疫细胞化学研究, 以鉴定肾细胞。单克隆肌节原肌球蛋白抗体(Sigma, St. Louis, MO)和肌钙蛋白 I 抗体(Chemicon, Temecula, CA)被分别用于检测骨骼肌和心肌纤维。醛暗褐菌素(fuschin)-爱茜蓝和单克隆抗胶原蛋白 II 抗体(Chemicon, St. Louis, MO)被用于染色软骨组织植入物。抗细胞角蛋白 5/6, AE1/AE3 被用于鉴定角质细胞。支气管纤毛抗体被用于检测呼吸上皮。抗 CD6 抗体被用于鉴定免疫 T 和 B 细胞。采用亲和素-生物素检测系统进行免疫标记。切片采用甲基绿进行复染。

结果

借助聚合物支架将生长至汇合的细胞植入动物体内, 然后取回, 没有并发症。在取回时, 植入物维持其最初大小, 没有任何纤维质生成的迹象。

从去势牛取回的植入物:

组织化学和免疫细胞化学分析:

组织学检测说明在整个植入物中有广泛的血管形成, 并在聚合物纤维周围观察到有多核巨细胞存在。然而, 在整个同种异体的对照支架中存在较高数量的炎症细胞。移出组织(即肾、骨骼、心脏、软骨细胞和角质细胞)的组织形态学分析说明, 对照植入物/结构(非克隆化的)较克隆化组织类型在淋巴细胞浸润方面有统计学显著($p < 0.05$; 斯氏 t 检验)增加(资料未显示)。该数据提示, 对照移植物正在经历早期移植排斥。

工程化肾组织:

通过组织学方法, 在取回的支架中观察到肾小球样结构(资料未显示)。采用过碘酸希夫试剂进行的组织化学分析鉴定到肾小管细胞(资料未显示)。以碱性磷酸酶抗体进行的免疫细胞化学研究证实了近端小管细胞的存在。采用骨桥蛋白抗体进行的研究在该牛组织系统中为阴性。

工程化肌肉组织:

取回的心肌和骨骼肌细胞植入物显示在每种情况下均出现了空间定向的肌肉纤维(资料未显示)。采用原肌球蛋白抗体进行的免疫细胞化学分析在该结构中鉴定出骨骼肌纤维(资料未显示)。抗肌钙蛋白 I 抗体对心肌纤维的染色呈阳性(资料未显示)。

为了证明克隆化组织的 mtDNA 来自受体卵母细胞, 对细胞核供体的 mtDNA 和克隆化胚胎的 mtDNA 进行了测序。序列数据证实这两种 mtDNA 确实不同, 尤其是在 d 环区域, 在该区域中克隆化组织与核供体相比有 4 个不同的对应核苷酸。

实施例 4

以上结果提示, 通过向同种异体背景中进行核移植可以制备用于移植的克隆化组织, 而且可以将从克隆化畸胎瘤或胚胎细胞的培养物分离或构建的分化细胞和组织移植回供体动物体内而不会有显著的排斥迹象。为了进一步证实即使在线粒体不匹配的情况下核移植技术也具有消除与细胞和器官移植有关的免疫应答的潜能, 本发明人将接着在具有不同线粒体背景的两个完全成熟克隆之间进行移植。

对于这些实验, 集合了两组动物以测试相互的皮肤移植: (1) Trans Ova 的 4 头克隆牛(动物 CL53-8、CL53-9、CL53-10 和 CL53-11)和 (2) LSU 的 5 只克隆山羊。为了进行该测试, 在两组动物之间交换相互的皮肤移植物(直径大约 2-3 cm)。自体移植物充当阳性对照, 而来自遗传上无关动物的移植物充当阴性对照。监测这些移植物的免疫排斥迹象, 如果和当它们出现坏死和移植位置得到修补后, 则将它们取出。

如果观察到排斥，那么为了证实结果则进行第二套移植物的移植，此第二套移植物应当以加速方式受到排斥。

所有的克隆牛和所有的克隆羊均带有相同的细胞核基因组。然而，由于 mtDNA 是通过母系遗传进行传递的，我们预测这些动物实际上是具有不同卵母细胞来源的线粒体的遗传嵌合体（这已经在许多克隆动物身上得到了证明）。我们正在进行实验以获得所有参加的动物个体的 mtDNA 序列，这样就可以容易地将在这些动物组中“分离”的多态性与皮肤移植物的存活/排斥联系起来。如果存在相关性，则进行体外测定试验以确定靶肽，并分离编码该肽的相关 mtDNA。

旨在确定线粒体 DNA 多态性的实验还将大体上揭示有关 mtDNA 嵌合水平的信息。例如，一旦已知了这些 mtDNA 的序列，就可以选择具有最大多态性的区域，最可能是 D 环，并对此区段进行扩增和克隆。然后可以对一组克隆进行测序以确定该区中的变异程度。当拥有了足够数量的具有同种异体线粒体的细胞核克隆的 mtDNA 序列后，即可精确估计出嵌合水平。还可以不时地收集血液样品以进行各种免疫学测定。对于组织相容性，可以在这些组中和采用同种异体细胞进行标准的 MLC 和 CML。

讨论

正如以上提供的数据所显示的，本发明证明获得用于组织工程和移植的克隆分化细胞和组织是有可能的。本发明还证明，尽管存在这一事实，即由于外来线粒体肽预期将会出现移植排斥，但采用具有同种异体线粒体的核移植产生的克隆化细胞仍可以得到稳定移植物。鉴于小鼠中的 Mta 系统和在大鼠中鉴定到的类似系统，令人惊奇的是采用本发明方法构建的牛组织当被移植回核供体体内后并未受到排斥。

采用本发明克隆化组织没有观察到移植排斥的原因可能有几个。在不受任何具体理论束缚的情况下，一个假设是啮齿动物中呈递 Mtf、MiHA 和其它线粒体抗原的特定 MHC 分子已经在进化中脱离了高等哺乳

动物。实际上，呈递 Mtf 和 MiHA 肽的小鼠 I 类分子 H-2M3a 是由小鼠 17 号染色体上位于端粒末端 H-2 复合物上的 M3 基因编码的 (Fischer Lindahl 等, “小鼠的母系传递抗原: 一种模式移植抗原”, *Annu. Rev. Immunol.* 1991; 9:351-71)。尽管该染色体此区域中的许多基因在人和小鼠之间是保守的, 但例如, 位于该区域中的 MHC I 类基因似乎已经在两个物种间产生了分歧并已独立进行进化 (Jones 等, 1999, “小鼠的近侧 H2-M 区中 MHC I 类和非 I 类基因的组织”, *Immunogenetics* 49(3):183-95)。事实上, H2-M 区富含 L1 重复, 某些人猜测它与进化的可塑性有关 (Yoshino 等, 1997, “小鼠 17 号染色体上远侧 MHC I 类区的基因组进化”, *Hereditas* 127(1-2):141-8)。

或者, 可能在高等哺乳动物中进化出了其它在 MHC 环境下调节对线粒体抗原的免疫反应的机制, 尤其是鉴于人体中许多老化但仍健康的组织已表现出含有老化相关的线粒体突变 (Soong 和 Ambeim, 1995)。实施例 4 中所述正在进行的实验将尤其有利于鉴定存在于指定 mtDNA 群体中的多态性, 并可以充当一个有用的模式系统用于鉴定随着时间的过去 mtDNA 中发生的可能导致线粒体抗原异常展示和识别的改变。

总之, 尽管在本发明前已有了对啮齿动物线粒体组织相容性的认识 and 了解, 但可以预测, 采用本文所述治疗性克隆化牛组织获得的结果是可以转移至其它有蹄动物和高等哺乳动物的。因此, 本发明证实了核移植产生的克隆化组织在移植中的治疗性用途。而且, 通过提供测试等基因的细胞核背景下同种异体和异种线粒体蛋白质的免疫相容性的模型, 本发明为解码存在于哺乳动物中和之间的、有助于线粒体稳定和物种单独进化的免疫调节系统铺平了道路。

专利名称(译)	采用核移植技术制备免疫相容细胞和组织的方法		
公开(公告)号	CN1376196A	公开(公告)日	2002-10-23
申请号	CN00813394.8	申请日	2000-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	先进细胞技术公司		
申请(专利权)人(译)	先进细胞技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	先进细胞技术公司		
[标]发明人	R兰扎 M维斯特		
发明人	R·兰扎 M·维斯特		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K35/12 A61K35/23 A61K35/30 A61K35/34 A61K35/36 A61K48/00 C07K16/30 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/53 C12N15/00 C12N15/63 C12N5/00		
CPC分类号	A01K67/0271 A61K35/12 C12N2517/04		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	60/155107 1999-09-22 US 60/152354 1999-09-07 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及制备用于移植和组织工程目的的免疫相容组织和细胞的方法,该方法采用了核移植和克隆技术。本发明还包括如下方法,通过该方法可以确定表达的转基因和其它遗传操作对工程化细胞和组织的免疫相容性产生的影响。

小鼠 #	处理	量	观察
1	来自 25 号牛的第 14 天 ICM	6	100
2	来自 22 号牛的第 14 天 ICM	9	在注射器中发现留下 3 个 ICM
3	猴交叉物种 (在牛内的) 4-8 细胞胚胎	90	-
4	ES 22. B	一个平板 (30mm)	-
5	ES 22. B	三个平板	-
6	ES 22. C	一个平板	-
7	ES 22. C	三个平板	-
8	ES 25. E	一个平板	-
9	ES 25. E	三个平板	-
10	ES 25. F	一个平板	-
左			
10	ES 25. F	三个平板	-
右			