

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01804140. X

A61K 39/395

A61K 39/40 G01N 33/53

G01N 33/555 G01N 33/567

C07K 16/00 C12P 21/08

[43] 公开日 2003 年 2 月 12 日

[11] 公开号 CN 1396832A

[22] 申请日 2001.1.25 [21] 申请号 01804140. X

[30] 优先权

[32] 2000.1.25 [33] US [31] 60/178,347

[86] 国际申请 PCT/US01/02342 2001.1.25

[87] 国际公布 WO01/54722 英 2001.8.2

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.25

[71] 申请人 内布拉斯加大学董事委员会

地址 美国内布拉斯加州

[72] 发明人 威廉 E·比斯丘尔内尔

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 孙粹芳

权利要求书 6 页 说明书 27 页 附图 3 页

[54] 发明名称 抵制抗供体免疫的移植前适应器官

[57] 摘要

本发明包括在移植前适应的器官移植物的组成，因而通过使用的抗体能抵制排异。在供体动物体内通过植入亚致死剂量的从对供体致敏的动物衍生出来的适应诱导因子可获得适应性。

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

1. 一种提供具有适应于供体哺乳动物能抵制受体哺乳动物排异反应的组织或器官的方法,包括:

5 至少一次注入供体哺乳动物不少于一种亚致死剂量的适应诱导因子;

 允许延长长时间地暴露所述的适应诱导因子, 然后得到一个或多个所述的适应的组织或器官。

10 2. 按权利要求 1 所述的方法, 其中所说的适应诱导因子是来自于与适应组织或器官的受体同样的物种。

 3. 按权利要求 2 所述的方法, 其中所说的受体是一个人。

15 4. 按权利要求 2 所述的方法, 其中所说的受体是一个人。按权利要求 2 所述的方法, 其中所说的适应诱导因子是来自于一个将要接受移植组织或器官的个人。

20 5. 按权利要求 1 的方法, 其中所说的适应诱导因子是注入处于免疫缺陷状态的所说的供体哺乳动物体内。

 6. 按权利要求 2 所述的方法, 其中所说的适应诱导因子是抗体或表达抗体的细胞。

25 7. 按权利要求 2 所述的方法, 其中所说的适应诱导因子是对供体内皮细胞有作用的抗体, 对猪内皮细胞、浆细胞、B 淋巴细胞、人体 B 淋巴细胞、条件性不死 B 淋巴细胞、抗 alphaGal 的抗体、表达适应诱导因子的细胞、含有表达适应诱导因子的细胞的杂交瘤、能对所说的移植组织或器官有作用的 T 细胞、perforin 或 *Bandeiraea simplicifolia* 凝集素有作用的抗体。

30

8. 按权利要求 2 所述的方法，其中所说的适应诱导因子是抗 alphaGal 的抗体或能产生抗 alphaGal 的抗体的细胞。

5 9. 按权利要求 5 所述的方法，其中所说的免疫缺陷状态是一个胎儿发育的前免疫期，化疗后的状态，放疗后的状态或先天性的免疫缺陷状态。

10 10. 按权利要求 9 所述的方法，其中所说的免疫缺陷状态是一个胎儿发育的前免疫期。

11. 按权利要求 9 所述的方法，其中所说的得到的器官是心脏、肾脏、肝脏、肺、胰腺、心肺联合器官、肠、脾脏或胸腺。

15 12. 按权利要求 1 所述的方法，其中所说的得到的器官是骨骼、皮肤、头发、眼球、神经组织、骨骼肌、平滑肌、心肌、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胰岛、肝细胞、干细胞、祖细胞或造血细胞。

20 13. 按权利要求 1 所述的方法，还包括以下步骤：在所說的器官或组织移植之前，确定所说的组织或器官已经适应。

14. 按权利要求 13 所述的方法，其中所述确定所述组织或器官实现适应的步骤，要发生在获得所述组织或器官之前。

25 15. 按权利要求 13 所述的方法，其中所述的确定所述组织或器官实现适应的步骤是：采用 Langendorff 测试法，在器官中输入受体动物的血浆、血清、或血液，输入血浆、血清、或血液在移植前完成，所用的器官是同一供体的其他器官；也可通过另外一种方法，即检测供体白细胞或内皮细胞暴露于受体血清时的裂解情况，从而得知其适应状态。

30

16. 按权利要求 14 所述的方法，其中所述确定所述组织或器官实现适应的步骤是检测血红素加氧酶基因、A-20 基因、bcl 基因表达增加的情况，检测供体哺乳动物中适应诱导细胞或抗体的情况，或测定供体白细胞或内皮细胞暴露于受体血清时的裂解情况。

5

17. 按权利要求 16 所述的方法，其中所述确定所述组织或器官实现适应的步骤是测定供体白细胞或内皮细胞暴露于受体血清时对裂解的敏感性。

10

18. 供体哺乳动物体内的异种移植器官或组织用适应诱导因子进行处理。

15

19. 按权利要求 18 所述的异种移植器官，是选自于包含心脏、肾脏、肝脏、肺、胰腺、心肺联合器官、肠、脾脏或胸腺的一组。

20

20. 按权利要求 18 所述的异种移植器官，是选自于包含骨骼、皮肤、头发、眼球、神经组织、骨骼肌、平滑肌、心肌、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胰岛、肝细胞、干细胞、祖细胞或造血细胞的一组。

21. 按权利要求 18 所述的异种移植器官或组织，其中所述用诱导因子的处理是在所述供体哺乳动物处于免疫缺陷状态时进行。

25

22. 按权利要求 18 所述的异种移植器官或组织，其中所述的诱导因子是对供体内皮细胞有作用的抗体，对猪内皮细胞、浆细胞、B 淋巴细胞、人体 B 淋巴细胞、条件性不死 B 淋巴细胞、抗 alphaGal 的抗体、表达适应诱导因子的细胞、含有表达适应诱导因子的细胞的杂交瘤、能对所述的移植组织或器官有作用的 T 细胞，perforin，或 *Bandeiraea simplicifolia* 凝集素有作用的抗体。

30

23. 一种发展适应性诱导因子的方法，包括：至少输入一次亚致死剂量的经检验有诱导适应作用的适应诱导因子到一个试验用供体哺乳动物体内；然后检测所述试验用哺乳动物适应诱导的程度。

5

24. 一种提供来自于供体哺乳动物以外的其他物种的已在供体哺乳动物体内适应的组织或细胞的方法，包括：至少输入一次亚致死剂量的至少一种适应诱导因子到供体哺乳动物体内；将来自于所述供体以外的哺乳动物的组织或细胞植入到所述供体体内；允许延长时间暴露于所述适应诱导因子中；然后获取已经适应的所述组织或至少一种所述细胞。

10

25. 按权利要求 24 所述的方法，其中所述适应诱导因子是来自于将要接受所述获取的组织或细胞移植的人。

15

26. 按权利要求 24 所述的方法，其中所述适应诱导因子是输入到处于免疫缺陷状态的供体哺乳动物体内。

27. 按权利要求 24 所述的方法，其中所述适应诱导因子是抗体或能表达抗体的细胞。

20

28. 按权利要求 24 所述的方法，其中所述适应诱导因子是对供体内皮细胞有作用的抗体，是对植入到所述供体内并来自于所述供体以外的哺乳动物的细胞或组织有作用的一个抗体，是能表达对植入到供体的并对来自于所述供体以外的哺乳动物细胞或组织有作用的抗体的细胞，是对猪内皮细胞、浆细胞、B 淋巴细胞、人体 B 淋巴细胞、条件性不死 B 淋巴细胞、抗 alphaGal 的抗体、表达适应诱导因子的细胞、含有表达适应诱导因子的细胞的杂交瘤、能对移植组织或器官有作用的 T 细胞，perforin，或 *Bandeiraea simplicifolia* 凝集素有作用的抗体。

30

29. 按权利要求 24 所述的方法，其中所述的免疫缺陷状态是一个胎儿发育的前免疫期，化疗后的状态，放疗后的状态或先天性的免疫缺陷状态。

5

30. 按权利要求 29 所述的方法，其中所述的免疫缺陷状态是一个胎儿发育的前免疫期免疫缺陷状态。

31. 按权利要求 24 所述的方法，还包括以下步骤：在获取所述的器官或组织之前，确定所述的组织或细胞已经适应。

10

32. 按权利要求 24 所述的方法，其中所述获取的细胞或组织是成骨细胞、骨细胞、皮肤、皮肤上皮细胞、头发囊泡细胞、眼球细胞、神经细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胰岛、血细胞、干细胞、祖细胞或造血细胞。

15

33. 供体哺乳动物体内的来自于供体哺乳动物以外的其他物种的异种移植组织或细胞用适应诱导因子进行处理。

20

33. 按权利要求 33 所述的异种移植组织或细胞，是选自于包含破骨细胞、皮肤、皮肤上皮细胞、头发囊泡细胞、眼球细胞、神经细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胰岛、血细胞、干细胞、祖细胞或造血细胞的一组。

25

34. 按权利要求 33 所述的异种移植器官或组织，其中所述用诱导因子的处理是在所述供体哺乳动物处于免疫缺陷状态时进行。

35. 按权利要求 33 所述的异种移植器官或组织，其中所述的适应诱导因子是对供体内皮细胞有作用的抗体，是对植入到所述供体内并来自于所述供体以外的哺乳动物的细胞或组织有作用的一个抗

30

体，是能表达对植入到供体的并来自于所述供体以外的哺乳动物的细胞或组织有作用的抗体的细胞，是对猪内皮细胞、浆细胞、B 淋巴细胞、人体 B 淋巴细胞、条件性不死 B 淋巴细胞、抗 alphaGal 的抗体、表达适应诱导因子的细胞、含有表达适应诱导因子的细胞的杂交瘤、
5 能与移植组织或器官发生反应的 T 细胞、perforin，或 *Bandeiraea simplicifolia* 凝集素有作用的抗体。

抵制抗供体免疫的移植前适应器官

5 本文中的工作由美国政府的 R43 DK50737 号研究基金提供部分资金，其对本项发明拥有相关权利。

发明背景

I. 发明领域

10 当前的发明领域和器官与组织移植，特别是与异种器官移植有关，该发明可以使移植器官在供者体时能抵制器官受者体内的排异抗体（适应）。这项发明同时还可用于评估供体动物的适应性。

II. 背景技术

15 将器官从某种哺乳动物种类移植到另一种的最大障碍是异种移植的排斥反应。很多排异反应与组织特异性抗原无关，而是由于受体对供体动物过敏所致。例如，人类与古猿都拥有针对猪等其他动物组织上的阿尔法半乳糖寡糖的循环抗体。抗体与移植过来的猪异种移植物结合，再与补体结合，并在一个小时内破坏移植物。这种快速的反应称为超急性排异反应（HAR）。由于预先形成的自身抗体对内皮细胞粘附和补体结合，导致移植物被迅速破坏。人体和古猿中大多数预先形成的抗体（>80%）具有对 Gal（阿尔法）1-3Gal 抗原决定基（alphaGal）的抗性。

25 急性血管性异种移植排斥反应发生在移植后的三到八天。诱导与循环的抗供体抗体粘附在内皮上，导致内皮活化、小血管栓塞以及巨噬细胞和 NK 细胞聚集。急性异种移植排异同时也是由于细胞排异引起。与同种移植细胞排异不同，异种移植排斥反应时 CD4+ 细胞毒淋巴细胞导致移植物破坏。

30 当前预防 HAR 的方法是消除抗体粘附和补体结合。供体排异抗体或补体可以从受体的血液中清除。在狒狒身体中进行的 ABO 异型的心脏同种移植中，通过注入可溶性三糖 A 与 B 抗原中和抗体，可以防止出现超急性排异反应。虽然在寡糖中断后存在循环抗体，但一些

移植物的存活期延长。Cooper D. K.等人, *Transplantation* 56: 769-77 (1993)。现在已经培育出能表达人补体抑制因子或 alphaGal 表达较弱的转基因猪。

5 这些技术在短期基础上是有用, 但并不是完全有效。抗体在消除后很快又出现, 因此必须不停的重复这些步骤。转基因猪在转基因表达程度上各有不同。通过这两种方法, 还是容易出现 HAR 和急性血管性排异反应。利用传统的化疗抑制异种移植排斥反应也仅部分有效。特别是, 抗猪异种移植物的抗体会对药物产生抗性。

10

为实现异种移植物长期且可靠的存活, 需要免疫耐受或移植适应。免疫耐受性涉及调整受体的免疫系统, 使其不对移植物产生反应。免疫适应是指移植物能抵制现有的免疫反应。

15

对猪异种移植物的部分免疫耐受已经可以通过消除受体免疫系统和以猪造血细胞的形式重建免疫系统来实现。猪的造血细胞在一年后
20 可以检测到。这种方法有三个主要限制。首先, 耐受性没有解决由于原来存在的自身抗体引起的问题。可能需要采取另外的措施, 如通过免疫吸附作用消除原来存在的抗体。其次, 受体需要经受一段更长时间的免疫缺陷, 更容易受到条件性病原微生物和动物传染病感染。最后, 耐受性只对造血细胞中的抗原有效。对组织相关抗原的耐受并没有效果。利用这种方法, 猪心和肾异种移植在狒狒体内受到严重的排异反应。

25

将猪胸腺移植到免疫消除的受体重提高了免疫耐受性, 因为受体的前胸腺细胞已经在猪的环境中成熟。利用这种方法, 猪皮肤移植在老鼠身上的存活期明显延长, 在灵长类动物身上也得到适当延长。但上面所述的混合性的遗传嵌合体仍然是个问题。

30

PCT/US94/05844 号专利申请中提出了通过向免疫缺陷供体动物注入淋巴细胞来实现受体淋巴细胞对异种移植的免疫耐受性。随后将耐受细胞收集并输回受体, 从而向受体传输耐受性。然而, 原来存在的免疫反应将限制这种方法的有效性。

35

适应性机理目前还未知。它不是通过消除抗体或利用受体内皮细

胞替换移植物中的供体内皮细胞来实现的。长期心脏异种移植（仓鼠到老鼠）的免疫组织化学显示了 IgG、IgM、C3 和 C6 在内皮上的沉积，但只有最小程度的血纤维蛋白形成。

5 根据发现，适应的内皮细胞仅表达较少的抗原。虽然发现阿尔法半乳糖等抗体原由于适应而有所减少，但还不认为足以能保护移植物。Park W 等人，Am. J. Pathol 152: 829-39（1998）。

10 我们已经知道，适应的移植物可以移植到第二个受体中，并能被受体接受。导致适应的机制存在于移植物内，不需要循环调节细胞或因子。Miyatake 指出如果仓鼠心脏移植排异可以在老鼠受体中得到避免，当移植物再次被移植到与第一个受体相同的第二个受体时，移植物也能抵制排异反应。T. Miyatake、N. Koyamada、W.W. Hancock、M.P. Soares 以及 F. H. Bach。适应的心脏移植物在再次移植到环孢素处理的受体时能存活。Transplantation 65: 1563-1569，（1998）。
15 虽然该研究具有科研价值，却不一定具有临床应用价值。应用该方法需要两个相同的对象，如人体受者，一个受体要一直接受移植器官，直到它产生适应。然后，器官还要被切下并被移植进另一个受体。向同卵双生这样的相同受体的数目有限，加上首位受体伦理上不能被接受，
20 这种方法不具可行性。

 有些报告已经报告了在人工培养的内皮细胞中实现适应性的一些成功事例。Dorling A 等人，Xenotransplantation, 5: 84-92（1998）；Dorling A 等人，Transplantation, 62: 1127-1136（1996）。Dorling 等人指出猪内皮细胞人工培养中过长时间地暴露于正常人体免疫球蛋白将导致内皮细胞适应性的变化。

 这些研究由 Shah 等人在国际异种移植协会第五届大会，摘要 199（1999）中进一步确认。对补体引起的细胞毒性的最低程度抵抗在人工培育 72 个小时后实现。更优的抵抗作用在培育的 120 到 144 个小时实现。而同时，另一些人未能利用原代内皮细胞培育对这些研究进行确认。McKane W. 等人，国际异种移植协会第五届大会，摘要 200（1999）。它们提出其他人所报告的明显的抵制性可能只是使用不死内皮细胞的产物，这些内皮细胞能不断地表达抗凋亡基因。

35

体外培育研究不可能具有这种显著的临床实用性。适应的内皮细胞自身不具有显著的实用性。另外，培育和改变的内皮细胞的适应至少需要 72 小时，最好是 120 个小时的培育。见 Dorling 等人（1996），上文。如果将研究拓展到整个器官的体外培育，在这段期间器官将明显恶化。

在受体中实现适应性非常困难，需要花费巨额资金，并常常以移植排斥反应的失败告终。

因此，现在需要有一种异种移植方法，这种方法能避免巨额成本、复杂性以及异种移植器官在受体中适应所带来的失败风险。

III. 发明概述

本发明的一个目的是在组织或器官移植前提供一个适应的组织或器官。

本发明的第二个目的是提供移植前实现供体移植物适应的方法。

本发明的另一个目的是提供发展供体内改进的适应技术的方法。

本发明的一个实施例提供了一种方法，通过这种方法，在供体哺乳动物中生成适应的组织或器官以抵制在受体哺乳动物中受到的排斥。该方法包括：

至少一次向供体哺乳动物注入亚致死剂量的适应诱导因子，允许上述适应诱导因子作用较长的时间；

获得一个或多个适应的组织与器官。

根据一个较佳的实施例，适应诱导因子被注入处于免疫缺陷状态的供体哺乳动物。根据另一个较佳的实施例，适应诱导因子是对供体内皮细胞作用的抗体，如猪内皮细胞、浆细胞、B 淋巴细胞、人体 B 淋巴细胞、条件性不死 B 淋巴细胞、抵制 alphaGal 的抗体、表达出如抗体等适应诱导因子的细胞、含有表达适应诱导因子的细胞的杂交瘤、对移植组织或器官的细胞作用的 T 细胞、perforin、或 Bandeiraea

simplicifolia 凝集素。根据另一个较佳实施例，这种方法还包括下列步骤：确定在上述器官或组织移植前，组织或器官已经适应。

5 另一个实施例提供了异种移植器官或组织。异种移植器官或组织在经过适应诱导因子处理的供体哺乳动物中存活。按照一个较佳实施例，异种器官包括但不限于心脏、肾、肝、肺、胰腺、心肺肠、脾、或胸腺。异种移植组织包括但不限于骨、皮肤、毛发、眼睛、神经组织、平滑肌、骨骼肌、心肌、肌细胞、郎格罕氏岛、肝细胞、胚胎干细胞、祖细胞或造血细胞。按照另一个较佳实施例，进行适应诱导因子处理时供体哺乳动物处于免疫缺陷状态。根据另一个较佳实施例，
10 适应诱导因子是对供体内皮细胞作用的抗体，如猪内皮细胞、浆细胞、B 淋巴细胞、人体 B 淋巴细胞、条件性不死 B 淋巴细胞、抵制 α Gal 的抗体、表达出如抗体等适应诱导因子的细胞、含有表达适应诱导因子的细胞的杂交瘤、对移植组织或器官的细胞作用的 T 细胞、*perforin*、
15 或 *Bandeiraea simplicifolia* 凝集素。

再另一个实施例，提供了培育适应因子的方法，这种方法包括至少向供体哺乳动物注入一次亚致死剂量的适应诱导因子；将不是供体的哺乳动物的组织或细胞转移到供体；允许上述适应诱导因子作用延长的时间；以及获得适应的组织或细胞。根据一个较佳的实施例，适应诱导因子来自即将接受上述获得的组织或细胞的受体。按照另一个较佳的实施例，适应诱导因子被注入处于免疫缺陷状态的供体哺乳动物。仍是按照另一个较佳的实施例，适应诱导因子是一个对供体内皮细胞作用的抗体，对来自于所述供体以外的哺乳动物的并被植入到上述供体的细胞或组织有作用的一个抗体、是能表达对来自于所述供体以外的哺乳动物的并被植入到所述供体的细胞或组织有作用的抗体的细胞；一个对猪内皮细胞、浆细胞、B 淋巴细胞、人体 B 淋巴细胞、条件性不死 B 淋巴细胞、抗 α Gal 的抗体、表达出如抗体等适应诱导因子的细胞、含有表达适应诱导因子的细胞的杂交瘤、对移植组织或器官的细胞有作用的 T 细胞、*perforin*、或 *Bandeiraea simplicifolia* 凝集素有作用的抗体，仍是根据另一个较佳的实施例，该方法还包括在获得组织或细胞前确定上述组织或器官实现适应的步骤。
20
25
30

35 根据另一个较佳的实施例，异种移植组织或细胞是成骨细胞、*osteoclast* 细胞、皮肤、皮肤上皮细胞、毛发卵泡细胞、眼睛细胞、神经细

胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、郎格罕氏岛、血细胞、干细胞、祖细胞或造血细胞。

IV. 附图说明

5 图 1 显示了淋巴细胞溶解试验中嵌合猪的适应性。72-5、72-1 以及 72-3 是在免疫前胎猪阶段注入骨髓的嵌合猪。对照组是未接受骨髓注入猪的淋巴细胞。该裂解 (lysis) 试验由 Trypan Blue 法进行检测—具体方法见例 3,用作测定致敏羊血清血清浓度。

10 图 2 显示了淋巴细胞检测中嵌合猪 (72-5) 的适应性。作为对照组的是未接受骨髓注入猪的淋巴细胞。该裂解试验由 Trypan Blue 法进行检测—具体方法见例 3,用作测定致敏羊血清血清浓度。致敏羊血清来源于与图 1 羊不同的另外一只羊。

15 图 3 显示了通过人类血液防止嵌合猪心脏出现超急性排斥反应。对照猪和嵌合猪 (72-5) 都注入了致敏人体血液并对心跳进行了监测。

V. 具体实施方式

1. 概述

20 发明提供了生成适合移植的适应器官或组织及适应器官的方法。适应是个对器官进行调节的过程,以防止被致敏受体的排斥。适应包括移植物抗细胞死亡或凋亡、抗凝血前改变以及抗白血球的粘附。根据本发明,通过向供体注入适应诱导因子可以实现适应,允许移植物暴露在适应诱导因子下,并获得在供体已适应能抵制受体排斥反应的移植物。

25 适应诱导因子是能引起异种移植器官或组织在供体内产生适应的任何因子。这种因子可能是除供体外的哺乳动物的部分血浆。另外,适应诱导因子还可能从血浆提取的或来自体内的配基。适应诱导因子最好是免疫系统组成部分,例如 B 淋巴细胞或抗体。

30 适应的器官或组织是可以抵制被致敏受体排斥的器官或组织。致敏受体是带有与供体抗原发应的预先形成的抗体或记忆 T 细胞的肌体,这些抗体或记忆 T 细胞在移植前就已经存在与移植受体中。致敏肌体包括对猪抗体原敏感的人和古猿。致敏受体通常会对供体组织产生超急性和/或急性血管性异种移植免疫反应。这种反应由异种移植前,受体体中预先形成的抗体和 T 细胞造成。器官或组织移植物来自

35

于嵌合动物。

5 根据本发明,嵌合动物是任何带有注入的转基因适应诱导因子的动物,例如,一只注射了其他动物的细胞的小猪是嵌合动物。在一篇推荐的文献中,嵌合动物是在免疫缺陷阶段注射了来自于其他的物种的哺乳动物,例如人,的细胞的猪。注射最好是在供体处于免疫缺陷阶段时进行,例如免疫前状态的胎儿。

10 适应诱导因子包括但不限于与供体组织发生反应的抗体,与供体内皮细胞发生反应的抗体,当供体是猪或猪一类的动物时与猪组织或内皮细胞发生反应的抗体,浆细胞、B 淋巴细胞、人体 B 淋巴细胞、条件性不死 B 淋巴细胞、抗 alphaGal 的抗体、表达适应诱导因子的细胞、含有表达适应诱导因子的细胞的杂交瘤、*Bandeiraea simplicifolia* 凝集素。适应诱导因子可以是天然、独立的因子,也可以是表达某一配体的人造细胞,或纯化的人造配体。

15 适应诱导因子可以来自于异种器官受体的物种,例如,人或另外一种哺乳动物。在一篇推荐的文献中,适应诱导因子来自于一个后来成为受体的个人,确定、分离、操作每一种适应诱导因子的方法对于精通该方面的人来说都是很熟悉的。

20 本发明还提供了不易受预先形成的和产生的免疫因子,尤其是象 alphaGal 抗体这样的抗体,排斥的异种移植器官, alphaGal 抗原在包括猪在内的其他多种物种的内皮细胞和其他组织和细胞上都有表达,移植器官的适应在供体通过将移植器官长时间暴露于适应诱导因子可以实现。抗体适应现象的机理还知道得不是很清楚,不用提任何对该现象机理的解释,据信,是供体内皮细胞和其他细胞暴露于能在受体体内保护移植物免受抗体攻击的适应因子表达因子导致了免疫耐受。

30 本发明还可以提供来自于供体以外的其他物种的移植组织,该移植组织能在受体体内抗预先形成的和正在形成的抗体。例如,人的造血细胞输入到胎猪的体内,然后将它们暴露于亚致死剂量的适应因子,这些因子可以通过将细胞输入到胎猪体内或通过公猪或小母猪/大母猪得到。象粒细胞这样的血细胞有抗粒细胞抗体的人体内不被破坏。

35

5 本发明还提供了—个方法和—个试剂盒，它可以分析和检测潜在供体的适应水平，该方法检测供体动物器官移植前得到的血液和组织。分析包括测定受体适应诱导因子，例如，供体动物的免疫球蛋白、B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞。其他的检测包括体外测定预期的供体的循环细胞和组织对活性抗体和补体或受体细胞毒 T 细胞的裂解反应的抵制、其他可选的检测包括测定供体血液和组织的适应器官特异表达的保护性基因超表达情况，如血红素加氧酶-1，A-20,bc12。Bach,F.H 等，Nature Medicine3(2): 196-204(1997)。

10

本发明还提供了一种用于评价其他关于适应的方法和因子的手段，也可以根据本发明来改进适应的方法。

A. 移植的器官或组织在移植之前先适应

15

本发明是促使移植的器官或组织在供体动物身上在移植之前产生适应。在移植之前就诱导产生是应有很大的好处，移植器官的排异反应的风险会大大降低，抗排异反应出现的并发症和巨额的费用可以大大地减少。如果需要，可以在多种供体动物身上采用多种方法已实现适应，可以选择有最好移植效果指征的动物作为异种移植物的供体。

20

供体动物是哺乳类动物，这些哺乳动物可以是但并不限于所举的例子，例如，非人灵长类，偶蹄动物，食肉动物，啮齿动物或兔类。胎猪是较好的适应因子的受体。

25

30

典型的适应因子是抗体或产生抗体的细胞，但包括抗体诱导因子在内的其他因子，但不局限于：对供体组织有作用的抗体，对供体内皮细胞有作用的抗体，当供体是猪或猪—类的动物时对猪组织或内皮细胞、浆细胞、B 淋巴细胞、人体 B 淋巴细胞、条件性不死 B 淋巴细胞、抗 alphaGal 的抗体、表达适应诱导因子的细胞、含有表达适应诱导因子的细胞的杂交瘤、能对移植组织或器官起作用的 T 细胞，perforin, *Bandeiraea simplicifolia* 凝集素有作用的抗体。适应因子可以是天然、独立的因子，也可以是表达某—配体的人造细胞，或纯化的人造配体。

35

适应诱导因子可以来自于异种器官受体的物种，例如，人或另外

一种哺乳动物。在一篇推荐的文献中，适应诱导因子来自于一个后来成为受体的个人，确定、分离、操作每一种适应诱导因子的方法对于精通该方面的人来说都是很熟悉的。

5 适应的过程需要长期暴露于适应诱导因子，至少需要暴露 16 小时，多时需要 150 天。经过这样一段时间的暴露后，就可以得到移植器官了。

10 在推荐的文献中，胎主在发育的早期注入适应诱导因子，最好是在约 45 天的时候。但是，发育成熟的动物也可以出现适应现象，受体不一定非要处于免疫缺陷状态，但必须似得循环的适应诱导因子在供体体内持续足够长的时间，以使组织和器官产生适应，但是，最好是使用免疫缺陷的动物。

15 获得异体移植器官的第一步是将适应诱导因子注入到供体动物体内，最好是在供体处于发育的免疫前阶段时完成注入，例如，将细胞注入到供体体内，产生亚致死剂量的配体，配体于供体动物的细胞结合，配体诱导产生适应。细胞注入后产生稳定的嵌合现象，如，在异种供体器官中一直存在着受体的免疫系统成分，随后，已经适应的用于移植的器官被摘下来，放入有利于移植到受体动物的移植器官保存液中。

25 举个例子，能产生针对猪内皮细胞的抗体的 B 淋巴细胞被注入到免疫前胎猪的体内，产生的少量抗体与猪的内皮细胞结合，诱导产生对补体依赖的细胞毒性的适应或耐受。从经过处理的供体猪身上取下来的器官，如心脏，被放入移植器官保存液中，例如，Wisconsin 大学溶液，然后植入受体人的体内。尽管在接受移植的人的体内有针对猪的活性抗体，包括抗 alphaGal 抗原的抗体，移植器官还是能抗超急性排异反应。

30 其他的实施例采用一种或多种抗体，如浆细胞、条件性不死 B 淋巴细胞。这些细胞完全是在体外增殖产生的，而在移植前灭活，例如，可以植入热易变转化基因，然后细胞在 33°C 而不是 37°C 增殖，还可以通过其他方法来进一步确保安全，如，在转化基因的周围插入 loxP 位点。转化基因可以通过 Cre 重组酶而去除。Nakamura,J 等，

35

Transplantation, 63 (11) : 1541-1547 (1997)。表达抗体的细胞可以来自于最终的异体器官受体,但不一定非要来自于器官接受者。适应并不取决于受体的免疫耐受的诱导程度,而取决于供体器官内细胞的抗凋亡基因的长期表达。

5

另外还可以使用对受体动物有反应的 T 细胞, Perforin 是细胞毒 T 细胞产生的蛋白质复合物,它介导靶细胞的溶细胞作用,它结构上与攻膜复合体很相似,暴露于 Perforin 可以增加对细胞毒性细胞的抵抗力。

10

该发明另外一个应用包括得到与供体动物不同物种的组织或细胞,例如,得到在注入病人之前就适应的人粒细胞。它们可以抗受体体内预先形成的或正在形成的抗体介导的排异和损伤。人的造血细胞(较佳为 10^7 /只猪,从 10^1 到 10^{10} /只猪)在受精后 45 天注入到免疫前胎猪的体内(从受精后 12 天到出生后 7 天)。如浆细胞、B 淋巴细胞、杂交瘤细胞之类的细胞可以注入胎猪体内,产生适应因子,在以后的日子里,如猪出生后,人体细胞可以收集,经过处理适于输入或移植入人体体内。可以检查猪的细胞以预先知道人细胞的适应状态。例如,可以通过检测抗体或保护细胞免受程序化死亡的基因的表达来测定人细胞对细胞毒性的抵抗力。猪可以用作检测针对人细胞的抗体。

15

20

B. 评价供体动物适应状态的方法

本发明提供了一种在器官移植之前检测供体动物适应状态的方法,该方法可以在移植之前确定适应状态,它还可用于输入适应因子到适应器官后的多种供体动物的比较,以找到最适合的供体。该方法提高了移植的存活率,降低了预先形成的免疫成分引发的异种移植器官的排异风险。

25

30

为了达到更好的效果,该方法需要事先知道适应的状态,还需要保存移植的器官。体外灌注试验是预先了解超级性排异反应和排异耐受的金标准,根据体外灌注试验,一个器官如心脏用 Langendorff 装置注入血清或血液,没有适应的器官在数分钟后失去了功能,适应的器官功能可以延续几个小时,但是,经过灌注试验以后,适应的器官不再适合用于移植。

35

根据本发明，适应性的检测包括非移植器官的体外短时间灌注。另外，也可以通过检查供体动物的血细胞和内皮细胞对补体依赖的细胞毒性的抵抗力来确定适应状态补体依赖的细胞毒性试验将检测细胞与会反应的抗体以及新鲜补体放在一起孵育，一段时间以后再检测细胞的存活率，在同样的对照组细胞中，抗体和补体会杀死绝大部分的细胞，而适应的细胞中大部分会存活。

另外，有一种方法检测输入细胞在供体动物体内持续的时间，有的检测供体动物体内的抗体或能与供体动物组织起反应的细胞。所采用的方法从事此类工作的人是很熟悉的。

C. 供体动物体内增强适应性的方法

本发明提供了一套检测改善和鉴定更多适应性刺激物的系统。该系统组成包括将多种因子及细胞输入动物体内及之后对处理后动物适应性的评估。作为系统的样例，比较了多种猪反应性抗体的来源/片段在诱导适应性方面的潜力。每个实验组中均应包括接受特定细胞成份输注的胎猪。然后供体和/或相应的器官接受适应性的评估。接受适应性检测的标本应该接受某器官——如心脏或肾脏的离体灌流并向非人类的灵长类动物进行异体异位移植。诱导出的心脏功能持续时间最长的细胞成份则被作为是最佳。本发明的其它用途还包括测试供体动物及转基因动物的不同种系。

II. 从供体动物产生经过适应的器官和组织的方法

本发明提供适应于抵抗接受该移植物的个体产生的排斥作用的器官或组织。同时也提供生产该种经过适应性改造的器官的方法。基于该方法，器官在被收获之前，将重复并长期地暴露于结合于供体动物组织上的适应因子之下，但这些结合的适应因子不能引起动物或器官的不可修复的损伤。在长时间的暴露后，经过适应的器官被取出准备移植入供体，如某个人。

更可取的办法是，配体或者需要被重复地输入供体体内或由供体内稳定的细胞生产出来。在重复输注中输入同样的、替代的或更多的配体。供体动物应该具有更可取的减弱的免疫活性状态（免疫缺陷）以更好地接受配体，亦即，对之不产生免疫学上的排斥。

作为配体输注的举例，将人类的免疫球蛋白输入前免疫状态的胎猪。免疫球蛋白在超声波引导下经皮下注射注入单只胎猪。注入亚致死剂量的适应因子。

5 注入的因子量事先凭经验测定。例如，在输入某种血清成份时，至少有另外一只处于同一发育期的幼体接受浓度加大的血清。测定半数致死量，最好以适应性治疗的方法。N ≤ 90 时，任一 N%致死剂量的确定作为适应因子剂量都是有用的。

10 免疫球蛋白包括抗体，包括特异性结合于猪内皮细胞的 IgG 和 IgM。这样的抗体包括存在于人类及古代灵长类动物中的抗-α Gal。（Galili, U., et al., Blood, 82(8): 2485-2493(1993)）。α Gal 在这些动物中并不表达，但在包括猪在内的大多数其它物种中表达。免疫球蛋白可能也包括针对其它异基因抗原的抗体。

15 该领域的熟练技术员熟知如何制备这种抗体或分离富含该种抗体的成份。例如，血清可以通过含有 α Gal 的免疫吸附柱。通过洗脱该柱，吸附的抗 α Gal 抗体就被洗脱下来。活性抗体片段或活性单链供体抗体亦同样可应用。

20 配体的另一个例子是西非单叶豆（*Bandeiraea Simplicifolia*, BSL）凝集素，该凝集素与 α Gal 结合，包括在猪内皮细胞表达的 α Gal。（Grehan, J.F., et al., Transplant. Proc. 32(5):975(2000)）。凝集素以低剂量水平（小于 100 微克/毫升）输注待作移植的猪体内。每天输注一次，3 到 30 天。

30 生产抗体的 B 淋巴细胞和生产与供体组织起反应的抗体的浆细胞在允许稳定输入的情况下输注，提供亚致死剂量的抗体。例如，人 B 淋巴细胞（ $2 \times 10^8/\text{kg}$ ，范围 $\times 10^6/\text{kg}$ 至 $4 \times 10^9/\text{kg}$ ）在超声引导下无菌输注入妊娠 45 天（范围 30-80 天）时的胎猪。估计大约有 1% 的人 B 细胞会产生抗 α Gal 的抗体。由于 B 细胞是被输注入处在前免疫状态的胎猪体内，胎猪将接受这些 B 细胞并对这些细胞产生耐受。

35 适应性诱导因子，一种配体或一种含有免疫细胞的悬液，可以从一个与受体无关的个体获得。因此，细胞可以包括来自无关的人或其

5 它物种的 B 细胞。例如，来自 O 型血人类的 B 细胞可以输入一只 A 或 B 型的狒狒胎儿体内。低的抗 A 或抗 B 水平诱导适应性。然后需移植的器官可在狒狒出生后收获用于移植。被输注的细胞可包括永生细胞如杂交瘤细胞。具体到某一个体，一种适应性诱导细胞，尤其 B 细胞，将含有自杀性基因如胸腺嘧啶激酶或腺嘌呤脱氨基酶。(Cohen, J. L., et al., Hum. Gene Ther. 11(18): 2473-2481(2000))。在移植前，细胞应该以合适的药物进行净化。

10 适应性诱导因子首选来自受体的同类。按照另一种理想条件，适应性诱导因子应该来自最终接受移植的受体。因为适应性是移植器官的特性，将淋巴细胞收养性地转移回受体并非关键。

15 在经过延长时间（最好大于 20 天，范围 16 小时至 150 天）暴露后，供体动物在允许取得适于移植的器官的条件下实行安乐死。例如，如果收获用于移植的器官是猪心，则该带有适应性组织的猪可以用异氟烷镇静并麻醉。在无菌条件下开胸，将冷停搏液（比如含有甘露醇、氯化钾、碳酸氢钠的 Stanford 溶液）灌入猪主动脉，心脏以冰盐水充满。然后心脏被取出并以移植介质如 Eurocollins (EC) 溶液 (Steffen, R., et al., Transpl. Int. 3(3): 133-136(1990)) 或威斯康辛大学溶液 (Belzer, F.O. & Southard, J.H. Transplantation 45(4):673-676(1988)) 灌流。器官保留液含有必需氨基酸、碳水化合物和电解质，以维持器官或组织在移植到受体过程中的活性。

25 可能进行适应性处理的器官，例如但不限于用于器官移植时的移植前处理，包括但不限于心、肾、肝、肺、胰、心-肺、肠、脾或胸腺。用于适应性处理的组织包括但不限于骨骼、皮肤、毛发、退化色素细胞、神经组织、骨骼肌、肌细胞、胰岛、肝细胞、胚胎或成熟干细胞，以及造血细胞。

30 本发明的另一功能涉及与供体哺乳动物不同的另一物种的适应性组织或细胞的生产。这些组织功细胞包括但不限于成骨细胞、破骨细胞、皮肤、皮肤上皮细胞、毛囊细胞、眼、神经细胞、骨骼肌、平滑肌细胞、心肌细胞、胰岛、肝细胞、干细胞、祖细胞或造血细胞。这些细胞将自供体以外物种的动物体内提取。理想的情况是它们来自与最终受体同一种的动物，或甚至来自受体本身。供体动物可以是适于
35

本发明的所有供体动物中的任一种。

5 按照本发明要求，适应性因子可以在用于适应的细胞被摄入前（1小时到 2 天）摄入、与用于适应的细胞同时摄入、或稍晚于用于适应的细胞摄入。在较可取的情况下，用于适应的细胞应该与适应性诱导因子同时摄入，彼此混和，或在对方摄入期间摄入。适应诱导因子系对应于该发明的因子，但还可包括抗体、抗体生产细胞、或者能识别那些来自被提取用于适应的细胞的动物的细胞的 T-细胞。

10 在按照本发明延长暴露时间后，来自与供体不同物种的细胞的适应性状态可以用本发明的任一种方法检测，例如在供体中寻找特定针对被导入用于适应的细胞的抗体。最后，适应过的细胞或组织被收获。

15 导入用于适应的细胞或其后代可用正向或负向方法从供体分离。例如，供体可以取自某一设计含有条件性致死基因——例如胸腺嘧啶激酶基因（HSV-tk）——的物种。带有该基因的细胞对甘昔洛韦敏感（Moolten 及 Walls. *Cancer Res.* 46:5276-5281(1986); Reardon. *J Biol. Chem.* 264:19039-44(1989); 及 Patil et al., *Breast Can. Res. Treat.* 62:109-115)。移植时供体细胞将由于暴露于甘昔洛韦而被杀灭。或者，用于适应的细胞用正向选择转化，在转入供体之前，它们可以被设计成表达某一选择性标志物，比如抗药性，或者某一种表达后位于细胞膜的抗原以便特异性针对该抗原的某种抗体可以钓出表达该种抗原的细胞。该领域的熟练技术人员应该很了解这些操作及类似的方法。

25 例如，人类粒细胞可以在适应之后被生产出来并输注给病人。然后它们可以抗排斥，并且被加入的或受者体内形成的抗体破坏。人类造血细胞（首选每只猪 10^7 细胞，范围每只猪 10^1 - 10^{10} 个细胞）被输入前免疫状态的妊娠 45 天的胎猪（范围妊娠 12 天至出生后 7 天）。适应诱导因子如浆细胞、B 淋巴细胞或杂交瘤细胞可注入产生适应因子的胎猪中。此后，例如在该猪出生后，人类细胞可被收获并制备成适于输注或移植至受体的形式。细胞或猪可用能预测人细胞之间适应性的试验检测。例如人类细胞可以以抵抗抗体细胞毒或表达那些保护细胞免于发生程序性死亡的基因来检测。猪则可用是否存在在与人体细胞起反应的抗体来检测。

35

猪是一种理想的用于适应的供体物种，该发明还完全可用于多种动物中的任一种。可能可用于作为替代物——例如供体——的动物，包括，但不限于列出的这些。已知某些动物在用于特定的用途上时有优势。

5

较可取的供体是哺乳动物。在哺乳纲的 39 个主要的目中，其中 5 个目的动物看来尤其适合作为人类器官受者的替代动物：灵长目、偶蹄目、食肉目、啮齿目及兔形目。

10

除人类以外的灵长类动物，从器官功能而言是合适的选择。蛋白质的氨基酸序列表明了典型的与人类 90-98%的同源性。将肝或心脏等器官移入人体后功能良好。灵长类与人类相当和谐一致，例如，人类受体对来自灵长类的组织不会典型地产生执行抗体。

15

有些低等的灵长类动物如狐猴，妊娠期较短（132-134 天），而高等灵长类动物（黑猩猩、大猩猩）则有与人类（267 天）相近的妊娠期。

20

偶蹄目动物，平蹄有蹄类动物，包括几种家畜如猪、绵羊、山羊及牛。来自它们中的几种的器官或蛋白已经证明在人体中有功能和有用，或者已经被打算用于移植。比如，猪或牛胰岛素、猪皮、绵羊的心脏，等等，已经被用于或建议用于治疗用途。

25

该目中的妊娠期变化较大。猪的妊娠期为 114 天，绵羊 145 天，牛则有 282 天。牛显示出在替代品耐受发生上有用的特征。所有同胎出生者的胎盘血是共用的，因此将人细胞输注入某头牛可导致对所有同胎出生者耐受。

30

食肉动物，包括狗、猫等，有一些在替代物耐受发生方面可能有优势的特征。很多有较短的妊娠期（猫约 65 天，狗约 63 天）并且新生动物相对容易生长。犬科和猫科动物的免疫系统与人类免疫系统十分相似。猫的免疫缺陷病毒模型是目前少数几个艾滋病研究的动物模型之一。

35

猫和狗经常被用作移植用的大型动物的模型，包括骨髓、肺、肠

及骨移植。(Ladiges et al., *Lab. Anim. Sci.*, 40:11-15(1990)及 Henry, et al., *Am. J. Vet. Res.*, 46:1714-20(1985))。

5 啮齿动物，包括大鼠、小鼠等，因为其妊娠期短及较快生长到成熟而在替代品耐受发生方面有潜在的用途。例如，大鼠的孕期只有 21 天，只用 6 周就生长成熟。因为啮齿类动物在免疫系统在初生时还很不成熟，耐受性可以在出生后 24 小时内注射细胞诱导而不用进行子宫内注射。

10 兔形目动物，包括猎兔和野兔等，曾经被认为是啮齿目的一部分，最近才被分离开来。它们与啮齿类同样有较短的妊娠期和生长期。因此它们同样可能用于发展成新的供体系，包括能较好提供功能性器官及组织的转基因种系。它们较大的体形使它们比啮齿类动物成为更好的替代品候选者。

15 理想的替代品物种应该最好在种系发育上接近于计划的器官移植受体。同样，移植物的生理也应该与器官移植受者的被替代器官或组织的生理相似。

20 另外的考虑影响对用于替代品耐受发生的物种的选择。被移植的移植物应该与对应的器官移植受者体内的部分在大小上接近相同。

那么，基于如上述的另外考虑，猪比灵长类更适合作为替代者，因为猪的妊娠期仅为 114 天，并且通常在 4 个月时长到 59 公斤重。

25 前免疫状态的动物提供了 B 细胞或浆细胞输注的理想环境。最早可进行适应诱导物质输注的胎儿应该是处在循环系统及心脏搏动形成的第一期。在不同的物种胎儿发育进程不同。不过，这一期已知在术语上称为 Carnegie10 期 (4-12 体节)。人类胎儿在这一期长 2.5-3mm。
30 (William J. Larsen, *ESSENTIALS OF HUMAN EMBRYOLOGY*, Churchill Livingstone, P. Xi (1998))

当供体还是一胎儿时，母体的因子也对适应性有所贡献。很多因子从母体的循环系统转移到胎儿的循环系统。例如，所有四种 IgG 的
35 亚型都通过胎盘膜转移 (Goulam et al., eds, *IMMUNOLOGICAL*

OBSTETRICS p 295, WW Norton & Co.(1992)）。胎盘转移始于第一期的中点（在猪为 17 天）并在第二期中（在猪约 76 天）以低水平持续。在体外实验中，低水平的 IgG 显出对猪内皮细胞适应（Dorlling et al., (1998), supra.）。因此，在母体中的 IgG 或其它因子，无论是经输注进入的或由母体产生的，可经胎盘转移入胎儿，引起在胎儿中的适应。

一种适应诱导因子，如 B 细胞或浆细胞获得稳定移植并产生抗供体抗体还有另一种途径。例如，B 细胞可以被输入免疫缺陷的动物，该免疫缺陷可由化疗、射线或由于先天性缺陷如重度综合性免疫缺陷引起。该哺乳动物可以接受骨髓移植或干细胞移植，与用于人体骨髓移植的方法相似（Amitage, J.O. Blood 73(7):1749-1758(1989)）。有先天性免疫缺陷如重度综合性免疫缺陷的动物可被输注外来细胞，如人造血细胞（McCune, J.M., et al., Immunol. Rev. 124:45-62(1991)）。

稳定移植也可以通过将不被供体作为抗原识别的细胞输入供体而得到。例如，猪 B 细胞可以被一个生产与猪内皮细胞反应的抗体的基因转染。这些细胞可以被输入作为供体的猪体内。

在某种特定环境下，因子可以用一种熟练技术员了解的方法介入，例如，经口、经静脉、经肌内、经动脉、经髓内、鞘内、经心室内、透皮、皮下、经腹腔、经舌下或经直肠。比较可取的适于诱导因子介入的方式是输注。

因子以药理学上可接受的方式运送。它们可能是液体形式的，最好是生理上兼容的缓冲液，如 Hank's 液，Ringer's 液或缓冲生理盐水。另外，粉剂、凝胶剂、乳剂也可被摄入。形式取决于运送的方式，这一点在该方面熟练的技术员均很了解。对于摄入途径和形式的讨论见 REMINGTON'S PHARMARCEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, PA)。

III. 移植前移植器官适应性的评估方法

在上述过程完成后，需要通过分析供体猪或来自供体猪的组织，以测定是否已获得适应性及对适应性进行定量，从而获得最佳的可用物。通常情况下该检测应该是相当快速并经济的。这对移植物的存活

性将有预见性。它不应该影响将作移植用的器官。

5 对供体动物的分析以获得适应性的预见性证据应当达到三个基本目的。首先，分析提供质量保证并确认适应性。如果在被检测的供体动物未达到适应性，移植将推迟或换用另一只动物。其次，适应性检测可以确认移植物是否特异地对特定的病人适应。第三，分析可允许在多个可能的供体动物之间进行比较并选择最合适的供体进行移植。

10 对适应性的分析可使用四种基本方法中的任一种完成：排异的体外试验；检测组织中负责针对排异反应起保护作用的基因；在器官收获之前检测输注入供体动物的细胞或免疫球蛋白及检测对供体动物发生反应的试验动物中的抗体。

15 在第一种方法中，将来自供体动物的组织在体外进行评估。来自受体或致敏的与受体类似的动物的血浆或血清，输注并通过来自试验动物的组织。如果适应性未达到，组织将在灌流后很快停止发挥功能。如例，在 Langerdorff 评估中，心脏移植物以含细胞毒性抗体的血浆、血清或血液灌流时在 20 分钟内停止了跳动。而如果适应性已达到，则移植物将跳动 2-4 小时。因此获取用于移植的心脏移植物可用致敏血浆灌流。如果心脏在 45-60 分钟后仍然跳动有力，则适应性就得到了证实。然后心脏移植物就可以用停搏液停跳然后以移植介质进行灌注直到移植完成。见例 2 和例 4。

25 在另一个可能更可取的实例中，另一个来自供体动物的器官得到了测试。例如，如果一个移植的器官是肾，心脏或对侧肾就可以用 Langendorff 评估来测试其功能。对比一个已经过适应性诱导步骤并被认定为有活力的同等器官的典型时长，如果被检测的器官在超过 50% 时间长度以后，最好超过 100% 的时间长度之后还能被认定为持续有活力，则认为适应性已达到。

30 在另一排异的体外检测方法中，来自嵌合体哺乳动物供体的外周血或内皮细胞以含有特异性与供体组织和补体结合的抗体的血清进行孵育。测定补体介导的供体细胞的裂解。如果适应性已达到，则相对于相似但未经处理的动物，细胞裂解将显著降低。见例 3

35

活力还可以通过其它染料来检测。死亡细胞将蓄积碘化丙啶从而可以用流式细胞仪检测。细胞可用放射性元素铬-51 标记。一旦细胞被杀死,则放射性被释出。移去细胞和膜后,测定游离放射性(Shimizu, Y., et al., *J. Immunol. Methods* 164:69-77(1997))。见例 5。

5

第二个用于分析适应性的基本检测方式用于检测来自经处理动物的组织中针对超急性排异反应的保护性基因的表达。这些基因产物使细胞能抵抗凋亡引起的细胞死亡并阻止前炎性基因包括细胞因子、前凝血质和粘附分子的表达。这些基因的例子包括血氧合酶、A-20 和 Bcl-2。它们已经在移植到致敏受体中后经过较长时间并变得适应的移植物中观察到。

10

按照本发明,在一个实施例中,在检测的供体动物中使用了活检,例如一只按如上述进行处理以诱导适应性用于施行抗猪抗体的猪。活检可以从被移植的器官上进行,例如心脏左心室的针刺活检。作为替代,也可以取自另一器官或组织。如果被移植的器官是心脏,可以进行肾、皮肤或血液样本的活检。对这些组织使用基于标准抗体的试验如免疫组化、Western blot、ELISA、及以 Northern blot 和 PCR 测定 RNA 的方法检测上述基因的存在。结果与阳性及阴性对照比较。针对 Bcl-2 的单克隆抗体可从转导实验室(Transduction Laboratories, Lexington, KY)得到,针对血氧合酶的则可从 StressGen(Victoria, BC, Canada)得到。针对 A-20 的单克隆抗体由 Dr. V. Dixit(Ann Arbor, MI)制备。按照该领域熟知的方法,可以在 DNA 合成仪上制作一个探针,制作并买到或合成引物。因为还没有人当器官还在供体身上时使其完成适应,因此没有理由在移植之前就检测过供体器官的基因的增强表达;也没有理由测试来自供体动物的移植物以外的组织以获得适应性的证据。

15

20

25

对适应性进行检测和定量的第三种方法是评估已输注过细胞或经一种适应诱导因子免疫球蛋白处理过的动物体内的嵌合体的证据。这些指标可以较容易地测定并能提供适应性的间接证据。如果供体动物排斥输注入的细胞而且不能检测到免疫球蛋白,器官或组织的适应就不太可能达到。同样,它们的存在对适应性有预见性。

30

35

从改良供体动物,如在胎儿期接受 B 细胞输入的一头猪,取得的

抗凝血的血液或血清的样品。对外周血液淋巴细胞进行嵌合体淋巴细胞的染色，并采用分析流式细胞仪计数细胞数。举例来说，如采用人 B 淋巴细胞输给猪，则采自改良猪的淋巴细胞就可以用带有特异性抗 CD20 的人 B 淋巴细胞染色。CD20 对提供相容性因子的种系是特异的。嵌合体的数量可以通过适当的阳性和阴性的对照进行比较。淋巴细胞是对仅存在于融合细胞内的 DNA 的替代分析。通过多聚酶链反应或限制长度片段多态性检测 DNA。

一个改变的实施例，融合至供体动物的细胞采用易于检测的标志物标记。例如：融合细胞可以含有绿色荧光蛋白（GFP）的转基因。通过荧光显微镜或流式细胞仪直接检查采自改良供者动物的血液。

在另一实施例中，检测血清的融合细胞产生的免疫球蛋白。人体免疫球蛋白，如可以通过酶链免疫吸附试验定量。参见例 6。

分析改良供体动物相容性的第四种途径，是通过检测对于供体组织或产生能够特异结合至供体组织的细胞的特异性抗体。自预先采用相容性诱导因子，如用与猪内皮细胞反应的人 B 细胞融合的供体动物猪采得血清或抗凝血。将血清与猪的内皮细胞共同孵育。

洗涤细胞并用辣根过氧化酶交联的抗人免疫球蛋白 G 和免疫球蛋白 M 标记，随后采用适当的基质。存在低水平的抗猪抗体即为阳性结果。用适当的阳性和阴性对照比较数值。将从改良供体动物得到的淋巴细胞维持在培养液内作为替代。孵育上清液用于检测抗供体抗体的产生。作为替代，自改良的供体动物的一种或多种组织分离免疫球蛋白。例如：假如移植器官是一个心脏，则从改良动物摘除肾脏并用一种酸性缓冲液灌洗（pH2 至 pH4），如甘油缓冲液。收集洗脱液内的抗体用于分析抗供体抗体。

IV. 相容性处理改进的方法

本发明提供了一实验系统测试对于供体器官相容性的改进，并且，特别是检查相容性因子。本发明特别允许相容性的量化。作为该系统的一个实施例，多种来源的抗猪抗体试验用于发展最适的猪皮异种皮移植的相容性。潜在的抗体来源包括自未致敏人体分离的 B 细胞，自致敏人体分离的 B 细胞，自绵羊分离的 B 细胞，一种已知产生抗

alphaGal 的抗体，含有 *Bandeirraea simplicifolia* 的脂质体等等。采用逐步增加剂量的抗体或用超声导向的细胞表达抗体输给预先免疫的一批胎儿猪，直至毒性促使胎猪流产。

- 5 采用试验来源的亚致死剂量，如用试验来源 50% 的致死量输给胎猪。在猪出生或母猪剖腹产后，采用上面叙述的任一来源分析试验猪的相容性。在不同年龄，自适当的猪采集心脏移植物，并按 Langendorff 分析用致敏血浆或血液如人血液灌注的移植物检查。最适抗体或抗体产生细胞是在 Langendorff 分析中提供最长延迟功能，并且
- 10 在出生后提供持续相容性的那些。试验的相容性诱导物质的微小群体将被进一步用异源移植至致敏受体，如狒狒，进行试验。

该系统同样可以被用于检查动物来源的相容性，包括不同株的猪、转基因猪，或其它哺乳动物。

- 15 一般描述的本发明，通过以下的例子将更容易被理解，这些例子是由实施例提供的，且不打算限制本发明。

实施例

- 20 **实施例 1. 采用嵌合体猪在致敏绵羊预防 HAR**

方法。通过输入一种从绵羊（一只受体绵羊或一只无关绵羊）获得的淋巴细胞混悬液至预先免疫的妊娠 45 天的胎儿猪内，在三头供体猪内诱导嵌合体。该混悬液包括规划产生与猪细胞反应的 B 细胞。而后，从供体采集猪心，并且进行异型猪心移植。

- 25 结果。结果见于表 1。嵌合体移植物排斥反应在致敏受体发生于 3+，9+ 和 25 天，与此相比，非嵌合体对照血管排斥反应发生在 0.5~2 天。移植物的延长存活不是由于耐受性。

- 30 的确，第二次致敏的绵羊证明对猪的细胞毒性抗体的滴度至移植后 7 天高出 1~2000，且延续至恰当的发功能时期。第三个实验性移植物是与用于嵌合体绵羊无关的绵羊。在移植前，采用猪淋巴细胞有意的免疫三次。

- 35 结论。嵌合体似乎在致敏绵羊产生抗高度一急性排斥反应的保护

作用。第三个受体提示相容性不是一个别绵羊的一种功能。

5 观察到的移植物存活的延长明显不像是由于耐受性的诱导。确实，受体之一证明一典型的继发性致敏。继发性致敏是涉及到随后重复接触抗原的免疫反应。它是典型的且更迅速，高滴度且涉及记忆细胞和免疫球蛋白 G。

表 1. 在致敏受体内心脏异源移植物存活

试验组	移植之前抗一猪		异源移植物存活 (天数)	异源移植物病理学
	供体猪嵌合体化	抗体		
对照*	否	64	0.5	严重血管排斥
对照*	否	4	1	严重血管排斥
对照	否	4	2	严重血管排斥
嵌合体试验	是	16	9+	无排斥反应
嵌合体试验	是	4	25	轻度细胞排斥 缺血梗塞
嵌合体无关试验	是	16	3+	轻度细胞排斥血肿

*采用猪淋巴细胞致敏三次或三次以上的绵羊

10 +因技术原因无痛苦死去的绵羊。无移植物反应或反应轻微。
异种皮移植前移植的移植之前标准。

实施例 2. 采用致敏绵羊血浆在 Langendorff 中嵌合体绵羊对于猪心的功能

15 在该研究中，分析了嵌合体猪心在 Langendorff 装置中的功能，并且，用非嵌合体心脏进行比较。预研究显示该项分析是体内功能的证明。

20 制备绵羊骨髓并输给妊娠 45 天的胎猪。届时通过剖腹产术取出胎猪。通过采用对于I型组织相容性抗原特异引物的多聚酶链反应和流式细胞仪分析血液中的嵌合体。从嵌合体或非嵌合体猪分离心脏移植物，并悬浮在 Langendorff 装置中。用 Krebs-Heinsleit 溶液灌注移植

物的冠状动脉。在跳动 30 分钟后，加入采自非致敏绵羊或用猪淋巴细胞致敏 3 至 5 次的绵羊血浆。用于致敏的绵羊和猪的淋巴细胞均与嵌合体心脏内的绵羊和猪无关。补体依赖的淋巴细胞细胞毒性分析证明致敏绵羊血浆含有 32 至 128 的滴度。分析了移植物的心跳率，灌注压和冠脉血流率，直至心跳停止 (<30 跳/分钟)。

结果：用未致敏绵羊血浆灌注的正常对照心脏发挥功能至 4 小时。用高度致敏绵羊血浆灌注的正常对照心脏在 19 ± 12 分钟停跳 (7 至 40 分钟, $n=6$)。这些包括 2 只含有最小嵌合体化 (<1%) 的猪，并且 1 只猪来自于一只未检测到嵌合体的注射母猪。来自嵌合体猪的心脏 (按流式细胞仪为 3 至 11%) 跳动为 183 ± 46 分钟 (137 至 229 分钟, $n=3$)。差异是显著的, $P < 0.0001$ 。免疫荧光染色证明在嵌合体心脏的血管壁内无绵羊球蛋白 G 和免疫球蛋白 M 沉积。

结论：在高滴度细胞毒性抗猪抗体的存在情况下，正常猪心在 20 分钟内停跳，而嵌合体心脏持续跳动 3 小时。对于排斥反应的抵抗取决于心脏移植体内的因素，而非循环因素或细胞。用于灌注血浆的绵羊采用猪淋巴细胞致敏与猪心来源无关。该绵羊同样与那些细胞被输入至胎猪的绵羊无关。

含有最小嵌合体化的 1 头猪和来自注射但未检测到嵌合体母猪的 2 头猪证明不存在相容性的证据，并且在加入采自致敏绵羊血浆后很快心脏移植体停跳。这些 35。观察证明先于获得器官之前对于猪的分析价值。

实施例 3 嵌合体猪内白细胞的相容性

方法：自正常猪和采用绵羊骨髓在预免疫胎儿期注射的嵌合体猪获得外周血淋巴细胞。采用取自致敏绵羊的不同滴度血清和采用含有对于 alphaGal 细胞毒性抗体的人血清孵育淋巴细胞。加入新鲜家兔补体。采用台酚兰测定细胞毒性。最大以 20% 稀释度或更高的细胞毒性确定滴度。

结果：三头试验猪的外周血液 显示与绵羊细胞的嵌合体，范围

自 2。7%至 4。6%（72-5）。

5 采自三头嵌合体猪的外周血淋巴细胞至少具有抵抗由致敏血清产生的裂解作用。在导致对照猪淋巴细胞 100%裂解的血清稀释度，它仅使 11%、31%和 47%的采自嵌合体猪的淋巴细胞裂解。参见图 1。

10 通过采用继发性致敏绵羊的血清裂解淋巴细胞证实 72-5 猪的相容性。以产生正常猪淋巴细胞 90%裂解的滴度的血清仅使取自嵌合体猪的大约 15%的淋巴细胞裂解。参见图 2。

15 结论：采自嵌合体猪的外周血淋巴细胞证明抵抗补体介导的细胞毒性作用。这点不能由存在绵羊淋巴细胞来解释，由于嵌合体低于 5%。采自 72-5 猪的心脏，证明最大淋巴细胞相容性，是在一项体外采用人血灌注的研究中的相容性目的而进行试验的。

15 实施例 4. 采用人血灌注时通过绵羊因素调节的猪心的延长功能

20 方法：如例 3 中所述采用绵羊骨髓输入的预免疫胎猪。在出生后，通过多聚酶链反应和流式细胞仪采用绵羊细胞分析血液中的嵌合体。通过测量对于补体依赖抗体细胞毒性的抵抗性分析相容性，如例 3 所说。从最好的嵌合体猪（72-5）的心脏移植和一对照猪在体外采用一人体志愿者的血液（B 型）用 Langendorff 装置灌注（J.J. Dunning, et al., Eur. J. Cardiothorac Surg. 8:204-206, (1994)。确定了心脏功能的间期。心脏移植切片采用福尔马林固定和常规苏木素及伊红切片进行评价。

25 结果：与 Dunning, ID 的研究一致，对照猪心在采用人血灌注它 20 分钟内变为心脏搏动缓慢。在此时，心室停止。当采自相同人体志愿者的血液灌注一个嵌合体猪（用绵羊骨髓注射）移植心脏时，它开始证明有些缓慢（从 132 次/分钟至 70 次/分钟）。但是，至 20 分钟 30 时，速率恢复至最初的 80%。至 80 分钟时，速率恢复至最初的 100%。心脏连续强烈跳动至试验中止时。参见图 3。

对照移植物的组织学显示高度排异反应的证据，包括血小板和纤

维蛋白的栓塞、中性白细胞粘附血管壁、和间质出血。肌原纤维具有局部缺血证据，伴有高度嗜酸性细胞浆、皱缩的核和泡状化。相反，试验心脏的切片未显示血栓、中性白细胞粘附血管壁、和局部缺血。进行了人免疫球蛋白 G、人免疫球蛋白 M、C3 和 C9 的免疫荧光染色。嵌合体猪的心脏较之对照心脏很少有人免疫球蛋白 M、C3 和 C9 的沉积。在人免疫球蛋白 G 的沉积方面，无可见的差异。

结论:该研究证明当接触人血液时绵羊因素嵌合体心脏的延长功能。由于绵羊成分产生 alphaGal,与人相比,它们不产生对于 alphaGal 的自然抗体。因此，通过对于抗 alphaGal 相容性的移植物保护作用系由对于与抗原相关的猪的抗体产生。

实施例 5.嵌合体猪内的持续性相容性

前言:在此研究中,以 12 和 15 周龄的猪评价相容性。

方法:从相容性的和对照的猪分离外周血淋巴细胞。用致敏绵羊血清（滴度 1: 128）和新鲜家兔补体孵育淋巴细胞。致敏血清滴度为 1: 4。采用碘源和流式细胞仪定量死亡的淋巴细胞。致敏血清和补体杀死 96 至 100%的采自符合这些条件的八只对照猪的猪淋巴细胞。因此，对照淋巴细胞的存活能力是相当的或低 4%。与此相比，采自相容性猪的 73%或以上的淋巴细胞是存活的。参见表 2。

表 2

猪	在 2 周的存活率*	最近的存活率*	最近的猪年龄	最近的猪体重 (kg)
421-3	83%	79%	12 周	77
421-10	80%	84%	12 周	74
2160-2	90%	83%	12 周	78
2163-1	87%	90%	12 周	80
2141-2	79%	73%	15 周	94

*对照淋巴细胞 (n=8) 具有相当的或低 4%的存活率

讨论：在二周龄猪观察到的淋巴细胞相容性持续至试验的 12 或 15 周龄。在此年龄和体 15。重的猪可能是成人受者的适当供体。如

果内皮细胞具有相似的保护水平，相容性器官可能提供抵抗高度急性的排异反应和急性血管性排异反应。

实施例 6. 容性嵌合体猪体内绵羊免疫球蛋白 G 的存在和移植结果

5 前言：据认为，相容性是由含有结合免疫球蛋白的细胞内的保护性蛋白的诱导而产生的。因此，在嵌合体猪体内的相容性的可能机制可能是由融合的异源性基因细胞产生了亚致死性水平的抗体。在此研究中，通过酶联免疫吸附试验分析了采自供体猪的血清样品中的免疫球蛋白 G。

10

 方法：研制了用于绵羊免疫球蛋白 G 的夹心酶联免疫吸附试验。采用驴抗绵羊免疫球蛋白 G 包被微量滴度板，用吐温 20 封闭并洗涤。试验血清按多次稀释后加入并孵育 30 分钟。在洗涤后，将生物素化的驴抗绵羊免疫球蛋白 G 加入板内。洗涤后，采用链球菌亲和素过氧化物酶孵育，后在加入基质。采用硫酸终止反应并用微量板读数仪读板。
15 用 4 只对照绵羊、14 只对照猪和 12 只猪来（10 至 14 天）自怀有注射绵羊骨髓细胞的猪的母猪的血清进行了分析。摘取心脏并移植给受体绵羊。移植后，绵羊接受环孢素（300—800ng/ml 饲料槽水平）和逐渐减量的类固醇。按周解剖心脏。参见表 3。

20

 讨论：采用特异的酶联免疫吸附试验检测到在嵌合体猪体内存在嵌合体免疫球蛋白 G。这一结果对于三个原因是重要的。第一，免疫球蛋白 G 的一致存在提示低水平的抗体结合至猪细胞并且诱导相容性。第二，分析提供了检查通过增强 B 细胞嵌合体和功能改进相容性努力的手段。第三，该方法对于质量保证、在获得用于移植的器官之前评价潜在的供体猪是有用的。
25

 该项研究并未确定在预告移植物结果方面嵌合体免疫球蛋白 G 的特异性。但是，在此项研究过程中，采自伴有可检测到的免疫球蛋白 G 的猪的心脏异源移植物并未发生明显的排异反应。但是，二只绵羊由于技术性失败在 5 和 17 天无痛苦死去。一个移植物在 106 天后，仍然未见排异反应。
30

表 3

猪	羊 IgG (ug/ml)	受体羊	移植物存活天数	结果
2141-4	0.64	105	5 天	无排异,技术失败
395-4	1.00	106	106 天	无排异
1187-5	1.08	116	17 天	无排异,技术失败
2165-5*	2.16	110	30 天	无排异安乐死
2161-2*	4.64	97	30 天	无排异, 安乐死
1115-7#	未检测	101	6 天	急性血管性排异
2141-8#	未检测	112	7 天	急性血管性排异
1115-5	未检测	113	5 天	无排异,技术失败
2126-5	未检测	103	9 天	急性细胞性排异
2165-3	未检测	115	15 天	急性细胞性排异
385-1	未检测	102	24 天	急性细胞性排异
1163-3	未检测	107	25 天	急性细胞性排异
对照组猪 (n=14)	未检测			

*2165-5 和 2161-2 组的猪也通过淋巴细胞毒性试验以检测适应程度。见实施例 5。在对照组淋巴细胞存活率等于或小于 4%的情况下，2165-5 组的淋巴细胞存活率为 98%，2161-2 组的淋巴细胞存活率为 95%。#对照组移植。PCR（聚合酶联反应）或流式细胞仪检不出猪的嵌合状态。

5

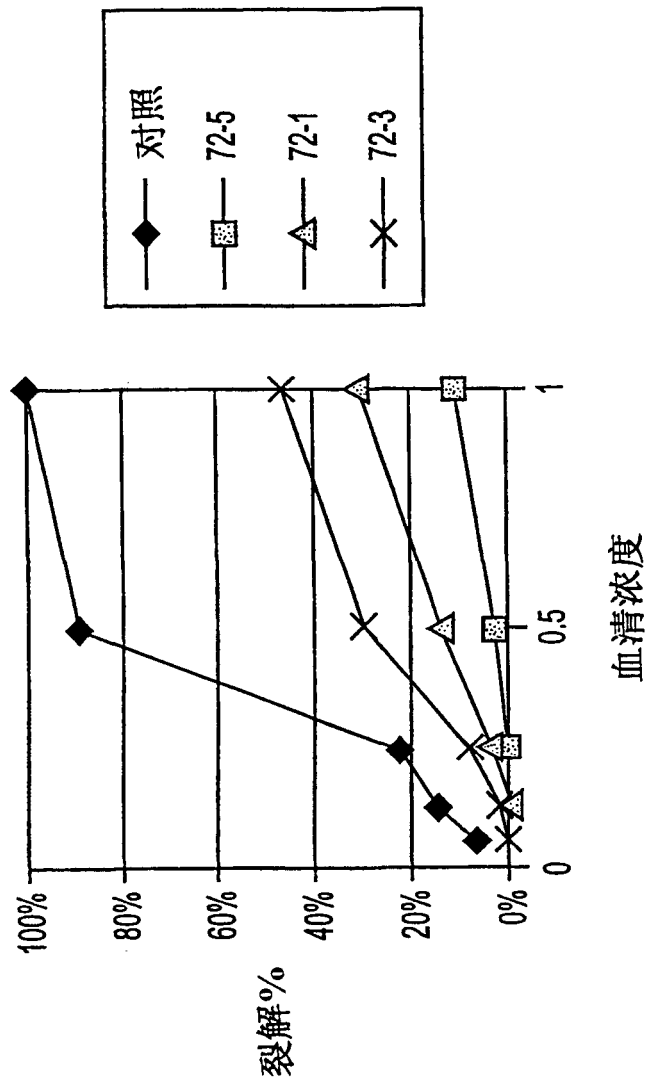


图 1

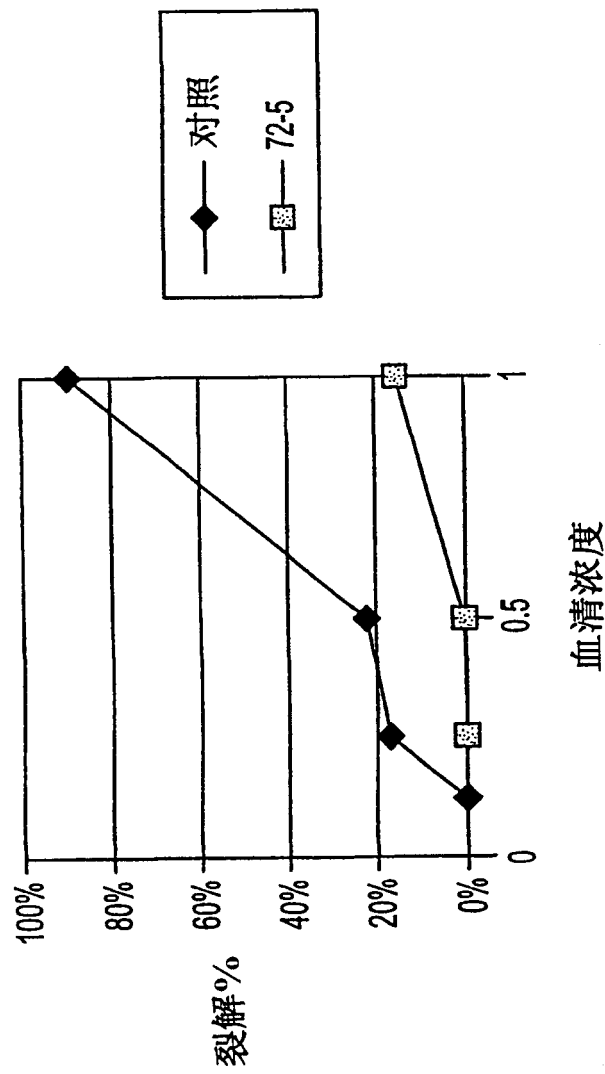


图2

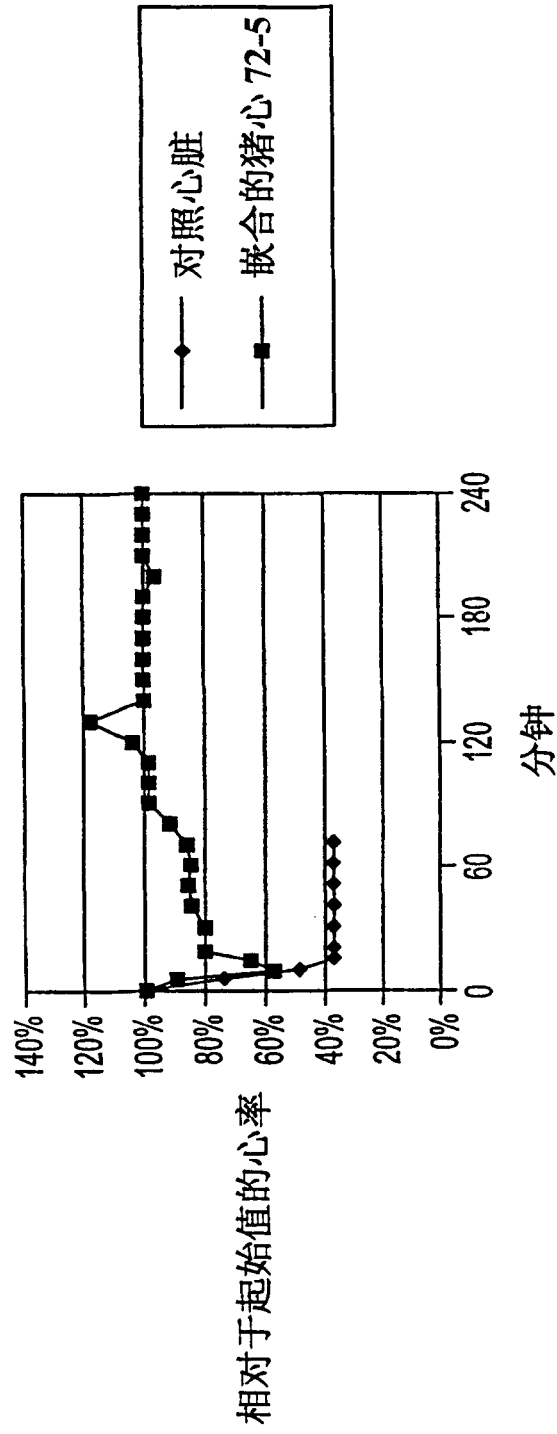


图 3

专利名称(译)	抵制抗供体免疫的移植前适应器官		
公开(公告)号	CN1396832A	公开(公告)日	2003-02-12
申请号	CN01804140.X	申请日	2001-01-25
申请(专利权)人(译)	内布拉斯加大学董事委员会		
当前申请(专利权)人(译)	内布拉斯加大学董事委员会		
[标]发明人	威廉 E· 比斯丘尔内尔		
发明人	威廉 E· 比斯丘尔内尔		
IPC分类号	A61K45/00 A61K35/12 A61K35/14 A61K35/17 A61K35/34 A61K38/00 A61K38/16 A61K39/00 A61K39/395 A61P37/06 C07K16/18 C12P21/08 A61K39/40 G01N33/53 G01N33/555 G01N33/567 C07K16/00		
CPC分类号	A61K38/168 A61K35/17 A61K35/34 C07K16/18 A61K39/001 A61K2039/515 A61K2039/505 A61K38/1709		
优先权	60/178347 2000-01-25 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明包括在移植前适应的器官移植物的组成，因而通过使用的抗体能抵制排异。在供体动物体内通过植入亚致死剂量的从对供体致敏的动物衍生出来的适应诱导因子可获得适应性。

