

一种利用胸腺疫苗降低或消除同种异体移植排斥的方法

本申请要求申请日为 2024/2/6 的中国专利申请 2024101713279 的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种利用胸腺疫苗降低或消除同种异体移植排斥的方法、该方法使用的胸腺疫苗（包括胸腺基因疫苗或胸腺细胞疫苗）及其应用。

背景技术

细胞器官移植在许多器质性疾病的治疗中被视为终极治疗手段。如造血干细胞移植治疗血液疾病，同种异体器官移植或异种器官移植治疗器官衰竭、坏死等疾病。全球每年接受器官移植的患者超过 14 万，其中主要包括肾脏、肝脏、心脏、肺、胰腺以及小肠。中国每年移植器官需求超过 30 万，然而，满足条件且进行器官移植的比例不超过 10%，世界范围内均面临这个现状。造成这种情况出现的原因主要是器官短缺和免疫排斥反应，解决器官短缺的现状可通过更多捐献改善，然而免疫排斥反应仍未完全解决^[1-2]。

当进行同种异体移植时，由于 MHC 具有高度多态性，如果供者和受者的 MHC 不匹配，受者的免疫系统会将移植物识别为“非我”，并发动攻击，导致排斥反应^[3-4]。MHC 主要功能是将抗原呈递给 T 细胞，以便 T 细胞能够识别并攻击“非我”细胞。T 细胞对于“自我”与“非我”的识别机制是在胸腺中通过阳性和阴性选择形成的^[5-6]。MHC 在这个选择过程中发挥关键作用。在胸腺中，MHC 与 T 细胞的相互作用，决定了 T 细胞的命运^[7]。T 细胞在阳性选择中，如果 T 细胞受体（TCR）与 MHC 分子的亲和力过低，将会因忽视而凋亡；在阴性选择中，如果亲和力过高，T 细胞也会凋亡，避免自身免疫。通过阳性和阴性选择的成熟的 T 细胞则会形成对“自我”的耐受^[8]。

多能干细胞和器官移植的替代治疗在许多器质性疾病的治疗中被视为终极治疗手段，然而，由于 MHC 具有高度多态性，当进行同种异体移植时，如果供者和受者的 MHC 不匹配，受者的免疫系统会将移植物识别为“非我”，并发动攻击，导致排斥反应。MHC 错配带来的移植排斥问题至今仍是一个重大挑战。尽管当前已有研究者提出了混合造血嵌合体等耐受策略，但仍存在耐受不稳定和严重的移植物抗宿主病（GvHD）的风险^[9-12]。因此，开发能够跨越 MHC 配型限制，实现广泛适用的免疫耐受策略成为当务之急。虽然引发同种异体移植排斥主要因素是 MHC 错配，但次要组织相容性抗原的存在也可能导

致免疫排斥发生，因此，开发一种完美解决 MHC 配型限制以及过继次要组织相容性抗原的策略具有重要意义。

基因治疗（gene therapy, GT）通过使用特定的载体，能够精准地针对特定的基因进行修复或调控，从而改变细胞的表达模式，达到治疗目的。腺相关病毒（AAV）载体已成功用于基因治疗应用中。特别是在胸腺中的基因治疗，提供了直接干预 T 细胞发育的机会。例如，Pouzolles 等将 AAV-ZAP-70 胸腺内（intra-thymic, IT）注射到 ZAP-70 缺陷小鼠的胸腺中后，发现功能性 T 淋巴细胞的快速发育和胸腺髓质的快速重建。这充分显示了基因治疗在难治性疾病治疗中的巨大潜力和优势。基因治疗的技术进步为解决移植排斥难题提供了新的思路。

运用基因表达技术，供者特异性抗原的多态性导致在受者胸腺内表达供者全部抗原的过程难以实现，因此，开发将供者全部特异性抗原表达在受者胸腺细胞内，实现完美的供者抗原过继至受者胸腺的技术是解决在器官移植以及细胞治疗过程中免疫排斥的关键。胸腺组织中，参与 T 细胞发育过程的主要细胞包括胸腺上皮细胞和树突状细胞，其中树突状细胞胸腺组织抗原在受者胸腺中表达是解决或者胸腺中参与 T 细胞教育过程的关键细胞移植是一个优化的解决方案。

现行解决 MHC 配型的有效策略是在尽可能满足配型要求的基础上，联合使用免疫抑制剂进行器官移植。同时，科学家通过建立供者低免疫原性细胞来降低供者对受者细胞的免疫排斥（公开号：TW202321435A，公开号：CN115335087A）。基于 MHC 错配带来的移植排斥问题，开发能够跨越 MHC 配型限制，实现广泛适用的免疫耐受策略是解决移植排斥的关键。公开号：CN112074277A 的专利中，该技术基于同种异体胸腺组织的培养后移植以实现同种异体器官移植物的供者特异性耐受。

发明内容

为解决现有技术中同种异体移植对供者具有极大的限制的问题，本发明提供一种利用胸腺疫苗降低或消除同种异体移植排斥的方法、该方法使用的胸腺疫苗（包括胸腺基因疫苗和胸腺细胞疫苗）及其应用。

现有技术培养供者来源的胸腺组织，移植入肌肉内，形成一个新的模拟胸腺，以实现供者来源的移植物特异性耐受，这种技术对供者具有极大的限制。T 细胞在胸腺发育成熟经历复杂过程，主要包括阴性选择和阳性选择，删除自身反应性 T 细胞。经过选择过程的成熟 T 细胞实现对自身的免疫耐受，这个选择过程主要是由自身抗原决定。那么当 T 细胞在选择过程中，受到外来抗原的刺激，对外来抗原具有反应性的 T 细胞是否

在阳性-阴性选择后删除，即是否能产生不攻击相应抗原来源的细胞的 T 细胞，是同种异体移植面临的关键问题。

本发明通过模拟天然的 T 细胞形成自身耐受的过程，使用低免疫原性的 AAV 载体，在受者的胸腺中表达供者的同种异体 MHC (allo-MHC)。经过阳性和阴性选择，供者反应性 T 细胞凋亡，成熟的 T 细胞将表达自体 MHC 或同种异体 MHC 的细胞都视为“自我”，并建立长期稳定的供者特异性耐受。

此外，异体细胞或器官移植能否成功，关键是组织型是否相容，决定组织型是否相容的因素是组织相容性抗原。组织相容性抗原分为主要组织相容性抗原和次要组织相容性抗原。引起急性排斥反应的抗原称为主要组织相容性抗原不匹配；然而，在一些主要组织相容性抗原一致的同卵双胞胎进行器官移植时，仍发生免疫排斥，其主要原因是次要组织相容性抗原不匹配。胸腺基因疫苗技术方案是将供者主要组织相容性抗原在胸腺上皮细胞中表达，能够解决细胞或器官移植时的免疫排斥。然而，当遇到因次要组织相容性抗原导致的免疫排斥反应时，该方案仍不完善。

因此，本发明首次提出将供者主要组织相容性抗原和次要组织相容性抗原共同在受者胸腺内表达的方案。次要组织相容性抗原的多态性限制了其目前不能通过转基因技术表达，而将供者来源的胸腺上皮细胞移植到受者胸腺内，可实现供者组织相容性抗原在受者胸腺内完整表达的方案。

为解决 MHC 配型限制及过继次要组织相容性抗原的多态性，本发明开发了供者抗原过继至受者胸腺内的胸腺疫苗技术方案，其中包括：1) 通过腺病毒感染将供者 MHC 在受者胸腺内表达；2) 将供者胸腺上皮细胞移植入受者胸腺中实现供者 MHC 和次要组织相容性抗原在受者胸腺中表达。

由此，本发明的技术方案之一提供了一种降低或消除同种异体移植排斥的方法，其中，所述方法包括以下步骤：

通过胸腺疫苗在受者胸腺组织中表达供者 MHC 和/或移植供者胸腺上皮细胞；所述胸腺疫苗包括胸腺基因疫苗和/或胸腺细胞疫苗。

优选地，所述方法为非治疗目的的；和/或，所述方法为体外 (*in vitro*) 或离体 (*ex vivo*) 进行的。

在一些较佳的实施例中，所述表达供者 MHC 是通过向受者胸腺组织注射胸腺基因疫苗来实现的。

优选地，所述胸腺基因疫苗包括：

(1) 基因表达载体；

(2) 分别编码供者的 MHC I 类分子和 MHC II 类分子的多核苷酸;

其中所述多核苷酸可操作地连接于所述基因表达载体, 且所述供者的 MHC 背景异于所述受者的 MHC 背景。

更优选地, 所述基因表达载体包括质粒载体和病毒载体; 和/或, 编码供者的 MHC I 类分子和 MHC II 类分子的多核苷酸位于同一基因表达载体中或分开的两个基因表达载体中。

在一些较佳的实施例中, 所述病毒载体为慢病毒载体或腺相关病毒载体 (AAV), 例如 AAV2/8。

优选地, 所述胸腺基因疫苗包括: AAV -CMV-H2-Kb α chain-IRES-H2-Db α chain 和 AAV-CMV-I-Ab α chain- IRES- β chain。

更优选地, 所述胸腺基因疫苗包括: 核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 1 和 2 所示的分离的核酸; 和/或, 将所述胸腺基因疫苗注射到受者胸腺的左右两叶的各 1-5 个点位, 例如 3 个点位。

在一些更佳的实施例中, 在注射胸腺基因疫苗之后, 受者经胸腺疫苗作用, 胸腺中新成熟的 T 细胞经过自身 MHC 与胸腺疫苗表达的 MHC 共同教育, 实现针对供者反应性 T 细胞的删除。

优选地, 在注射胸腺疫苗之前, 还包括以下步骤:

- (i) 注射或不注射 IFN- γ ;
- (ii) 注射 T 细胞清除剂或免疫抑制剂; 所述 T 细胞清除剂例如抗体 2.43 和 GK1.5;
- (iii) 辐照; 例如第二日 1.5-3 Gy 辐照 1-2 分钟。

本文中, IFN- γ 在小鼠体内使用可刺激 MHC 快速高表达。当受者为人时, 因机体自身可产生 IFN- γ , 不需要进行 IFN- γ 注射。

本文中, 小鼠实验条件下进行 T 细胞清除操作, 在人器官移植的治疗过程当中, 基础治疗应用免疫抑制剂, 能够有效的预防排斥反应的发生。理想的免疫抑制剂的治疗, 既能保证移植物不排斥, 又能够避免毒副作用对受害者产生的危害。常用的免疫抑制剂包括: 硫唑嘌呤、霉酚酸酯、皮质类固醇、环孢素、他克莫司、抗淋巴细胞球蛋白、莫罗莫那-CD3 等。

由此, 本发明的技术方案之二提供了一种组织或器官移植的方法, 其包括以下步骤:

- A. 使用如技术方案之一所述的方法降低或消除同种异体移植排斥;
- B. 在受者外周血 T 细胞恢复至正常水平前或恢复至正常水平后, 进行细胞、组织或器官的移植;

优选地，所述组织或器官选自皮肤、胰岛、神经、肾脏、肝脏、心脏、小肠、脂肪和骨中的一种或多种。

本发明的胸腺疫苗技术包括两个方面：一是基于基因编辑技术，在受者胸腺中表达供者 MHC，以解决 MHC 配型限制问题。这种基于基因治疗的策略，为基因治疗在移植免疫领域的应用开辟了新的道路。当前基因治疗已经在许多疾病的治疗中显示出巨大的潜力。基因治疗是通过使用特定的载体（如腺相关病毒，AAV），可以将特定的基因导入细胞，从而改变其表达模式，进而达到治疗目的。二是在受者胸腺内移植同种异体来源的胸腺上皮细胞，这种供者来源的胸腺上皮细胞携带供者所有的抗原信息，在解决了 MHC 错配的同时，也避免了次要组织相容性抗原可能导致的免疫排斥。

由此，本发明的技术方案之三提供了一种胸腺基因疫苗，其用于在受者胸腺表达供者组织相容性抗原（MHC）且包括：

（1）基因表达载体；

（2）分别编码供者的 MHC I 类分子和 MHC II 类分子的多核苷酸；

其中所述多核苷酸可操作地连接于所述基因表达载体，且所述供者的 MHC 背景异于所述受者的 MHC 背景。

优选地，所述基因表达载体包括质粒载体和病毒载体；和/或，编码供者的 MHC I 类分子和 MHC II 类分子的多核苷酸位于同一基因表达载体中或分开的多个基因表达载体中。

在一些较佳的实施例中，所述病毒载体为慢病毒载体或腺相关病毒载体（AAV），例如 AAV2/8。

优选地，所述胸腺基因疫苗包括：AAV-CMV-H2-Kb α chain-IRES-H2-Db α chain 和 AAV-CMV-I-Ab α chain-IRES- β chain。

更优选地，所述胸腺基因疫苗包括：核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 1 和 2 所示的分离的核酸。

本发明的技术方案之四提供了一种胸腺细胞疫苗，其由以下步骤制备：使用抗 Epcam 抗体分选获得胸腺上皮细胞，即得。

优选地，所述胸腺上皮细胞的剂量为 200 万个/受者；和/或，所述胸腺上皮细胞悬浮于磷酸盐缓冲液（PBS）中，制得所述胸腺细胞疫苗。

当受者为人时，按照小鼠比例，胸腺上皮细胞移植量约为人胸腺细胞总量的 50%。

本发明分选供者胸腺上皮细胞并移植入受者胸腺内。根据本发明，本领域技术人员无论以何种形式（如原代细胞、多能干细胞分化）获得的供者胸腺上皮细胞移植入受者

胸腺，均能达到解决免疫排斥的效果。

本发明的技术方案之五提供了一种胸腺细胞疫苗试剂盒，其包括如技术方案之三所述的胸腺基因疫苗或如技术方案之四所述的胸腺细胞疫苗；

任选还包括 (i) IFN- γ ；和/或，
(ii) T 细胞清除剂或免疫抑制剂。

本发明的技术方案之六提供了一种如技术方案之三所述的胸腺基因疫苗、如技术方案之四所述的胸腺细胞疫苗或如技术方案之五所述的胸腺细胞疫苗试剂盒在制备降低或消除同种异体移植排斥的免疫制剂或在降低或消除同种异体移植排斥中的应用。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明的积极进步效果在于：

本发明开发基于胸腺疫苗的移植耐受策略，建立一种便捷万能的供者来源，克服了因 MHC 错配而导致的同种异体移植的局限性，有助于临床上解决供者来源的问题。这种基于基因治疗的策略，为基因治疗在移植免疫领域的应用开辟了新的道路。

附图说明

图 1 为质粒模式图；其中 A 为胸腺基因疫苗供者 MHC β 链构建图谱，在 PGMAAV-4878 表达载体上连接供者 MHC 链 β 上的 H2^{Kb} 和 H2^{Db} 基因片段；B 为供者 MHC α 链胸腺基因疫苗构建图谱，在 PGMAAV-4878 表达载体上连接供者 MHC α 链 I α (I-A) 基因片段。

图 2 显示了胸腺基因疫苗在受者胸腺上皮细胞中的表达。

图 3 显示了胸腺基因疫苗在受者胸腺内树突状细胞中的表达。

图 4 显示了胸腺基因疫苗作用下的供者反应性 T 细胞删除。

图 5 显示了胸腺基因疫苗作用下供者皮肤移植结果。

图 6 显示了胸腺基因疫苗作用下供者胰岛移植能有效治疗 I 型糖尿病。

图 7 显示了胸腺基因疫苗作用下同种异体小鼠畸胎瘤成瘤。

图 8 显示了胸腺基因疫苗作用下多器官组织生长。

图 9 显示了胸腺细胞疫苗分选结果。

图 10 显示了胸腺细胞疫苗在受者胸腺内长期存活的结果。

图 11 显示了胸腺细胞疫苗作用下供者皮肤移植结果。

图 12 显示了胸腺细胞疫苗作用下供者胰岛移植能有效治疗 I 型糖尿病。

具体实施方式

下面通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

实施例 1 胸腺基因疫苗

为了实现 allo-MHC 在受者胸腺中表达，根据表达供者 MHC 的基因序列，构建重组 AAV 病毒。首先，挑选了一对 MHC 完全不匹配的小鼠，其中受者 Balb/c 小鼠 MHC 背景为 H2d，供者 C57 小鼠 MHC 背景为 H2b。接着，根据供者小鼠的 MHC 基因序列，本发明构建了表达 H2b I 类和 II 类分子的重组 AAV 病毒，即：AAV2/8-CMV-H2-Kb α chain-IRES-H2-Db α chain 和 AAV2/8-CMV-I-Ab α chain-IRES- β chain（统称为胸腺基因疫苗）的质粒模式图，分别如图 1 的 A 和 B 所示。对应的核苷酸序列分别命名为 GPAAV-CMV-H2-Kb-IRES-H2-Db-WPRE 和 GPAAV-CMV-I-Ab-alpha-IRES-beta-WPRE。

GPAAV-CMV-H2-Kb-IRES-H2-Db-WPRE 的核苷酸序列

```
GAATTCCGCCACCATGGTACCGTGCACGCTGCTCCTGCTGTTGGCGGCCGCCCTG
GCTCCGACTCAGACCCGCGCGGGCCACACTCGCTGAGGTATTTTCGTCACCGCCGT
GTCCCGGCCCGGCCTCGGGGAGCCCCGGTACATGGAAGTCGGCTACGTGGACGAC
ACGGAGTTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGCGGAGAATCCGAGATATGAGCCGCGGG
CGCGGTGGATGGAGCAGGAGGGGCCCCGAGTATTGGGAGCGGGAGACACAGAAAG
CCAAGGGCAATGAGCAGAGTTTCCGAGTGGACCTGAGGACCCTGCTCGGCTACTAC
AACCAGAGCAAGGGCGGCTCTCACACTATTCAGGTGATCTCTGGCTGTGAAGTGGG
GTCCGACGGGCGACTCCTCCGCGGGTACCAGCAGTACGCCTACGACGGCTGCGATT
ACATCGCCCTGAACGAAGACCTGAAAACGTGGACGGCGGCGGACATGGCGGCGCT
GATCACCAAACACAAGTGGGAGCAGGCTGGTGAAGCAGAGAGACTCAGGGCCTAC
CTGGAGGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGAAGAACGGGAACGCGA
CGCTGCTGCGCACAGATTCCCCAAAGGCCCATGTGACCCATCACAGCAGACCTGAA
GATAAAGTCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCTGACATCACCT
GACCTGGCAGTTGAATGGGGAGGAGCTGATCCAGGACATGGAGCTTGTGGAGACC
AGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCATCTGTGGTGGTGCCTCTTGG
GAAGGAGCAGTATTACACATGCCATGTGTACCATCAGGGGCTGCCTGAGCCCCTCA
```

CCCTGAGATGGGAGCCTCCTCCATCCACTGTCTCCAACATGGCGACCGTTGCTGTTC
TGGTTGTCTTGGAGCTGCAATAGTCACTGGAGCTGTGGTGGCTTTTGTGATGAAG
ATGAGAAGGAGAAACACAGGTGGAAAAGGAGGGGACTATGCTCTGGCTCCAGGCT
CCCAGACCTCTGATCTGTCTCTCCCAGATTGTAAAGTGATGGTTCATGACCCTCATTC
TCTAGCGTGACCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGG
AATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGC
AATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCT
TTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTC
CTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGG
AACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATAC
ACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAA
AGAGTCAAATGGCTCACCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGA
AGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGT
TTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCT
TTGAAAAACACGATGATAAGCCACCATGGGGGCGATGGCTCCGCGCACGCTGCTCC
TGCTGCTGGCGGCCCGCCCTGGCCCCGACTCAGACCCGCGCGGGGCCACACTCGATG
CGGTATTTTCGAGACCGCCGTGTCCCGGCCCGGCTCGAGGAGCCCCGGTACATCTC
TGTCGGCTATGTGGACAACAAGGAGTTCGTGCGCTTCGACAGCGACGCGGAGAATC
CGAGATATGAGCCGCGGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGA
GCGGGAAACACAGAAAGCCAAGGGCCAAGAGCAGTGGTTCCGAGTGAGCCTGAG
GAACCTGCTCGGCTACTACAACCAGAGCGCGGGCGGCTCTCACACACTCCAGCAG
ATGTCTGGCTGTGACTTGGGGTCGGACTGGCGCCTCCTCCGCGGGTACCTGCAGTT
CGCCTATGAAGGCCGCGATTACATCGCCCTGAACGAAGACCTGAAAACGTGGACGG
CGGCGGACATGGCGGCGCAGATACCCGACGCAAGTGGGAGCAGAGTGGTGCTGC
AGAGCATTACAAGGCCTACCTGGAGGGCGAGTGCGTGAGTGGCTCCACAGATACC
TGAAGAACGGGAACGCGACGCTGCTGCGCACAGATTCCCCAAAGGCACATGTGAC
CCATCACCCAGATCTAAAGGTGAAGTCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCT
ACCCTGCTGACATCACCTGACCTGGCAGTTGAATGGGGAGGAGCTGACCCAGGA
CATGGAGCTTGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCA
TCTGTGGTGGTGCCTCTTGGGAAGGAGCAGAATTACACATGCCGTGTGTACCATGA
GGGGCTGCCTGAGCCCCCTACCCTGAGATGGGAGCCTCCTCCGTCCACTGACTCTT

ACATGGTGATCGTTGCTGTTCTGGGTGTCCTTGGAGCTATGGCCATCATTGGAGCTG
TGGTGGCTTTTGTGATGAAGAGAAGGAGAAACACAGGTGGAAAAGGAGGGGACTA
TGCTCTGGCTCCAGGCTCCAGAGCTCTGAAATGTCTCTCCGAGATTGTAAAGCGT
GAGGATCC (SEQ ID NO: 1)

GPAAV-CMV-I-Abalpha-IRES-beta-WPRE 的核苷酸序列

GCCACCATGCCGCGCAGCAGAGCTCTGATTCTGGGGGTCTCGCCCTGACCAC
CATGCTCAGCCTCTGTGGAGGTGAAGACGACATTGAGGCCGACCACGTAGGCACCT
ATGGTATAAGTGTATATCAGTCTCCTGGAGACATTGGCCAGTACACATTTGAATTTGA
TGGTGATGAGTTGTTCTATGTGGACTTGGATAAGAAGGAGACTGTCTGGATGCTTCC
TGAGTTTGGCCAATTGGCAAGCTTTGACCCCCAAGGTGGACTGCAAACATAGCTG
TAGTAAACACAACCTGGGAGTCTTGACTAAGAGGTCAAATTCCACCCCAGCTACC
AATGAGGCTCCTCAAGCGACTGTGTTCCCCAAGTCCCCTGTGCTGCTGGGTCAGCC
CAACACCCTCATCTGCTTTGTGGACAACATCTTCCCTCCTGTGATCAACATCACATG
GCTCAGAAATAGCAAGTCAGTCGCAGACGGTGTTTATGAGACCAGCTTCTTCGTCA
ACCGTGACTATTCTTCCACAAGCTGTCTTATCTCACCTTCATCCCTTCTGACGATGA
CATTTATGACTGCAAGGTGGAACACTGGGGCCTGGAGGAGCCGGTTCTGAAACACT
GGGAACCTGAGATTCCAGCCCCCATGTCAGAGCTGACAGAGACTGTGGTCTGTGCC
CTGGGGTTGTCTGTGGGCCTTGTGGGCATCGTGGTGGGCACCATCTTCATCATTCAA
GGCCTGCGATCAGGTGGCACCTCCAGACACCCAGGGCCTTTATGACCCCTCTCCCT
CCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTT
GTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAAC
CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAA
TGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGA
CAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACA
GGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAA
CCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCACCTC
AAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGAT
CTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACG
TCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAAG
CCACCATGGCTCTGCAGATCCCCAGCCTCCTCCTCTCGGCTGCTGTGGTGGTGCTGA

TGGTGCTGAGCAGCCCAGGGACTGAGGGCGGAGACTCCGAAAGGCATTTCGTGTA
CCAGTTCATGGGCGAGTGCTACTTCACCAACGGGACGCAGCGCATAACGATATGTGA
CCAGATACATCTACAACCGGGAGGAGTACGTGCGCTACGACAGCGACGTGGGCGA
GCACCGCGCGGTGACCGAGCTGGGGCGGCCAGACGCCGAGTACTGGAACAGCCAG
CCGGAGATCCTGGAGCGAACGCGGGCCGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAACCT
ACGAGGGGCGGAGACCCACACCTCCCTGCGGCGGCTTGAACAGCCCAATGTCTGT
CATCTCCCTGTCCAGGACAGAGGCCCTCAACCACCACAACACTCTGGTCTGCTCAG
TGACAGATTTCTACCCAGCCAAGATCAAAGTGCGCTGGTTCCGGAATGGCCAGGAG
GAGACGGTGGGGGTCTCATCCACACAGCTTATTAGGAATGGGGACTGGACCTTCCA
GGTCCTGGTCATGCTGGAGATGACCCCTCGGCGGGGAGAGGTCTACACCTGTCACG
TGGAGCATCCCAGCCTGAAGAGCCCCATCACTGTGGAGTGGAGGGCACAGTCTGA
GTCTGCCTGGAGCAAGATGTTGAGCGGCATCGGGGGCTGCGTGCTTGGGGTGATCT
TCCTCGGGCTTGGCCTTTTCATCCGTCACAGGAGTCAGAAAGGACCTCGAGGCCCT
CCTCCAGCAGGGCTCCTGCAGTGA (SEQ ID NO: 2)

首先，在 8 周 Balb/C 小鼠腹腔注射 400 μ l T 细胞清除抗体混合物，包括抗体 2.43 (bioxcell, CAT:BE0061) 和 GK1.5 (bioxcell, CAT:BP0003-1)。其中，GK1.5: 浓度 9.79mg/ml, 40.8 μ l/管; 2.43 浓度 9.9mg/ml, 40.4 μ l/管。第 2 日进行 1.5 Gry 强度辐照 1 分钟，进行 T 细胞清除。1 周后，将胸腺基因疫苗注入经过 T 细胞清除过程的 Balb/C 小鼠胸腺中，左右两叶分上、中、下各 3 个点位。疫苗注射成功后，受者小鼠经疫苗作用，胸腺中新成熟的 T 细胞经过自身 MHC 与胸腺基因疫苗表达的 MHC 共同教育，实现针对供者反应性 T 细胞删除。42 天后，受者小鼠外周血 T 细胞回复至正常水平后，进行 C57 小鼠来源的皮肤、胰岛、肾、肝和心脏移植等实验。

皮肤移植完成 4 周后，取受者小鼠外周血，通过流式细胞仪分选出 CD3 阳性的 T 细胞，进行 scRNAseq & TCRseq。通过单细胞测序实验证明，本发明的技术实现针对供者反应性 T 细胞的克隆性清除，教育出的 T 细胞不再攻击受者。

供者胸腺基因疫苗注入受者胸腺后，运用流式细胞技术检测受者胸腺上皮细胞胸腺基因疫苗感染效率。胸腺上皮细胞感染胸腺基因疫苗后，长时间表达供者 MHC，在第 90 天仍保持高水平表达（参见图 2 的 A 和 B）。

供者胸腺基因疫苗注入受者胸腺后，运用流式细胞计数检测受者胸腺内树突状细胞胸腺基因疫苗感染效率。胸腺内树突状细胞感染胸腺基因疫苗后，长时间表达供者 MHC，

虽然表达水平有轻微降低，在第 90 天仍保持高水平表达，其表达水平降低可能是因树突状细胞的流动性所致（参见图 3 的 A 和 B）。

胸腺基因疫苗注射后，经疫苗的作用，新成熟的 T 细胞均为对受者和供者耐受的 T 细胞。通过单细胞 TCR 测序技术，分析新成熟的 T 细胞 TCR 表达，以 TRBV5、TRBV19、TRBV13-2、TRBV31、TRBV20 和 TRBV1 表达量较高的 TCR 为例，结果表明，经胸腺基因疫苗作用后，供者反应性 T 细胞 TCR TRBV31、TRBV20 和 TRBV1 表达水平下降，供者反应性 T 细胞被删除（参见图 4 的 A 和 B）。

因胸腺基因疫苗作用后，供者反应性 T 细胞被删除，受者新成熟的 T 细胞不攻击供者来源的细胞、组织和器官，选择移植难度最大的皮肤验证疫苗的作用，结果表明，供者皮肤移植到受者后存活良好（参见图 5）；其中，图中“PTD0”和“PTD0”分别表示移植后第 0 天和第 21 天。

野生型 C57 小鼠、野生型 Balb/c 小鼠和经过胸腺基因疫苗作用的 Balb/c 小鼠分别造模 I 型糖尿病，糖尿病小鼠模型成功后，在上述三种糖尿病小鼠模型肾包膜下移植 C57 小鼠来源的胰岛，检测各时间点小鼠血糖变化。C57 小鼠胰岛自体移植（Auto）后，模型小鼠血糖显著下降，并在 3 周内趋于正常水平，第 4 周后血糖持续升高，这是由于移植胰岛过度合成胰岛素导致其功能性耗竭。胸腺注射 AAV 空病毒疫苗组（AAV Con）小鼠胰岛移植后 2 周内血糖轻微下降，这是由于移植胰岛在被排斥干净前发挥的微弱作用。胸腺基因疫苗组（TV）小鼠胰岛移植后的血糖水平与胰岛自体移植小鼠接近。以上结果表明，在胸腺基因疫苗的作用下，同种异体移植胰岛移植能够有效治疗 I 型糖尿病，如图 6 所示。

为进一步验证同种异体效果，在 C57 小鼠、Balb/c 小鼠、C3H 小鼠和注射胸腺基因疫苗的 Balb/c 小鼠皮下注射 C57 小鼠胚胎干细胞进行畸胎瘤成瘤实验，发现 C57 小鼠组（Auto con）和注射胸腺基因疫苗的 Balb/c 小鼠组（TV）成功长出畸胎瘤，且畸胎瘤大小无显著差异。Balb/c 小鼠组（Allo con）和 C3H 小鼠组（3rd con）未长出畸胎瘤，如图 7 的 A 和 B 所示。

对 C57 小鼠组（Auto con）和注射胸腺基因疫苗的 Balb/c 小鼠组（TV）皮下移植多能干细胞，成功长出多种器官组织，表明胸腺基因疫苗对同种异体多种器官移植及生长的良好作用，证明胸腺基因疫苗能有效解决多种器官的同种异体移植，如图 8 所示。

实施例 2 胸腺细胞疫苗

将 C57BL/6JSmoc-Gt(ROSA)26S 或 cm1(CAG-Luc-EGFP)Smoc 雄鼠与雌鼠进行交配

得到 P1-P7 新生鼠，进行磁珠分选，通过 anti-Epcam mAb 将胸腺上皮细胞进行分选，即得胸腺细胞疫苗，如图 9 所示。新生 P1-7 的 C57 小鼠胸腺通过 CD326 表面标志分选胸腺上皮细胞。将胸腺上皮细胞悬浮在含 matrigel+10% FBS 的 PBS 中，按照 200 万胸腺上皮细胞/只移植入经过 T 细胞清除（同实施例 1）的受者胸腺小鼠胸腺左右两叶内，每个点 100 万细胞悬浮于 5 μ l 细胞 PBS 缓冲液进行注射。移植入受者胸腺内的供者胸腺上皮细胞通过 Luciferase 荧光检测，移植后 90 天仍存在。

胸腺细胞疫苗获取成功后移植入受者胸腺内，设置同型对照，以及不做预先 T 细胞清除对照，结果显示，胸腺细胞疫苗移植后，在受者胸腺内长期存活（参见图 10）。

胸腺细胞疫苗作用后，运用移植难度最大的皮肤验证胸腺细胞疫苗的作用，结果表明，经胸腺细胞疫苗作用后，供者皮肤移植到受者后存活良好（参见图 11）；其中，图中“PTD0”和“PTD0”分别表示移植后第 0 天和第 21 天。

野生型 C57 小鼠、假手术操作的野生型 Balb/c 小鼠和经过胸腺细胞疫苗作用的 Balb/c 小鼠分别造模 I 型糖尿病，糖尿病小鼠模型成功后，在上述三种糖尿病小鼠模型肾包膜下移植 C57 小鼠来源的胰岛，检测各时间点小鼠血糖变化。C57 小鼠胰岛自体移植（Auto）后，模型小鼠血糖显著下降，并在 3 周内趋于正常水平，第 4 周后血糖持续升高，这是由于移植胰岛过度合成胰岛素导致其功能性耗竭。胸腺假手术组（Blank）小鼠胰岛移植后 2 周内血糖轻微下降，这是由于移植胰岛在被排斥干净前发挥的微弱作用。胸腺细胞疫苗组（Allo TEC）小鼠胰岛移植后的血糖水平与胰岛自体移植小鼠接近。以上结果表明，在胸腺细胞疫苗的作用下，同种异体移植胰岛移植能够有效治疗 I 型糖尿病，如图 12 所示。

参考文献

- [1] Global activity in organ transplantation estimations.
- [2] 中国器官移植发展报告(book)
- [3] Montgomery, R. A., Tatapudi, V. S., Leffell, M. S. & Zachary, A. A. HLA in transplantation. *Nat Rev Nephrol* 14, 558-570, doi:10.1038/s41581-018-0039-x (2018).
- [4] Bodmer, J. G. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens* 53, 407-446, doi:10.1034/j.1399-0039.1999.530421.x (1999).
- [5] Zachary, A. A. & Leffell, M. S. HLA Mismatching Strategies for Solid Organ Transplantation - A Balancing Act. *Front Immunol* 7, 575, doi:10.3389/fimmu.2016.00575 (2016).
- [6] Williams, R. C., Opelz, G., McGarvey, C. J., Weil, E. J. & Chakker, H. A. The Risk of

Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. *Transplantation* 100, 1094-1102, doi:10.1097/TP.0000000000001115 (2016).

[7] Jameson, S. C., Hogquist, K. A. & Bevan, M. J. Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* 13, 93-126, doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.000521 (1995).

[8] Goldrath, A. W. & Bevan, M. J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255-262, doi:10.1038/46218 (1999).

[9] Cobbold, S. P., Martin, G., Qin, S. & Waldmann, H. Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. *Nature* 323, 164-166, doi:10.1038/323164a0 (1986).

[10] Pilat, N. & Wekerle, T. Transplantation tolerance through mixed chimerism. *Nat Rev Nephrol* 6, 594-605, doi:10.1038/nrneph.2010.110 (2010).

[11] Kawai, T. et al. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 358, 353-361, doi:10.1056/NEJMoa071074 (2008).

[12] Blazar, B. R., Murphy, W. J. & Abedi, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 12, 443-458, doi:10.1038/nri3212 (2012).

虽然以上描述了本发明的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，在不背离本发明的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式做出多种变更或修改。因此，本发明的保护范围由所附权利要求书限定。

权利要求

1. 一种降低或消除同种异体移植排斥的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:
通过胸腺疫苗在受者胸腺组织中表达供者 MHC 和/或移植供者胸腺上皮细胞;所述胸腺疫苗包括胸腺基因疫苗和/或胸腺细胞疫苗;
优选地,所述方法为非治疗目的的;和/或,所述方法为体外 (*in vitro*) 或离体 (*ex vivo*) 进行的。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述表达供者 MHC 是通过向受者胸腺组织注射胸腺基因疫苗来实现的;
优选地,所述胸腺基因疫苗包括:
(1) 基因表达载体;
(2) 分别编码供者的 MHC I 类分子和 MHC II 类分子的多核苷酸;
其中所述多核苷酸可操作地连接于所述基因表达载体,且所述供者的 MHC 背景异于所述受者的 MHC 背景;
更优选地,所述基因表达载体包括质粒载体、噬菌体载体、非病毒载体和病毒载体;
和/或,编码供者的 MHC I 类分子和 MHC II 类分子的多核苷酸位于同一基因表达载体中或分开的多个基因表达载体中。
3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述病毒载体为慢病毒载体或腺相关病毒载体 (AAV),例如 AAV2/8;
优选地,所述胸腺基因疫苗包括: AAV -CMV-H2-Kb α chain-IRES-H2-Db α chain 和 AAV-CMV-I-Ab α chain- IRES- β chain;
更优选地,所述胸腺基因疫苗包括: 核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 1 和 2 所示的分离的核酸;和/或,将所述胸腺基因疫苗注射到受者胸腺的左右两叶的各 1-5 个点位,例如 3 个点位。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述胸腺细胞疫苗的制备包括以下步骤:
使用抗 Epcam 抗体分选获得胸腺上皮细胞,即得;
优选地,将所述胸腺细胞疫苗移植到受者胸腺的左右两叶的各 1-3 个点位;和/或,所述胸腺细胞疫苗的剂量为 200 万个胸腺上皮细胞/受者;
更优选地,所述胸腺上皮细胞悬浮于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中,制得所述胸腺细胞疫苗。
5. 如权利要求 2 和/或权利要求 4 所述的方法,其特征在于,在注射胸腺疫苗之后,在新成熟的 T 细胞中实现供者反应性 T 细胞的删除;

优选地，在注射胸腺疫苗之前，还包括以下步骤：

- (i) 注射或不注射 IFN- γ ；
- (ii) 注射 T 细胞清除剂或免疫抑制剂；所述 T 细胞清除剂例如抗体 2.43 和 GK1.5；
- (iii) 辐照；例如第二日 1.5-3 Gy 辐照 1-2 分钟。

6. 一种组织或器官移植的方法，其特征在于，其包括以下步骤：

A. 使用如权利要求 1-5 任一项所述的方法降低或消除同种异体移植排斥；

B. 在受者外周血 T 细胞恢复至正常水平前或恢复至正常水平后，进行细胞、组织或器官的移植；

优选地，所述组织或器官选自皮肤、胰岛、神经、肾脏、肝脏、心脏、小肠、脂肪和骨中的一种或多种。

7. 一种胸腺基因疫苗，其特征在于，所述胸腺基因疫苗用于在受者胸腺表达供者组织相容性抗原（MHC）且包括：

- (1) 基因表达载体；
- (2) 分别编码供者的 MHC I 类分子和 MHC II 类分子的多核苷酸；

其中所述多核苷酸可操作地连接于所述基因表达载体，且所述供者的 MHC 背景异于所述受者的 MHC 背景；

优选地，所述基因表达载体包括质粒载体和病毒载体；和/或，编码供者的 MHC I 类分子和 MHC II 类分子的多核苷酸位于同一基因表达载体中或分开的两个基因表达载体中。

8. 如权利要求 7 所述的胸腺基因疫苗，其特征在于，所述病毒载体为慢病毒载体或腺相关病毒载体（AAV），例如 AAV2/8；

优选地，所述胸腺基因疫苗包括：AAV-CMV-H2-Kb α chain-IRES-H2-Db α chain 和 AAV-CMV-I-Ab α chain- IRES- β chain；

更优选地，所述胸腺基因疫苗包括：核苷酸序列分别如 SEQ ID NO: 1 和 2 所示的分离的核酸。

9. 一种胸腺细胞疫苗，其特征在于，其由以下步骤制备：使用抗 Epcam 抗体分选获得胸腺上皮细胞，即得；

优选地，所述胸腺上皮细胞的剂量为 200 万个/受者；和/或，所述胸腺上皮细胞悬浮于磷酸盐缓冲液（PBS）中，制得所述胸腺细胞疫苗。

10. 一种胸腺细胞疫苗试剂盒，其特征在于，其包括如权利要求 7 或 8 所述的胸腺基因疫苗，或如权利要求 9 所述的胸腺细胞疫苗；

任选还包括 (i) IFN- γ ；和/或，

(ii) T 细胞清除剂或免疫抑制剂。

11. 如权利要求 7 或 8 所述的胸腺基因疫苗、如权利要求 9 所述的胸腺细胞疫苗或如权利要求 10 所述的胸腺细胞疫苗试剂盒在制备降低或消除同种异体移植排斥的免疫制剂或在降低或消除同种异体移植排斥中的应用。