

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1351656 B

(45) 授权公告日 2012.02.29

(21) 申请号 00804990.4

代理人 程伟

(22) 申请日 2000.01.19

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 5/08(2006.01)

60/116,331 1999.01.19 US

C12N 5/10(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 35/407(2006.01)

2001.09.14

A01N 1/02(2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

A61P 1/16(2006.01)

PCT/US2000/001116 2000.01.19

A61P 35/00(2006.01)

(87) PCT申请的公布数据

(56) 对比文件

WO00/43498 EN 2000.07.27

US 5789246 A, 1998.08.04, 说明书第1、2、  
4、8栏。

(73) 专利权人 查珀尔希尔北卡罗来纳大学

审查员 廖雅静

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 L·M·雷德 H·库博达 N·莫斯

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

权利要求书 1 页 说明书 43 页

序列表 9 页 附图 16 页

(54) 发明名称

人肝脏祖先

(57) 摘要

本发明公开了分离和低温保藏人肝脏祖先的多种方法，其中包括：处理人肝脏组织以提供基本上是单细胞的悬浮液，该悬浮液包含存在于人肝脏的一种或多种细胞谱系的祖先和非祖先；将悬浮液进行缩小体积处理，该步骤显著地减少悬浮液中非祖先的数量从而提供富集祖先的悬浮液，这些祖先显示与一种或多种细胞谱系中的至少一种相关的一种或多种标志；然后从所述的缩小体积悬浮液选择这样的细胞，这些细胞本身、它们的后代或者其更成熟形式表达与一种或多种细胞谱系中的至少一种相关的一种或多种标志。这些标志包括 CD14、CD34、CD38、CD45 和 ICAM。肝祖先的特征为直径 6–15 μm、二倍体、血型糖蛋白 A<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、AFP<sup>++</sup>、ALB<sup>+</sup>、ICAM<sup>+</sup>，并且肝祖先亚群在 CD14<sup>+</sup>、CD34<sup>++</sup>、CD38<sup>++</sup>、CD117<sup>++</sup> 和 ICAM<sup>+</sup> 的表达方面有变化。这些祖先亚群细胞具有期望的特征在于在肝脏细胞和基因治疗中以及对建立人工生物器官特别有用。

1. 一种对包含已经从人肝脏组织取出的细胞混合物的组合物进行处理以获得该组合物的方法,其中所述的混合物包含人肝脏祖先的富集群,该方法包括:

(a) 提供成人肝脏组织的单细胞的悬浮液,所述的肝组织含有包括未成熟和成熟细胞在内的不同大小细胞的混合物;以及

(b) 在可以去除成熟细胞而同时保留直径小于 15 微米的未成熟细胞的条件下,缩小悬浮液的体积,

(c) 对缩小体积的悬浮液进行包含选择表达 CD14、CD34、CD38、CD117、ICAM 或其组合的那些细胞的阳性免疫选择,和 / 或包含去除表达 CD45、血型糖蛋白 A、连接蛋白 32 或其组合的那些细胞的阴性免疫选择,

以提供包含人肝脏祖先富集群的细胞混合物,其表达甲胎蛋白或清蛋白或二者均表达。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的富集群含有人二倍体全肝脏细胞。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的肝脏祖先为肝祖先、造血祖先、间充质祖先或其多种混合物。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的甲胎蛋白为全长甲胎蛋白。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的缩小体积处理包括根据细胞的大小、浮力密度或其组合而进行的分离。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的缩小体积步骤包括离心式淘洗、密度梯度离心、淘选、亲和层析、荧光标记、流体反向流动、连续流式离心、区带离心、磁珠的使用或其多种组合。

7. 如权利要求 1 所述的方法,进一步包括成熟细胞的选择性裂解。

8. 一种提供包含人肝脏祖先富集群的组合物的方法,包括:

(a) 提供成人肝脏组织的单细胞的悬浮液,和

(b) 根据细胞的大小、浮力密度或其组合缩小悬浮液的体积以去除成熟而保留未成熟细胞,和

(c) 对缩小体积的悬浮液进行包含选择表达 CD14、CD34、CD38 或其组合的那些细胞的阳性免疫选择,和 / 或包含去除表达 CD45、血型糖蛋白 A、连接蛋白 32 或其组合的那些细胞的阴性免疫选择,从而提供一种细胞混合物,其中该细胞混合物由人肝脏祖先富集群构成并表达甲胎蛋白或清蛋白或二者均表达。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述的肝脏祖先为肝祖先、造血祖先、间充质祖先或其多种组合。

10. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述的免疫选择包括从悬浮液选择表达甲胎蛋白或清蛋白或二者均表达的细胞。

11. 如权利要求 10 所述的方法,进一步包括选择产生全长甲胎蛋白 mRNA 的细胞。

12. 如权利要求 1 所述的方法,其中未成熟细胞的直径为 5-15 微米。

13. 如权利要求 1 所述的方法,其中未成熟细胞的直径为 8.0-9.4 微米。

## 人肝脏祖先

### 发明领域

[0001] 本发明涉及人肝脏干细胞、生成肝脏细胞和胆管细胞的多能细胞，以及能够扩增和分化为包括造血、间充质或肝脏细胞谱系在内的其它肝脏远祖细胞亚群。特别是，本发明涉及用于鉴定人肝脏祖先的标记和特性、人肝脏祖先的纯化和低温保藏方法、使人们能够区分肝脏细胞亚群与造血细胞亚群的新方法以及证明肝祖先从胎儿到成年在人肝脏中存在的证据。本发明构成细胞和基因治疗以及建立人工生物器官的基础。

### 背景技术

[0002] 成熟肝脏基本的结构和功能单位是腺泡，其横断面的组织形式象围绕两个独特的血管床的轮子：3-7 套肝三联（每套有一个门小静脉、肝小动脉和一个胆管）位于外周、中央静脉位于中心。肝脏细胞彼此组织构成细胞板，在其两侧排列有帘式内皮膜，形成一系列的与门脉管和中央血管系统相邻近的窦状隙。最近的数据表明肝闰管 (Canals of Herring)，即位于每个肝三联周围的小管，在整个区带 I 产生细小的小管，它们延伸并切入肝板，形成与瓶刷子相似的结构式样。(Theise, N. 1999, 肝脏学 (Hepatology), 30 : 1425-1433)。

[0003] 一个称作迪塞间隙 (Space of Disse) 的狭窄空间，一直沿着窦状隙将内皮膜与肝脏细胞分隔开。作为这种组织结构的结果，肝脏细胞具有两个基部区（其中的每一个面向一个窦状隙）和一个顶部区。基部区接触血液并参与血浆成分的吸收和分泌，而顶部区则形成专门分泌胆汁盐的胆汁小管并通过交联网络与胆管相连。血液从门小静脉和肝小动脉流过窦状隙到达末端肝小静脉和中央静脉。

[0004] 基于这种循环形式，将腺泡分为三个区带：区带 1，门周区；区带 2，腺泡中区；和区带 3，中心周围区。增殖潜能、形态规范、(染色体) 倍性以及大多数肝脏特异性基因与区带定位相互关联 (Gebhardt, R 等人, 1988, FEBS Lett., 241 :89-93 ;Gumucio, J. J. , 1989, Springer International, Madrid ;Traber, P. 等人, 1988, 胃肠学 (Gastroenterology), 95 :1130-43)。跨腺泡的血液成分 (包括氧气) 浓度梯度以及沿着从肝三联到中央静脉的血流方向承担这种区带化的一部分，例如，糖酵解和糖异生的彼此区室化。然而，门周区带形成中的间隙连结蛋白质 (连结蛋白 26) 以及中心周围区带形成中的谷氨酰胺合成酶 (这里仅列举两个例子) 对这样的梯度并不敏感，而更代表了大多数组织特异性基因，并看来好象取决于微环境中对细胞或非血流变量而言为内源性的因子。

[0005] 除了肝脏细胞、胆管上皮细胞 (胆管细胞) 和内皮细胞外，位于门脉和中央静脉区段间的区域含有其它细胞类型，诸如 Ito 细胞和库佛细胞 (Kupffer cell)。这些细胞在肝脏的疾病状态中扮演突出的角色，特别是在炎症和纤维化中，但是表面看来，它们对正常器官主要的自身稳定功能的贡献并不大。

[0006] 肝脏是盲肠囊 (形成自前肠尾和原始横隔，它们内脏间充质的一部分) 汇聚发育的结果。肝脏细胞的形成，很可能是通过成纤维细胞生长因子，始于内胚层上皮与生心中胚层的相互作用之后。接着，注定为肝脏细胞的细胞增殖并以索状方式穿入原始横隔的间

充质,形成肝脏原基。上皮 - 间充质的直接相互作用在肝脏的这些早期发育阶段中是至关重要的,并决定哪些细胞将分别成为肝脏细胞或胆管细胞和帘式内皮膜。间充质特异性基因 h1x 和 jumonji 的突变将阻断肝脏发育,从而表明来自该组织的贡献的重要性。在肝脏发育的早期,肝脏含有原始的肝脏细胞簇(与缺乏基底膜的连续内皮和丰富的造血细胞相邻)。由于内皮细胞转化为不连续的帘式内皮膜,所以脉管系统,特别是门脉管系统随着基底膜的产生变得更加发达。门小间隙可以提供胆管发育的触发器,并且由于它包围着门小静脉、肝小动脉和胆管,所以形成了肝三联。很可能是为了响应诸如 C-CAM105、Agp 110、E- 钙粘蛋白和连结蛋白这样的组织 - 形成分子在数量和分布上的变化,未成熟肝脏细胞快速增殖并形成实质板,同时伴有绝大部分(但不是全部)造血细胞再定位于骨髓。最近的研究提示某些造血细胞祖先存留于休眠的成年啮齿类的肝脏中,并且已从成年人类和鼠的肝脏中分离出造血干细胞(Crosbie, O. M. 等人, 1999, 肝脏学(Hepatology), 29 :1193-8)。在啮齿类中成熟的物理组构是在出生后的几周内完成的,在人类中是在头几年。代谢的区带化是根据不同的酶采取多少有些不同的安排而建立的,但在出生后的时期代谢的区带化变得明显起来。

[0007] 干细胞和定向祖先

[0008] 干细胞被定义为自我复制、多能,即产生的子代细胞多种命运的、能够广泛地发育,并能够再构建一种或多种组织的原始细胞。大多数关于干细胞的文献,源自有关胚胎方面的文献或者源自关于造血、表皮或肠组织方面的文献。

[0009] 最近,对定义进行了修改,以识别特定种类的干细胞。将具有参与所有细胞类型发育潜能的那些细胞称为**全能干细胞**,其中包括受精卵和上至 8 细胞阶段(桑椹胚)的正常胚胎细胞。胚胎干细胞也叫做“ES”细胞,包括源自胚泡中全能的正常细胞之永久细胞群,首先报道它们在二十世纪八十年代早期。ES 细胞系可在体外培养并保持全能性。如果将 ES 细胞引入到无免疫应答宿主中的任何部位,但不包括子宫,将导致肿瘤发生,形成畸胎瘤。但是,当将它们注射回到正常的胚泡中时,它们能够恢复胚胎发育并参与形成正常的但却是嵌合的小鼠。尽管已从多种物种(小鼠、大鼠、猪等)建立了 ES 细胞系,但只有小鼠系统,通过将培养的修饰细胞与胚泡合并、接着将该胚泡植入到假孕宿主中,已被常规地用于产生具有新表型(敲除、转基因)的动物。可以将显示 ES 细胞的多种特性的胚胎生殖(EG)细胞系在体外直接从原基生殖细胞群中分离出来。与 ES 细胞一样,当将 EG 细胞注射到无免疫应答的小鼠中时,EG 细胞形成畸胎瘤;当将 EG 细胞注射到胚泡中时,其对嵌合体包括生殖细胞系的形成作出了贡献。

[0010] 认定干细胞是多能细胞,它的遗传潜能被限制于有限种类的细胞类型、但具有广泛的生长潜能。越来越多的证据诸如来自端粒酶领域的证据提示:认定干细胞并不能自我复制,也就是它们的后代具有比其亲代更小的生长潜能。认定干细胞通过将它们的遗传潜能限制在单一种命运(例如肝细胞),产生失去多能性的子代细胞,并称其为定向祖先。在肝谱系中,有定向肝细胞祖先和定向胆管细胞祖先。

[0011] 最近,大量公布的实验报道了可从人的胚胎建立人 ES 细胞培养物。有人建议:可以将这些人 ES 细胞注射到组织中,希望它们能够再造损坏的器官和组织。由于发现当将 ES 和 EG 细胞注射到除子宫(见上)以外的部位时形成肿瘤,所以计划将人 ES 细胞接种到患者中并不现实,并对患者带来产生肿瘤的严重可能性。为了克服这种僵局,某些研究小组正

在努力进行这样的计划,即在限定的微环境条件下分化 ES 细胞,使其成为能够安全地接种到患者中的认定干细胞。例如,在产生造血祖先方面已有一些成功的措施。但是,如果将培养物接种到患者中,仍然担心培养物中残留的 ES 可能带来发生肿瘤的危险性。总之,在发育生物学研究将胚胎发育过程中控制决定细胞命运的谜底揭示出来之前,ES 细胞仍将作为一种实验手段,而几乎没有希望用于细胞或基因治疗的临床项目。

[0012] 围绕肝脏干细胞的争论

[0013] 在肝脏的细胞生物学领域,在成年的正常肝脏中是否存在干细胞是有巨大争议的论题。以下总结了在该领域中相互竞争的几种流行的模型。斜体字表示在不同模型中的关键概念。

[0014] 本领域的一些专家相信,**肝脏干细胞仅存在于胚胎组织**,而在成年肝脏中没有干细胞,而且所有成熟的肝脏细胞平等地参与肝脏的再生过程(法博 Farber, E., 1992, 见:多种细胞类型在肝癌发生中的作用(The Role of Cell Types in Hepatocarcinogenesis.), S. A. E. 编辑, Academic Press, New York)。法博 Farber 模型认为所有成熟的实质细胞在表型上是共相等的,并且在肝脏中,只是由于微环境造成了已知的生长潜能和基因表达的不均一性。Farber 提出在致癌条件下,成年的实质细胞逆分化并变为肿瘤细胞。该模型统治肝脏肿瘤发生领域几十年并在肝脏再生研究中仍具有影响。

[0015] 另一些专家相信**所有的肝脏细胞都是干细胞**(肯尼迪 Kennedy, S. 等人, 1995, 肝脏学, 22 :160-8; Michalopoulos, G. K. 等人, 1997, 科学(Science), 276 :60-6)。这些研究者相信所有的实质细胞是相互对等的,是高度可塑的,其基因表达仅由微环境支配。在适当的致癌条件下,设想成熟的实质细胞都会变为能够随后转变为肿瘤细胞的干细胞。

[0016] **沉默干细胞模型**是基于 Willson 和 Leduc (Willson, J. W. 等人, 1958, 病理细菌学杂志(J. Pathol. Bacteriol.), 76 :441-449) 的研究建立的。正如在造血领域中,这个概念是从对肝癌发生的广泛研究中获得大多数承认的(Marceau, N., 1994, Gut., 35 :294-6)。这些研究者相信祖先细胞,包括双潜能祖先细胞,能够继续存在于成年组织中,但是这些研究者认为它们属于稀少的残留物或者来自胚胎发育细胞群的残余。这些研究者假设祖先在正常或再生肝脏的功能发挥中不起任何作用,但只在疾病状态中起作用(Overturf K, 1999, 美国病理学杂志(American Journal of Pathology), 155 :2135-2143)。这也就是假设它们是“沉默的”,与肌肉中的星形细胞相似。由于其与众不同的细胞核形状,这些细胞被描述为“卵形细胞”。它们不大(9  $\mu$ m 左右),并且在细胞表面表达特征性的抗原谱。所有成熟肝脏的细胞在生长和基因表达方面被假设为是共相等的,而且基因表达的不均一性仅由细胞的微环境所决定。沉默干细胞模型的支持者强烈反对实质细胞从门周到中央周围部位移动的任何想法。肝脏细胞和其它肝祖先的重要性被认为仅与疾病状态、特别是癌症发生相关。因而,这些研究者将精力集中在用多种致癌性损害处理的动物中的候选祖先上。这些研究表明,“卵形细胞”在再生条件下或者在轻度至中度损伤的条件下不形成快速增殖细胞的可识别实体。只是在肝脏受到相当严重的损伤后,才观察到大量的增殖性卵形细胞群(Grisham, J. W. 等人, 1997, 见:干细胞(Stem Cells), C. S. Potter 编辑, Academic Press, London, 233-282)。

[0017] 基于**肝脏细胞流动**的模型(Arber, N. 等人, 1988, 肝脏(Liver), 11 :347-51),遭到了尖锐的批评,并且基本上已被忽视(Jurtile, R. L., 1995, 肝脏再生与癌症发生:分

子和细胞机理(肝脏的再生与肿瘤的生成:分子和细胞机理 LiverRegeneration and Carcinogenesis :Molecular and Cellular Mechanisms), AcademicPress, New York)。该模型假定,位于每个肝三联的干细胞区室产生“流向”中央静脉的成年实质细胞。流动过程使子代细胞与独特的微环境接触,从而引起细胞表型的改变。另外,假设微环境是至关重要的表型决定基。大部分研究者不赞成该模型,因为研究表明再引入肝脏的标记供体细胞并不移动(Kennedy, S. 等人, 1995, 肝脏学, 22 :160-8),而该模型却与此不一致。然而,即使在提供最确切证据以反对流动模型的那些研究中,也不清楚微环境或谱系的位置是否影响用于供体细胞的标记之表达。而且,最近 Theise 及其同事发现(Theise, N., 1999, 肝脏学, 30 :1425-1433),一直被怀疑与肝祖先相关的肝闰管至少在区带 1 中伸出遍及肝板的小管,流动肝脏假说很可能在此之后被重新光顾。

[0018] Reid 及其同事支持肝脏是一个干细胞和正在成熟的谱系系统(西格 Sigal, S. H. 等人, 1992, 美国生理学杂志(Am J Physiol.), 263 :G139-48)。他们提出,组织由干细胞或早期的祖先细胞群组成结构为正在成熟谱系的,类似泉涌的涌入流(fed)(布利 Brill, S. 等人, 1993, Proceedings of the Society for Experimental Biology&Medicine, 204 :261-9)。组织被定义为从“年轻到中年再到老年的不断变化的细胞”。成熟的过程伴随着细胞在大小、形态、抗原谱、生长潜能和基因表达方面的谱系位置依赖性变化。这些变化被假设为是由细胞的自主性变化之组合引起的,并不依赖于微环境及微环境诱导的变化;这里所说的微环境包括营养物、气体交换(氧气、CO<sub>2</sub>)、pH、激素、细胞-细胞相互作用及细胞外基质化学。

[0019] 表 1

区带	1	2	3
倍性	二倍体细胞	四倍体细胞	四倍体细胞和八倍体细胞的混合
平均大小	7-20 μ	20-30 μ	30-50 μ
生长	最快	中间	可忽略不计
细胞外基质	基质化学梯度位于迪塞间隙, 包括与门周的层粘素和硫酸乙酰肝素蛋白多糖混合的 IV 型胶原, 并在中央周围地区转变为原纤维胶原、纤维结合素和肝素蛋白多糖		
基因表达	早	中间	晚

[0020]

[0021] 假定生长在干细胞和早期祖先中为最快,并沿着谱系进程而衰退。该模型考虑到在成年肝脏组织中大部分细胞是多倍体,主要是四倍体和八倍体,少于三分之一的细胞是二倍体。最近的数据支持这样的概念,即组织中的大部分再生潜能源自二倍体细胞群,而且较老的细胞通过增加细胞量(以与多倍体相关的肥大性应答方式)为再生做出贡献(西格 Sigal, S. H. 等人, 1999, American Journal of Physiology, 276 :G1260-72)。所以,这些研

究者支持：无论是在细胞或基因治疗还是在人工生物器官，细胞生长的最佳希望存在于用组织的二倍体细胞群。

[0022] 干细胞和正在成熟谱系模型与其它肝脏细胞发育模型的矛盾之处在于，它认为肝脏恶性肿瘤在绝大多数情况下是致癌性损害的非直接、而不是直接的结果。致癌性损害被认为是杀死了肝脏的大多数细胞，特别是谱系中的成熟细胞，导致对再生应答的显著诱导。所导致的祖先扩增增加了快速生长的细胞，即祖先，它可导致恶性肿瘤的第二次突变事件的危险性。因而，较老的假说，即癌是阻断的分化，或者癌是由于靶向干细胞的致癌性损害，被承认是正确的，但进行了如上所述的修改。

[0023] 目前基于这样的数据，即肝脏充满了表示细胞程序性死亡或终末分化过程的特征（西格 Sigal, S. H., 1995, 分化 (Differentiation), 59 :35-42），以及发现仅存在于成年肝脏的某些肝脏细胞亚群能够进行广泛的细胞分裂 (Overturf K 等人, 1999, 美国病理学杂志 (American Journal of Pathology), 155 :2135-2143 ;Tateno, C 等人, 2000, 肝脏学, 31 : 65-74)，使得正在成熟谱系模型越来越被承认。在该模型中，祖先和成年细胞的一个亚群（假定是二倍体亚群）被再注射到活体内时，具有重建肝脏组织的能力，并能够进行广泛生长，包括克隆生长。

[0024] 授予瑙顿 (Naughton) 的美国专利第 5,559,022 号公开了从肝脏分离细胞和使用梯度离心进一步将其纯化。然而，其所分离的细胞群是“嗜酸性的实质细胞群”，而不是本发明所要求保护的肝脏祖先。

#### [0025] 肝脏祖先的临床前和临床应用性

[0026] 因为来自肝脏的未成熟祖先细胞可能具有治疗肝脏疾病的效果，所以对分离和鉴定这类细胞群有强烈的临床和商业兴趣。每年在美国，就有大约 250,000 人因肝脏衰竭而住院。肝脏移植能够有效地治疗某些类型的肝脏衰竭，并且每年在美国进行大约 4,100 例移植。其中限制肝脏移植的一个因素是供体肝脏的可利用度，特别是受到了用于器官移植的供体肝脏必须源自脑死亡而不是心脏停滞的患者的限制。由尸体提供的肝脏一直不成功，尽管最近使用这类供体的努力已经支持这种可能性，即如果在死亡 1 小时内获得肝脏，就可使用它们。

[0027] 对于大多数肝脏疾病，将细胞移植入肝脏是一种有吸引力的替代性疗法。相对于那些需要移植整个器官而言，细胞移植的手术过程算不上重要，因而可将其用于具有多种手术危险性的患者，诸如老年或体弱者。使用人的肝脏细胞优于源自其它哺乳类动物的肝脏细胞，这是因为潜在的病原是人源的，并可被患者更好地耐受以及在使用前可容易地对其进行筛选。

[0028] 在进行肝脏细胞移植的尝试中，使用过未分级的成熟肝脏细胞，并已显示一定程度的效果（福克斯 Fox, I. J. 等人, 1998, 新英格兰医学杂志 (New England Journal of Medicine), 338 :1422-1426）。然而，由于这些细胞在活体内不生长，所以需要注射大量的细胞（100-200 亿）才能成功。而且，引入大量成熟的大肝脏细胞（平均细胞直径 30-50  $\mu$ ），在注射时它们倾向于并发性地形成巨大的聚集体，从而导致潜在的致死性栓子。而且，这些细胞还引发显著的免疫排斥应答，迫使患者服用免疫抑制药物以维持以后的生存。最后，还没有成功地将成熟的肝细胞低温保藏，因而需要复杂的后勤来协调合适肝脏组织的可用性、细胞悬浮液的制备以及用于临床治疗细胞的即刻传递。

[0029] 分离肝脏祖先方面的进展

[0030] 已知从肝脏分离肝脏祖先是一项极具挑战性的工作,这是由于对肝脏细胞缺乏正选择标志。对于肝祖先的候选物,唯一可用的抗体是所制备的抗肝祖先亚群(卵形细胞),可诱导其增殖,用于受到致瘤剂损害后的那些单克隆抗体。然而,这些抗体与存在于造血细胞的抗原有交叉反应。

[0031] 过去,曾尝试获得肝祖先细胞群,认为它们是用于肝脏的细胞和基因治疗之最为通用的群。授予 Reid 等人的美国专利 5,576,207、5,789,246 使用细胞表面标志和侧向散射(side scatter)流式细胞计数,以提供肝脏中限定的亚群。通过去除谱系定向细胞以及选择未成熟的肝祖先,未成熟的肝祖先为经过检测携带有 OC.3- 阳性(卵形细胞抗原性标志)、AFP- 阳性、清蛋白- 阳性和 CK19- 阴性(细胞角蛋白 19)细胞标记的非粒细胞。已经对大鼠肝脏细胞的亚群进行了分离。前述的大鼠肝脏亚群证实有这样的特性,它们在从啮齿类肝脏分离和鉴定富集的肝祖先中很重要。

[0032] 部分由于这样的争论,即关于成年期中是否有肝脏祖先,假定是人肝祖先存在与否,或者该肝脏祖先只是来自胚胎发生、在生理上沉默的残余物,所以,正如本文所公开,从成年人的肝脏分离肝脏祖先是创新和出乎意料的。因而,除了在疾病状态下,还没有对它们进行分离或研究的尝试。

[0033] 对比之下,胞质蛋白质甲胎蛋白(AFP)和清蛋白在发育肝脏中的存在被认为是祖先细胞的强阳性指征。在肝脏发育的最早阶段,这些细胞能够产生既进入胆管又进入肝脏细胞谱系的子代。如果这些子代细胞定向到胆管谱系,甲胎蛋白的表达就停止了。然而,在肝脏细胞谱系中甲胎蛋白持续表达,直到围生期时被抑制为止,从而使得表达清蛋白成为成年肝脏细胞的主要特征之一。

[0034] 然而,由于甲胎蛋白是细胞内蛋白质,并且只能在细胞被固定和可渗透化处理后,才能显示出来,所以将其作为鉴定活的肝祖先细胞的标志并不合适。

[0035] 发明概述

[0036] 本发明涉及一种提供含源自人肝脏组织细胞混合物的组合物的方法,该混合物包含人肝祖先的富集群,该方法包括:提供基本上是人肝脏组织的单细胞悬浮液,它包含多种大小细胞的混合物,其中包括未成熟的细胞和成熟的细胞;然后在能够去除成熟的细胞和那些相对较大的细胞的条件下缩小悬浮液的体积,而同时保留未成熟的细胞和那些相对较小的细胞,以提供包含人肝祖先的富集群,其中的人肝祖先本身、它们的后代、或者其更成熟的形式均显示出一种或多种表示甲胎蛋白、清蛋白或二者表达的标记。甲胎蛋白和清蛋白可以是全长的或者是变异体。缩小体积的过程包括利用细胞的大小、浮力密度或二者的分离。也可以基于沉降速度、流体动力学半径和沉降到平衡密度,缩小体积。或者,也可以利用表面标志对例如,抗体和植物凝集素等结合组分的粘附性进行分离。所分离的祖先可以是二倍体并且其直径可小于大约 15 微米。而且,这些祖先或它们的后代能够合成祖先特有的大分子,包括但不限于甲胎蛋白和清蛋白。优选地,甲胎蛋白包括编码外显子 1(AFP)的多肽序列。因而,甲胎蛋白转录自大小大于 2kb 的 mRNA,为全长的 AFP mRNA。类似地,清蛋白优选地包括编码外显子 1(ALB)的多肽序列。因而,该清蛋白转录自全长的 mRNA。

[0037] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种分离、低温保藏和使用来自人肝脏祖先的方法,其中包括处理人肝脏组织,提供包含存在于人肝脏的一种或多种细胞谱系的祖先和

非祖先、并且基本上是单细胞的悬浮液；将悬浮液在缩小体积步骤中处理，从而大量地减小悬浮液中非祖先的数量，以提供富集祖先的缩小体积的悬浮液，该祖先显示与至少一种细胞谱系相关的一种或多种标志；可选地是，从缩小体积的悬浮液中选择这样的细胞，这些细胞本身、它们的后代、或其更成熟形式表达与至少一种肝细胞谱系相关的至少一种标志；可选地是，在适于最佳低温保藏的条件下将细胞悬浮；以及可选地是，用于生产生长因子和治疗患者。优选地将表达胞质蛋白质诸如甲胎蛋白的肝脏祖先选择出来。本发明中的处理和缩小体积步骤优选地包括肝细胞悬浮液的密度梯度离心或离心式淘洗，以便根据它们的浮力密度和/或大小将细胞分开，这种大小与具有较低浮力密度的一个或多个梯度分级和/或在大小上较小相关。密度梯度方法可包括区带离心和连续流式离心。

[0038] 本发明的一个实施方案为通过利用与成熟的肝脏细胞相关的标志，诸如连结蛋白、与造血细胞相关的标志诸如血型糖蛋白 A 和 CD45 和/或与成熟的间充质细胞相关的标志，诸如类维生素 A 和 von Willebrand Factor 等，负选择包括成熟的肝、造血和间充质细胞在内的非祖先。

[0039] 本发明者发现使用肝祖先能够克服许多与使用成熟肝细胞相关的缺点，使它们成为用于细胞和基因治疗以及用于人工生物器官的理想细胞。这些细胞较小 (7-15  $\mu$ )，因而最小化巨大栓子的形成。另外，这些细胞具有广泛的生长潜能，这意味着只需要更少的细胞就可在患者中重建肝脏组织。最后，这些祖先具有最少的可能引发免疫排斥的抗原性标志，提供了也许几乎不需要或不需要任何免疫抑制药物的希望。用肝脏细胞治疗包括肝脏细胞的体外处理或者移植。这些细胞，优选地包括祖先细胞在内，是以多种途径中的任何之一包括非肠道和腹膜内提供的。有效量的细胞，优选地  $10^3$  到  $10^{10}$  个细胞，是需要的。更优选地，要移植  $10^5$  到  $10^8$  个细胞，最佳地大约  $10^6$  个细胞。

[0040] 在本发明的另一个实施方案中，肝脏祖先在生产生长因子和其它蛋白质中极为有用。这些因子与它们自己的生长或者与肝脏中其它祖先（例如，造血或间充质祖先）的生长相关，并与肝祖先细胞发育为特定谱系之早期步骤相关的因子相关。这些新的生长因子可用于治疗肝脏疾病，或者控制那些是肝脏祖先的转化子的癌症。而且，肝脏祖先 是基因治疗的重要靶子，其中的插入遗传性地转化肝祖先，或者将正常的肝祖先移植入个体，则正常的肝祖先促进个体的健康。

[0041] 本发明的另一个方面是确定细胞表面上与甲胎蛋白在细胞内表达相互联系的独特抗原谱。以这种方式表征含有甲胎蛋白的细胞，就能够从制备自完整肝脏或者肝叶的活跃的单细胞悬浮液，通过流式细胞计数法接着富集活的肝祖先细胞。而且，人肝祖先的分离和鉴定，正如本文所述，是通过应用独特的方法、标志和参数之组合而实现的，并且本发明者是第一个使用这些手段得到本发明之独特的细胞群。

[0042] 本发明的进一方面提供起源肝、造血或间充质的全肝脏细胞祖先。通过选自 CD14、CD34、CD38、CD45、CD117、ICAM、血型糖蛋白 A 抗原性标志，和/或胞质标志诸如甲胎蛋白样免疫反应性、清蛋白样免疫反应性或二者，选择出这些细胞谱系、它们的后代或者其更成熟形式。甲胎蛋白可源自全长的 mRNA (大于 2kb, 为通常在肝祖先中表达的形式) 或者来自变异形式 (小于 2kb, 即大约 0.5、0.8、1、1.5 或 2kb, 为通常在造血祖先中表达的形式)。本发明的肝脏祖先可分离自胎儿、新生儿、婴儿、儿童、青少年或成年人的肝脏。

[0043] 为与本发明的进一方面相适应，将所分离的人肝脏祖先纯化为高度富集到基本纯

的形式。这样的肝脏祖先含有肝、造血和间充质祖先。肝祖先具有发育为肝细胞、胆管细胞或其组合的能力；造血祖先具有发育为巨噬细胞、中性白细胞、粒细胞、淋巴细胞、血小板、中性白细胞嗜酸细胞、嗜碱性粒细胞或其多种组合的能力；间充质祖先具有发育为内皮细胞、基质细胞、肝星形细胞 (Ito 细胞)、软骨细胞、骨骼细胞或其多种组合的能力。本发明的方法可用于选择表达甲胎蛋白样免疫反应性、CD45、清蛋白样反应性、CD34、骨桥蛋白、骨骼唾液蛋白 (bonesialoprotein)、胶原 (I、II、III 或 IV 型) 或其组合的间充质祖先。

[0044] 本发明的更进一方面提供包含有外源核酸的肝脏祖先。该外源核酸可编码至少一种目的多肽，或者能够促进至少一种目的多肽的表达。

[0045] 为与本发明的再进一方面相适应，通过对受到一种或多种人疾病或功能障碍之负效应所损害的个体施用有效量的所分离的人肝脏祖先，从而提供减轻该负效应的一种方法。可采用腹膜内或者通过血管采用非肠道途径，或者直接施用于肝脏内，从而将祖先施用。可通过外科手术经门静脉、肠系膜静脉、肝动脉、肝胆管或其多种组合，有效地实现直接施用。或者，可将肝脏祖先施用于个体的异位部位内，诸如脾脏或腹膜。

[0046] 通过本发明的方法，能够减轻的人疾病或功能障碍包括：肝胆管炎、肝硬化、肝肿大、肝硬变、肝纤维化、肝炎、急性肝衰竭、慢性肝衰竭，或者先天性代谢不正常和肝脏癌症诸如肝癌，或者肝胚细胞瘤。肝脏癌症可以是原位癌症或者转移到肝脏内的癌症。转移的肿瘤可能源自任一数目的原位，其中包括肠、前列腺、乳腺、肾脏、胰脏、皮肤、脑、肺、或其组合。

[0047] 为与本发明的再进一方面相适应，提供了一种生物反应器，包括：包含从人肝脏中分离的祖先的生物物质，它们的后代，它们的正在成熟或已分化的后代，或者其组合；以及培养液，诸如基础培养液；一个或多个装有生物物质或包含生物物质组分的区室；和任选地，一个或多个连接接口。而且，该生物反应器也可任选地包含：细胞外基质；激素、生长因子、营养物或其多种组合；以及生物液，诸如血清、血浆或淋巴液。

[0048] 该生物反应器适用于维持所述祖先处于活的、有功能的状态，并能够维持肝脏祖先从大约 1 周到大约 55 周的时间。具体地，该生物反应器适用于用作人工肝脏、制造产品、毒理学研究，或者包括涉及细胞色素 P450 活性的研究等代谢研究，或者药物代谢的其它类型。

[0049] 为与本发明的再另一个方面相适应，本发明提供了所分离的人肝脏祖先的组合物或者从人肝脏获得的富集祖先悬浮液。所提供的细胞悬浮液处于药学可接受的载体或稀释剂中，然后将其施用于需要接受治疗的个体。本发明的组合物包含显示与发现于人肝脏的一种或多种细胞谱系中的至少一种相关的一种或多种标志的肝脏祖先，并且基本上不含有成熟细胞。更特别的是，所分离的肝脏祖先源自一种或多种全肝脏细胞谱系，包括肝、造血或间充质细胞谱系，并且这些细胞谱系本身、它们的后代或者其祖先的更成熟形式表达至少一种或多种抗原性标志 CD14、CD34、CD38、CD90、或 CD117、CD45、血型糖蛋白 A，以及甲胎蛋白样免疫反应性、清蛋白样免疫反应性或二者的胞质标志。在进一步的实施方案中，未成熟细胞、它们的后代或更成熟形式表达骨桥蛋白、骨骼唾液蛋白、I 型胶原、III 型胶原、IV 胶原型或其组合。

[0050] 为与本发明的另一个实施方案相适应，本发明提供了肝脏祖先的细胞培养系统，其中包含所分离的人肝脏祖先、它们的后代、它们的正在成熟或已分化的后代或其多种组

合。细胞培养系统还另外包含：包含一种或多种胶原、一种或多种粘连蛋白质（层粘素、纤维结合素）及其它组分（诸如蛋白多糖，例如硫酸乙酰肝素蛋白多糖）的细胞外基质；或者单独一种基质组分。该基质组分包括：基质组分的片段，基质模拟物，它可以是合成的或者生物可降解的物质（即微球体），它们采用来自多种类型的细胞外基质中的一种或多种因子外包衣。该细胞培养系统还可另外包含：基本或加富(enriched)培养液及其它营养物；激素、生长因子和，任选地，生物液，诸如血清、血浆或淋巴液。另外，细胞培养系统可含有一个或多个装有生物物质的诸如培养皿、板、瓶、摇瓶、transwell 或其它类似容器的区室。

[0051] 可将本发明的培养物或生物反应器用于：一种或多种代谢的研究，包括涉及第 I 阶段或第 II 阶段生物转化酶系统的活性的研究；一种或多种转运的研究，包括涉及肝窦状隙及小管的转运系统的表达、调节和活性的研究；其它包括药物代谢方面和细胞色素 P450 的活性。

[0052] 在本发明的更进一步的实施方案中，为粘连的细胞提供了低温保藏方法。低温保藏粘连的细胞的方法包括：(a) 提供粘连的细胞，以及基质或粘性增强剂；(b) 将细胞悬浮于包含培养液、冰晶抑制剂、碳水化合物调节因子、铁供体、脂蛋白和类脂的低温保藏混合液中；和 (c) 冷却悬浮液至细胞的冰点之下。此处的冰点是指细胞变为固体物质的温度，而不管其是过冷的液体或玻璃体、微晶或巨晶物质。而且，本文公开了低温保藏混合物，其中包含培养液、冰晶抑制剂、碳水化合物调节因子、铁供体、脂蛋白和类脂。低温保藏混合物也可包含：抗氧化剂诸如抗坏血酸、甘油 (10% v/v) 或二甲基亚砜 (DMSO, 10% v/v)，后两种试剂可作为冰晶形成的抑制剂。铁供体、脂蛋白和类脂可分别是转铁蛋白、高密度脂蛋白和游离脂肪酸。任选地，游离脂肪酸与清蛋白结合。低温保藏混合液可包括胶原、胶原样物质、琼脂糖、甲基纤维素或明胶，其中的胶原可以是 I 型胶原、III 型胶原或 IV 型胶原。该低温保藏混合液的组分可制备于 Viaspan 或 Univeisity of Wisconsin 低温保藏溶液中。

[0053] 本发明进一步的实施方案是拥有多份低温保藏的肝祖先和 / 或它们的后代的标本、细胞库、目录或生物储藏处。肝祖先可由上述方法分离，并且也可以是由任何可接受的方法，它提供表达全长甲胎蛋白、清蛋白或二者的肝祖先的分离的肝祖先。此储藏处可包括细胞标志索引系统。在融化后，可将储藏的细胞用于接种生物反应器、起始细胞培养或用于治疗患者。

[0054] 本发明更进一步的实施方案包括甲胎蛋白变异数体，它是缺失甲胎蛋白外显子 1 的基因或 mRNA 的基因产物，见下面定义。正如在本发明中所公开，甲胎蛋白变异数体常常与造血祖先及其它们的后代相关，而不与肝祖先相关。本发明再进一步的实施方案包括从甲胎蛋白外显子 1 编码的序列得到的 3 至 10 个氨基酸的肽。

[0055] 本发明的另一个实施方案包括大分子与肽的缀合物，其中的肽为来自甲胎蛋白外显子 1 编码序列的 3 至 10 个氨基酸之间的肽，并适于用作抗原。大分子可以是清蛋白、血蓝蛋白、酪蛋白、卵清蛋白、多聚赖氨酸例如，多聚-L-赖氨酸或多聚-D-赖氨酸和本领域已知的任何其它适合的大分子。可将抗原用于产生对甲胎蛋白特异的抗体，甲胎蛋白的表达为肝祖先的特征，而不是造血祖先或它们的后代的特征。正如本领域所公知，在存在或不存在佐剂的情况下用抗原免疫动物，或者将脾脏细胞暴露于抗原并随后融合脾脏细胞以形成杂交瘤，可产生抗体。

[0056] 在本发明的另一个实施方案中，公开了从人肝脏分离祖先的方法，包括处理人肝

脏组织以提供基本上为单细胞的悬浮液,其中包含在人肝脏中发现的一种或多种细胞谱系的祖先和非祖先,将悬浮液在缩小体积步骤中处理,此步骤显著地减小悬浮液中非祖先的数量,以提供祖先被富集、体积被缩小的悬浮液,该祖先显示一种或多种与一种或多种细胞谱系中的至少一种相关的标志,接着从缩小体积的悬浮液选择这样的细胞,这些细胞本身、它们的后代或者其更成熟形式表达与一种或多种细胞谱系中的至少一种相关的一种或多种标志。

- [0057] 附图简要说明
- [0058] 图 1 甲胎蛋白 mRNA 的 PCR 分析
- [0059] 图 2 清蛋白 mRNA 的 PCR 分析
- [0060] 图 3 低温保藏对胎儿肝细胞存活率的影响
- [0061] 图 4 左边,通过 FACS 得到的甲胎蛋白免疫荧光矩形图
- [0062] 右边,通过 FACS 得到的清蛋白免疫荧光的矩形图
- [0063] 图 5 在未分级的全肝脏细胞悬浮液中表达表面标志 CD14、CD34、CD38、CD45 和血型糖蛋白 A(GA) 的细胞百分比
- [0064] 图 6 胎儿的全肝脏细胞 : 细胞表面标志和甲胎蛋白的共表达
- [0065] 图 7 左上,甲胎蛋白阳性的细胞百分比
- [0066] 右上,清蛋白阳性的细胞百分比
- [0067] 底部,Percoll 分级对甲胎蛋白和清蛋白的共表达的影响
- [0068] 图 8 一个胎儿全肝脏细胞悬浮液共表达 CD14、CD38 和甲胎蛋白的 FACS 分析
- [0069] 图 9 使用 CD14 和 / 或 CD38 筛选甲胎蛋白阳性细胞的产率
- [0070] 图 10 对甲胎蛋白染色的胎儿肝祖先细胞之四个有代表性的免疫荧光视野
- [0071] 图 11 CD14 的筛选效果 (右) : 差示干涉对比 (differential Interference Contrast) (上) 和免疫荧光视野 (下)
- [0072] 图 12A 通过相差显微镜观察全肝脏细胞簇
- [0073] 图 12B 采用抗甲胎蛋白抗体,通过免疫荧光观察相同的全肝脏细胞簇
- [0074] 图 12C A 和 B 的叠加
- [0075] 图 13A 用 Calcein 染色的全肝脏细胞
- [0076] 图 13B 用甲胎蛋白染色的全肝脏细胞,视野同 A
- [0077] 优选实施方案的详述
- [0078] I. 定义
  - [0079] 在随后的描述中,广泛地使用了若干术语,以描述本发明。为了对专利说明书及权利要求书,包括术语所包含的范围,提供一个清楚和连贯的了解,提供如下定义。
  - [0080] **甲胎蛋白样免疫反应性:**任何由甲胎蛋白引起的免疫反应。甲胎蛋白可以是全长的或截短的,包括异构体和甲胎蛋白的拼接变异体。
  - [0081] **定向祖先:**具有单一种命运的未成熟细胞,诸如肝脏细胞的定向祖先(生成肝脏细胞)或胆管的定向祖先(生成胆管)。在分子水平上还不了解定向的过程。但仅经验性地认识到,当细胞的命运比其前辈缩窄时,就发生了定向的过程。
  - [0082] **肝脏细胞:**全肝脏细胞的亚群,它包括肝细胞和胆管细胞。
  - [0083] **全肝脏细胞 (liver cells):**如本文所用,术语“全肝脏细胞”指存在于正常肝脏中的

所有细胞类型,不考虑它们的来源和命运。

[0084] **干细胞:**如本文所用,术语“干细胞”指能够产生多于一种命运的子代细胞之未成熟细胞,也就是它们是多能的。全能干细胞,诸如胚胎干细胞(ES细胞)或者哺乳动物胚胎上至8细胞阶段的胚胎细胞,具有自我更新(自我保持)的能力,其中的干细胞产生与其自身完全相同的子代细胞。与此相对应,认定干细胞,诸如造血、神经元、皮肤或肝干细胞,是多能的并具有广泛的生长能力,但却怀疑其具有自我更新能力。在全能干细胞的情况下,一些子代细胞与亲代完全相同,而另一些“定向”于特定的一种或多种命运,它们的遗传潜能被限制至少于其亲代。在认定干细胞的情况下,一些子代细胞保持多能性,而另一些失去多能性,定向于单一的、特定的命运。

[0085] **肝祖先:**这些细胞产生肝细胞和胆管细胞。肝祖先包括三个亚群:“肝干细胞”、“定向肝脏细胞祖先”和定向胆管祖先,后两个为肝干细胞后代的未成熟细胞,并且具有单一种命运:或者是肝脏细胞,或者是胆管细胞,但不能是二者。

[0086] **肝干细胞:**肝祖先的一个亚群。

[0087] **肝脏祖先:**来自肝脏的一个细胞群,包括肝祖先、造血祖先和间充质祖先。

[0088] **造血:**生成细胞命运为淋巴细胞(B和T)、血小板、巨噬细胞、中性白细胞和粒细胞的血液细胞。

[0089] **间充质生成:**生成细胞命运为内皮细胞、脂肪细胞、基质细胞、软骨和甚至骨骼(最后二者仅在疾病状态下于肝脏中发生)的间充质衍生物。

[0090] **细胞治疗:**如本文所用,术语“细胞治疗”指用作自体或同种异体物质的规定细胞群的活体内或离体转移,并被移植到患者特定的靶细胞或其附近中。细胞可以在任何合适的介质、载体或稀释剂,或者任何类型的,包括微载体、珠、微粒体、小球体、囊泡等药物递送系统中被移植。

[0091] **基因治疗:**如本文所用,术语“基因治疗”指规定的遗传物质活体内或离体转移到患者特定的靶细胞,因而改变了基因型,并且在大多数情况下,也改变那些靶细胞的表型,最终目的是为了预防或改变特定的疾病状态。基因治疗可包括离体修饰靶细胞并将细胞引入到患者中。或者,可将载体靶向活体内肝脏祖先细胞,以传递外源遗传物质和转染祖先。而且,遗传工程化的祖先细胞可用于生物反应器中治疗患者或者作为生物制品的来源物。正如本定义所陈述,根本的前提是这些治疗性的遗传操作,其设计的目的是最终预防、治疗或改变明显的或隐藏的病理状态。在大多数情况下,基因治疗操作的最终治疗目的是改变特定靶细胞群的表型。

[0092] **CD:**“分化簇”或“共同决定簇(common determinant)”如本文所用,指被单克隆抗体识别的细胞表面分子。对于特定的谱系或正在成熟途径的细胞,某些种类CD的表达是特异的,而相同的细胞中其它种类CD的表达随激活、部位或分化状态而变化。

[0093] 当术语“一种,一个(英文one)”、“一个(英文a)”或“一个(英文an)”用于本专利公开中时,它们的含义为“至少一种或一个”或“一个或更多”,除非另外指出。

[0094] II. 甲胎蛋白和清蛋白作为肝谱系的诊断标志

[0095] 均为胞质蛋白质的甲胎蛋白(AFP)和清蛋白是肝谱系的特别可靠的标志。这些蛋白质的表达是鉴定肝脏中来自其它细胞类型的肝亚群的基础。

[0096] 体外刺激人白血病细胞谱系及正常的T淋巴细胞后,它们也能够表达AFP。然而,

该数据没有表明白血病细胞谱系以及激活的淋巴细胞中的 AFP mRNA 是否与肝脏细胞中真正的 AFP mRNA 完全相同。有必要确定：是否可通过常规的蛋白质测定，诸如免疫荧光、western 印迹等等来测量 AFP 或清蛋白 mRNA 的表达，因为 RT-PCR 是已知的鉴定特定 RNA 模板的最灵敏技术。

[0097] 在此处所描述的研究之前，还没有人曾对 AFP 或清蛋白 mRNA 在人造血细胞中的形式进行过详细的研究。本发明证实了 AFP 和清蛋白的变异形式在造血细胞中的表达。

[0098] 图 1 是利用针对甲胎蛋白 mRNA 的几个外显子的引物，通过聚合酶链式反应 (PCR) 对肝脏和非肝细胞的分析结果。PCR 分析揭示在造血细胞中有截短的 AFP。利用 hAFP 1、hAFP 2、hAFP3 和 hAFP4 的引物组合，进行了 RT-PCR。M = 分子量标准，道 1-3 = Hep3B；道 10-12 = STO 成纤维细胞；道 13-15 = 无任何 RNA。注意：在道 2、4 和 8 中，都有一条为截短的 AFP 异体形式的条带。注意到在道 1 和 4 中，有一个对全肝脏细胞特异的变异的 AFP 异体形式。在道 3 和 6 中观察到完整的 AFP 种类。为了表征 hAFP mRNA 的变异形式，本发明者设计了九个 PCR 引物，如在实施例 1 中所示。AFP 的编码序列从外显子 1 延伸至外显子 14。除了对 AFP mRNA 外显子 1 的引物组合外，所有的引物组合在人红白血病细胞系 K562 中都扩增出 AFP mRNA 的部分；而在人肝脏细胞系 HepG2 和 Hep3B 中所有的组合均检测到 AFP mRNA。这就证实了 AFP mRNA 的变异形式含有从外显子 2 到正如在 K562 中所表达的外显子 14，但是并不覆盖 AFP 的所有编码序列。该结果提示在鉴定肝脏细胞中有用的引物只是检测 AFP 外显子 1 部分的那些引物，AFP 外显子 1 的表达更可能地是以组织特异的方式被加以限制。对肝祖先亚群而言外显子 1 是独特的，这个事实使得人们能够利用它，在肝和造血祖先细胞类型之间作为鉴定肝祖先细胞类型的探针。

[0099] 由于在造血细胞的一些亚群中存在有 AFP 的截短形式，在肝和造血细胞中也都对清蛋白进行了分析。清蛋白探针的设计方式与 AFP 探针类似（见上），并将其用于在肝和造血细胞谱系之间测定清蛋白在肝脏细胞谱系中的相对表达。至于 AFP，在造血细胞谱系 K562 中，发现了一个截短的形式，并且利用针对外显子 12-14 的引物而检测出的一个转录本。

[0100] 本发明公开了 RT-PCR 特异探针的设计和制备，以确定在肝和造血细胞群中， AFP 和清蛋白 mRNA 的变异形式的表达谱。正如此处所公开，本发明证实了在造血祖先中可存在有 AFP 和清蛋白 mRNA 二者的变异形式。它意味着当使用这样的敏感测定法时，必须使用另加的标准，诸如使用针对 AFP 外显子 1 的探针，从而在肝和造血细胞群中确定出肝脏细胞群。

[0101] 图 2 是通过针对清蛋白的几个外显子的 PCR，对肝脏细胞和非肝脏细胞的分析结果。由于在造血细胞的一些亚群中存在有 AFP mRNA 的截短形式，在肝和造血细胞中也都对清蛋白进行了分析。清蛋白探针的设计方式与 AFP 探针类似（见上），并将其用于在肝和造血细胞谱系之间测定清蛋白在肝脏细胞谱系中的相对表达。至于 AFP，在造血细胞谱系 K562 中，发现了一个截短的形式，并且发现了针对外显子 12-14 的引物而检测出的一个转录本。

[0102] 肝脏的发育研究证实胎儿的肝脏，在子宫内的发育期间，既是肝脏的发生器官又是造血器官。在肝脏的多种发育期期间，胎儿的肝脏含有巨量的造血细胞，特别是红细胞谱系的造血细胞。而且，越来越意识到肝脏发生系统和造血系统是相互间紧密相关的，并存在

这样的可能性,即这种相互关系包括了 AFP 和清蛋白的联合表达 (joint expression),或者也许是联合表达该蛋白质的同型。对肝祖先亚群而言外显子 1 是独特的,这个事实使得人们能够鉴定本发明的肝脏祖先细胞的特定亚群。

[0103] 尽管 PCR 分析显示,造血祖先可表达 AFP 以及清蛋白 mRNA 二者,但是 mRNA 的表达水平非常低。确实,当采用流式细胞计数分析测量 AFP 和清蛋白时,在 K562 中检测不到 AFP 和清蛋白。尽管 AFP 和清蛋白二者都在鉴定肝脏细胞中起着至关重要的指导作用,但是在采用流式细胞计数将它们纯化后,AFP 能够特别地诊断肝祖先细胞,这是由于 AFP 在肝祖先中的表达强度特别高。在经过任何类型的分级分离策略后,AFP 也被用来估计肝祖先的纯度。

#### [0104] III. 人肝脏祖先的处理

[0105] 本发明者建立了从胎儿或成年的肝脏获得解聚的人肝脏祖先的最佳方法。成熟的全肝脏细胞的分离,通常包括酶或机械解聚组织为单细胞悬浮液,随后是采用密度梯度离心、离心式淘洗、差异性酶消化法(即肝星形细胞)的分级分离,和 / 或采用细胞培养(见 Freshney 的综述,在“动物细胞培养的基本技术手册 (Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique”,1983,Alan R Liss, Inc. NY 中) 来选择。大多数研究者日常使用密度梯度离心,通过弃去所有的分级分离部分并只留下最终的沉淀,去除他们认为的碎片和死细胞。

[0106] 所有的其他研究者使用经密度梯度分级分离后的最终沉淀,而本文所公开的方法却是独特的,这是由于它使用了密度梯度靠上的分级分离部分而没有使用沉淀部分。对密度梯度离心的新变化,正如本文所公开,就在于沉淀被弃去而保留具有较低浮力密度的细胞,即,收集位于或接近梯度顶部的细胞。本发明者发现更年轻(二倍体)和更具活力的细胞在低温保藏时出现在 Percoll 密度梯度的顶部或其中,而不是位于沉淀部分中。

#### [0107] IV. 缩小体积

[0108] 缩小体积是富集肝脏祖先的一个过程。祖先可以是包括肝、造血和间充质的几个谱系中的任何。由于肝脏中有多种成熟细胞可以是四倍体或多倍体,所以去除一些或者全部成熟细胞,从而制备祖先的富集群是有益的。在 4°C 进行缩小体积步骤有利但不是必需的。

[0109] 在制备了全肝脏细胞的单细胞悬浮液后,根据细胞的大小、浮力密度或二者的组合将细胞分成多个分级分离部分。根据本发明,肝脏祖先细胞的直径小于 15 微米。将这样小的细胞从较大的细胞或者从细胞碎片中分离的任何方法都是合适的,其中包括培养液(其可以是基本培养液或滋养培养液)的沉降速度法、梯度沉降、采用大孔径珠的色谱分离及其它。梯度介质可以是聚乙烯吡咯烷酮包衣的硅胶 (Percoll)、交联的蔗糖 (Ficoll)、葡聚糖或本领域人员公知的任何物质,并将其在例如,磷酸缓冲盐溶液或者 Eagle 基本培养液 (BME),中配为等渗液以防止细胞裂解。一般将解聚的细胞悬浮液加在梯度介质层的上面,随后进行离心,同时保持温度在 4°C。或者,将细胞悬浮液加到单采血液成分装置,诸如用于分离血液组分,即血浆去除法。包括成熟的实质细胞和四倍体细胞的大细胞,要比小的祖先和二倍体细胞沉降得快,因而被去除。离心方法的设计要考虑到细胞对低氧压力的敏感性,并最大限度地减小富集细胞富所需的时间。通过这些方法,可将细胞悬浮液用于富集肝祖先。而且,缩小体积步骤可包括离心式淘洗、基于细胞表面粘附蛋白质的淘选、亲和

色谱或分批处理、荧光标记、区带离心、连续流式离心、与磁性珠温育后的磁性分选，例如，复合抗体的磁性珠，或者这些方法的组合。密度梯度离心可以是不连续的梯度或者连续的密度梯度。Percoll 分级分离适于立即使用、低温保藏、在培养液中建立、或者进一步富集。进一步富集可通过淘选、亲和选择、FACS 分选或者本领域公知的以及上述的任何技术来实现。负选择可通过对去除表达标志 CD45、血型糖蛋白 A 或正如下面提到的其它标志的细胞来完成。正选择可通过选择表达 CD14、CD34、CD38、ICAM 或者其它标志的细胞，而这些标志指示全长甲胎蛋白、清蛋白或二者表达。

[0110] 在进行缩小体积的另一个实施方案中，通过选择性裂解，将非祖先选择性地去除。通过将细胞悬浮液与等渗的氯化铵溶液短暂地接触，随后用培养液稀释和离心，去除红细胞“影”。并释放血红蛋白。类似地，通过使用下述的低温保藏混合物进行冰冻，非祖先被选择性和水解性地裂解。缩小体积的多种方法去除了多倍体细胞、表达与成熟肝脏细胞相关的标志的细胞、表达与成熟间充质细胞相关的标志的细胞以及这些细胞的多种组合。

[0111] V. 人肝脏祖先和它们的后代的低温保藏

[0112] 本发明的低温保藏方法与所使用的现有技术相比，具有独特和明显不同之处。主要的区别是使用了不同的缓冲液以及低温保藏低密度的肝祖先群，因而其在密度梯度离心中是悬浮的。肝祖先在大小方面小，并且是二倍体。

[0113] 非常希望将成熟的人肝细胞成功地低温保藏，但是在本领域中却从来没有实现过。一般将成功的低温保藏定义为：能够在液氮温度 (-160–180°C) 冷冻细胞，接着将其融化，可观察到存活率大于 75% 并具有贴附到培养皿上的能力。使用较老的方法，啮齿类或人源的成熟肝脏细胞，在上述条件下冷冻后，具有 30–40% 存活率、不具贴附能力（例如，见 Toledo-Pereya 等人，美国专利 4,242,883；Fahy 等人，美国专利 5,217,860；Mullon 等人，美国专利 5,795,711；以及 Fahy 等人，美国专利 5,472,876）。这些专利公开的细胞存活率非常低（小于 50%），主要是处理细胞培养液（不是在细胞悬浮液中的单个细胞）并且需要在冷冻前将细胞与缓冲液进行延长的接触。

[0114] 图 3 表示的是根据本发明的方法低温保藏的全肝脏细胞，其优秀的存活率。数据是以在处理时测量存活率与融化时测量的存活率进行对比的存活率的百分比变化表达的。这些数据显示低温保藏没有显著地影响这些细胞的存活率。在储藏期延长至超过 550 天时，存活率没有显著的变化。本发明的该特殊的低温保藏方法包括使用新缓冲液，新细胞群，以及任选地，将细胞以细胞外基质的形式包埋。该方法是第一次实现了融化时的存活率与冷冻前，即，在细胞分散后的即刻测量的存活率没有不同。由于组织来到时的状态以及使用酶和机械解聚法制备细胞悬浮液的影响，实际存活率有所变化；在本研究中，对胎儿肝细胞而言，平均为 77%。该低温保藏方法，冷冻过程没有导致存活率的显著丧失，所得细胞在融化后在离体条件下能够贴附和扩增。

[0115] VI. 人肝脏祖先的免疫选择

[0116] 本发明讲述一个从人肝脏分离祖先的方法，它包括：提供基本上是人肝脏组织的单细胞悬浮液，并对该悬浮液进行正或负的免疫选择。免疫选择的方法可包括从悬浮液中选择那些这样的细胞，它们本身、它们的后代或者其更成熟形式表达与至少一种细胞谱系相关的至少一种标志。这些细胞谱系可以是造血、间充质、肝的细胞谱系或者这些细胞谱系的一些组合。细胞选择步骤可包括去除表达血型糖蛋白 A、CD45、一种在成年全肝脏细胞特

异的标志、连结蛋白 32 或者这些的组合的细胞。而且，选择方法可包括去除多倍体细胞、表达与成熟肝脏细胞相关的标志的细胞、表达与成熟间充质细胞相关的标志的细胞或者其组合。细胞的选择可包括选择表达 CD14、CD34、CD38、ICAM 或者其组合的细胞。而且，该方法可鉴定和选择表达血型糖蛋白 A、CD45 或者这些的组合的成熟造血细胞。而且，该选择方法可选择表达类维生素 A、von Willebrand Factor、因子 VIII 或者其组合的成熟间充质细胞。

[0117] 该免疫选择方法可与基于细胞大小、浮力密度或者其组合的缩小体积连同进行。该选择方法可选择表达与至少一种可以是造血、肝或间充质细胞谱系的细胞谱系相关的至少一种标志的细胞。细胞、它们的后代或者其更成熟形式的选择可表达与至少一种肝脏细胞谱系相关的至少一种标志。该谱系可以是实质细胞或肝脏细胞，或者胆管细胞。因而，由这些细胞表达的标志可以是 CD14、CD34、CD38、CD117、ICAM 或者其多种组合。

[0118] VI. 细胞标志和流式细胞计数

[0119] 利用我们当前对肝脏祖先的定义，即，表达甲胎蛋白以及表达或者不表达清蛋白的未成熟细胞群，我们对通过使用免疫选择技术，特异地选择这些细胞的标志进行了评价。一个令人吃惊的发现是，为造血祖先的经典标志的许多标志（即，CD34），也可鉴定肝祖先亚群。因而，针对 CD34 的单色分选会导致表达 AFP 细胞的显著富集（至少 9 倍）。然而，并不是所有这些 AFP 阳性的细胞可被证实为肝祖先。根据清蛋白阳性的百分比，我们估计 80–90% 的这些细胞为肝祖先，而其余的细胞或者是远未成熟的肝祖先，因而还没有表达清蛋白，或者可能是表达甲胎蛋白的造血亚群。

[0120] 本发明使用了一种独特的流式细胞分选策略。通过使用 AFP 与清蛋白表达的组合作为限定肝脏祖先的两个独特特性，我们已经鉴定了限定肝祖先细胞的抗原标志和其它流式细胞计数参数。到目前为止，分选策略包括分选小于 15  $\mu$ ，使用前向散射测量的小细胞、二倍体细胞（使用来自 Hoechst 染料 33342 的荧光）、使用侧向散射的无粒细胞、对一定的造血细胞抗原（例如，血型糖蛋白 A、血红细胞抗原和 CD45）为阴性的细胞，接着为肝脏细胞亚群和造血细胞亚群间共享的阳性标志（即，CD14 和 / 或 CD38）的分选。

[0121] 在本文所描述的实验中，本发明者通过分选那些强烈地表达甲胎蛋白，微弱地表达清蛋白，以及表达 CD14、CD34、CD38、CD117，或者其组合的细胞，鉴定了肝脏祖先细胞。尽管是 AFP 的一个截短形式，本文也描述了造血细胞也表达 AFP 的证据。本发明者描述了一个新细胞群及其分离、鉴定、培养的过程和使用该细胞群的方法。在分离、鉴定和培养本发明的特定细胞群方面的成功，部分地是通过使用先进的分离方法、亲和缩小体积、高速荧光激活细胞分选、更高速度准确性、以及改进的低温保藏和培养技术而实现的。

[0122] 发明申请者证实了使用流式细胞分选策略和方法，从新鲜分离的细胞悬浮液和 / 或从融化的低温保藏全肝脏细胞纯化肝脏祖先。这些方法涉及：1) 用荧光探针标记的几种针对特异的细胞表面标志的抗体，染色细胞；和 2) 在多参数流式细胞计数技术中，使用阴性和阳性分选策略的组合。用于从人肝脏细胞群纯化特定谱系期的方法，可用在来自任何年龄供体的肝脏，这是由于这些标志似乎是谱系位置特异的。

[0123] 改进的标记细胞方法，并跟以前所使用的仪器 (Beckon Dickson's FACSTARPLUS，它可以 2000–6000 个细胞 / 秒的速度分选细胞，并可进行 2–4 个颜色分选) 相比，有显著改进的流式细胞计数仪（来自 Cytomation 的“一个 MoFlo”流式细胞计数仪，以 40000 个细胞 / 秒的速度分选细胞，并可进行 8 个颜色分选），帮助成功地分离和鉴定该新的细胞群。

[0124] 图 4 是一个单变量 FACS 分选。制备用于免疫荧光分析的细胞悬浮液：分析甲胎蛋白时使用结合红色染料 Cy5 的抗体，分析清蛋白时使用结合蓝色染料 (AMCA) 的抗体。经红色 (AFP) 和蓝色 (清蛋白) 荧光筛选的细胞数是三万个。结果显示一个清晰的细胞组，其每种蛋白质都是阳性的。进一步的分析显示每种蛋白质阳性群中的大约 80% 代表相同的细胞 (即，共表达两种蛋白质)。在细胞悬浮液中，AFP 和清蛋白样免疫反应性的表达被充分地限定，有一个清晰的细胞组显示了一个与背景信号相比的清晰区别。在未分级分离的细胞悬浮液中，有  $6.9 \pm 0.86\%$  的细胞表达甲胎蛋白，而清蛋白则存在于  $7.7 \pm 1.1\%$  的细胞。在 AFP 阳性的细胞中  $75.6 \pm 4.9\%$  的细胞共表达清蛋白，而  $80 \pm 5.5\%$  的清蛋白阳性细胞也表达 AFP。因而，大约 25% 表达甲胎蛋白的细胞不表达清蛋白，并且 20% 表达清蛋白的细胞不表达甲胎蛋白。

[0125] 对于完整的细胞悬浮液 (即，包括红细胞)，携带用于本研究中的主要表面标志的细胞的比例，见表 2 (GA = 血型糖蛋白 A，为一种血红细胞上的表面标志)。

[0126] 表 2：在最初的全肝脏细胞悬浮液中 CD 阳性的细胞百分比以及它们当中又为 AFP 阳性的百分比

	CD14	CD34	CD38	CD45	GA
<b>未分级分离</b>					
[0127]	<b>在群中的 %</b>	<b><math>3.7 \pm 0.8 (8)</math></b>	<b><math>2.8 \pm 0.5</math></b>	<b><math>2.2 \pm 0.4</math></b>	<b><math>2.6 \pm 0.5</math></b>
	<b>AFP 阳性 %</b>	<b><math>81.7 \pm 2.2</math></b>	<b><math>72.6 \pm 4.2</math></b>	<b><math>57.6 \pm 4.6</math></b>	<b><math>22.2 \pm 4.4</math></b>
					<b><math>2.3 \pm 0.6</math></b>

[0128] 图 5 是在未分级分离的全肝脏细胞悬浮液中，表达表面标志 CD14、CD34、CD38、CD45 和血型糖蛋白 A (GA) 的细胞百分比。注意，为了保持刻度，GA 数据以右轴标绘。图 6 是在最初的细胞悬浮液中表达甲胎蛋白以及其它抗原性标志的细胞百分比。平均值  $\pm$  SEM 指甲胎蛋白 (AFP) 以及特异的细胞表面标志 (CD14、34、38、45 和血型糖蛋白 A) 阳性的细胞百分比。显然，血型糖蛋白 A (GA) 阳性细胞 (即，红系细胞) 代表细胞量的主要成分，但在 AFP 阳性细胞中却是无足轻重的部分。

[0129] 图 7 (上部) 是甲胎蛋白和清蛋白的共表达。在有或没有使用 Percoll 分级分离的，目的是选择性清除红细胞的胎儿全肝脏细胞悬浮液中，甲胎蛋白 (左边) 和清蛋白 (右边) 的表达。共表达清蛋白的 AFP 阳性细胞百分比也提高到  $80.5 \pm 8.2\%$ ，并且共表达 AFP 的清蛋白阳性细胞比例提高到  $89 \pm 3.1\%$ ，尽管哪一个变化在统计学上都不够显著。

[0130] 图 7 (下部) 是 Percoll 分级分离缩小体积对甲胎蛋白和清蛋白共表达的影响。既表达甲胎蛋白又表达清蛋白的细胞比例，以 AFP 或清蛋白阳性细胞百分比来表示。使用 Percoll 分级分离，红细胞清除和红细胞不清除的细胞数据均绘出。因而，当通过 Percoll 分级分离清除细胞悬浮液中的红细胞时，表达 AFP 的细胞比例显著地提高到  $12.9 \pm 1.9\%$ ，并且表达清蛋白的细胞比例显著地提高到  $12.1 \pm 2.3\%$ 。

[0131] 本方法关于携带表面标志的细胞比例之结果见表 3，并一同给出 AFP 染色阳性的每个亚组的比例。

[0132] 表 3：在清除红细胞后的全肝脏细胞悬浮液中 CD 阳性群的百分比以及它们当中又为 AFP 阳性的百分比

	CD14	CD34	CD38	CD45	GA
--	------	------	------	------	----

### 红细胞被清除

[0134]	在群中的%	7.4±1.3	3.4±0.5	4.8±0.9	8.2±0.3	27.5±4.7
	AFP 阳性%	89.8±1.3	77.1±2.9	53.5±7.2	32.5±1.3	1.8±0.9

[0135] 图 8 是胎儿全肝脏细胞悬浮液的针对共表达 CD14、CD38 和 AFP 的 FACS 分析。双变量散射图谱显示 CD14(纵坐标)三色染色对 CD38(横坐标) FITC 染色的分布。设置了阈值,以 CD14 和 CD38 信号选择特定的细胞分组。接着,将其用于显示每一个这些亚组中 AFP 染色的强度。该 AFP 结果显示,通过选择 CD38 阳性或 CD14 阳性细胞,获得对 AFP 的高水平富集。从完整的细胞悬浮液(30000 个细胞)所产生的 AFP 信号,显示在左下。在大多数情况下,AFP 在通过细胞表面标志所选择出的亚组中是以连续分布存在的,并且在阳性范围内染色显示强的细胞,具有明显的优势。然而,共表达 AFP 的 CD38 阳性细胞,其分布独特。在 CD38 阳性细胞中,对 AFP 共表达的双模式分布是显而易见的,其中的两个明显不同的细胞组是显而易见的,一组对 AFP 阳性,另一组对 AFP 阴性。

[0136] 这些结果显示在胎儿肝脏组织的单细胞悬浮液(即,最初的细胞悬浮液)中,甲胎蛋白(AFP)存在于 7% 的细胞。发现针对血型糖蛋白 A(血红细胞,即红细胞上的一种抗原)的抗体可鉴定不表达 AFP 的细胞亚群。因而,从打算表征肝祖先的细胞中,将表达该抗原的细胞(即,红细胞)排除在外。CD38 抗原鉴定出的细胞群,显著地提高了 AFP 阳性细胞的比例(即,相对于未分级分离样品中的比例,大于超过 7 倍)。根据是否有分子片段(由拼接变体所编码)存在,这两个抗原均显示多种异体形式。已经有鉴定多种异体形式的抗体可供使用。

[0137] 发现造血祖先细胞的典型标志 CD34,也存在于表达 AFP 的许多细胞上。CD34 阳性细胞的分选导致 AFP 阳性细胞的富集,至少超过在最初的细胞悬浮液中所存在的 9 倍(在 CD34 阳性细胞中 67%:在最初的细胞悬浮液中 7%)。然而,富集 AFP 阳性细胞的最有效的单种抗体是 CD14,它可将这些细胞的比例,与最初的群相比,提高超过 11 倍(81% : 7%)。

[0138] 看起来,通过使用表面标志的组合,就能够将 AFP 阳性细胞的产率提高。因而,对 AFP 与所选表面标志组合共表达的程度进行了确定,以建立细胞内标志的选择可被提高的程度。数据表示为:表达表面标志的 AFP 阳性细胞的比例(称作 AFP 阳性细胞的“产率”),以及在被表面标志限定的群中出现的所有 AFP 阳性细胞的比例(称作对 AFP 阳性细胞的“富集”因子)。CD14、CD34 和 CD38 的组合的结果,见表 4,并一同给出来自单个标志的结果,以便比较。

[0139] 表 4

		CD14	CD34	CD38	CD14+CD38	CD14+CD38
[0140]	富集	80.6±2.6	66.7±4.7	53.8±4.5	66.9±3.5	68.2±3.9
	产率	39.8±2.6	26.9±4.4	22.0±2.7	50.6±2.7	52.2±5.5

[0141] 富集:表达任一(或全部两个)表面标志、同时也是 AFP 阳性的细胞百分比

[0142] 产率:也表达一种或全部两种表面标志组合的所有 AFP 阳性细胞的百分比

[0143] 图 9 表示选择 CD14 和 CD38 是如何富集 AFP 阳性细胞的。通过选择对标志 CD38 和 CD14 的表面标记反应阳性的细胞,将从胎儿肝脏制备的细胞悬浮液中 AFP 阳性细胞的比

例大幅度地提高。这两个标志的组合所产生的对含 AFP 细胞的富集，明显优于单独采用其中一种标志时所产生的对含 AFP 细胞的富集。

[0144] 图 10 是人肝祖先细胞的荧光显微镜图。将来自胎儿肝脏的典型肝祖先细胞染色以测定 AFP 的含量。细胞的大小表明早期祖先和更晚期的肝祖先均存在。对 AFP 染色阳性的细胞，其形态是可变的，并且涵盖了来自胎儿肝脏（而不是成年肝脏）细胞悬浮液中细胞大小和形态的所有范围。最大的 AFP 阳性细胞，大约  $12\text{--}15 \mu$ ，也比成熟肝脏细胞（大小范围在  $20\text{--}50 \mu$ ）小许多。

[0145] 图 11 是通过 AFP 的表达选择出的典型细胞。对 CD14 染色阳性的细胞（右边）是肝胚细胞所特有的性质。对表明标志染色阴性的细胞较小，在大小和形态上与早期肝祖先相一致。在所有情况下，一定比例的 AFP 阳性细胞没有显示用于本研究的任何表面抗体的表达。这些 AFP 阳性“无效”细胞的形状，见图 11，在该图中，可将它们与从相同悬浮液分选的 CD14 阳性 / AFP 阳性的细胞形状进行比较。很清楚，虽然所有两种细胞类型都是 AFP 阳性，表面抗原染色阴性的细胞一致地比 CD14 阳性细胞小和更不复杂。

[0146] 因而，很可能用于分选肝祖先的标志为：血型糖蛋白 A<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、ICAM<sup>+</sup>，以及一种或多种 CD14<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>、CD38<sup>+</sup>、CD117<sup>+</sup>、二倍体、无粒细胞（通过侧向散射）、小于  $15 \mu$ （通过前向散射）。所分选的这些细胞的表型为小细胞（小于  $15 \mu$ ）、几乎没有细胞质（高细胞核 / 细胞质比）、清蛋白<sup>+</sup> 和 / 或 AFP<sup>+++</sup>。

[0147] VII. 通过共聚焦显微镜表征在胎儿和成人肝脏中的表达甲胎蛋白的细胞

[0148] 共聚焦显微镜用于获得来自人胎儿及成年、表达甲胎蛋白的细胞的图像。该方法使得人们能够观察这些细胞的形态和大小并直接显示细胞内蛋白质，诸如 AFP 和 ALB 的位置以及膜表面标志诸如 CD34 和 CD38 的位置。

[0149] 图 12 是表达甲胎蛋白细胞，也就是成人肝脏中的肝祖先的共聚焦显微镜图。该图显示一个视野的三个画面，并且，在该视野中有两个 AFP 阳性细胞。C 画面就是 A 画面和 B 画面的叠加，并表明在全肝脏细胞组中的 AFP 阳性细胞的形态（细胞原始染色为粉红）。

[0150] 图 13 表示的是用 calcein(A) 标记的细胞，以显示所有的细胞类型。图 13(B) 包含共表达 AFP 的相同细胞并且显示只有两个细胞为 AFP 阳性。细胞大小不是 AFP 阳性或阴性的因子。

[0151] AFP 表达细胞在胎儿和成年的肝脏中均可见到。胎儿肝脏，如所期望，具有最高百分比（6-7%），而成年肝脏具有小百分比（小于 1%），并且随着供体年龄的增加数量下降。通过 Percoll 分级分离方法，可显著地富集存在于成年肝脏中的少数几个肝祖先，获得高达 2% 的来自成人肝脏的 Percoll 分级分离部分 1 和分级分离部分 2 中的细胞（表 5）。供体年龄超过 71 岁，其肝脏中没有发现任何 AFP 表达细胞。

[0152] 表 5 是来自成年全肝脏细胞的 Percoll 分级分离部分中的细胞大小和存活率。在相同的低温保藏条件下经低温保藏后，较小细胞（分级分离部分 1-3）比较大细胞（分级分离部分 4）具有较高的存活率。

[0153] Percoll

分级分离部分	存活率 (%)	细胞大小 ( $\mu\text{m}$ )	% AFP <sup>+</sup> 细胞
分级分离部分 1	82	>12	0.5-1%
[0154] 分级分离部分 2	84	10-15	2%
分级分离部分 3	85	15-25	< 0.2%
分级分离部分 4	56	25-50	< 0.01%

[0155] 这些结果提示,用于全肝脏细胞治疗以及用于器官移植的供体器官将由来自年轻供体(上至大约 45 岁)的那些器官组成。而且,来自老年患者(大于 65 岁)的肝脏将不适合合作细胞治疗的供体并且也不适合用作完整器官移植(特别是对儿童而言),这是由于它们几乎没有来自肝祖先的再生能力,并且已知成熟细胞仅仅具有中等或最小的再生能力。

#### [0156] VIII. 正在成熟谱系

[0157] 因而,成年肝脏含有在正常和疾病状态下都能够生长和分化为肝脏细胞和胆管细胞的肝祖先细胞群。本发明代表这样的主张,即肝脏谱系中的每一个部位都是独特的正在成熟阶段,并且在肝脏中存在众多的干细胞群。

[0158] 令人意外的是,本发明的胚胎肝脏产生这样的祖先细胞,它可发育为三个分开的正在成熟谱系:肝脏发生,其中细胞的命运为肝脏细胞和胆管细胞(胆管);造血,其中细胞的命运为淋巴细胞(B 和 T)、血小板、巨噬细胞、中性白细胞和粒细胞;以及间充质生成,其中细胞的命运为内皮、脂肪细胞、基质细胞、软骨和甚至骨骼(最后两种仅在疾病状态下在肝脏中发生)。

[0159] 通常,干细胞为能够产生多于一种命运子代的未成熟细胞。干细胞产生的子代细胞,其中的一些与亲代完全相同,而另一些“定向”于特定的命运。在分子水平上对定向的过程不了解。但仅经验性地认识到,当细胞的命运比其前辈缩窄时,就发生了定向的过程。“定向祖先”被定义为具有单种命运的未成熟细胞,诸如肝脏细胞定向祖先(生成肝脏细胞)或胆管定向祖先(生成胆管)。

[0160] 从干细胞到成年细胞的转换发生是一个产生正在成熟谱系的逐步过程,其中细胞的大小、形态、生长潜力和基因表达被紧紧地限制在该谱系内。在解释这个过程时,使用老化来比喻很形象。“年轻”细胞表达早期基因并具有最大生长潜力;谱系中的后期细胞表达“后期”基因,并且它们在生长方面通常受到限制或者根本不生长。可以认为后期细胞是“老化的”,或者用生物学术语来讲,“凋亡的”,并最终被丢弃。谱系的成熟过程导致组织的自然更新并允许损害后再生。不同的组织,其成熟过程的动力学有区别。肠的正在成熟谱系相当快,进行一个完整循环少于一周;而肝脏的正在成熟谱系慢,对于大鼠肝脏,需要大约一年。

[0161] 在胚胎期,大鼠的肝脏形成于大约第 10 天,表示为“胚胎第 10 天”或“E10”,其中心间充质内陷位于胚胎中肠区的内胚层(Zaret, K. 1998. Current Opinion in Genetics&Development. 8 :526-31)。通过使用原位杂交研究编码甲胎蛋白的 mRNA,达到最早识别胚胎中的全肝脏细胞(Zaret, K. 1998. Current Opinion in Genetics&Development. 8 :526-31 ;Zaret, K. 1999 发育生物学 (Developmental Biology) (Orlando). 209 :1-10)。在胚胎的中肠区观察到 AFP 表达细胞,在所有测定过的大鼠和小鼠的肝脏中均靠近生成心脏(在第 9-10 天)的间充质。在 E12 肝脏变得肉眼可见,并且在 E13 直径为大约 1mm。

[0162] 类似地,在造血发生中,第一个可识别的造血细胞出现于 E15-E16(在啮齿类中)以及第 3-4 个月(在人类中),并且红细胞生成的顶峰出现于 E18(在啮齿类中)以及第 5-6 个月(在人类中)。在红细胞生成的顶峰期,这些红细胞的数量在肝脏中占绝对优势,为全肝脏细胞数量的大约 70% 之多。在啮齿类中妊娠期结束于第 21 天,在人类中妊娠期结束于第 9 个月。出生后几个小时内,造血细胞的数量显著地下降,以至于在出生后的第 2 天(在啮齿类中)以及出生后的第 1-2 周内(在人类中),大多数造血细胞消失了,已迁移到骨髓。没有人知道造血细胞迁移的原因。但有两个占统治地位的推测。

[0163] 第一,造血祖先喜欢相对无氧的环境,随着肺的激活,肝脏中氧的水平提高,它们逃到骨髓(这里相对无氧);以及第二,孕激素的消失是迁移的原因。出生后,肝脏中造血祖先的消失,跟肝祖先数量的显著减少以及肝脏细胞和胆管细胞在数量与成熟性上的平行增加相关。肝脏的完全成熟是在出生后的 2-3 周(在啮齿类中)以及几个月内(在人类中)完成的。那时,仍然存在的肝祖先被定位于每个肝脏腺泡周围的肝三联区。

[0164] 此后,建立了肝脏腺泡的经典结构:每一个腺泡被六套肝三联包围,每个肝三联有一个胆管、一个肝动脉和一个肝静脉,并且在肝三联的中心有一个连接到大静脉的中央静脉。肝板细胞,象轮中的辐条,从周围延伸到中心。习惯将肝板划分为三个区带:区带 1 靠近肝三联;区带 2 在腺泡中间;和区带 3 靠近中央静脉。在肝脏中,仅有的二倍体细胞在区带 1 中;四倍体细胞在区带 2 中;以及四倍体细胞、八倍体细胞和多核细胞在区带 3 中。这种排列方式强烈暗示一个处于细胞凋亡过程中的正在成熟谱系(Sigal, S. H., S. 等人, 1995, 分化(Differentiation), 59 :35-42)。

[0165] IX. 在肝脏生物学的临床前和临床研究中谱系的含意

[0166] 本发明的细胞群在体外和活体内的生长及分化特性,与肝脏中的谱系-位置谱系模型的概念和含意相一致。例如,在体外实质培养中,实质细胞的分裂能力以及细胞的分裂数目都被预言为严格的谱系位置依赖。因而,门周的实质细胞应该比中央周围的实质细胞具有更大的分裂潜能。这就解释了为什么作为体内最著名的再生器官的肝脏的原代培养,在培养液中表现出有限的细胞分裂。

[0167] 预期干细胞以及其相应的被转化细胞,肝脏细胞瘤表达早期基因,诸如甲胎蛋白和胰岛素样生长因子 II,但是不表达谱系中后来表达的基因。在成熟性-谱系模型中,肝脏细胞瘤不应该表达任何晚期基因,因为完整地穿过谱系的过程需要分化、生长和细胞周期的无干扰调节。在本发明的细胞群中确实已经观察到这一点。比较胚胎与成年组织中肝脏特异基因表达的分子生物学研究确定了几类基因:那些诊断区室(干细胞、扩增、分化)的基因;那些区带性地表达并潜在性地跨过区室边界的基因;以及那些在谱系中为谱系中不连续的一个或少数几个细胞的早期、中期或晚期表达的基因。

[0168] 通过研究本发明的细胞群,可以了解原发性肝脏肿瘤的多种形态样式和基因表达谱。如果肿瘤代表的是具有多种不同分化能力的转化干细胞的增殖,那么甲胎蛋白在肝脏肿瘤中的共同表达并不是一个诱导的肿瘤标志,而是一个被扩增的,正常情况下表达甲胎蛋白的未成熟细胞群的一个指示物。

[0169] 本发明所分离的细胞群,对肝脏导向的细胞和/或基因治疗的成功具有巨大的影响。本发明,正如在实施例中所描述,已鉴别出成功低温保藏非人灵长类和人类的肝祖先的关键条件。

[0170] 本发明的细胞群由于能够在体外明显地扩增与造血谱系中的细胞类似的,可用作“活组织的穿孔检查材料”,提供用于离体扩增的细胞种子。这将免除主要的侵入性手术切除患者肝脏的必要性。

[0171] 一旦在培养液中建立了人肝祖先,就可实施基因转移。这可通过使用多种不同的基因传递载体系统来完成。此时,一个重要的考虑是成功的基因转移需要快速生长的培养物;由于本发明的人肝祖先在正常生理条件下可显著地分裂,,所以这些细胞是将基因转移到肝脏的理想候选物。另外,本发明的细胞群的生长特性,允许通过使用一定的基因传递载体系统(即,逆病毒载体类)将该细胞群用于离体基因转移;所使用的基因传递载体系统还需要细胞扩增,以使基因有效地插入和表达。

[0172] 基因治疗的另一个方法是设计专一性地靶向祖先的载体,接着将偶联有目的基因的载体直接注射到患者体内。在载体将靶向并修饰内源的祖先细胞群。

[0173] 可将本发明的祖先细胞群用于自体或同种异体的肝脏导向的细胞或基因治疗。显然,使用自体的肝祖先将不用担心移植细胞被排斥。对于同种异体细胞移植,本发明的细胞群有特别的吸引力,因为其抗原谱提示它们产生最小的免疫排斥现象。而且,通过纯化过程将已知具有高度免疫原性的其它细胞成分,诸如血液细胞、内皮细胞、枯否细胞,基本清除。

[0174] 一旦将自体或同种异体的肝祖先分离、纯化和培养,就可以对其进行遗传修饰或者保持其完整、体外扩增以及移植回宿主内。如果希望进行遗传修饰,那么在遗传修饰后和移植前,可以根据显性的选择标志的掺入和表达对那些修饰过的细胞进行扩增和/或选择。可以移植回肝区室内,或者在异位部位移植。对于移植到肝区室内,可采用门静脉注入或脾内注射。所选择的施用途径可以是脾内注射,因为通过脾内注射而移植的肝祖先可移动到肝区室内。在有效地植入移植的肝祖先方面,另外的医学手段可能会有协作作用。动物模型已经证实,在部分肝切除中,施用血管发生因子或其它生长因子,有助于移植肝脏细胞的植入和存活。另一个方法是将经遗传修饰的肝脏细胞移植到异位部位。

[0175] 到目前为止,有关肝脏方面的细胞治疗方法几乎不显有效性。这也许是由于事实,即所使用的供体细胞绝大部分为成年全肝脏细胞,并且经分离和再注射后,很快就死亡了。由于本发明所提供的肝祖先细胞诱发免疫排斥现象的能力有限以及由于其更广泛的再生能力,所以将更有效。

[0176] 至于在基因治疗方面,当前所进行的努力使用了“靶向可注射载体”,是正在开发的最常见临床治疗途径。由于免疫问题和载体的瞬时表达,这些方法的有效性都有限。关于基因治疗,值得赞誉的已证实的基因治疗途径只有离体基因治疗,并且几乎仅限于在造血祖先细胞中进行过。我们预测,采用祖先细胞的离体基因治疗(或者使用以某种方式靶向那些祖先细胞群的可注射载体),将被证明更有效。这是由于可将载体离体引入纯化的祖先细胞亚群;选择所修饰的细胞并将其再引入活体内。祖先细胞的优越性在于它们巨大的增殖潜力、它们所诱导的免疫反应最小(如果有的话)以及它们能够分化产生整个谱系的细胞。

#### [0177] X. 共同或相互依赖的谱系

[0178] 使用改进的方法,使本发明者能够更仔细地研究和表征肝祖先。通过这些研究发现,肝祖先和造血祖先之间有特别紧密的关系,提示这两个谱系紧密相关。确实,这些研究显示,肝和造血谱系的祖先细胞共享许多抗原标志(CD14、CD34、CD38、CD117,或卵形细胞

抗原 ckit)，共享生化特性（即，转铁蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶和甲胎蛋白的一个截短形式），以及离体培养时在培养要求方面具有广泛的共同性（细胞外基质形式和特定的激素要求）。这两个谱系的祖先细胞都定位于肝脏腺泡中的相同部位。最后，旁分泌信号存在于这两个正在成熟谱系的所有细胞，也就是每一个谱系所产生的信号均调节另外谱系的细胞。确实，也许可以有这样的结论，即在肝谱系和造血谱系之间存在一个共同谱系，或者至少是相互依赖的谱系。

[0179] 纯化本文所公开的细胞群，并根据所使用的分离和培养细胞的条件，将其用于产生骨髓-造血细胞或者肝衍生物。采用既限定肝祖先又限定造血祖先的一组抗原（例如，CD38<sup>+</sup>、ckit<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>）对细胞群进行分选，然后将分选细胞接种到生物反应器系统，就可产生具有多种命运的细胞群。细胞的命运依赖于细胞是如何被离体引入的或者细胞被置于什么样的培养条件下。

[0180] 本发明的细胞群的另一个重要方面是，它们显示特定的造血干细胞表面抗原 CD34。CD34 阳性骨髓细胞一直被用作方便的造血干细胞正选择标志。然而，越来越多的报告对 CD34 抗原标志的造血干细胞特异性产生怀疑 (Nakauchi H. 自然医学 Nature Medicine 4 :1009-1010 (1998))。实验证据证实：在人骨髓 CD34 阴性细胞群中以及在脐带血中，存在能够重新定居于免疫缺陷小鼠骨髓中的细胞。

[0181] 正如本文所公开，本发明公开了纯化造血和肝的祖先细胞群的方式，利用肝脏细胞与造血细胞间的密切关系，该祖先细胞群被随后用于临床和临床前研究项目。

[0182] 人肝祖先的用途多而广泛。它们包括：1) 研究人细胞；2) 产生疫苗或抗病毒物质；3) 毒理学研究；4) 药物开发；5) 制造蛋白质（利用该细胞作为生产多种人特异的因子）；6) 肝细胞治疗；7) 肝脏基因治疗；8) 可用于研究、毒理学和抗微生物研究、蛋白质制造或者在临幊上作为肝脏辅助系统的人工生物肝脏。考虑到在造血和肝脏发生之间可能存在一个共同的谱系，正如本发明者所提出，可将相同的细胞当作肝或者造血命运使用，具体将取决于它们被置于的微环境。

[0183] 高度纯化的人肝祖先细胞的获得，将能够对人细胞进行更加广泛的研究，将促进全肝脏细胞和基因治疗的成功开发，并能够开发既可用于研究又可用作临幊辅助装置的人工生物肝脏。目前，健康人组织的有限供给，妨碍了在肝细胞治疗方面或者在人的人工生物肝脏方面的临幊项目。该祖先细胞群将具有足够的扩增潜能，可克服或至少极大地缓解健康人组织的有限供应。

## 实施例

[0184] 以下实施例是阐明性的，并不旨在限制。

[0185] 实施例 1 相对于其它细胞类型而言，在肝脏细胞中表达的多种形式 AFP 和清蛋白的分析

[0186] **细胞系：**将两种人肝脏肿瘤细胞系，Hep3B 和 HepG2，保持在补充有 1mM 丙酮酸钠、2mM L-谷氨酰胺、50U/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素、0.1mM MEM 非必需氨基酸溶液、5 μg/ml 胰岛素以及 10% FBS 的 Egale's MEM 中。将人的红白血病细胞系 K562 和小鼠的胚胎成纤维细胞系 STO 保持在补充有 2mM L-谷氨酰胺、50U/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素、5 × 10<sup>-5</sup>M 2-ME 以及 10% FBS 的 DMEM/F2 中。

[0187] **RT-PCR:** 使用 Chomcznski 和 Sacchi N. 在 : 分析生物化学 (Anal. Biochem) 162 : 156-159 (1987) 中的方法, 从 Hep3B、HepG2 和 STO 中提取总 RNA。cDNA 通过 oligo-dT 引发、随后使用本发明者设计的若干套引物进行 PCR 扩增合成, 并制备人 AFP 或清蛋白的 cDNA。引物序列如下 :

[0188] 对于 AFP :

- [0189] SEQ ID 1 hAFP1 : 5' -ACCATGAAGTGGGTGGAATC-3',
- [0190] SEQ ID 2 hAFP2 : 5' -CCTGAAGACTGTTCATCTCC-3',
- [0191] SEQ ID 3 hAFP3 : 5' -TAAACCCTGGTGTTGCCAG-3',
- [0192] SEQ ID 4 hAFP4 : 5' -ATTAAACTCCCAAAGCAGCAC-3',
- [0193] SEQ ID 5 hAFPExon2 : 5' -CTTCCATATTGGATTCTTACCAATG-3'.
- [0194] SEQ ID 6 hAFPExon3 : 5' -GGCTACCATATTTTGCCCAG',
- [0195] SEQ ID 7 hAFPExon4 : 5' -CTACCTGCCTTCTGGAAGAAC-3',
- [0196] SEQ ID 8 hAFPExon5 : 5' -GAGATAGCAAGAAGGCATCCC-3', and
- [0197] SEQ ID 9 hAFPExon6 : 5' -AAAGAATTAAGAGAAAGCAGCTTG-3',

[0198] 对于清蛋白 :

- [0199] SEQ ID 10 hALB1 : 5' -GGCACAAATGAAGTGGTAACC-3',
- [0200] SEQ ID 11 hALB2 : 5' -CCATAGGTTCACGAAGAGTTG-3',
- [0201] SEQ ID 12 hALB3 : 5' -GCCAGTAAGTGACAGAGTCAC-3',
- [0202] SEQ ID 13 hALB4 : 5' -TTATAAGCCTAAGGCAGCTTGAC-3',

[0203] 这些引物的组合如下 :

[0204] 对于 AFP :

- [0205] hAFP1 and hAFP2,
- [0206] hAFP3 and hAFP4,
- [0207] hAFP1 and hAFP4,
- [0208] hAFPExon2 and hAFP4,
- [0209] hAFPExon3 and hAFP4,
- [0210] hAFPExon4 and hAFP4,
- [0211] hAFPExon5 and hAFP4, and
- [0212] hAFPExon6 and hAFP4.

[0213] 对于清蛋白 :

- [0214] hALB1 and hALB2,
- [0215] hALB3 and hALB4,
- [0216] hALB1 and hALB4,

[0217] PCR 反应的总体积为 50 μl, 其中含有 : 每种引物 1 μM、每种 dNTP 200 μM、50mM KC1、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、10mM Tris-HCl (pH8.3) 和 1.25U AmpliTaq 聚合酶 (Cetus Corp)。将样品加热到 94°C 3 分钟, 随后扩增 30 个循环 : 94°C 2 分钟、62°C 2 分钟和 72°C 3 分钟。完成最后一个循环后, 进行一个最终延伸步骤 : 72°C 7 分钟。接着, 从每个 PCR 反应中取 5 μl, 在含有 5 μg/ml 溴化乙锭, 于 Tris-醋酸-EDTA 缓冲液的 2% 琼脂糖凝胶上跑电泳。

[0218] **AFP 的 RT-PCR:** 人的 AFP 基因含有 15 个外显子 (Gibbs 等人, 生物化学

(Biochemistry), 26 :1332-1343)。为了将截短形式的转录本与有功能的完整 AFP mRNA 区别开,选择 AFP cDNA 序列的两个不同部分作为 RT-PCR 的靶分子。引物 hAFP1 和 hAFP2 的组合用于扩增含有起始 MET 的外显子 1 到外显子 3,而引物 hAFP3 和 hAFP4 的组合扩增外显子 12 到含有终止密码的外显子 14。PCR 结果见图 1。所有两个引物组合从 Hep3B 和 HepG2 的 RNA 中都产生了可强烈检测到的扩增带 (道 1、2、4 和 5)。相比之下,在 K562 的 RNA 中仅检测到 C- 末端部分的特异带 (道 7 和 8),所使用的引物套是 hAFP3 和 hAFP4。该结果提示红白血病细胞系 K562 仅表达没有 N- 末端的截短形式的 AFP。为了支持该假设,使用 hAFP1 和 hAFP4 引物,PCR 扩增 AFP 的整个编码区。如所预料,PCR 扩增 Hep3B 和 HepG2 的 cDNA 时,出现了显著的 1.8kb 单一带 (泳道 3 和 6),而在 K562 中没有任何带出现 (泳道 9)。对照为无 RNA 样品和一个源自小鼠胚胎成纤维细胞系 (STO) 的样品。它们都没有出现任何可检测到的带。

[0219] 下一步,构建了从外显子 2 到外显子 6 的一系列 5' 引物,以发现真正的 AFPmRNA 与其变异形式间的差异。图 1 中的结果表明 :K562 (泳道 1,3,5,7,9 和 11) 中的 hAFP 变异形式共享除外显子 1 之外的所有编码区。

[0220] **清蛋白的 RT-PCR:**人的清蛋白基因也含有 15 个外显子 (Minghetti 等人,生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 261 :6747-6757)。对于 AFP,引物 hALB1 和 hALB2 的组合用于扩增外显子 1(含有起始 MET) 到外显子 4,而引物 hALB3 和 hALB4 的组合扩增外显子 12 到含有终止密码的外显子 14。PCR 结果见图 17。所有两个引物组合从 Hep3B 和 HepG2 的 RNA 中都产生了可强烈检测到的扩增带 (泳道 1、2、4 和 5)。相比之下,在 K562 的 RNA 中仅检测到 C- 末端部分的特异带 (泳道 7 和 8),所使用的引物套是 hALB3 和 hALB4。使用 hALB1 和 hALB4 引物、扩增 ALB 完整编码区的 PCR,在 K562 中没有任何带出现 (泳道 9)。对照为无 RNA 样品和一个源自小鼠胚胎成纤维细胞系 (STO) 的样品。它们都没有出现任何可检测到的带。

[0221] 试剂供应商包括 :

[0222] Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo)

[0223] Gibco BRL Products (Gaithersburg, MD)

[0224] Worthington Biochemical Corporation (Frehold, New Jersey)

[0225] Dupont Pharmaceuticals (Wilmington, Delaware)

[0226] Falcon-a subsidiary of Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, New Jersey)

[0227] 组织供应商包括 :

[0228] Anatomical Gift Foundation (Atlanta, Georgia)

[0229] Advanced Biosciences Research, ABR (San Francisco, Cal)

[0230] Local transplant surgeons at UNC Hospital

[0231] 实施例 2 人肝脏的处理

[0232] **胎儿肝脏:**胎儿肝脏来自附属于 Advanced Biosciences Research (ABR) 的多个诊所 (它们均位于加利福尼压 California),或者来自 Anatomical Gift Foundation (AGF),其诊所位于南部 (即,弗吉尼亚、乔治亚 (Georgia、Virginia))、东北部 (宾夕法尼亚 Pennsylvania) 或中西部 (科罗拉多、堪萨斯 Kansas、Colorado)。胎儿是从诊所收集到的;

组织免费地剖自胎儿并将其置于补充有胰岛素 (Sigma, 5  $\mu$  g/ml)、转铁蛋白 (Sigma, 5  $\mu$  g/ml)、硒 ( $10^{-9}$ M) 以及 5% 胎牛血清 (Gibco) 的 RPMI 1640 (Gibco) 中。接着将样品置于冰上并通过信使运送到我们的实验室,这个过程需要 10-16 个小时。这样,我们就在手术后大约 24 小时收到样品。按照收到的年月顺序,给样品编号 (带上前缀 REN),如 REN1、2、3 等,其中的 REN 是 Renaissance(含义为“复兴”)的缩写。

[0233] 成年肝脏:成年肝脏来自 Anatomical Gift Foundation 或者来自 local surgeons (UNC),其中包括被排斥肝脏、取自移植接受者的外植体或者作为器官移植供体但是由于非病理因素而被排斥的肝脏。对提供外植体组织或者被排斥供体组织的患者进行一系列疾病的筛查,只有那些通过这些检测发现是安全的组织才能被用于细胞处理。在将患者的肝脏摘除后,置于威斯康星大学 (University of Wisconsin) 溶液 (也称作 Viaspan) 中,并在冰藏条件下运送到实验室。从脑死亡患者摘除器官 (“clamp time”,即将肝脏从供体摘除的时间) 至其到达实验室,这段时间间隔的长短变化极大。标本在“clamp time”后小于 24 小时以内到达。

[0234] 尸体肝脏:死后得到的尸体肝脏,是在死亡至少 30 小时以内,通过当地的器官采办协会 (例如,Carolina Organ Procurement Association 或称为 COPA) 获得的。对尸体肝脏的处理与成年肝脏相同。

[0235] 为了调查研究者的安全,要检查的项目名单为 :HIV I 和 II, HTLV I 和 II, 乙型和丙型肝炎;结核。为了临床用途,要检查的名单为 :HIV I 和 II, HTLV I 和 II;甲型、乙型、丙型和庚型肝炎;EBV、CMV;结核,梅毒和支原体。

[0236] 通过酶消化与机械解聚结合使用,对胎儿和成年肝脏进行处理,制备胎儿肝脏时基本上是通过机械解聚,而解聚成年肝脏时基本上是通过酶消化。胎儿和成年肝脏均在酶缓冲液中进行不同时间长度的消化,以便将组织中使细胞结合在一起的细胞外基质溶解掉。用于分离全肝脏细胞的胶原酶酶混合物是高纯度的“Liberase”酶制剂,由 Boehringer-Mannheim 制造,其中包含纯化的胶原酶与弹性蛋白酶的混合物。使用该酶混合物时,其浓度可大大降低,因而具有更少的有害性“副作用”。

[0237] 酶溶液:胶原酶溶液 ---60-70mg/100ml 缓冲液 (Sigma 的 IV 型胶原酶,货号 #C5138 或者 Worthington 的 B 型,货号 LS005273;二者都是富集胶原酶的细菌制剂,但含有许多杂质酶) 或者 Liberase---(纯化的胶原酶 / 弹性蛋白酶制剂,由 Boehringer-Mannheim 制造,货号 1814184) 配制于 P2 缓冲液中,使用浓度为 0.23mgs/ml。

[0238] 细胞洗液:补充有胰岛素 (5  $\mu$  g/ml)、转铁蛋白 (5  $\mu$  g/ml)、以 1 : 1 的摩尔比与纯化的牛或人血清清蛋白结合的游离脂肪酸混合物 (见下) 的 RPMI 1640 (Gibco)。

[0239] 游离脂肪酸混合物:未成熟细胞群以及遭到破坏的较老的全肝脏细胞需要脂类维持和合成其细胞膜。尽管完全成熟的肝细胞能够从单种脂肪酸来源物 (亚油酸) 合成其细胞膜,但是较年轻的实质细胞却不能,所以它需要多种不同的脂肪酸混合物来满足其脂类需求。我们提供这样一种复合混合物,并将其与高度纯化的清蛋白以 1 : 1 的摩尔比结合。下面是配制该脂肪酸制剂的详细描述:

[0240] 储存液配制如下 (配制总和为 100mM 的游离脂肪酸):

[0241]

软脂酸	<u>30.1 mM</u>	油酸	<u>13.4 mM</u>
棕榈油酸	<u>2.8 mM</u>	亚油酸	<u>35.6 mM</u>
硬脂酸	<u>11.6 mM</u>	亚麻酸	<u>5.6 mM</u>

[0242] 欲得到终浓度为  $7.6 \mu M/L$ , 则每升加入  $76 \mu l$  上述储存液。(参见: Chessebaum 和 Padieu, In Vitro 20(10) :780, 1984。根据该参考文献, 在细胞培养液中游离脂肪酸混合物的使用终浓度为  $7.6 \mu eq/L$  ( $= 7.6 \mu M$ ) )。

[0243] 各种脂肪酸组分的配制:

[0244] 将每种组分按如下单独溶于 100% EtOH :

[0245] 软脂酸 1M 储存液, 在热 EtOH 中可溶

[0246] 棕榈油酸 1M 储存液, 在 EtOH 中易溶

[0247] 硬脂酸 151mM 储存液, 在加热的 EtOH 中可溶, 1g/21ml

[0248] 亚油酸 1M 储存液, 在 EtOH 中易溶

[0249] 亚麻酸 1M 储存液, 在 EtOH 中易溶

[0250] 接着, 混合这些脂肪酸组分储存液, 获得 100mM 的 FFA 混合液。将各种 FFA 以及 FFA 混合液分装, 通过通氮气减少氧气, 以增加稳定性。将储藏液在  $-20^{\circ}C$  冻存。

[0251] P1 灌注缓冲液 --- 无钙镁灌注缓冲液 (pH7.2), 其每种组分的终浓度具体如下: 118mM NaCl、4.7mM KCl、1.2mM  $KPO_4$  pH7.4、2.5mM  $NaHCO_3$ 、0.5mMEDTA、5.5mM 葡萄糖、0.5% 牛或人血清清蛋白 (BSA)、抗坏血酸 ( $50 \mu g/ml$ )、胰岛素 ( $4 \mu g/ml$ )、地塞米松 ( $1 \mu M$ )。

[0252] P2 灌注缓冲液 --- 补充有 0.5% BSA、抗坏血酸 ( $50 \mu g/ml$ )、胰岛素 ( $4 \mu g/ml$ )、地塞米松 ( $1 \mu M$ ) 的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养液或者 RPMI 1640。

[0253] DMEM: 含有葡萄糖、丙酮酸钠和 L- 谷氨酰胺并进一步补充有 5% 胎牛血清、胰岛素 ( $4 \mu g/ml$ ) 和地塞米松 ( $1 \mu M$ ) 的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养液 (Gibco)。

[0254] Chee's 培养液: 用 ITS<sup>TM</sup> 补充培养液 (5ml/500ml) 和地塞米松 ( $0.1 \mu M$ ) 补充。

[0255] Percoll (Pharmacia, 货号 #17089102) : 用  $10 \times$  Dulbecco's 磷酸盐缓冲液按 9 : 1 稀释。

[0256] 实施例 3: 胎儿肝脏组织的研究

[0257] 胎儿肝脏到达时是处于运输缓冲液 (描述见上) 中并在冰上。用“洗细胞缓冲液”对其进行冲洗, 该“洗细胞缓冲液”包含补充有胰岛素 (Sigma,  $5 \mu g/ml$ )、转铁蛋白 (Sigma,  $5 \mu g/ml$ )、硒 (Johson Matthey's mass spec trace elements;  $10^{-9}M$ ) 以及以 1 : 1 的摩尔比与牛血清清蛋白结合的游离脂肪酸混合物的 RPMI 1640 (Gibco)。接着将胎儿肝脏置于胶原酶缓冲液中 15-20 分钟, 然后轻轻地压过带有 800 筛孔网的“收集器” (Sigma), 得到小的细胞聚集体; 使用“洗细胞缓冲液”是为了促进解聚过程。接着将细胞聚集体压过 70 微米的过滤器 (Falcon 细胞滤过器, 70  $\mu m$  尼龙, 货号 #2350) 并使用“洗细胞缓冲液”促进该过程, 细胞聚集体就被完全地解聚了。将通过 70 微米过滤器的细胞与那些没有通过的细胞分开保存。两种样品均低温保藏, 并使用台盼蓝染料排除测定法检查存活百分比。

[0258] 实施例 4: 成年肝脏组织的研究

[0259] 将肝脏通过门静脉、腔静脉, 或者通过门静脉以及腔静脉插入导管, 用缓冲液灌注以去除血液; 并接着用含有胶原酶 / 蛋白酶的缓冲液灌注, 以实现酶性解聚细胞。根据肝脏

的大小,一般需要消化 15-30 分钟后,将组织压过酪布或尼龙过滤器或者用梳子耙松,以机械性地完成细胞解聚的过程。用含有血清的缓冲液洗解聚细胞,以灭活灌注过程中使用的胶原酶和其它酶。

[0260] 将灌注缓冲液 P1 和 P2 置于 37°C 水浴中。灌注是在 Miller 型灌注箱中完成的,灌注箱在整个灌注过程中保持在 37°C。在灌注过程中,给缓冲液充氧。灌注箱中的所有连管用 70% 的乙醇洗,接着用蒸馏水、然后是 P1 洗,以确保将空气从系统中赶出。对于大块的肝脏(100-300 克),使用 Teflon 插管对肝脏进行插管,将 16 号标准针头接到 60 毫升的注射器上,利用肝脏切割面上可利用的多种血管使冰冷的 P1 缓冲液快速流过肝脏。在罕见的情况下,当有完整的肝叶可供灌注时,可在腔静脉的残余处插管。对肝脏块中的多个血管进行测试,以掌握哪一个将提供最佳的组织灌注效果。这一步也同时将肝脏中过多的血液去除。对所选择的血管插管并使用医疗级的粘合剂(医疗级“超级粘胶”)对插管处密封。用医疗级的粘合剂对所有的其它大血管和表面开口进行密封,并且如果需要,用带有粘合剂的 Q 吸头帮助密封开口。一旦粘合剂干燥后,将肝脏标本置于尼龙网上,放在大小合适的玻璃碗内。将 P1 缓冲液加入到碗中,使肝脏浸没在缓冲液中。将含有肝脏的碗置于灌注箱内,接上出口连管。让 P1 缓冲液再循环 15 分钟,大约 24ml/min 的低速起始、然后慢慢升高到 58ml/min 到 90ml/分钟之间,在可接受的回压条件下将流速最佳化。一定要注意检查:不能从肝脏中渗漏出过多的灌注液。15 分钟后,将 P1 缓冲液从碗中移去,代替以含有胶原酶的 P2 缓冲液。再循环 P2 缓冲液,通过肝脏的颜色由深红棕色到淡棕色的转变以及通过获得浆性质地的肝脏来评价,直到肝脏被充分消化为止。P2 再循环的时间不超过 20-25 分钟。一旦灌注结束后,将 P2 缓冲液从碗中排走并将肝脏在碗中转移到生物通风橱。

[0261] 将细胞培养液(DMEM)加到碗中,并将插管和粘合剂连同任何未消化的肝脏部分去除。使用组织镊和剪刀剪开肝脏被膜(Glisson's 被膜)。这样,消化的组织就释放到培养液中,而结缔组织和任何未被消化的物质就被遗留下。将消化的物质置于 DEME 中并接着通过一系列不同大小的过滤器过滤。将过滤器置于大漏斗内,辅助过滤。消化的物质首先用单层酪布、接着用 400 μm 尼龙过滤器、最后用 70 μm Teflon 过滤器过滤。将滤过液等分到离心管中,在 70g 离心 4 分钟。

[0262] 将离心后、加入 Percoll 之前的上清液称作分级分离部分 1(F1)。将 DMEM 和等渗的 Percoll 加到细胞沉淀中,其最终比值分别为 3 : 1。例如,一小块体积为 5ml 的压紧的细胞沉淀,将悬浮于 30ml DMEM 和 10ml 等渗的 Percoll 中。将该样品在 100g 离心 5 分钟。所得到的上清液:最上层称作分级分离部分 2(F2)。中间的 Percoll 层称作分级分离部分 3(F3)。剩下的细胞沉淀为分级分离部分 4(F.)。将不同分级分离部分的细胞悬浮,并使用台盼蓝染料排除测定法测定存活率。这些不同分级分离部分的细胞,其存活率见表 3,表中同时给出了它们在低温保藏后的存活率。

[0263] 经肝脏灌注后,仍与肝脏组织的血管或胆管树保持结合的细胞也被保留下来。这些细胞存在于酶性灌注后所得到的最初的细胞悬浮液中,并且在悬浮液中的细胞通过滤网(例如,酪布)后,它们一般留在滤网上。将这些血管和胆管树的残留再次用酶处理,并将所得细胞与其它细胞汇聚到一起。

[0264] 大多数研究者日常使用 Percoll 分级分离,去除他们所认为的碎片和死细胞,并仅仅把最终的沉淀保存下来。对这种灌注常规所作的新变化,正如本文所公开,在于沉淀被

弃去,而具有最低浮力密度的细胞(即,收集位于梯度顶部的细胞)被保留下并用于进一步研究。这些细胞是较年轻的实质细胞,因而具有大大提高的冷冻自由度(见低温保藏部分)。

[0265] 实施例 5 低温保藏实验:

[0266] 用于低温保藏方法的肝脏来自小到胎儿肝脏(妊娠期为 12 至 25 周),大到 77 岁的肝脏。

[0267] “新的低温保藏缓冲液”

[0268] ●补充有 2% 人血清(Gibco) 或胎牛血清(BioWhittaker) 的 Viaspan(Dupont 货号 #1000-46-06),

[0269] ●10% 低温保藏剂【专门用于成熟的实质细胞的二甲基亚砜(Sigma 货号 #D5879 或 D8779),或者用于祖先的二甲基亚砜或甘油(Sigma 货号 #G6279)】。

[0270] ●缓冲液进一步地补充抗生素(青霉素 200U/ml; 链霉素 100 μg/ml),

[0271] ●缓冲液进一步地补充激素和生长因子:胰岛素(5 μg/ml),转铁蛋白(5 μg/ml),表皮生长因子(50 μg/ml), FGF(10ng/ml), FGF II(10ng/ml),

[0272] ●缓冲液进一步地补充脂类:与牛血清清蛋白(BSA) 或人血清清蛋白(HSA) 以及高密度脂蛋白(10 μg/ml)结合的多种游离脂肪酸(7.6 μM/l)

[0273] ●缓冲液进一步地补充微量元素(硒( $10^{-9}M$ ),铜( $10^{-7}M$ ),锌( $5 \times 10^{-11}M$ ))以及一种抗氧化剂(例如,超氧化物歧化酶的模拟物 porphorin, 使用浓度为 10 μg/ml; 抗坏血酸, 使用浓度为大约 0.1mg/ml; 或者本领域公知的任何抗氧化剂)。

[0274] 组成上的变化,正如本文所公开,为的是将关键的营养物、脂类、激素和生长因子组合在一起,而这些物质经鉴定后将作为全肝脏细胞定做、限定激素的无血清培养液的一部分。新缓冲液使 F4 分级分离部分的全肝脏细胞,其存活率从 50% 之低(来自特别差的样品)上升到 80% 之高(对于好的样品而言)。F1-F3 分级分离部分的存活率始终保持在 80% 以上,我们猜测这是由于这些分级分离部分含有较年轻的细胞,其染色体倍性状态和代谢活性更有助于合成在细胞存活和生长中所需要的细胞外基质组分和 / 或其它细胞因子;因而,它们很可能更容易被冰冻。在缓冲液中使用超氧化物歧化酶模拟物,使细胞的存活率提高了 5-10%。

[0275] 对上述的一种替代是:

[0276] ●使用改进的缓冲液,其中的 Viaspan 被删除,并且基础培养液(诸如 RPMI1640)补充有胰岛素(5 μg/ml)、转铁蛋白(5 μg/ml)、结合到 BSA 的游离脂肪酸(7.6 μM/l)、高密度脂蛋白(10 μg/ml)、微量元素(硒  $10^{-9}M$ , 铜  $10^{-7}M$ , 锌  $5 \times 10^{-11}M$ )以及一种抗氧化剂

[0277] ●用细胞外基质的形式(诸如与层粘素混合的 IV 型胶原或者与纤维结合素混合的 I 型胶原或 III 型胶原)包被细胞。

[0278] 将按上面所述处理的胎儿全肝脏细胞悬浮于低温保藏缓冲液(如上所述)中,浓度为  $5-10 \times 10^6$  个细胞/ml,将悬浮液等分于 3ml 的低温保藏管中并在当时的条件下保持 1-2 小时。接着,使用电脑控制速度的冷冻仪(Forma Crymed),将细胞冷冻到 -100 °C 至 -180 °C 的液氮温度,优选地 -160 °C,然后保存在一个大的气相、液氮(-160 °C)保存罐中。经此处理后的细胞存活良好,在 50-270 天的保存期范围,没有发生存活率的显著丧失。

[0279] 在成年全肝脏细胞的分级分离部分(F1-F4)中,发现含有独特的细胞群:F1 含有

碎片、红血细胞、肝星形细胞和可能是祖先细胞群（肝谱系的或者造血谱系的）的小肝脏细胞（小于 10 μ）；F2 分级分离部分（来自 Percoll 溶液的顶部）含有较大的二倍体肝脏细胞（10-15 μ）、小实质细胞；来自 Percoll 底部的 F3 分级分离部分含有更大的实质细胞（15-25 μ），其中包含二倍体和四倍体细胞的混合物；以及 F4 分级分离部分（正是所有其他研究者所使用的部分）包含最大的实质细胞（25-50 μ）并且全部为多倍体（四倍体和八倍体）。通常，F1-F3 分级分离部分中的实质细胞，冷冻后的存活率为 50-80%（取决于肝脏到来时的状态）。已鉴定的影响 F4 分级分离部分中的实质细胞存活率的可变因素为：1) 供体的年龄（供体的年龄越大，预后就越差）；2) “clamp time”与递送到实验室时的时间间隔（越短越好）；3) 摘除前肝脏组织的健康状况（即，严重的局部缺血状态导致坏的预后）。这些因素是相互作用的，因此快速递送取自较老供体的组织，也许比取自年轻患者的组织但在运输中却花费了太长时间而更具吸引力。

[0280] 表 5 经低温保藏的胎儿和成年肝脏的平均存活率和贴附效率以及肝祖先 (AFP<sup>+</sup> 细胞) 在细胞悬浮液中的%

细胞群	低温保藏剂	处理后的存活率	融化后的存活率	细胞平均大小 (μm)	在培养液中的生长情况	AFP <sup>+</sup> 细胞 %
胎儿肝脏	甘油	76%	77% (100% 复苏)	7-15	良好	6-7%
成年肝脏, F1	甘油 /DMSO	80%	82-85%	>12	良好	0.5-1 %
成年肝脏, F2	甘油 /DMSO	85%	84%	12-15	良好	2%
成年肝脏, F3	DMSO	85%	85%	15-25	良好	0.2%
成年肝脏, F4	DMSO	50-70%	56%	25-50	差	0.01%

[0282] 无论是处理后还是冷冻后，F4 分级分离组分存活率的极端范围是由“clamp time”到实验室收到样品时这段时间的长短变化以及肝脏的不同状态（纤维化、局部缺血等）所引起的。通常，F4 分级分离部分对变化莫测的肝脏处理以及组织的总健康状况最敏感。不同寻常的是，甚至从差的肝脏标本获得的 F2 和 F3 分级分离部分，在常规情况下可存活并易于低温保藏。F1 分级分离部分的存活性更高，其中含有大量的碎片、脂肪滴以及包括小实质细胞（假定包括肝祖先在内）和多种造血细胞亚群（即，红细胞类）在内的许多小细胞。

[0283] 表 6. 低温保藏：胎儿肝脏

- 处理数 >200
- 所收到的组织
  - (根据供体年龄)
    - ◆ 12 周: 大约 1ml 压紧细胞
    - ◆ 16 周: 大约 15-20ml 压紧细胞  
=0.5-1gm 组织
    - ◆ 24 周: 大约 4-5 gms 压紧细胞
- [0284] ● 产率
  - ◆ 每克大约  $10^8$  个细胞
- 经处理的组织
- 存活率
  - ◆ 处理: 75-85%
  - ◆ 融化: >95%
  - ◆ 分选: >90%
  - ◆ 在培养液中: >90%
- [0285] 表 7. 低温保藏 : 成年肝脏
  - 处理数 >80
  - 收到 100-200
    - \* 每个肝脏的克数
      - (2.5-3kg/肝脏)
    - \*产率:
      - 每克组织  $10^7$ - $10^8$  个细胞
  - 存活率 (处理)
    - ◆ F1: >75% ( $>12\mu$ )
    - ◆ F2: >90% ( $12-15\mu$ )
    - ◆ F3: >90% ( $15-25\mu$ )
    - ◆ F4: 75-80% ( $25-50\mu$ )
  - 存活率 (冰冻)
    - ◆ F1-F3: >80%
    - ◆ F4: 56%
- [0286] →贴附良好
- [0287] →贴附差
- [0288] 实施例 6 : 细胞计数
- [0289] 细胞以单列方式通过一个流式小室, 在那里它们暴露于激光。每个小室的大约体积是由“前向散射”或者光束被横切时的折射光量所决定的。从细胞内部结构诸如细胞核、内质网高尔基体、囊泡等“侧向散射”出来的散射光, 用于确定细胞内部的复杂程度 (即, 活跃细胞和更成熟的细胞将比静息细胞或更年轻细胞含有更多的胞内组分)。通过将高度特异性的特征性抗原与细胞表面上的蛋白质复合物结合, 获得关于细胞特性的更多选择性信息。可将这些抗体与荧光分子诸如异硫氰酸荧光素 (FITC)、藻红蛋白 (PE) 以及 PE 和细胞色素的串联缀合物共价结合, 这些荧光分子被激光束激发时, 对于每个荧光团来讲产生特定波长的发射光。通过选择一组与特定的抗体缀合的独特的生色团, 就将目的细胞群选择出来。
- [0290] 对细胞的分析, 是基于其参数输入。在收集所希望的细胞时, 使用了多种收集装置, 其中包括 Eppendorf 管和锥形管以及任何大小的多孔板, 收集的速度高达 40000 次事件 / 秒或更高。
- [0291] 在染色过程中所使用的抗体和试剂

抗体	供应商	货号#	批号#
山羊抗-人 AFP	Chemicon, AB635,	C4P168	
单克隆小鼠 X 人 Thy	Chemicon, MAB1294,	293CCD	
[0292] 单克隆小鼠抗人 AFP-PE 缀合物	Chromaprobe, P41020,	A45P7	
生物素酰基化的兔-抗山羊	Vector Laboratories, BA-5000, J0313		
生物素酰基化的兔-抗山羊,	Jackson Immunochemicals, 200-152-096, 25985		
链亲和素/AMCA 缀合物,	Jackson Immunochemicals, 016-150-084, 40001		
驴抗-绵羊 AMCA 缀合物,	Jackson Immunochemicals, 713-156-4732202		
驴抗-山羊 CY5 缀合物,	Jackson Immunochemicals, 705-156-147, 38756		
山羊 IgG,	Jackson Immunochemicals, 005-000-002, 38837		
绵羊 IgG,	Jackson Immunochemicals, 013-000-002, 39945		
绵羊抗-人清蛋白,	Serotic, ABP102, 210498		

**小鼠单克隆抗-人:**

CD14/三色缀合物	Pharmingen	
ICAM	Pharmingen	
CD34/FITC 缀合物	Pharmingen	34374X
CD38/PE 缀合物	Pharmingen	31015X
CD38/FITC 缀合物	Pharmingen	31014X
血型糖蛋白 A PE 缀合物	Pharmingen	32591A
CD45/PE 缀合物	Pharmingen	31255X
CD45/ FITC 缀合物	Pharmingen	31254X
同型对照 IgG1 PE	Pharmingen	33815X
IgG2 FITC	Pharmingen	33814X
c_Kit PE 缀合物	Caltag	MHCK04
兔子 X 人 AFP-FITC 缀合物 Accurate	YNRH AFPP	没有列出
山羊抗-人 未结合 AFP	“ AXL625	061
7-氨基放线菌素 D (7AAD)	Mol Probes	A-1310, 4981-1

[0293] 流式细胞计数法制备细胞的主要溶液 :

- [0294] BSA :牛血清清蛋白 (Pentex V)
- [0295] PBS :磷酸盐缓冲液 ;
- [0296] FBS :胎儿牛血清 ;
- [0297] AFP :甲胎蛋白
- [0298] 加有激素的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养液 :HC\_DMEM
- [0299] 500mL 不加酚红、高葡萄糖含量的 DMEM,
- [0300] 25mL 胎牛血清 (FBS)
- [0301] 20mL 5mM EGTA
- [0302] 胰岛素 (5  $\mu$  g/ml)、转铁蛋白 (5  $\mu$  g/ml)
- [0303] 微量元素 [硒 (10<sup>-9</sup>M), 铜 (10<sup>-7</sup>M), 锌 (5×10<sup>-11</sup>M) ]
- [0304] 抗生素 (青霉素 -100  $\mu$  g/ml, 链霉素 -100  $\mu$  g/ml)
- [0305] 500mg 牛血清清蛋白 (BSA) 30mg DNase
- [0306] 38  $\mu$  L 结合到 BSA 的游离脂肪酸混合物
- [0307] 通过 Nalgene 过滤装置 (0.2  $\mu$  m 孔) 过滤除菌
- [0308] Hank' s 缓冲盐溶液 - 改良版 :HBSS-mod
- [0309] 50mL 10×HBSS
- [0310] 10mL 1M Hepes
- [0311] 青霉素 -100  $\mu$  g/ml / 链霉素 -100  $\mu$  g/ml
- [0312] 500mg BSA
- [0313] 30mg DNase
- [0314] 调至体积为 400ml
- [0315] pH 至 7.3
- [0316] 终体积至 500ml
- [0317] 0.2  $\mu$  m 过滤除菌器
- [0318] 免疫化学封阻缓冲液
- [0319] 100mls HBSS\_mod
- [0320] 2.2mL 45% 的硬骨鱼鱼胶以及
- [0321] 0.8g BSA
- [0322] 0.5mL 1% 皂甙 (溶于 HBSS)
- [0323] 免疫荧光显微镜检查封固培养液
- [0324] 0.5mL 2×PBS
- [0325] 0.25g 正 - 丙基没食子酸
- [0326] 5.7g 甘油
- [0327] 实施例 7 :用于流式细胞计数的冷冻的肝脏组织的制备方法
- [0328] 将冷冻的肝脏组织在 37°C 快速融化。将肝脏的冷冻管置于冰上, 往每个冷冻管 (每管含有大约 3ml 缓冲液, 其中含有 5-10×10<sup>6</sup> 个细胞 / mL) 中以每分钟 1mL 的速度加入 HC-DMEM, 至终体积为 10mL。接着离心样品, 转速 1200 转 / 分钟、时间 5 分钟、温度 4°C。弃去上清液, 并将细胞沉淀重新悬浮于 5mL HC-DMEM 中。重复洗细胞直到上清液变澄清为止。这时使用台盼蓝染料排除测定法, 通过血细胞计数器对细胞进行计数和测定存活率。根据

实验手册,将细胞分为几个分级分离部分。为获得对照数据,制备含有 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/mL的标准管(通常是从含 $5-10 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞悬浮液中,每种取200 μL而得到)。需要以下标准管:

- [0329] 1) OCS. 原始的细胞悬浮液,其中包含未染色的对照细胞。
- [0330] 2) 用于补偿调整的单独 FITC. 将5 μL FITC标记的抗血型糖蛋白A抗体加到200 μL细胞悬浮液中。或者,将FITC标记的CD34、CD38和CD45的混合剂,其中每种7 μL,加到200 μL细胞中。
- [0331] 3) 用于补偿调整的单独PE. 使用血型糖蛋白-PE(2 μL加到1mLHC DMEM中,从中再取30 μL加到200 μL细胞中)。
- [0332] 4) 用于补偿的单独7AAD. 将200 μL细胞悬浮液用2%多聚甲醛固定,接着将5 μL 100 μM的7AAD和5 μL去污剂(1%皂甙)加到1mL这些细胞的HBSS-mod悬浮液中。被渗透的细胞被7AAD强烈地染色。
- [0333] 5) 用于补偿的单独Cy5. 为了用绵羊IgG标记细胞表面,将200 μL固定细胞(2%多聚甲醛)在2%山羊血清中温育40分钟。接着将细胞与结合Cy5的驴抗-山羊IgG(1:800)温育40分钟。
- [0334] 6) 用于补偿的单独AMCA. 与用7AAD类似,产生了一个用于补偿调整的强烈的人工信号。为了用绵羊IgG标记细胞表面,将200 μL固定细胞(2%多聚甲醛)在2%绵羊血清中温育40分钟。接着将细胞与结合AMCA的驴抗-绵羊IgG(1:800)温育90分钟。
- [0335] 7) AMCA/Cy5对照. 将被固定(2%多聚甲醛)和被渗透(0.05%皂甙)的细胞用结合AMCA的驴抗-绵羊IgG和结合Cy5的驴抗-山羊IgG温育90分钟。
- [0336] 8) 单克隆同型对照. 将细胞与小鼠IgG1 PE缀合物和小鼠IgG2 FITC缀合物温育。浓度应与用于标记分析和分选的管的那些浓度相匹配。
- [0337] 9) 细胞内同型对照. 将被固定(2%多聚甲醛)和被渗透(0.05%皂甙)的细胞用非免疫的绵羊IgG和山羊IgG温育90分钟,作为鉴别甲胎蛋白和清蛋白的抗体对照。继续与结合Cy5的驴抗-山羊IgG和结合AMCA的驴抗-绵羊IgG温育90分钟。
- [0338] 制备分选管是为了获得表达特定的CD标志组合的所选细胞群。在正常情况下,这些管中含有 $50-70 \times 10^6$ 个细胞。将细胞再悬浮于1mL包含HC DMEM+1%BSA+500pM 7AAD(从100 μM的储存液中取5 μL)的染色缓冲液中。将CD34FITC、CD38PE或CD45PE,根据细胞数量(一般情况下每 $10 \times 10^6$ 个细胞,加3 μL Pharmingen抗体),每种15-25 μL,加到染色缓冲液中。以1:60稀释度加入抗c-Kit的抗体,使用血型糖蛋白A时,稀释度为1:500。在黑暗中冰上染色40分钟。染色后,用HBSS-mod洗细胞两次,然后用2%多聚甲醛于PBS中在冰上固定30分钟。
- [0339] 实施例8 用于分选的细胞内染色
- [0340] 为了使用流式细胞计数仪分析甲胎蛋白(AFP),需要对细胞进行细胞内染色;将细胞悬浮液用溶于HBSS\_mod中的0.05%皂甙(Sigma S4521)混合液冰上渗透10分钟。接着将细胞在1%硬骨鱼鱼胶和0.8%BS以及0.005%皂甙的混合液中封阻20分钟,随后与山羊抗-人AFP和绵羊抗-人清蛋白(二者均以1:800稀释于封阻缓冲液中)抗体于室温黑暗中温育90分钟。细胞用含有0.01%皂甙的HBSS\_mod洗两次,然后与9 μg/ml链亲和素/于0.01%皂甙中的Cy5缀合物/HBSS\_mod于室温黑暗中温育90分钟。最后,细胞用

HBSS\_mod 洗两次并再悬浮于 HBSS\_mod 中,用 50 μm 筛子过滤去除细胞结块后,用在流式细胞计数仪上进行分析和分选。

[0341] 如果旨在选择肝祖先,那么免疫选择包括去除多倍体细胞和 / 或表达与来自肝脏的成熟造血细胞相关的标志,诸如,红细胞上的血型糖蛋白 A 的细胞。另外,显示出 CD45 的细胞,CD45 表达于所有的成熟造血细胞上;显示出与成熟肝脏细胞相关的标志诸如存在所有的肝细胞和胆管细胞上连结蛋白 32 的细胞;以及表达与成熟间充质细胞相关的标志的细胞,都被去除,诸如,在肝星形细胞中的类维生素 A,或者在内皮细胞中的 von Willebrand Factor 或因子 8。

[0342] 实施例 9 经过分选的细胞群的免疫组织化学染色

[0343] 细胞经流式细胞计数仪分析和分选后,进行甲胎蛋白染色。将过分选的细胞群收集到含有 1% BSA 的 0.3% HBSS\_mod 中,在回到实验室后,立即调整收集到的样品的体积,至提供  $0.5 \times 10^6$  个细胞 / mL 规格的样品,将每份体积为 200 μL 的等分部分置于显微镜载玻片上,于 Shandon 细胞旋转装置中旋转。将细胞旋转载玻片上的制备物空气干燥保存,供以后甲胎蛋白和 / 或清蛋白染色。将贴附于显微镜载玻片上的细胞“板”用橡胶质地的坝环绕,形成一个圆形坑,以便加入免疫组织化学试剂。将载玻片浸于含有 0.3% Triton X 的 Tris 缓冲液(“低盐”,加有 0.9% NaCl 的 10mM Tris, pH7.4) 中 10 分钟,随后是单独的低盐 Tris 10 分钟。

[0344] 接着将细胞在含 10% 兔血清的硬骨鱼鱼胶封阻溶液(描述见上)中,室温封阻 90 分钟。细胞在低盐 Tris 中洗两次后,用山羊抗 - 人抗体(其以 1 : 100 的比例稀释于含有 2% 兔血清的封阻缓冲液中)在 4°C 温育细胞过夜。细胞在 Tris 缓冲液中洗两次,随后与生物素酰基化的兔抗山羊 IgG(其以 1 : 200) 的比例稀释于封阻缓冲液中,室温温育 90 分钟。最后采用与链亲和素 / AMCA 复合物(9 μg/ml,于低盐 Tris 缓冲液中)温育,利用 AMCA 荧光色素与生物素酰基化的兔抗体结合,将 AFP 样免疫反应性定位。用低盐 Tris 缓冲液洗细胞两次,随后让细胞制备物接近完全干燥,然后加抗褪色封阻培养液(含在 1mL PBS 中的 0.25g 正 - 丙基没食子酸于 5.7g 甘油),盖上盖玻片。如果合适,通过将结合 Texas 红的兔抗人抗清蛋白抗体加入到初级抗 - 甲胎蛋白抗体中,将细胞对清蛋白加倍染色。

[0345] 对照载玻片的制备是通过删除初级或者次级抗体,证实在抗甲胎蛋白抗体或者生物素酰基化的次级抗体不存在的条件下,没有任何 AMCA 标记的细胞。载玻片用向上荧光显微镜观察,使用 UV 激发 AMCA 染料,使其发射位于蓝(450nm)区的光。

[0346] 实施例 10 细胞和 / 或基因治疗

[0347] 由于人尿激酶纤溶酶原激活剂(uPA)能够跨物种激活纤溶酶原,所以构建了从 RSV-LTR 启动子表达人尿激酶的重组腺病毒载体。构建 Ad-RSV-uPA 的目的是为了诱导肝脏再生。用于构建和产生重组腺病毒载体的人 uPA cDNA,其制备方法如下。将含有该蛋白质的编码序列的 1.326kb 的 Hind III/Asp 718 uPA 片段嵌入到 pXCJL.1 的 Hind III/Asp 718 位点内,受到劳氏肉瘤病毒 LTR(RSV)启动子的转录控制,并位于牛生长激素多聚腺苷酸化信号的上游。在用 pJMI7 和所命名的载体 Ad-RSV-uPA 共转染后,制备病毒。通过在 293 细胞中扩增空斑,进行筛选 Ad-RSV-uPA。感染后三天,通过 ELISA 和纤溶活性,通过纤维蛋白平板测定法检测上清液中有免疫反应性的 uPA,以证实在感染 Ad-RSV-uPA 后,产生了 uPA 催化活性。将等量分装的纯化病毒保存于 -80°C,在注射前用 HGDMEM 培养液新鲜稀

释。病毒的滴度是通过 OD 测定和标准空斑测定法确定的。载体的构建,基本上是按照美国专利 5,980,886 中的描述进行的。病毒滴度的测定,使用的是 208F 细胞。

[0348] 将 5 至 6 周大小的 C57BL/6 雌性小鼠 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 培养于无特定病原的环境中。从安乐死的小鼠中得到处在多种不同局部缺血期的肝脏样品,然后按上面公开的方法分离肝脏祖先。对于门静脉插管,将接受插管的小鼠通过腹膜内施用 20mg/ml 的 2,2,2- 三溴乙醇 0.5ml 麻醉。沿小鼠腹中线作切口,然后将皮肤与腹膜分开,造皮下囊。打开腹膜,暴露门静脉。将硅酮管 (0.02 英寸 I. D. , 0.037 英寸 O. D. , S/P 医疗级, Baxter, 111.) 插入到门静脉内并用肝素化的盐水灌注。此后,将插管穿过腹膜并用丝质缝线固定。在远端将这个 3cm 长的插管系住,然后置于前面所造的皮下囊内。一定要在 24 小时之后,给予小鼠感染病毒的祖先细胞。在某些小鼠中,实施门静脉插管时,还连同进行了 2/3 肝切除术;所以,接下来是实施部分肝切除术。为了灌注门静脉,将小鼠麻醉,在已有的腹部切口的近侧位点打开皮肤。将插管暴露,然后连接到一个注射泵。注入病毒时,将处于 DMEM 中的腺病毒制备物在 5 到 10 分钟,通过插管注射到门静脉内。

[0349] 所有的生化和组织学分析,都是在将感染腺病毒的肝祖先通过插管注射到门静脉之后进行的。对 uPA 的 ELISA 测定,基于的是导向 uPA 催化和受体结合结构域的两个不同单克隆抗体。其中的一个单克隆抗体用过氧化物酶标记。血清总蛋白和清蛋白的分析,采用的是临床病理实验室中常规的自动化方法。已知将腺病毒注入到 C57BL/6 小鼠的门静脉内,将导致肝细胞的 100% 转导,每个转导细胞带有多于一个拷贝的腺病毒 DNA。相同剂量的 Ad-RSV-uPA 导致 90% 的死亡率,这个结果与出血至少部分相关。当使用更低剂量的 Ad-RSV-uPA 时,死亡率小于 5%,然后选择这个剂量用于肝脏再生实验。Ad-RSV-uPA 的注入导致血清尿激酶的瞬时升高,4 天后达到大约为 350ng/ml (比内源水平大 70-100 倍) 的峰值,在第 12 天后降到背景水平。uPA 的上升也与血清中 SGPT 浓度的上升相关。在注入腺病毒后的不同时间,<sup>3</sup>H- 胸苷进入动物,测定掺入到肝脏 DNA 中的放射量并将其作为定量细胞增殖的方法。用 Ad-RSV-uPA 处理的动物,从第 3 天开始吸收胸苷并一直持续 8 天,其吸收胸苷的周期增长了。因而,经 Ad-RSV-uPA/ 卵形细胞处理,肝 <sup>3</sup>H- 胸苷的吸收周期要比用部分肝切除术得到的肝脏的周期长得多。阴性对照腺病毒的接受者在第 4 天显示肝 <sup>3</sup>H- 胸苷的吸收峰值,并在 24 小时后回到基线水平,然后在第 11 天肝 <sup>3</sup>H- 胸苷吸收有一个最小上升。总之,通过测量 SGPT 水平以及 <sup>3</sup>H- 胸苷的高吸收速率,肝脏损害造成了肝内尿激酶的产生,而肝内尿激酶的产生又显示有显著的肝脏生物合成再生发生。所注入的肝祖先细胞没有 uPA 时,这样的细胞比没有 uPA 插入的腺病毒好。

[0350] 用重组腺病毒 / 源自无心脏跳动的尸体供体的祖先处理动物,从中得到的显微组织学发现显示:到第 3 天时,被处理的小鼠有中等程度的炎性浸润液,其中含有巨噬细胞和中性白细胞。肝细胞的退化性变化包括液泡化、细胞核固缩和几乎没有有丝分裂性细胞核。施用 Ad-RSV-uPA/ 卵形细胞后 8 到 10 天,出现了肝恢复的证据,其中包括出现了多灶再生、大小不一的细胞核,以及大大减小的炎症反应,几乎没有退化性肝细胞。到第 3 至 4 周时,浸润液消退,肝脏看起来正常了。

[0351] 总而言之,这些研究证实:尿激酶的表达并与肝祖先一起,诱导了显著的肝脏实质细胞的再生。

[0352] 实施例 11 通过 Percoll 离心缩小体积

[0353] 本实施例提供富集肝脏祖先,包括肝脏干细胞、未定向祖先和定向祖先的方法。这些技术的变化为本领域的那些技术人员公知,并且只要与缩小全肝脏细胞悬浮液体积以提供祖先富集群的目标相一致,这些技术变化就同等适合。

[0354] 将基本上是肝脏细胞的单细胞悬浮液,例如在培养液如基础培养液 Eagle (BME) 中,加到 15% BME 中制备的 Percoll 层的顶部。使用 Sorvall TR7 离心机以及 14cm 转头,或者其它相当的转头离心机组合,将梯度在 600–1200 转 / 分钟,优选地 750–1000 转 / 分钟,离心 10 分钟。收集上清液并再次离心,但转速为 1200–2000 转 / 分钟,优选地大约 1500 转 / 分钟。该上清液分级分离部分富集有祖先,而沉淀 (F3 分级分离部分) 含有能够完成至少一个细胞周期的细胞。将上清液中的细胞分开收集并再次离心,2000–3000 转 / 分钟,优选地大约 2500 转 / 分钟。在后一次离心中,祖先细胞经常沉降到 Percoll 的上部区内,留下细胞碎片位于上层,而沉淀含有能够完成几个有丝分裂周期的细胞。Percoll 分级分离适用于立即使用、低温保藏、在培养液中建立细胞系或者进一步富集。进一步富集可通过淘选、亲和选择、FACS 分选或者本领域公知的技术以及上述的任何技术完成。负选择是通过去除表达标志 CD45、血型糖蛋白 A 或者下面提到的其它标志的细胞完成的。正选择是通过选择表达 CD14、CD34、CD38、ICAM 或者选择其它全长甲胎蛋白、清蛋白或者两者标志的细胞。

[0355] 实施例 12 通过淘洗制备祖先细胞

[0356] 本实施例提供分离定向和未定向肝脏祖先细胞的步骤。虽然在本领域中已知多种技术,但本文还是对一个优选的实施方案予以详细公开,需要明白的是,只要与所希望的目标相一致,其它的制备技术也同等适用。优选的例子有:非限制性技术见例如美国专利 5,807,686、5,916,743、5,672,346、5,681,559、5,665,557、5,672,346 和 5,663,051(此处列出,作为参考)。

[0357] 对多能或肝定向的小的全肝脏细胞,可以使用 Percoll 或其它合适的密度梯度诸如 Histopaque 离心,然后用培养液洗两次并再悬浮于 10ml 淘洗培养液中,实现初步分离。对于逆流淘洗,将洗过的小单核细胞,经过一个样品位点偶联器,注射到装备 JE-5 转头和标准分离腔的 Beckman J6M/E 离心机的进样流中。然而,可以使用任何一种商业供应的连续流式离心机和淘洗器,诸如,由位于 Deerfield, IL 的 Baxter International Inc., 出售的“Fenwal Models CS 3000”和“AutopheresisC”;或者由位于 Lakewood, CO 的 Cobe 制作所出售的 Spectra Apheresis v 7/6,这些仪器优选地采用一次性塑料插入装置,其中包括为方便基于密度分离的分离腔装置。仪器的具体选择,取决于本领域的技术人员。用蠕动泵 (Cole Palmer Instruments, Chicago, IL) 驱动加有 100mg/dl D-葡萄糖、0.3mM 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 的淘洗培养液、50mg/dl 牛血清清蛋白的 0.9% 生理盐溶液, pH 调到 7.2 不断流动。使用前将培养液灭菌。输送细胞的总流速为 15ml/min, 转头速度为 900g, 在室温下进行。在收集了 100ml 洗脱液后, 将流速提高到 25ml/min。在转头速度保持恒定的条件下, 将流速顺序提高到 29ml/min、33ml/min 和 37ml/min, 每增加一次流速就收集 200ml。通过改变转头方向并用 100ml 淘洗培养液洗, 将留在分离腔中的细胞捕获。冲洗每个分级分离部分并在 300g 离心 10 分钟。将适当的分级分离部分收集起来, 通过台盼蓝染料排除测定存活率, 并用细胞计数器 (Coulter Electronics, Hialeah, FL) 确定细胞回收率。

[0358] 或者, 不采用密度梯度分离方法分离全肝脏细胞, 而是将细胞悬浮于 pH7.4 的含有 5% 胎牛血清、0.01% EDTA (重量 / 体积) 和 1.0g/l D-葡萄糖的磷酸盐缓冲液 (PBS)

中,然后注射到 Beckman 逆流式离心淘洗系统中,使用 JA-17 转头和标准分离腔 (Beckman Instrument)、转头的速速为 1950 转 / 分钟、温度为 10℃,样品的流速在 12-14ml/min 之间。  
[0359] 所得到的位于适当的分级分离部分中的细胞,细胞直径一般在 5-15 微米之间,优选地为 8.0-9.4 微米;这些直径的测量,采用的是本领域公知的技术。如果需要,可进行基于细胞标志的进一步正选择或者负选择。

[0360] 可以将本领域技术人员所公知的多种其它抗体,单独地或者与肝脏祖先标志组合在一起使用。具体选择将取决于所希望分离或富集的细胞类型,这些选择包括但不限于:对造血和淋巴样抗原特异的抗体,诸如,对 T- 细胞特异的抗 -CD2、抗 -CD2R、抗 -CD3、抗 -CD4、抗 -CD5、抗 -CD8 抗体;对 T- 细胞亚类和 B- 细胞亚类特异的抗 -CD6 抗体;对主要 T- 细胞亚类特异的抗 -CD7 抗体;对 B- 细胞特异的抗 -CD12、抗 -CD19 和抗 -CD20、抗 -CD72、抗 -CDw78 抗体;对单核细胞特异的抗 -CD13 和抗 -CD14 抗体;对天然杀伤细胞特异的抗 -CD16 和抗 -CD56 抗体;针对血小板的抗 -CD41 抗体;对皮质胸腺淋巴细胞和朗各汉斯细胞特异的抗 -CD1a、抗 -CD1b 和抗 CD1c 抗体;对前 B- 细胞、单核细胞和血小板特异的抗 -CD9 抗体;对淋巴样祖先细胞、C-A11 和粒细胞特异的抗 -CD10 抗体;对白细胞特异的抗 -CD11a 抗体;对粒细胞、单核细胞和天然杀伤细胞特异的抗 -CD11b 抗体;对单核细胞、粒细胞、天然杀伤细胞和多毛细胞白血病特异的抗 -CD11c 抗体;对粒细胞抗 -CD15 抗体;对粒细胞、单核细胞和血小板特异的抗 -CDw17 抗体;对白细胞特异的抗 -CD18 抗体;对成熟 B- 细胞特异的抗 -CD21 抗体;对 B- 细胞细胞质和成熟 B 细胞特异的抗 -CD22 抗体;对激活的 B- 细胞特异的抗 -CD23 抗体;对 B- 细胞和粒细胞特异的抗 -CD24 抗体;对激活的 T- 和 B- 细胞以及激活的巨噬细胞特异的抗 -CD25、和抗 CD-26 抗体;对主要 T- 细胞亚类特异的抗 -CD27 和抗 -CD28 抗体;对激活的 T- 和 B- 细胞以及 Sternberg Reed 细胞特异的抗 -CD30 抗体;对血小板、单核细胞 / 巨噬细胞、粒细胞和 B- 细胞特异的抗 -CD31 抗体;对巨噬细胞、粒细胞、B- 细胞和嗜酸细胞特异的抗 -CDw32 抗体;对单核细胞、骨髓祖先细胞和骨髓白血病特异的抗 -CD33 抗体;对红细胞生成前体细胞特异的抗 -CD34 抗体;对粒细胞、单核细胞、B- 细胞、某些 NK 细胞和红细胞特异的抗 -CD35 抗体;对单核细胞 / 巨噬细胞和血小板特异的抗 -CD36 抗体;对成熟 B- 细胞特异的抗 -CD37 抗体;对浆细胞、胸腺细胞和激活的 T 细胞特异的抗 -CD38 抗体;对成熟 B- 细胞特异的抗 -CD39 抗体;对 B- 细胞和癌特异的抗 -CD40 抗体;对血小板和巨核细胞特异的抗 -CD42、抗 -CD42b 抗体;对除循环的 B- 细胞之外白细胞特异的抗 -CD43 抗体;对白细胞和红细胞特异的抗 -CD44 抗体;对白细胞特异的抗 -CD45 抗体;对 T- 细胞、B- 细胞亚类、单核细胞和巨噬细胞特异的抗 -CD45R0 抗体;对 B- 细胞、单核细胞和 T- 细胞亚类特异的抗 -CD45RA 抗体;对 B- 细胞、T- 细胞亚类、单核细胞、巨噬细胞和粒细胞特异的抗 -CD45RB 抗体;对造血和非造血细胞特异的抗 -CD46、CD55、CD58 和 CD59 抗体;对所有的细胞类型特异的抗 -CD47 抗体;对白细胞和中性白细胞特异的抗 -CD48 抗体;对血小板、激活的以及长期培养的 T- 细胞特异的抗 -CDw49b 抗体;对单核细胞、T- 细胞和 B- 细胞特异的抗 -CDw49d 抗体;对血小板和巨核细胞特异的抗 -CDw49f 抗体;对白细胞特异的抗 -CDw50 和 CD w52 抗体;对血小板特异的抗 -CD51 抗体;对包括正常和赘生的浆细胞在内的白细胞特异的抗 -CD53 抗体;对内皮细胞特异的抗 -CD54 抗体;对 T- 细胞亚类和血小板特异的抗 -CDw60 抗体;对血小板以及巨核细胞特异的抗 -CD61 抗体;对激活的血小板特异的抗 -CD62 抗体;对激活的血小板、单核细胞 / 巨噬细胞特异的抗 -CD63 抗体;对单

核细胞特异的抗 -CD64 抗体（未调节的干扰素 - $\gamma$ ）；对单核细胞异质反应性以及粒细胞特异的抗 -CDw65 抗体；对粒细胞特异的抗 -CD66 和 67 抗体；对单核细胞和巨噬细胞特异的抗 -CD68 抗体；对激活的 T- 和 B- 细胞、激活的巨噬细胞和天然杀伤细胞特异的抗 -CD69 抗体；对激活的 T- 和 B- 细胞、Sternberg Reed 细胞和退行性变化的巨大细胞淋巴瘤特异的抗 -CDw70 抗体；对激活的 T- 和 B- 细胞、巨噬细胞、正在增殖的细胞特异的抗 -CD71 抗体；对 B- 细胞亚类和 T- 细胞亚类特异的抗 -CD73 抗体；对 B- 细胞和单核细胞 / 巨噬细胞特异的抗 -CD74 抗体；对成熟 B- 细胞特异的抗 -CDw75 抗体；对成熟 B- 细胞和 T- 细胞亚类特异的抗 -CD76 抗体；对卵泡中心 B- 细胞特异的抗 -CD77 抗体；针对细胞因子和生长因子（例如，IL1-IL13、EGF、IGF I 和 IGF II、TGF- $\alpha$  和  $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和  $\beta$ 、FGF、NGF、CIF、IFN- $\alpha$  和  $\beta$ 、CSF's）的抗体；病毒抗原（例如，乙型肝炎病毒外壳蛋白或 HIV 外壳蛋白）、激素、细胞或肿瘤相关抗原或标志、粘附分子、止血分子和内皮细胞。其它的标志和富集方法，诸如在美国专利 5,840,402 作为参考中所公开的，是同等适用的。

[0361] 实施例 13 生物反应器

[0362] 在培养人肝脏细胞祖先及其后代时，使用了高效生物反应器 (HPBR)。该装置可提供大量的用于进一步的医学目的的细胞，或者将生物反应器本身作为生产装置，生产生物学有用的细胞分泌蛋白质和因子，其中可以包括但不限于肝细胞生长因子 (HGF)、胰岛素样生长因子 I 和 II (IGF-I 和 II)、表皮生长因子 (EGF)、a 型和 b 型转化生长因子 (TGF-a 和 b)、神经生长因子 (NGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、肉瘤生长因子 (SGF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激生长因子 (GM-CSF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、促乳素和生长激素释放因子 (GHRF) 和多种造血生长因子诸如白细胞介素 (IL) IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-11 等等，红细胞分化因子 (EDF) 或促卵泡激素释放蛋白 (FRP)、抑制素、干细胞增殖因子 (SCPF) 以及活性片段、亚基、衍生物和这些蛋白质的多种组合（其中包括本领域公知的许多其它蛋白质）。通常，正如本文所用，这些细胞因子是选自细胞素、淋巴因子、白细胞介素、集落刺激因子、激素、趋化因子、抗 - 趋化因子、凝固因子、溶解血栓蛋白质、补体蛋白质。酶、免疫球蛋白和抗原的分泌蛋白质。本领域的技术人员可以从这些有生物学活性的蛋白质中，选择因子 VIII、因子 IX、因子 VII、红细胞生成素、 $\alpha$ -1- 抗胰蛋白酶、降钙素、生长激素、胰岛素、低密度脂蛋白、载脂蛋白 E、IL-2 受体及其拮抗剂、超氧化物歧化酶、免疫应答调节剂类、甲状腺激素、干扰素类 (IFN  $\alpha$ 、 $\beta$  或  $\gamma$ )、神经生长因子类、葡糖脑苷脂酶、集落刺激因子、白细胞介素类 (IL) 1-15、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、腺苷脱氨酶、胰岛素样生长因子类 (IGF-1 和 IGF-2) 促巨核细胞配体 (MPL)、血小板生成素或其组合。

[0363] 如果不对在反应器中生长细胞这个特定方法加以限制，那么本领域公知的其它方法也是同等适用的，并且从已出版的美国专利 6,001,585、5,998,184、5,846,817、5,622,857、5,571,720、5,563,068、5,512,474、5,443,985、5,342,781、5,330,915、5,320,963、5,202,254、4,833,083 和 4,760,028 此处引用，作为参考，能够容易地获得这些方法。

[0364] 本装置含有 45010kD 纤维素纤维 540 聚丙烯纤维，并且关于其它参数的详细情况，参见例如，美国专利 5,622,857。细胞按上面所公开进行分离。所需要的所有材料均从

Sigma Chemical Co. 或 Life Technologies 获得。长期培养用的贴壁培养液,成分如下 : RPMI 1640 (500mL)、50mL (10%) FBS、4mM L-谷氨酰胺、1× 青霉素 / 链霉素、庆大霉素、15mM HEPES、10mU/mL 胰岛素、10mU/mL 转铁蛋白、硒。在加入贴壁培养液之前,用培养液冲刷 HPBR 一天。将 500mg 预膨胀的 Cytodex 3 微载体接种到 HPBR 的内环形空间中。充氧器纤维支撑着微载体并防止其分散到整个 ECS。将活的人肝祖先也接种到内环形空间中,并用手摇晃该装置,实现细胞和微载体的均一混合。假定祖先和后代的直径大小为 10–20 μ m,则细胞对微载体的接种比例为大约 500。细胞和微载体的表观粘度快速增加,就表示细胞对微载体和细胞对细胞的贴附正在快速正常地进行着。如此混合 2–3 分钟内,就在内环形空间中形成了一个不连续的细胞与微载体凝胶。在贴壁培养液中 37°C 温育过夜 (静置培养) 后,将培养液换为长期培养液 (2L)。因为本领域的技术人员可以容易地将生产按比例扩大到所希望的水平,所以不以任何方式限制这些体积。将肝细胞培养 5 周,每周于该系统中加入新鲜培养液。通过测试每天的样品,监测细胞的代谢功能。5 周后,活细胞和微载体的回收率达到 > 90%,做法如下 : 将与 0.44mL (0.23M) EDTA 混合的 0.1% 胶原酶 (于 PBS 中) 用于冲刷 ECS,并温育 HPBRr 10 分钟。用无菌空气经过一个注射筒将 ECS 中的内容物排出 ; 用长期培养液重复此过程,并将该物质收集、冲洗和分离。

[0365] 该 HPBR 在细胞的培养和遗传转化方面同等适用 (例如, HGF 基因表达)。下面是对贴壁依赖细胞 (例如, SW 480P3、ATCC#CCL228) 的一个非病毒遗传转化方法 ; 当使用培养孔和培养皿时,本领域的那些技术人员可根据公开出版的方法,对其进行适当的修改并最佳化。在 HPBR 中,优选具有 10kD 性质的培养液纤维。生物反应器的操作方式,与上述完全相同。Cytodex 1 微载体 (Pharmacia, 由 Sigma Chemical Co. 出售) 广泛地用于培养贴壁依赖细胞。接种到 HPBR 的 ECS 中的细胞密度范围很宽,从  $1 \times 10^4$  到  $1 \times 10^{15}$  个细胞,或者根据需要可更高。建议的细胞对微载体的接种比例在大约 10 左右,尽管本领域的技术人员可以根据需要修改这个数值。在整个实验过程中,缓缓转动该装置,大约 10 转 / 分钟 (或者更大)。在培养细胞大约一天或者更长,这取决于特定的细胞后,达到最佳生长汇合,以获得高效转染。可以对细胞对微载体的接种比例进行调节,从而有益地影响该时间框架,达到更好的治疗效率和经济效益。在转染的当天,制备 DNA 质粒溶液 (例如, pCMV) 和阳离子脂质溶液 (例如, LIPOFECTIN Reagent, Life Technologies)。这些试剂必须是无血清的,即便是整个过程要求有血清存在。将适当量的 DNA 和脂质溶液混合,接着将该混合液注射到该装置的 ECS 内。在转染后大约几个小时 (或者甚至数个小时),恢复使用血清,如果合适的话,然后跟以前一样继续培养细胞大约几天。当扩增永生地转化的细胞时,可以培养更长的周期。收获细胞的方式跟前面所描述相似。

#### [0366] 实施例 14 人工肝脏

[0367] 作为上面实施例的一个延伸,本领域的技术人员能够容易地利用生物反应器,作为体外的肝脏支持系统。异种移植 (在物种间移植器官),通过使用动物器官,可以帮助缓解供体肝脏的短缺。然而,将动物器官移植到人类中的一个潜在危险是 : 感染供体动物的病毒可能会感染器官接受者。由于器官移植接受者可能需要通过吃药来抑制免疫系统和预防器官排斥,所以他们可能无法战胜感染动物的病毒。更加可怕的情况是 : 动物病毒可能会在感染的宿主中,突变为能够感染具有正常免疫系统的人类的形式。结果是,出现了新的人类病原病毒。对于人类器官移植,受欢迎的动物品种为猪,还有灵长类。不过,如果有基于人

细胞的人工肝脏可用的话，显然要比动物肝脏更好。

[0368] 在培养液中培养所希望的时间后，就获得了源自富集肝脏祖先群的成熟肝细胞和/或胆管细胞。通常，可获得 20-50 亿个高存活率（大于 80%）的细胞。一般情况下，所使用的培养液为补充了激素的 Waymouth 培养液。为了容纳 20-50 亿个细胞，将生物反应器按比例放大到两个容器，每一个的内径为 40mm、高度为 100mm。在这种特定情况下，使用直径大约为 2mm 的玻璃珠，每一个容器所使用的总体积为 250ml。培养液的供给循环速率为 360ml/min。肝细胞的高活性通过其稳定的耗氧速率得到证实。由于彻底的肝衰竭，其肝脏已被外科手术摘除，接着将生物反应器与无肝的接受者人连接。类似地，将生物反应器与肝脏功能异常的受治疗人连接。专业人员将知道把生物反应器作为体外的肝支持系统的连接方法，或者为本领域所公知的替代手段诸如在，参见如，美国专利 6,008,049、5,981,211、5,976,870、5,891,713、5,827,729、5,643,794、5,622,857、5,605,835 和 5,270,192。从这些参考文献可以明显看出，不一定要将作为供体的人工全肝脏细胞限制为人类这个种，并且现在跨种使用这些细胞是可能的。例如，来自猪或者灵长类的全肝脏细胞同等适用于人。同样明显的是，本发明的方法和组合物，除了具有所伴随的所有优越性之外，还可以制备用于细胞治疗或体外肝脏治疗的人全肝脏细胞。

[0369] 将来自左股动脉的血液导向 Minntech 血液浓缩器。将一个 12 fringe elecath 插管插入到股动脉内并通过 1/4 英寸的 PVC 连管与血液浓缩器连接。血液浓缩器将血液分离为无细胞超滤液分级分离部分和血细胞分级分离部分。血细胞分级分离部分通过一个类似的连管被送回到股静脉。超滤液通过 1/4 英寸的 PVC 连管从血液浓缩器中流出，然后使用滚筒式泵并将流速调整为 40ml/min，使流出的超滤液进入肝细胞生物反应器系统。超滤液在经过生物反应器灌注后，通过左颈静脉被送回到患者中。为了证实体外肝代谢的供给，将已知是由肝脏代谢的两个不同化合物，7-乙氧基香豆素和利度卡因盐酸盐，经生物反应器的入口施入到超滤液中。在超滤液回到患者之前，在生物反应器的出口测定其相应的代谢物，7-OH- 香豆素和一乙基甘氨酸二甲代苯胺 (MEGX)。结果发现 7-乙氧基香豆素和利度卡因盐酸盐都发生了显著的代谢。因而，这些结果证实了生物反应器可作为支持系统使用，它提供了体外肝脏代谢。将血细胞与血浆分离最大程度地减小了受治疗者对外源肝细胞的免疫反应。因而，肝祖先以及它们的后代可用于生物反应器，提供体外的肝支持。

[0370] 实施例 15 外显子 1 编码的肽及其用作抗原

[0371] 与甲胎蛋白外显子 1 相应的短肽，被明确地用于辨别多种细胞系中的甲胎蛋白，通过采用特定的抗体评价其表达。外显子 1 编码的肽序列为：

[0372] SEQ. ID14 MKWVESIFLIFLLNFTESRTLHRNEYGI

[0373] 这些氨基酸也可以用字母串诸如 ABCDEFGHIGKLMNOPQRSTUVWXWZ 来表示，这样该字母串中的字母 A 从肽的 M、K、W、V、E、S、I、F、L、I、F、L、L 或 N 位置起始。将外显子 1 所编码的序列而且长度在 4 到 12 个氨基酸残基之间的肽缀合到大分子，生成抗原。任选地，通过长度为 2-8 个碳原子的间隔臂将肽连接到大分子。大分子是清蛋白、血蓝蛋白、酪蛋白、卵清蛋白或多聚赖氨酸。合适的肽包括表中的肽以及同源性为至少 80% 的类似物，或者标准的替代氨基酸。下面就是本领域的技术人员解释根据特定的需要来获得所希望的肽序列和肽长度的例子。

[0374] A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,

- [0375] A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,
- [0376] A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L,
- [0377] A--B--C--D--E--F--G--H--I--J--K,
- [0378] A--B--C--D--E--F--G--H--I--J,
- [0379] A--B--C--D--E--F--G--H--I,
- [0380] A--B--C--D--E--F--G--H,
- [0381] A--B--C--D--E--F--G,
- [0382] A--B--C--D--E--F,
- [0383] A--B--C--D--E,
- [0384] A--B--C--D,
- [0385] B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,
- [0386] B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,
- [0387] B--C--D--E--F--G--H--I--J--K--L,
- [0388] B--C--D--E--F--G--H--I--J--K,
- [0389] B--C--D--E--F--G--H--I--J,
- [0390] B--C--D--E--F--G--H--I,
- [0391] B--C--D--E--F--G--H,
- [0392] B--C--D--E--F--G,
- [0393] B--C--D--E--F,
- [0394] B--C--D--E,
- [0395] C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,
- [0396] C--D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,
- [0397] C--D--E--F--G--H--I--J--K--L,
- [0398] C--D--E--F--G--H--I--J--K,
- [0399] C--D--E--F--G--H--I--J,
- [0400] C--D--E--F--G--H--I,
- [0401] C--D--E--F--G--H,
- [0402] C--D--E--F--G,
- [0403] C--D--E--F,
- [0404] D--E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,
- [0405] D--E--F--G--H--I--J--K--L--M,
- [0406] D--E--F--G--H--I--J--K--L,
- [0407] D--E--F--G--H--I--J--K,
- [0408] D--E--F--G--H--I--J,
- [0409] D--E--F--G--H--I,
- [0410] D--E--F--G--H,
- [0411] D--E--F--G,
- [0412] E--F--G--H--I--J--K--L--M--N,
- [0413] E--F--G--H--I--J--K--L--M,

- [0414] E--F--G--H--I--J--K--L,
- [0415] E--F--G--H--I--J--K,
- [0416] E--F--G--H--I--J,
- [0417] E--F--G--H--I,
- [0418] E--F--G--H,
- [0419] F--G--H--I--J--K--L--M--N,
- [0420] F--G--H--I--J--K--L--M,
- [0421] F--G--H--I--J--K--L,
- [0422] F--G--H--I--J--K,
- [0423] F--G--H--I--J,
- [0424] F--G--H--I,
- [0425] G--H--I--J--K--L--M--N,
- [0426] G--H--I--J--K--L--M,
- [0427] G--H--I--J--K--L,
- [0428] G--H--I--J--K,
- [0429] G--H--I--J,
- [0430] H--I--J--K--L--M--N,
- [0431] H--I--J--K--L--M,
- [0432] H--I--J--K--L,
- [0433] H--I--J--K,
- [0434] I--J--K--L--M--N,
- [0435] I--J--K--L--M,
- [0436] I--J--K--L,
- [0437] J--K--L--M--N,
- [0438] J--K--L--M,
- [0439] K--L--M--N 等等。

[0440] 其中, A--B--C--D--E--F--G--H--I--G--K--L--M- 或 N 中的任一, 可以是非极性的氨基酸 (疏水性的)

- [0441] 诸如甘氨酸 Gly G
- [0442] 丙氨酸 Ala A
- [0443] 缬氨酸 Val V
- [0444] 亮氨酸 Leu L
- [0445] 异亮氨酸 Ile I
- [0446] 甲硫氨酸 Met M
- [0447] 苯丙氨酸 Phe F
- [0448] 色氨酸 Trp W
- [0449] 脯氨酸 Pro P
- [0450] 或极性 (亲水性的)
- [0451] 丝氨酸 Ser S

- [0452] 苏氨酸 Thr T
- [0453] 半胱氨酸 Cys C
- [0454] 酪氨酸 Tyr Y
- [0455] 天冬酰胺 Asn N
- [0456] 谷氨酰胺 Gln Q
- [0457] 或带电荷的（负）
- [0458] 天冬氨酸 Asp D
- [0459] 谷氨酸 Glu E
- [0460] 或带电荷的（正）
- [0461] 赖氨酸 Lys K
- [0462] 精氨酸 Arg R
- [0463] 组氨酸 His H
- [0464] 或不存在。该字母串可包含可接受的氨基酸替代物或其盐类。最常见的氨基酸替代为 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly，并且反之相同。

[0001]

## 序列单

&lt;110&gt; Reid, Lola

&lt;120&gt; 人肝脏祖先

&lt;130&gt; 113918.101

&lt;140&gt; 新的

&lt;141&gt; 2000-01-19

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

accatgaagt gggtggaatc

20

[0002]

## 序列单

&lt;110&gt; Reid, Lola

&lt;120&gt; 人肝脏祖先

&lt;130&gt; 113918.101 序列 2

&lt;140&gt; 新的

&lt;141&gt; 2000-01-19

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

cctgaagact gttcatctcc

20

[0003]

## 序列单

<110> Reid, Lola

<120> 人肝脏祖先

<130> 113918.101 序列 3

<140> 新的

<141> 2000-01-19

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

taaacccctgg tgttggccag

20

[0004]

## 序列单

<110> Reid, Lola

<120> 人肝脏祖先

<130> 113918-101 序列 4

<140> 新的

<141> 2000-01-19

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

atttaaactc ccaaagcagc ac

22

[0005]

## 序列单

<110> Reid, Lola

<120> 人肝脏祖先

<130> 113918.101 序列 5

<140> 新的

<141> 2000-01-19

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

c~~t~~ccatatt ggattttac caatg

25

[0006]

## 序列单

<110> Reid, Lola

<120> 人肝脏祖先

<130> 113918.101 序列 6

<140> 新的

<141> 2000-01-19

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

ggctaccata ttttttgc~~cc~~ ag

22

[0007]

## 序列单

<110> Reid, Lola

<120> 人肝脏祖先

<130> 113918.101 序列 7

<140> 新的

<141> 2000-01-19

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

ctacaccttgcct ttctggaaaga ac

22

[0008]

## 序列单

<110> Reid, Lola

<120> 人肝脏祖先

<130> 113918-101 序列 8

<140> 新的

<141> 2000-01-19

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

gagatagcaa gaaggcatcc c

21

[0009]

## 序列单

<110> Reid, Lola

<120> 人肝脏祖先

<130> 113918-101 序列 9

<140> 新的

<141> 2000-01-19

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

aaagaattaa gagaaagcag cttg

24

[0010]

## 序列单

<110> Reid

<120> 人肝脏祖先

<130> 序列 10

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

ggcacaaatga agtgggtaac c

21

[0011]

## 序列单

<110> Reid

<120> 人肝脏祖先

<130> 序列 11

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

ccataggttt cacgaagagt tg

22

[0012]

## 序列单

&lt;110&gt; Reid

&lt;120&gt; 人肝脏祖先

&lt;130&gt; 序列 12

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

gccagtaagt gacagagtca c

21

[0013]

## 序列单

<110> Reid

<120> 人肝脏祖先

<130> 序列 13

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

ttataaggcct aaggcagctt gac

23

[0014]

## 序列单

<110> Reid

<120> 人肝脏祖先

<130> 序列 14

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

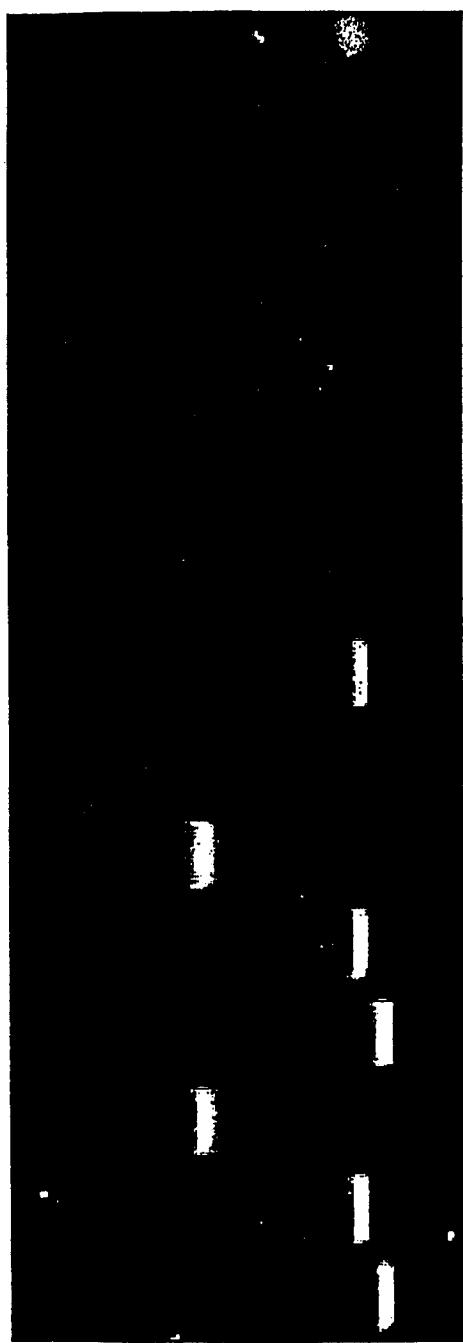
<213> 智人

<400> 1

Met Lys Trp Val Glu Ser Ile Phe Leu Ile Phe Leu Leu Asn Phe Thr  
1 5 10 15

Glu Ser Arg Thr Leu His Arg Asn Glu Tyr Gly Ile  
20 25

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



5' 引物	hAFP1	hAFP3	hAFP1
3' 引物	hAFP2	hAFP4	hAFP4
靶外显子 (DNA 长度)	1~3 (257bp)	12~14 (355bp)	1~14 (1836bp)
Hep3B	1	2	3
HepG2	4	5	6
K562	7	8	9
STO	10	11	12
无 cDNA	13	14	15

图 1



5' 引物	hALB1	hALB3	hALB1
3' 引物	hALB2	hALB4	hALB4
靶外显子 (DNA 长度)	1~4 (333bp)	12~14 (358bp)	1~14 (1836bp)
HepG2	1	2	3
Hep3B	4	5	6
K562	7	8	9
STO	10	11	12
无 cDNA	13	14	15

图 2

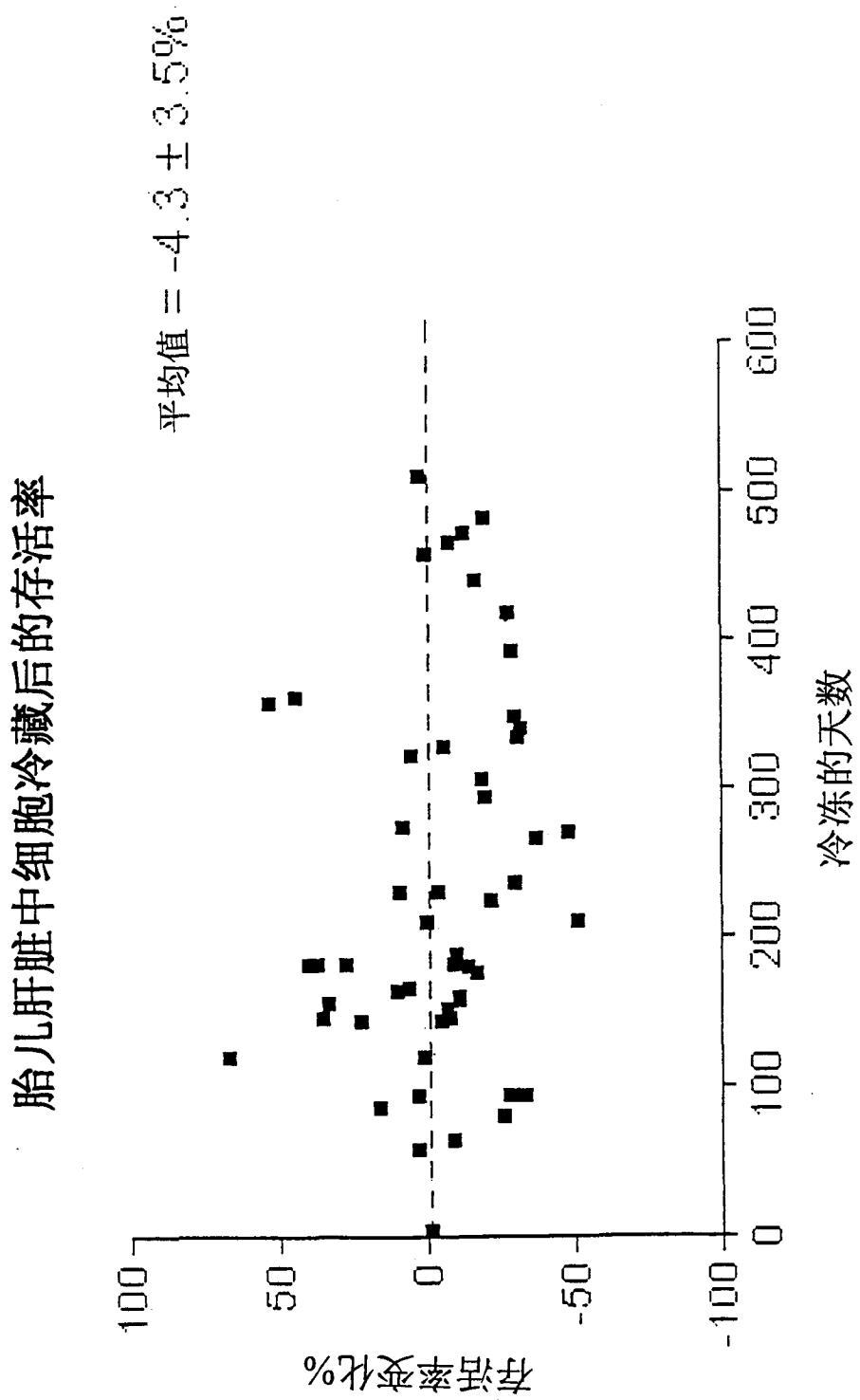


图 3

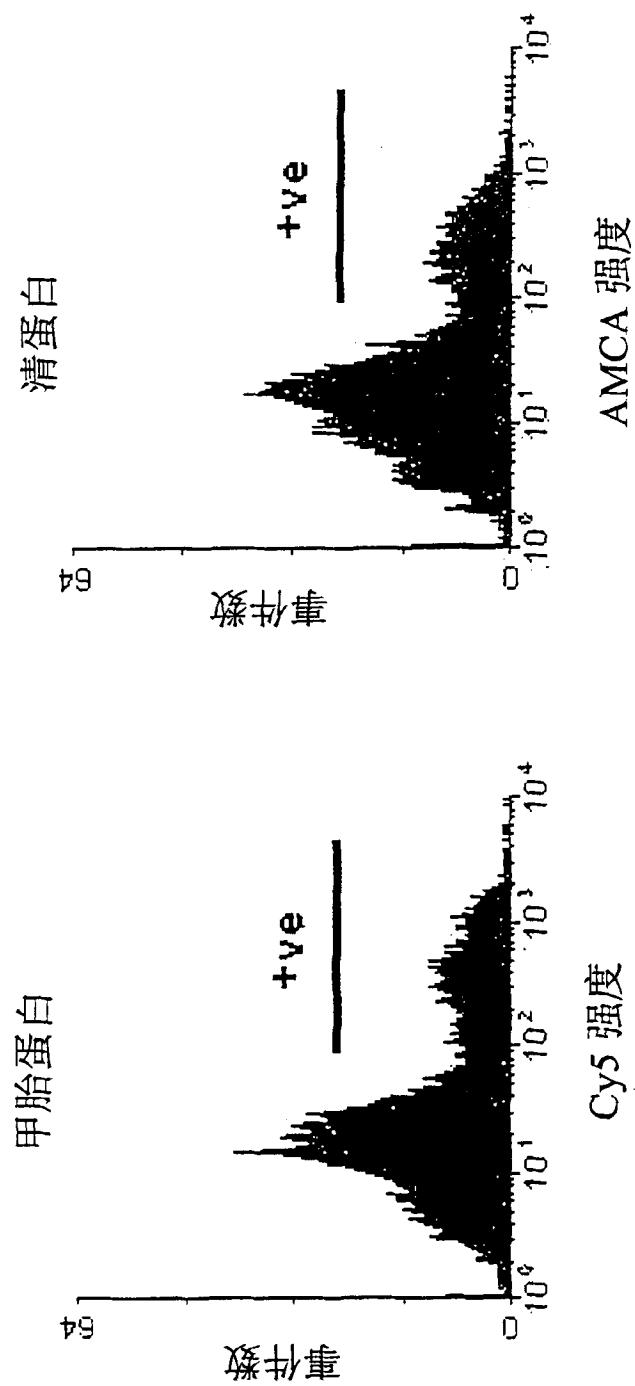


图 4

### 肝细胞悬浮液上表面标志的表达

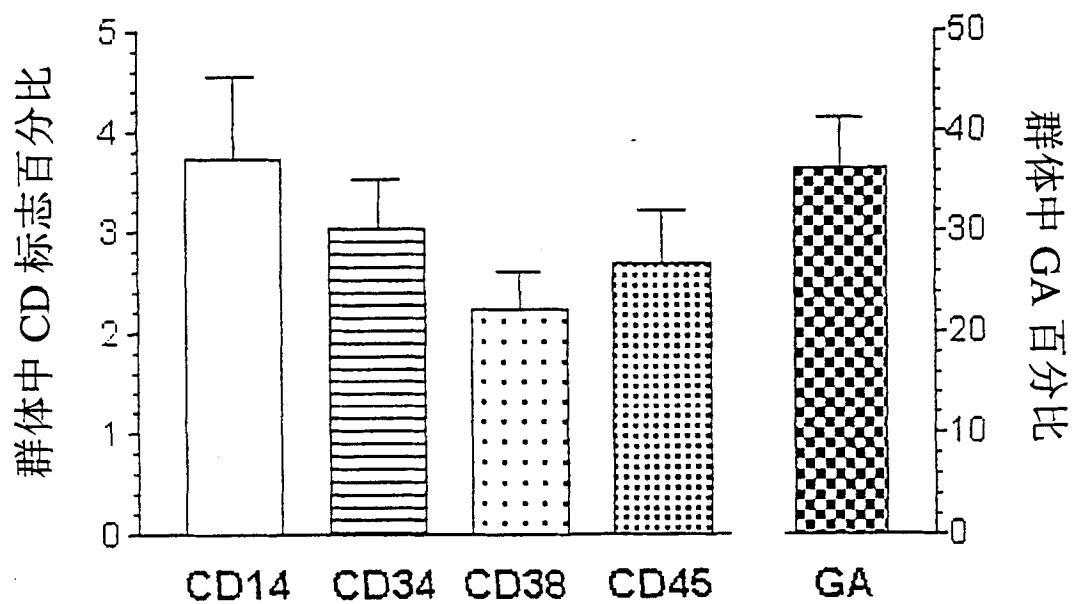


图 5

## 胎儿肝脏中细胞表面抗原 和甲胎蛋白的共表达

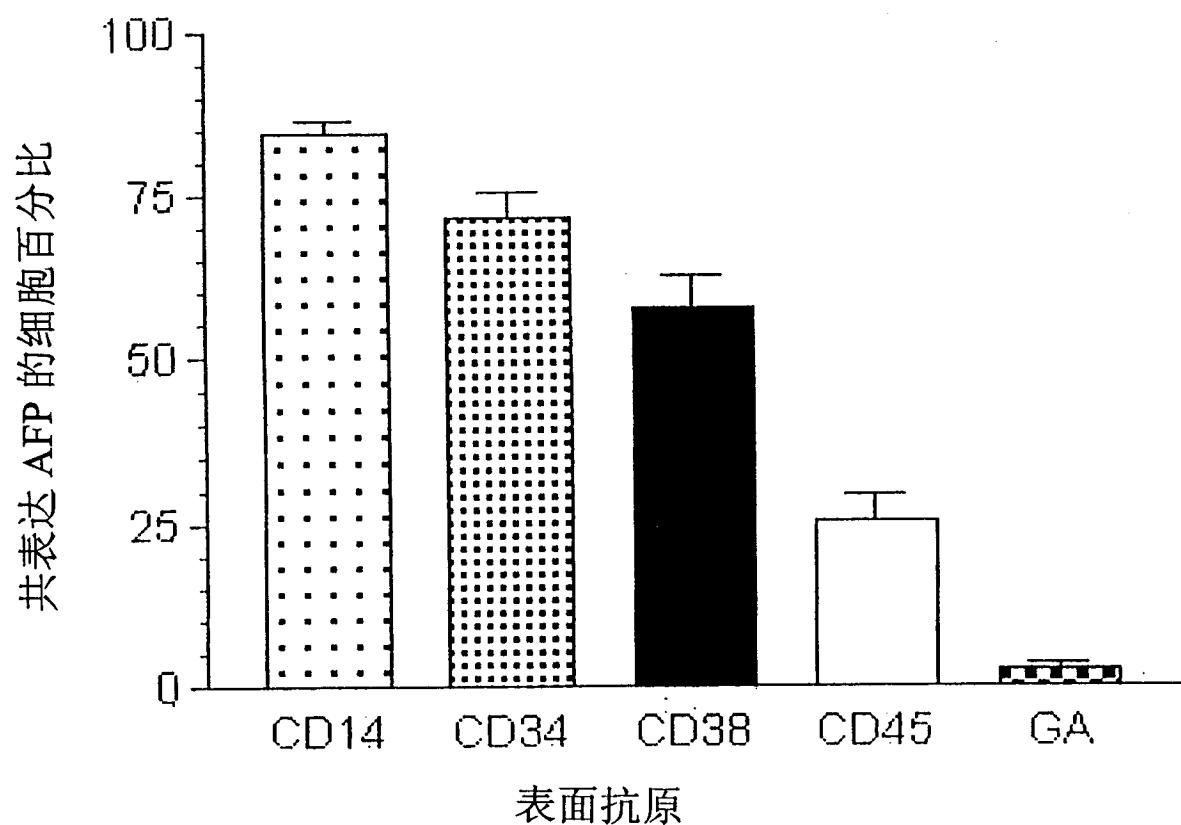


图 6

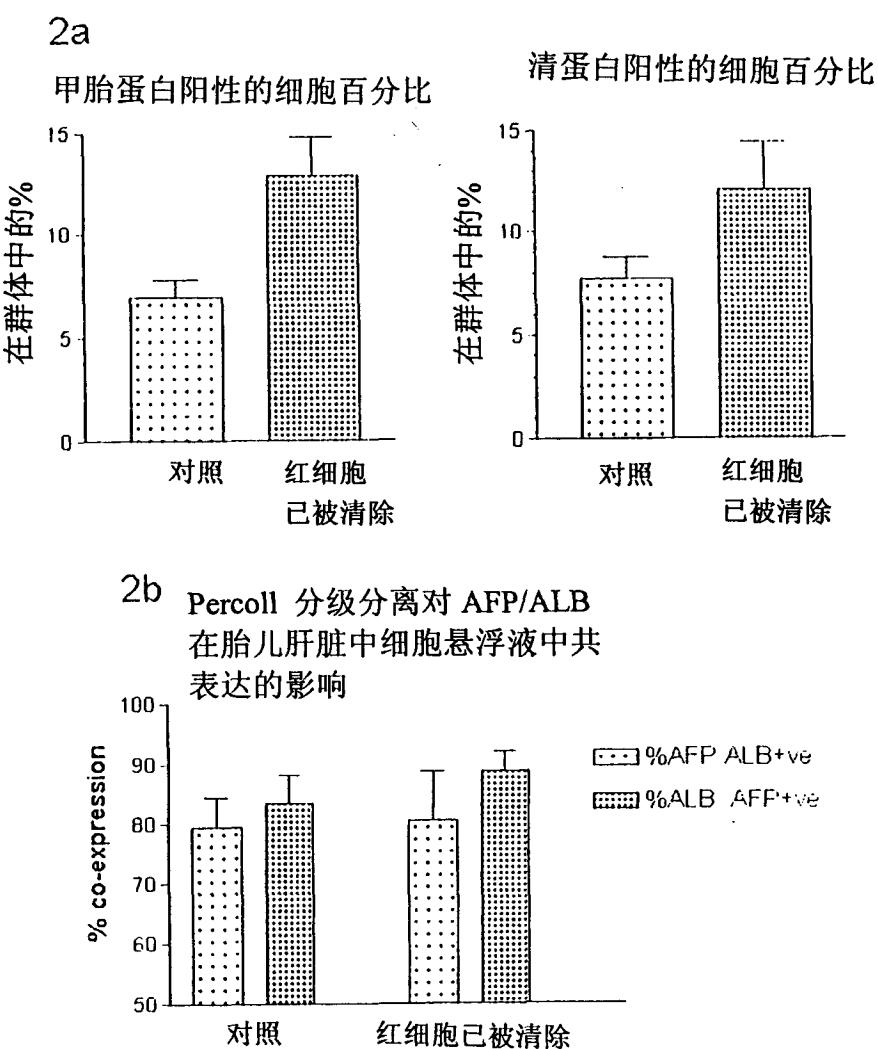


图 7

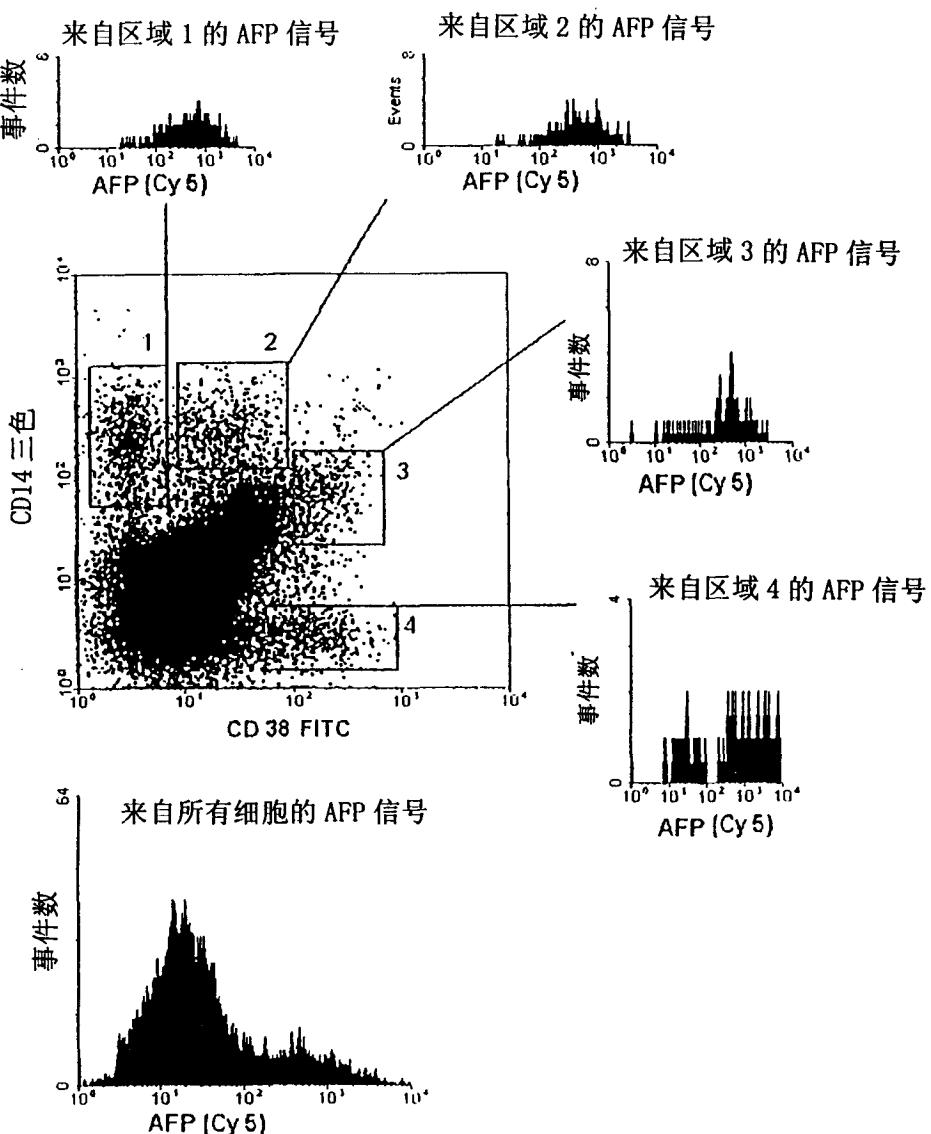
**3**

图 8

## 4

## 使用 CD14 和/或 CD38, AFP+ve 细胞的产率

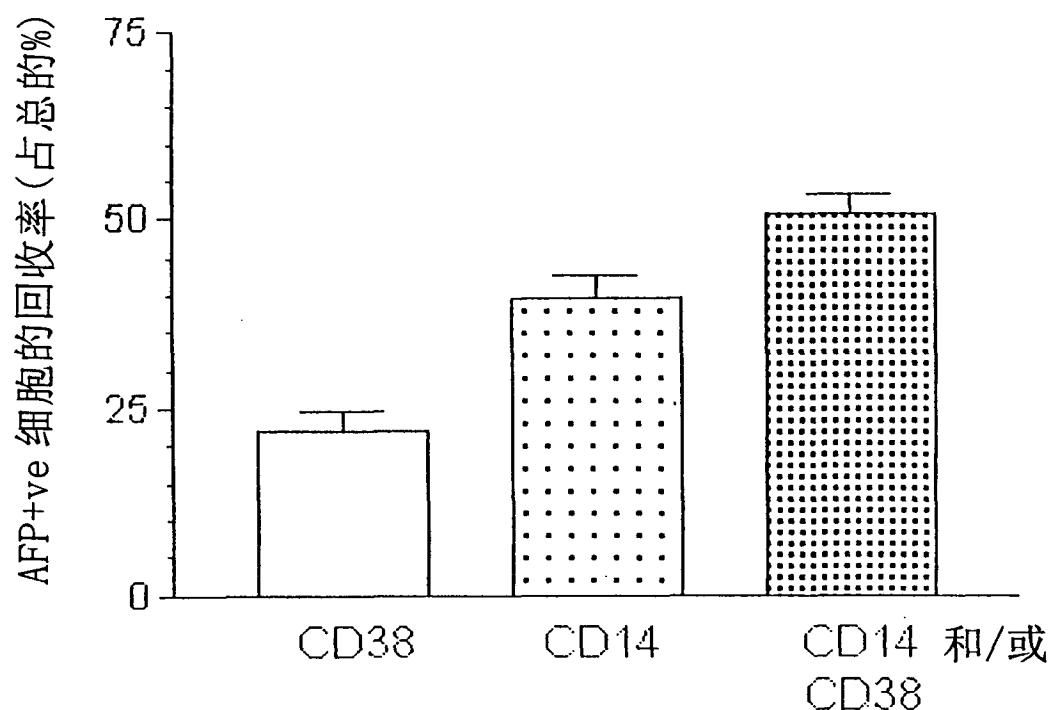


图 9

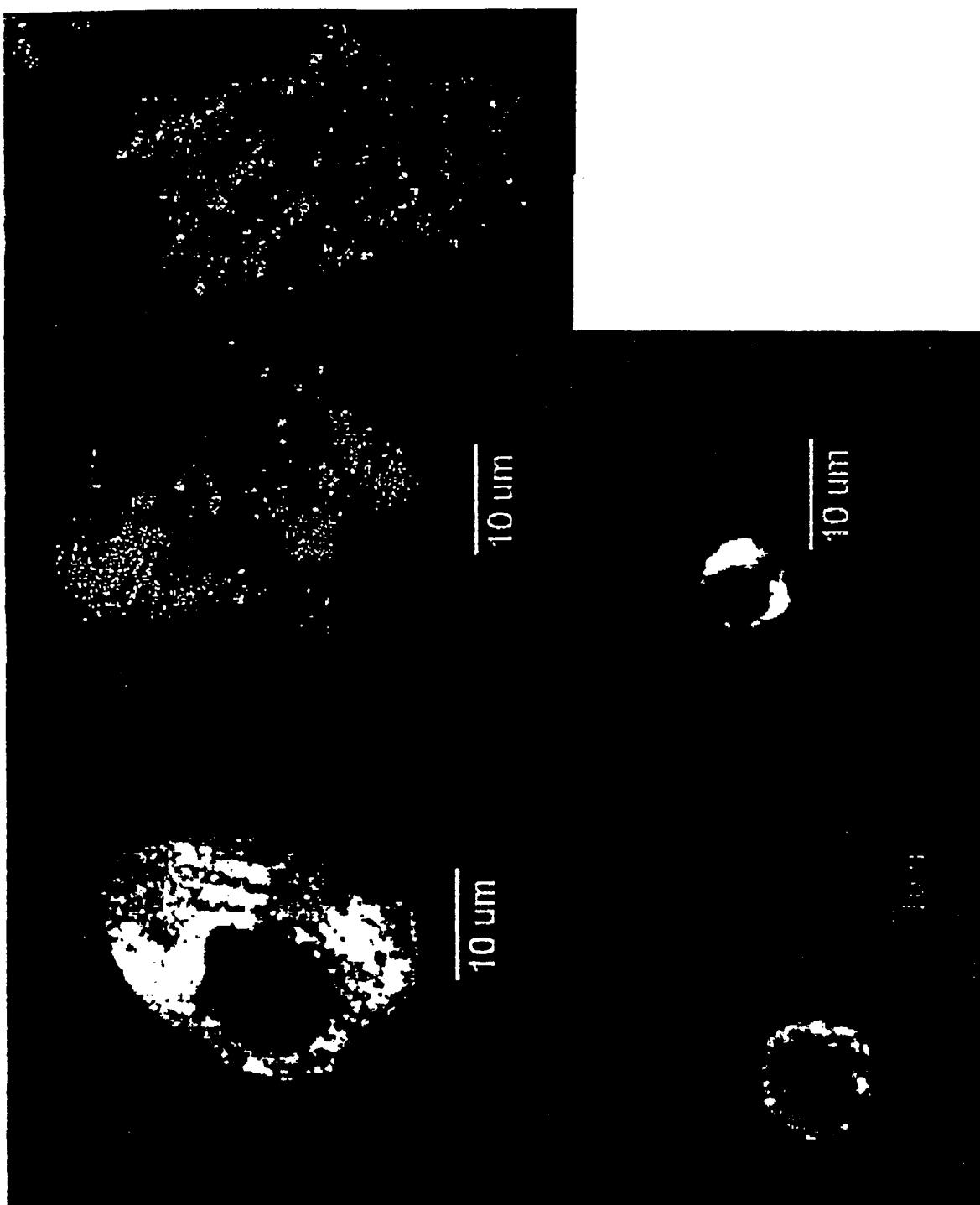
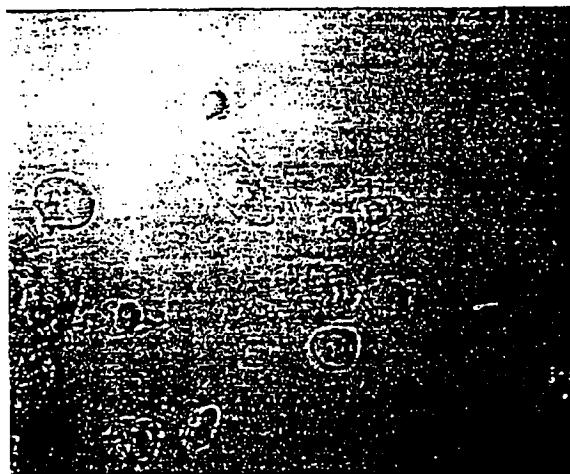
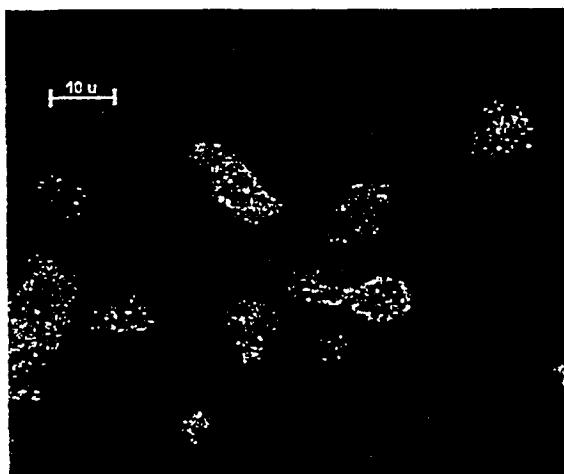
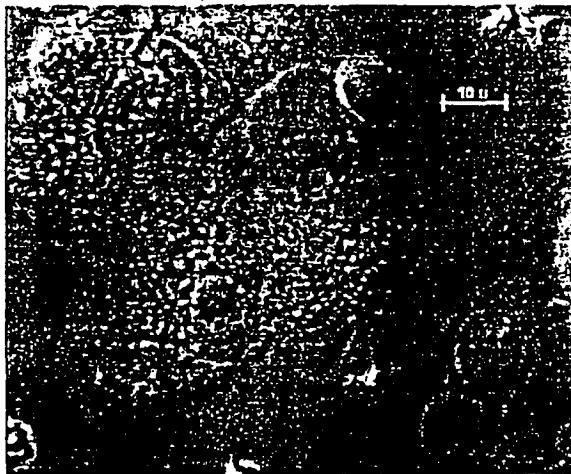


图 10

表面抗原阴性



CD14 阳性



上：细胞的 DIC 图像

下：AFP 免疫荧光

图 11

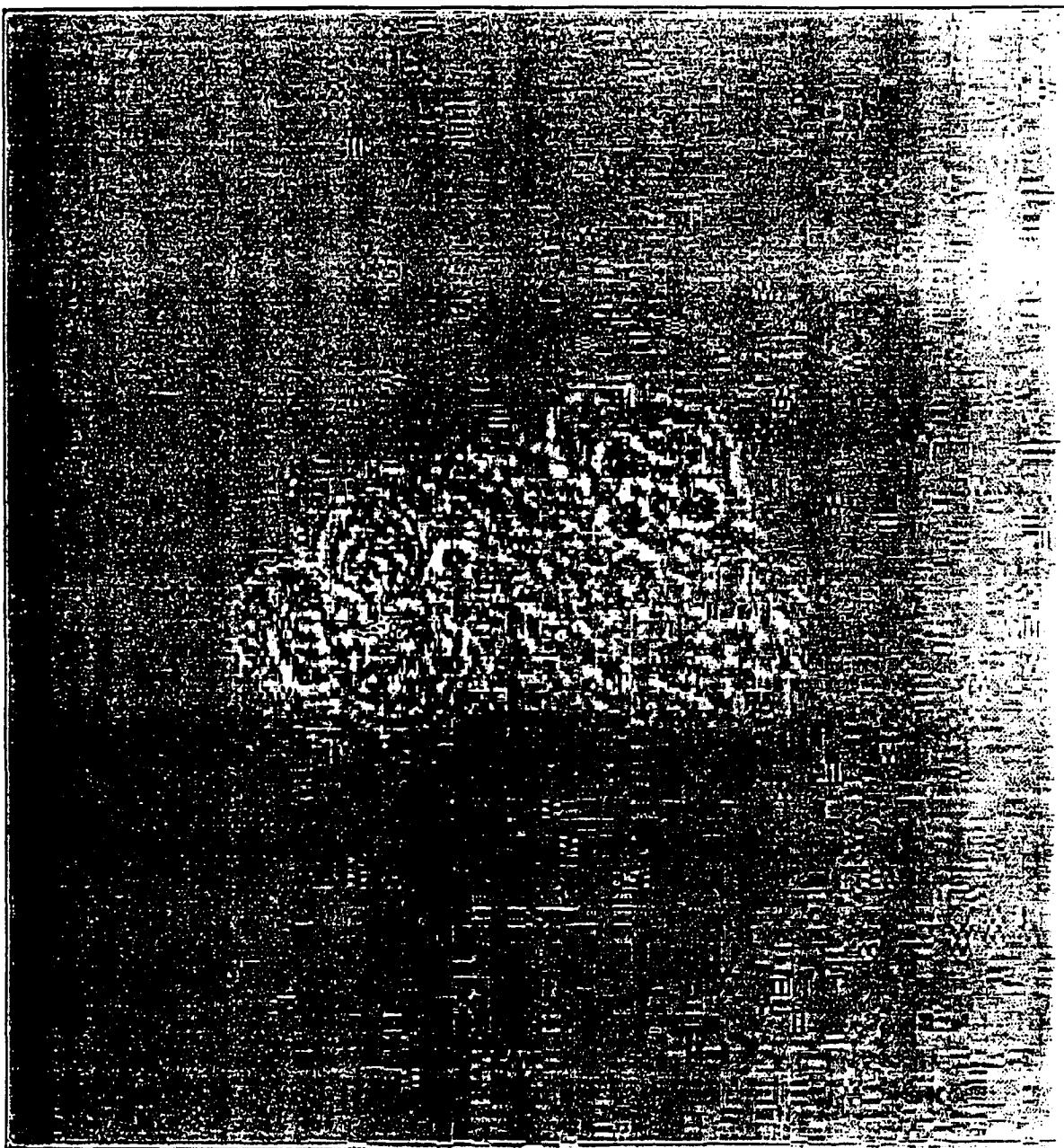


图 12a

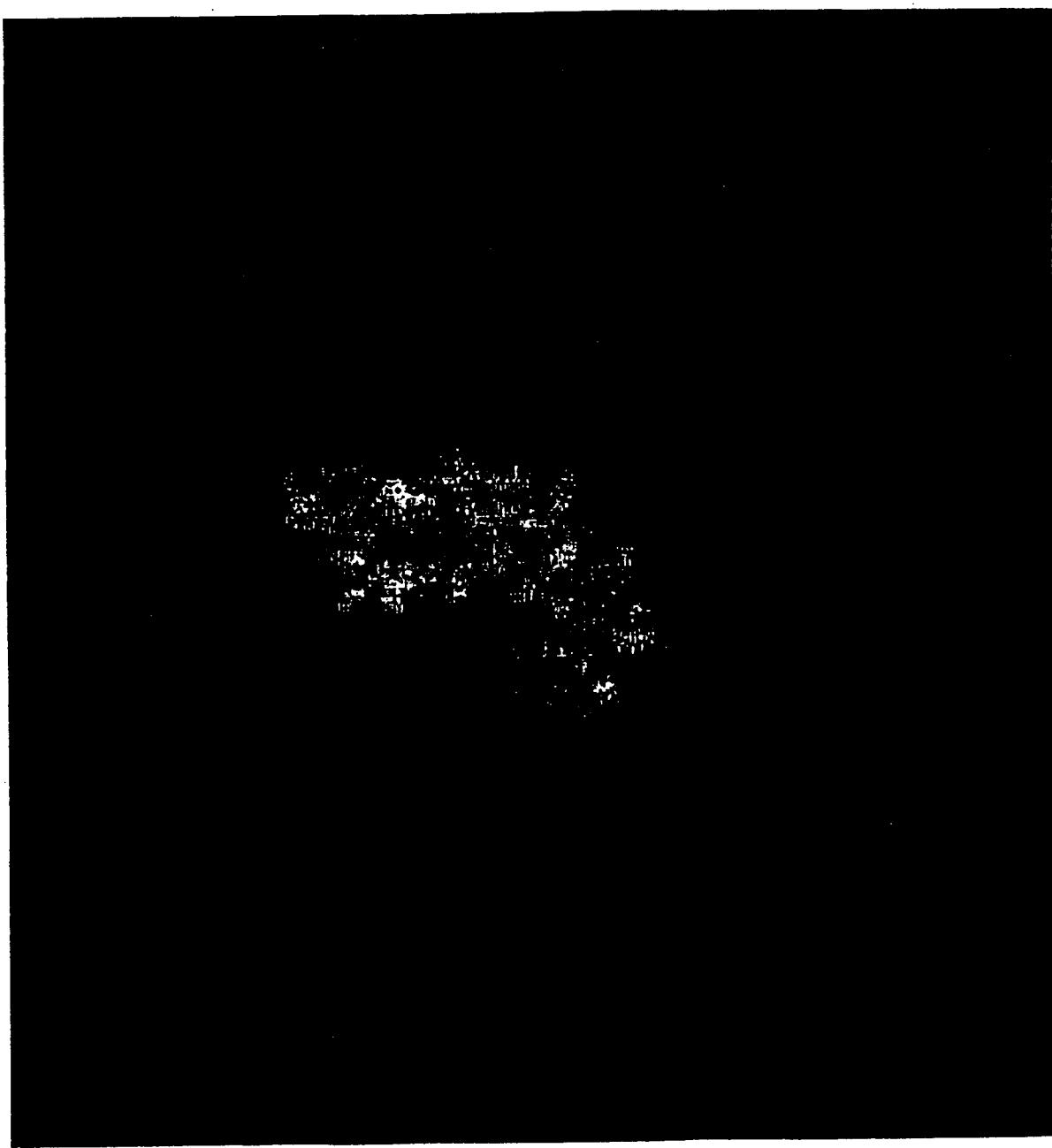


图 12b

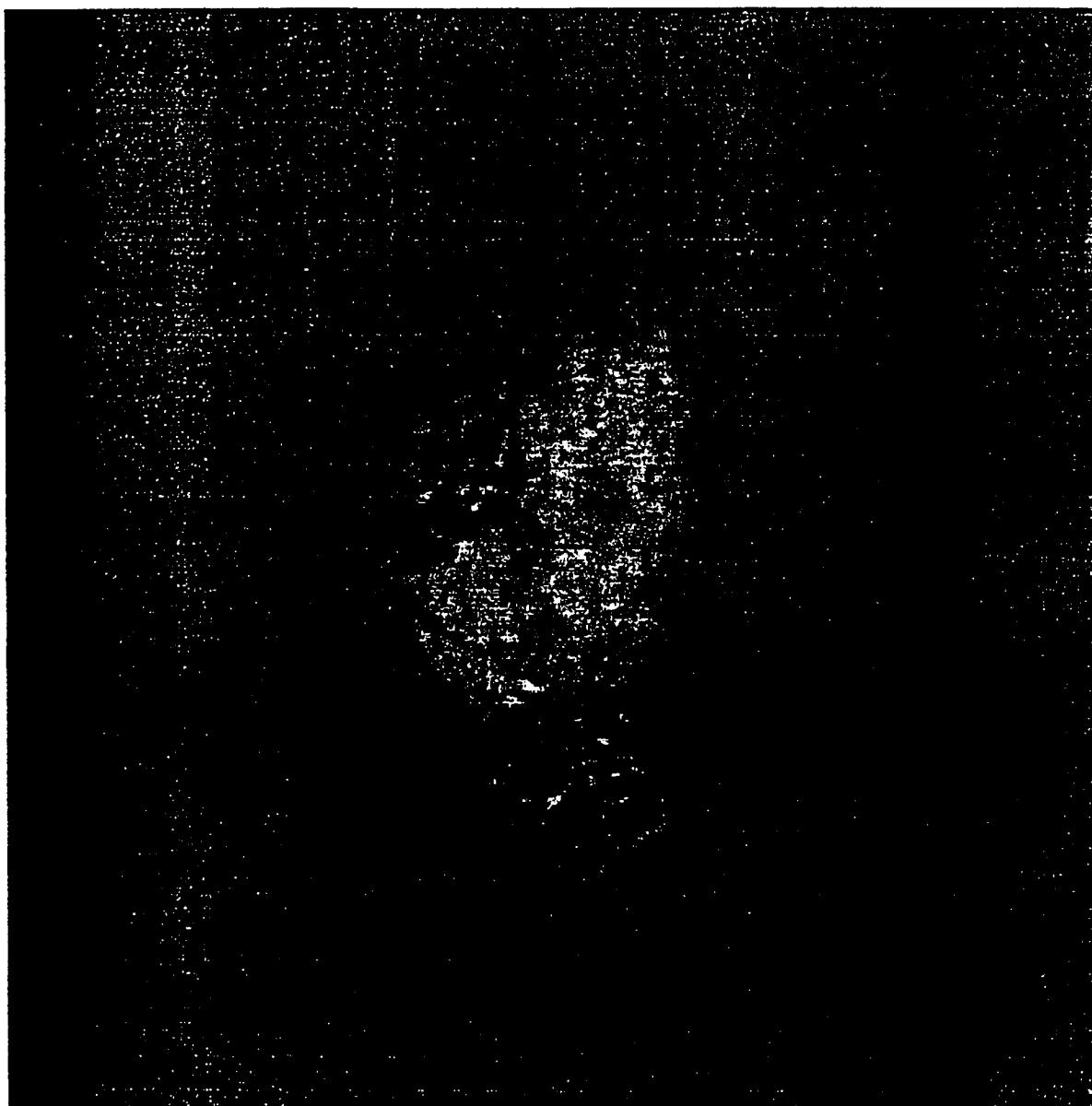


图 12c

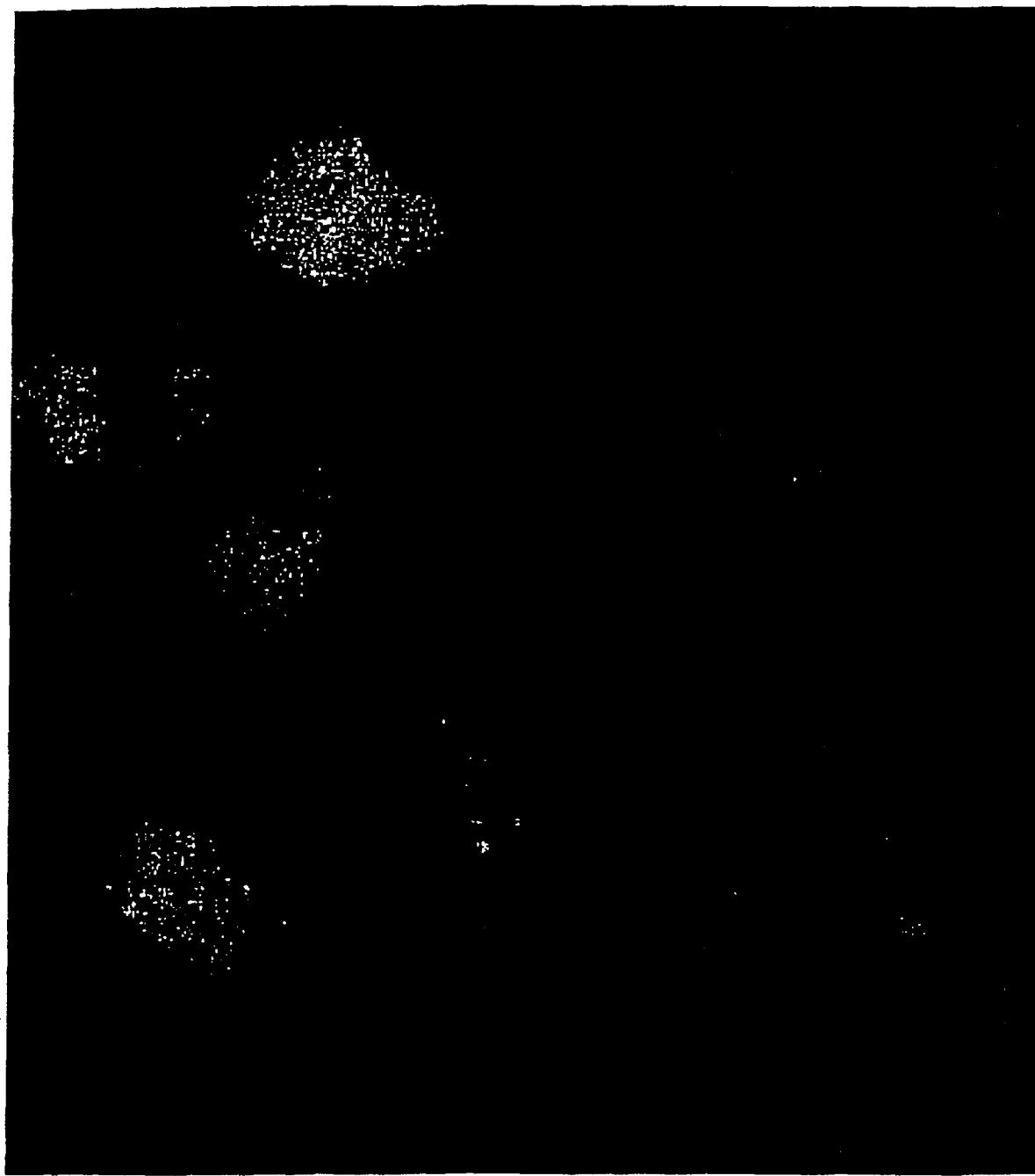


图 13a

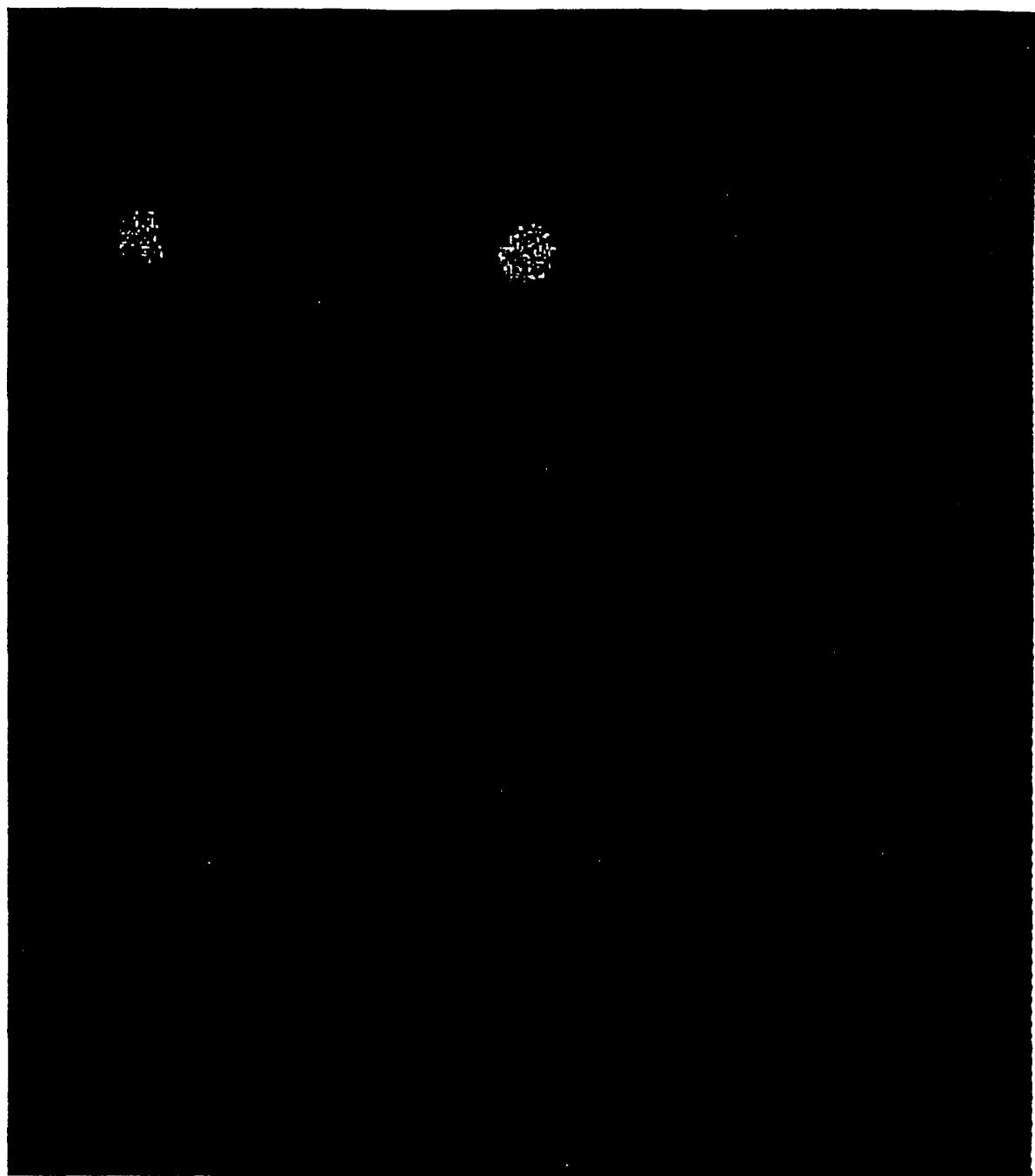


图 13b

专利名称(译)	人肝脏祖先		
公开(公告)号	<a href="#">CN1351656B</a>	公开(公告)日	2012-02-29
申请号	CN00804990.4	申请日	2000-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	查珀尔希尔北卡罗来纳大学		
申请(专利权)人(译)	查珀尔希尔北卡罗来纳大学		
当前申请(专利权)人(译)	查珀尔希尔北卡罗来纳大学		
[标]发明人	LM雷德 H库博达 N莫斯		
发明人	L·M·雷德 H·库博达 N·莫斯		
IPC分类号	C12N5/08 C12N5/10 A61K35/407 A01N1/02 A61P1/16 A61P35/00 G01N33/53 A61K35/12 A61K48/00 A61P7/00 C12N5/00 C12N5/074 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68		
CPC分类号	C12N5/0672 C12N2500/25 C12N2503/02 C12N2500/22 A61K35/12 C12N2500/20 C12N2500/36 A61K2039/55594 A61P1/00 A61P1/16		
代理人(译)	程伟		
优先权	60/116331 1999-01-19 US		
其他公开文献	CN1351656A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明公开了分离和低温保藏人肝脏祖先的多种方法，其中包括：处理人肝脏组织以提供基本上是单细胞的悬浮液，该悬浮液包含存在于人肝脏的一种或多种细胞谱系的祖先和非祖先；将悬浮液进行缩小体积处理，该步骤显著地减少悬浮液中非祖先的数量从而提供富集祖先的悬浮液，这些祖先显示与一种或多种细胞谱系中的至少一种相关的一种或多种标志；然后从所述的缩小体积悬浮液选择这样的细胞，这些细胞本身、它们的后代或者其更成熟形式表达与一种或多种细胞谱系中的至少一种相关的一种或多种标志。这些标志包括CD14、CD34、CD38、CD45和ICAM。肝祖先的特征为直径6-15μm、二倍体、血型糖蛋白A-、CD45-、AFP+++、ALB+、ICAM+，并且肝祖先亚群在CD14+、CD34++、CD38++、CD117++和ICAM+的表达方面有变化。这些祖先亚群细胞具有所期望的特征在于在肝脏细胞和基因治疗中以及对建立人工生物器官特别有用。

区带	1	2	3
倍性	二倍体细胞	四倍体细胞	四倍体细胞和八倍体细胞的混合
平均大小	7-20 μ	20-30 μ	30-50 μ
生长	最快	中间	可忽略不计
细胞外基质	基质化学梯度位于迪塞间隙，包括与门周的层粘素和硫酸乙酰肝素蛋白多糖混合的IV型胶原，并在中央周围地区转变为原纤维胶原、纤维结合素和肝素蛋白多糖		
基因表达	早	中间	晚