

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2015年9月3日 (03.09.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/127875 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/873 (2010.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/073099
- (22) 国际申请日: 2015年2月15日 (15.02.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410070925.3 2014年2月28日 (28.02.2014) CN
- (71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN];
中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。
- (72) 发明人: 沙红英 (SHA, Hongying); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。朱剑虹 (ZHU, Jianhong); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。曹云霞 (CAO, Yunxia); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。王天 (WANG, Tian); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。纪冬梅 (JI, Dongmei); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。
- (74) 代理人: 上海翼胜专利商标事务所 (普通合伙) (SHANGHAI ESSEN PATENT&TRADEMARK AGENCY); 中国上海市普陀区中山北路 1958 号 2718 室, Shanghai 200063 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: POLAR BODY GENOME RESTRUCTURED OOCYTES AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 极体基因组重构卵子及其制备方法和用途

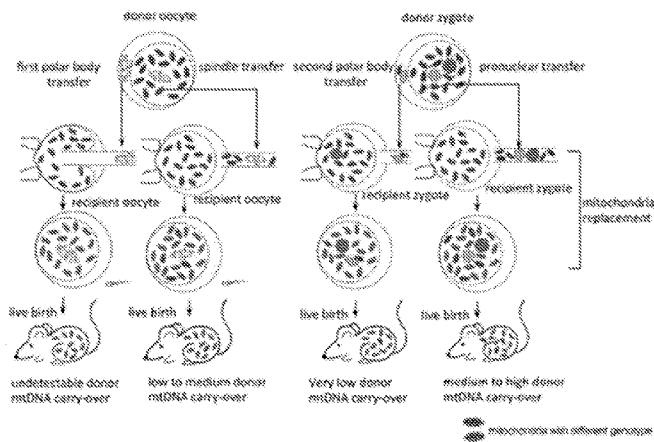


图 1 / FIG. 1

(57) Abstract: Disclosed are polar body genome restructured oocytes, the preparation method thereof and the use thereof in preparing the materials for preventing the occurrence of mitochondrial maternal genetic diseases.

(57) 摘要: 极体基因组重构卵子, 其制备方法及其在用于制备预防线粒体母源性遗传疾病的发生的制材中的用途。

WO 2015/127875 A1

极体基因组重构卵子及其制备方法和用途

技术领域

本发明属于生物医学领域，涉及极体基因组及其用途，具体涉及极体基因组重构卵子及其制备方法和用途，尤其是在制备治疗母源性线粒体遗传病制材中的用途。

背景技术

据研究报道，线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是独立于细胞核染色体外的又一基因组，被称为人类第25号染色体，遗传特点表现为非孟德尔遗传方式，又称为母系遗传 (maternal inheritance)，即母亲将mtDNA传递给她的儿子和女儿，但只有女儿能将其mtDNA传递给下一代。线粒体疾病(mitochondriopathy) 是指因遗传缺损引起线粒体代谢酶缺陷，导致ATP合成障碍、能量来源不足而出现的一组多系统疾病，其中，发生在卵子中的mtDNA突变引起母系家族性疾病，即母源性线粒体疾病。据不完全统计，在发生线粒体疾病致肌无力患者中，每200名妇女就有1名将线粒体肌无力遗传下一代。另一方面，人体的重要器官(能量需求高的部位如脑、心、肾、骨骼肌和内分泌腺等) 更易受突变影响。研究显示，绝大多数线粒体疾病影响到多器官系统的正常功能。疾病的临床表型非常广泛，包括线粒体脑肌病、线粒体肌病、胃肠综合征、肌张力障碍、糖尿病、心肌病、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿氏舞蹈病、痴呆以及耳聋等。目前，临床针对上述种目繁多的线粒体疾病尚无有效治疗方法，患者只能靠药物短期缓解症状，生活质量无法保证。同时，因线粒体DNA是通过卵胞质以母源性遗传的方式进入下一代，故通常患者被不建议生育，因此，给家庭带来痛苦和不幸。

卵子/胚胎显微操作技术(核移植)的发展为线粒体疾病治疗带来了希望。线粒体遗传物质呈母源性遗传方式，即由母亲遗传给下一代，因此可利用卵子/胚胎显微操作技术对患线粒体疾病的母亲卵子进行线粒体置换(mitochondria replacement MR)，使其获得功能正常的线粒体，这种置换后的卵子所产生的后代线粒体功能将得到改善或完全恢复正常。目前，MR技术包括中期纺锤体-染色体复合物移植(Spinlde-chromosome transfer, ST)——将患者卵子的遗传物质转移到去除遗传物质的健康卵子胞浆内、以及原核移植(pronucleus transfer, PNT)——将患者夫妇受精卵的原核转移到去除原核的健康受精卵胞浆内等技术手段。近年来，有研究在动物(小鼠、灵长类)实验中，利用上述两种MR技术手段已获得线粒体置换后产生的后代。因此，自2011年英国人类受精与胚胎机构(HFEA, Human Fertilisation and Embryology Authority) 即已开始着手总结近年线粒体置换调研结果，酝酿相应政策，有趋势

鼓励进一步临床试验研究。该机构同时还对人-人线粒体置换重构卵的安全性开展评估，认为该技术未改变卵子主要遗传物质—核DNA，且不同于克隆生物的目的，未发现明显安全隐患。据称该机构将在广泛听取大众舆论意见后，出台人线粒体置换相应政策(Human Fertilisation and Embryology Authority mitochondria public consultation 2012: <http://www.hfea.gov.uk/6896.html>)。

虽然 HFEA 已对上述线粒体置换技术安全性进行评估并认为该技术是安全的，但线粒体 DNA 遗传的瓶颈效应使上述技术尚无法真正做到彻底预防线粒体母源性遗传疾病的发生。由于人类的每个卵细胞中大约有 10 万个线粒体 DNA，但其中只有随机的一小部分(2~200 个)可以进入成熟的卵细胞传给子代，这种卵细胞形成期线粒体 DNA 数量剧减的过程被业内称为“遗传瓶颈效应”。通过“瓶颈”的线粒体 DNA 复制、扩增，构成子代的线粒体 DNA 种群类型。因此，要做到最大限度的预防线粒体疾病遗传给子代，必须确保置换后重构的卵子中不含患者的线粒体 DNA。然而，研究实践显示，无论中期染色体还是原核，因为能量的需要，在它们的周围均包裹着大量的线粒体，约占胞浆中线粒体总量的 40%，在核置换的过程中，这些线粒体随核进入新的卵胞浆中，使置换后的重构卵中仍含有一定量的突变 mtDNA，这些 mtDNA 有可能通过“遗传瓶颈”，在子代中复制和扩增，积累到一定的阈值，仍会导致子代发病。

本申请的发明人针对上述问题，拟提供一种极体基因组重构卵子及其制备方法和用途，尤其是在制备治疗母源性线粒体遗传病制材中的用途。该发明方法制得的重构卵子中不含患者线粒体 DNA，将能主动彻底预防线粒体母源性遗传疾病的发生。

发明内容

本发明的目的是克服现有技术的缺陷和不足，提供一种极体基因组重构卵子及其制备方法。

本发明进一步的目的是提供所述重构的卵子在用于制备预防线粒体母源性遗传疾病的发生的制材中的用途。本发明制得的重构卵子中不含患者的线粒体DNA，可有效阻断胞质相关疾病的发生，尤其可用于线粒体置换术获得治疗母源性线粒体遗传病的效果，将能主动彻底预防线粒体母源性遗传疾病的发生。

本发明理论依据为：雌性生殖细胞形成过程中经过两次减数分裂，形成一个大的单倍体即卵细胞和 2~3 个小的细胞，这些小的细胞称为极体，当第一次减数分裂时，形成一个大的次级卵母细胞和一个小的第一极体 (First Polar Body, PB1)；第二次减数分裂时，同样

产生一个小的第二极体 (Second Polar Body, PB2), 无论第一还是第二极体, 具备以下几个特点: (1) 虽然极体的体积远远小于卵细胞, 但其所获得的遗传物质与卵细胞是相等的; (2) 极体内细胞质 (线粒体) 极少, 因而用于提供基因组构建重构卵子时, 带入重构卵子内的疾病线粒体极少或者没有。

本发明利用了极体的既包含与卵胞浆中相同的女性遗传物质 (female DNA), 同时所携带的胞浆物质 (线粒体) 极少甚至没有的这两个特点, 提供了一种极体基因组重构卵子及其在用于制备预防线粒体母源性遗传疾病的发生的制材中的用途。

本发明的目的通过下述技术方案实现,

构建由患者卵子和受精卵的第一和/或第二极体提供的基因组与健康者卵子的胞浆构成的重构卵子, 该重构卵子内部仅含有健康者卵子的线粒体;

本发明中, 所述的第一极体源于线粒体疾病女性患者减数分裂中期卵子;

所述的第二极体源于线粒体疾病女性患者减数分裂中期卵子与其配偶受精后的受精卵;

本发明中, 采用显微操作的方法, 离体的, 将患者卵子和受精卵的第一和/或第二极体移入到已去除雌性遗传物质的健康者卵子或受精卵胞浆中; 通过下述步骤:

- (1) 将患线粒体疾病女性患者第一极体基因组与健康女性卵胞浆组成重构卵子;
- (2) 将患线粒体疾病女性患者第二极体基因组取代健康女性与患者配偶受精卵的雌原核, 组成重构胚胎;
- (3) 检测重构卵子 / 重构受精卵发育的胚胎中两种来源的线粒体含量 (线粒体异质性)
- (4) 动物模型实验验证, 所获胚胎包含 3 种遗传物质 (父母核 DNA 及健康供者线粒体 DNA), 有效阻断线粒体疾病的母源性遗传效果。

更具体的, 本发明中, 其核心技术方案是离体制备线粒体置换的重构卵子以及重构胚胎, 其包括:

- (1) 将患线粒体疾病女性患者第一极体基因组与健康女性卵胞浆组成重构卵子

用线粒体疾病女性患者的卵子排出的第一极体遗传物质代替卵子胞浆中的中二期遗传物质, 与去除遗传物质的健康女性卵子胞浆组成重构卵; 这种重构卵具有与正常卵子相同的受精发育能力, 并能使获得的后代彻底免于线粒体疾病的发生。

将所述患者和健康女性卵子置于显微工作室内含含有 CB 的 G-gamete 操作液中, 10 分钟后, 用持卵针持住一枚患者卵子 (含活的饱满的极体), 置极体于 12 点钟位置。使用 Piezo

脉冲控制的 $8\ \mu\text{m}$ 去核针吸取 PB1, 在 7% 的 PVP 中简单破膜后, 注入去核的健康女性卵子中, 完成操作的重构卵在 HTF 中充分洗涤后, 移入 HTF 等待体外受精。

取患者配偶精放入 HTF 获能 1 小时后, 加入适量的精子至重构卵液滴中行体外受精。受精 6 小时后将出现双原核的受精卵挑出, 移入到 G1 培养液中培养 72 小时, 每天于显微镜下观察胚胎发育情况, 根据临床需求可以将胚胎进一步转移至 G2 培养至囊胚阶段, 分裂的各阶段胚胎可以用于移植或冷冻保存。

上述制备方法中, 所述的重构, 是指采用显微操作系统介导的核移植技术将患者遗传物质与健康卵子胞浆组成重构卵 / 受精卵。

(2) 将患线粒体疾病女性患者第二极体基因组取代健康女性与患者配偶受精卵的雌原核, 组成重构胚胎

将患者和健康女性与患者配偶的受精卵置于显微工作室内含含有 CB 的 G-gamete 操作液中, 10 分钟后, 用持卵针持住一枚患者受精卵, 置极体于 12 点钟位置。使用 Piezo 脉冲控制的 $8\ \mu\text{m}$ 去核针吸取 PB2 (注意保持质膜的完整), 然后用 $15\ \mu\text{m}$ 的斜口去核针将 PB2 转移到灭活的仙台病毒中处理数秒后移入到去除雌原核的健康女性受精卵的透明带下, 使其与卵质膜紧密接触以促进二者的融合, 融合后的重构合子经 G1 液滴彻底洗涤后, 移入 G1 培养, 根据临床需求可以将胚胎进一步转移至 G2 培养至囊胚阶段, 分裂的各阶段胚胎可以用于移植或冷冻保存。

(3) 检测重构卵子 / 重构受精卵发育的胚胎中两种来源的线粒体含量 (线粒体异质性)

将各阶段胚胎裂解, 全基因组试剂盒(TIANGEN, BEIJING)提取 DNA 后, 针对患者与健康卵子捐赠女性的线粒体 DNA 序列, 选择二者有差异的 DNA 位点所在的一段序列, 设计引物扩增二者线粒体上的一段序列产物。再根据差异 DNA 位点设计生物素标记引物扩增第二轮产物用于焦磷酸测序。

上述关于子代线粒体含量检测采用焦磷酸测序法。

(4) 动物模型实验验证, 所获胚胎包含 3 种遗传物质 (父母核 DNA 及健康供者线粒体 DNA), 有效阻断线粒体疾病的母源性遗传效果。

采用含有不同线粒体的两种小鼠模型, 制备上述重构卵子, 并移植至假孕母鼠体内产生极体基因组移植的线粒体置换小鼠, 同时制备现有技术 (纺锤体、原核置换) 条件下的线粒体置换小鼠, 验证该发明所获得的重构卵子阻断线粒体疾病的母源性遗传效果。

本发明的极体基因组重构卵子能进一步制备防治线粒体母源性遗传疾病发生的制材。

本发明的极体基因组重构卵子具有如下优点：

- (1) 极体内线粒体极少 (PB2) 甚至完全缺失线粒体 (PB1)，为主动彻底预防线粒体母源性遗传疾病的发生开辟了新的治疗途径和手段；
- (2) 极体基因组外被质膜，且体积极小，易于操作，外被质膜可以保证基因组在操作的过程中不丢失；
- (3) 本发明重构的卵子具备正常卵子的体外受精、卵裂和发育能力；
- (4) 本发明重构的受精卵具备正常受精卵的卵裂和发育能力；
- (5) 本发明中来自第一极体的所有子代仅含有胞浆供体的线粒体，即健康女性的线粒体，未检测到核供体即线粒体疾病患者的线粒体的存在，也即本发明获得了完全健康的来自线粒体疾病患者的后代；
- (6) 本发明建立的焦磷酸测序法检测线粒体的异质性灵敏性特异性高。

本发明的极体基因组重构卵子可用于线粒体置换术获得治疗母源性线粒体遗传病的效果，本发明制得的重构的卵子中不含患者的线粒体DNA，可有效阻断胞质相关疾病的发生，将能主动彻底预防线粒体母源性遗传疾病的发生。

附图说明

图 1. 本发明的技术路线，其中显示：

Donor oocyte / zygote: 核供体卵子 / 受精卵 (来自雌性线粒体疾病患者); Recipient oocyte / zygote: 胞浆供体卵子 / 受精卵 (来自健康雌性); first polar body transfer: 第一极体移植; Spindle transfer: 纺锤体移植; second polar body transfer: 第二极体移植; pronucleus transfer: 原核移植; mitochondria replacement: 线粒体置换; undetectable donor mtDNA carry-over: 未检测到核供体线粒体 DNA 携带; low to medium donor mtDNA carry-over: 少量至中量核供体线粒体 DNA 携带; very low donor mtDNA carry-over: 极少量核供体线粒体 DNA 携带; medium to high donor mtDNA carry-over: 中量至大量核供体线粒体 DNA 携带。

图 2. 显示 PB1、Spindle、PB2、pronuclei 周围的线粒体分布，

其中，

A: 卵子胞浆内及第一极体中线粒体分布; B: 受精卵胞浆内及第二极体中线粒体分布; C: 第一极体、纺锤体—染色体复合物周围所携带线粒体，第二极体、原核周围所携带线粒

体；D：第一极体、纺锤体—染色体复合物、第二极体、原核周围线粒体荧光密度分析。MitoTrackor：线粒体荧光探针；Hochest：核荧光探针。

图 3. 显示 PB1 与 spindle—chromosome、表观遗传特征一致，PB1 可以取代 spindle—chromosome 治疗母源性线粒体疾病，

其中，

A、B： α -tubulin 染色显示 PB1 与 spindle—chromosome 形态特征一致；C、D、E：5 甲基胞嘧啶甲基化、组蛋白 3 甲基化、组蛋白 3 磷酸化抗体染色显示 PB1 与 spindle—chromosome 表观遗传特征一致；F：第一极体置换的模式及实物图；G：纺锤体置换的模式及实物图。

图 4. 显示 PB2 与 Female Pronucleus 表观遗传特征一致，PB2 可以取代 female pronucleus 治疗母源性线粒体疾病，

其中，

A、B：lamin B1 染色显示 PB2 与 female pronucleus 形态特征一致；C、D、E：5 甲基胞嘧啶甲基化、组蛋白 3 甲基化、组蛋白 3 乙酰化抗体染色显示 PB2 与 female pronucleus 表观遗传特征一致；F：第二极体置换的模式及实物图；G：原核置换的模式及实物图。

图 5. 显示 PB1T、ST、PB2T、PNT 产生的四种线粒体置换小鼠及其效率，

其中，

A、B：PB1T、ST、PB2T、PNT 四种线粒体置换技术的效率，IVF 技术为这四种技术的对照；C：PB1T、ST、PB2T、PNT 四种线粒体置换小鼠的出生体重及胎盘重量与 IVF 小鼠的无显著差异性；D：PB1T、ST、PB2T、PNT 四种线粒体置换胚胎、新生儿、成年个体。

图 6. PB1T、ST、PB2T、PNT 产生的四种线粒体置换小鼠体内核供体与胞浆供体的线粒体异质性，

其中，

A：核供体（NZW 鼠）与胞浆供体（BDF1 鼠）线粒体被检测位点；B：示 C、T 为 100% 时的焦磷酸测序图；C：PB1T、ST、PB2T、PNT 四种线粒体置换小鼠体内核供体与胞浆供体的线粒体异质性比较；D、E、F、G：依次为 PB1T、ST、PB2T、PNT 四种线粒体置换小鼠脑、心、肺、肝、肾等重大器官中核供体与胞浆供体的线粒体异质性分布；H、I、J、K：依次为 PB1T、ST、PB2T、PNT 四种线粒体置换小鼠脑、心、肺、肝、肾等重大器官中核供体与胞浆供体的线粒体异质性检测代表性图谱。

图 7. 显示人类卵子 PB1 与 spindle—chromosome、受精卵 PB2 与 Female Pronucleus 遗传特征一致，

其中，

A: 人类卵子及其第一极体; B: 比较基因组学检测该卵子第一极体与其胞浆内的核染色体的遗传特征是一致的; C: 人类受精卵及其第二极体; D: 比较基因组学检测该受精卵第二极体与其胞浆内的原核遗传特征是一致的。

具体实施方式

下面结合动物模型具体实施例，进一步阐述本发明，并与现有的线粒体置换技术 (ST, PNT) 进行比较 (图 1 示本发明的研究示意图)。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

一. 研究材料与方法

(一) 研究材料

新西兰白鼠，在本发明研究中模拟女性线粒体疾病患者。C57BL / 6 与 DBA2 的杂一代鼠 BDF1，在本发明研究中模拟捐赠卵胞浆的健康女性。ICR 鼠，在本发明中用作代孕妈妈。

(二) 研究方法

1. PB1、PB2 用于母源性线粒体疾病治疗的可行性分析

(1) PB1、spindle、PB2、Pronuclei 所携带的线粒体比较

用线粒体荧光探针 MitoTrackor (250nM) 染色卵子、受精卵 10 分钟，Hochest33342 复染核 10 分钟。将染色后的卵子及胚胎置于含 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的 CB 操作液滴中，用 $15 \mu\text{m}$ 的去核针取出 PB1、Spindle、PB2、Pronuclei，转移至共聚焦显微镜专用的培养皿小室液滴内，共聚焦显微镜下观察线粒体分布情况。

(2) PB1 与 spindle、PB2 与 Pronuclei 表观遗传特征比较

将新鲜的卵子、受精卵用 4% 的多聚甲醛固定及透化、封闭处理后，进行表观遗传免疫组化检测，检测的一抗包括 anti-tubulin (1/200, Sigma, T8203), anti-lamin B1(1:50, Abcam, ab8982), anti-H3K9me3 (1/200, Abcam, ab8898), anti-H3P (1/100, Abcam, ab7031), anti-acetyl H3 (1:250, Millipore 06599) , 5mC antibody (1:200, Abcam, ab10805). 所有一抗均于 4 °C 孵育过夜。次日，用 PBS 充分洗涤卵子、受精卵后，针对不同的一抗，分别用荧光二抗 DyLight 488 驴抗鼠 IgG (1:500, Jackson) 或 Alexa488 驴抗兔 IgG (1:500, Invitrogen) 标记荧光 (37°C 孵育 1.5 h)。二抗标记结束后，PI 复染核。将完成染色的卵子、受精卵转移至共聚焦显微

镜专用的培养皿小室液滴内，共聚焦显微镜下观察表观遗传的异同。

2. PB1T、ST、PB2T、PNT 四种线粒体小鼠制备及其子代繁殖

(1) PB1T 及 ST 小鼠制备

6-8 周 NZW、BDF1 雌鼠腹腔注射 5IU PMSG，间隔 48h 腹腔注射 5IU HCG。HCG 注射后 13h 从输卵管膨大部回收卵丘细胞包围的成熟卵母细胞，置于含 0.1%透明质酸酶的 G-gamete 操作液中，置于 37°C，5%CO₂ 饱和适度培养箱内直到卵丘细胞松散（2~3min）。脱颗粒后的卵子置于培养箱中恢复 30min。

将 NZW 和 BDF1 卵子置于显微工作室内含有 CB 的 G-gamete 操作液中，10 分钟后用持卵针持住一枚 NZW 卵（含活的饱满的极体），置极体于 12 点钟位置。使用 Piezo 脉冲控制的 8 μm 去核针吸取 PB1，在 7%的 PVP 中简单破膜后，注入去核的 BDF1 卵子中。完成操作的重构卵在 HTF 中充分洗涤后，移入 HTF 等待体外受精。

用 Piezo 脉冲控制的 8 μm 去核针将 NZW 卵的纺锤体-染色体复合物连同少量胞质轻轻吸出（此处简称 karoplast），然后用 15 μm 的斜口去核针将 karoplast 转移到灭活的仙台病毒中处理数秒后移入到去核的 BDF1 卵子的透明带下，使其与 BDF1 卵质膜紧密接触以促进二者的融合。融合后的重构卵经 HTF 液滴彻底洗涤后，移入 HTF 等待体外受精。

12 周的公鼠脱颈椎致死，取附睾精子放入 HTF 获能 1 小时后，加入适量的精子至重构卵液滴中行体外受精。受精 6 小时后将出现双原核的受精卵挑出，移入到 G1 培养液中培养 72 小时，每天于显微镜下观察胚胎发育情况。72 小时后，发育至囊胚的重构胚移入到同步发情的假孕母鼠体内待产仔。16 天后，对怀孕的母鼠实行剖腹产，存活的仔鼠带奶。

(2) PB2T 及 PNT 小鼠制备

6-8 周 NZW、BDF1 雌鼠腹腔注射 5IU PMSG（NZW 鼠注射 PMSG 时间比 BDF 早 2 小时左右），间隔 48h 腹腔注射 5IU HCG，与 12 周龄公鼠合笼交配。HCG 注射后 18h 从输卵管膨大部回收卵丘细胞包围的合子，置于含 0.1%透明质酸酶的 G-gamete 操作液中，置于 37°C，5%CO₂ 饱和适度培养箱内直到卵丘细胞松散（2~3min）。脱颗粒后的合子置于培养箱中恢复 30min。

将 NZW 和 BDF1 合子置于显微工作室内含有 CB 的 G-gamete 操作液中，10 分钟后用持卵针持住一枚 NZW 合子，置极体于 12 点钟位置。使用 Piezo 脉冲控制的 8 μm 去核针吸取 PB2（注意保持质膜的完整）。然后用 15 μm 的斜口去核针将 PB2 转移到灭活的仙台病毒中处理数秒后移入到去除雌原核的 BDF1 卵子的透明带下，使其与 BDF1 卵质膜紧密

接触以促进二者的融合。融合后的重构合子经 G1 液滴彻底洗涤后，移入 G1 培养。

用持卵针去除第二极体的 NZW 合子，15 μ m 的斜口去核针轻轻吸出雌雄双原核，转移到灭活的仙台病毒中处理数秒后移入到去除雌雄双原核的 BDF1 卵子的透明带下，使其与 BDF1 卵质膜紧密接触以促进二者的融合。融合后的重构合子经 G1 液滴彻底洗涤后，移入 G1 培养。

每天于显微镜下观察胚胎发育情况。72 小时后，发育至囊胚的重构胚移入到同步发情的假孕母鼠体内待产仔。16 天后，对怀孕的母鼠实行剖腹产，存活的仔鼠带奶。

3. PB1T、ST、PB2T、PNT 四种线粒体置换小鼠 (♀) 及其子代异质性程度比较

取四种线粒体置换小鼠及其子代的鼠尾，全基因组试剂盒 (TIANGEN, BEIJING) 提取 DNA 后，设计引物 5'- atggctactggattccatgg-3' and 3'- gctcctatgaagcttcatgg-5' 扩增线粒体上 9201 ~ 11102 序列产物。合成生物素标记引物 TTTGAAGCCGCAGCATGA (forward), ATTTATTTGGGGGAGTCAGAATGC (reverse-biotin) 扩增第二轮产物用于焦磷酸测序。焦磷酸测序引物为 GAATAAACCCAGAAGAGAGT，焦磷酸测序的操作按照仪器的操作规程和步骤执行。

4. 人类卵子 PB1 与 spindle、受精卵 PB2 与 Pronuclei 遗传特征比较

将新鲜的卵子、受精卵置于含 5 μ g / ml 的 CB 操作液滴中，用 15 μ m 的去核针取出 PB1、Spindle、PB2、Pronuclei，转移至 PCR 管，用全基因组扩增试剂盒进行单细胞扩增，扩增后的产物进行比较基因组学芯片 (cGH) 检测，比较 PB1 与 spindle、PB2 与 Pronuclei 遗传特征是否一致。

结果显示：

1. PB1、PB2 具备用于母源性线粒体疾病治疗的基础和优势 (相对于 ST 和 PNT)

(1) . PB1、PB2 携带极少的线粒体，相对于 Spindle 和 Pronuclei

MitoTrackor 荧光探针标记染色显示 (图 2)，PB1、PB2 中仅携带极少的线粒体，尤其 PB1 中几乎检测不到线粒体的存在；而 PB1 的对应者 Spindle 周围则包裹着大量的线粒体，因 Spindle 的运动需要大量的能量；PB2 的对应者 Pronuclei 周围线粒体则更多，因卵子受精后线粒体会激增，同时雌雄原核在不断的靠近准备分裂，这个过程需要大量的线粒体提供能量。因此，用 PB1 取代 ST、PB2 取代 PNT，那么带入到重构卵子 / 胚胎中的疾病线粒体数量将显著降低。

(2) . PB1 与 spindle-chromosome、PB2 与 Female Pronucleus 表观遗传一致

免疫组化染色分析结果显示, PB1 与 spindle—chromosome 表观遗传特征一致, 在 PB1 与 spindle—chromosome 中均能检测到表观遗传标志物 H3K9me3, H3P, 5mC antibody 的表达 (图 3); PB2 则与 Female Pronucleus 遗传特征一致, 在 PB2 与 Female Pronucleus 中均能检测到 H3K9me3, acetyl H3, 5mC 的表达 (图 4)。

2. PB1、PB2 提供基因组诞生线粒体置换后代的效率与 ST、PNT 及 IVF 胚胎无显著差异性

本发明在以小鼠为模型的线粒体置换研究中, 成功获得了来自 PB1、PB2 的重构小鼠, 其获得效率与现有的线粒体置换技术 ST、PNT 以及常规 IVF 效率相比无差异显著性, 后代的体重以及胎盘重量亦与 ST、PNT 以及常规 IVF 后代无差异性 (如图 5 所示)。

3. PB1T 线粒体置换小鼠仅含有胞浆供体即健康卵胞浆供者的线粒体

焦磷酸测序结果显示 PB1T 线粒体置换小鼠仅含有胞浆供体的线粒体, 不含有基因组供体的线粒体, 即该小鼠的异质性为 0%, 显著低于 ST 线粒体置换小鼠的异质性 (5%); PB2T 线粒体置换小鼠含有极低的基因组供体也即患者来源的线粒体 (1%), 显著低于 PNT 线粒体置换小鼠的异质性 (25%)。

4. PB1 与 spindle—chromosome、PB2 与 Female Pronucleus 遗传特征一致

比较基因组学芯片检测人类卵子 / 受精卵结果显示, PB1 与 spindle—chromosome、PB2 与 Female Pronucleus 遗传特征一致, 具备 23 条染色体, 没有 DNA 断裂或扩增 (图 7), 提示本发明的极体基因组重构卵子可用于线粒体置换术获得治疗母源性线粒体遗传病的效果的可行性。

权 利 要 求 书

1、极体基因组重构卵子，其特征在于由患者卵子和受精卵的第一和/或第二极体提供的基因组与健康者卵子的胞浆构成，该重构卵子内部仅含有健康者卵子的线粒体。

2、按权利要求 1 所述的极体基因组重构卵子，其特征在于，所述的第一极体源于线粒体疾病女性患者减数分裂中期卵子。

3、按权利要求 1 所述的极体基因组重构卵子，其特征在于，所述的第二极体源于线粒体疾病女性患者减数分裂中期卵子与其配偶受精后的受精卵。

4、权利要求 1 的极体基因组重构卵子的制备方法，其特征在于，采用显微操作的方法，离体的，将患者卵子和受精卵的第一和/或第二极体移入到已去除雌性遗传物质的健康者卵子或受精卵胞浆中；通过下述步骤：

(1) 将患线粒体疾病女性患者第一极体基因组与健康女性卵胞浆组成重构卵子；

(2) 将患线粒体疾病女性患者第二极体基因组取代健康女性与患者配偶受精卵的雌原核，组成重构胚胎；

(3) 检测重构卵子 / 重构受精卵发育的胚胎中两种来源的线粒体含量；

(4) 动物模型实验验证，所获胚胎包含 3 种遗传物质，阻断线粒体疾病的母源性遗传效果。

5、按权利要求 4 述的方法，其特征在于，所述的 3 种遗传物质是父、母核 DNA 及健康供者线粒体 DNA。

6、按权利要求 4 述的方法，其特征在于，所述的线粒体含量检测采用焦磷酸测序法。

7、极体基因组重构卵子在制备防治线粒体母源性遗传疾病发生的制材中的用途。

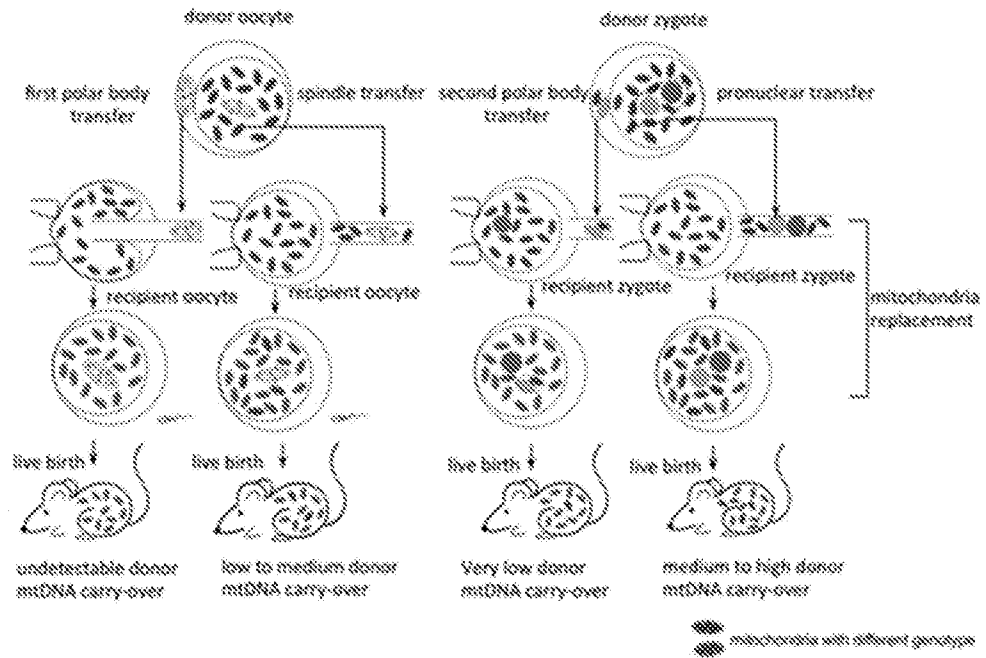


图 1

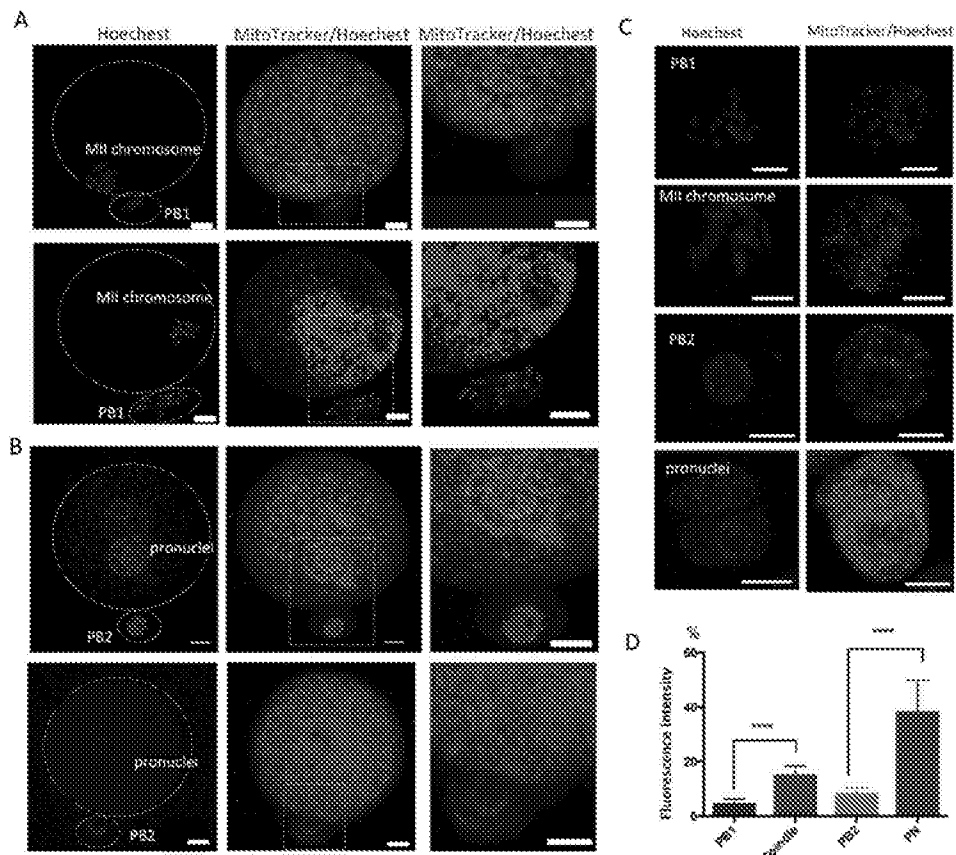


图 2

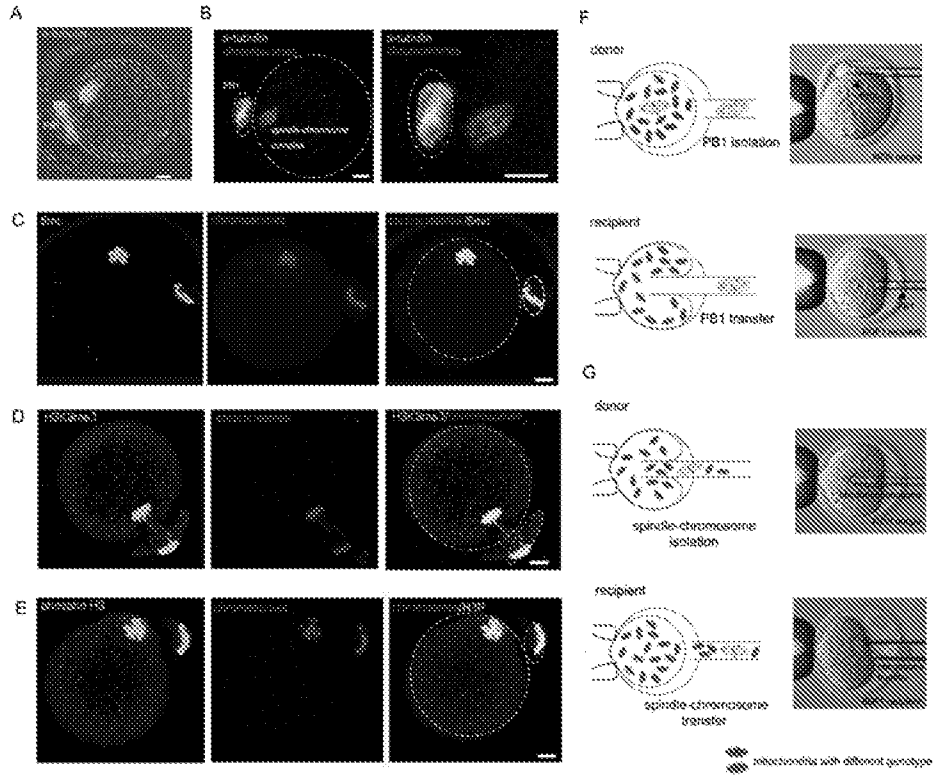


图 3

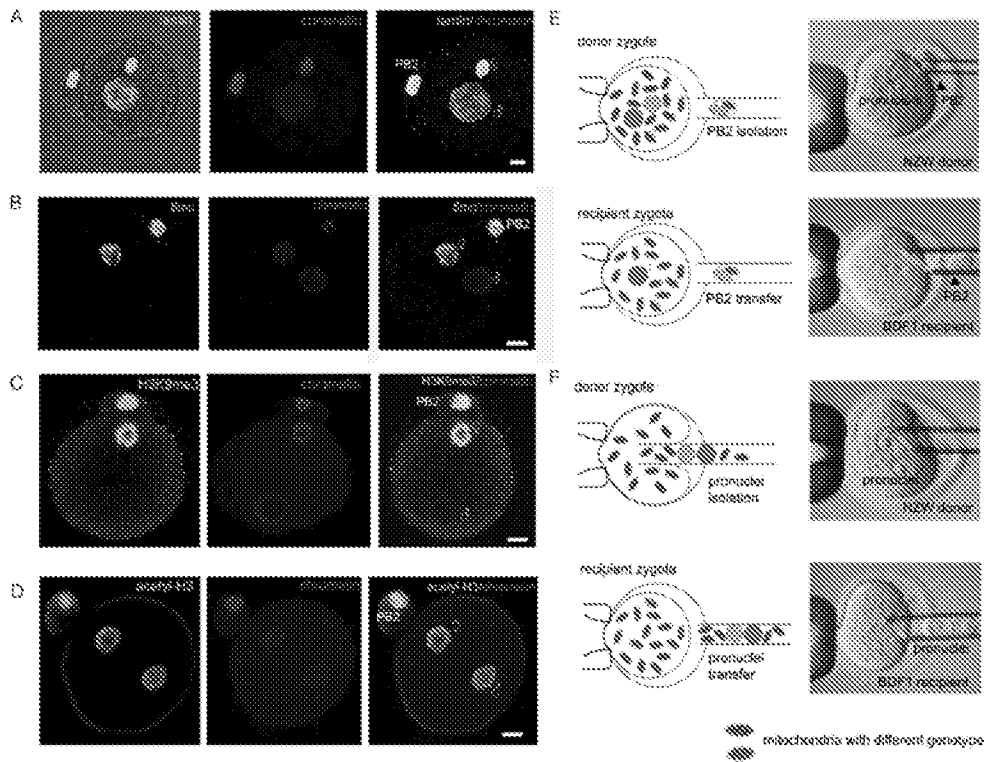


图 4

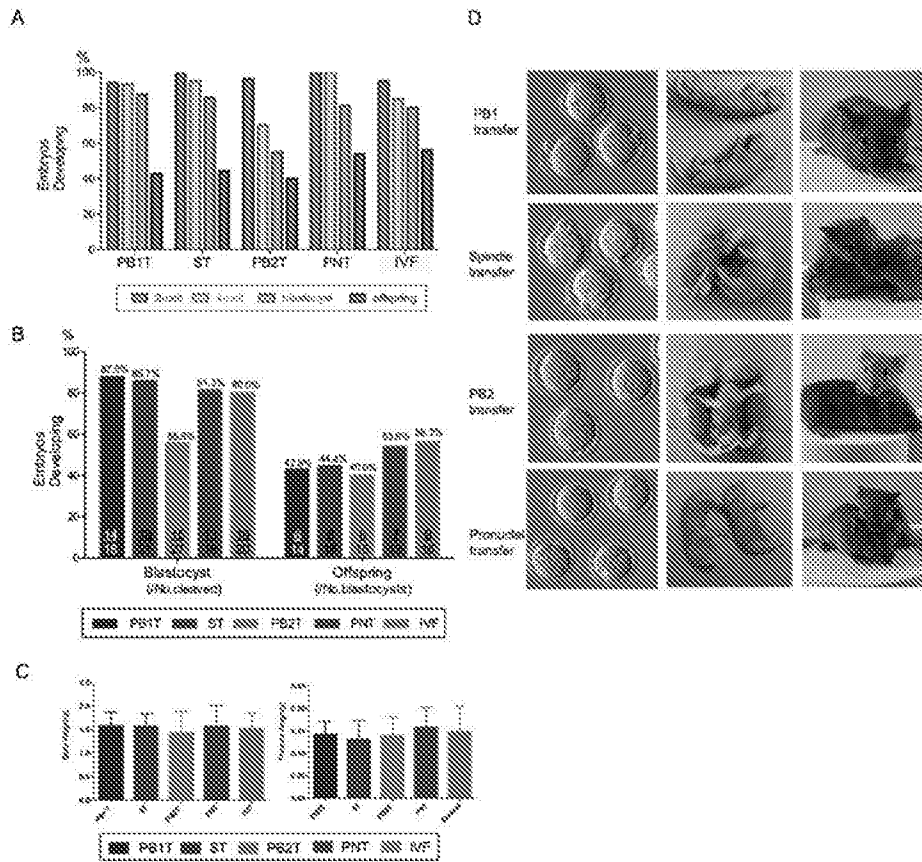


图 5

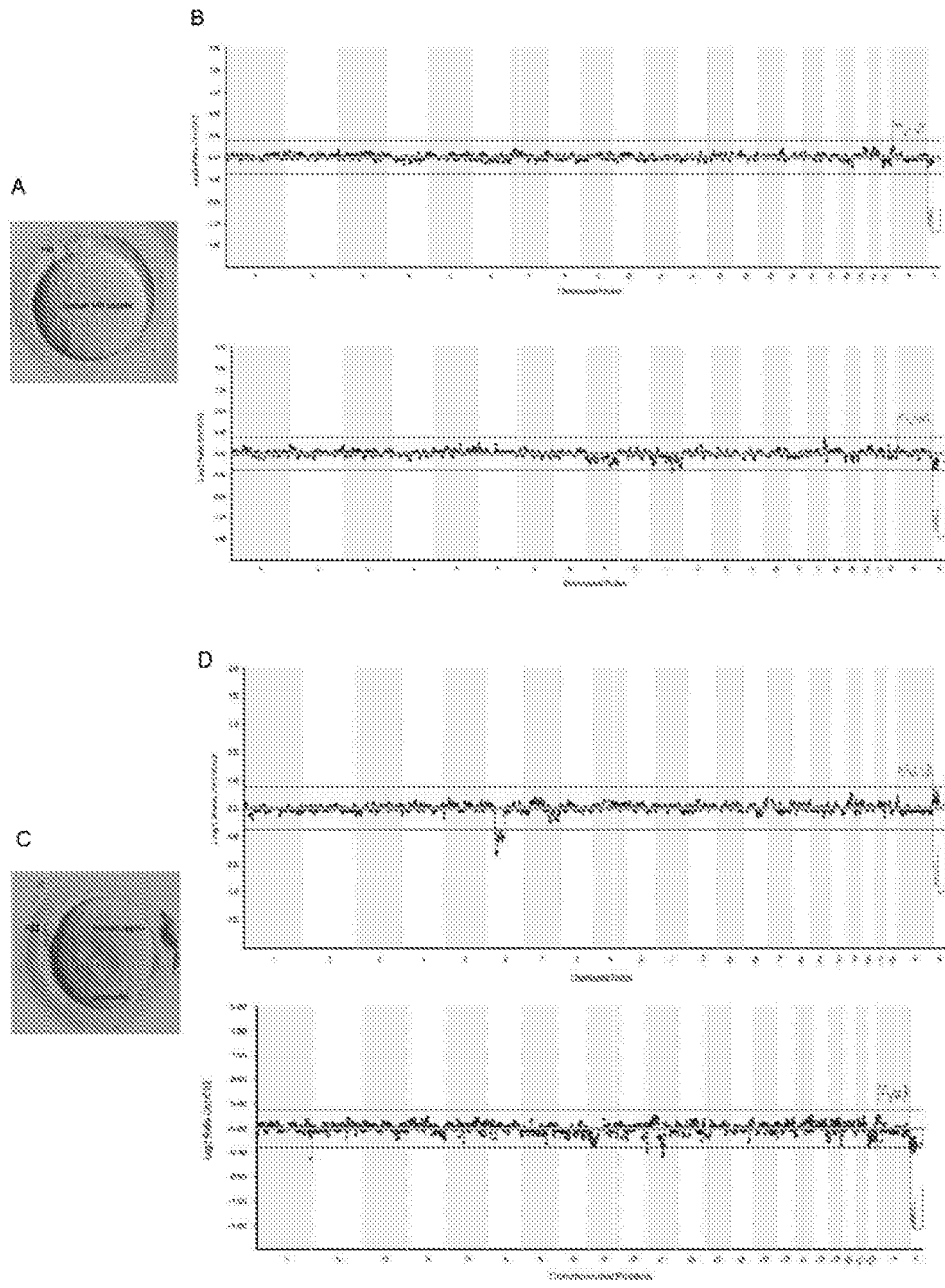


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/073099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10 (2006.01) i; C12N 15/873 (2010.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DATABASE: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA,
MEDLINE, PUBMED

KEY WORDS: polar body, polocyte, PB, oocyte, zygote, mitochondrial, mtDNA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Tian Wang et al. 'Polar Body Genome Transfer for Preventing the Transmission of Inherited Mitochondrial Diseases', Cell, 19 June 2014 (19.06.2014), ISSN: 0092-8674 pages 1591-1604, see results and figures 1-5	1-7
X	SA Gitlin et al. 'Oocyte Biology and Genetics Revelations from Polar Bodies' Reproductive BioMedicine, volume 6, number 4, 20 February 2003 (20.02.2003), ISSN: 1472-6483 pages 403-409, see the abstract, and pages 404-407, especially figures 1 and 2	7

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&”document member of the same patent family</p>
---	--

Date of the actual completion of the international search 28 April 2015	Date of mailing of the international search report 12 May 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer YU, Na Telephone No. (86-10) 62089160

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/073099

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SA Gitlin et al. 'Oocyte Biology and Genetics Revelations from Polar Bodies' Reproductive BioMedicine, volume 6, number 4, 20 February 2003 (20.02.2003), ISSN: 1472-6483 pages 403-409	1-6
A	CN 1427887A(ADVANCED CELL TECHNOLOGY INC.) 2 July 2003 (02.07.2003) see the whole document	1-7
A	US 2008222745A1(UNIV UTAH STATE) 11 September 2008 (11.09.2008) see the whole document	1-7
A	SHI, Sanbao et al. 'Application of the Bare Nuclear Injection in Mouse Somatic Cell Nuclear Transfer', Journal of International Reproductive Health/Family Planning, volume 33, number 1, 31 January 2014 (31.01.2014), ISSN: 1674-1889 pages 2-4, see the whole document	1-7
A	Masahito Tachibana et al. 'Towards Germline Gene Therapy of Inherited Mitochondrial Diseases', Nature, volume 493, number 7437, 31 January 2013 (31.01.2013), ISSN: 0028-0836 pages 627-631, see the whole document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/073099

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1427887A	2 July 2003	AU 5705301A	30 October 2001
		NZ 521711A	24 March 2005
		JP 2003530848A	21 October 2003
		AU 2007205775A1	30 August 2007
		WO 0179445A2	25 October 2001
		EP 1282685A2	12 February 2003
		BR 0110072A	6 July 2004
		MX 2002010075A1	1 February 2003
		WO0179445A3	11 July 2002
US 2008222745A1	11 September 2008	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/073099

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/873(2010.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>数据库: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED 检索词: 极体, 线粒体, 卵子, 受精卵, polar body, polocyte, PB, oocyte, zygote, mitochondrial, mtDNA</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>Tian Wang等. "Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases" Cell, 2014年 6月 19日 (2014 - 06 - 19), ISSN: ISSN: 0092-8674 第1591-1604页, 参见Results和Figures 1-5</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>SA Gitlin等. "Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies" Reproductive BioMedicine, 第6卷卷, 第4期期, 2003年 2月 20日 (2003 - 02 - 20), ISSN: ISSN: 1472-6483 第403-409页, 参见摘要和第404-407页, 尤其图1-2</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SA Gitlin等. "Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies" Reproductive BioMedicine, 第6卷卷, 第4期期, 2003年 2月 20日 (2003 - 02 - 20), ISSN: ISSN: 1472-6483 第403-409页, 参见第404-407页</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1427887 A (先进细胞技术公司) 2003年 7月 2日 (2003 - 07 - 02) 参见全文</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	Tian Wang等. "Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases" Cell, 2014年 6月 19日 (2014 - 06 - 19), ISSN: ISSN: 0092-8674 第1591-1604页, 参见Results和Figures 1-5	1-7	X	SA Gitlin等. "Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies" Reproductive BioMedicine, 第6卷卷, 第4期期, 2003年 2月 20日 (2003 - 02 - 20), ISSN: ISSN: 1472-6483 第403-409页, 参见摘要和第404-407页, 尤其图1-2	7	A	SA Gitlin等. "Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies" Reproductive BioMedicine, 第6卷卷, 第4期期, 2003年 2月 20日 (2003 - 02 - 20), ISSN: ISSN: 1472-6483 第403-409页, 参见第404-407页	1-6	A	CN 1427887 A (先进细胞技术公司) 2003年 7月 2日 (2003 - 07 - 02) 参见全文	1-7
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	Tian Wang等. "Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases" Cell, 2014年 6月 19日 (2014 - 06 - 19), ISSN: ISSN: 0092-8674 第1591-1604页, 参见Results和Figures 1-5	1-7															
X	SA Gitlin等. "Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies" Reproductive BioMedicine, 第6卷卷, 第4期期, 2003年 2月 20日 (2003 - 02 - 20), ISSN: ISSN: 1472-6483 第403-409页, 参见摘要和第404-407页, 尤其图1-2	7															
A	SA Gitlin等. "Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies" Reproductive BioMedicine, 第6卷卷, 第4期期, 2003年 2月 20日 (2003 - 02 - 20), ISSN: ISSN: 1472-6483 第403-409页, 参见第404-407页	1-6															
A	CN 1427887 A (先进细胞技术公司) 2003年 7月 2日 (2003 - 07 - 02) 参见全文	1-7															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2015年 4月 28日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2015年 5月 12日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>于娜</p> <p>电话号码 (86-10)62089160</p>															

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2008222745 A1 (UNIV UTAH STATE) 2008年 9月 11日 (2008 - 09 - 11) 参见全文	1-7
A	史三宝等. "裸核注入法在小鼠体细胞核移植中的应用" 国际生殖健康/ 计划生育杂志, 第第33卷卷, 第第1期期, 2014年 1月 31日 (2014 - 01 - 31), ISSN: ISSN: 1674-1889 第2-4页, 参见全文	1-7
A	Masahito Tachibana等. "Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases" Nature, 第第493卷卷, 第第7437期期, 2013年 1月 31日 (2013 - 01 - 31), ISSN: ISSN: 0028-0836 第627-631页, 参见全文	1-7

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/073099

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1427887	A	2003年 7月 2日	AU	5705301	A	2001年 10月 30日
				NZ	521711	A	2005年 3月 24日
				JP	2003530848	A	2003年 10月 21日
				AU	2007205775	A1	2007年 8月 30日
				WO	0179445	A2	2001年 10月 25日
				EP	1282685	A2	2003年 2月 12日
				BR	0110072	A	2004年 7月 6日
				MX	2002010075	A1	2003年 2月 1日
				WO	0179445	A3	2002年 7月 11日
<hr/>							
US	2008222745	A1	2008年 9月 11日	无			
<hr/>							

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)