

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 5/06

C12N 1/38 A61K 35/39

A61L 27/00 G01N 33/50

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01807876.1

[43] 公开日 2003 年 6 月 18 日

[11] 公开号 CN 1425061A

[22] 申请日 2001.4.10 [21] 申请号 01807876.1

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 10 [33] US [31] 09/546,577

[86] 国际申请 PCT/US01/40487 2001.4.10

[87] 国际公布 WO01/77300 英 2001.10.18

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.10

[71] 申请人 雷文生物技术公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 P·E·罗伯特兹 J·P·马瑟

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 8 页

[54] 发明名称 人胰上皮祖细胞及其分离和使用方  
法

[57] 摘要

本发明公开了基本纯的人胰祖细胞群体，以及分离和培养胰祖细胞的方法。通过小心操作胰祖细胞的微环境，可以得到多次传代，其中胰祖细胞不衰老且能够成为有功能的外分泌或内分泌细胞。另外，本文还公开了使用人胰祖细胞的几种方法。

1. 基本纯的人胰祖细胞群体，其中所述胰祖细胞已经由自人胎胰组织分离的细胞的原代培养物进行了传代培养，且其中所述胰祖细胞群体保留了分化成腺泡、导管、或胰岛细胞并形成具有外分泌和内分泌细胞二者的胰组织的多能性。
2. 依照权利要求1的胰祖细胞，其中在不含血清的培养基中分离和培养胰祖细胞。
3. 依照权利要求1的胰祖细胞，其中所述胰祖细胞能够通过至少一种细胞标记的表达而得到鉴定。
4. 依照权利要求3的胰祖细胞，其中所述细胞标记选自下组：细胞角蛋白19、癌胚抗原、碳酸酐酶II、和囊性纤维化跨膜传导调节蛋白。
5. 依照权利要求4的胰祖细胞，其中所述胰祖细胞具有如下形态：小且圆，细胞直径大约 $10\text{ }\mu\text{m}$ ，且是高度致密的柱状上皮形式。
6. 依照权利要求5的胰祖细胞，其中所述胰祖细胞还能够分化成表达淀粉酶的腺泡细胞，且其中所述腺泡细胞具有大簇形成腺泡的外观。
7. 依照权利要求5的胰祖细胞，其中所述胰祖细胞还能够分化成表达细胞角蛋白19的导管细胞，且其中所述导管细胞具有如下形态：小且圆，细胞直径大约 $40\text{ }\mu\text{m}$ ，且是致密的立方柱状上皮形式。
8. 依照权利要求5的胰祖细胞，其中所述胰祖细胞还能够分化成表达胰岛素和胰高血糖素的胰岛细胞，且其中所述胰岛细胞具有由腺泡外分泌单位包围的上皮胰岛的外观。
9. 分离权利要求1的基本纯的人胰祖细胞群体的方法，包括：
  - a) 显微解剖人胎胰祖细胞来源，以生成包含胰祖细胞的胰细胞混和群体；
  - b) 将胰细胞混和群体置于营养培养基中，其培养条件足以维持所述胰祖细胞的存活，而且其中营养培养基所含营养物包括胰岛素、转

铁蛋白、表皮生长因子、乙醇胺、磷酸乙醇胺、硒、三碘甲腺原氨酸、孕酮、氢化可的松、毛喉素、heregulin、抑酶肽、和牛垂体提取物；

- c) 维持合适的培养条件，该条件足以使胰祖细胞形成聚集体或单层结构；并
- d) 将所述聚集体或单层结构传代培养，以选择基本纯的胰祖细胞群体。

10. 向异源受体提供免疫原的来源的方法，包括以在所述受体中有效诱导免疫应答的量将权利要求1所述胰祖细胞群体导入所述受体。

11. 在免疫缺陷或免疫不应的非人哺乳动物受体中生成人胰组织模型的方法，包括将来自权利要求1的基本纯的群体的人胰祖细胞群体联合间充质组织施用于所述受体中能够支持所述胰祖细胞的生长和分化的部位。

12. 向人受体提供细胞疗法的方法，包括将来自权利要求1的基本纯的群体的人胰祖细胞施用于所述受体中能够支持所述胰祖细胞的生长和分化的部位。

13. 在一种或多种药物的药物开发中提供胰组织特异性生物学成分的来源的方法，包括分离权利要求1所述人胰祖细胞群体，并使用所述胰祖细胞或其任意细胞部分作为一种或多种开发中药物的作用靶。

14. 在生物测定法的开发中提供核酸或蛋白质的来源的方法，包括由权利要求1所述人胰祖细胞分离核酸或蛋白质，并使用所述核酸或蛋白质作为生物测定法中的一种或多种主要成分。

15. 权利要求12的方法，还包括免疫遏制受体的步骤。

16. 权利要求 12 的方法，还包括在限制受体针对所述胰祖细胞产生免疫系统应答的屏障装置中提供所述胰祖细胞的步骤。

## 人胰上皮祖细胞及其分离和使用方法

### 发明领域

本发明属于发育生物学和细胞生物学领域。具体而言，本发明涉及能够分化成有功能的外分泌和内分泌细胞的胰上皮祖细胞群体、分离胰上皮祖细胞的方法、胰上皮祖细胞的表征、和胰上皮祖细胞的用途。

### 技术背景

由于干细胞和祖细胞具有极大潜能，因此它们的分离和表征成为深入研究的主题。能够成为人体内任何细胞类型的全能干细胞产生比全能细胞更分化的祖细胞。这些祖细胞类型之一就是预定的胰上皮祖细胞。胰上皮祖细胞能够成为不同类型的胰上皮细胞，包括腺泡细胞、胰岛细胞、和导管细胞。腺泡细胞通常发现于胰腺头部附近，且包含易于使用电子显微镜看到的酶原颗粒。腺泡细胞通过将碱性消化液注入小肠而发挥外分泌功能。每天分泌大约1500ml胰液，其中包含分解脂类和蛋白质所需要的酶（Ganong, William F., 《Review of Medical Physiology》即医学生理学回顾，第26章“Regulation of Gastrointestinal Function”即胃肠功能的调节，第15版，Appleton and Lange, 1991）。存在四类胰岛细胞（也称为朗格汉斯细胞）：胰岛- $\alpha$ 、胰岛- $\beta$ 、胰岛- $\delta$ 、和胰岛-PP。胰岛- $\alpha$ 细胞分泌胰高血糖素，它促进葡萄糖异生，即分解能量储备物而生成更多的循环中葡萄糖。胰岛- $\beta$ 分泌胰岛素，它促进循环中葡萄糖贮藏成可及的能源。在I型糖尿病（也称为幼年型糖尿病）中，认为自身免疫攻击胰岛- $\beta$ 细胞，引起胰岛- $\beta$ 细胞功能缺陷，从而引起降低循环中葡萄糖水平的胰岛素的缺乏。胰岛- $\delta$ 细胞分泌抑生长素，它调节胰高血糖素和胰岛素的分泌。第四类胰岛细胞即胰岛-PP（胰多肽）不具有胰内已知功能。另一类亚

胰细胞是导管细胞。这些细胞排列成连接胰不同部分的管道。

像其它类型的祖细胞一样，由于祖细胞的短命本性，因而难以分离胰上皮祖细胞。分离所需要的对祖细胞的操作可能扰乱这些细胞脆弱的祖先状态，而且可能引起它们分化。与生长因子或底层的接触可能诱导胰祖细胞开始分化成外分泌或内分泌细胞。胰细胞领域的研究已经导致了几种衍生自大鼠的胰上皮细胞系的建立( Stephan, J. 等人, Endocrinology, 140: 5841 - 5854, 1999 )。其它研究包括分离人成年胰细胞，并用肝细胞生长因子/分散因子 (HGF/SF) 诱导这些胰细胞增殖成胰岛- $\beta$  样结构 (Jeffrey等人, 美国专利号5,888,705)。其它研究工作包括通过首先在含血清的低葡萄糖培养基中培养然后换成具有更高血清和葡萄糖含量的培养基而由成年胰细胞诱导胰岛细胞的生长 (WO 97/15310)。胰祖细胞领域的还有其它研究包括由前期糖尿病成人分离祖细胞，并在促进有功能的胰岛细胞生长的含血清预定培养基中进行培养 (美国专利号5,834,308)。然而，所有这些“祖细胞”只产生胰岛细胞。上述研究的胰细胞不能分化成内分泌和外分泌细胞这两种类型。似乎上述研究的胰细胞沿着胰祖细胞的分化途经进一步定型，因而是与本发明的人胰祖细胞不同的胰细胞类型。另外，上述研究中使用的培养条件 (向培养基中添加血清) 可能具有不利后果。血清 (血液凝结后血液中的流体部分) 包含许多生物分子，诸如清蛋白和 $\alpha$ 、 $\beta$ -球蛋白。在体内，细胞通常不暴露于血清等同物，除非涉及组织损伤。因此，在血清中培养胰细胞不能准确反映胰细胞在体内存在其中的生理参数。

理想的胰祖细胞群体应当能够分化成外分泌 (即腺泡) 细胞、内分泌 (即胰岛- $\alpha$ 、胰岛- $\beta$ 、胰岛- $\delta$ 、和胰岛-PP) 细胞、和导管细胞。这样的胰祖细胞群体可用于临床环境下，例如通过移植能够分化成有功能的胰细胞的胰祖细胞来治疗某些类型的糖尿病和治疗功能缺陷的胰细胞。因此，需要胰祖细胞群体和分离并培养胰祖细胞的方法，使得在允许这些细胞增殖和避免衰老的同时，胰祖细胞的分化潜能得到保留。本文公开的胰祖细胞和分离并培养这些胰祖细胞的方法满足

了这些需要，而且还提供了相关优势。

### 发明概述

本发明涉及发育和细胞生物学领域。在一个方面，本发明涉及基本纯的人胰上皮祖细胞群体，它们具有分化成有功能的外分泌或内分泌胰细胞的多能性。

在另一方面，本发明涉及分离基本纯的人胰上皮祖细胞群体的方法，它们具有分化成有功能的外分泌或内分泌胰细胞的多能性。

在还有一个方面，本发明涉及维持基本纯的人胰上皮祖细胞群体的方法，它们具有分化成有功能的外分泌或内分泌胰上皮细胞的多能性，以及维持或培养这些胰祖细胞并使之保持多能性同时避免衰老的方法。

在还有一个方面，本发明涉及提供免疫原的来源的方法，以及基本纯的胰祖细胞群体作为免疫原的用途。

在还有一个方面，本发明涉及通过使用基本纯的人胰祖细胞群体作为胰细胞的来源并将胰祖细胞导入非人哺乳动物受体来生成人胰组织模型的方法。

在另一方面，本发明涉及提供细胞疗法的方法，即将基本纯的人胰祖细胞群体导入受体。

在另一方面，本发明涉及提供药物开发的方法，其中基本纯的人胰祖细胞群体用作胰生物学成分的来源，其中一种或多种上述胰生物学成分是开发中药物的作用靶。

在另一方面，本发明涉及提供生物测定法开发的方法，其中基本纯的人胰祖细胞群体用作核酸或蛋白质的来源，其中核酸或蛋白质用作生物测定法或生物测定法开发中的一种或多种主要成分。

### 图的简述

图1显示了人胰导管上皮细胞在两种不同类型的培养基中的生长。图1A（左）显示了胰上皮细胞在CMRL 1066培养基中的生长，平板经过

纤连蛋白的包被。大且圆的细胞就是胰上皮细胞。图1B（右）显示了胰上皮细胞在F12/DMEM培养基中的生长，胰上皮细胞变平而形成单层。

图2显示了人胰上皮细胞在经胶原包被的平板上传代三次后的生长。箭头指示分裂中细胞。

图3显示了组织重组移植物的染色结果。图3A显示了组织重组移植物中的胰岛形成，放大倍数20x。图3B显示了组织重组移植物中的胰岛形成，放大倍数60x。图3C显示了组织重组移植物中胰岛、导管、和腺泡组织的形成。图3D显示了组织重组移植物中的导管形成。图3E显示了组织重组移植物中的腺泡细胞簇（或聚集体）形成。

图4显示了组织重组移植物中胰高血糖素（蓝色）和胰岛素（棕色）的染色结果。

图5显示了组织重组移植物中胰岛素（棕色）的染色结果。

图6显示了组织重组体中的导管形成。

图7显示了组织移植物的石蜡包埋组织切片中胰高血糖素（蓝色）和胰岛素（棕色）的染色结果。

图8是由全能干细胞发育成胰细胞的示意图。虚线指示本发明的人胰祖细胞所驻留的分化阶段。

### 发明实施方式

为了帮助本领域技术人员实践本发明而提供下文详述。不应将详述解释成对本发明的限制，因为本领域普通技术人员可以修改本文公开的实施方案而不违背本发明的精神和范围。在整篇公开书中，引用了多种发表物、专利、和已发表专利说明书作为参考。将这些发表物、专利、和已发表专利的公开书完整收入本公开书作为参考。

除非另有说明，本发明的实践将采用免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、和重组DNA的常规技术，它们属于本领域的技术范围之内。参阅例如《MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL》即分子克隆：实验室手册，Sambrook等人，第2版，1989；《CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY》即分子生物学通用方案，

F. M. Ausubel等人编, 1987; 《METHODS IN ENZYMOLOGY》即酶学方法丛书, Academic出版公司, PCR 2: PRACTICAL APPROACH即PCR 2: 实践方法, M. J. MacPherson、B. D. Hames、和G. R. Taylor编, 1995; 《ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL》即抗体: 实验室手册, Harlow 和Lane编, 1988; 和《ANIMAL CELL CULTURE》即动物细胞培养, R. I. Freshney编, 1987。

## 定义

在用于说明书和权利要求书时, 单数形式“一个”和“一种”包括复数指称, 除非文章另有清楚说明。例如, 术语“一个细胞”包括一群细胞, 还包括它们的混合物。

在用于说明书和权利要求书时, 术语“胰上皮祖细胞”和“胰祖细胞”可以互换, 指人类来源的“胰上皮祖细胞”和“胰祖细胞”。

“胰上皮祖细胞”和“胰祖细胞”指在胰中发现的分裂中祖细胞, 它们尚未进入终端分化的基本不分裂阶段。“胰上皮祖细胞”和“胰祖细胞”最初衍生自全能细胞, 而全能细胞产生多能的组织特异细胞。这些多能的、组织特异的、分裂中祖细胞能够产生内胚层、外胚层、或中胚层的细胞。在内胚层多能细胞中, 有些分化成肠道特异的分裂中祖细胞。在肠道特异的祖细胞中, 有些预定成为胰细胞。本文要求的细胞群体就驻留在这个发育阶段。更具体的说, 本文公开的“胰上皮祖细胞”和“胰祖细胞”群体处于肠道特异的祖细胞预定成为胰(或其部分)的阶段与胰特异的祖细胞开始定型成为亚胰细胞类型的阶段之间。胰特异的祖细胞能够分化成几种细胞类型: 腺泡、导管、和胰岛- $\alpha$ 、胰岛- $\beta$ 、胰岛- $\delta$ 、及胰岛-PP。腺泡细胞的一种外分泌功能是将消化液分泌到肠中。胰岛细胞的一种内分泌功能是分泌胰高血糖素(胰岛- $\alpha$ )和胰岛素(胰岛- $\beta$ )。本发明的胰祖细胞尚未分化成任何上述类型的亚胰细胞, 但是能够成为任何上述细胞。

“亚胰的”指胰内作为整个器官的细胞基础结构。亚胰细胞的范例包括但不限于腺泡、导管、和胰岛细胞。

“全能细胞”和“全能干细胞”在全文中可以互换，指能够成为哺乳动物体内任何细胞类型的干细胞。

“多能性”指细胞仍能成为多种细胞但不再能够成为体内任何细胞类型的阶段。“多能”细胞不是指“干细胞”，而是指“祖细胞”，因为它们是一种或多种细胞群体的祖先。

在用于本文时，“预定的胰”指多能细胞越过肠道特异的阶段且在最终分化的胰细胞（诸如腺泡、胰岛、或导管细胞）阶段之前的发育阶段。称为“预定的胰”的细胞被定型成为胰细胞，但尚未开始发育成最终分化的胰细胞。引起预定的胰细胞开始分化的因素是不同的。非限制性范例包括暴露于血清、暴露于胰岛素生长因子（IGF）或表皮生长因子（EGF）、与周围组织的接触、细胞的微环境、和与周围组织的细胞-细胞接触。发育链由能够成为体内任何细胞的全能干细胞开始。由于其细胞全能性，全能干细胞是真正的干细胞。在越过全能干细胞之后的任何阶段，细胞成为“预定的祖细胞”，因为它们已经被定型到不再能够成为体内任何细胞类型的途经。

“抗体”指能够结合抗原的免疫球蛋白分子。在用于本文时，该术语不仅涵盖完整的免疫球蛋白分子，还包括抗独特型抗体、突变体、片段、融合蛋白、人源化蛋白质、和包含具有所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的修饰。

术语“抗原”指包含抗体能够结合的一个或多个表位的分子。抗原可能是具有免疫原性的分子，即能够诱导免疫应答。抗原被认为是一类免疫原。在用于本文时，术语“抗原”意欲指全长蛋白及其包含一个或一群表位的肽片段。

术语“表面抗原”和“细胞表面抗原”在本文中可以互换，指细胞的质膜成分。这些成分包括但不限于整合型和外周型膜蛋白、糖蛋白、多糖、脂类、和糖基磷脂酰肌醇（GPI）连接蛋白。“整合型膜蛋白”指穿越细胞质膜脂双层的跨膜蛋白。典型的整合型膜蛋白包含至少一个跨膜区段，它通常包含疏水氨基酸残基。外周型膜蛋白不伸入脂双层的疏水内部，它们通过与其它膜蛋白的非共价相互作用而结合

膜表面。GPI连接蛋白是通过插入脂双层的脂尾而停留在细胞表面的蛋白质。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指具有基本同质的抗体群体的抗体组合物。它并非意欲限制抗体的来源或生成方式（如通过杂交瘤或重组合成）。单克隆抗体是高度特异的，针对单一的抗原位点。与通常包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的常规（多克隆）抗体制剂相反，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

“单克隆抗体群体”指一群异质单克隆抗体，即群体所包含的各个单克隆抗体可能识别彼此不同的抗原决定簇。

“免疫原”指能够诱导免疫应答的任何物质。将称为免疫原的物质描述成具有“免疫原性”。诱导免疫应答包括但不限于激活体液应答（如生成抗体）或细胞应答（如引发细胞毒性T细胞）、炎症应答（如募集白细胞）、和分泌细胞因子和淋巴因子。

术语“异源”在指称用于免疫或移植的细胞时，指细胞衍生自基因型与受体不同的实体。例如，异源细胞可以衍生自相对于受体的不同物种或相同物种的不同个体。衍生自一种物种的个体的胚细胞与相同物种的成体是异源的。“异源”在指称受体时指受体的基因型与将要导入受体的细胞的来源不同。

若细胞衍生自胚胎的三种胚层（外胚层、内胚层、或中胚层）之一，则细胞分别是“外胚层”、“内胚层”、或“中胚层”起源。外胚层是外层，生成表皮细胞和神经系统。内胚层是内层，生成消化管的内衬及其相关器官，包括但不限于胰脏和肝脏。中间层即中胚层生成几种器官（包括但不限于心脏、肾脏、和性腺）、结缔组织（如骨、肌肉、腱）、和血细胞。

术语“培养基”和“细胞培养基”可以互换，指培养过程中哺乳动物细胞生长其中的水性微环境。培养基包含物理化学、营养、和激素微环境。

当血清在培养基中的体积百分比不能屏蔽细胞表面的抗原性位点或抗体结合位点时，则细胞培养基“基本不含血清”。通常在细胞培

养基包含低于大约50%（体积比）、优选低于大约25%、甚至更优选低于大约5%、最优选低于大约0.1%的血清时，采用术语“基本不含血清”。

当在至少大约75%、更优选至少大约90%、甚至更优选至少大约95%、最优选至少大约99%的胰祖细胞表面上，没有衍生自血清的血清生物分子结合细胞表面，使得抗原性位点或抗体结合位点受到结合或不能受到抗体或其部分的抗原识别，则此时细胞表面“基本不含血清生物分子”。可以通过显微镜或流式细胞计量术测量细胞大小，从而测定细胞表面。例如，各种已知大小的合成珠常用于校准流式细胞计量术。可以将少量的校准珠与胰祖细胞混和，并通过流式细胞计量术分析产生的群体。然后可以将胰祖细胞与校准珠的大小进行比较。既然珠的大小是已知的，那么就可以实现细胞表面积的计算。

在用于本文时，“基本纯的”胰祖细胞群体指包含至少大约85%、优选至少大约90%、甚至更优选至少大约95%或更多胰祖细胞的细胞群体。

“已知成分培养基”和“基本细胞维持培养基”在本文中可以互换，指包含培养过程中细胞存活和/或生长所必需的营养和激素需求且其成分已知的培养基。通常通过加入生长和/或存活所必需的营养物和生长因子来配制已知成分培养基。已知成分培养基通常提供至少一种来自下列一项或多项的成分：1) 所有必需氨基酸，通常是基本的一套20种氨基酸加胱氨酸；2) 能源，通常是碳水化合物的形式，诸如葡萄糖；3) 维生素和/或有低浓度需要的其它有机化合物；4) 游离脂肪酸；和5) 微量元素，其中微量元素定义为通常有很低浓度（通常是微摩尔级范围）需要的无机化合物或天然存在元素。已知成分培养基还可任选的添加一种或多种来自下列任何项的成分：1) 一种或多种促有丝分裂剂；2) 盐和缓冲液，例如钙、镁、和磷酸盐；3) 核苷和碱基，诸如腺苷、胸苷、次黄嘌呤；和4) 蛋白质和组织水解物。

在用于本文时，“条件培养基”指不含完整细胞、胰上皮祖细胞曾在其中生长的培养基。在营养培养基中生长的胰细胞可能释放可促

进前分化原始状态的胰祖细胞连续存活、生长、和维持的因子。条件培养基可用于重建细胞沉淀，或者加到早已存在于培养板中的细胞中。条件培养基可以单独使用，或者添加到用于饲养胰细胞的营养培养基中。既然条件培养基衍生自营养培养基，而且本文所述营养培养基基本不含血清，那么条件培养基也基本不含血清。

“标准保温条件”指在放置细胞的保温箱中为了组织培养而设计的物理化学条件。标准保温条件通常是大约37°C和大约5% CO<sub>2</sub>及增湿。应当在无菌条件下执行所有组织培养技术和设备。组织培养容器指可用于培养细胞的任何容器类型。非限制性范例包括烧瓶和平板。

“促有丝分裂剂”或“生长因子”指刺激哺乳动物进行有丝分裂的分子。通常，促有丝分裂剂或生长因子可增强哺乳动物细胞在细胞培养过程中的存活和增殖，而且是多肽。不管生成方法是什么（如可以由分子的内源来源进行分离或者通过合成技术包括重组技术进行生成），促有丝分裂的多肽可以是“天然”或“天然序列”的多肽（即具有天然存在生长因子的氨基酸序列），或者是它们的变体或突变体（见下文定义）。非限制性范例包括erbB受体家族的一个或多种成员的激活剂；升高培养基中cAMP水平的试剂（如毛喉素、霍乱毒素、cAMP或其类似物）；粘着分子诸如神经细胞粘着分子（N-CAM）、层粘连蛋白、或纤连蛋白；孕酮；神经营养因子诸如骨衍生神经营养因子（BDNF）和睫状神经营养因子（CNTF）；神经营养蛋白-3、-4、-5、或-6；血小板衍生生长因子（PDGF）；成纤维细胞生长因子诸如酸性FGF（aFGF）和碱性FGF（bFGF）；血管内皮生长因子（VEGF）；转化生长因子（TGF）诸如TGF-α和TGF-β；胰岛素样生长因子，包括IGF-I和IGF-II；激素诸如雌激素、睾丸素、甲状腺激素、胰岛素、和Mather, J. P. 和 Roberts, P. E., 1998, 《Introduction to Cell and Tissue Culture》即细胞和组织培养导论, Plenum出版社, 纽约, 第138 – 139页, 表8.2所列任何促有丝分裂剂。

“胰祖细胞聚集体”、“胰祖细胞球”、和“胰细胞簇”在全文中可以互换，指一块胰祖细胞群体，它们能够形成约略类似球形的三

维结构。

“移植重组体”在用于本文时指胰祖细胞聚集体与间充质组织一起放置的组合单位。间充质组织可以具有胰或非胰来源。间充质组织可以来自移植受体的异源物种。间充质组织还可以来自胰祖细胞来源的异源物种。可以将移植重组体在底层（优选柔软的生物学底层，如琼脂）上保温一段时间，即大约1小时 - 72小时、更优选大约6小时 - 24小时、甚至更优选过夜(大约8 - 16小时)(Olumi, A. F. 等人, Cancer Research, 59: 5002 - 5011, 1999)。

“血清”在用于本文时指哺乳动物血液在血液凝结后剩余的流动相。

“血清生物分子”在用于本文时指在血清中发现的生物学组合物。范例包括但不限于清蛋白、 $\alpha$ 1-球蛋白、 $\alpha$ 2-球蛋白、 $\beta$ -球蛋白、和 $\gamma$ -球蛋白。血清生物分子可以包括在血清中自然发现的或衍生自对血清的加工和处理的生物学组合物（整个或部分）。

术语“哺乳动物”指温血脊椎动物，包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔、猿猴、运动动物、和宠物。

### 胰祖细胞的分离和维持

本发明的胰祖细胞是由人胎胰组织分离得到的。胎儿的年龄在大约6周 - 大约40周之间、优选大约8周 - 大约26周之间、甚至更优选大约12周 - 大约22周之间。可以通过大体解剖、外观、和在胎儿中的定位来鉴定胰组织。辨别胰脏的几个大体解剖和外观特征是：延长的分叶腹膜后腺体、缺乏被膜、和由小肠的十二指肠凹陷延伸至脾。胰包括位于十二指肠凹陷内的扁平头部、横向穿过腹部的延长的三面体、和与脾接触的尾部。一旦已经鉴定，首先显微解剖胎胰组织。显微解剖的目的是将包含上皮细胞的结构与结缔组织和非胰组织诸如脂肪、膜、等分开，或者将细胞彼此分开。显微解剖的非限制性范例包括实施机械剪切强制的装置（即匀浆器、钵与杵、捣碎机、等）、实施切割或撕裂的装置（即解剖刀、注射器、镊子、等）、或超声装置。或

者，显微解剖胎胰组织的另一种方法是使用酶处理。本领域众所周知用于显微解剖组织的多种酶。一种方法包括在维持由胰组织分离的细胞存活的缓冲培养基中使用胶原酶 - 分散酶消化经部分剪切的胰组织。使用的胶原酶 - 分散酶浓度是至少大约0.5mg/ml、更优选至少大约1mg/ml、甚至更优选至少大约5mg/ml。酶量取决于胎儿的年龄和胰组织的大小。在一个优选实施方案中，使用大约5mg/ml胶原酶 - 分散酶消化来自大约14周 - 大约22周胎儿的胰组织。有极其多种基本细胞维持培养基可用于将液体的pH维持在促进胰祖细胞存活的范围内并提供能够在其中进行酶促消化的额外体积。非限制性范例包括F12/DMEM、Ham氏F10 (Sigma)、CMRL-1066、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、Dulbecco氏修改Eagle氏培养基 (DMEM, Sigma)、和 Iscove氏修改Eagle氏培养基 (IMEM)。另外，可以使用Ham和Wallace, Meth. Enz., 58: 44, 1979; Barnes和Sato, Anal. Biochem., 102: 225, 1980; 或Mather J. P. 和Roberts P. E., 《Introduction to Cell and Tissue Culture》即细胞和组织培养导论, Plenum出版社, 纽约, 1998中描述的任何基本营养培养基。可用于消化组织的其它酶的范例包括中性蛋白酶、丝氨酸蛋白酶，包括但不限于胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、胶原酶、和嗜热菌蛋白酶。在另一个优选实施方案中，使用消化DNA的酶（诸如DNA酶）将DNA切成小段，以防止游离DNA的组织聚集。用酶处理胎胰组织导致不同的细胞产量。有些细胞位于单细胞悬浮液中，其它细胞位于细胞聚集体中。通过密度梯度，可以将不与实体组织块相连的细胞彼此分开，或与实体组织块分开，或与碎片分开。可用于生成密度梯度的化合物包括但不限于血清（即牛血清清蛋白或BSA）、卵清蛋白、蔗糖的非离子型合成聚合物（即菲可<sup>TM</sup>）、聚乙烯吡咯烷酮包被的硅胶（即珀可<sup>TM</sup>）、聚乙烯吡咯烷酮或PVP、和甲基纤维素。在一个优选实施方案中，使用能够中和用于消化胰组织的酶的密度梯度。这种密度梯度的一个范例是BSA。BSA的用量是大约50% (v/v)、更优选大约25%、更优选大约10%、甚至更优选大约5%。需要除去的碎片数量取决于几个因素，诸如消化程度或应用

于胰组织的机械剪切力。在有些情况下，一次密度梯度足以清除碎片（如间充质组织、脂肪颗粒、或破碎的细胞膜）。在其它情况下，将需要应用超过一次密度梯度。期望的产物是一群相对较纯的胰细胞聚集体。

然后将胰细胞重悬于基本细胞维持培养基中。可以使用多种基本细胞维持培养基。范例包括但不限于Ham氏F12培养基、RPMI-1640、和CMRL-1066。为了获得促进胰祖细胞存活和生长的更佳条件，可以向基本培养基中添加多种营养物。范例包括但不限于胰岛素、转铁蛋白、表皮生长因子、乙醇胺、磷酸乙醇胺、硒、三碘甲腺原氨酸、孕酮、氢化可的松、毛喉素、hergulin、抑酶肽、牛垂体提取物、和庆大霉素。在一个优选实施方案中，使用下列量的营养物来促进胰祖细胞的存活和生长：至少大约 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  胰岛素且不超过大约 $100\mu\text{g}/\text{ml}$  胰岛素，更优选大约 $10\mu\text{g}/\text{ml}$  胰岛素；至少大约 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  转铁蛋白且不超过大约 $100\mu\text{g}/\text{ml}$  转铁蛋白，更优选大约 $10\mu\text{g}/\text{ml}$  转铁蛋白；至少大约 $1\text{ng}/\text{ml}$  表皮生长因子且不超过大约 $100\text{ng}/\text{ml}$  表皮生长因子，更优选大约 $5\text{ng}/\text{ml}$  表皮生长因子；至少大约 $1\times 10^{-8}\text{M}$  乙醇胺且不超过大约 $1\times 10^{-2}\text{M}$  乙醇胺，更优选大约 $1\times 10^{-6}\text{M}$  乙醇胺；至少大约 $1\times 10^{-9}\text{M}$  磷酸乙醇胺且不超过大约 $1\times 10^{-1}\text{M}$  磷酸乙醇胺，更优选大约 $1\times 10^{-6}\text{M}$  磷酸乙醇胺；至少大约 $5\times 10^{-12}\text{M}$  硒且不超过大约 $1\times 10^{-1}\text{M}$  硒，更优选大约 $2.5\times 10^{-8}\text{M}$  硒；至少大约 $1\times 10^{-15}\text{M}$  三碘甲腺原氨酸且不超过大约 $5\times 10^{-1}\text{M}$  三碘甲腺原氨酸，更优选大约 $1\times 10^{-12}\text{M}$  三碘甲腺原氨酸；至少大约 $1\times 10^{-12}\text{M}$  孕酮且不超过大约 $1\times 10^{-1}\text{M}$  孕酮，更优选大约 $1\times 10^{-9}\text{M}$  孕酮；至少大约 $1\times 10^{-15}\text{M}$  氢化可的松且不超过大约 $1\times 10^{-1}\text{M}$  氢化可的松，更优选大约 $1\times 10^{-9}\text{M}$  氢化可的松；至少大约 $0.001\mu\text{M}$  毛喉素且不超过大约 $50\mu\text{M}$  毛喉素，更优选大约 $1\mu\text{M}$  毛喉素；至少大约 $0.1\text{nM}$  hergulin且不超过大约 $100\text{nM}$  hergulin，更优选大约 $10\text{nM}$  hergulin；至少大约 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  抑酶肽且不超过大约 $100\mu\text{g}/\text{ml}$  抑酶肽，更优选大约 $25\mu\text{g}/\text{ml}$  抑酶肽；至少大约 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  牛垂体提取物且不超过大约 $500\mu\text{g}/\text{ml}$  牛垂体提取物，更优选大约 $75\mu\text{g}/\text{ml}$  牛垂体提取物；至少大约 $1$

$\mu\text{g/ml}$  庆大霉素且不超过大约 $1\text{mg/ml}$  庆大霉素，更优选大约 $100\mu\text{g/ml}$  庆大霉素。根据期望细胞的物理取向类型，可以在不同底层上培养胰祖细胞。可以使用的底层的非限制性范例包括纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原、聚赖氨酸、硝酸纤维素、尼龙、和聚四氟乙烯。在一个实施方案中，在经纤连蛋白包被的组织培养板上在上文所述优选营养培养基中培养胰祖细胞。当在优选营养培养基中在经纤连蛋白包被的板中培养时，胰祖细胞形成细胞聚集体。另外，这种培养组合能够将非期望的间充质细胞与胰祖细胞聚集体分开。在一个优选实施方案中，通过在优选培养基（使用CMRL 1066作为基本培养基）中在纤连蛋白板中培养胰祖细胞，可以很容易实现对胰细胞聚集体的纯化。胰祖细胞形成大且圆的不贴壁细胞簇，而其它细胞类型（即间充质细胞）粘附在纤连蛋白包被层上。然后可以收集胰祖细胞簇，并转移至另一个组织培养容器，用于传代培养和增殖。当期望更多胰祖细胞簇的增殖时，可以用纤连蛋白包被组织培养容器，并在本文公开的优选培养基（使用CMRL 1066作为基本培养基）中培养胰祖细胞。在另一个优选实施方案中，在优选营养培养基（使用F12/DMEM作为基本培养基）中在经胶原包被的组织培养容器中培养胰祖细胞。在这个实施方案中，胰祖细胞形成单层。

胰祖细胞换液的频率可以是每天一次或隔天一次。在一个实施方案中，可以通过用新的营养培养基更换整个旧的营养培养基来饲养胰祖细胞。在另一个实施方案中，可以用曾经用于培养这些细胞的条件培养基来饲养胰祖细胞。为了获得更大数目的细胞，需要进行胰祖细胞的传代培养，即取出成簇形式（在纤连蛋白上培养）或单层形式（在胶原上培养）的胰祖细胞，并将细胞群体分到多个组织培养容器中。然后向每个组织培养容器中加入营养培养基，使得祖细胞的浓度低于原始组织培养容器。添加的营养培养基取决于期望的胰祖细胞类型。当需要单层时，就在本文公开的优选营养培养基中使用F12/DMEM作为基本培养基，并同时用胶原包被组织培养容器。当需要胰细胞簇时，就在本文公开的优选营养培养基中使用CMRL 1066作为基本培养基，并

同时用纤连蛋白包被组织培养容器。因为要求的胰祖细胞对于本发明而言是独特的，而且将分泌对于这些细胞特异的因子，所以由胰祖细胞衍生的条件培养基也是独特的。在本发明中，当在上文所述优选营养培养基中在纤连蛋白组织培养板中培养时，胰祖细胞形成聚集体。当底层是经胶原包被的组织培养板时，胰祖细胞形成贴壁的基质单层。加入的条件培养基极大促进胰祖细胞的存活力。条件培养基的优选量是培养基总体积的至少大约1% - 至少大约25%、甚至更优选大约15%。促进胰祖细胞存活和生长的饲养频率优选每周一次，甚至更优选每周两次，最优选隔天一次。本发明的胰祖细胞可以传代多次而保留分裂能力且不诱导这些胰祖细胞分化成最终分化的腺泡、胰岛、或导管细胞。

### 胰祖细胞的表征

以本文公开的方式分离得到的本发明的胰祖细胞群体具有几个定义特征。首先，胰祖细胞处于可以描述成“预定的胰”的阶段。在肠道特异的祖细胞中，有些预定将成为胰细胞。本文要求的胰祖细胞群体就驻留在这种发育阶段（图8）。本发明的胰祖细胞具有成为外分泌或内分泌细胞的能力。内分泌和外分泌细胞在用于本文时是由它们的分泌物定义的。内分泌细胞诸如 $\alpha$ -胰岛细胞和 $\beta$ -胰岛细胞分别分泌胰高血糖素和胰岛素。外分泌细胞诸如腺泡细胞分泌多种胰消化液诸如胰蛋白酶原、 $\alpha$ -淀粉酶、和脂肪酶。

可以通过形态学或特异标记或者这两种技术的联合来实现胰祖细胞的鉴定。正如本文公开的，根据用于培养胰祖细胞的培养条件，胰祖细胞可能具有圆形和囊状的外观，或者以单层形式延长。还可以通过形态学来实现已分化胰祖细胞的鉴定。胰岛细胞的形态是卵形，直径（长轴）大约 $75\text{ }\mu\text{m}$  -  $175\text{ }\mu\text{m}$ 。胰岛细胞趋向于更接近胰的尾端（远离十二指肠腔）。可用于检测胰岛细胞的标记包括但不限于胰高血糖素（胰岛- $\alpha$ 细胞）、胰岛素（胰岛- $\beta$ 细胞）、抑生长素（胰岛- $\delta$ 细胞）、和胰多肽（胰岛-PP细胞）。可用于检测导管细胞的标记包括但

不限于细胞角蛋白（CK）7、CK8、CK18、CK19、粘蛋白MUC1、碳酸酐酶II、和碳水化合物抗原19.9（Sialyl-Lewis-a）。导管细胞的形态是小且圆的细胞，直径大约 $10\text{ }\mu\text{m}$ ，且是显得高度紧凑的立方上皮。腺泡细胞的形态包括比导管细胞大，形状，和腺泡细胞内存在的酶原颗粒。可用于鉴定腺泡细胞的标记包括但不限于羧肽酶A和淀粉酶。

Ki67或PCNA是可用于测定胰祖细胞增殖的标记。预定的胰祖细胞仍能分裂，而最终分化的外分泌或内分泌细胞基本不分裂。Ki67或PCNA的染色可以测定所分析的胰细胞的增殖状态。

在不含血清的培养基中将本发明的胰祖细胞维持在它们的原始前分化状态。基本细胞维持培养基或本文公开的优选营养培养基或者条件培养基可用于在体外培养胰祖细胞。组织培养板上的不同类型的底层可用于获得胰祖细胞的聚集体或单层。纤连蛋白联合本文公开的优选营养培养基的使用产生胰祖细胞聚集体，而组织培养板上胶原的使用产生胰祖细胞单层。

本发明的胰祖细胞具有在本文公开的优选无血清营养培养基中传代多次的能力。在每次传代的过程中和在每次传代后的任意时间点，多能性均得到维持，本发明的胰祖细胞能够分化成有功能的外分泌或内分泌细胞。另外，正如本文公开的，在每次传代后的任意时间点，胰祖细胞可以用作免疫原、用于细胞疗法、用于生物测定法、用于建立人胰模型、或用于药物发现和/或开发。

本发明胰祖细胞的另一个特征是能够在移植到受体哺乳动物的肾膜下后分化成外分泌或内分泌细胞。在移植前，胰祖细胞不生成消化酶，诸如淀粉酶或脂肪酶，而且消化酶染色不呈阳性。正如本文公开的，胰祖细胞可以胰祖细胞聚集体或单层的形式生长，然后联合间充质组织并置于受体哺乳动物的肾膜下。优选的是，将人胰祖细胞聚集体联合大鼠精囊间充质组织使用，并置于受体哺乳动物的肾膜下。可以取下部分移植物用于使用标记、形态学、或其联合的分析来鉴定胰细胞。

可用于鉴定这种胰祖细胞群体的抗体（单克隆或多克隆）包括但

不限于抗细胞角蛋白19、抗癌胚抗原（CEA）、抗碳酸酐酶II、抗囊性纤维化跨膜传导调节蛋白（CFTR）。

### 胰祖细胞的用途

#### 作为免疫原的用途

胰祖细胞的一种用途是作为免疫原。正如本发明公开的，独特的无血清培养条件允许胰祖细胞的细胞表面保持不含可能结合表面的血清蛋白质或血清生物分子。通过使用本文公开的无血清分离和培养技术，避免了抗原性位点可能被血清生物分子的结合所“屏蔽”的潜在问题。因此，可以生成针对最近才能够获得的、在使用含血清培养条件时被“屏蔽”的抗原的一组抗体。

通过本文公开的方法分离和培养的胰祖细胞可以作为免疫原施用于异源受体。可以通过几种方法来实现胰祖细胞作为免疫原的施用。将胰祖细胞作为免疫原施用于异源受体的方法包括但不限于：免疫接种、通过直接接触（诸如擦拭或刮涂装置）施用于膜、通过气雾剂施用于粘膜、和口服施用。正如本领域众所周知的，免疫接种可以是消极的或积极的免疫。可以通过不同路径来执行免疫方法，包括但不限于腹膜内注射、皮内注射、局部注射。免疫接种的受试者包括哺乳动物，诸如小鼠。免疫接种的路径和方案通常遵循已建立的用于抗体刺激和生成的常规技术。虽然此实施方案采用小鼠，但是可以依照本发明方法操作任何哺乳动物受试者包括人或由此而来的抗体生成细胞，作为生成哺乳动物杂交瘤细胞系的基础。通常，在腹膜内或其它区域（即足垫、尾基部、等）将小鼠接种免疫原性量的胰祖细胞，然后用相似量的免疫原进行加强。或者，通过外科手术将在非生物学膜基质上生长的细胞移植到宿主哺乳动物腹膜内。最后一次加强后几天收集淋巴样细胞（优选来自小鼠的脾淋巴样细胞），并由此制备细胞悬浮液用于融合。

使用Kohler B. 和Milstein C., Nature, 256: 495 - 497, 1975 的一般体细胞杂交技术，依照Buck D.W. 等人, In Vitro, 18: 377 -

381, 1982的修改方案，由淋巴细胞和永生化骨髓瘤细胞制备杂交瘤。可以利用的骨髓瘤系，包括但不限于X63-Ag8. 653和来自美国加利福尼亚洲圣迭戈市细胞分配中心（Cell Distribution Center）索尔克研究所（Salk Institute）的细胞系，可用于杂交。该技术包括使用融合剂诸如聚乙二醇或者通过本领域技术人员众所周知的电手段来融合骨髓瘤细胞和淋巴样细胞。融合后，将细胞与融合培养基分开，并在选择生长培养基诸如HAT培养基中培养，以消除未杂交的亲本细胞。本文所述任何培养基都可用于培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作为细胞融合技术的另一种变通方法，可以将EBV永生化B细胞用于生成本发明的单克隆抗体。如果需要，将杂交瘤进行扩增和亚克隆，并通过常规免疫测定流程（如放射免疫测定法、酶免疫测定法、或荧光免疫测定法）对上清液测定抗免疫原活性。

可以使用已知流程在体外或在体内培养生成这些抗体的杂交瘤。如果需要，可以通过常规免疫球蛋白纯化流程，诸如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、层析、和超滤，由培养基或体液分离单克隆抗体。若存在非期望活性，则可以通过例如使制剂流过由免疫原附着于固相而制成的吸附剂并由免疫原洗脱或释放期望抗体而进行消除。

以这种方式，可以使用本发明的胰祖细胞，生成针对胰祖细胞阶段特异性细胞表面抗原的一组新抗体。一旦通过本文公开的方法生成了针对胰祖细胞上的细胞表面抗原的单克隆抗体，就可以将抗体用于几种用途。为了构建重组抗体或人源化抗体，可以将抗体测序和克隆。胰祖细胞特异抗体的其它用途包括但不限于生物学测试或纯化（即通过诸如流式细胞计量术和淘选等方法来分离胰祖细胞）、治疗性用途（即通过抗体与靶细胞的结合来促进或阻滞细胞的生长或者通过抗体与靶细胞的结合来促进或阻滞细胞团的生长）、临床诊断、和生物学标记（即其它胰或非胰细胞的鉴定）。

作为免疫原的另一种用途是调控异源受体中总的免疫应答。正如本领域详细记录的，导入异源受体的外源物质诸如细胞或器官可以诱导多种免疫应答。免疫应答可能是排斥（如在器官移植中）、T细胞激

活（如交叉引发）、无反应性、或耐受的形式。总的免疫应答可能是全身的或局部的。在期望局部免疫应答的情况下，例如在肠道区域中，以有效量将免疫原诸如胰祖细胞导入肠道区域。可以将数量渐增的胰祖细胞导入异源受体，随后监测免疫应答，由此以逐步方式测定有效量。可以通过许多方法来监测总的免疫应答（如抗体生成、细胞因子生成、T细胞增殖、无反应性、耐受、等），包括但不限于ELISA、增殖实验、使用细胞表面标记的流式细胞计量术、和免疫组织化学。

#### 胰祖细胞用于药物发现的用途

胰祖细胞的另一种用途涉及药物发现。既然尚未以本文公开的方式分离和培养预分化的多能胰祖细胞群体，那么胰祖细胞群体可能分泌迄今尚未发现或表征的蛋白质。使用血清的先前培养技术可能抑制蛋白质的分泌。或者，当这些蛋白质被分泌并与血清生物分子相互作用时，它们的功能、构象、或活性可能发生变化。若由胰祖细胞分泌的蛋白质受到来自血清生物分子的最小干涉，则可能在生理学和拓扑学上更准确。因此，由胰祖细胞分泌的蛋白质可以作为作用靶用于药物开发。在一个实施方案中，可以将药物制成在体内靶向胰祖细胞上的特异蛋白质。药物的结合可能促进胰祖细胞分化成特定的亚胰细胞，诸如胰岛细胞。当期望胰岛细胞新生时，例如用于糖尿病治疗，这种方法可能是有用的。在另一个实施方案中，对胰祖细胞的调节蛋白特异的药物可用于阻滞特定细胞类型的生长，例如在囊性纤维化的情况下，其中腺泡细胞被导管细胞取代。在另一个实施方案中，药物可以是表达胎儿抗原的干细胞或癌细胞的生长抑制剂。任何这些蛋白质都可以作为作用靶用于开发治疗性抗体、蛋白质、或小分子药物。

#### 胰祖细胞用于细胞疗法的用途

在另一种用途中，将胰祖细胞系用于细胞疗法。胰祖细胞移植是细胞疗法的这样一种范例。在不同类型的胰细胞（诸如胰岛细胞或腺泡细胞）不能发挥它们的功能即分别分泌胰岛素或胰高血糖素的情况下，胰祖细胞移植提供了一种治疗，因为本发明的胰祖细胞具有多能性且能够分化成有功能的外分泌和内分泌细胞。为了实践这种用途，

使用本文公开的方法分离胰祖细胞，并在不含血清的营养确定培养基中进行培养。在经纤连蛋白包被的组织培养板上培养胰祖细胞以获得胰祖细胞聚集体。将胰祖细胞聚集体在标准保温条件下培养大约半天 - 大约7天、更优选大约1天 - 大约5天、甚至更优选大约3天。然后可以将胰细胞聚集体施用于受体并使之分化。或者，胰细胞聚集体可用作基因疗法的细胞载体，其中用一种或多种基因转染胰细胞，装入投递装置，然后施用于受体。在另一个实施方案中，将胰细胞聚集体置于肾膜下，并使之分化成腺泡、导管、或胰岛细胞。在另一个实施方案中，将胰细胞聚集体用于包含细胞且限制其它细胞接近的装置（即 Theracyte®），以限制免疫系统应答。

#### 胰祖细胞用于生成人组织模型的用途

胰祖细胞的另一种用途是在非人哺乳动物中构建人组织模型。将胰祖细胞聚集体置于间充质组织的顶端以形成移植重组体。为了形成移植重组体，将大约1 - 15个、更优选大约5 - 8个胰细胞球置于间充质组织的顶端。间充质组织可以是胰或非胰组织，而且可以衍生自与用于分离胰祖细胞的物种不同的物种。在一个工作实施例中，将人胰祖细胞置于大鼠间充质精囊组织的顶端以形成移植重组体。通过首先使用本文公开的方法分离人胰祖细胞，然后与来自不同器官的间充质组织合并，熟练技术人员可以逐步方式确定最佳组合。在有些实施方案中，使用不同物种（如大鼠）作为间充质组织的来源，联合人胰祖细胞使用。异源物种的使用使得可以将人特异标记用于测定已分化胰细胞的身份。若使用大鼠间充质组织，则假阳性的可能性降低。同样，使用精囊间充质组织取代胰间充质组织降低了鉴定已分化胰细胞时假阳性的可能性。在一个优选实施方案中，将大约1 - 12个、甚至更优选大约5 - 8个胰祖细胞球置于大鼠精囊间充质组织的顶端。优选使用大约 $1 \times 10^4$  - 大约 $5 \times 10^6$ 个间充质细胞，甚至更优选使用大约 $2 \times 10^5$  - 大约 $5 \times 10^5$ 个间充质细胞。然后将包含胰祖细胞球且其置于间充质组织上的移植重组体置于受体哺乳动物的肾膜下、脂肪垫中、皮下、或包含胰祖细胞但限制其它细胞接近胰祖细胞的装置（即 Theracyte®）中。可

能的受体哺乳动物包括但不限于小鼠和大鼠。通常，在移植部位，供体组织容易受到受体免疫系统的攻击。为了减轻移植排斥，可以使用几种技术。一种方法是以亚致死剂量辐射受体，以破坏可能攻击移植植物的免疫细胞。另一种方法是给予受体以环孢菌素或其它T细胞免疫抑制药物。在使用小鼠作为受体哺乳动物时，有多种方法可能减轻移植排斥。这样的一种方法是使用免疫缺陷小鼠（裸鼠或重度联合免疫缺陷或SCID）。在一个工作实施例中，将人胰祖细胞球置于大鼠精囊间充质组织上，并置于免疫缺陷小鼠的肾膜下。将移植重组体在受体中保留大约1周 - 大约52周、优选大约5周 - 大约40周、甚至更优选大约6周 - 大约8周后，收获移植物并分析胰祖细胞分化。在有些情况下，需要移植物的一小部分用于分析。在免疫组织化学分析中利用胰岛细胞（即胰岛素、胰高血糖素、等）、导管细胞（即CK19、等）和腺泡细胞（即淀粉酶、等）的特异标记。还可以使用外分泌和内分泌功能的另一组标记（诸如胰岛素或胰高血糖素特异标记）来分析移植的功效。这些标记可以分开使用，或者彼此联合。另外，这些标记中的一种或多种的联合可以联合细胞形态学使用，以测定移植的功效。

在一个实施方案中，可以在SCID（重度联合免疫缺陷）小鼠中构建人胰模型。可以如下构建这种人胰模型：使用通过本文公开的方法分离和培养人胰祖细胞，使用人胰祖细胞生成移植重组体，然后将移植重组体置于小鼠的肾膜下。在植入肾膜下大约1 - 10周、优选大约6 - 8周后，收获移植物或其部分，并进行免疫组织化学分析。将外分泌或内分泌功能特异标记（诸如胰岛素或胰高血糖素）用于分析组织模型系统的功效。或者，使用胰组织诸如胰岛细胞（即PDX-1）、腺泡细胞（即淀粉酶）、导管细胞（即CK19）的特异标记。评估胰祖细胞分化结果的还有一种方法是形态学。胰祖细胞具有如下外观：小且圆，直径大约 $10\text{ }\mu\text{m}$ ，且是高度致密柱状上皮细胞。腺泡细胞具有大簇形成腺泡的外观。导管细胞具有如下外观：小且圆，直径大约 $40\text{ }\mu\text{m}$ ，且是致密立方柱状上皮。胰岛细胞具有由腺泡外分泌单位包围的上皮岛的外观。另外，为了更完整的评估，可以将形态学与胰岛素和胰高血糖

素的功能标记和特定细胞的细胞表面标记联合使用。因而，重组体组织在小鼠中代表完全是人的微型胰。这些人胰组织模型可用于评估开发中的候选药物治疗I型和II型糖尿病、胰腺炎、胰腺癌、和其它胰腺机能不全的功效和毒性。它们还可用于筛选胰毒性的任何药物。在还有一种用途中，受体动物将经历胰或胰岛- $\beta$ 细胞的手术或化学（即链脲菌素，streptazotocin）消除，所以生成的胰岛素均来自移植植物。

### 胰祖细胞在生物测定法中的用途

本文公开的胰祖细胞可用于多种生物测定法。在一种用途中，将胰祖细胞用于测定哪种生物学因子是分化所必需的。通过以逐步方式使用胰祖细胞并联合不同生物学化合物（诸如激素、特定生长因子、等），可发现一种或多种特定生物学化合物能够诱导分化成为胰岛细胞。采用相同的逐步联合，可发现一种或多种特定生物学化合物能够诱导分化成为腺泡细胞，这对导管细胞同样是可行的。胰祖细胞在生物学测定法中的其它用途是差异显示（即mRNA差异显示）和使用来自胰祖细胞的分泌型蛋白质的蛋白质-蛋白质相互作用。可以通过诸如酵母双杂交系统等技术来测定蛋白质-蛋白质相互作用。来自胰祖细胞的蛋白质可用于鉴定与胰祖细胞相互作用的其它未知蛋白质或其它细胞类型。这些未知蛋白质可以是下列一种或多种：生长因子、激素、酶、转录因子、翻译因子、和肿瘤抑制基因。涉及胰祖细胞和这些细胞形成的蛋白质-蛋白质相互作用和蛋白质-蛋白质或甚至细胞-细胞接触的效果的生物测定法可用于测定周围组织（诸如间充质组织）如何促进胰祖细胞的分化。

下列实施例提供了分离、表征、和使用胰祖细胞的详述。这些实施例并非意欲以任何方式限制本发明。

## 实施例

### 实施例1：胰祖细胞的分离

在立体显微镜下通过显微解剖即机械的撕开胎胰（孕龄14-22

周），然后进行酶促解离。酶处理包括将部分解离的组织置于1ml 含5mg/ml 胶原酶 - 分散酶、20 μg/ml 大豆胰蛋白酶抑制剂、和50 μg/ml DNA酶的F12/DMEM培养基中，并于37℃保温15分钟。

将细胞聚集体分层置于5%（体积比）BSA梯度的顶端，并通过离心（900rpm，6min）进行清洗。将仍然处于聚集体形式的细胞沉淀重悬于由包含下列因子的CMRL 1066营养培养基构成的生长培养基中：

胰岛素	10 μg/ml
转铁蛋白	10 μg/ml
表皮生长因子	5ng/ml
乙醇胺	10 <sup>-6</sup> M
磷酸乙醇胺	10 <sup>-6</sup> M
硒	2.5x10 <sup>-8</sup> M
三碘甲腺原氨酸	10 <sup>-12</sup> M
孕酮	10 <sup>-9</sup> M
氢化可的松	10 <sup>-9</sup> M
毛喉素	1 μM
heregulin	10nM
抑酶肽	25 μg/ml
牛垂体提取物	75 μg/ml
庆大霉素	100 μg/ml

将重悬的细胞聚集体分配到24孔板经纤连蛋白包被的孔（6-12）中，并在增湿的37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中保温72小时。72小时后，上皮细胞形成悬浮的球形结构（图1A），而间充质或基质细胞粘附于孔壁。当期望单层结构时，用微量移液管收集6个孔的胰聚集体或胰球，并置于经胶原包被的60mm培养皿中，使用F12/DMEM作为基本营养培养基，并添加本文公开的营养物。24小时内，上述结构贴壁，来自上述结构的细胞在胶原上展开而形成上皮单层（图1B）。这些胰祖细胞至少可以传代三次（图2）。

## 实施例2：胰祖细胞在移植中的用途

为了重组体移植的目的，自最初涂板开始将细胞保持在球形状态，或者，由胶原释放单层，并在未包被瓶中培养，其中它们保留在悬浮液中并再次聚集成球形结构。

为了移植的目的，将球置于来自e15大鼠的精囊间充质的顶端，通常是5–8个球使与 $2 \times 10^5$ – $5 \times 10^5$ 个细胞的间充质聚集体。将每个重组体置于琼脂的顶端，并在增湿的37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中保温过夜。

移植包括将3–6个重组体置于免疫缺陷小鼠（裸鼠或SCID）的肾膜下并保留6–8周。然后收获并加工移植物用于免疫组织化学。

通过形态学评估胰组织重组移植物的移植结果。胰祖细胞具有如下外观：小且圆，直径大约10 μm，且是高度致密的柱状上皮形式。腺泡细胞具有大簇形成腺泡的外观（图3E）。导管细胞具有如下外观：小且圆，直径大约40 μm，且是致密的立方柱状上皮（图3D）。胰岛细胞具有由腺泡外分泌单位包围的上皮岛的外观（图3A、3B、3C、和图7）。

## 实施例3：测定移植的胰祖细胞移植物细胞的身份、胰祖细胞的分化状态、和它们的功能

在将胰球移植到小鼠的肾膜下并将其在该部位保留6–8周之后，收获并分析移植物，通过免疫组织化学和功能来鉴定胰细胞。显示了移植物表达胰岛素和胰高血糖素（图4、5、和7）。另外，显示了组织移植重组体形成导管结构（图6）。因此，组织重组移植物产生能够表达胰岛素和胰高血糖素并形成导管结构的有功能的胰细胞。

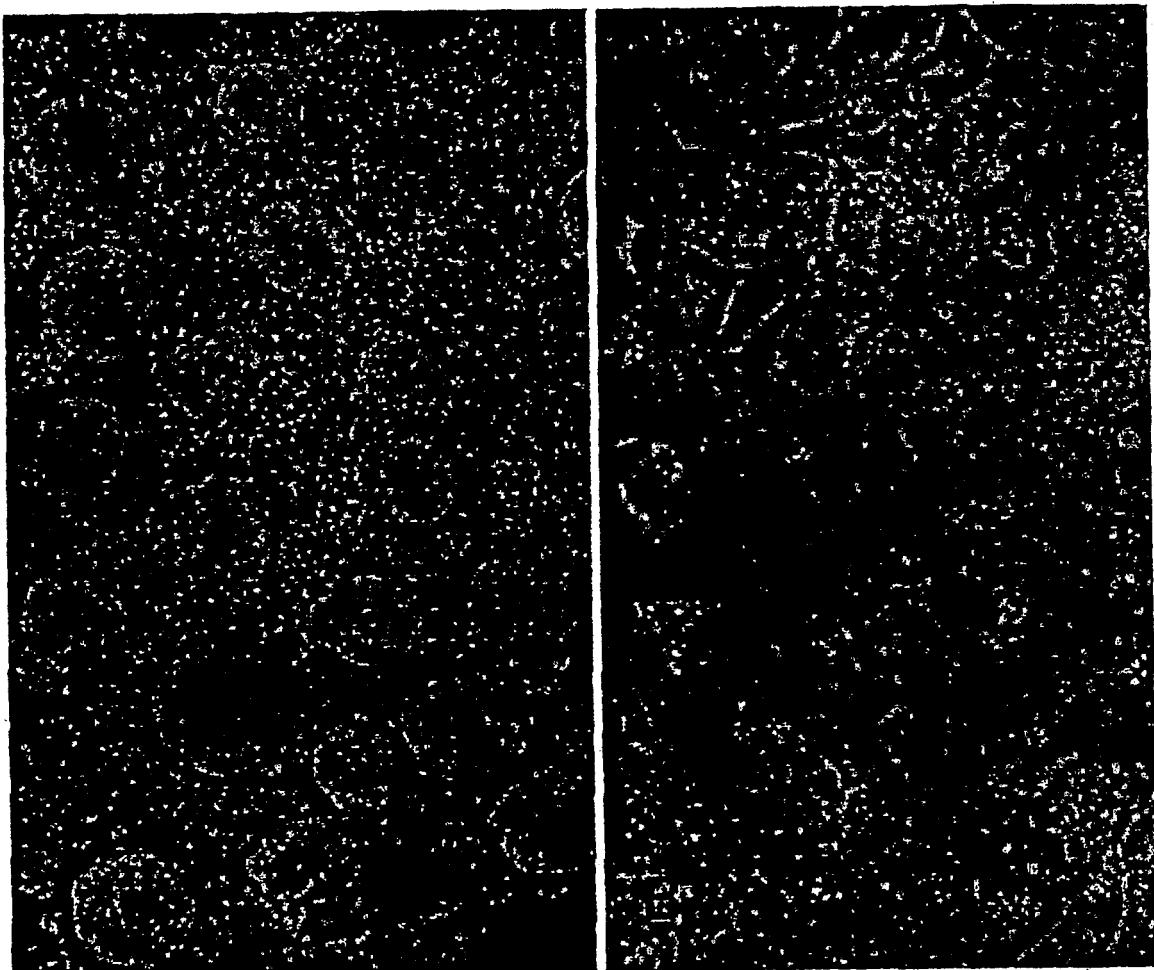


图 1

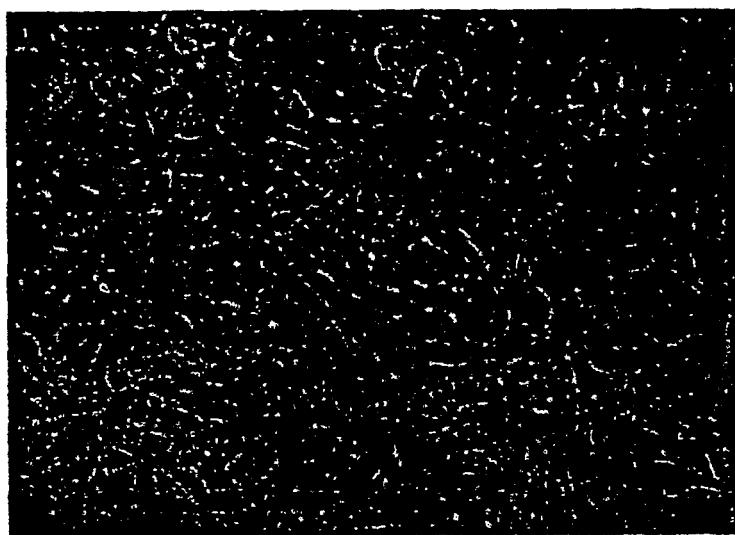


图 2

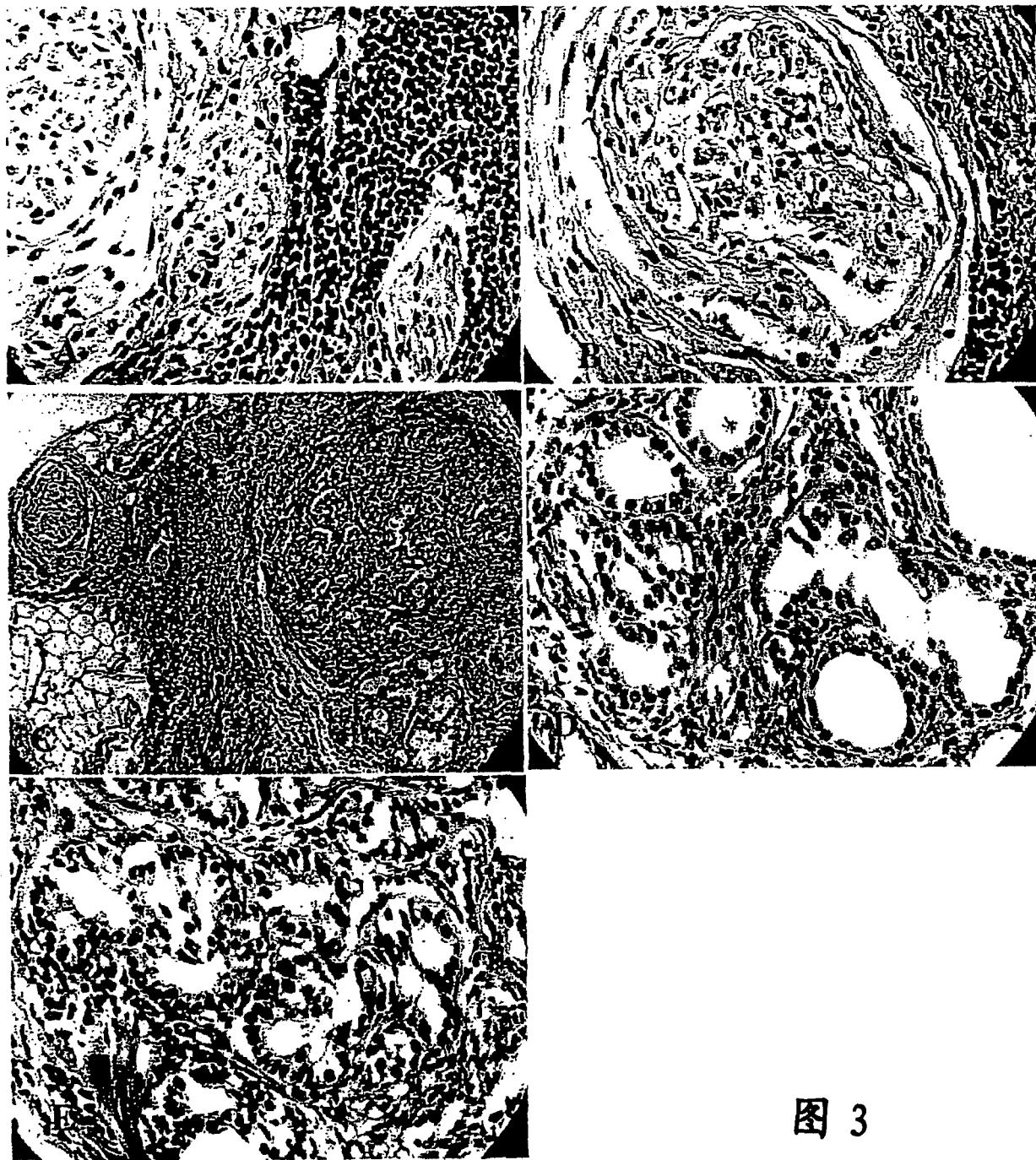


图 3



图 4

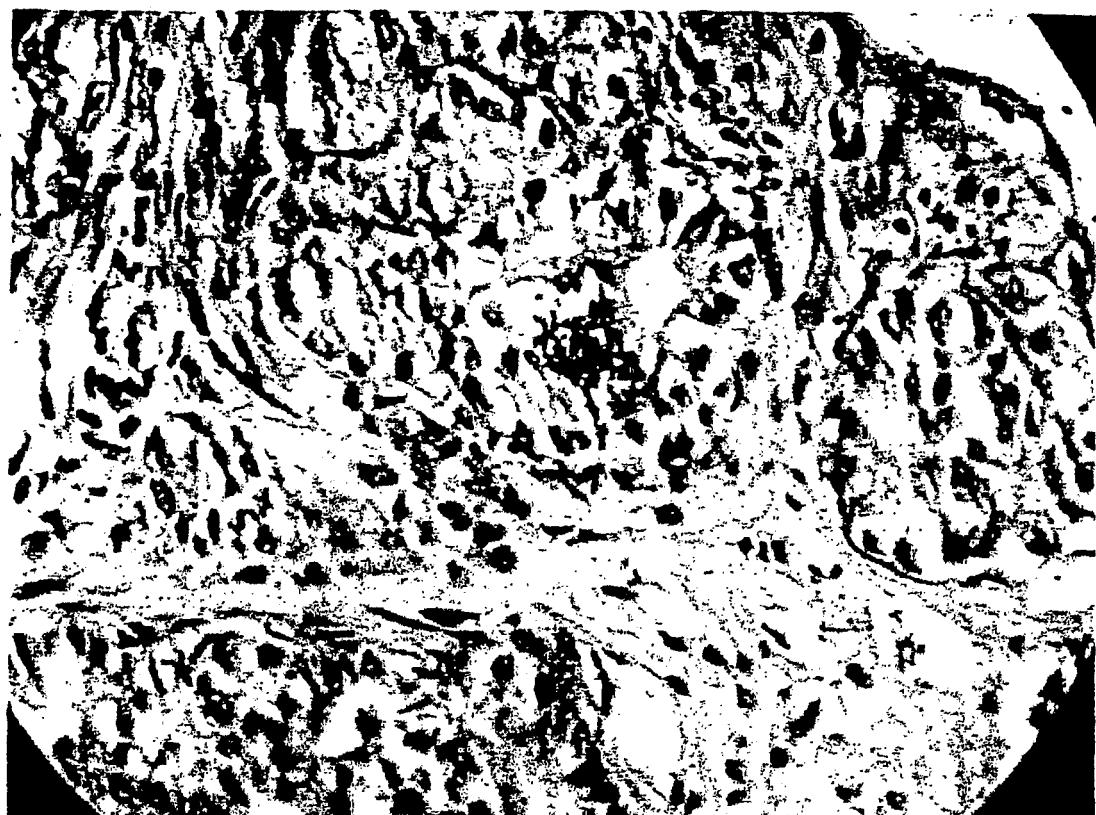


图 5

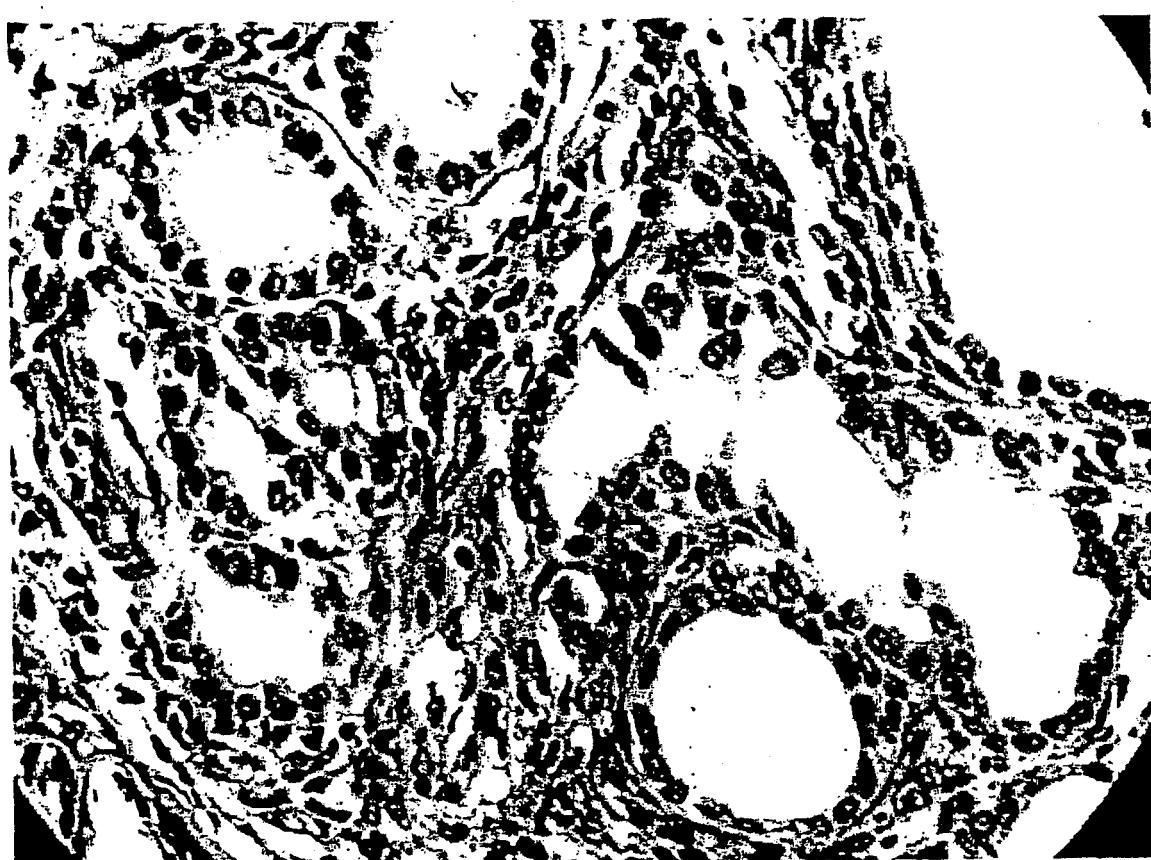


图 6

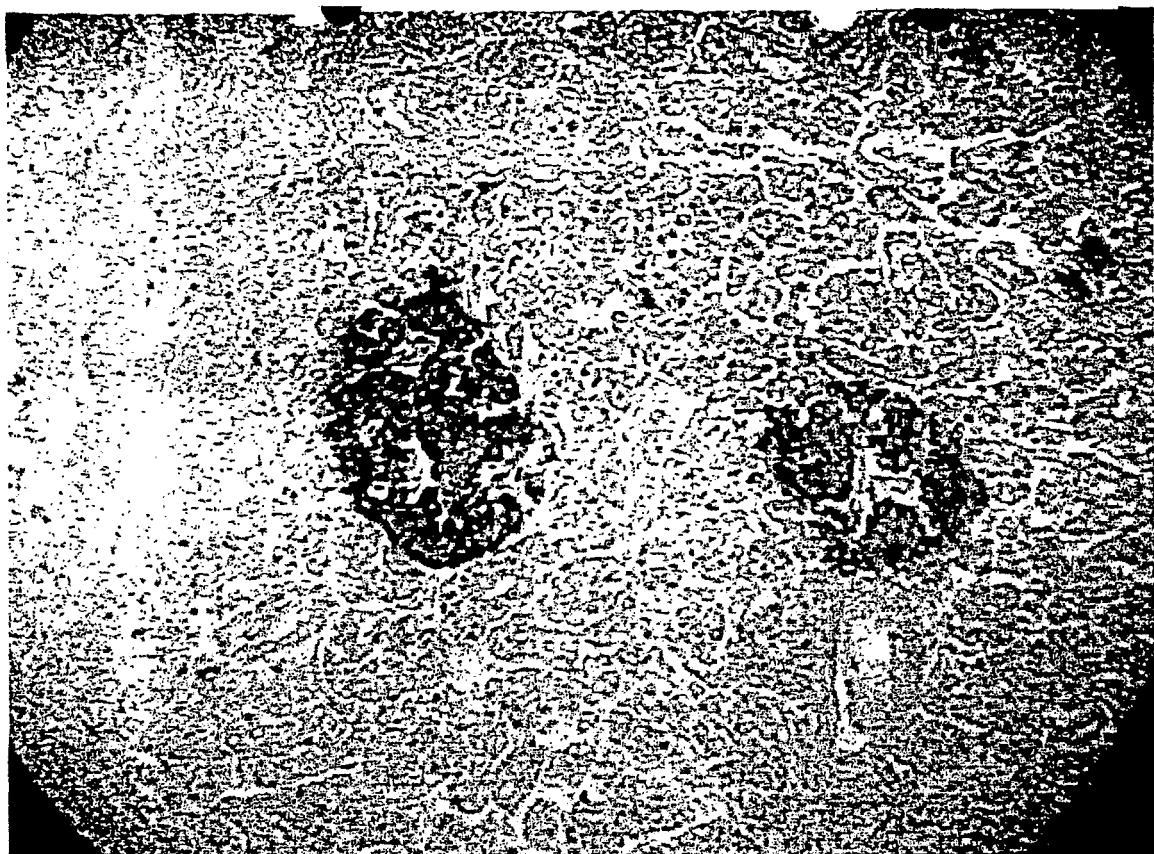
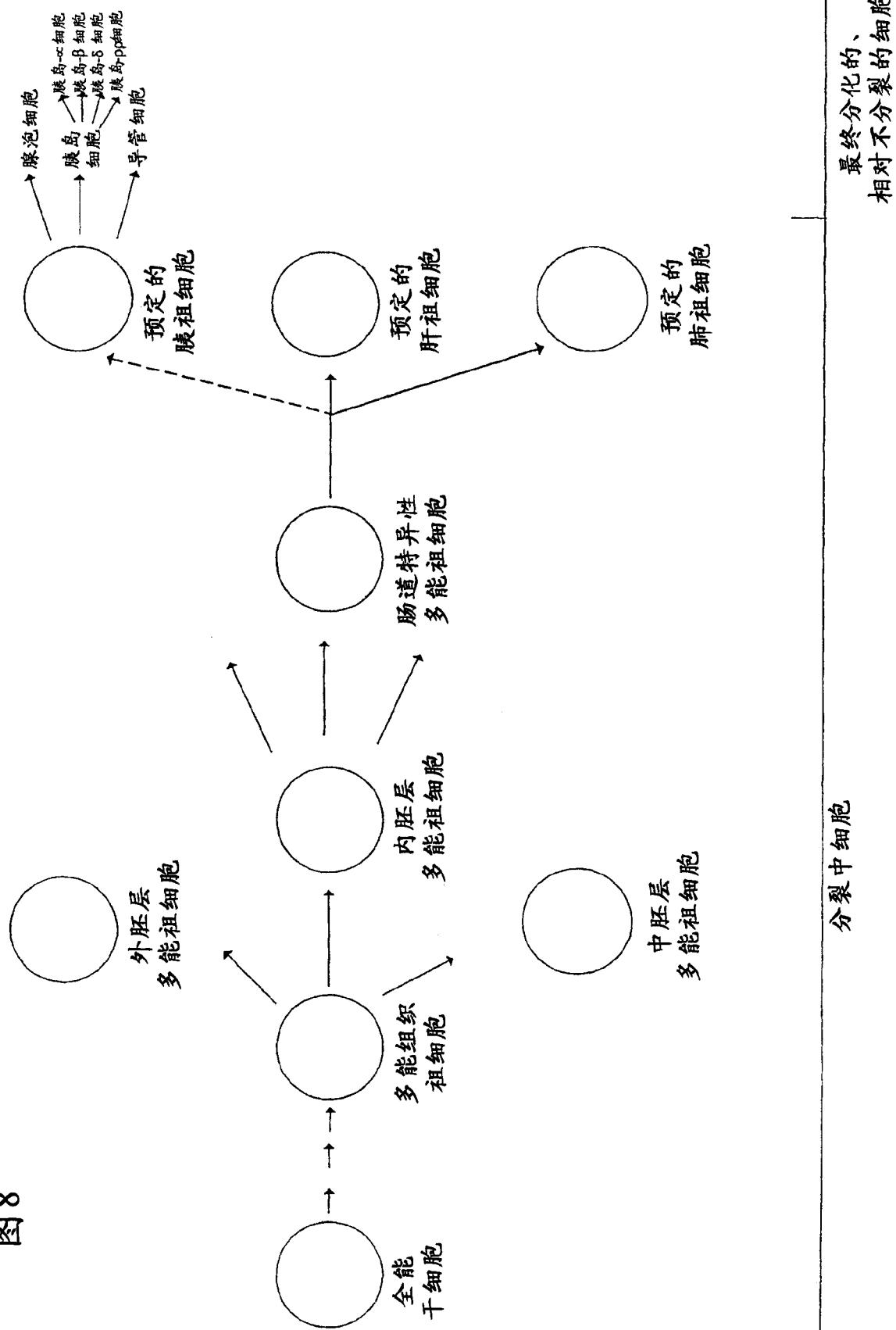


图 7

图 8



专利名称(译)	人胰上皮祖细胞及其分离和使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1425061A</a>	公开(公告)日	2003-06-18
申请号	CN01807876.1	申请日	2001-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	雷文生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	雷文生物技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	雷文生物技术公司		
[标]发明人	JP马瑟		
发明人	P·E·罗伯特兹 J·P·马瑟		
IPC分类号	C12Q1/02 A61K35/12 A61K35/39 A61K39/00 A61P3/10 C12N5/02 C12N5/071 C12N5/074 C12N5/06 C12N1/38 A61L27/00 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	C12N2500/25 C12N2501/392 C12N2500/99 A61K2035/122 C12N2501/39 C12N2501/395 C12N5/0678 A61K2035/126 C12N2501/11 A61K35/12 C12N2501/60 A61K2039/515 A61P1/18 C12N2500/90		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	09/546577 2000-04-10 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

本发明公开了基本纯的人胰祖细胞群体，以及分离和培养胰祖细胞的方法。通过小心操作胰祖细胞的微环境，可以得到多次传代，其中胰祖细胞不衰老且能够成为有功能的外分泌或内分泌细胞。另外，本文还公开了使用人胰祖细胞的几种方法。

