



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103562378 B

(45)授权公告日 2016.09.07

(21)申请号 201280018195.1

(22)申请日 2012.04.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103562378 A

(43)申请公布日 2014.02.05

(30)优先权数据
61/475,561 2011.04.14 US
61/600,505 2012.02.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.10.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/033643 2012.04.13

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/142500 EN 2012.10.18

(73)专利权人 通用医疗公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 乔纳森·李·蒂莉
多里·C·伍兹

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.
C12N 5/075(2006.01)

(56)对比文件
US 2006010508 A1,2006.01.12,
W0 2001030980 A2,2001.05.03,
Tracey Baas 等.“Repowering the
ovary”.《Science Business Exchange》.2012,
第5卷(第10期),第1-3页.

审查员 蔺娜

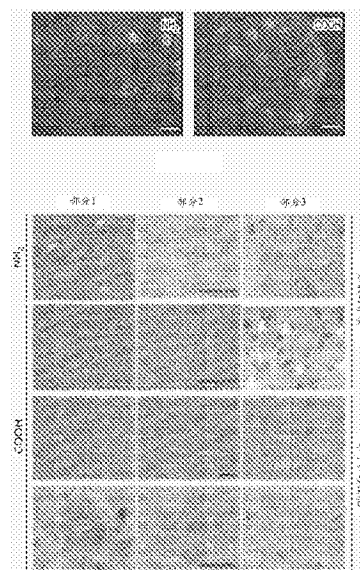
权利要求书4页 说明书35页
序列表11页 附图33页

(54)发明名称

用于自体种系线粒体能量转移的组合物和方法

(57)摘要

在此描述了卵原干细胞(OSC)衍生的组合物(如无核细胞质或分离的线粒体)、以及OSC衍生的组合物在自体生育力增强程序中的用途。



1. 制备用于体外受精(IVF)或人工授精的卵母细胞的方法,所述方法包括将包含i)卵原干细胞(OSC)线粒体、或ii)从OSC子代获得的线粒体的组合物转移到卵母细胞之中,由此制备所述用于IVF或人工授精的卵母细胞,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原,并且其中所述OSC和所述卵母细胞是自体的。

2. 如权利要求1所述的方法,其中包含OSC线粒体、或从OSC子代获得的线粒体的所述组合物是没有细胞核的所述细胞的细胞质。

3. 如权利要求1所述的方法,其中包含i)OSC线粒体、或ii)从OSC子代获得的线粒体的所述组合物是纯化线粒体制剂。

4. 包含分离的OSC线粒体或从OSC子代获得的线粒体的组合物,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原。

5. 如权利要求4所述的组合物,其中所述组合物是至少85%不含细胞或非功能线粒体的。

6. 如权利要求4所述的组合物,其中所述组合物是至少90%不含细胞或非功能线粒体的。

7. 如权利要求4所述的组合物,其中所述组合物是至少95%不含细胞或非功能线粒体的。

8. 包含从OSC或至少一个OSC子代获得的至少一个分离的线粒体的组合物,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原。

9. 根据权利要求1所述的方法制备的卵母细胞。

10. 包含外源的自体OSC线粒体或从OSC子代获得的线粒体的卵母细胞,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原。

11. 体外受精方法,所述方法包括以下步骤:

a) 获得包含i)来自OSC的线粒体、或ii)从OSC子代获得的线粒体的组合物,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原;

b) 将所述组合物转移到分离的自体卵母细胞中;并且

c) 使所述自体卵母细胞体外受精以形成受精卵。

12. 如权利要求11所述的方法,进一步包括将所述受精卵、或来源于所述受精卵的植入前期胚胎转移到女性受试者的子宫或输卵管中。

13. 从至少一个OSC、或至少一个OSC子代分离出功能线粒体群体的方法,所述方法包括以下步骤:将包含至少一个OSC、或至少一个OSC子代的组合物与荧光线粒体跟踪探针一起在足以使所述探针结合到功能线粒体上的条件下孵育,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原,所述荧光线粒体跟踪探针选自下组,所述组由以下各项组成:非氧化依赖性探针、积累依赖性探针以及氧化还原态探针;并且使用荧光激活细胞分

选术分选这些功能线粒体,由此从至少一个OSC、或至少一个OSC子代分离出所述功能线粒体群体。

14.如权利要求13所述的方法,其中非功能线粒体被排除在所述功能线粒体群体之外。

15.鉴定从至少一个OSC、或至少一个OSC子代获得的功能线粒体群体的方法,所述方法包括以下步骤:

a)将包含至少一个OSC、或至少一个OSC子代的组合物与荧光氧化还原态探针以及荧光积累依赖性探针一起在足以使所述荧光氧化还原态探针结合到所述组合物中的功能线粒体上并且使所述荧光积累依赖性探针结合到所述组合物中的所有线粒体上的条件下孵育,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原;

b)使用荧光激活细胞分选术获得包含所述功能线粒体的组合物,其中所述组合物将非功能线粒体排除在外;

c)确定功能线粒体的量和总线粒体的量;并且

d)计算功能线粒体与总线粒体的比率;并且

e)确定所述比率是否大于0.02,由此鉴定从至少一个OSC、或至少一个OSC子代获得的功能线粒体群体。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述荧光积累依赖性探针在绿色光谱中发荧光。

17.如权利要求15所述的方法,其中所述荧光氧化还原态探针在红色光谱中发荧光。

18.包含根据如权利要求15所述的步骤a)和b)获得的功能线粒体的组合物。

19.包含如权利要求4到8中任一项所述的组合物和使用说明书的试剂盒。

20.用于增强卵母细胞的ATP产生能力的方法,所述方法包括以下步骤:

a)获得包含从对于所述卵母细胞为自体的至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的组合物,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原,并且其中所述卵母细胞和所述OSC是自体的;并且

b)将所述线粒体组合物注射到所述卵母细胞中。

21.如权利要求1、11或20所述的方法,其中所述组合物包含 1×10^3 到 5×10^4 个线粒体。

22.如权利要求1、11或20所述的方法,其中与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fg mtDNA产生至少多5倍的ATP。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述卵巢体细胞是自体的。

24.如权利要求1、11或20所述的方法,其中与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fg mtDNA产生至少多10倍的ATP。

25.如权利要求24所述的方法,其中所述卵巢体细胞是自体的。

26.如权利要求1、11或20所述的方法,其中与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fg mtDNA产生至少多50倍的ATP。

27.如权利要求26所述的方法,其中所述卵巢体细胞是自体的。

28.如权利要求1、11或20所述的方法,其中与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fg mtDNA产生至少多100倍的ATP。

29.如权利要求28所述的方法,其中所述卵巢体细胞是自体的。

30. 如权利要求1、11或20所述的方法,其中所述卵母细胞是从高育龄的人类女性、具有卵母细胞相关性不孕症的人类女性或具有低卵巢储备功能的人类女性获得的。

31. 如权利要求1、11或20所述的方法,其中所述组合物包含已通过离心分离的线粒体。

32. 如权利要求1、11或20所述的方法,其中所述组合物包含已通过线粒体膜电位依赖性细胞分选术分离的线粒体。

33. 如权利要求20所述的方法,其中所述至少一个OSC是从卵巢组织获得的。

34. 如权利要求20所述的方法,其中所述至少一个OSC是从非卵巢组织获得的。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述非卵巢组织是血液。

36. 如权利要求34所述的方法,其中所述非卵巢组织是骨髓。

37. 如权利要求20所述的方法,其中包含从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的所述组合物是没有细胞核的所述细胞的细胞质。

38. 如权利要求20所述的方法,其中包含从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的所述组合物是纯化线粒体制剂。

39. 如权利要求4或8所述的组合物,其中所述组合物包含 1×10^3 到 5×10^4 个线粒体。

40. 如权利要求4或8所述的组合物,其中与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fg mtDNA产生至少多5倍的ATP。

41. 如权利要求40所述的组合物,其中所述卵巢体细胞是自体的。

42. 如权利要求4或8所述的组合物,其中与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fg mtDNA产生至少多10倍的ATP。

43. 如权利要求42所述的组合物,其中所述卵巢体细胞是自体的。

44. 如权利要求4或8所述的组合物,其中与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fg mtDNA产生至少多50倍的ATP。

45. 如权利要求44所述的组合物,其中所述卵巢体细胞是自体的。

46. 如权利要求4或8所述的组合物,其中与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fg mtDNA产生至少多100倍的ATP。

47. 如权利要求46所述的组合物,其中所述卵巢体细胞是自体的。

48. 如权利要求4或8所述的组合物,其中所述OSC或OSC子代是从高育龄的人类女性、具有卵母细胞相关性不孕症的人类女性或具有低卵巢储备功能的人类女性获得的。

49. 如权利要求4或8所述的组合物,其中所述组合物包含已通过离心分离的线粒体。

50. 如权利要求4或8所述的组合物,其中所述组合物包含已通过线粒体膜电位依赖性细胞分选术分离的线粒体。

51. 根据如权利要求20所述的方法制备的卵母细胞。

52. 从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的组合物,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原,并且其中所述组合物包含线粒体群体,在所述线粒体群体中大于75%的线粒体是高ATP产生能力的线粒体。

53. 从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的组合物,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原,并且其中所述组合物包含线粒体群体,在所

述线粒体群体中大于85%的线粒体是高ATP产生能力的线粒体。

54. 从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的组合物,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原,并且其中所述组合物包含线粒体群体,在所述线粒体群体中大于90%的线粒体是高ATP产生能力的线粒体。

55. 从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的组合物,其中所述OSC从卵巢组织获得并且是分离的非胚胎干细胞,所述干细胞具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原,并且其中所述组合物包含线粒体群体,在所述线粒体群体中大于99%的线粒体是高ATP产生能力的线粒体。

用于自体种系线粒体能量转移的组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2011年4月14日提交的美国临时申请序列号61/475,561和2012年2月17日提交的美国临时申请序列号61/600,505的权益,这些申请的全部披露内容通过引用结合在此。

[0003] 关于在联邦赞助的研究下做出本发明的权利声明

[0004] 本工作部分地得到了美国国家老龄化研究院批准号NIHR37-AG012279和美国国家卫生研究院国家研究服务奖(F32-AG034809)的支持。政府对本发明具有某些权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包含序列表,所述序列表已通过EFS网以ASCII格式递交并且特此通过引用以其全文结合。所述ASCII拷贝是在2012年6月25日创建的,命名为88511W05.txt并且大小为15,448个字节。

[0007] 发明背景

[0008] 在过去的几十年期间,由于文化与社会变迁,发达国家的女性已显著延迟分娩。例如,在过去的40年中,在美国,35-44岁的女性的初育率已增加超过8倍(文图拉(Ventura)卫生统计(Vital Health Stat)47:1-27,1989;马修斯(Matth ews)美国国家卫生统计中心的数据摘要(NCHS Data Brief)200921:1-8)。众所周知的是,35岁或更大年龄的女性在自然生殖和借助辅助生殖两种情况下的妊娠率显著更低。活产率下降反映了对卵巢刺激的反应的下降、胚胎质量和妊娠率的降低、以及流产和胎儿非整倍性的发生率增加。另外,卵子中衰老相关的染色体和减数分裂纺锤体异常也被视为是造成在处于高生育年龄的女性中的不孕症、胎儿丢失(流产)以及引起出生缺陷(最值得注意的是21三体或唐氏综合征)的受孕的发生率增加的主要因素(亨德森(Henderson)等人,自然(Nature)1968218:22-28,哈索尔德(Hassold)等人,人类遗传学(Hum Genet)198570:11-17,巴塔利亚(Battaglia)等人,人类生殖(Hum Reprod)199611:2217-2222,亨特(Hunt)等人,遗传学趋势(Trends Genet)200824:86-93)。

[0009] 目前,没有能改善年长女性患者的妊娠结果的已知干预措施。在动物研究中,已报导了在幼年期期间和在整个成年育龄中长期给予药理学剂量的抗氧化剂可以改善衰老雌性小鼠的卵母细胞质量(塔林(Tarín)等人,分子生殖发育(Mol Reprod Dev)200261:385-397)。然而,这种方法对卵巢和子宫功能具有显著的长期负面影响,在所治疗的动物中引起更高的胎儿死亡和再吸收以及产仔频率和产仔数的降低(塔林等人,动物生殖学(Theriogenology)200257:1539-1550)。因此,用于维持或改善衰老女性的卵母细胞质量的长期抗氧化剂疗法的临床转化是不切实际的。

[0010] 衰老和年龄相关病理学往往与由线粒体数目(生源论)减少、线粒体活性(产生作为细胞能量的主要来源的ATP)减小和/或线粒体DNA(mtDNA)突变和缺失的积累所引起的线粒体功能丧失相关。随着卵母细胞老化以及卵母细胞线粒体能量产生减少,产生有能力的卵子所需的卵母细胞成熟的许多关键过程(尤其是核纺锤体活性和染色体分离)受损(巴特

曼(Bartmann)等人,辅助生殖与遗传学杂志(JAssist Reprod Genet)200421:79-83,瓦尔汀(Wilding)等人,受精卵(Zygote)200513:317-23)。

[0011] 将来自年轻供体卵母细胞(即,从不同女性获得)的细胞质提取物异源转移到有生殖失败史的年长女性的卵母细胞中(称为卵胞质移植或卵胞质转移的程序)展示了改善的胚胎发育和存活后代的分娩。然而,令人遗憾的是,遵循这个程序出生的孩子展现出线粒体异质性或来自两个不同来源的线粒体的存在(科恩(Cohen)等人,分子人类生殖学(Mol Hum Reprod)19984:269-80,巴里特(Barritt)等人,人类生殖,200116:513-6,马格尔顿-哈里斯(Muggleton-Harris)等人,自然,1982299:460-2,哈佛(Harvey)等人,发育生物学当代课题(Curr Top Dev Biol)200777:229-49)。这与以下事实一致:卵子中存在的母源线粒体被用来向胚胎“播种”线粒体,因为来自精子的父源线粒体在受精之后不久就被破坏了(苏托夫斯基(Sutovsky),生殖生物学(Biol Reprod)200063:5820590)。虽然所述程序涉及来自供体卵子的细胞质和未纯化或分离的线粒体的转移,但是转移的细胞质中供体线粒体的存在(通过“外来”线粒体传代到后代中所证实)被认为是异源卵胞质转移提供生育力益处的原因。不考虑的是,在这些孩子中诱发的线粒体异质性的健康影响至今是未知的;然而,已证明线粒体异质性的小鼠模型产生了与代谢综合征一致的表型(阿克顿(Acton)等人,生殖生物学,200777:569-76)。有争议的是,异源卵胞质转移最显著的问题是线粒体还包含与生物学母亲和生物学父亲所提供的核基因不同的遗传物质的事实。

[0012] 因此,遵循这个程序孕育的孩子具有三个遗传亲本(生物学母亲、生物学父亲、卵子供体),并且因此代表了用于产生胚胎的人类种系遗传操作的实例。因此,导致线粒体异质性的卵胞质移植程序现在受到管制并且在很大程度上被FDA禁止。关于细节,参见CBER2002会议文件(CBER2002Meeting Documents),2002年5月9日的生物反应调节剂咨询委员会(Biological Response Modifiers Advisory Committee)记录,这些文件可从FDA公开获得,以及“致资助者/研究者的信一涉及在通过除配子核结合以外的手段转移遗传物质的疗法中使用的人类细胞(Letter to Sponsors/Researchers-Human Cells Used in Therapy Involving the Transfer of Genetic Material By Means Other Than the Union of Gamete Nuclei)”,它同样可从FDA<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ucml05852.htm>公开获得。

[0013] 虽然使用来自体细胞的自体线粒体将避免线粒体异质性,体细胞的线粒体同样会因线粒体数目(生源说)减少、线粒体活性(产生作为细胞能量的主要来源的ATP)减小和/或线粒体mtDNA突变和缺失的积累而经历年龄相关性线粒体功能丧失。因此,对于高育龄女性来说,将来源于自体体细胞的线粒体转移到卵母细胞中没有所预期的显著益处。而且,已知多种干细胞具有低线粒体活性(拉马略-桑托斯(Ramalho-Santos)等人,人类生殖新进展(Hum Reprod Update),2009(5):553-72)并且因此,成体干细胞被认为不是高活性线粒体的可行来源。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明是部分基于以下出人意料的发现:存在于卵巢的体细胞组织中的哺乳动物雌性种系干细胞或卵原干细胞(OSC)含有具有有所评估的所有干细胞类型中最高的已知ATP产生能力的线粒体,并且这些线粒体含有具有减少的积累突变量的mtDNA,这些积累突变在一些情况下包括不可检测的水平的已知随着年龄在体细胞中积累的常见的mtDNA缺失。

[0016] 在一个方面,本发明提供了制备用于体外受精(IVF)或人工授精的卵母细胞的方法。所述方法包括将包含OSC线粒体、或从OSC的子代获得的线粒体的组合物转移到自体卵母细胞之中,由此制备用于体外受精或人工授精的卵母细胞。

[0017] 在一些实施例中,OSC是分离的非胚胎干细胞,具备有丝分裂能力并且表达Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地阶段特异性胚胎抗原(SSEA)(例如,SSEA-1、-2、-3以及-4)。OSC可以从卵巢组织或非卵巢组织/来源(如骨髓或血液,例如外周血和脐带血)获得。

[0018] 在其他实施例中,包含OSC线粒体、或从OSC的子代获得的线粒体的组合物是没有细胞核的这些细胞的细胞质。

[0019] 仍然在其他实施例中,包含OSC线粒体或从OSC的子代获得的线粒体的所述组合物是纯化制剂。在某些实施例中,所述纯化制剂不含OSC、OSC子代和/或非功能线粒体或者至少大约85%、90%、95%不含OSC、OSC子代和/或非功能线粒体。

[0020] 在一些实施例中,所述组合物包含 1×10^3 到 5×10^4 个线粒体。

[0021] 在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多5倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0022] 仍然在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多10倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0023] 在再其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多50倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0024] 在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多100倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0025] 在一些实施例中,所述卵母细胞是从高育龄的人类女性获得的。在其他实施例中,所述卵母细胞是从具有低卵巢储备功能的人类女性获得的。

[0026] 在一些实施例中,所述组合物包含已通过离心分离的线粒体。在其他实施例中,所述组合物包含已通过线粒体膜电位依赖性细胞分选术分离的线粒体。

[0027] 在一些实施例中,包含从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的所述组合物是没有细胞核的这些细胞的细胞质。在其他实施例中,包含从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的所述组合物是纯化线粒体制剂。

[0028] 在另一个方面,本发明提供了包含分离的OSC线粒体、或从OSC子代获得的线粒体的组合物。

[0029] 在一些实施例中,所述组合物是至少大约85%、90%、95%不含细胞或非功能线粒体的。

[0030] 在一些实施例中,所述组合物包含 1×10^3 到 5×10^4 个线粒体。

[0031] 在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多5倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0032] 在一些实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多10倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0033] 在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多50倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0034] 在一些实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多100倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0035] 在一些实施例中,所述OSC或OSC子代是从高育龄的人类女性获得的。在其他实施例中,所述OSC或OSC子代是从具有低卵巢储备功能的人类女性获得的。

[0036] 在一些实施例中,所述组合物包含已通过离心分离的线粒体。在其他实施例中,所述组合物包含已通过线粒体膜电位依赖性细胞分选术分离的线粒体。

[0037] 在又另一个方面,本发明提供了包含从OSC或至少一个OSC子代获得的至少一个分离的线粒体的组合物。

[0038] 在一些实施例中,所述组合物包含 1×10^3 到 5×10^4 个线粒体。

[0039] 在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多5倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0040] 在一些实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多10倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0041] 在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多50倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0042] 在一些实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多100倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0043] 在一些实施例中,所述OSC或OSC子代是从高育龄的人类女性获得的。在其他实施例中,所述OSC或OSC子代是从具有低卵巢储备功能的人类女性获得的。

[0044] 在一些实施例中,所述组合物包含已通过离心分离的线粒体。在其他实施例中,所述组合物包含已通过线粒体膜电位依赖性细胞分选术分离的线粒体。

[0045] 在另一个方面,本发明提供了根据任何上文描述的方法制备的卵母细胞。

[0046] 在又另一个方面,本发明提供了包含外源的自体OSC线粒体或从OSC子代获得的线粒体的组合物。

[0047] 在又另一个方面,本发明提供了体外受精的方法。所述方法包括以下步骤:a)获得组合物,所述组合物包含i)从OSC获得的线粒体、或ii)从OSC子代获得的线粒体;b)将所述组合物转移到分离的自体卵母细胞中;并且c)使所述自体卵母细胞体外受精以形成受精卵。在一个实施例中,所述方法进一步包括将所述受精卵、或来源于所述受精卵的植入前期

胚胎转移到女性受试者的子宫或输卵管中。

[0048] 在一些实施例中,所述组合物包含 1×10^3 到 5×10^4 个线粒体。

[0049] 在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多5倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0050] 在又其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多10倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0051] 仍然在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多50倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0052] 在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多100倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0053] 在一些实施例中,所述卵母细胞是从高育龄的人类女性获得的。在其他实施例中,所述卵母细胞是从具有低卵巢储备功能的人类女性获得的。

[0054] 在一些实施例中,所述组合物包含已通过离心分离的线粒体。在其他实施例中,所述组合物包含已通过线粒体膜电位依赖性细胞分选术分离的线粒体。

[0055] 在一些实施例中,所述至少一个OSC是从卵巢组织获得的。在其他实施例中,所述至少一个OSC是从非卵巢组织获得的。

[0056] 在一些实施例中,所述非卵巢组织是血液。在其他实施例中,所述非卵巢组织是骨髓。

[0057] 在一些实施例中,包含从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的所述组合物是没有细胞核的这些细胞的细胞质。在其他实施例中,包含从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的所述组合物是纯化线粒体制剂。

[0058] 在又另一个方面,本发明提供了从至少一个OSC、或至少一个OSC子代分离功能线粒体群体的方法。所述方法包括以下步骤:将包含至少一个OSC、或至少一个OSC子代的组合物与线粒体跟踪探针一起在足以使所述探针结合到这些功能线粒体上的条件下孵育;并且将功能线粒体从非功能线粒体分选出来,由此从至少一个OSC、或至少一个OSC子代分离出所述功能线粒体群体。在一些实施例中,非功能线粒体被排除在所述功能线粒体群体之外。

[0059] 在一些实施例中,所述线粒体跟踪探针是非氧化依赖性探针。在一些实施例中,所述线粒体跟踪探针是积累依赖性探针。在一些实施例中,所述线粒体跟踪探针是氧化还原态探针。在一些实施例中,所述分选步骤包括荧光激活细胞分选术。

[0060] 在又另一个方面,本发明提供了鉴定从至少一个OSC、或至少一个OSC子代获得的功能线粒体群体的方法。所述方法包括以下步骤:a)将包含至少一个OSC、或至少一个OSC子代的组合物与荧光氧化还原态探针以及荧光积累依赖性探针一起在足以使所述荧光氧化还原态探针结合到所述组合物中的功能线粒体上并且使所述荧光积累依赖性探针结合到所述组合物中的所有线粒体上的条件下孵育;b)使用荧光激活细胞分选术获得包含所述功能线粒体的组合物,其中所述组合物将非功能线粒体排除在外;c)确定功能线粒体的量和

所有线粒体的量;并且d)计算功能线粒体与所有线粒体的比率;并且e)确定所述比率是否大于大约0.02,由此鉴定从至少一个OSC、或至少一个OSC子代获得的功能线粒体群体。

[0061] 在一些实施例中,所述荧光积累依赖性探针可以在光谱的一个部分(例如绿色)中发荧光。在其他实施例中,所述荧光氧化还原态探针可以在光谱的不同部分(例如红色)中发荧光。

[0062] 在另一个方面,本发明提供了包含功能线粒体的组合物,这些功能线粒体是根据一种方法获得的,所述方法包括以下步骤:a)将包含至少一个OSC、或至少一个OSC子代的组合物与荧光氧化还原态探针以及荧光积累依赖性探针一起在足以使所述荧光氧化还原态探针结合到所述组合物中的功能线粒体上并且使所述荧光积累依赖性探针结合到所述组合物中的所有线粒体上的条件下孵育;并且b)使用荧光激活细胞分选术获得包含所述功能线粒体的组合物,其中所述组合物将非功能线粒体排除在外。

[0063] 本发明的另一个方面提供了试剂盒,所述试剂盒包括包含分离的OSC线粒体或从OSC子代获得的线粒体的组合物和使用说明书。在一个实施例中,所述组合物是至少大约85%、90%、95%不含细胞或非功能线粒体的。

[0064] 本发明的又另一个方面提供了试剂盒,所述试剂盒包括从OSC或至少一个OSC子代获得的至少一个分离的线粒体和使用说明书。

[0065] 本发明的另一个方面提供了用于增强卵母细胞的ATP产生能力的方法。所述方法包括以下步骤:a)获得一种组合物,所述组合物包含从对于所述卵母细胞为自体的至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体;并且b)将所述线粒体组合物注射到所述卵母细胞中。

[0066] 在一些实施例中,所述组合物包含 1×10^3 到 5×10^4 个线粒体。

[0067] 在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多5倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0068] 仍然在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多10倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0069] 在再其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多50倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0070] 在其他实施例中,与卵巢体细胞或间充质干细胞相比,所述OSC或OSC子代每fgmtDNA产生至少多10倍的ATP。在某些实施例中,所述卵巢体细胞或间充质干细胞是自体的。

[0071] 在一些实施例中,所述卵母细胞是从高育龄的人类女性获得的。在其他实施例中,所述卵母细胞是从具有低卵巢储备功能的人类女性获得的。

[0072] 在一些实施例中,所述组合物包含已通过离心分离的线粒体。在其他实施例中,所述组合物包含已通过线粒体膜电位依赖性细胞分选术分离的线粒体。

[0073] 在一些实施例中,所述至少一个OSC是从卵巢组织获得的。在其他实施例中,所述至少一个OSC是从非卵巢组织获得的。

[0074] 在一些实施例中,所述非卵巢组织是血液。在其他实施例中,所述非卵巢组织是骨髓。

[0075] 在一些实施例中,包含从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的所述组合物是没有细胞核的这些细胞的细胞质。在其他实施例中,包含从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的所述组合物是纯化线粒体制剂。

[0076] 在另一个方面,本发明提供了通过包括以下步骤的方法制备的卵母细胞:a)获得包含从对于所述卵母细胞为自体的至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的组合物;并且b)将所述线粒体组合物注射到所述卵母细胞中。

[0077] 本发明的又另一个方面提供了从至少一个OSC或至少一个OSC子代获得的线粒体的组合物,其中所述组合物包含线粒体群体,在所述线粒体群体中大于大约75%、85%、90%、或大约99%的线粒体是高ATP产生能力的线粒体。

[0078] 在再另一个方面中,本发明提供了包含线粒体群体的组合物,在所述线粒体群体中小于大约5%到大约25%的mtDNA包含在线粒体基因组的核苷酸8470-13447内的缺失突变;以及与这类组合物有关的方法。

[0079] 从详细说明和从权利要求书将清楚本发明的其他特征和优点。因此,本发明的其他方面描述于以下披露中并且在本发明的范围之内。

[0080] 附图简要说明

[0081] 以下详细说明是借助于实例给出的,但不打算将本发明限制于所描述的具体实施例,可以结合通过引用结合在此的附图进行理解。

[0082] 图1描绘了用于OSC分离的基于荧光激活细胞分选术(FACS)的方案验证。在图1a中,显示了使用针对VASA的NH₂或COOH端的抗体对成年小鼠卵巢中的VASA表达进行的免疫荧光分析(用DAPI复染色)(比例尺,50μm)。在图1b中,显示了使用针对VASA的NH₂或COOH端的抗体进行的分散的小鼠卵巢或分离的卵母细胞的免疫磁性分选。部分1包含在分离之前的细胞加珠粒,部分2是洗涤或流过的部分(非免疫反应性)并且部分3是珠粒部分(VASA阳性细胞)。在图1c中,显示了使用针对VASA的NH₂或COOH端的抗体对来自分散的小鼠卵巢的活的或透化细胞进行的FACS分析。活的VASA阳性细胞仅用COOH抗体检测(虚线框),而透化允许使用NH₂抗体分离VASA阳性细胞(虚线框)。在图1d中,用COOH抗体获得的活的VASA阳性细胞的透化(虚线框)允许通过FACS使用NH₂抗体再分离相同的细胞(虚线框)。在图1e中,显示了使用VASA-COOH抗体,采用FACS方案分离活的OSC的示意性图示。图1f描绘了在使用VASA-COOH抗体以获得用于基于FACS的OSC分离的卵巢分散过程期间所产生的每个细胞部分(+ve,在FACS之后的VASA阳性活细胞部分;-ve,在FACS之后的VASA阴性活细胞部分;无RT,在无逆转录情况下RNA样品的PCR;β-肌动蛋白,样品加载对照)中的种系标记[Blimp1(也称为具有ZNF域的含PR域1或Prdm1)、Stella、Fragilis(也称为干扰素诱导的跨膜蛋白3或Ifitm3)、Tert(端粒酶逆转录酶)、Vasa、Dazl(无精症样缺失)]和卵母细胞标记[Nobox(新生儿卵巢同源盒)、Zp3(透明带糖蛋白3)、Gdf9(生长分化因子9)]的基因表达分析。

[0083] 图2描绘了通过免疫磁珠分选术从包含污染性卵母细胞的成年小鼠卵巢中分离的OSC部分。显示了在年轻成年小鼠卵巢(阳性对照)或在分散的年轻成年小鼠卵巢的基于VASA-COOH抗体的免疫磁珠分选术后获得的最终细胞部分中的种系标记(Blimp1、Stella、Fragilis、Tert、Vasa、Dazl)和卵母细胞特异性标记(Nobox、Zp3、Gdf9)的基因表达分析(无

RT,在无逆转录情况下分选的细胞RNA样品的PCR; β -肌动蛋白,样品加载对照)。

[0084] 图3描绘了使用FACS从成年小鼠和人类卵巢分离VASA阳性细胞。在图3a和b中,显示了用于人类(a)和小鼠(b)OSC分离的成体卵巢组织的代表性组织学外观。比例尺,100 μ m。在图3c和d中,显示了基于VASA的细胞表面表达的通过FACS分离的活细胞的形态。比例尺,10 μ m。图3e提供了起始卵巢材料和新鲜分离的OSC的基因表达谱,显示了作为人类组织分析的实例的3名不同患者的评定(无RT:在无逆转录情况下RNA样品的PCR; β -肌动蛋白,样品加载对照)。在图3f到图3k中,显示了畸胎瘤形成试验,所述试验显示了相比于在注射小鼠胚胎干细胞(ESC)之后3周的小鼠中产生肿瘤,在接受小鼠OSC注射之后24周的小鼠中不存在肿瘤(3f),(图3g到图3j;图3h到3j显示了来自所有三个胚层的细胞的实例,其中在图3h插图中突出显示了神经玫瑰花结);以及实验结果的概述(3k)。

[0085] 图4描绘了在卵巢内移植之后从小鼠OSC获得的功能性卵子。在图4a和4b中,显示了在先前5-6个月用表达GFP的OSC注射的野生型小鼠的卵巢中含有GFP阴性和GFP阳性(苏木精复染色)卵母细胞的生长卵泡的实例。在图4c中,显示了对在先前5-6个月接受表达GFP的OSC的卵巢内移植的野生型雌性小鼠进行诱导排卵之后,通过IVF产生的排卵的GFP阴性卵子(在卵丘-卵母细胞复合体中)和所得胚胎[2个细胞、4个细胞、致密桑椹胚(CM)以及早期囊胚(EB)阶段胚胎作为实例显示]的实例。在图4d和4e中,显示了在先前5-6个月接受表达GFP的OSC的卵巢内移植的野生型雌性小鼠进行诱导排卵之后,从输卵管获得的GFP阳性卵子(在卵丘-卵母细胞复合体中)的实例。使用野生型精子使这些卵子体外受精,产生2个细胞的胚胎,这些胚胎进展到植入前发育期[显示了处于2个细胞、4个细胞、8个细胞、致密桑椹胚(CM)、扩张桑椹胚(EM)、囊胚(B)以及孵化囊胚(HB)阶段的GFP阳性胚胎的实例],从而在受精后5-6天形成孵化囊胚。

[0086] 图5描绘了体外小鼠和人类OSC的生殖细胞集落形成。VASA表达的基于免疫荧光的分析显示于图5b和5d中;(用DAPI复染色)在体外建立于小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上之后由小鼠(5a、5b)和人类(5c、5d)OSC形成的典型生殖细胞集落中(典型集落通过白色虚线突出显示)。

[0087] 图6描绘了在确定的培养物中的小鼠和人类卵巢来源的VASA阳性细胞的评估。图6a到6d显示了通过在不含MEF的培养物中维持的小鼠(6a、6b)和人类(6c、6d)OSC中的VASA表达和BrdU掺入的双重检测的OSC增殖的评定。图6e显示了在24孔培养板中在传代和接种 2.5×10^4 个细胞/孔之后小鼠OSC的不含MEF的培养物的典型生长曲线。图6f显示了使用C00H抗体检测在数月繁殖之后小鼠OSC中的VASA的细胞表面表达的FACS分析(显示实例,第45代)。图6g指示了起始卵巢材料以及在体外4个月或更长时间的繁殖之后所培养的小鼠和人类OSC的基因表达谱(无RT,在无逆转录情况下RNA样品的PCR; β -肌动蛋白,样品加载对照)。显示了根据两个不同的患者建立的两个不同的人类OSC系(OSC1和OSC2)作为实例。图6h和6i显示了在不含MEF的培养物中小鼠(h)和人类(i)OSC中的BLIMP1、STELLA以及FRAGILIS表达的代表性免疫荧光分析。分别用DAPI和罗丹明-鬼笔环肽将细胞复染色以便将核DNA和细胞质F-肌动蛋白可视化。

[0088] 图7描绘了来自培养的小鼠和人类OSC的自发性卵子发生。图7a到7c提供了由培养物中的小鼠OSC形成的不成熟卵母细胞的实例,如通过以下各项评定的:形态(7a);卵母细胞标记蛋白VASA和KIT的表达(7b;注意VASA的细胞质定位);以及编码卵母细胞标记基因

Vasa、Kit、Msy2(也称为Y框蛋白2或Ybx2)、Nobox、Lhx8、Gdf9、Zp1、Zp2及Zp3的mRNA的存在(7c;无RT:在无逆转录情况下RNA样品的PCR; β -肌动蛋白,样品加载对照)。比例尺,25 μ m。图7d指示了在24孔培养板中在传代和接种 2.5×10^4 个细胞/孔之后24、48以及72小时由小鼠OSC形成的不成熟卵母细胞的数目(在每个时间点收集培养物上清液用于测定,并且因此这些值代表在每个24小时时间段内产生的数目,而非累积数目;平均值 $\pm$ SEM,n=3份独立的培养物)。图7e到7g显示了来自人类OSC的体外卵子发生,其中显示了由培养物中的人类OSC形成的不成熟卵母细胞的实例(7f,形态;7g,卵母细胞标记蛋白VASA、KIT、MSY2以及LHX8的表达)以及在24孔培养板中传代和接种 2.5×10^4 个细胞/孔之后形成的数目(7e;平均值 $\pm$ SEM,n=3份独立的培养物)。图c中显示了在人类OSC来源的卵母细胞中编码卵母细胞标记基因(Vasa、Kit、Msy2、Nobox、Lhx8、Gdf9、Zp1、Zp2、Zp3)的mRNA的存在以及小鼠OSC来源的卵母细胞的结果。比例尺,25 μ m。在图7h中,显示了在培养的人类OSC的细胞核中减数分裂重组标记DMC1(mck1同源物的剂量抑制因子)和SYCP3(联会复合体蛋白3)的基于免疫荧光的检测(DAPI复染色);人类卵巢基质细胞充当阴性对照。在图7i中,显示了在传代之后72小时的培养的人类OSC的基于FACS的倍性分析。由培养的人成纤维细胞(阴性对照)和培养的小鼠OSC的倍性分析得到的结果呈现于图9中。

[0089] 图8描绘了在成年人类卵巢中的卵母细胞特异性标记的检测。显示了在成年人类卵巢皮质组织中的卵母细胞中的VASA(8a)、KIT(8b)、MSY2(8c)以及LHX8(8d)表达的免疫荧光分析(也参见图10h)。切片用DAPI复染色以用于将细胞核可视化。比例尺,25 μ m。

[0090] 图9描绘了在培养物中的人成纤维细胞和小鼠OSC的倍性分析。图9a和9b显示了活跃分裂的人类胎肾成纤维细胞的培养物(9a)中以及在传代之后48小时收集的小鼠OSC(9b)中的倍性状态的代表性的基于FACS的评定。单倍体(1n)细胞仅在种系培养物中检测到,与由体外维持的人类OSC的分析得到的结果(参见图7i)一致,而所有培养物都包含二倍体(2n)和四倍体(4n)细胞群体。

[0091] 图10描绘了从人类卵巢组织中的人类OSC的卵母细胞的产生。显示了在分散、与GFP-hOSC再聚集(10a)以及体外培养24-72小时(10b、10c)之后人类卵巢皮质组织的直接(活细胞)GFP荧光分析。注意在类似卵泡的致密结构中被更小的GFP阴性细胞围绕的较大的单一GFP阳性细胞的形成(图10b和10c;比例尺,50 μ m)。显示了在用GFP-hOSC注射并且异种移植到NOD/SCID雌性小鼠中的成年人类卵巢皮质组织中包含GFP阳性卵母细胞的不成熟卵泡的实例(通过黑色箭头突出显示,相对于苏木精复染色)(图10d,移植后1周;图10f,移植后2周)。注意在同一移植物中具有GFP阴性卵母细胞的同样的卵泡。作为阴性对照,在GFP-hOSC注射和异种移植(10e)之前或在异种移植之前接受了媒介物注射(无GFP-hOSC)(10g)的人类卵巢皮质组织中的所有不成熟卵泡在处理之后均包含GFP阴性卵母细胞,以用于与上文所示样品平行的GFP检测。图10h显示了在接受GFP-hOSC注射的异种移植物中GFP表达和双线期卵母细胞特异性标记MSY2或卵母细胞转录因子LHX8的双重免疫荧光分析。注意的是,在GFP-hOSC注射之前在移植物中未检测到GFP,而在所有卵母细胞中均检测到MSY2和LHX8。切片用DAPI复染色以便将细胞核可视化。比例尺,25 μ m。

[0092] 图11描绘了在GFP-hOSC移植之后人类卵巢异种移植物中卵母细胞形成的基于形态测量的评定。显示了在注射GFP-hOSC并且异种移植到NOD/SCID小鼠中之后7天,在3份随机选择的人类卵巢皮质组织样品(标记为1、2以及3)中的原始和初级卵泡的总数目,它们包

含GFP阴性(宿主来源的)或GFP阳性(OSC来源的)卵母细胞(例如参见图10d到10g)。

[0093] 图12描绘了人类卵巢皮质组织和新鲜分离的人类OSC的冷冻保存和解冻。图12a和12b显示了在玻璃化之前和之后成年人类卵巢皮质组织的组织学外观,突出显示了组织完整性的维持和在冷冻-解冻程序后存活的大量卵母细胞(黑色箭头)。在图12c中,显示了在新鲜分离的人类OSC冷冻-解冻之后的细胞损失百分比(来自两位不同的患者的结果)。

[0094] 图13描绘了自体种系线粒体能量转移(Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer, AUGMENT)程序的概述。注意的是,用作供转移的线粒体的来源的OSC以及将接受OSC线粒体的待受精的卵子是从同一位受试者获得的。

[0095] 图14描绘了在从同一位患者获得的培养的人类卵巢体细胞和培养的人类OSC中用MitoTracker绿色FM(Invitrogen M7514,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)进行的线粒体染色。

[0096] 图15描绘了来自培养的OSC和患者匹配的卵巢体细胞的mtDNA中4977bp缺失的PCR分析。

[0097] 图16描绘了ATP测定的结果。

[0098] 图17描绘了在雌性生殖周期动情期期间使用Vasa的细胞表面表达从成年雌性小鼠的骨髓制剂分离细胞而进行的基于FACS的生殖细胞纯化或分离。

[0099] 图18描绘了在雌性生殖周期动情期期间使用Vasa的细胞表面表达从成年雌性小鼠的外周血制剂分离细胞而进行的基于FACS的生殖细胞纯化或分离。

[0100] 图19描绘了在用mitotracker M7514染色并且进行细胞溶解之后的线粒体。将人类OSC与M7514一起孵育,并且然后使用渗透冲击溶解以释放被染色的线粒体。通过FACS分析整个群体(来自溶解的细胞和残余未溶解的染色的细胞的线粒体)。左图显示了来自溶解的细胞的线粒体,这些线粒体可基于大小容易地与残余未溶解的细胞中所包含的线粒体相区分(正向散射;FSC-A)。荧光强度(FITC-A)揭示了来自溶解的细胞的两个不同的线粒体群体,一个具有高强度(Mito MT高),并且一个具有低强度(Mito MT低)。已知功能线粒体具有更多的染色剂吸收和保留,并且因此在更高强度下发荧光(英杰技术人员,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)。

[0101] 图20描绘了从不同人类细胞类型分离的线粒体的ATP产生能力的动力学。

[0102] 图21描绘了在10分钟内从不同人类细胞类型分离的线粒体的ATP产生能力。

[0103] 图22描绘了在人类间充质干细胞和人类卵巢体细胞中的mtDNA缺失分析。

[0104] 发明详细说明

[0105] 定义

[0106] 除非另外定义,在此使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。如果发生冲突,将以包括定义在内的本申请为准。

[0107] “卵原干细胞”(OSC),也称为雌性种系干细胞,来源于产后来源并且表达多种标记,包括Vasa、Oct-4、Dazl、Stella以及任选地SSEA。OSC具备有丝分裂能力(即,能够有丝分裂)并且不表达卵母细胞标记,所述卵母细胞标记包括生长/分化因子-9(“GDF-9”)和透明带糖蛋白(例如透明带糖蛋白-3,“ZP3”),或减数分裂重组的标记,如联会复合体蛋白-3(“SYCP3”或“SCP3”)。OSC可以从产后的卵巢获得。OSC是本领域中已知的并且描述于美国专利号7,955,846中,所述专利的全部内容通过引用结合在此。OSC另外由以下各文献描述:约

约翰逊(Johnson)等人,自然,428:145-150;约翰逊等人,细胞(Cell)2005122:303-315;王(Wang)等人,细胞周期(CellCycle)20109:339-349;新仓(Niikura)等人,衰老(Aging)20102:999-1003;蒂莉(Tilly)等人,生殖生物学,200980:2-12,蒂莉等人,分子人类生殖学,200915:393-398;邹(Zou)等人,自然细胞生物学(Nat Cell Biol)200911:631-636;帕基亚罗蒂(Pacchiarotti)等人,分化(Differentiation)201079:159-170,这些文献的内容通过引用结合在此。优选地,本发明的OSC是人类OSC。

[0108] 如在此所使用的,“OSC子代”是指来源于本发明的OSC的所有子代细胞,包括维持或实现生卵潜能(即,形成卵母细胞的能力)的祖细胞和分化的细胞以及功能线粒体。优选地,本发明的OSC子代是人类OSC子代。

[0109] 如在此所使用的,术语“功能线粒体”是指产生ATP的线粒体,并且可以与术语“呼吸的线粒体”可互换地使用。

[0110] 另外地可以从骨髓、外周血或脐带血获得OSC。骨髓来源的本发明OSC还可以在全身循环,并且最优选地可以定位于骨髓、外周血以及卵巢中。骨髓来源的OSC表达多种标记,包括Oct4、Vasa、Dazl、Stella、Fragilis、以及任选地Nobox、Kit及Sca-1。骨髓来源的OSC具备有丝分裂能力(即,能够有丝分裂)并且不表达GDF-9、透明带蛋白(例如,ZP3)或SCP3。关于骨髓来源的OSC的另外的细节,参见美国专利公开号20060010509,所述专利中有关骨髓中的OSC的说明的全部内容通过引用结合在此。关于外周血和脐带血来源的OSC的另外的细节,参见美国专利公开号20060015961,所述专利中有关外周血中的OSC的说明的全部内容通过引用结合在此。

[0111] Oct-4,也称为POU域第5类转录因子1或Pou5f1,是表达在雌性种系干细胞和其祖细胞中的基因。Oct-4基因编码转录因子,所述转录因子涉及哺乳动物种系的建立并且在早期生殖细胞特化中起显著作用(评述于舒勒(Scholer),遗传学趋势,19917(10):323-329中)。在正在发育的哺乳动物胚胎中,Oct-4在上胚层分化期间下调,最终变得局限于生殖细胞谱系。在所述种系中,Oct-4的表达与外胚层的表达是分开进行调控的。Oct-4的表达是全能性的表型标记(耶姆(Yeom)等人,发育(Development)1996122:881-888)。

[0112] Stella,通常也称为发育多能性相关3或Dppa3,是表达在雌性种系干细胞和其祖细胞中的基因。Stella是在原始生殖细胞和其后代(包括卵母细胞)中特异性表达的新颖基因(博尔特温(Bortvin)等人,BMC发育生物学(BMC Developmental Biology)20044(2):1-5)。Stella编码具有SAP样域和剪接因子基序样结构的蛋白质。Stella表达缺乏的胚胎在植入前发育中受损并且很少达到囊胚阶段。因此,Stella是涉及早期胚胎发生的母体因子。

[0113] Dazl是表达在雌性种系干细胞和其祖细胞中的基因。常染色体基因Dazl是包含共有RNA结合域的基因家族的成员并且表达在生殖细胞中。在鼠中的完整Dazl蛋白的表达的丢失与生殖细胞无法完成减数分裂前期相关。确切地说,在没有Dazl的雌性小鼠中,在胎儿期期间在生殖细胞进展到减数分裂前期的同时,发生了生殖细胞的丢失。在没有Dazl的雄性小鼠中,生殖细胞不能进展超过减数分裂前期I的细线期。因此,在不存在Dazl的情况下,进展到减数分裂前期被中断(桑德斯(Saunders)等人,生殖(Reproduction)20031126:589-597)。

[0114] Vasa,也称为DEAD盒多肽4(“DEAD”被披露为SEQ ID NO:1)或Ddx4,是表达在雌性种系干细胞和其祖细胞中的基因。Vasa是编码DEAD家族(“DEAD”被披露为SEQ ID NO:1)ATP

依赖性RNA解旋酶的种质的组分(梁(Liang)等人,发育,1994120:1201-1211;拉斯科(Lasko)等人,自然,1988335:611-167)。Vasa的分子功能是针对结合在生殖细胞建立(例如Oskar和Nanos)、卵子发生(例如Gruken)以及翻译起始中所涉及的目标mRNA(加维斯(Gavis),发育,1996110:521-528)。Vasa是极细胞形成所需要的,并且在整个发育中仅局限于生殖细胞谱系。因此,Vasa是大多数动物种类中的生殖细胞谱系的分子标记(年明(Toshiaki)等人,细胞结构和功能(Cell Structure and Function)200126:131-136)。

[0115] 阶段特异性胚胎抗原任选地表达在雌性种系干细胞中并且表达在本发明的雌性种系干细胞的祖代中。阶段特异性胚胎抗原-1(SSEA-1)是细胞表面胚胎抗原,其功能与细胞粘附、迁移以及分化相关。在内胚层形成期间,可以在囊胚腔和内胚层中鉴定到SSEA-1阳性细胞并且随后在生殖新月(germinal crescent)中鉴定到。SSEA-1在早期生殖细胞和神经细胞发育中起作用(德科斯塔(D'Costa)等人,国际发育生物学杂志(IntJ.Dev.Biol),199943(4):349-356;亨德森等人,干细胞(Stem Cells)200220:329-337)。在具体实施例中,SSEA在雌性种系干细胞中的表达可以随着细胞分化而发生。在本发明中有用的SSEA包括SSEA-1、-2、-3以及-4。

[0116] 如在此所使用的术语“自体的”是指从同一位受试者获得的生物组合物。在一个实施例中,所述生物组合物包括OSC、OSC衍生的组合物以及卵母细胞(即,成熟卵母细胞)。因此,在进行本发明的方法时,用于转移的雌性生殖细胞的细胞质或线粒体以及上文提到的组合物被转移到其中的受体卵母细胞是从同一位受试者获得的。

[0117] 如在此所使用的术语“分离的”是指OSC、线粒体或衍生自OSC的组合物(例如,细胞质、线粒体制剂),已从其天然生物环境中物理地分离或移出。分离的OSC、线粒体或组合物不必是纯化的。

[0118] 如在此所使用的术语“外源的”是指所转移的细胞物质(例如,线粒体)是从一个细胞移出并且被转移到另一个细胞中。例如,已转移到卵母细胞中的OSC衍生的线粒体,即使两者是来源于同一位受试者,也将是外源的。

[0119] “受试者”是哺乳动物纲的任何胎生成员,包括人类、家养和农场动物,以及动物园、运动类或宠物动物,如小鼠、兔、猪、绵羊、山羊、牛以及高等灵长类动物。

[0120] 如在此所使用的,术语“高育龄”在它涉及人类时是指34岁或更大年龄的女性。如在此所使用的,术语“卵母细胞相关性不孕症”在它涉及人类时是指在一年的无保护性交之后不是由解剖学异常(例如阻塞的输卵管)或病理状态(例如子宫肌瘤、重度子宫内膜异位症、II型糖尿病、多囊卵巢病)引起的不能受孕。

[0121] 如在此所使用的,术语“低卵巢储备功能”在它涉及人类时是指女性展现出以下情形:如斯克特(Scott)等人,在生育与不孕(Fertility and Sterility),198951:651-4中所描述,在“第3天FSH测试”中循环促卵泡激素(FSH)水平大于15miu/ml;或循环抗苗勒管激素(AMH)水平小于0.6ng/ml;或如由超声波所测量,窦状卵泡计数小于7。

[0122] 在本披露中,“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“含有”以及“具有”等可以具有将它们归于美国专利法中的含义,并且可以意指“包括(includes)”、“包括(including)”等等;“主要由…组成(consisting essentially of)”或“主要由…组成(consists essentially)”同样具有归于美国专利法中的含义,并且所述术语是开放式的,允许超过所列举的内容的存在,只要所列举的内容的基础或新颖特征不会因超过所列举的

内容的存在而改变即可,但将现有技术实施例排除在外。

[0123] 如在此所使用的术语“降低的(reduced)”或“降低(reduce)”或“减少(decrease)”通常表示如与一个参考水平相比,减少了至少5%,例如减少了至少大约10%,或至少大约20%,或至少大约30%,或至少大约40%,或至少大约50%,或至少大约60%,或至少大约70%,或至少大约80%,或至少大约90%或高达并且包括100%在内的减少(即,实质上不存在或低于检测水平),或介于5%-100%之间的任何减少,如所述术语在此所定义的,并且如通过获得统计学显著性($p < 0.05$)的方法所确定的。

[0124] 如在此所使用的术语“增加”通常表示如与一个参考水平相比,增加了至少5%,例如增加了至少大约10%,或至少大约20%,或至少大约30%,或至少大约40%,或至少大约50%,或至少大约60%,或至少大约70%,或至少大约80%,或至少大约90%或高达并且包括100%在内的增加(即,实质上超过检测水平),或介于5%-100%之间的任何增加,如所述术语在此所定义,并且如通过获得统计学显著性($p < 0.05$)的方法所确定的。

[0125] 如在此所使用的“ATP产生或制造的增加”是指ATP的制造量是一个参考水平中的ATP制造量的至少约1倍(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、1000、10,000倍或更多倍),如所述术语在此所定义。ATP的制造可以通过本领域中已知的标准方法测量。

[0126] 如在此所使用的,“高ATP产生能力的线粒体”是指具有高线粒体膜电位的线粒体,如通过可以区分高与低(或介于高与中等/低之间)的膜电位的探针所确定的。鉴定具有高线粒体膜电位的线粒体的方法是使用荧光探针5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑基羰花青碘化物(JC-1, Invitrogen T3168, 加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司(Life Technologies Corp., Carlsbad, CA)),所述荧光探针在高质量线粒体中发红色-橙色荧光(590nm)但在中等和/或低质量线粒体中发绿色荧光(510-520nm)。(参见例如,加纳(Garner)等人,生殖生物学,199757:1401-1406;雷尔斯(Reers)等人,生物化学(Biochemistry)199130:4480-4486;Cossariza等人,生物化学与生物物理研究通讯(Biochem Biophys Res Commun)1993197:40-45;斯麦利(Smiley)等人,美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)199188:3671-3675)。

[0127] 如在此所使用的,术语“标准”或“参考”是指在与另一份样品相比较的已知样品中测量的生物参数,包括(但不限于)如非整倍性、突变、染色体排列异常、减数分裂纺锤体异常和/或线粒体功能障碍(聚集,受损的ATP产生)等缺陷,或者这些缺陷的减少或消除;可替代地,标准可以仅仅是代表所测量的生物参数的量值的参考数字,它定义了供比较的基线。所述参考数字可以来源于从个体、或多名个体或由其获得的细胞(例如卵母细胞、OSC)取得的样品。也就是说,“标准”不必是所测试的样品,但可以是认可的参考数字或值。考虑个体的状况,例如关于年龄、性别、体重、身高、种族背景等等,可以开发一系列标准。标准水平可以例如从来自不同个体(例如,不是正在被测试的个体)的已知样品获得。也可以通过汇集来自多名个体(或由其获得的细胞)的样品以在平均的群体内产生标准而获得已知样品。另外地,可以合成标准以使得使用一系列标准来定量在个体的样品中的生物参数。来自待测试的个体的样品可以在一个更早的时间点(大概在处理开始之前)获得,并且充当与在处理开始之后从同一个体取得的样品相比较的标准或参考。在这样的情况下,所述标准可以提供治疗功效的量度。在具体实施例中,“标准”或“参考”是卵巢体细胞(例如,从具有功能性

生殖系统的雌性受试者获得的年龄匹配的卵巢体细胞)或年龄匹配的间充质干细胞。

[0128] 在此提供的范围应当被理解为对所述范围内的所有值的简写。例如,1到50的范围应当被理解为包括来自下组的任何数字、数字的组合、或子范围,所述组由以下各项组成:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50。

[0129] 其他定义呈现在本披露全篇的上下文中。

[0130] 本发明的组合物和方法

[0131] OSC的分离

[0132] 可以使用本领域中已知的小型腹腔镜手术获得成体卵巢皮质组织以收集较小(例如 $3\times 3\times 1\text{mm}$)的卵巢皮质活检标本,然后处理所述卵巢皮质活检标本以用于OSC分离。参见古克(Gook)等人,人类生殖,200420(1):72-78。

[0133] 可以如在实例1、图1中所描述或如本领域中先前所描述、或使用相当的技术进行从成体卵巢皮质组织分离人类OSC。参见例如,美国专利公开号20060010508的第0116段,和邹等人,自然细胞生物学,20095:631-6,电子出版2009年4月12日。也可以从非卵巢来源(如骨髓或外周血)获得OSC。可以通过本领域中已知的用于从例如骨髓或血液中分离干细胞的标准手段(例如细胞分选术)分离骨髓和外周血来源的OSC。任选地,所述分离方案包括产生造血细胞耗尽的kit⁺/lin⁻部分。基于OSC中的基因表达(例如Vasa、Oct-4、Dazl、Stella、Fragilis)的特征曲线的另外的选择手段可以被用来进一步纯化或分离所希望的细胞群体,并且减少或消除在这些细胞群体从其获得的生物样品(例如骨髓、外周血)中的其他细胞和物质。例如,已将实例1,图1b中描述的方法应用于血细胞和骨髓细胞的单核部分以从非卵巢来源获得纯化或分离的OSC。简言之,将细胞与兔抗VASA抗体(ab13840;马萨诸塞州剑桥的艾碧康公司(Abcam,Cambridge,MA))一起孵育20分钟,洗涤,并且与结合别藻蓝蛋白(APC)的山羊抗兔IgG一起孵育20分钟,并且再次洗涤。洗脱液中的标记细胞是通过荧光激活细胞分选术(FACS),使用BD生物科学公司(BD Biosciences)的FACS Aria II细胞计数器(马萨诸塞州波士顿的哈佛干细胞研究所(Harvard Stem Cell Institute,Boston,MA))针对阴性(未染色和无初级抗体)对照进行门控而分离的。在刚好在分选之前,将碘化丙啶添加到细胞悬液中以排除死细胞。使用Vasa的细胞表面表达从非卵巢来源分离OSC所获得的结果提供于图17和18中,其中显示了在雌性生殖周期动情期期间来自成年雌性小鼠的骨髓和外周血制剂的基于FACS的生殖细胞纯化。

[0134] OSC衍生的组合物的制备以及转移方法

[0135] 用于制备和转移线粒体的方法是本领域中已知的并且可以如本领域中先前所述或使用相当的技术进行。参见例如,佩雷斯(Perez)等人,细胞死亡与分化(Cell Death and Differentiation)20073:524-33,电子版2006年10月13日,和佩雷斯等人,自然,2000,403:500-1,这些文献各自的内容通过引用结合在此。简言之,可以如上所述分离和培养OSC。在一种方法中,当OSC培养物达到80%汇合时,将2ml的线粒体溶解缓冲液(0.3M蔗糖、1mM EDTA、5mM MOPS、5mM KH₂PO₄、0.1%BSA)添加到每块板中,并且使用细胞刮刀将细胞移出。将细胞悬液转移到一个小的玻璃组织匀浆器(douncer)中并且均质化,直到调均为止(大约10次上下的撞击),并且将溶解物在4℃在600g下离心30分钟。移出上清液,并且将其在4℃在10,000g下旋转12分钟,并且使所得粗线粒体片状沉淀物再悬浮于0.2ml的0.25M蔗糖中。

然后将这个样品在用0.25M蔗糖稀释的25%-60%Percoll密度梯度内分层,并且在17℃在40,000g下离心20分钟。从所述梯度中萃取界面带并且在2个体积的0.25M蔗糖中洗涤,随后在4℃在14,000g下最终离心10分钟以产生线粒体片状沉淀物。

[0136] 线粒体片状沉淀物也可以如弗雷扎(Frezza)等人,自然实验手册(Nature Protocols)20072:287-295所描述来制备,所述文献的内容通过引用结合在此。在本发明的具体实施例中,在组织、细胞、溶解细胞或其部分中的总OSC来源的线粒体群体可以使用一种基于FACS的方法,用荧光探针进行分离、表征和/或计数,所述荧光探针以线粒体膜电位(MMP)非依赖性方式特异性结合到线粒体上。以一种MMP非依赖性方式特异性结合到线粒体上的荧光探针包括(但不限于)积累依赖性探针(例如JC-1(红色光谱;Invitrogen T3168,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)、MitoTracker深红FM(Invitrogen M22426,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)以及JC-1(绿色光谱;Invitrogen T3168,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)。可以基于大小和荧光强度,使用指示线粒体质量的线粒体跟踪探针,包括(但不限于)非氧化依赖性探针(例如MitoTracker绿色FM(Invitrogen M7514,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)),进行分选并收集功能性(例如呼吸)线粒体,优选地将残余的未溶解的细胞和非功能线粒体排除在外。关于用非氧化依赖性探针进行FACS的示例性方案的细节提供于下文实例9中。任选地,还可以使用基于FACS的方法,使用线粒体膜荧光探针来选择性产生基本上纯的功能性(例如呼吸)线粒体群体,所述线粒体膜荧光探针以MMP依赖性方式特异性结合到线粒体上。以MMP依赖性方式特异性结合到线粒体上的荧光探针包括(但不限于)氧化还原态mitotracker探针(例如MitoTracker红色CM-H2XRos(Invitrogen M7513,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)和MitoTracker橙色CM-H2TMRos(Invitrogen M7511,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)。此外,可以进行使用MMP依赖性和MMP非依赖性探针的双标记来定量在组织、细胞、溶解细胞或来源于它们的部分中的功能线粒体与总线粒体的比率。在具体实施例中,所述比率大于大约0.02、0.025、0.033、0.04、0.05、0.1、或大约0.2。当基于MMP使用用于示差筛选的探针时,光谱颜色是指定功能线粒体的主要决定因素,并且可以使用正向散射来区分从溶解细胞释放的荧光线粒体与仍然包含在残余未溶解的细胞中的荧光线粒体。

[0137] 还可以如由泰勒(Taylor)等人,自然生物技术(Nat. Biotechnol.)200321(3):239-40;汉森(Hanson)等人,电泳(Electrophoresis.)200122(5):950-9;以及汉森等人,生物化学杂志(J. Biol. Chem.)2001276(19):16296-301所描述来制备线粒体片状沉淀物。在本发明的具体实施例中,可以使用差速离心方法(如在此在实例10所描述的方法)或使用蔗糖梯度分离程序(如在此在实例11所描述的程序)将组织、细胞、溶解细胞或其部分中的总OSC来源的线粒体群体进行分离、表征和/或计数。

[0138] 在分离之后,可以根据本领域中已知的方法(杜兰(Duran)等人,生育与不孕,201196(2):384-388;阿拉尔(Aral)等人,遗传学与分子生物学(Genetics and Molecular Biology)201033:1-4;陈(Chan)等人,分子人类生殖,200511(12):843-846;陈等人,BMC医学遗传学(BMC Medical Genetics)201112:8以及实例8)进行线粒体功能或mtDNA完整性(例如突变和缺失)的评定。现在可以根据本发明的方法获得根据功能参数(例如MMP依赖性/活性或MMP非依赖性/活性加上无活性)分选的线粒体或来自不太优选的OSC来源(包括有限大小的样品)的线粒体的群体。本发明的线粒体组合物可以产生例如每fgmtDNA大约

1pmol ATP到每fgmtDNA大约6pmol ATP(例如每fgmtDNA大约1、2、3、4、5或6pmol ATP)。在具体实施例中,在大约10分钟到大约15分钟内每fgmtDNA产生的ATP在大约1.0pmol到1.4pmol之间。

[0139] 线粒体群体中的突变百分比可以通过以下方式评定:首先确定存在于生物样品中的线粒体数目,并且接着,确定存在于所述样品中的线粒体DNA的拷贝数。可以采用标准突变分析并且与线粒体的数目和线粒体DNA的拷贝数相比较,从而计算线粒体群体中的突变百分比。例如,本发明的组合物和方法可以提供线粒体群体,其中小于大约5%到大约25%(例如大约5%、10%、15%、20%到大约25%)的线粒体DNA包含在线粒体基因组的核苷酸8470-13447之内的缺失突变。

[0140] 根据本领域中已知的方法将待注射的物质(例如线粒体悬液)转移到显微注射针中。可以使用Sutter拉制仪(美国加利福尼亚州诺瓦托的萨特仪器公司(Sutter Instruments,Novato,CA,USA))和De Fonbrune 显微拉制仪(美国康涅狄格州东格兰比的EB科学公司(EB Sciences,East Granby,CT,USA))制造显微注射针和固定吸管。显微注射针具有5 μ m的内径,具有钝的尖端。待注射的物质通过负压吸引而被吸到所述针中。可以注射介于大约 1×10^3 到大约 5×10^4 个之间的来自OSC或其子代的线粒体(例如大约1、2、3、4、5、6、7、8到 9×10^3 ;大约1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9到大约 5×10^4 个线粒体)。可以使用Piezo显微操作器将在蔗糖中的线粒体悬液(例如5-7p1,包含大约 1×10^3 - 5×10^4 个来自OSC或其子代的线粒体)注射到卵母细胞中。将在显微注射程序之后存活的卵母细胞转移以用于培养以及任选地在体外受精或子宫内授精之前的评定或冷冻保存。卵母细胞冷冻保存的方法是本领域中熟知的。关于细节,参见例如,波尔库(Porcu)等人,分子与细胞内分泌学(Molecular and Cellular Endocrinology)2000169:33-37;曼德尔鲍姆(Mandelbaum),人类生殖,200015:43-47;以及法布里(Fabbri)等人,分子与细胞内分泌学,2000169:39-42,这些文献的内容通过引用结合在此。

[0141] 用于制备和转移无核细胞质部分的方法是本领域中已知的并且可以如先前所描述来进行。参见例如,科恩等人,分子人类生殖学,19984:269-80,所述文献的内容通过引用结合在此。简言之,在一种方法中,在卵子提取后大约4小时,使受体卵子暴露于0.1%的透明质酸酶,并且选择成熟卵子用于注射。用细口径吸管移出所有冠细胞。可以通过将OSC卵质体与完整MII卵母细胞电融合来进行卵胞质转移。在暴露于0.1%的透明质酸酶之后,使用显微枪(microspear)机械地打开带区(zonae)。使OSC在37 $^{\circ}$ C下暴露于包含细胞松弛素B(CCB;美国密苏里州圣路易斯的西格玛化学公司(Sigma Chemical Co.,St Louis,MO,USA))的hHTF培养基持续10分钟。取决于其敏感性,人类MII卵母细胞的分配涉及可变的细胞松弛素B浓度(约2.5mg/ml)。不同大小的卵质体是通过将封闭在质膜中的一部分卵质取出而从OSC分离的。在将OSC来源的卵质体插入到从中去除了极体的受体卵子的卵周隙中之后,在甘露糖醇溶液中进行排列和电融合。这可以用直径为约30-40 μ m的宽口径抛光微型工具来进行。将卵质体吸入所述微型工具中,并且一旦所述工具被放置到卵周隙深处时就将其释放。将在电融合程序之后存活的卵母细胞转移以用于培养以及任选地在体外受精或子宫内授精之前的评定或冷冻保存。

[0142] 可替代地,常规胞质内精子注射(ICSI)方法可以与无核细胞质部分或分离的线粒体的转移结合使用。参见例如,科恩等人,分子人类生殖学,19984:269-80,所述文献的内容通过引用结合在此。作为一个实例,使用显微枪在极体区上方机械地打开受体卵子的带区。在将卵母细胞再定位于固定吸管上之后移出极体,以此方式使得可以使用闭合的显微枪切开带区。使用相同位置在已经包含极体的区域左侧约90°插入卵质体。使用同一工具将带区紧密切合。在ICSI之前,洗涤电融合的细胞并且在mHTF中孵育40-90分钟。将精子固定在10%的聚乙烯吡咯酮(PVP)中以用于ICSI。所述程序是在hHTF中进行的,同时孔口的短边处于大约3点钟处。将ICSI工具移动通过人工间隙以便避免在标准ICSI期间在带区的缺口上挤出卵质。体外受精的方法是本领域中熟知的。通常首先对夫妇进行评估以诊断其特定的不育问题。这些问题的范围可能从伴侣双方原因不明性不孕(不育)到女性的严重问题(例如导致输卵管不通畅并伴有不规则月经周期的子宫内膜异位症或者多囊卵巢病)或男性的严重问题(例如精子计数低并伴有形态异常,或因具有脊髓病变、逆行射精或逆向输精管切除术而不能正常射精)。这些评估的结果也决定了对于每对夫妇进行的具体程序。

[0143] 这些程序通常始于给予药物来下调下丘脑/垂体系统(GnRH激动剂)。这个过程降低了促性腺激素的血清浓度,并且使发育中的卵巢滤泡退化,由此在发育的较早阶段提供一组新的卵泡。这允许在不存在被下丘脑垂体轴的影响的情况下通过给予外源性促性腺激素而更精密地控制这些新卵泡的成熟。通过使用超声波每日观察和血清雌二醇测定来监测生长卵泡(通常每个卵巢刺激四到十个)的成熟进展和数目。当这些卵泡达到排卵前的大小(18-21mm)并且雌二醇浓度持续线性上升时,通过外源给予人绒毛膜促性腺素(hCG)来启动排卵反应。

[0144] 在移植程序之后,可以对单独的卵母细胞进行形态学评估并且将其转移到含有培养基和热灭活血清的皮氏培养皿中。由男性伴侣提供精液样品,并且使用“向上游(swim up)”程序进行处理,由此将获得最具活性的活动精子用于授精。如果女性的输卵管存在,那么此时可以进行称为GIFT(配子输卵管内转移)的程序。通过这种方法,将被精子包围的卵母细胞-卵丘复合体通过腹腔镜检查直接放置到输卵管中。这个程序极佳地模拟了事件的正常顺序并且允许在输卵管内发生受精。并不意外的是,GIFT具有最高的成功率,其中在1990年经历卵子提取的3,750名患者中有22%分娩活胎。替代程序ZIFT(受精卵输卵管内转移)允许在卵子提取次日选择有待转移到输卵管中的体外受精的受精卵。额外的受精卵此时可以被冷冻保存以用于将来转移或用于捐赠给无雌配子的夫妇。然而,具有更严重的不育问题的大多数患者将需要在培养物中孵育另外的一到两天,使得可以选择处于早期卵裂状态的植入前胚胎用于转移到子宫或输卵管中。这种IVF-UT(体外受精子宫转移)程序需要若干2-6个细胞(第2天)或8-16个(第3天)植入前胚胎经子宫颈转移到子宫的宫底(4-5个植入前胚胎提供最佳的成功)。

[0145] 用于体外受精的程序还描述于美国专利号6,610,543、6,585,982、6,544,166、6,352,997、6,281,013、6,196,965、6,130,086、6,110,741、6,040,340、6,011,015、6,010,448、5,961,444、5,882,928、5,827,174、5,760,024、5,744,366、5,635,366、5,691,194、5,627,066、5,563,059、5,541,081、5,538,948、5,532,155、5,512,476、5,360,389、5,296,375、5,160,312、5,147,315、5,084,004、4,902,286、4,865,589、4,846,785、4,845,077、4,832,681、4,790,814、4,725,579、4,701,161、4,654,025、4,642,094、4,589,402、4,339,

434、4,326,505、4,193,392、4,062,942以及3,854,470中,关于它们的这些程序的说明将这些专利的内容特别地通过引用结合。

[0146] 可替代地,患者可以选择将包含外源的自体OSC线粒体的卵母细胞再植入并且使用子宫内授精(IUI)进行体内受精。IUI是熟知的方法,它涉及制备高度浓缩量的活性活动精子并且将其通过子宫颈直接递送到子宫中。存在若干可用于制备用于IUI的的技术。首先,从精液中分离出精子。一种精子分离的方法被称为“密度梯度分离法”。在这种技术中,通过使用粘稠溶液将活动精子与死亡精子和其他细胞分离。在制备之后,通过使用薄的柔性导管将精子浓缩物通过子宫颈放置到子宫中,并且接着进行再植入的卵母细胞的受精。

[0147] 通过提供本发明的更好理解和本发明的许多优点的以下说明性的非限制性实例另外地描述本发明。

[0148] 实例

[0149] 在此,采用了经过确认的方案来证明OSC可以从健康年轻女性的组织可靠地分离并且进行体外增殖以便在后续临床程序中使用。以下实例仅仅是出于说明性的目的而提出并且不旨在限制发明人认为是其发明的内容的范围。

[0150] 实例1:用于OSC分离的基于FACS的方案

[0151] 被邹(Zou)等人,自然细胞生物学,200911:631-636用于通过免疫磁性分选法分离小鼠OSC的VASA抗体是针对人类VASA的COOH端最后25个氨基酸(DDX4)的兔多克隆抗体(ab13840;马萨诸塞州剑桥的艾碧康公司)。这个区域与小鼠VASA的相应区域(MVH)共享96%的总同源性。为了比较研究,使用了针对人类VASA的NH₂端的前145个氨基酸(所述区域与小鼠VASA的相应区域共有91%的总体同源性)的山羊多克隆抗体(AF2030;明尼苏达州明尼阿波利斯的安迪生物公司(R&D Systems,Minneapolis,MN))。

[0152] 使用任一抗体的年轻成年(2个月大)小鼠卵巢的免疫荧光分析显示如所预期的限定于卵母细胞的相同的VASA表达谱(图1a)。然后,使用各抗体进行分散的年轻成年小鼠卵巢组织的免疫磁性分选(邹等人,自然细胞生物学,200911:631-636)。对于每次细胞制备,将来自4只小鼠的卵巢汇集并且通过切碎接着进行两步酶消化而解离,所述两步酶消化涉及与800U/ml胶原酶[IV型;制备在不含钙和镁的汉克平衡盐溶液(HBSS)中]一起孵育15分钟,接着与0.05%的胰蛋白酶-EDTA一起孵育10分钟。在1 μ g/ml的DNase-I(密苏里州圣路易斯的西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO))存在下进行消化,以使细胞制剂内的粘性降到最低,并且通过添加10%的胎牛血清(FBS;Hyclone,马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific,Inc.,Waltham,MA))来中和胰蛋白酶。通过70 μ m的尼龙筛网将卵巢分散质过滤,并且在由1%的无脂肪酸牛血清白蛋白(BSA;密苏里州圣路易斯的西格玛-奥德里奇公司)以及1%的正常山羊血清(马萨诸塞州比勒瑞卡的EMD密理博公司(EMD Millipore,Billerica,MA);用于使用针对VASA-COOH的ab13840的后续反应)或1%的正常驴血清(密苏里州圣路易斯的西格玛-奥德里奇公司;用于使用针对VASA-NH₂的AF2030的后续反应)组成的溶液在HBSS中在冰上封闭20分钟。然后使细胞在冰上与识别COOH端(ab13840)或NH₂端(AF2030)的VASA抗体的1:10稀释液反应20分钟。然后,在HBSS中将细胞洗涤2次,并且在冰上与山羊抗兔IgG结合的微珠粒(德国格拉德巴赫的美天施公司(Miltenyi,Gladbach,Germany);ab13840检测)或生物素结合的驴抗山羊IgG

(加利福尼亚州圣克鲁斯的圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); AF2030检测)的1:10稀释液一起孵育20分钟,接着与链霉亲和素结合的微珠粒(德国格拉德巴赫的美天旎公司)一起孵育。在HBSS中再一次洗涤之后,将细胞制剂加载到MACS柱上并且根据制造商的说明书(德国格拉德巴赫的美天旎公司)进行分离。对于可视化潜在的抗体-珠粒与单独的卵母细胞的相互作用的实验,通过注射孕马血清促性腺激素(PMSG, 10IU; 密苏里州圣路易斯的西格玛-奥德里奇公司),接着在46-48小时后注射人绒毛膜促性腺素(hCG, 10IU; 密苏里州圣路易斯的西格玛-奥德里奇公司)而使成年雌性小鼠超数排卵。在hCG注射之后15-16小时,从输卵管收集卵母细胞,使用透明质酸酶(加利福尼亚州圣安娜的欧文科学公司(Irvine Scientific, Santa Ana, CA))剥去卵丘细胞并且用补充有BSA的人类输卵管液(HTF; 加利福尼亚州圣安娜的欧文科学公司)进行洗涤。将分散的卵巢细胞或分离的卵母细胞封闭并且与如上所描述针对VASA的初级抗体一起孵育。在HBSS中洗涤之后,使细胞与结合于2.5 μ m的Dynabeads (Invitrogen, 加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)的物种适当的二级抗体反应。将悬液放置于1.5ml的艾本德管(Eppendorf tube)中,以便使用Dyna1 **MPC[®]-S**磁性粒子浓缩器(加利福尼亚州卡尔斯巴德的Dyna1生命技术公司)进行分离。

[0153] 当使用VASA-NH₂抗体时,在珠粒部分中未获得细胞;然而,当使用VASA-COOH抗体时,观察到结合到磁性珠粒上的5-8 μ m的细胞(图1b)。这些细胞的分析揭示了与关于先前由邹等人,自然细胞生物学,200911:631-636使用免疫磁性分选法分离的OSC所报导一致的种系基因表达谱(图2)。虽然使用VASA-COOH抗体总是在非免疫反应洗涤部分中检测到平行评定的分离的卵母细胞(图1b),通过免疫磁性分选法获得的VASA阳性细胞部分的另外的标记分析揭示了包括Nobox、Zp3以及Gdf9在内的若干卵母细胞特异性mRNA(图2)。这些发现指示,虽然卵母细胞在作为单独的实体分析时不展现VASA的细胞表面表达(图1b),在来自分散的卵巢组织的OSC的免疫磁性分选之后,卵母细胞仍然是污染细胞类型。这个结果很可能反映了在珠粒离心步骤期间卵母细胞的非特异性物理遗留或在质膜受损的(损害的)卵母细胞中的细胞质VASA与COOH抗体的反应性。任一情况都将通过使用FACS而缓解。

[0154] 接下来,通过FACS评定每种抗体与分散的小鼠卵巢细胞的反应性。对于每次实验,将卵巢组织(小鼠:汇集的4个卵巢;人类:10 $\times$ 10 $\times$ 1mm厚,仅皮质)解离、封闭并且与如上所描述的初级抗体(用于VASA-COOH的ab13840或用于VASA-NH₂的AF2030)反应。在用HBSS洗涤之后,将细胞与结合于Alexa Fluor488的山羊抗兔IgG(Invitrogen, 加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司; ab13840检测)或结合于Alexa Fluor488的驴抗山羊IgG(Invitrogen, 加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司; AF2030检测)的1:500稀释液一起在冰上孵育20分钟,并且用HBSS洗涤。然后,再次将标记的细胞过滤(35 μ m孔径)并且通过FACS使用FACS Aria II细胞计数器(新泽西州富兰克林湖的BD生物科学公司, 贝康顿迪金森公司(BD Biosciences, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ); 哈佛干细胞研究所(Harvard Stem Cell Institute))针对阴性(未染色的并且没有初级抗体)对照进行门控来分选。在即将进行分选之前,将碘化丙啶添加到细胞悬液中以排除死细胞。收集新鲜分离的VASA阳性活细胞用于基因表达谱分析、畸胎瘤形成能力评定或体外培养。对于一些实验,将细胞固定于2%的中性缓冲多聚甲醛(PFA)中并且用0.1%的Triton-X100透化,随后与针对VASA的NH₂端的初级抗体(AF2030)反应,并且在与结合于Alexa Fluor488的

驴抗山羊IgG反应之后通过FACS进行检测。对于再分选实验,使活细胞与VASA-COOH抗体(ab13840)反应并且在与结合于别藻蓝蛋白(APC)的山羊抗兔IgG(宾夕法尼亚州西格罗夫的杰克逊免疫研究实验室公司(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove PA))反应之后通过FACS进行分选。然后所得APC阳性(VASA-COOH阳性)活细胞被保持完整或者被固定和透化,随后与VASA-NH₂抗体(AF2030)一起孵育,接着与结合于Alexa Fluor488的驴抗山羊IgG一起孵育并且进行FACS分析。

[0155] 与磁性珠粒分选结果一致,仅当使用COOH抗体时获得活的VASA阳性细胞(图1c)。然而,如果卵巢细胞在FACS之前被透化,使用NH₂抗体获得VASA阳性细胞群体(图1c)。此外,如果将使用COOH抗体通过FACS分离的活的VASA阳性细胞透化和再分选,则相同的细胞群体被VASA-NH₂抗体识别(图1d)。作为证实这种OSC分离法的有效性的最终手段,使用针对生殖细胞的标记(Blimp1/Prdm1, Stella/Dppa3, Fragilis/Ifitm3, Tert, Vasa, Dazl)和针对卵母细胞的标记(Nobox, Zp3, Gdf9)的组合通过基因表达分析来评定在所述方案的每个步骤的细胞部分。为了获得用于FACS的细胞,将卵巢组织切碎并且使用胶原酶和胰蛋白酶进行酶促消化,使其通过70 μ m的过滤器以去除大组织团块,并且然后使其通过35 μ m的过滤器以获得最终的细胞部分。除了通过FACS获得的VASA阳性活细胞部分之外,所述方案每个步骤中的每个细胞部分均表达所有种系和卵母细胞标记(图1f)。虽然FACS分选的VASA阳性细胞部分表达所有种系标记,但未检测到卵母细胞标记(图1f)。因此,不同于在使用VASA-COOH抗体通过免疫磁性分选法分离OSC时观察到的卵母细胞污染(参见图2),使用这种相同抗体通过FACS提供了获得不含卵母细胞的成体卵巢来源的OSC部分的优异策略。

[0156] 实例2:从人类卵巢分离OSC

[0157] 在签署了书面知情同意书的情况下,在埼玉医疗中心(Saitama Medical Center)从用于性别重置的患有性别认同障碍的6名年龄在22-33(28.5 $\pm$ 4.0)岁之间的女性患者手术移出卵巢。小心地将外部皮质层去除,使其玻璃化并且冷冻保存(香川(Kagawa)等人,生殖生物学(Reprod. Biomed.)2009在线,18:568-577;图12)。简言之,将1mm厚的皮质片段切成100mm²(10 $\times$ 10mm)的数片,在包含7.5%的乙二醇(EG)和7.5%的二甲亚砷(DMSO)的平衡溶液在26 $^{\circ}$ C下孵育25分钟,并且然后在包含20%的EG、20%的DMSO以及0.5M的蔗糖的玻璃化溶液在26 $^{\circ}$ C下孵育15分钟,随后浸没入液氮中。对于实验分析,冷冻保存的卵巢组织使用Cryotissue解冻试剂盒(日本静岡富士市的北里生物制药公司(Kitazato Biopharma, Fuji City, Shizuoka, Japan))解冻并且立即处理以用于组织学、异种移植术或OSC分离。使用COOH抗体,也通过FACS从年龄在22-33岁之间的所有患者的人类卵巢皮质组织活检标本中一致地分离出直径在5-8 μ m之间的活的VASA阳性细胞,其中产率百分比(相对于分选的总活细胞1.7% $\pm$ 0.6% VASA阳性;平均值 $\pm$ SEM, n=6))与来自平行处理的年轻成年小鼠卵巢的OSC的产率(相对于分选的总活细胞1.5% $\pm$ 0.2% VASA阳性;平均值 $\pm$ SEM, n=15)相当。这个产率百分比是这些细胞在通过FACS分选的最终活的单细胞池中的发生率,它代表在处理之前在卵巢中存在的总细胞数的分数。为了估算每个卵巢的OSC发生率,确定了1.5-2个月大的小鼠每个卵巢的基因组DNA含量(1,774.44 $\pm$ 426.15 μ g;平均值 $\pm$ SEM, n=10)并且除以每个卵巢每个分选的活细胞部分的基因组DNA含量(16.41 $\pm$ 4.01 μ g;平均值 $\pm$ SEM, n=10)。假定每个细胞的基因组DNA含量是相等的,确定总卵巢细胞池中有多少是由处理之后获得的总的活的分选细胞部分代表的。使用这一校正因数,估算出每个卵巢的OSC发

生率为 $0.014\% \pm 0.002\% [0.00926 \times (1.5\% \pm 0.2\%)]$ 。关于OSC产率,这一数字在重复测定之间变化,但在最初从4个卵巢池制备的分散质的FACS之后一致地获得每个成体卵巢在250个与略微超过1,000个之间的活VASA阳性细胞。

[0158] 从小鼠和人类卵巢两者(图3a、3b)新鲜分离的VASA阳性细胞的分析揭示了相似的大小和形态学(图3c、3d)以及富含针对早期生殖细胞的标记的相匹配的基因表达谱(斋藤(Saitou)等人,自然,2002418:293-300;小日向(Ohinata)等人,自然,2005436:207-213;多尔奇(Dolci)等人,细胞科学(Cell Sci.)2002115:1643-1649)(Blimp1、Stella、Fragilis以及Tert;图3e)。这些结果与科学文献(邹等人,自然细胞生物学,200911:631-636,帕基亚罗蒂等人,分化,201079:159-170)中所报导的小鼠OSC的形态学和基因表达谱一致。

[0159] 为了进一步定义从成体卵巢获得的VASA阳性细胞的特有特征,使用体内畸胎瘤形成试验来测试小鼠OSC。这是很重要的,因为一项近期的研究已报道了来自具有胚胎干细胞(ESC)和诱导性多能干细胞(iPSC)的畸胎瘤形成能力的成年小鼠卵巢的Oct3/4-阳性干细胞的分离(龚(Gong)等人,生育与不孕,201093:2594-2601)。如上所描述,从总共100只年轻的成年雌性小鼠收集卵巢,将其解离并且使其经受FACS以便分离VASA-COOH阳性活细胞。将新鲜分离的小鼠OSC皮下注射到NOD/SCID雌性小鼠的后腰部附近(每只小鼠注射 1×10^5 个细胞)。作为对照,将小鼠胚胎干细胞(mESC v6.5)平行注射到年龄匹配的雌性小鼠中(每只受体小鼠注射 1×10^5 个细胞)。每周监测小鼠的肿瘤形成情况,持续长达6个月。

[0160] 正如所预期的,用作阳性对照的移植有小鼠ESC的小鼠的100%在3周之内产生畸胎瘤;然而,在平行移植有从成年小鼠卵巢分离的VASA阳性细胞的小鼠中,即使在移植后24周也未观察到畸胎瘤(图3f-k)。因此,虽然OSC表达许多干细胞和原始生殖细胞标记(邹等人,自然细胞生物学,200911:631-636,帕基亚罗蒂等人,分化,201079:159-170;也参见图1f和图3e),但这些细胞与迄今为止所描述的其他类型的多能干细胞明显不同。

[0161] 实例3:从FACS纯化的小鼠OSC产生卵母细胞

[0162] 通过逆转录病毒转导而被工程化成表达GFP的FACS纯化的小鼠OSC(在其确立为体外仅活跃分裂的生殖细胞的培养物之后)在移植到成年雌性小鼠的卵巢中之后产生卵母细胞的能力进行评定。为了确保所获得的结果反映移植的细胞稳定整合到卵巢中并且也不合并对生殖腺的移植前诱导的损伤,将 1×10^4 个表达GFP的小鼠OSC注射到2个月大的经过非化学疗法调节的野生型受体的卵巢中,并且将动物维持5-6个月,随后进行分析。用外源性促性腺激素(单次腹膜内注射PMSG(10IU),接着在46-48小时后hCG(10IU))诱导年龄在7-8个月之间的经过移植的动物排卵,此后收集它们的卵巢和释放到输卵管中的任何卵母细胞。将排卵的卵丘-卵母细胞复合体转移到补充有0.4%的BSA的HTF中,并且通过直接荧光显微术针对GFP表达进行评定。在接受了最初通过FACS纯化的表达GFP的小鼠OSC的雌性的卵巢中,可容易地检测到包含GFP阳性卵母细胞的发育卵泡以及包含GFP阴性卵母细胞的卵泡(图4a)。

[0163] 在输卵管冲洗之后,观察到包含围绕中央定位的缺乏和表达GFP的两种卵母细胞的扩大卵丘细胞的复合体。这些复合体与来自野生型雄性的精子混合导致植入前胚胎的受精和发育。对于体外受精(IVF),将附睾尾和输精管从成年野生型C57BL/6雄性小鼠中移出并且放置到补充有BSA的HTF培养基中。通过用镊子轻轻地挤压组织获得精子,在37℃下将其催熟持续1小时,并且然后与卵丘-卵母细胞复合体混合(在补充有BSA的HTF培养基中每

毫升 $1-2 \times 10^6$ 个精子)持续4-5小时。然后从授精的卵母细胞洗掉精子并且转移到新鲜培养基中。在授精后4-5小时,将卵母细胞(受精的和未受精的)转移到50 μ l滴的KSOM-AA培养基(加利福尼亚州圣安娜的欧文科学公司)中,并且用矿物油覆盖这些滴以支持进一步植入前胚胎发育。每24小时进行光和荧光显微镜检查,持续总共144小时,以监测胚胎发育到孵化囊胚阶段(Selesniemi等人,美国国家科学院院刊,2011108:12319-12324)。将从输卵管收集排卵的卵母细胞时所收获的卵巢组织固定并且处理,以便使用针对GFP的小鼠单克隆抗体(sc9996,加利福尼亚州圣克鲁斯的圣克鲁斯生物技术公司)以及MOMTM试剂盒(加利福尼亚州伯林盖姆的维克多实验室(Vector Laboratories,Burlingame,CA))对GFP表达进行免疫组织化学检测,如先前详述的(李(Lee)等人,临床肿瘤学杂志(J.Clin.Oncol.)200725:3198-3204)。来自未经过移植的野生型雌性小鼠和来自TgOG2转基因雌性小鼠的卵巢分别用作阴性和阳性对照,用于GFP检测。

[0164] 来源于受精的GFP阳性卵子的植入前胚胎在孵化囊胚阶段中保持GFP表达(图4b-d)。从先前5-6个月移植有表达GFP的OSC的5只成年野生型雌性小鼠,从输卵管提取了总共31个卵丘-卵母细胞复合体,其中23个成功地受精产生胚胎。在每个卵母细胞周围的卵丘细胞的存在使得不可能精确地测定相对于排卵的GFP阳性卵母细胞的GFP阴性卵母细胞的数目。然而,对于在体外受精(IVF)之后产生的23个胚胎的评估揭示,有8个是GFP阳性的,并且所测试的所有5只小鼠在排卵时释放了至少一个卵子,所述卵子受精从而产生GFP阳性胚胎。这些发现指示,通过基于VASA-COOH抗体的FACS分离或纯化的OSC,如同其先前报导的通过免疫磁性分选法分离的对应物(邹等人,自然细胞生物学,200911:631-636)一样,在体内产生了功能性卵母细胞。然而,我们的数据还显示,在移植之前进行化学疗法调节,如同先前报导的(邹等人,自然细胞生物学,200911:631-636)一样,不需要在成体卵巢组织中移入并且产生功能性卵母细胞的OSC。

[0165] 实例4:候选人类OSC的体外表征

[0166] 使用先前针对小鼠OSC的体外繁殖所描述的参数(邹等人,自然细胞生物学,200911:631-636),将成年小鼠和人类卵巢来源的VASA阳性细胞放置于以有丝分裂失活的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)作为滋养物(feeder)的特定的培养物中。简言之,将细胞培养于MEM α (Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)中,所述MEM α 补充有10%的FBS(Hyclone,马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司)、1mM的丙酮酸钠、1mM的非必需氨基酸、1 $\times$ 浓缩青霉素-链霉素-谷氨酰胺(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)、0.1mM的 β -巯基乙醇(密苏里州圣路易斯的西格玛公司(Sigma,St.Louis,MO))、1 $\times$ 浓缩N-2补充剂(明尼苏达州明尼阿波利斯的安迪生物公司)、白血病抑制因子(LIF;10³个单位/毫升;马萨诸塞州比勒瑞卡的EMD密理博公司)、10ng/ml的重组人类表皮生长因子(rhEGF;Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)、1ng/ml的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF;Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)以及40ng/ml的胶质细胞来源的神经营养因子(GDNF;明尼苏达州明尼阿波利斯的安迪生物公司)。每隔一天通过添加40-80 μ l的新培养基来更新培养物,并且每两周将细胞再次平板接种到新鲜MEFS上。为了评定增殖,将无MEF的OSC培养物用10 μ M的BrdU(密苏里州圣路易斯的西格玛-奥德里奇公司)处理48小时,随后固定于2%的PFA中,以便进行针对BrdU掺入(有丝分裂活性细胞)和VASA表达(生殖细胞)的基于双重免疫荧光的检测,如所描述的(邹等人,自然细

胞生物学,200911:631-636)。如果省去初级抗体或用正常兔血清的等效稀释液置换时,未检测到信号(未显示)。

[0167] 新鲜分离的OSC可以被确立为无性系,并且未接种到MEF上的人类OSC的集落形成效率在0.18%到0.40%范围内。不能使用MEF作为初始滋养物进行集落形成效率的精确评定,其中后者大大有助于体外小鼠和人类OSC的确立。在10-12周(小鼠)或4-8周(人类)培养完之后,活跃分裂的生殖细胞集落变得显而易见(图5)。一旦被确立并且进行增殖,这些细胞可以在不存在MEF情况下再确立为仅有生殖细胞的培养物而不丧失增殖潜能。在无MEF培养物中的VASA表达和溴脱氧尿苷(BrdU)结合的双重分析揭示了大量的双阳性细胞(图6a-d),证实了成年小鼠和人类卵巢来源的VASA阳性细胞正在活跃地分裂。在这个阶段,小鼠细胞需要每4-5天在汇合时进行传代,其中培养物按1:6-1:8分开(14小时的估算倍增时间;图6e)。小鼠OSC增殖的速率比平行维持的人类生殖细胞的增殖速率高大约2-3倍,其中后者需要每7天在汇合时进行传代,其中培养物按1:3-1:4分开。在数月的增殖之后,VASA的细胞表面表达在超过95%的细胞的表面上仍然是可检测的(图6f)。使用VASA-COOH抗体通过FACS未检测到的剩余细胞是在培养期间由小鼠和人类OSC自发产生的较大(直径为35-50 μ m)的球形细胞,这些细胞展现出VASA的细胞质表达并且详细地描述于实例5中。

[0168] 培养的细胞的基因表达分析证实了早期种系标记的维持(图6g)。在这些培养物中也检测到若干卵母细胞特异性标记。使用**SuperScript®**VILO™ cDNA合成试剂盒(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)和Platinum Taq聚合酶(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)通过RT-PCR评定mRNA的水平。将所有产物测序以证实身份。使用的正向和反向引物的序列以及相应基因的GenBank登录号提供于表1(小鼠)和表2(人类)中。

[0169] 表1.用来分析小鼠细胞和组织样品中的基因表达的PCR引物。

[0170]

基因	登录号	引物序列(5'到3'; F, 正向; R, 反向)	SEQ NO	ID	大小 (bp)
<i>Blimp1</i>	NM_007548	F: CGGAAAGCAACCCAAAGCAATAC	2		483
		R: CCTCGGAACCATAGGAAACATTC	3		
<i>Stella</i>	NM_139218	F: CCCAATGAAGGACCCTGAAAC	4		354
		R: AATGGCTCACTGTCCCGTTCA	5		
<i>Fragilis</i>	NM_025378	F:	6		151

[0171]

		GTTATCACCATTGTTAGTGTCATC		
		R: AATGAGTGTTACACCTGCGTG	7	
<i>Tert</i>	NM_009354	F: TGCCAATATGATCAGGCACTCG	8	305
		R: ACTGCGTATAGCACCTGTCACC	9	
<i>Vasa</i>	NM_001145885	F: GGAAACCAGCAGCAAGTGAT	10	213
		R: TGGAGTCCTCATCCTCTGG	11	
<i>Dazl</i>	NM_010021	F: GTGTGTGCGAAGGGCTATGGAT	12	328
		R: ACAGGCAGCTGATATCCAGTG	13	
<i>Msy2</i>	NM_016875	F: CCTCCCCACTTTCCCATAAAT	14	235
		R: AATGGGTGGGGAAGAAAAAC	15	
<i>Sycp3</i>	NM_011517	F: AGCAGAGAGCTTGGTCGGG	16	100
		R: TCCGGTGAGCTGTCGCTGTC	17	
<i>mcl</i>	NM_010059.2	F: CTCACGCTTCCACAACAAGA	18	81
		R: TCTCGGGGCTGTCATAAATC	19	
<i>Nobox</i>	NM_130869	F: CCCTTCAGTCACAGTTTCCGT	20	379
		R: GTCTCTACTCTAGTGCCTTCG	21	
<i>Lhx8</i>	NM_010713	F: CGTCAGTCCCAACCATTCTT	22	157
		R: TTGTTGGTGAGCATCCATGT	23	
<i>Gdf9</i>	NM_008110	F: TGCCTCCTTCCCTCATCTTG	24	709
		R: CACTTCCCCCGCTCACACAG	25	
<i>Zp1</i>	NM_009580	F: GTCCGACTCCTGCAGAGAAC	26	208
		R: TGATGGTGAAGCGCTGATAG	27	
<i>Zp2</i>	NM_011775	F: AAGGTCTTGAGCAGGAACGA	28	152
		R: GGGTGGAAAGTAGTGCGGTA	29	
<i>Zp3</i>	NM_011776	F: CCGAGCTGTGCAATTCCCAGA	30	183
		R: AACCCCTCTGAGCCAAGGGTGA	31	
β -肌动蛋白	NM_007393	F: GATGACGATATCGCTGCGCTG	32	440
		R: GTACGACCAGAGGCATACAGG	33	

[0172] 表2. 用来分析人类细胞和组织样品中的基因表达的PCR引物。

[0173]

基因	登录号	引物序列 (5'到3'; F, 正向; R, 反向)	SEQ NO	ID	大小 (bp)
<i>Blimp1</i>	NM_001198	F: AAACATGACCGGCTACAAGACCT	34		332
		R: GGCACACCTTGCAATTGGTATGGTT	35		
<i>Stella</i>	NM_199286	F: AGCAGTCCTCAGGGAAATCGA	36		276

[0174]

		AGA		
		R: TATGGCTGAAGTGGCTTGGTG TCT	37	
<i>Fragilis</i>	NM_021034	F: ATGTCGTCTGGTCCCTGTTC	38	205
		R: GGGATGACGATGAGCAGAAT	39	
<i>Tert</i>	NM_198253	F: AGACGGTGTGCACCAACATCT ACA	40	271
		R: TGTCGAGTCAGCTTGAGCAGG AAT	41	
<i>Vasa</i>	NM_024415	F: TTGTTGCTGTTGGACAAGTGG GTG	42	283
		R: GCAACAAGAACTGGGCACTTT CCA	43	
<i>Dazl</i>	NM_0011908 11	F: TCGAACTGGTGTGTCCAAAGG CTA	44	260
		R: TAGGATTCATCGTGGTTGTGG GCT	45	
<i>Msy2</i>	NM_015982	F: ACCCTACCCAGTACCCTGCT	46	248
		R: GCAAGAAAAGCAACCAGGAG	47	
<i>Sycp3</i>	NM_0011779 49	F: TATGGTGTCTCCGGAAAAA	48	238
		R: AACTCCAACCTCCTCCAGCA	49	
<i>Nobox</i>	NM_0010804 13	F: ATAAACGCCGAGAGATTGCCC AGA	50	375
		R: AAGTCTGGTCAGAAGTCAGCA GCA	51	
<i>Lhx8</i>	NM_0010019 33	F: CAAGCACAATTTGCTCAGGA	52	230
		R: GGCACGTAGGCAGAATAAGC	53	
<i>Gdf9</i>	NM_005260	F: TCACCTCTACAACACTGTTCG GCT	54	344
		R: AAGGTTGAAGGAGGCTGGTC	55	

[0175]

		ACAT		
<i>Zp1</i>	NM_207341	F: CGCCATGTTCTCTGTCTCAA	56	219
		R: CGTTTGTTCACATCCCAGTG	57	
<i>Zp2</i>	NM_003460	F: TCTTCTTCGCCCTTGTGACT	58	217
		R: CTCAGGGTGAGCTTTTCTGG	59	
<i>Zp3</i>	NM_001110354	F: AGCAGGACCCAGATGAACTCAACA	60	274
		R: AAGCCCACTGCTCTACTTCATGGT	61	
β -肌动蛋白	NM_001101	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC	62	250
		R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT	63	

[0176] 为了扩展Blimp1、Stella以及Fragilis的mRNA分析,进行这三种经典的原始种系标记的免疫荧光分析(斋藤等人,自然,2002418:293-300;小日向等人,自然,2005436:207-213)。对于培养的OSC的分析,用1×浓磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗涤细胞,在20℃下在2%的PFA中固定45分钟,用PBS-T(包含0.01%的Triton-X100的PBS)洗涤3次,并且在20℃下在阻断缓冲液(包含2%的正常山羊血清和2%的BSA的PBS)中孵育1小时。细胞接着在20℃下与以下初级抗体之一的1:100稀释液一起孵育1小时:一种针对BLIMP1的生物素化的小鼠单克隆抗体(ab81961,马萨诸塞州剑桥的艾碧康公司)、一种针对STELLA的兔多克隆抗体(ab19878;马萨诸塞州剑桥的艾碧康公司)或一种针对FRAGILIS的兔多克隆抗体(小鼠:ab15592,人类:ab74699;马萨诸塞州剑桥的艾碧康公司)。洗涤细胞并且在20℃下在罗丹明-鬼笔环肽(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)存在下与链霉亲和素结合的Alexa Fluor488(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司;BLIMP1检测)或结合于Alexa Fluor488的山羊抗兔IgG(STELLA和FRAGILIS检测)的1:500稀释液一起孵育30分钟。洗涤细胞,将其与4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI;密苏里州圣路易斯的西格玛-奥德里奇公司)一起孵育,并且再洗涤3次,随后成像。在将初级抗体省去或用正常血清置换时,未检测到信号(未显示)。

[0177] 对于由小鼠和人类OSC在体外产生的卵母细胞的评定,从培养物上清液中收集单独的卵母细胞,洗涤,在37℃下用含有0.5%BSA的2%PFA固定45分钟,洗涤,并且在20℃下在含有0.5%的BSA和5%的正常山羊血清(VASA或LHX8检测)或1%的正常驴血清(c-KIT检测)任一者的PBS中封闭1小时。在封闭之后,在20℃下将卵母细胞与以下初级抗体之一的1:100稀释液(在具有0.5%BSA的PBS中)一起孵育2小时:针对c-KIT的山羊多克隆抗体(sc1494,加利福尼亚州圣克鲁斯的圣克鲁斯生物技术公司)、针对VASA的兔多克隆抗体(ab13840,马萨诸塞州剑桥的艾碧康公司)或针对LHX8的兔多克隆抗体(ab41519,马萨诸塞州剑桥的艾碧康公司)。然后洗涤细胞,并且将其与结合于Alexa Fluor568(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)或Alexa Fluor488(LHX8检测)的山羊抗兔IgG的1:250稀释液、或结合于Alexa Fluor488的驴抗山羊IgG的1:250稀释液(c-KIT检测)一起孵育

育。洗涤细胞,将其与DAPI一起孵育,并且另外洗涤3次,随后成像。如果将初级抗体省去或用正常血清置换时,未检测到信号。

[0178] 对于这些后面的实验,卵巢组织切片中的VASA、c-KIT以及对于人类卵巢来说的LHX8的卵母细胞特异性表达的检测用作阳性对照。将小鼠和人类卵巢组织固定于4%的PFA中,石蜡包埋并且切片(6 μ m),随后使用0.01M的柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)进行高温抗原修复。在冷却之后,洗涤切片,并且在20℃下使用含有1%的正常山羊血清(VASA-COOH或LHX8检测)或1%的正常驴血清(VASA-NH₂或c-KIT检测)的任一者的TNK缓冲液(0.1M Tris-HCl、0.55M NaCl、0.1mMKCL、0.5%BSA以及0.1%Triton-X100,在磷酸盐缓冲盐水中)封闭1小时。然后将切片在4℃下与初级抗体的1:100稀释液(在具有1%的正常血清的TNK缓冲液中)一起孵育过夜,在PBS中洗涤,并且在20℃下与结合于Alexa Fluor568的山羊抗兔IgG(人类卵巢中的VASA-COOH检测)、结合于Alexa Fluor488的山羊抗兔IgG(小鼠卵巢中的VASA-COOH或者LHX8的检测)或结合于Alexa Fluor488的驴抗山羊IgG(c-KIT或VASA-NH₂检测)的1:500稀释液一起孵育30分钟。在用PBS洗涤之后,使用含有DAPI的Vectashield(维克多实验室(Vector Labs))将切片用盖玻片盖住(cover-slipped)。如果将初级抗体省去或用正常血清置换时,未检测到信号。

[0179] 在体外维持的小鼠(图6h)和人类(图6i)OSC中容易并且均一地检测到所有三种蛋白质。值得注意的是,在这些细胞中的FRAGILIS的检测与一项近期研究一致,所述研究报告,还可以使用这种蛋白质,通过免疫磁珠分选术从小鼠卵巢分离OSC(邹等人,干细胞与发育(Stem Cells Dev.)2011doi:10.1089/scd.2011.0091)。

[0180] 实例5:候选人类OSC的体外生卵能力

[0181] 与来自他人的结果(帕基亚罗蒂等人,分化,201079:159-170)一致,体外培养的小鼠OSC自发地产生大的(直径为35-50 μ m)球形细胞,通过形态学(图7a)和基因表达分析(图7b、c)发现这些细胞类似卵母细胞。在每次传代之后24-48小时之内观察到来自小鼠OSC的体外卵子发生的峰值水平(图7d),接着每次OSC恢复汇合时进行性下降到几乎不可检测的水平。从成年人类卵巢分离并且在体外维持的VASA阳性细胞的平行分析揭示,与小鼠OSC一样,这些细胞也自发地产生卵母细胞,如从形态学(图7f)和基因表达(图7c、g)分析两者中推断出的。人类OSC与小鼠OSC的体外卵子发生的动力学的微小差异在于在每次传代之后72小时观察到卵母细胞形成的峰值水平(图7e)。除了许多广泛认可的卵母细胞标记(Vasa、c-Kit、Nobox、Lhx8、Gdf9、Zp1、Zp2、Zp3;(铃森(Suzumori)等人,发育机制(Mech.Dev.)2002111:137-141;贾科维奇(Raikovic)等人,科学,2004305:1157-1159;潘加斯(Pangas)等人,美国国家科学院院刊,200603:8090-8095;埃尔文(Elvin)等人,分子内分泌学(Mol.Endocrinol.)199913:1035-1048;郑(Zheng)等人,生殖医学文集(Semin.Reprod.Med.)200725:243-251)的检测之外,小鼠和人类OSC来源的卵母细胞还表达双线期卵母细胞阶段特异性标记Msy2(图7c)。MSY2是爪蟾FRGY2的哺乳动物同源物,它是结合生殖细胞特异性核酸的Y框蛋白,对于两种性别中的减数分裂进展和配子发生是必不可少的(顾(Gu)等人,生殖生物学,199859:1266-1274;杨(Yang)等人,美国国家科学院院刊,2005102:5755-5760)。通过使用成年人类卵巢皮质组织作为阳性对照进行的可商购的抗体的经验检验,鉴定出四种针对卵母细胞标记(VASA、c-KIT、MSY2、LHX8;图8)的这类抗体,这些抗体与存在于成年人类卵巢中的不成熟卵母细胞特异性反应;也在人类OSC体外产生的卵母细胞中检测到所有

四种这些蛋白质(图7g)。

[0182] 在人类OSC体外新形成的卵母细胞中编码减数分裂标记MSY2的mRNA的存在促使我们接着探索这些培养物中减数分裂进入的前景。在传代之后72小时粘附的(非卵母细胞种系)细胞的免疫荧光分析鉴定出具有减数分裂特异性DNA重组酶DMC1和减数分裂重组蛋白联会复合体蛋白3(SYCP3)的点状核定位的细胞(图7h)。两种蛋白质均为生殖细胞特异性的并且为减数分裂重组所需要的(佩奇(Page)等人,细胞和发育生物学年鉴(Annu. Rev. Cell Dev. Biol.)200420:525-558;袁(Yuan)等人,科学,2002296:1115-1118;香川等人,FEBS杂志(FEBSJ.)2010277:590-598)。

[0183] 测定了在传代之后72小时的人类OSC培养物的染色体DNA含量分析。通过胰蛋白酶消化收集培养的小鼠(在传代之后48小时)或人类(在传代之后72小时)OSC,将其洗涤并且再悬浮于冰冷的PBS中,并且用血细胞计数器计数。在冰冷的70%乙醇中固定1小时之后,在冰冷的PBS中洗涤细胞并且在37℃下将其与0.2mg/ml的RNase-A一起孵育1小时。然后添加碘化丙啶(最终为10μg/ml),并且使用BD生物科学公司的FACSAria II细胞计数器确定倍性状态。作为对照体细胞系,使用人类胎肾成纤维细胞(HEK293,Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司)重复这些实验。这一分析揭示了预期的二倍体(2n)细胞群体的存在;然而,检测到对应于4n和1n细胞群体的多个峰,后者指示生殖细胞已达到单倍体状态(韦斯特(West)等人,干细胞与发育,201120:1079-1088)(图7i)。在作为对照平行分析的人类胎肾成纤维细胞的活跃分裂的培养物中,仅检测到2n和4n细胞群体(图9a)。在小鼠OSC培养物的基于FACS的染色体分析之后观察到相当的结果(图9b)。

[0184] 实例6:人类OSC在人类卵巢皮质组织中体内产生卵母细胞

[0185] 为了证实和扩展候选人类OSC的推定的卵子发生的体外观察结果,在两项最终实验中,用GFP表达载体(GFP-hOSC)稳定地转导从成年人类卵巢分离的VASA阳性细胞以有助于细胞跟踪。对于细胞跟踪实验,使用逆转录病毒转导人类OSC以获得具有GFP稳定表达的细胞(GFP-hOSC)。简言之,按照制造商的方案(Lipofectamine,Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司),将1μg的pBabe-Gfp载体DNA(Addgene质粒储存库号10668)转染到Platinum-A逆转录病毒包装细胞系(加利福尼亚州圣地亚哥的细胞生物实验室公司(Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA))中。在转染之后48小时收集病毒上清液。使用由聚凝胺(5μg/ml;密苏里州圣路易斯的西格玛-奥德里奇公司)的存在来促进的新鲜病毒上清液进行人类OSC的转导。在48小时之后,去除病毒并且用新鲜OSC培养基置换。在最初1周的扩充之后通过FACS纯化或分离表达GFP的人类OSC,并且使纯化或分离的细胞扩充另外的2周,随后进行第二轮FACS纯化或分选,从而获得GFP-hOSC以用于人类卵巢组织再聚集或异种移植实验。

[0186] 在第一个实验中,然后将大约 1×10^5 个GFP-hOSC与分散的成年人类卵巢皮质组织再聚集。如上所描述,将人类卵巢皮质解离并且洗涤,并且在37℃下与35μg/ml的植物血凝素(PHA;密苏里州圣路易斯的西格玛公司)加 1×10^5 个GFP-hOSC一起孵育10分钟。通过离心(在20℃下9,300×g持续1分钟)使细胞混合物形成片状沉淀物以产生组织聚集体,将所述组织聚集体放置到包含在具有1ml OSC培养基的6孔培养皿中的Millicell 10.4μm插入式培养皿(马萨诸塞州比勒瑞卡的EMD密理博公司)上。在37℃下在5%CO₂-95%空气中孵育聚集体,并且在24、48以及72小时后进行活细胞GFP成像。

[0187] 正如所预期的,观察到遍及再聚集组织的许多GFP阳性细胞(图10a)。然后将聚集体放置于培养物中,并且在24-72小时后通过直接(活细胞)GFP荧光进行评定。在24小时之内,在聚集体中同样观察到若干个非常大的($\geq 50\mu\text{m}$)单细胞,其中有许多被更小的GFP阴性细胞封闭在类似卵泡的坚固致密结构中;这些结构经过72小时仍然可检测到(图10b、c)。这些发现指示,表达GFP的人类OSC自发地产生卵母细胞,这些卵母细胞变得被存在于成年人类卵巢分散质中的体(前颗粒/颗粒)细胞封闭。

[0188] 接下来,将GFP-hOSC注射到成年人类卵巢皮质组织活检标本中,然后将其异种移植到NOD/SCID雌性小鼠中(n =总共40个移植物)。使用具有35号斜面针的10 μl NanoFil注射器(佛罗里达州萨拉索塔的世界精密仪器公司(World Precision Instruments, Sarasota, FL))向卵巢皮质组织片($2\times 2\times 1\text{mm}$)单独地注射大约 1.3×10^3 个GFP-hOSC。将受体NOD/SCID雌性小鼠麻醉,并且沿背侧面制造小切口以用于皮下插入人类卵巢组织,基本上如所描述(韦斯曼(Weissman)等人,生殖生物学,199960:1462-1467;马蒂凯宁(Matikainen)等人,自然·遗传学(Nature Genet.)200128:355-360)。在移植后7或14天之后移出异种移植物,固定于4%的PFA中,将其用石蜡包埋并且进行连续切片($6\mu\text{m}$),以便使用针对GFP的小鼠单克隆抗体(sc9996;加利福尼亚州圣克鲁斯的圣克鲁斯生物技术公司)进行免疫组织化学分析(李等人,临床肿瘤学杂志,200725:3198-3204)。简言之,首先使用0.01M的柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)进行高温抗原修复。在冷却之后,将切片与在甲醇中的3%过氧化氢的一起孵育10分钟以封闭内源性过氧化物酶活性,洗涤,并且按照制造商的方案(加利福尼亚州伯林盖姆的维克多实验室)在链霉亲和素-生物素预封闭溶液中孵育。然后在20℃下使用含有1%正常山羊血清的TNK缓冲液将切片封闭1小时,并且在4℃下与制备在含有1%正常山羊血清的TNK缓冲液中的GFP抗体的1:100稀释液一起孵育过夜。然后洗涤切片,在20℃下将其与山羊抗小鼠生物素化二级抗体的1:500稀释液一起孵育30分钟,洗涤,并且使其在20℃下与Vectastain ABC试剂(LabVision,马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司)反应30分钟,随后使用二氨基联苯胺(丹麦格洛斯楚普的大科公司(DAKO Glostrup, Denmark))检测GFP阳性细胞。用苏木精将切片轻度复染色以将细胞和组织构造可视化。阴性对照(针对接受媒介物注射的异种移植的组织的完全免疫组织化学染色方案)总是平行运行并且不显示阳性信号。为了证实并且扩展这些观察结果,用DAPI复染色法进行异种移植的人类卵巢组织中的GFP和MSY2(双线期卵母细胞特异性标记)或LHX8(早期卵母细胞转录因子)的基于双重免疫荧光的检测,如先前在免疫分析的说明中所详述。

[0189] 在7天或14天后收集移植物以用于GFP表达的评定。所有人类卵巢移植物均包含可容易地辨别的原始和初级卵泡,这些卵泡具有中央定位的GFP阴性卵母细胞。交错分散在这些卵泡之中并且通常邻近这些卵泡(推测起来,这些卵泡在GFP-hOSC注射之前存在于所述组织中)是包含GFP阳性卵母细胞的其他不成熟卵泡(图10d、f)。注射有GFP-hOSC的3个随机选择的人类卵巢组织活检标本的连续切片组织形态学分析揭示,在异种移植到小鼠中之后7天,每个移植物存在15-21个GFP阳性卵母细胞(图11)。作为对照,在GFP-hOSC注射之前在人类卵巢皮质组织中(图10e)或在移植到NOD/SCID小鼠中之前在接受了模拟注射(没有GFP-hOSC的媒介物)的异种移植物中(图10g)从未检测到GFP阳性卵母细胞。GFP以及双线期卵母细胞特异性标记MSY2(顾等人,生殖生物学,199859:1266-1274;杨等人,美国国家科学院院刊,2005102:5755-5760)或卵母细胞特异性转录因子LHX8(潘加斯等人,美国国家科学

院院刊,2006103:8090-8095)的基于双重免疫荧光的检测鉴定出遍及分布在注射有GFP-hOSC的异种移植物的许多双阳性细胞(图10h)。正如所预期的,在GFP-hOSC注射之前在卵巢组织中或在未接受GFP-hOSC注射的异种移植体中未检测到GFP阳性卵母细胞(未显示;参见图10e、g);然而,这些卵母细胞对于LHX8和MSY2一致地呈阳性(图10h;图8)。

[0190] 实例7:在自体种系线粒体能量转移(“AUGMENT”)中使用OSC

[0191] 图13描绘了使用OSC作为雌性生殖细胞的自体来源以用于衍生出生卵细胞质或线粒体部分的概述,然后这些生卵细胞质或线粒体部分可以在体外受精(IVF)之前或期间被转移到从同一位受试者获得的卵母细胞中。所得到的在AUGMENT之后在卵子中的线粒体DNA拷贝数和ATP产生能力的提高确保了卵母细胞具有充足的ATP储备以用于成功受精和胚胎发育所需要的能量驱动事件。通过AUGMENT而提供给卵母细胞的另外的线粒体是来源于被身体用来产生卵母细胞的天然前体细胞。此外,基于数据,另外的线粒体将不会在卵母细胞中产生不良作用,这些数据显示,即使在超过胚胎发育所需线粒体的最小阈值数几乎四倍时健康胚胎发生也会进行(参见Wai等人,生殖生物学,201083:52-62,图6)。先前由科恩等人,分子人类生殖学,19984:269-80所报道的异源卵胞质转移(不适于人类使用的程序,因为它导致在胚胎/后代中的种系遗传操作和线粒体异质性)的有益作用指示,卵母细胞通过另外的线粒体受益。

[0192] 用于AUGMENT的示例性临床方案如下。在标准IVF开始之前,受试者将在月经周期第1-7天期间经历腹腔镜检查,以从一个卵巢收集多达三片卵巢上皮(卵巢皮质活检标本)(每片大约 $3 \times 3 \times 1$ mm)。在这个程序期间,将在腹部内制造2-3个切口,并且将插入装置以便使用无菌程序从卵巢中移出组织。收集的组织将被放置于无菌溶液中并且在冰上运输到GTP适用性实验室(compliant laboratory),在其中它将被冷冻保存直到AUGMENT/ICSI时为止。组织将保持冷冻,直到酶解离时为止。这将用作自体OSC的来源,线粒体将从这些OSC纯化或分离。

[0193] 接下来,将分离OSC并且将从这些OSC中收获线粒体。在将卵巢皮质活检的组织解冻之后,将切碎所述组织并且放置于包含重组胶原酶和重组DNase1的溶液中并且均质化成单细胞悬液。将使悬液通过细胞滤网以制备单细胞溶液。所述单细胞悬液将与抗VASA抗体一起孵育。然后将通过荧光激活细胞分选术(FACS)分离标记细胞。将使用标准缓慢冷却的冷冻保存程序用于冷冻OSC的等分试样。

[0194] 受试者将经历标准IVF方案,包括基线评估、GnRH拮抗剂下调以及促性腺激素刺激。卵母细胞提取将在hCG给予之后34-38小时内进行,并且将针对质量和成熟状态评定卵母细胞。成熟卵母细胞将通过ICSI授精。

[0195] 在卵母细胞提取当天,将使用标准方法解冻用于受试者的冷冻OSC小瓶。OSC将经过加工以产生线粒体片状沉淀物(弗雷扎等人,自然实验手册,20072:287-295,或佩雷斯等人,细胞死亡与分化,20073:524-33. 电子版2006年10月13日)或如下文实例9中所描述,其中使用了基于FACS的方法来分离组织中的总线粒体群体并且任选地进一步分离在组织中的活跃呼吸线粒体群体或定量活性线粒体与所有线粒体的比率。将评定并记录线粒体制剂的评估和活性。线粒体功能的示例性测定描述于实例8中。线粒体片状沉淀物将被再悬浮于培养基中达到改善卵母细胞质量的标准化线粒体活性浓度。将这种包含线粒体的培养基吸到包含待递送的精子的显微注射针中。线粒体和精子两者将通过ICSI一起被递送到卵母细

胞中。可替代地,在使用之前线粒体或其制剂将被冷冻。

[0196] 在受精和胚胎培养之后,可以基于胚胎发育的评定,在培养3天或5天之后在超声波引导下典型地将转移最多三个1级或2级(SART分级系统(50))胚胎。如果通过BhCG测试证实有妊娠,那么受试者将在大约6周和20周胎龄时进行后续观察。

[0197] 实例8:在人类OSC相对于人类卵巢基质细胞中的线粒体参数的评定。

[0198] 在从同一位患者获得的培养的人类卵巢体细胞和培养的人类OSC中进行线粒体染色。将细胞在37℃下与指示线粒体质量的非氧化依赖性MitoTracker绿色FM(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司;M7514)线粒体跟踪探针一起孵育45分钟并且用新鲜培养基洗涤两次,随后进行活细胞荧光成像。两种细胞类型是平行处理的。在图14中,分布型式指示了在人类OSC中的核周定位,与其他人类干细胞类型一致。

[0199] 随着生物衰老,在细胞的mtDNA中发生常见缺失突变(线粒体基因组的核苷酸8470-13447缺失)的积累。PCR引物被设计为跨越这个缺失。如果不存在缺失突变,指示mtDNA基因组是完整的,那么PCR扩增子将为5080bp。如果存在缺失,将扩增103bp的片段。在单独的细胞或细胞群体之内的线粒体中的异质性的情况下,两种产物都不扩增。这一现象的出现是由于缺失(如由小条带所指示的)的扩增远比较大的5kb产物更有效。较小产物更迅速地达到指数期和平台期,由此利用了PCR混合物中可用的试剂并且有极少或没有遗留,以便用于不太有效的5kb产物扩增。在图15中显示的PCR分析指示,人类OSC不包含突变的积累,而患者匹配的卵巢体细胞具有包含突变的积累。

[0200] 为了证实在体细胞之内的线粒体群体就突变来说是异质的(一些线粒体将包含缺失而一些不包含缺失),使用特异性靶向缺失区域之内的序列的第二组PCR引物来评定卵巢体细胞中的线粒体完整性。191bp产物的扩增指示,这个区域在这些细胞中的至少一些线粒体内是完整的,并且体细胞线粒体的总群体就缺失突变来说是异质的,而人类OSC基本上不含突变。

[0201] 用于线粒体DNA分析的引物序列(5'到3')包括用于5080bp(完整)或103bp(缺失突变体)的扩增子1,具有以下序列:TTACACTATTCCTCATCACCCAAC(SEQ ID NO:64)(正向)和TGTGAGGAAAGGTATTCCTGCT(SEQ ID NO:65)(反向);以及用于191bp(内部,缺失序列)的扩增子2,具有以下序列:CCTACCCCTCACAATCATGG(SEQ ID NO:66)(正向)和ATCGGGTGATGATAGCCAAG(SEQ ID NO:67)(反向)。

[0202] 图16描绘了ATP测定(ATP生物发光测定试剂盒HS II,德国曼海姆的罗氏应用科学公司(Roche Applied Science,Mannheim,Germany))的结果。左图显示了在稀释ATP之后的标准曲线(相对于化学发光的摩尔比)。如所示,所述测定在ATP的检测水平下是敏感的。右图显示了来自从培养的人类OSC分离的线粒体的ATP的量。将大约100,000、10,000、1,000以及100个细胞溶解并且用于分析,其中多个值和可检测性处于mM到fM范围内。包含少至100个OSC的样品产生了差不多6.00E-08M的ATP(大约600pmol ATP/细胞)。与卵巢体卵子细胞相比,OSC以少大约100倍的线粒体产生更多或等量的ATP/细胞。

[0203] 实例9:基于FACS的线粒体分离

[0204] 如在本实例中所描述,可以使用基于FACS的方法来分离组织中的总线粒体群体。另外,用于线粒体分离的基于FACS的方法可以使用双标记,使用两种不同的荧光染料(线粒体膜电位(MMP)依赖性和MMP非依赖性)以便仅仅分离在组织、细胞、溶解细胞或来源于它们

的部分中的功能性(例如活跃呼吸)线粒体群体或定量功能线粒体与所有线粒体的比率。

[0205] 如下文所描述,制备并利用非氧化依赖性MitoTracker绿色FM(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司;M7514)线粒体跟踪探针,所述探针指示了线粒体质量。将MitoTracker储备溶液(1-5mg/ml,溶解于无水二甲亚砜(DMSO)中)稀释于无血清生长培养基中以达到在25-500nM之间的工作浓度。通过在300×g下离心5分钟使新鲜分离或解冻的OSC形成片状沉淀物。吸出上清液并且将细胞片状沉淀物再悬浮于200μl的稀释的MitoTracker储备溶液中。

[0206] 将细胞在37℃下孵育45分钟,在预热(37℃)的无血清生长培养基中洗涤并且通过在300×g下离心5分钟而沉淀(可替代地,可以在与感兴趣的探针一起孵育之前将细胞溶解)。吸出上清液并且将细胞再悬浮于100μl的线粒体溶解缓冲液中,并且转移到FACS分选管中以通过使用快速渗透冲击进行机械透化来溶解。在溶解之后,将细胞在冰上平衡15-30分钟,在200μl(最小体积)冰冷的PBS中孵育并且进行涡旋。如在图19中所示,观察到三种不同的群体:残余的M7514阳性细胞(细胞MT+)、高荧光线粒体(功能性,Mito MT高)以及低表达的线粒体(非功能性,Mito MT低)。溶解后功能性与非功能线粒体的比率是大约1:1(1552个线粒体,743个被门控为功能性的,并且716个被门控为非功能性的,并且剩余部分未经过门控;在图19中突出显示了针对每个线粒体群体的门控)。

[0207] 因此,功能线粒体可以被分选并收集,并且残余未溶解的细胞和非功能线粒体基于大小和荧光强度而被排除在外。使用多种探针或JC-1探针(红色光谱;Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司;T3168)的双标记可以有助于进一步区分功能与非功能线粒体。用于双标记的探针包括(但不限于)氧化还原态mitotracker探针(例如MitoTracker红色CM-H2XRos(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司;M7513)、MitoTracker橙色CM-H2TMRos(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司;M7511);以及积累依赖性探针:JC-1(红色光谱;Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司;T3168)、MitoTracker深红FM(Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司;M22426)及JC-1(绿色光谱;Invitrogen,加利福尼亚州卡尔斯巴德的生命技术公司;T3168)。

[0208] 实例10:使用差速离心的线粒体分离

[0209] 如在本实例中所描述的,可以使用差速离心程序来分离和/或分级存在于组织中的线粒体。当从任何组织或细胞分离线粒体时的关键步骤是:(i)通过机械和/或化学手段使细胞破裂;(ii)在低速下差速离心以去除碎片和极大细胞的细胞器(SPIN1);并且(iii)在更高速度下离心以分离并收集线粒体(SPIN2)。

[0210] 将组织称重并且用1.5ml可商购的洗涤缓冲液(MitoSciences,英国剑桥的艾碧康公司(Abcam,plc,Cambridge,UK))洗涤两次。将组织切碎并且放置于预冷的Dounce均质机中。添加多达2.0ml可商购的分离缓冲液(MitoSciences,英国剑桥的艾碧康公司)。使用Dounce均质机使细胞破裂(10-40次撞击),并且将匀浆转移到艾本德管中。每个管用分离缓冲液装填到2.0ml。将匀浆在4℃在1,000g下离心10分钟。保留上清液并且将其转移到新管中,这些新管各自用分离缓冲液装填到2.0ml。将这些管在4℃在12,000g下离心15分钟。保留片状沉淀物。如果需要,分析上清液的质量。所述片状沉淀物通过再悬浮于补充有10μl的可商购的蛋白酶抑制剂混合液(MitoSciences,英国剑桥的艾碧康公司)的1.0ml分离缓冲

液中将其洗涤两次。将这些管在4℃在12,000g下离心15分钟。在洗涤之后,将片状沉淀物合并,并且再悬浮于补充有蛋白酶抑制剂混合液的500μl分离缓冲液中。如果需要,将等分试样储存在-80℃下直到使用。

[0211] 在一种方法中,使用可商购的抗体,如抗体MSA06、MSA03以及MSA04(MitoSciences,英国剑桥的艾碧康公司),通过蛋白质印迹筛选针对在分离的线粒体中相对于上清液部分中的细胞色素c、孔蛋白或亲环素D来测试线粒体完整性。在另一种方法中,例如使用可商购的OXPHOS复合体检测混合液(MitoSciences,英国剑桥的艾碧康公司),通过蛋白质印迹法探查线粒体样品以检测线粒体复合体的组分。

[0212] 实例11:使用蔗糖梯度分离法的线粒体分离

[0213] 所述方案使用了以下可商购的试剂:n-十二烷基-β-D-麦芽吡喃糖苷(十二烷基麦芽糖苷;MS910;MitoSciences,英国剑桥的艾碧康公司);磷酸盐缓冲盐水(PBS);15%、20%、25%、27.5%、30%以及35%的蔗糖溶液;双蒸馏水;蛋白酶抑制剂混合液(MitoSciences,英国剑桥的艾碧康公司);以及13×51mm的异质同晶聚合物离心管(Beckman 326819;加利福尼亚州布雷亚的贝克曼-库尔特公司(Beckman-Coulter, Inc., Brea, CA))。

[0214] 蔗糖梯度分离程序是被优化用于线粒体的蛋白质细分级方法。这种方法将样品拆分成至少10个部分。有可能将溶解的完整细胞分成复杂性低得多的多个部分,而当分析已经分离的线粒体时,这些部分甚至更简化。蔗糖梯度分离技术被设计为用于在5mg/ml蛋白质下多达0.5ml的初始样品体积。因此,应当使用2.5mg或更少的总蛋白质。对于更大的量,可以制备多个梯度或制造更大比例的梯度。

[0215] 将样品溶解于非离子型洗涤剂中。已经确定,在这一蛋白质浓度下,线粒体被20mM的n-十二烷基-β-D-麦芽吡喃糖苷(1%w/v的十二烷基麦芽糖苷)完全溶解。这个溶解过程的关键在于膜被破坏,而先前膜包埋的多亚基OXPHOS复合体保持完整,此步骤是在此描述的基于密度的蔗糖分离程序所必需的。一个重要的例外是丙酮酸脱氢酶(PDH)。为了在5mg/ml线粒体的蛋白质浓度下分离PDH,所需要的清洁剂浓度仅仅为10mM(0.5%)的十二烷基麦芽糖苷。还应当在更低速度下将PDH酶离心,16000g的离心力是用于PDH复合体的最大值。

[0216] 向在PBS中的处于5mg/ml蛋白质的线粒体膜悬液中,添加十二烷基麦芽糖苷达到1%的终浓度。将其充分混合并且在冰上孵育30分钟。然后将混合物在72,000g下离心30分钟。贝克曼Optima台式超速离心机(加利福尼亚州布雷亚的贝克曼-库尔特公司)被推荐用于小的样品体积。然而,在最低限度上,在最大速度(例如大约16000g)上的台式微量离心机应当满足。在离心之后,收集上清液并且丢弃片状沉淀物。将蛋白酶抑制剂混合液添加到样品中,所述样品被维持在冰上直到进行离心为止。在极富含线粒体的样品中,复合体III和IV中的细胞色素可以赋予上清液棕色,当在检查以下分离的有效性时这是有用的。

[0217] 通过使连续递减密度的蔗糖溶液在彼此上方分层来制备不连续的蔗糖密度梯度。含有15%-35%的蔗糖溶液的不连续梯度的制备和离心详细描述于下文中。这一梯度使线粒体OXPHOS复合体良好分离(质量在200kDa到1000kDa范围内)。然而,可以对这一设置进行修改以用于分离特定的复合体或用于分离更大量的物质。

[0218] 通过使逐渐变低的密度的蔗糖溶液在彼此上方分层来制备梯度;因此,施用的第一溶液是35%的蔗糖溶液。所述溶液的稳定施用产生了最具重现性的梯度。为了帮助这一

施用,将贝克曼异质同晶聚合物管直立地保持在管座中。接下来,将Rainin Pipetman的200 μ l吸管端放置在RaininPipetman的1000 μ l吸管端的末端上。将两个紧密配合的吸管端通过夹钳座稳固保持,并且使所述200 μ l吸管端的末端与所述管的内壁接触。然后将蔗糖溶液放置在所述1000 μ l吸管端的内部并且缓慢而稳定地进给到所述管中,以35%的溶液(0.25ml)开始。

[0219] 一旦所述35%的溶液被引流到管中,将30%的溶液(0.5ml)加载到管中在所述35%的溶液的顶部上。这一程序分别用27.5%(0.75ml)、25%(1.0ml)、20%(1.0ml)以及15%(1.0ml)的溶液继续。在所述管的顶部处留下足够的空间以添加0.5ml溶解线粒体的样品。

[0220] 一旦倾注了蔗糖梯度,可见不连续的蔗糖层。在将样品施加到所述梯度的顶部后,将所述管非常小心地加载到转子中,并且开始离心。所有离心程序都需要平衡转子,因此产生精确地包含相同质量的另一个管。在实践中,这意味着必须制备2个梯度,虽然第二梯度不必包含实验样品,但是可以包含0.5ml的水代替所述0.5ml的蛋白质样品。

[0221] 应当将异质同晶聚合物管在吊桶式SW50.1型转子(加利福尼亚州布雷亚的贝克曼-库尔特公司)中在4 $^{\circ}$ C下在37,500rpm(相对离心力平均值132,000 $\times$ g)下离心16小时30分钟,其中加速模式设定(acceleration profile)为7并且减速模式设定为7。在运行之后应立即从转子中移出所述管,要非常小心不要弄乱蔗糖层。当分离富含线粒体的样品时,可以观察到不连续的有色蛋白质层。最通常的是,这些是距管底部大约10mm的复合体III(500kDa-棕色)和距管底部25mm的复合体IV(200kDa-绿色)。在一些情况下,可以观察到另外的条带。这些是其他OXPHO复合体。

[0222] 对于部分收集,使用夹钳座稳固并且直立地保持管。使用细针在所述管的最底部引入微孔。所述孔刚好大到足以允许蔗糖溶液以1滴/秒滴出。将相等体积的部分收集于在刺穿的孔下方的艾本德管中。总共10 $\times$ 0.5ml部分是适当的,然而也有可能收集更多的部分,这些部分因此体积更小(例如20 $\times$ 0.25ml部分)。将这些部分储存在-80 $^{\circ}$ C下直到分析为止。分析收集的部分,以便使用在此(例如在实例9、10中)描述或本领域中已知的方法中的任一种来确定线粒体完整性。

[0223] 实例12:OSC展现出增加的线粒体活性

[0224] 据报导,正如已经在精原细胞、早期胚胎、内细胞团细胞以及胚胎干细胞中观察到的,低线粒体活性是“干性”的特征。参见拉马略-桑托斯等人,人类生殖新进展,2009(5):553-72。OSC实质上是雄性精原干细胞(精原细胞)的雌性等效物,然而,现在已经确定OSC具有丰富的线粒体活性。

[0225] 在OSC溶解之后,在10、15、20以及30分钟时测量线粒体的ATP产量(pmol),并且然后针对所测试的每一样品中的总mtDNA含量(fg)将其标准化(ATP生物发光测定试剂盒HS II,德国曼海姆的罗氏应用科学公司)。如在图20中所示,在埼玉医疗中心从用于性别重置的患有性别认同障碍的年龄在22-33(28.5 $\pm$ 4.0)岁之间的女性患者获得的成年人类卵巢来源的卵原干细胞(OSC)产生的ATP水平比来自骨髓的人类间充质干细胞(hMSC,从德国海德堡的普诺生公司(PromoCell GmbH,Heidelberg,Germany)获得)、成年人类卵巢体细胞(与使用的OSC匹配的受试者)、人类胚胎干细胞(ESC)、以及来源于IMR90胎肺成纤维细胞的人类诱导型多能干细胞(iPSC)高得多。

[0226] 针对所测试的每一样品中的总mtDNA含量(fg)将线粒体的ATP产量(pmol)标准化。如在图21中所示,从成年人类卵巢来源的卵原干细胞(OSC)分离的线粒体在10分钟内产生的ATP是来自骨髓的人类间充质干细胞(MSC)的6倍以上,并且在10分钟内产生的ATP是成年人类卵巢体细胞(与使用的OSC匹配的受试者)、人类胚胎干细胞(ESC)、以及来源于IMR90胎肺成纤维细胞的人类诱导型多能干细胞(iPSC)的10倍以上。图21描绘了在10分钟内hOSC、hMSC、体细胞、hESC以及hiPSC分别产生 $1.03\text{E}-09$ 、 $1.46\text{E}-10$ 、 $1.76\text{E}-11$ 、 $4.56\text{E}-12$ 、 $9.10\text{E}-11$ pmolATP。

[0227] 标准误差(按相同的顺序)是 $1.15\text{E}-10$ 、 $4.56\text{E}-11$ 、 $2.28\text{E}-12$ 、 $1.72\text{E}-13$ 以及 $7.99\text{E}-12$ 。

[0228] 缺失分析揭示,在hMSC中存在常见的4977bp缺失(图22)。已知具有突变的人类卵巢体细胞是作为阳性对照与无样品对照(ve)一起被包括在内。在任一样品中均未检测到完整的产物部分。比较起来,常见的4977bp缺失在人类OSC中是不可检测的(图15)。

[0229] 其他实施例

[0230] 从前述说明应当清楚的是,可以对在此描述的本发明作出变更和修改以使其适应不同的用途和状况。这样的实施例同样处于以下权利要求书的范围之内。

[0231] 在此对变量的任何定义中的要素清单的叙述包括将所述变量定义为任何单个要素或所列出的要素的组合(或次组合)。在此对实施例的叙述包括作为任何单个实施例或与其他实施例或其部分组合的实施例。

[0232] 本申请包含的主题可能涉及2011年6月29日提交的美国临时申请序列号61/502,840和2012年2月17日提交的美国临时申请序列号61/600,529,这些申请的全部披露内容通过引用结合在此。本说明书中所提及的所有专利和出版物通过引用结合在此,所述引用的程度如同特定地并且单独地指示每个独立的专利和出版物是通过引用结合一样。

序列表

<110> THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
<120> 用于自体种系线粒体能量转移的组合物和方法
<130> 88511WO(51588)
<140> PCT/US2012/033643
<141> 2012-04-13
<150> 61/600,505
<151> 2012-02-17
<150> 61/475,561
<151> 2011-04-14
<160> 67
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<223> 对于未知的描述: "DEAD"盒基序肽
<<00> 1
Asp Glu Ala Asp
1
<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
[0001] <220>
<223> 对于人工序列的描述: 合成的引物
<<00> 2
cggaagcaaa cccaagcaa tac 23
<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 对于人工序列的描述: 合成的引物
<<00> 3
cctagggaacc ataggaaaca ttc 23
<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 对于人工序列的描述: 合成的引物
<<00> 4
cccaatgaag gaccctgaaa c 21
<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 对于人工序列的描述: 合成的引物

	<400> 5 aatggetcac tgtcccgttc a	21
	<210> 6 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 6 gttataacca ttgtagtgt catc	24
	<210> 7 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 7 aatgagtgtt acacctgcgt g	21
	<210> 8 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
[0002]	<400> 8 tgccaatatg atcaggcact cg	22
	<210> 9 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 9 actgcgtata gcaactgtca cc	22
	<210> 10 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 10 ggaaaccagc agcaagtgat	20
	<210> 11 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 11 tggagtcctc atcctctgg	19

	<210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 12 gtgtgtcgaa ggcctatgga t 21
	<210> 13 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 13 acaggcagct gatatccagt g 21
	<210> 14 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 14 cctccccact ttcacataat 20
[0003]	<210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 15 aatgggtggg gaagaaaaac 20
	<210> 16 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 16 agcagagagc ttggtcggg 19
	<210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 17 tccggtgagc tgctcgtgtc 20
	<210> 18

[0004]	<211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 18 ctcagcttc cacaacaaga 20
	<210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 19 tctcgggct gtcataaatc 20
	<210> 20 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 20 cccttcagtc acagtttcg t 21
	<210> 21 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 21 gtctctactc tagtgccttc g 21
	<210> 22 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 22 cgtcagtcctc aaccttcctt 20
	<210> 23 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 23 ttgttggtga gcatccatgt 20
	<210> 24 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列

	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 24 tgcttccttc cctcattttg	20
	<210> 25 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 25 cacttccccc gctcacacag	20
	<210> 26 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 26 gtccgaacctc tgcagagaa	20
	<210> 27 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
[0005]	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 27 tgaatggtgaa gcgctgatag	20
	<210> 28 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 28 aaggctcttga gcaggaaaga	20
	<210> 29 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 29 gggtggaaag tagtgcggta	20
	<210> 30 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	

	<400> 30 ccgagctgtg caattcccag a	21
	<210> 31 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 31 aacccctctga gccaaagggtg a	21
	<210> 32 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 32 gatgaacata tegtgcgt g	21
	<210> 33 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
[0006]	<400> 33 gtacgaccag aggcatacag g	21
	<210> 34 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 34 aaacatgacc ggctacaaga ccct	24
	<210> 35 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 35 ggcacacctt gcattggtat gggt	24
	<210> 36 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 36 agcagtcctc agggaaatcg aaga	24

	<210> 37 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 37 taaggctgaa gtggcttggg gctt	24
	<210> 38 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 38 atgtcgtctg gtccctgttc	20
	<210> 39 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 39 gggatgacga tgagcagaat	20
[0007]	<210> 40 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 40 agacggtgtg caccaacatc taca	24
	<210> 41 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 41 tgtcgagtea gcttgagcag gaat	24
	<210> 42 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 42 ttgttgctgt tggacaagtg ggtg	24
	<210> 43	

[0008]	<211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 43 gcaacaagaa ctgggcactt tcca	24
	<210> 44 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 44 togaactggt gtgtccaag gcta	24
	<210> 45 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 45 taggattcat cgtggttggt gget	24
	<210> 46 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 46 acctaccca gtacctgct	20
	<210> 47 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 47 gcaagaaaag caaccaggag	20
	<210> 48 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 48 tatgggtcc tccggaaaa	20
	<210> 49 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 49 aacctccaact ccttcagca	20
	<210> 50 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 50 ataaacgccg agagattgcc caga	24
	<210> 51 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 51 aagtcctggtc agaagtcagc agca	24
[0009]	<210> 52 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 52 caagcacaat ttgctcagga	20
	<210> 53 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 53 ggcagctagg cagaataagc	20
	<210> 54 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物 <400> 54 tcacctctac aacactgttc ggct	24
	<210> 55 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	

	<400> 55 aaggttgaag gaggctggtc acat	24
	<210> 56 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 56 cgccatgttc tctgtctcaa	20
	<210> 57 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 57 cgtttgttca catcccagtg	20
	<210> 58 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
[0010]	<400> 58 tcttcttgc ccttgtgact	20
	<210> 59 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 59 ctcagggtga gctttctgg	20
	<210> 60 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 60 agcaggacc agatgaactc aaca	24
	<210> 61 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 对于人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 61	

	aageccactg ctctacttca tggc	24
	<210> 62 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述: 合成的引物 <400> 62 catgtacgtt gctatccagg c	21
	<210> 63 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述: 合成的引物 <400> 63 ctctttaatg tcaagcaga t	21
	<210> 64 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述: 合成的引物 <400> 64 ttacaactatt cctcatcacc caac	24
[0011]	<210> 65 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述: 合成的引物 <400> 65 tgtgaggaaa ggtattcctg ct	22
	<210> 66 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述: 合成的引物 <400> 66 cctacccctc acaatcatgg	20
	<210> 67 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 对于人工序列的描述: 合成的引物 <400> 67 atcgggtgat gatagecaag	20

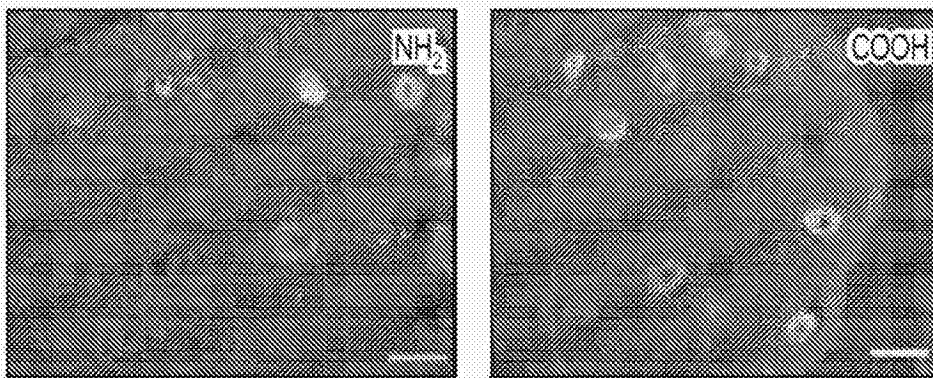


图1A

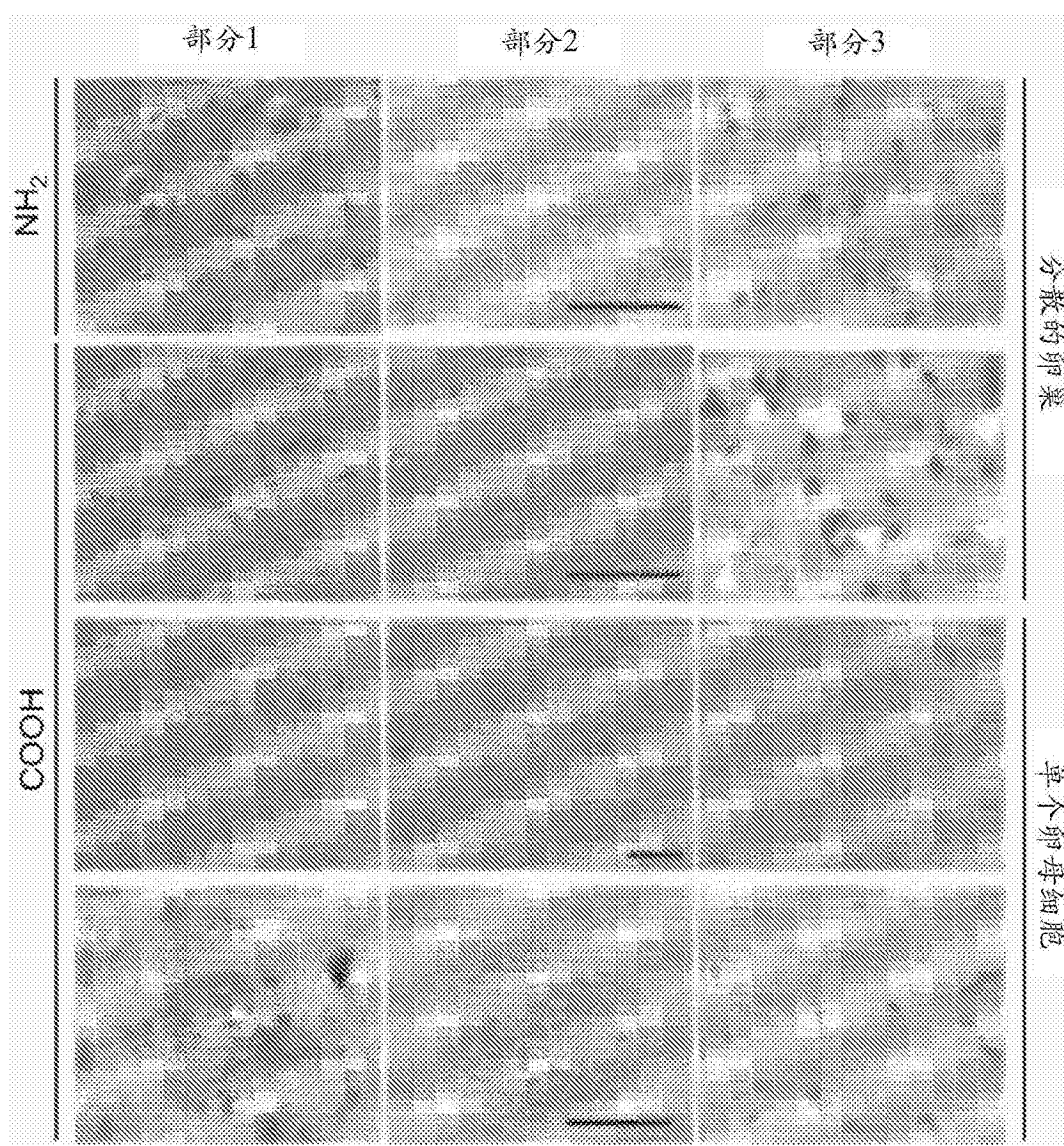


图1B

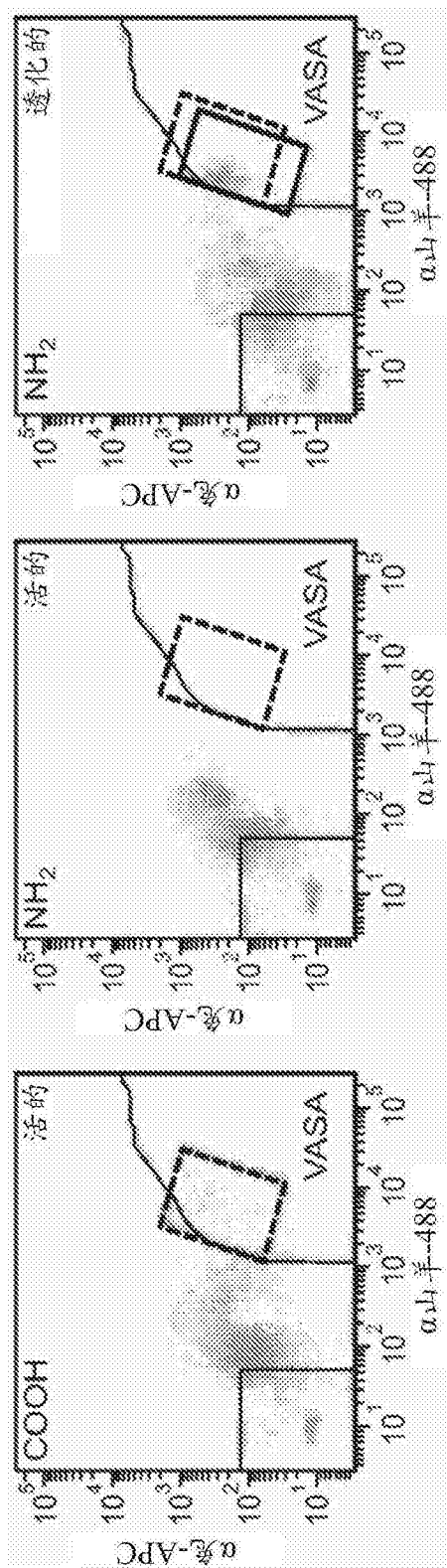


图1C

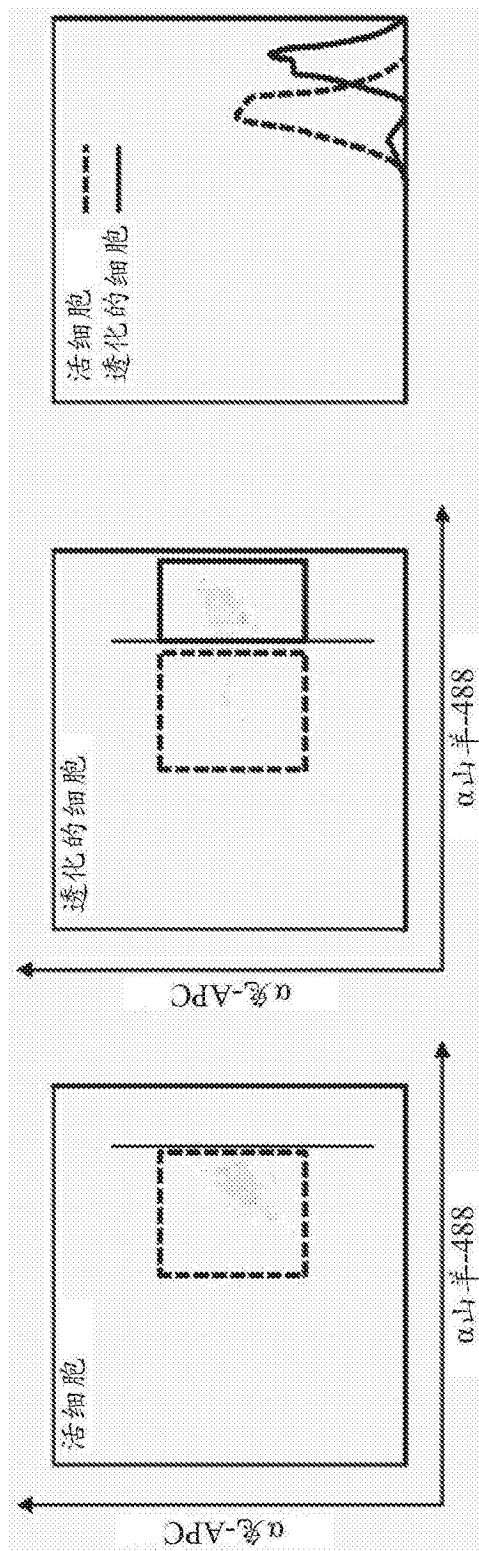


图1D

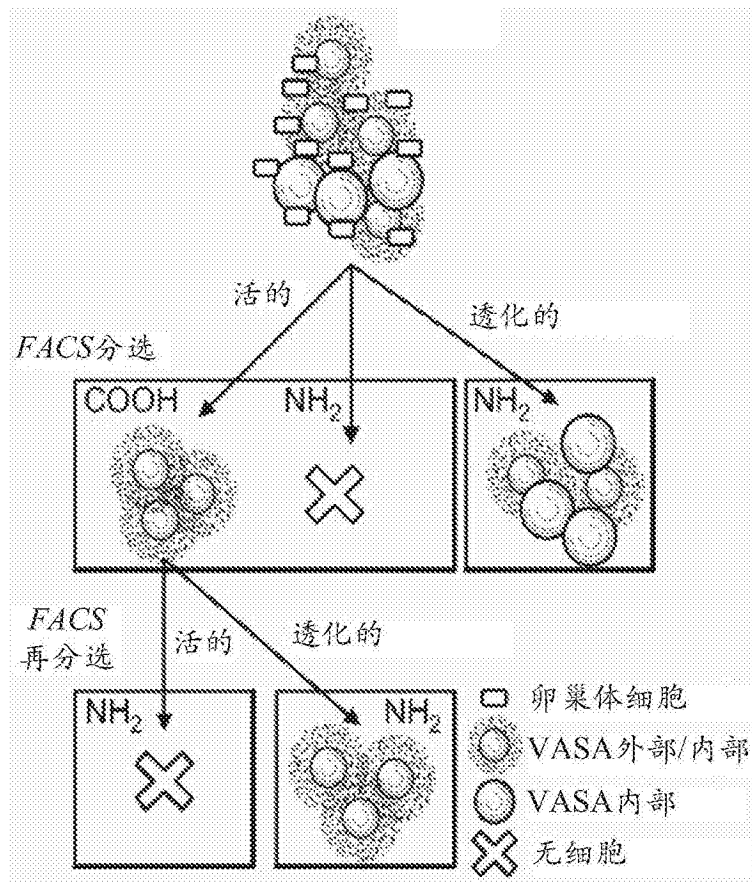


图1E

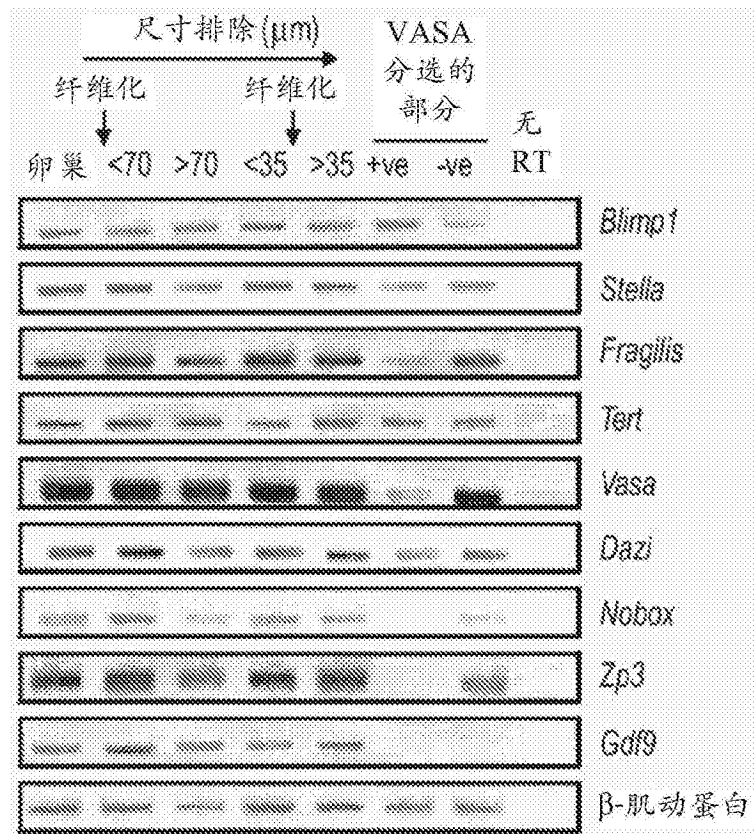


图1F

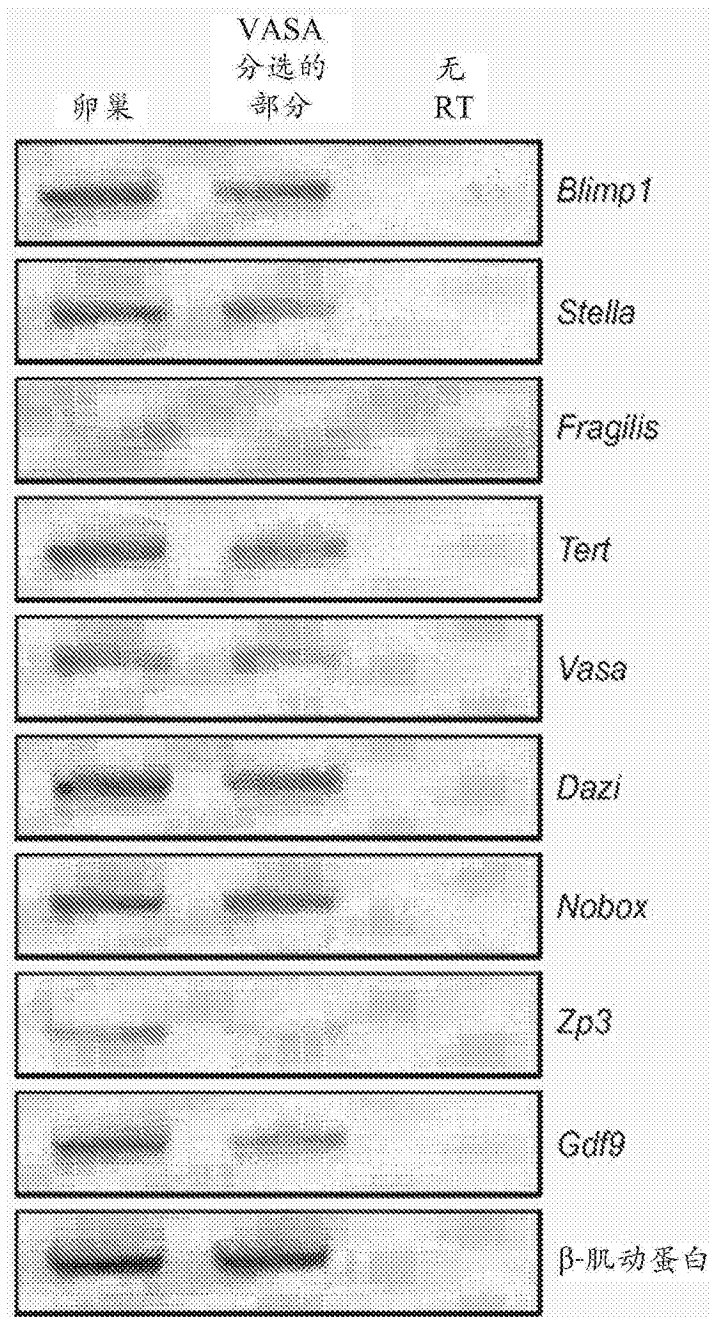


图2

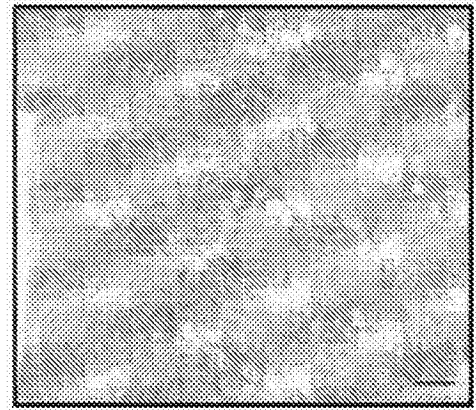


图3A

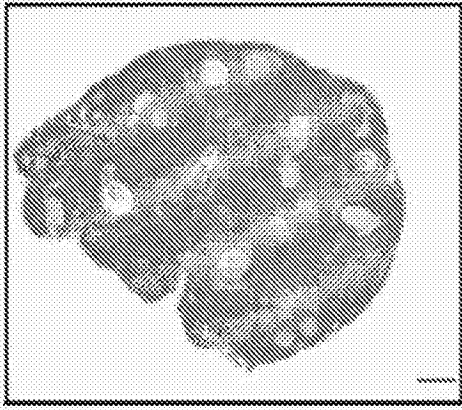


图3B

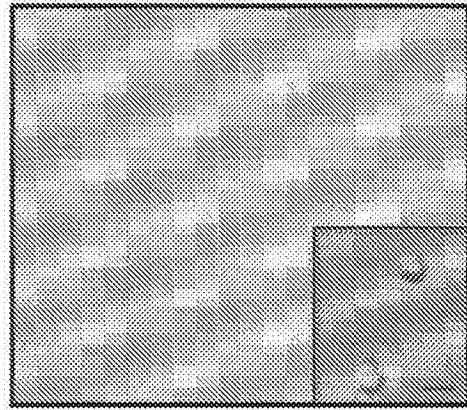


图3C

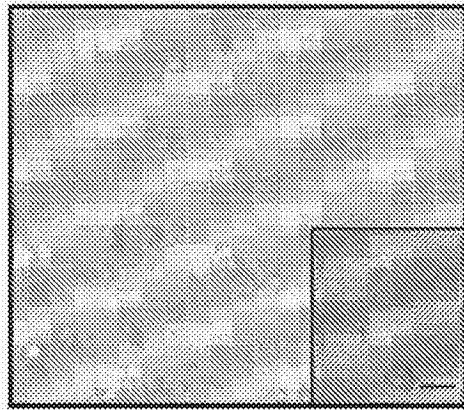


图3D

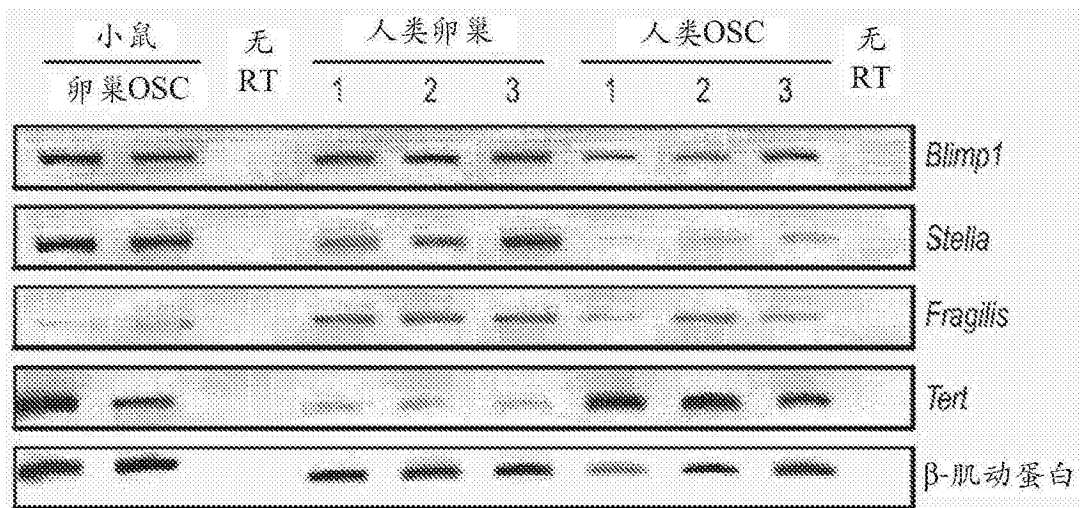
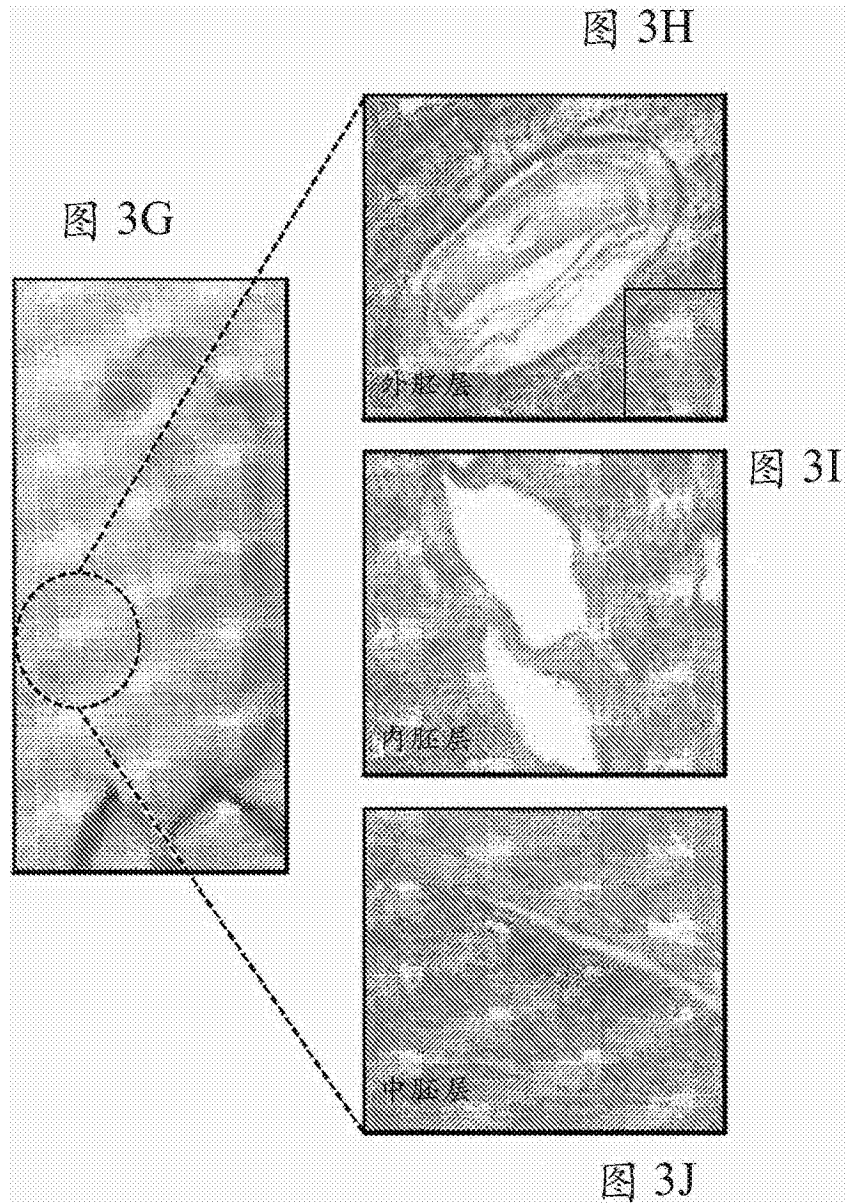


图3E



图3F



细胞类型	注射的细胞的数目	持续时间(周)	畸胎瘤形成
mESC (v6.5)	1×10^5	3	3/3
mOSC (C57BL/6)	1×10^5	24	0/3

图3K

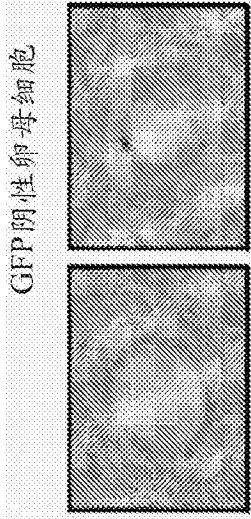


图4A

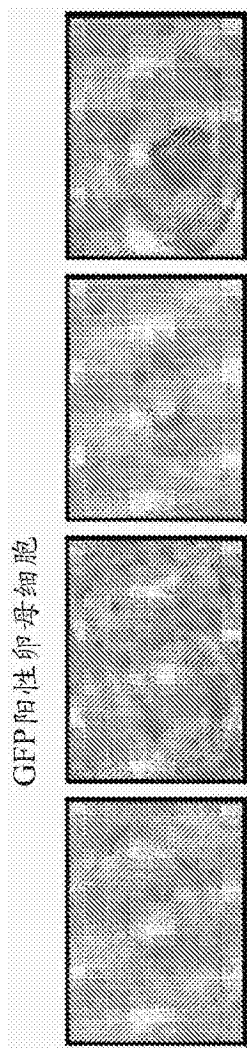


图4B

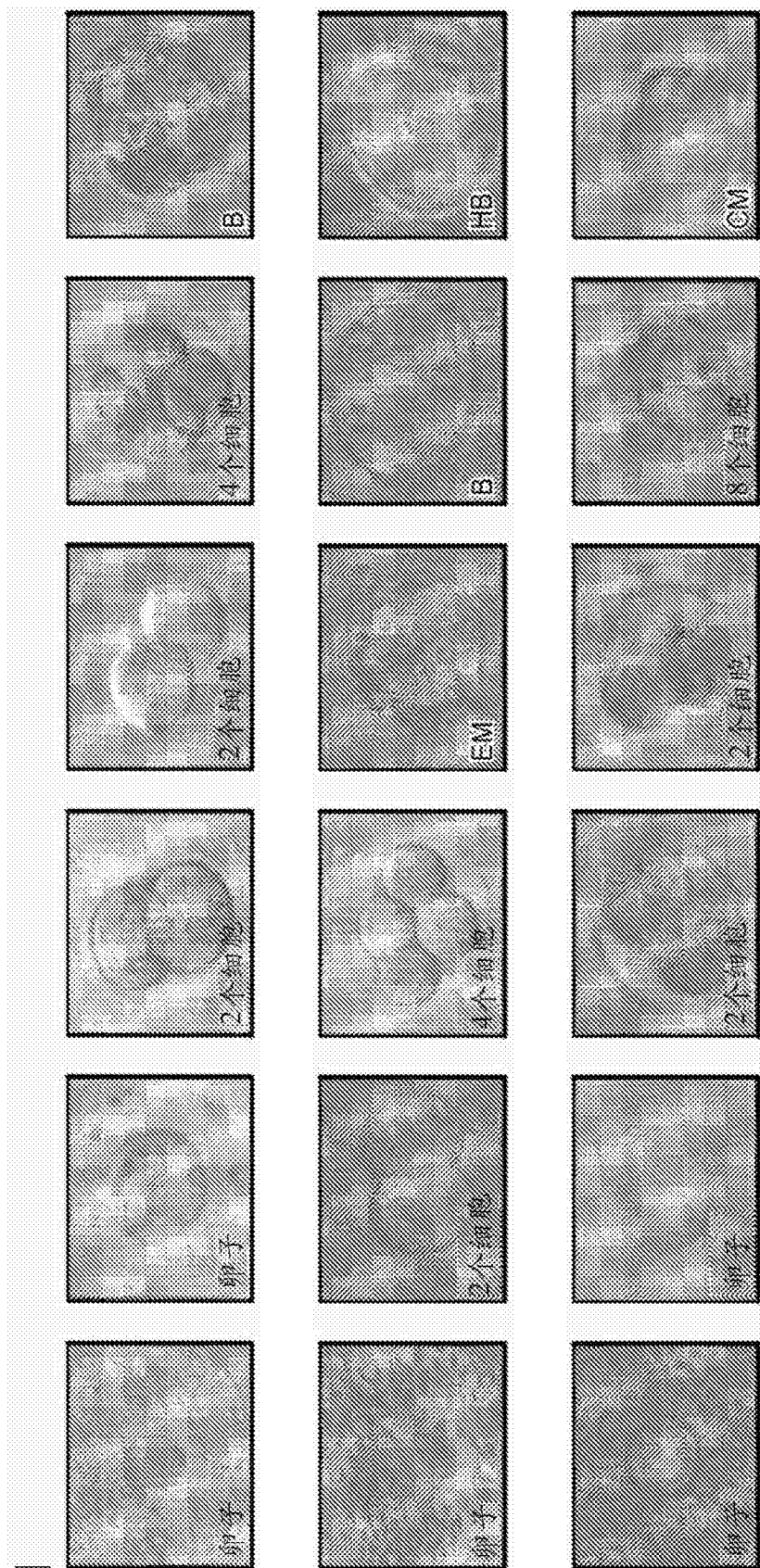


图4C

图4D

图4E

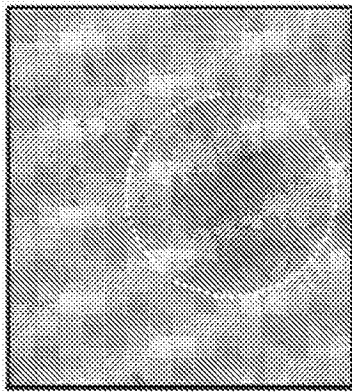


图5A

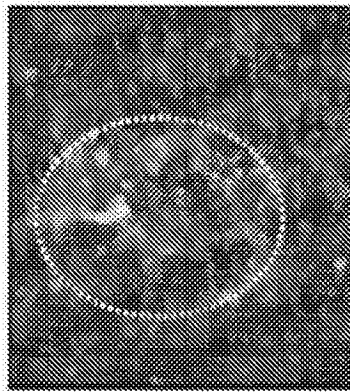


图5B

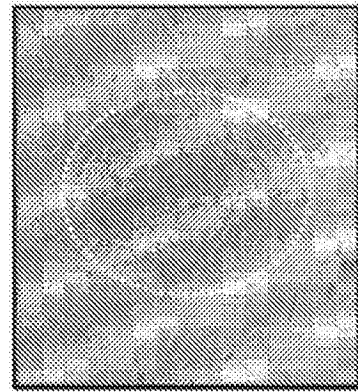


图5C

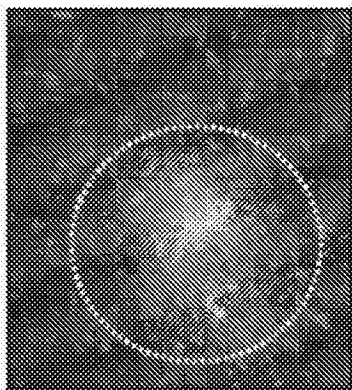


图5D

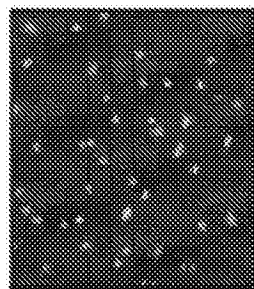


图6A

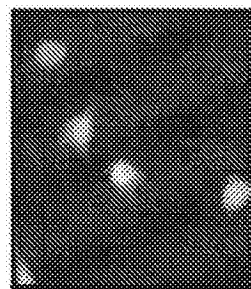


图6B

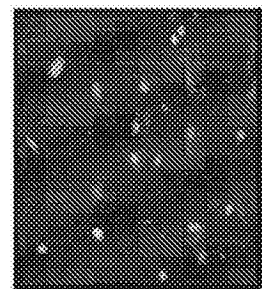


图6C

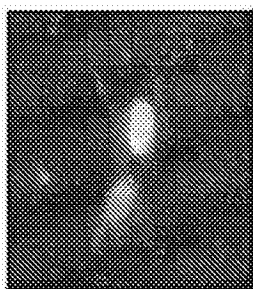


图6D

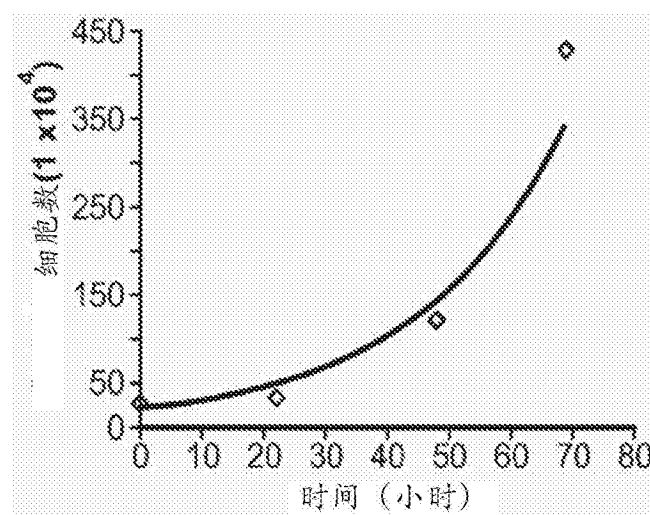


图6E

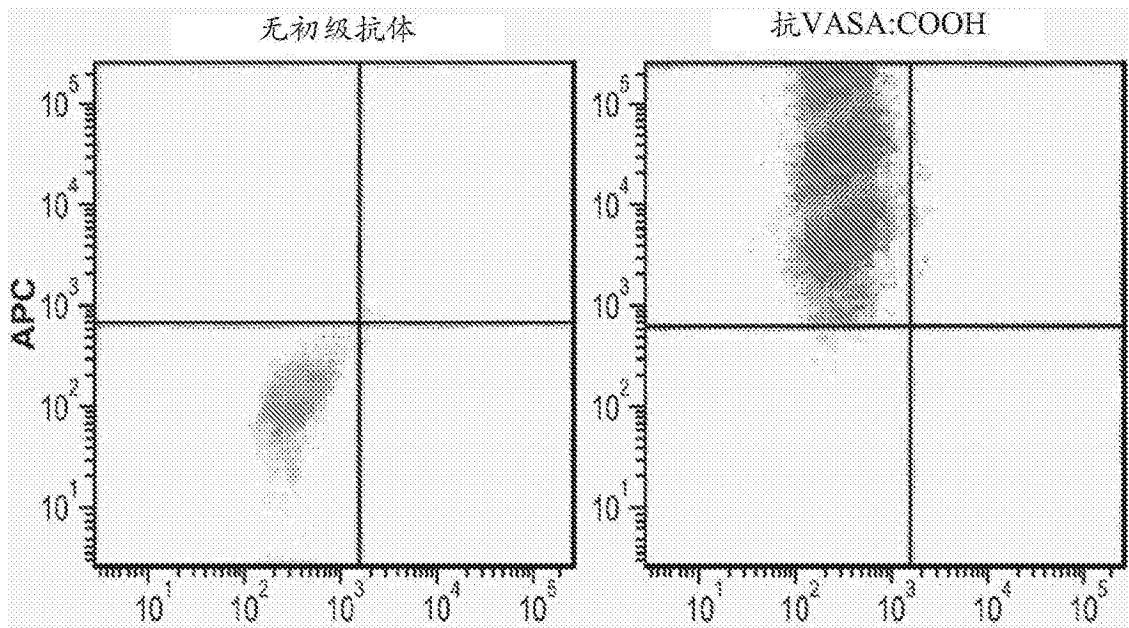


图6F

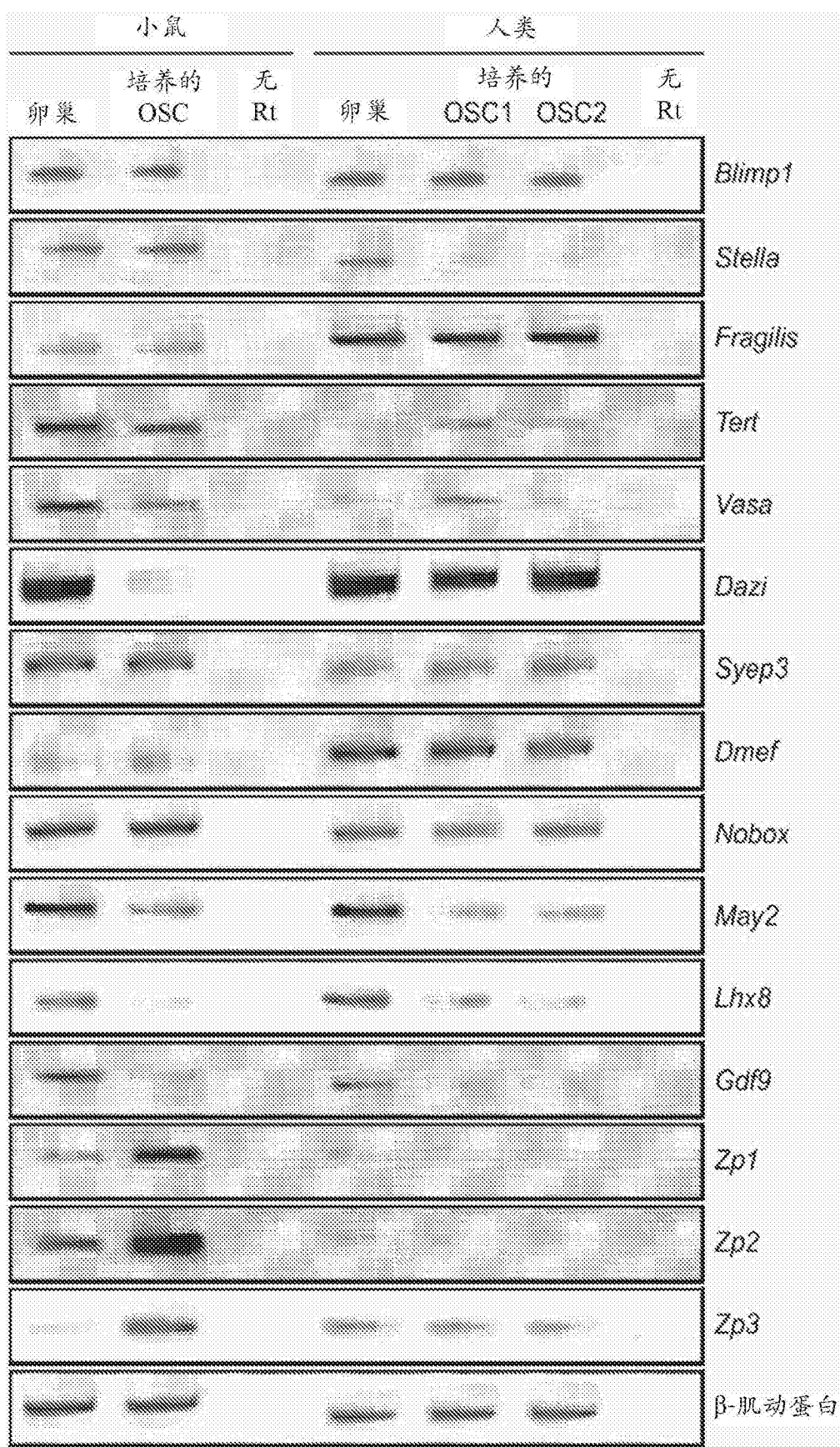


图6G

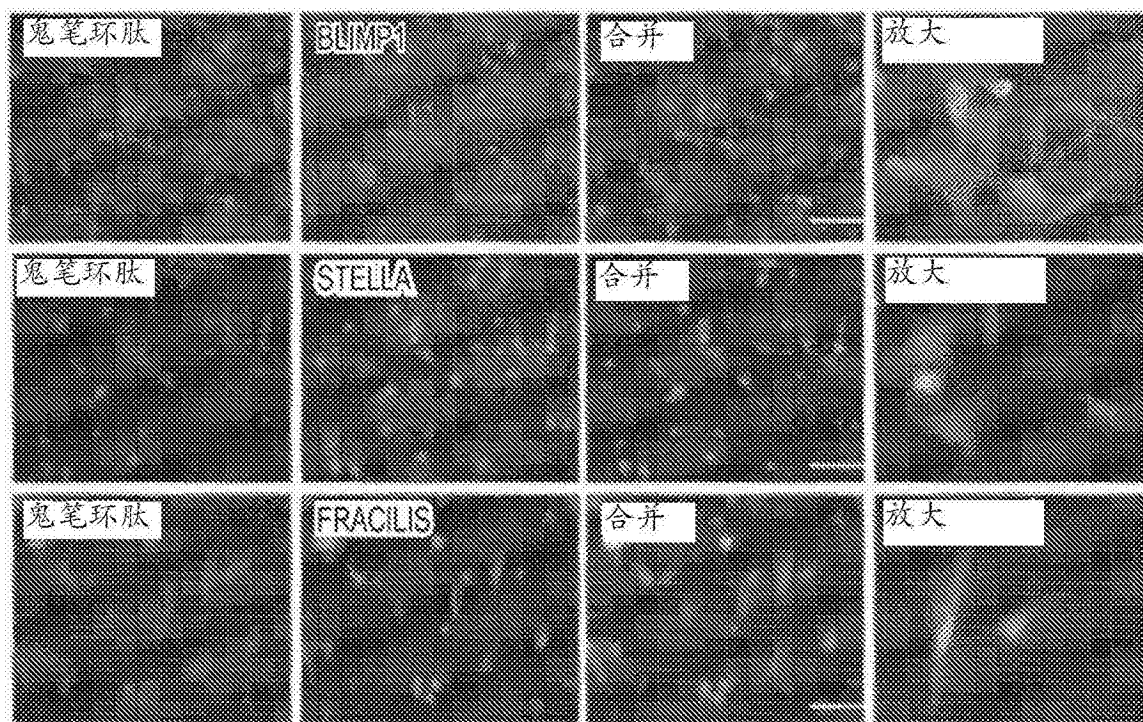


图6H

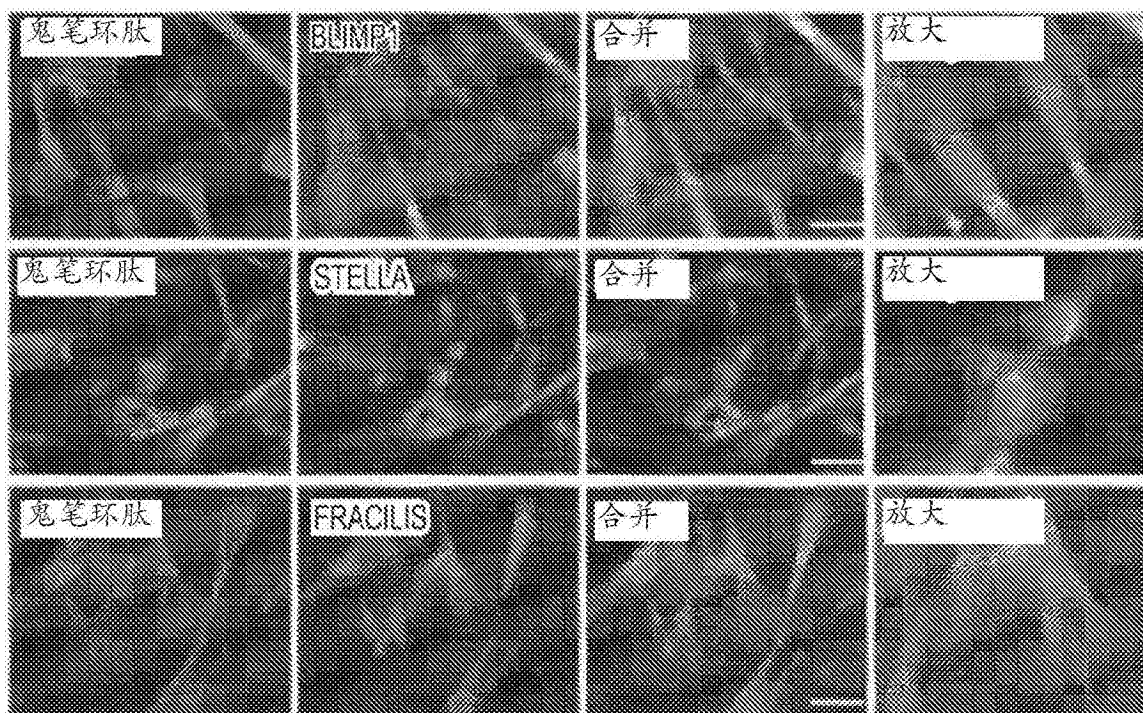


图6I

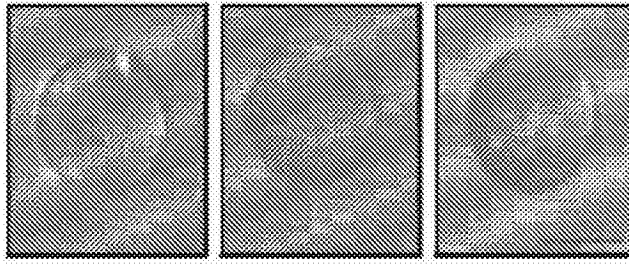


图7A

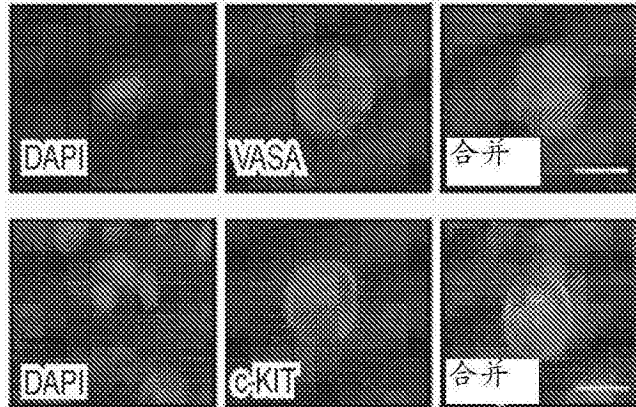


图7B

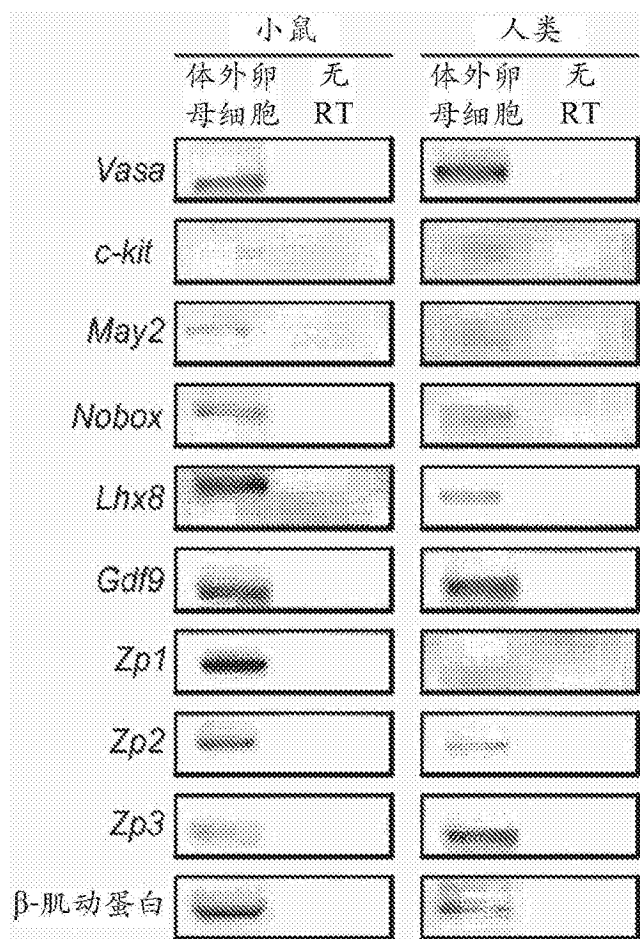


图7C

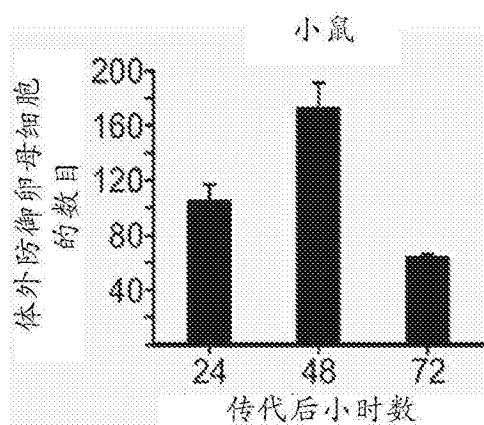


图7D

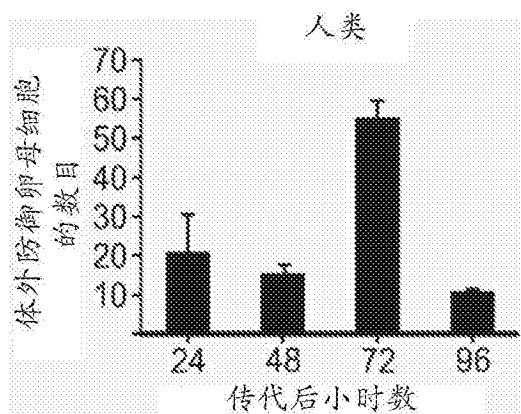


图7E

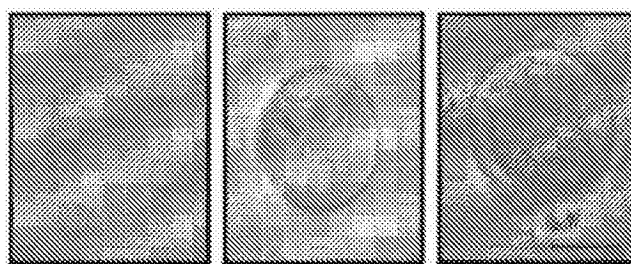


图7F

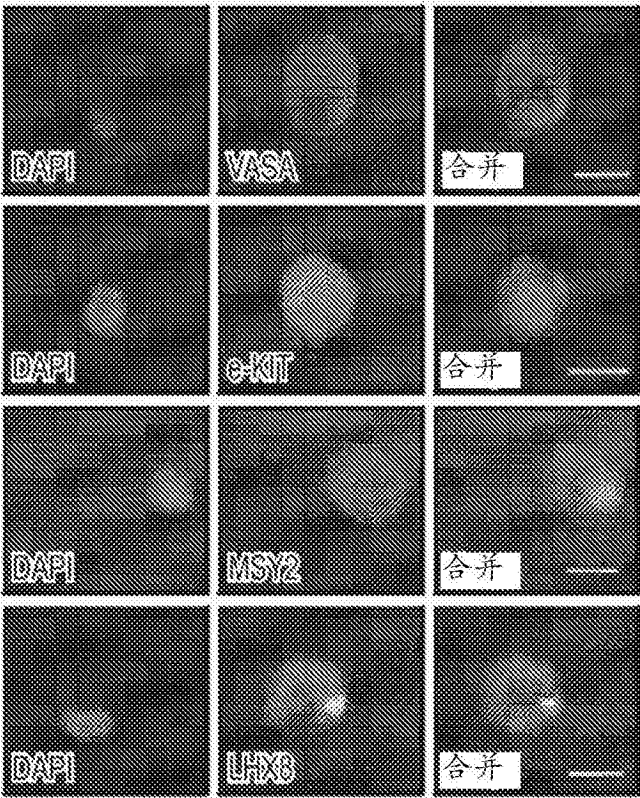


图7G

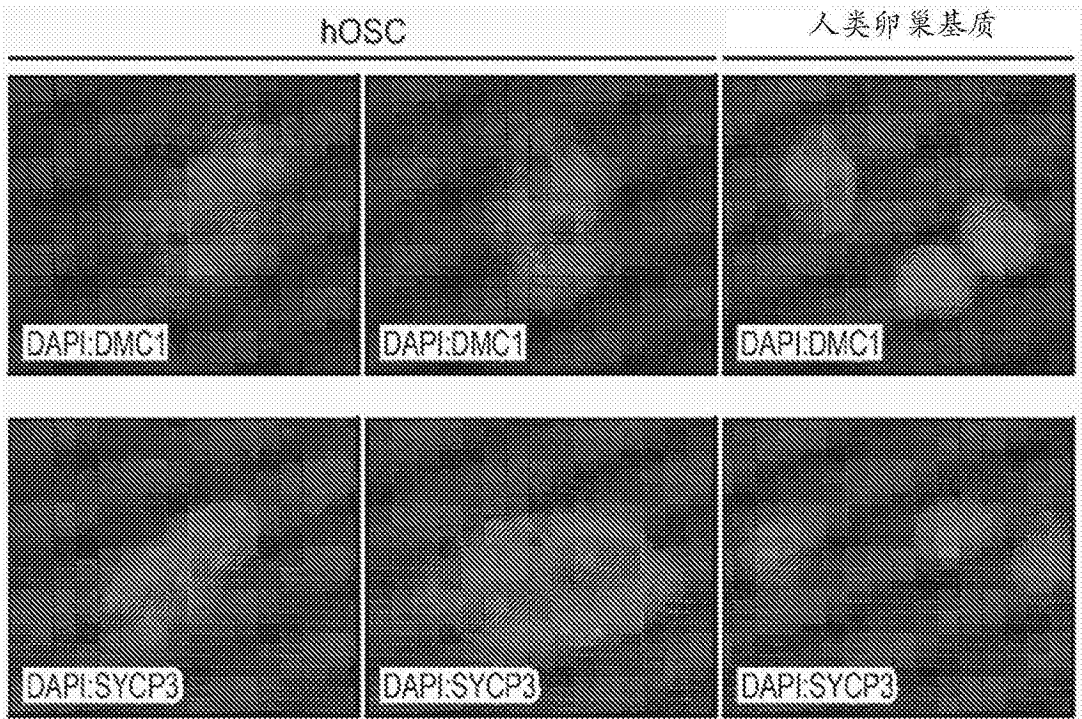


图7H

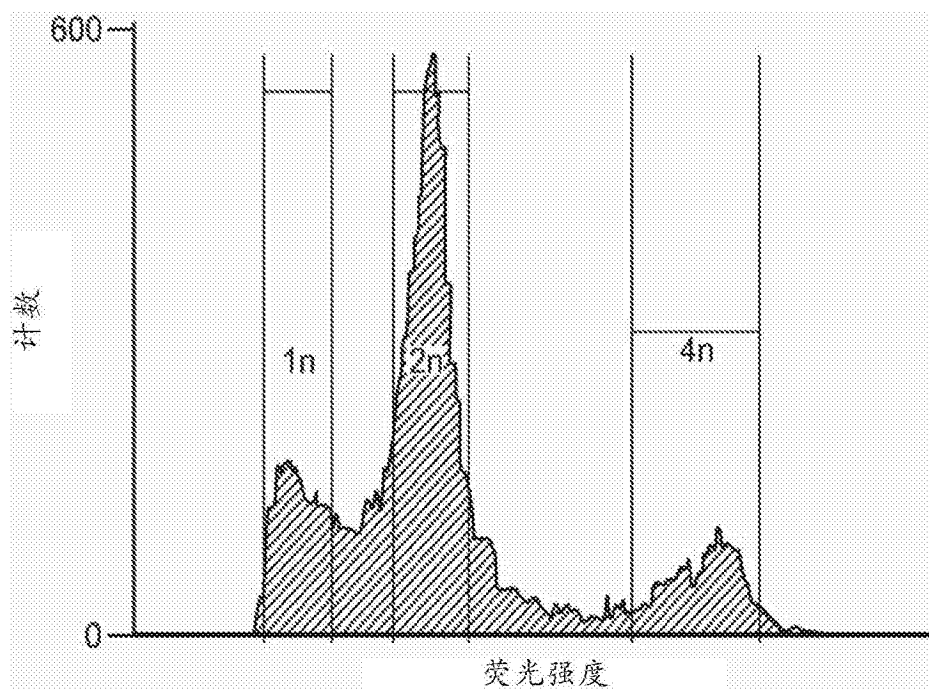


图7I

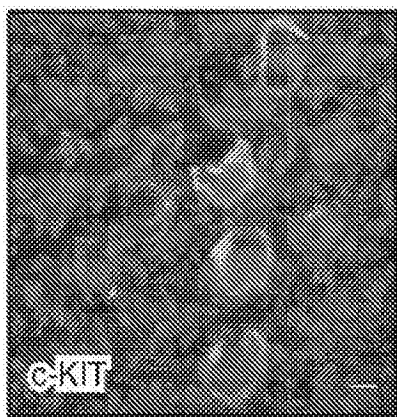


图8A

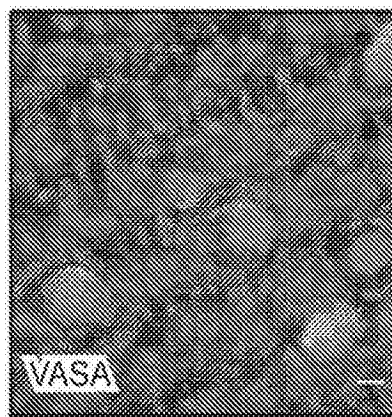


图8B

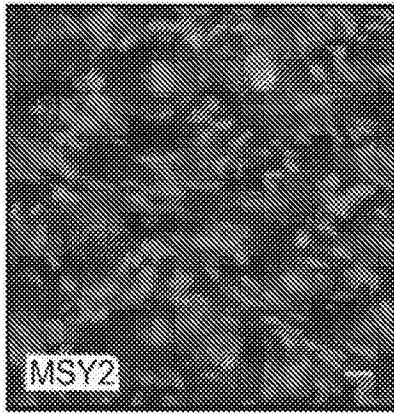


图8C

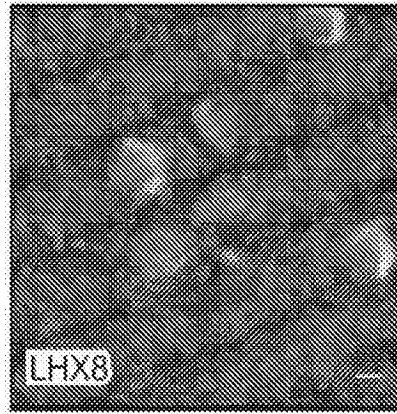


图8D

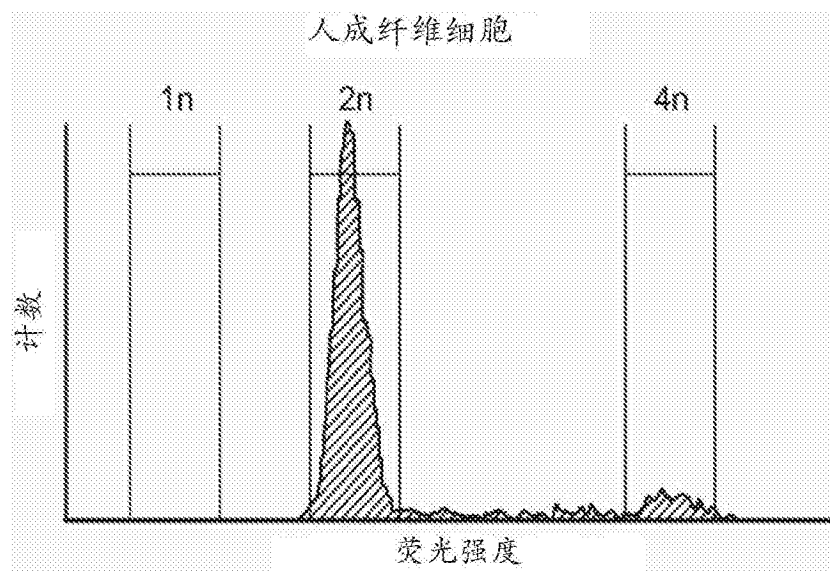


图9A

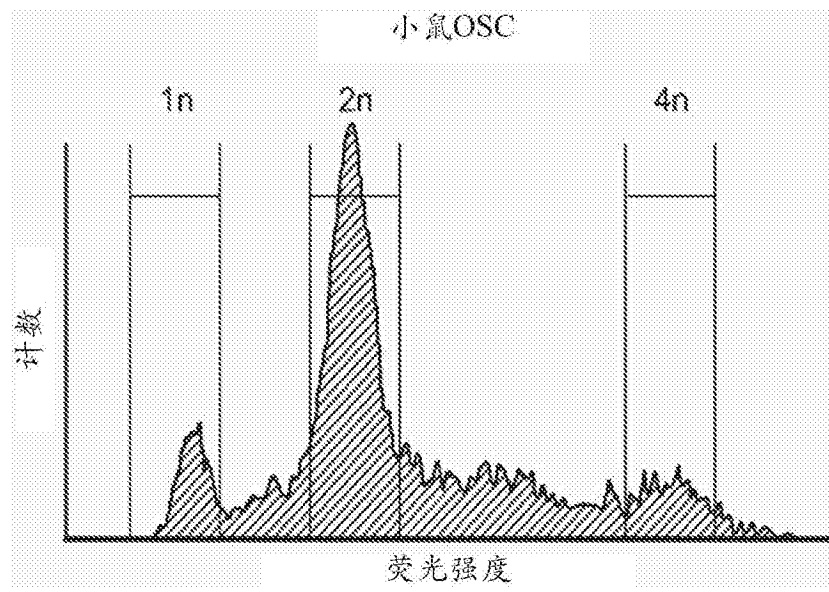


图9B

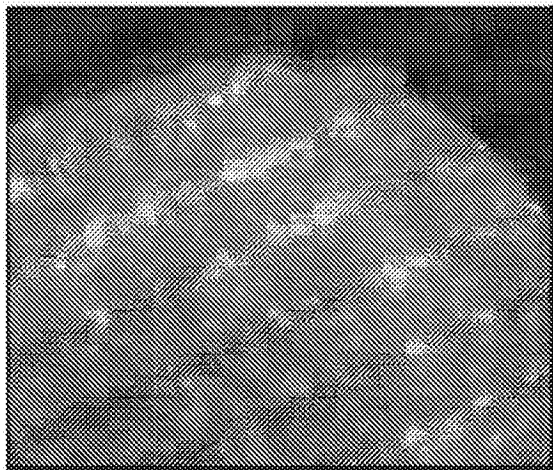


图10A

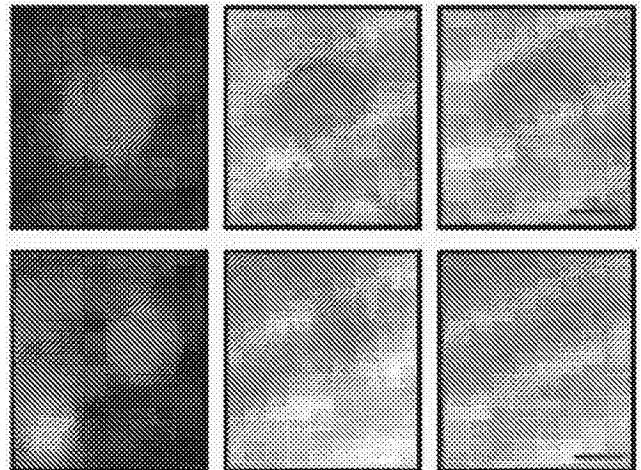


图10B

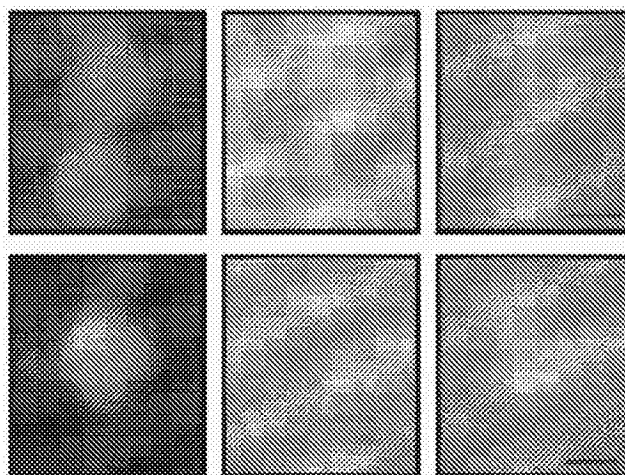


图10C

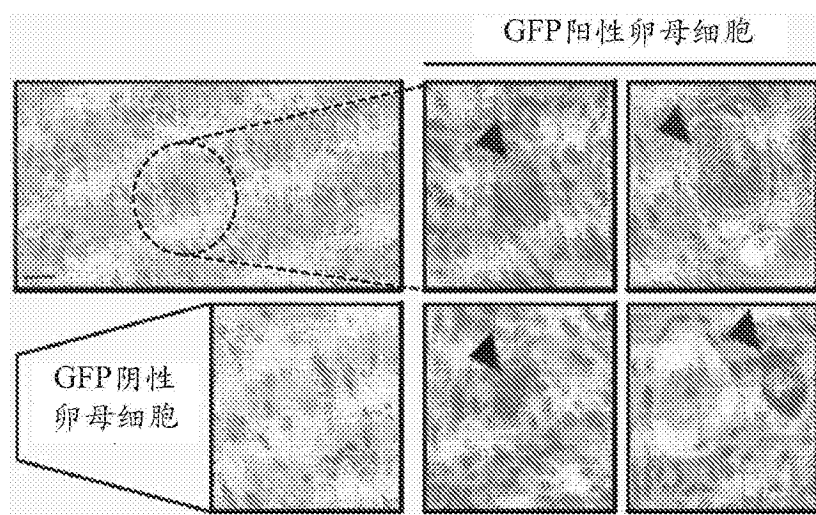


图10D

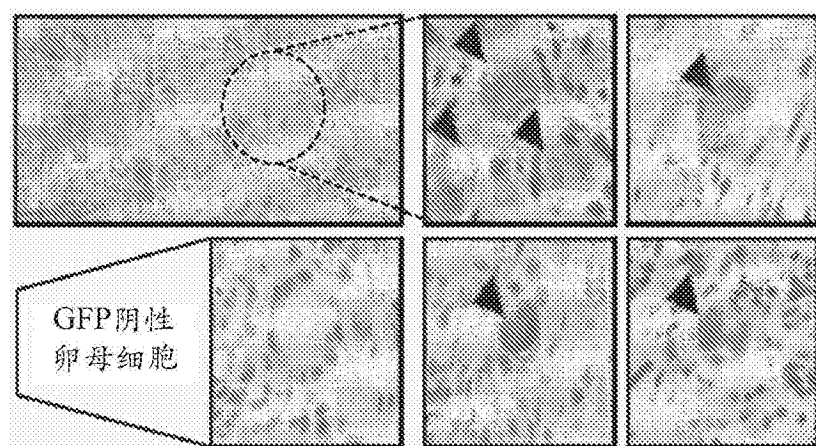


图10E

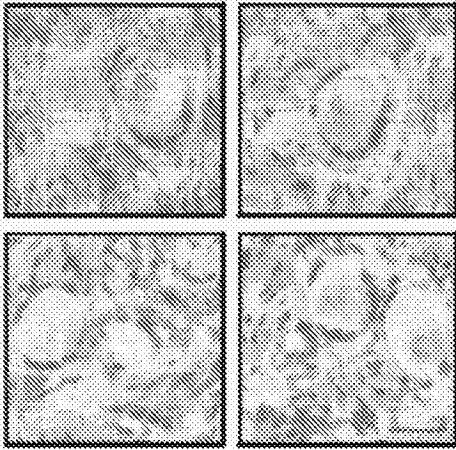


图10F

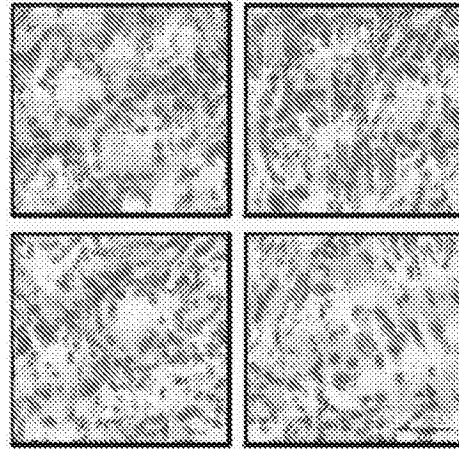


图10G

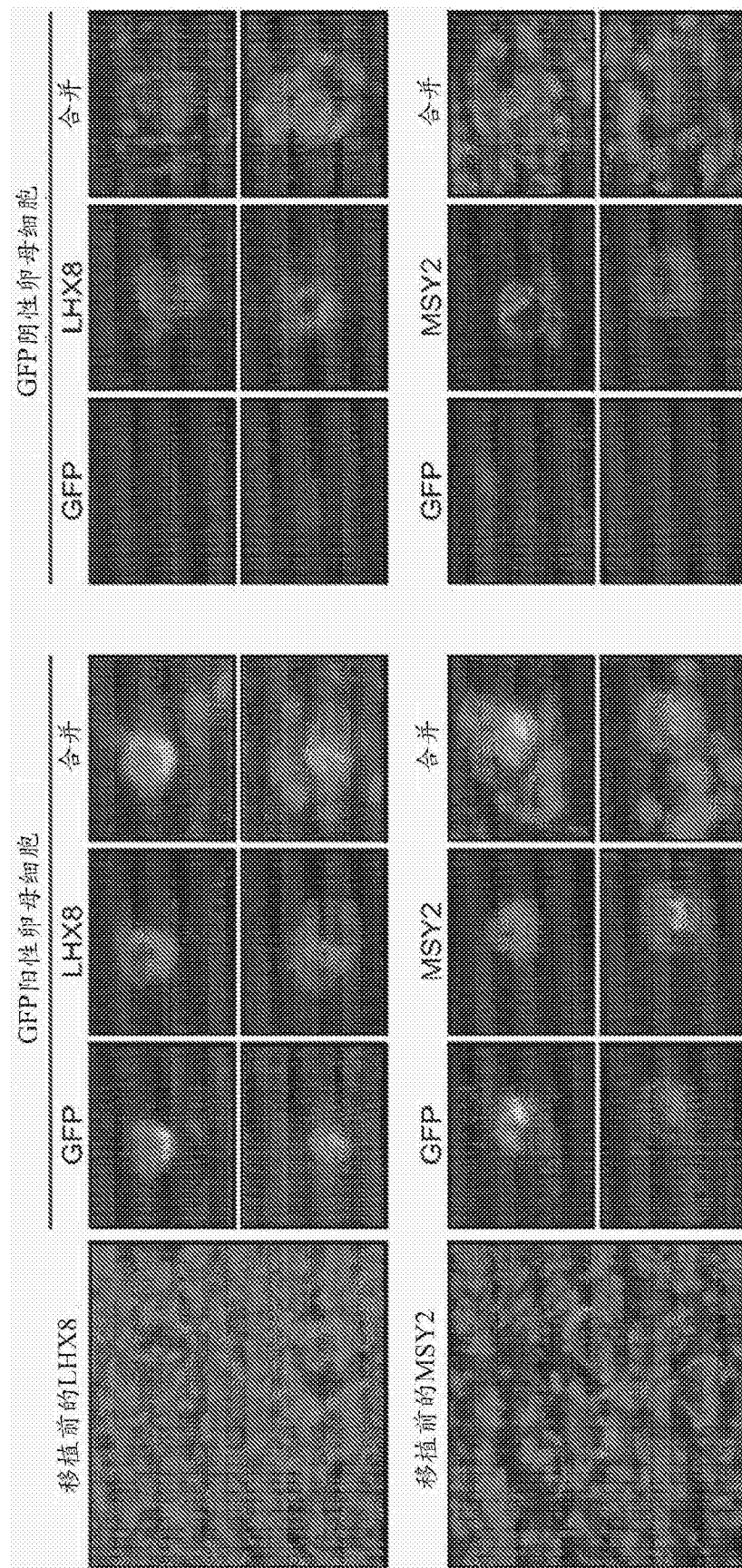


图10H

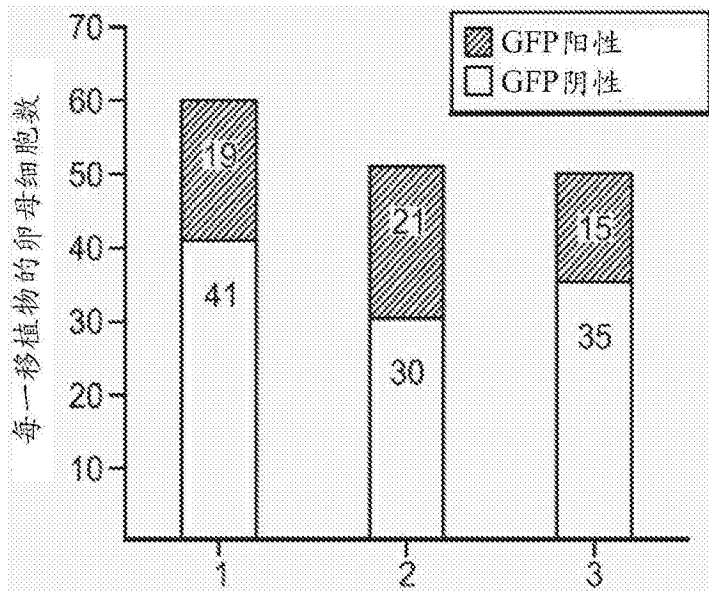


图11

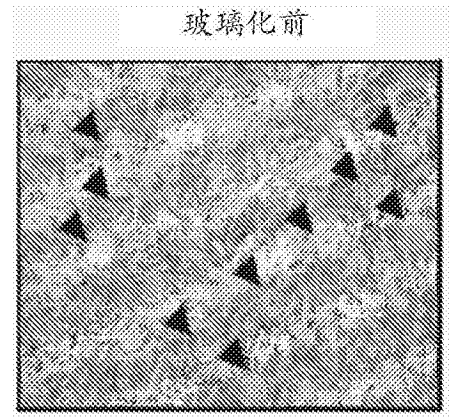


图12A

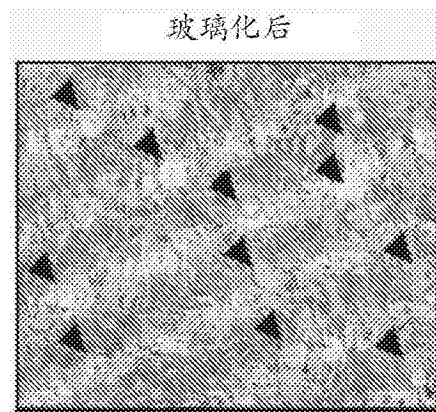


图12B

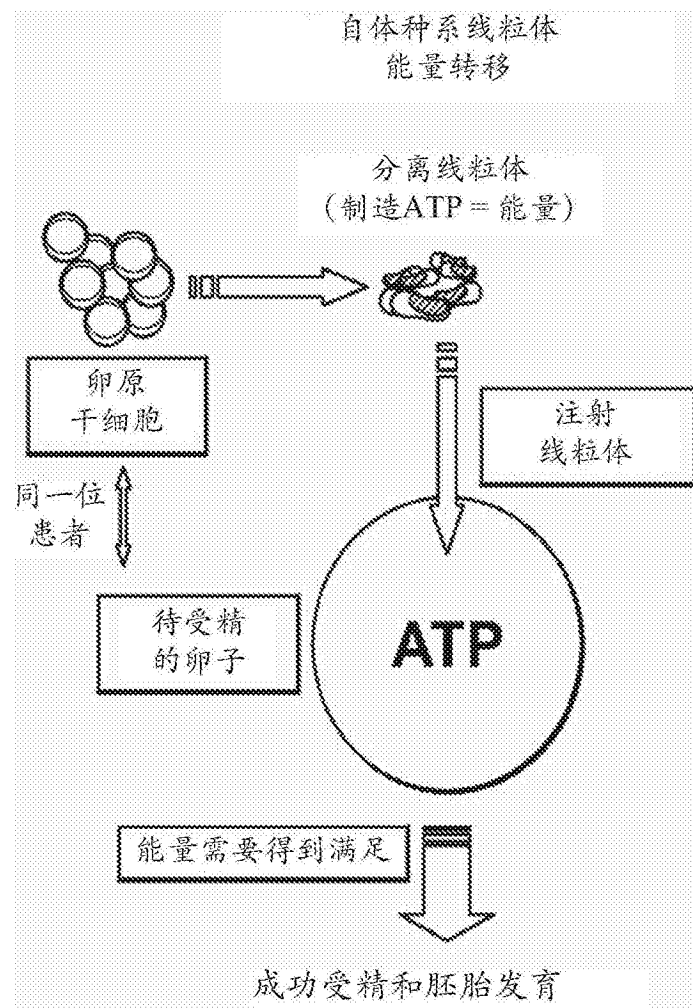
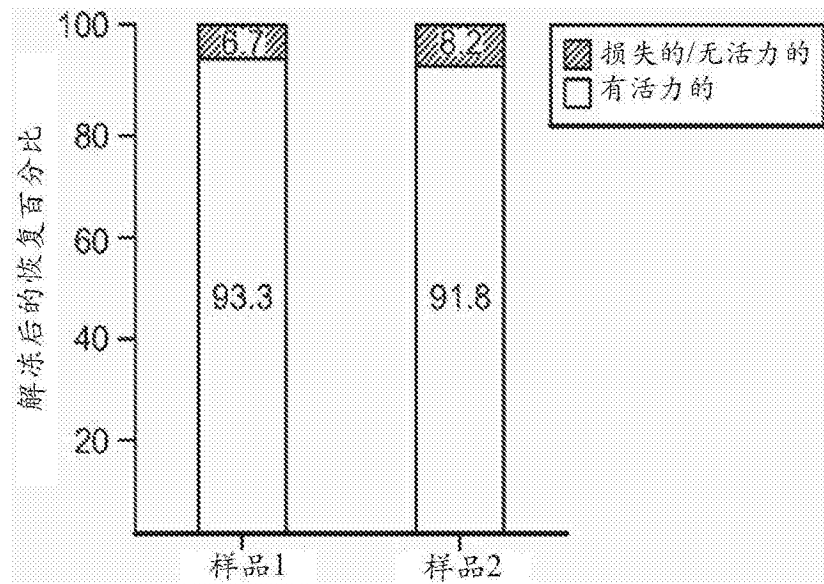


图13

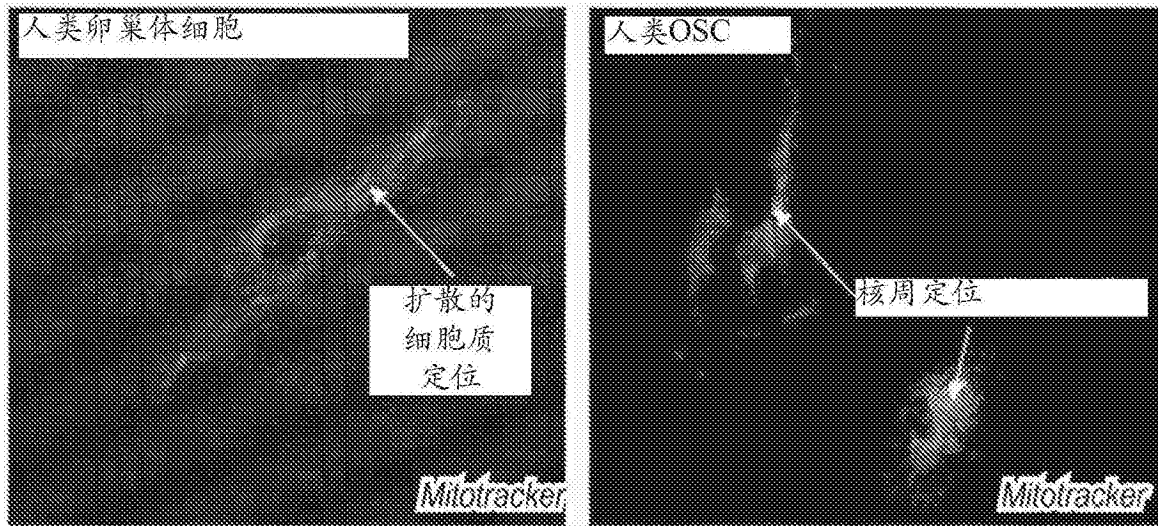


图14

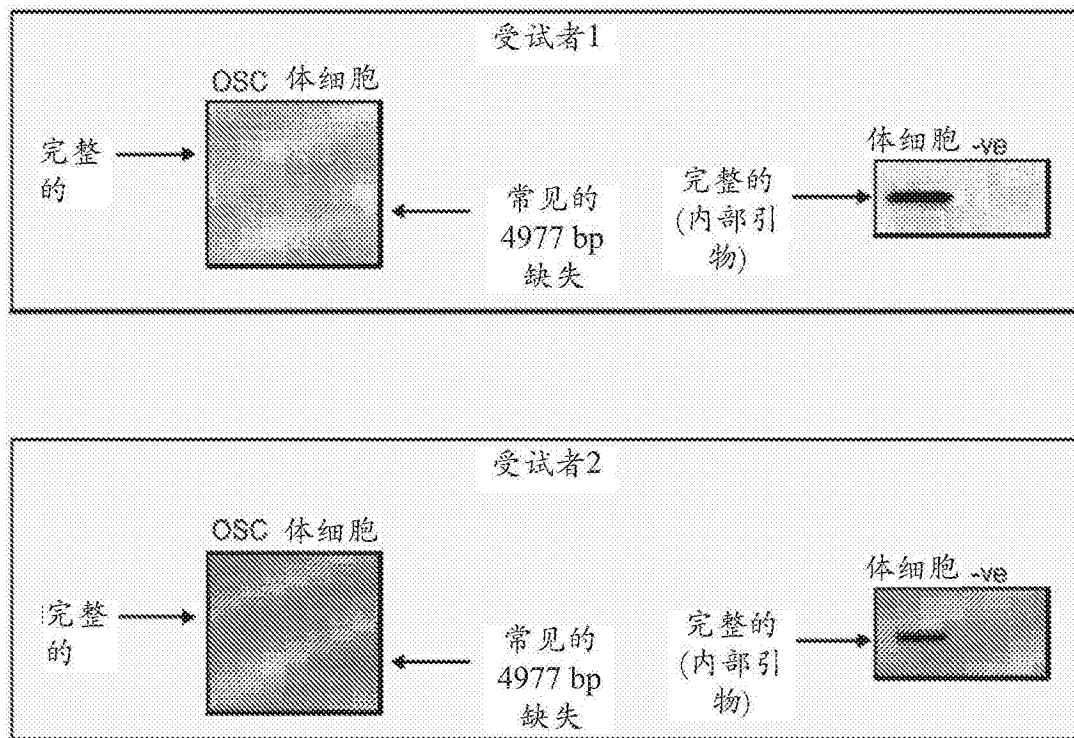


图15

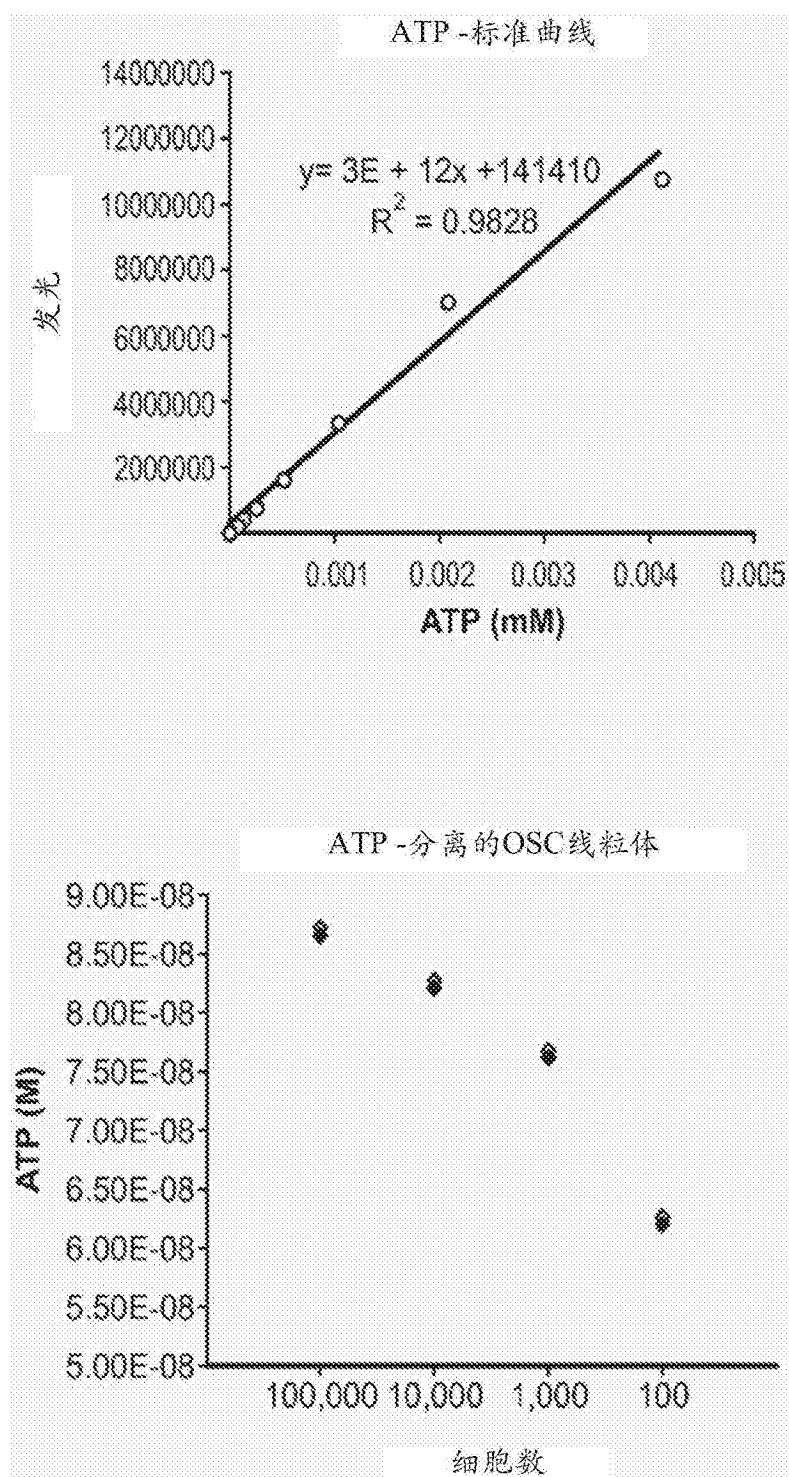
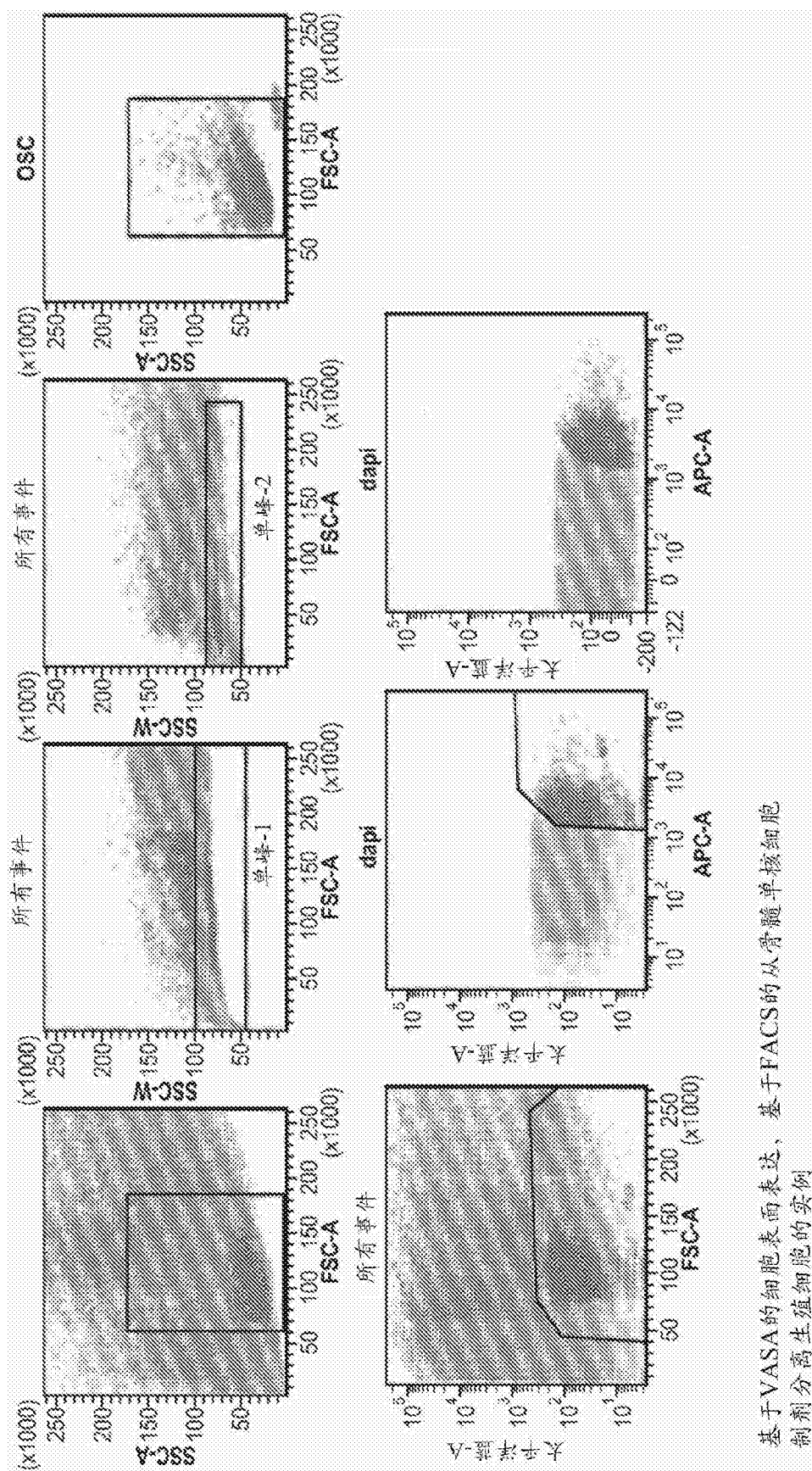


图16



基于VASA的细胞表面表达，基于FACS的从骨髓单核细胞
抑制剂分离增殖细胞的实例

图17

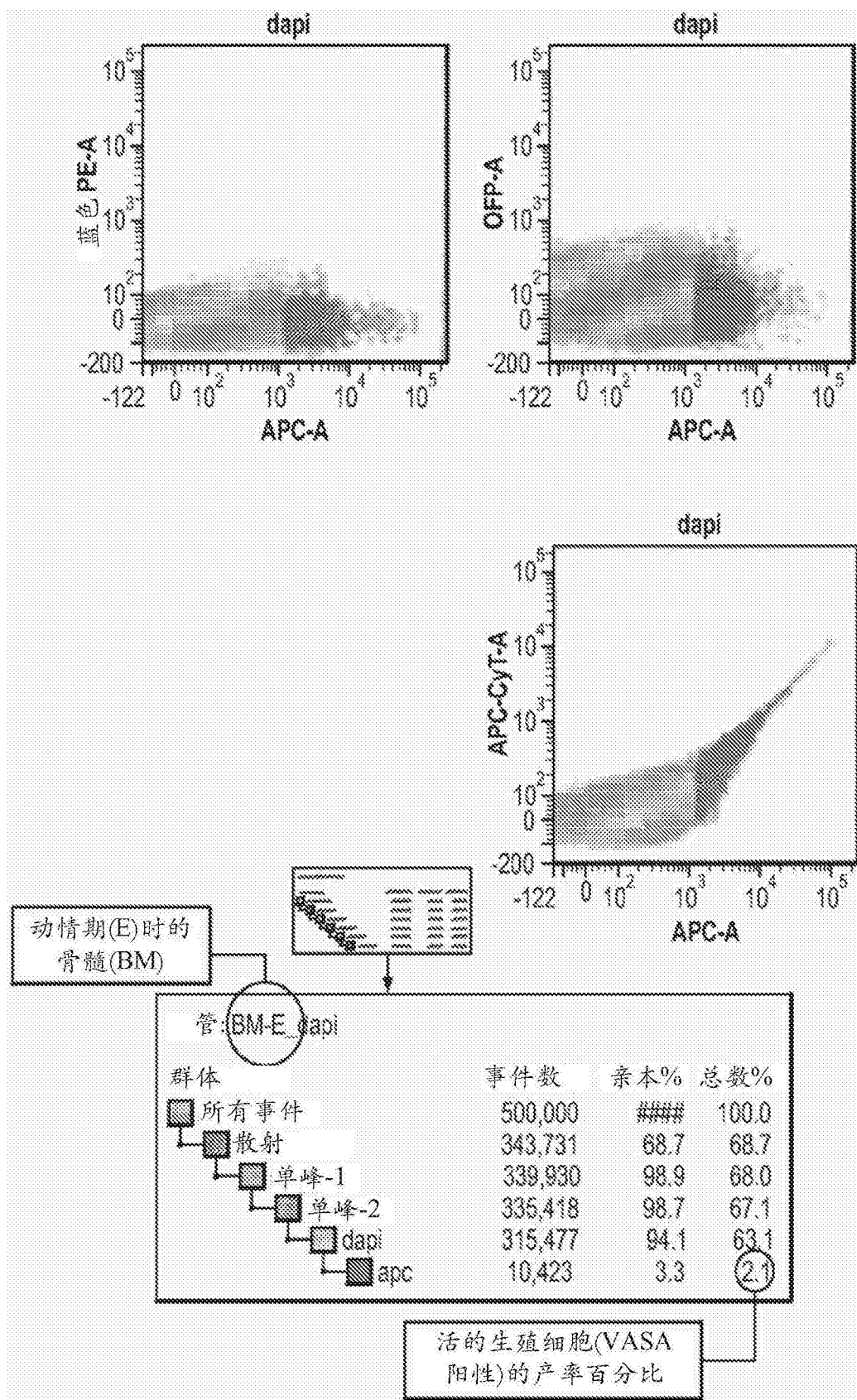
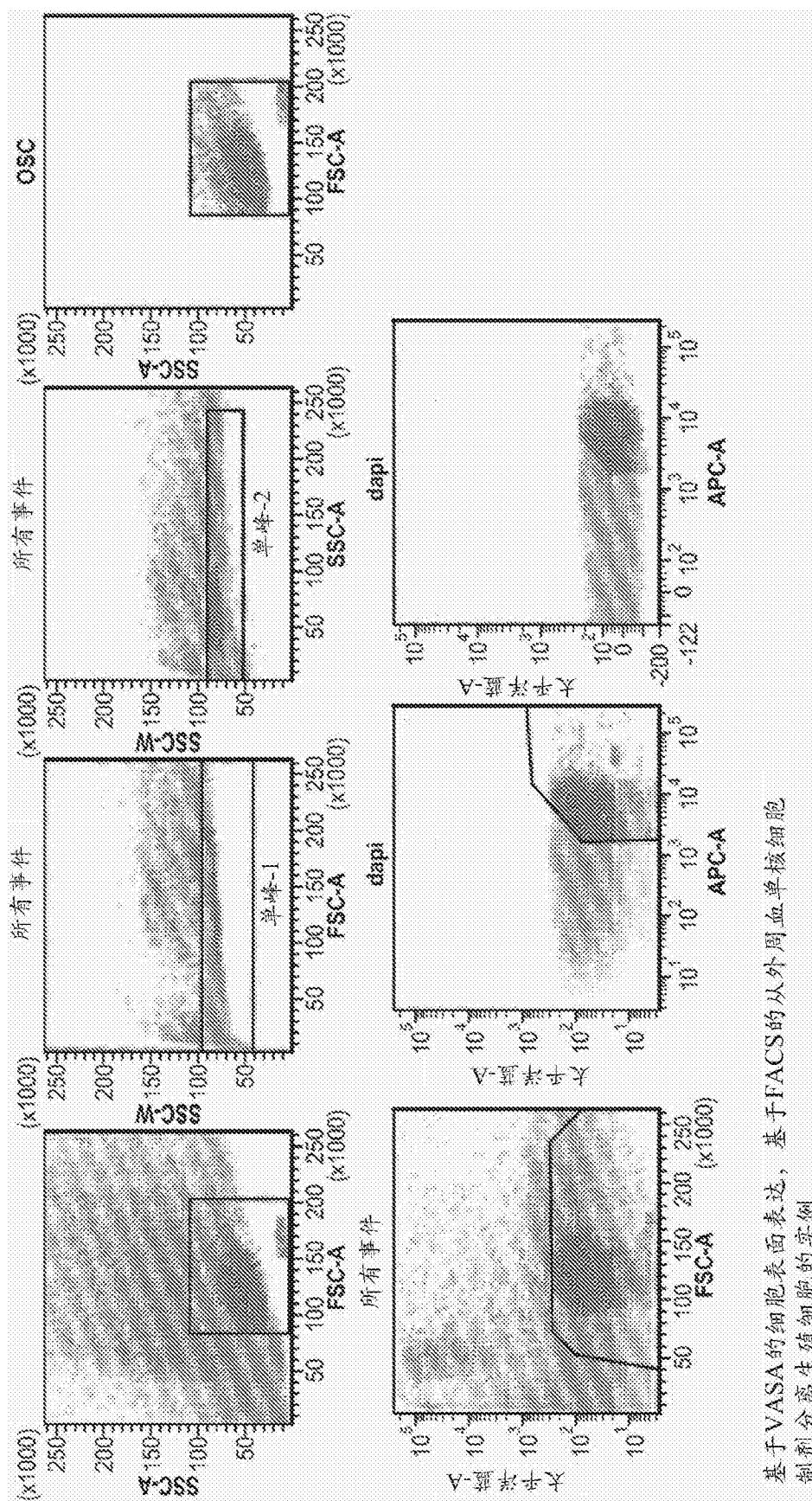


图17续



基于VASA的细胞表面表达，基于FACS的从外周血单核细胞
制剂分离增殖细胞的实例

图18

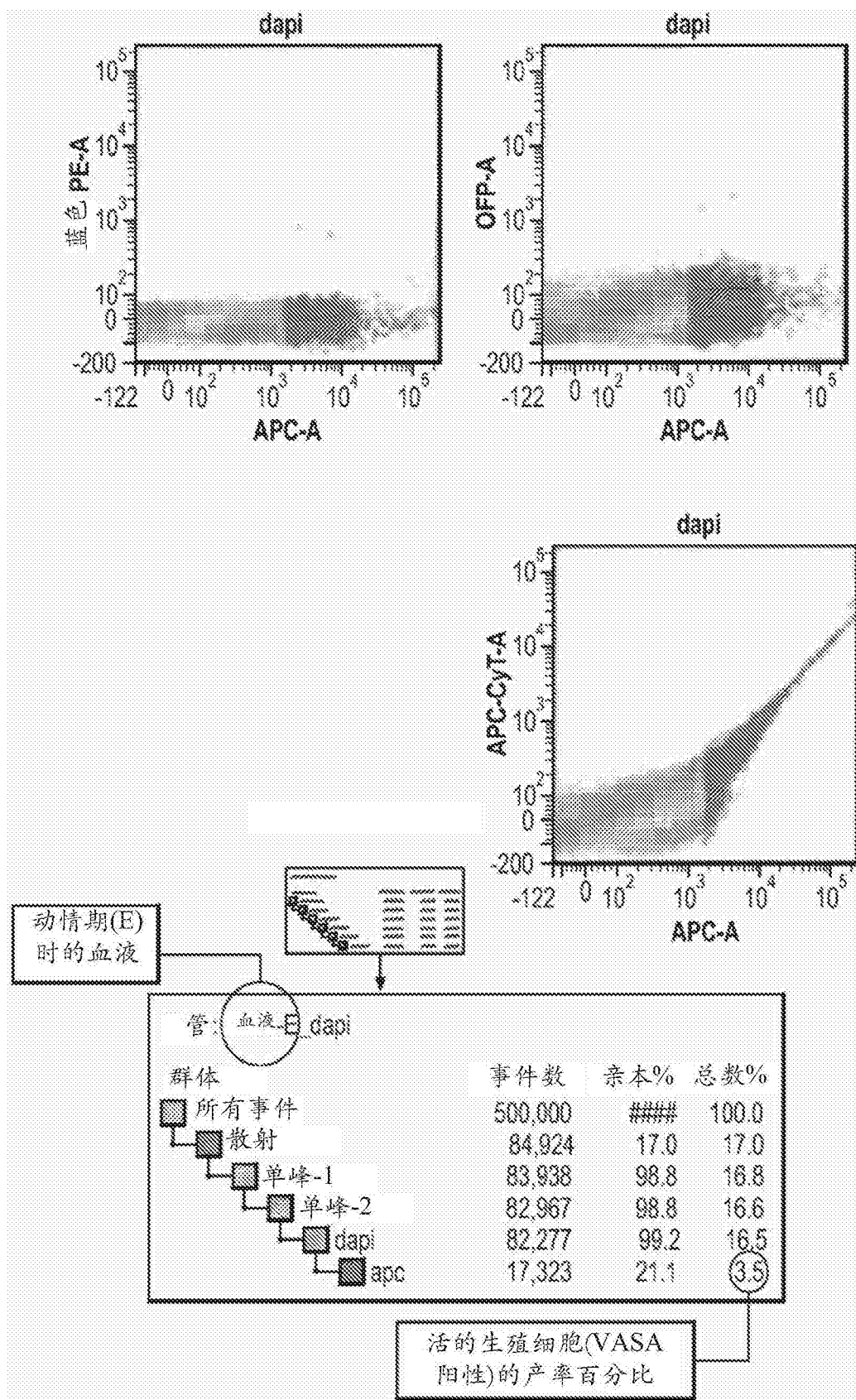


图18续

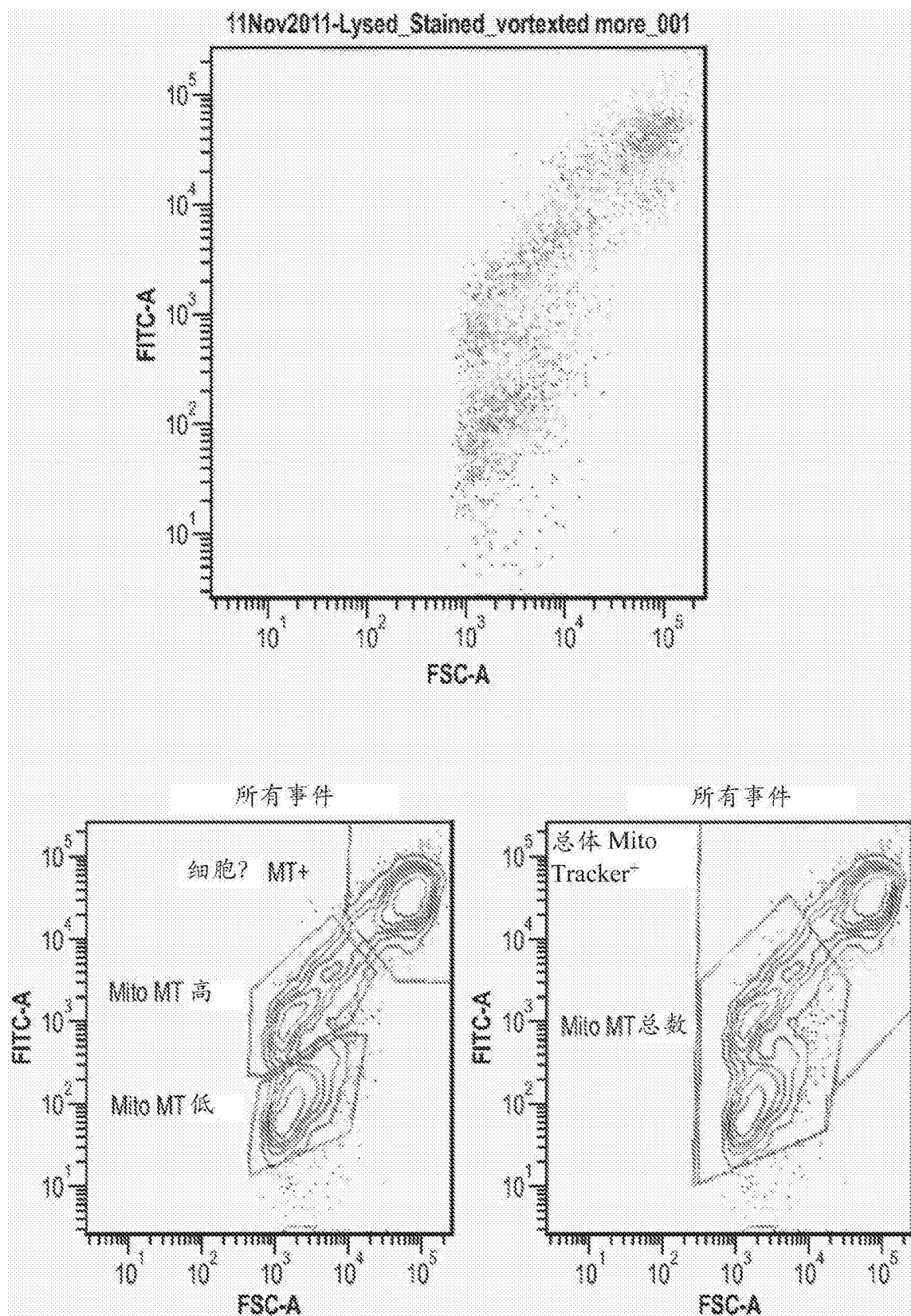


图19

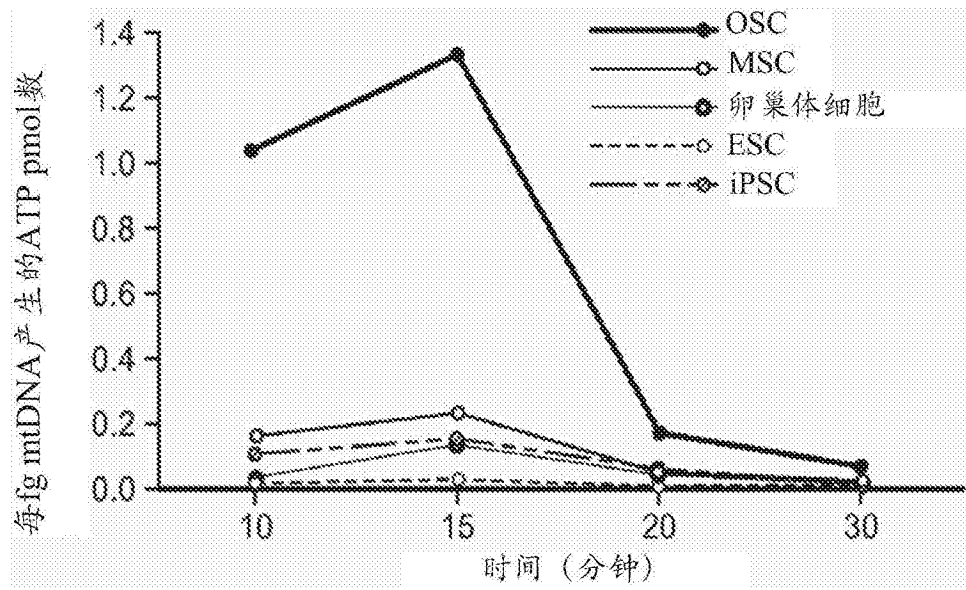


图20

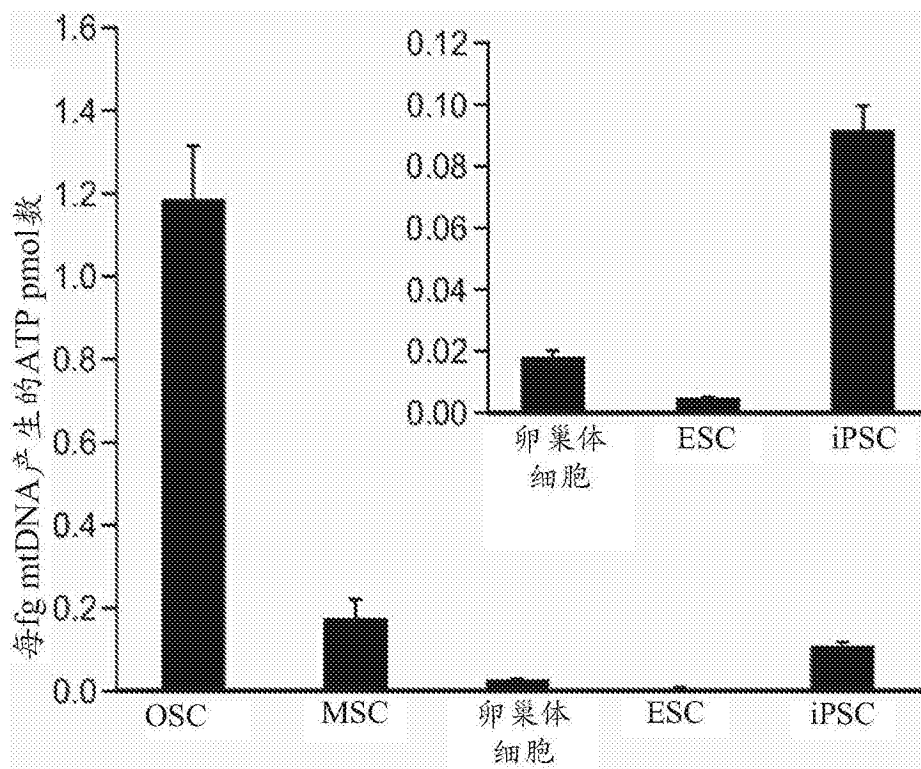


图21

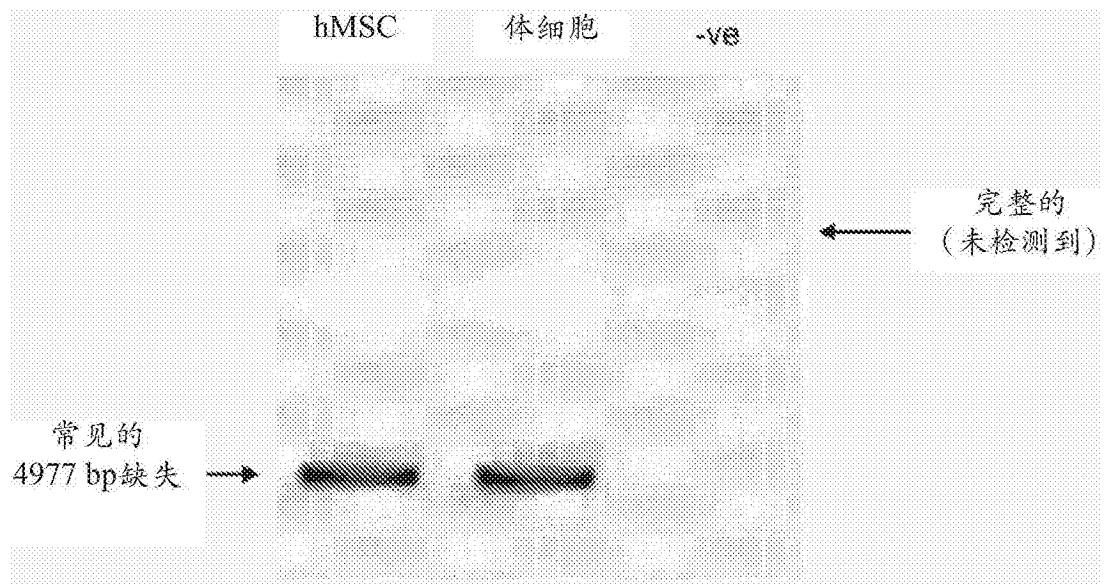


图22