



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102264221 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 30

(21) 申请号 200980152496. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 12. 23

*A01N 1/02* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*A01N 59/00* (2006. 01)

61/140908 2008. 12. 26 US

*A61J 1/00* (2006. 01)

61/223595 2009. 07. 07 US

*C12N 5/071* (2006. 01)

*C12M 1/38* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 06. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/069401 2009. 12. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02010/075509 EN 2010. 07. 01

(71) 申请人 贝勒研究院

地址 美国德克萨斯

(72) 发明人 松本慎一 T·池元

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 刘丹妮

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 7 页

(54) 发明名称

用来保存用于移植的胰腺组织和胰岛细胞的设备和方法

(57) 摘要

本发明包括用于制备、保存和贮藏用于移植的器官（例如，胰岛细胞）的组合物和方法，其通过贮藏器官进行，在所述的储藏中将所述器官悬浮在用于维持生存能力的溶液中，并且在整个贮藏期间内所述器官或细胞在冷却单元中冷却，其中设备内平均温度自设定温度的变化不超过 2°C。

1. 一种用于贮藏器官、组织或细胞的设备,其中所述器官、组织或细胞悬浮于一种维持生存能力的溶液中,并且将所述器官、组织或细胞在整个贮藏期间在冷却单元中冷却,其中设备中的平均温度从设定温度变化不超过 2°C。

2. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述设备在 18 分钟内将器官或组织从体温冷却至约 4°C。

3. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述设备进一步包含一个或多个保护气的入口,所述保护气选自 CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub> 或 O<sub>2</sub>。

4. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述设备包含一个或多个用于测定器官或细胞温度的探头。

5. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述设备内部的温度自设定温度的变化不超过 1°C。

6. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述设备内部的温度自设定温度的变化不超过 0.5°C。

7. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述设备的设定温度大于 0、1、2、3、4、5 或 6°C。

8. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述器官或组织包含至少一部分的肝脏、肺、角膜、肌肉、心脏、胰腺、胰岛、肾、胸、眼睛、耳朵、骨或骨髓。另一方面,该器官在贮藏期间用一种或多种能增强器官移植的活性试剂处理。

9. 如权利要求 1 所述的设备,其中贮藏的器官或组织的生存能力为至少 80%。

10. 如权利要求 1 所述的设备,其中该贮藏的器官或组织的生存能力为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40% 和 30%。

11. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述器官或组织在存储期间用一种或多种活性试剂处理,所述活性试剂选自抗体、酶、类固醇、抗生素、蛋白酶、核酸酶、载体、核酸、蛋白质、肽、脂质、碳水化合物、盐、矿物质、维生素、缓冲剂、气体、电脉冲、机械应力(延伸和/或压缩)、辐射或毒素。

12. 一种保存器官或组织的方法,其包含:

获得用于移植的器官或组织;

将该器官或组织置于保存液中;

冷却该器官或组织到预先选定的温度;

并且在贮藏期间内维持该器官或组织在预先选定的温度,其中温度自预先选定的温度的变化不超过 2°C。

13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述设备在 18 分钟内将器官或组织从体温冷却至约 4°C。

14. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述设备进一步包含一个或多个保护气的入口,所述保护气选自 CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub> 或 O<sub>2</sub>。

15. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述设备包含一个或多个用于测定器官或细胞温度的探头。

16. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述设备内部的温度从设定温度的变化不超过 1°C。

17. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述设备内部的温度从设定温度的变化不超过 0.5°C。

18. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述设备的设定温度大于 0、1、2、3、4、5 或 6℃。
19. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述器官或组织包含至少一部分的肝脏、肺、角膜、肌肉、心脏、胰腺、胰岛、肾、胸、眼睛、耳朵、骨或骨髓。
20. 如权利要求 12 所述的方法,其中贮藏的器官或组织的生存能力为至少 80%。
21. 如权利要求 12 所述的方法,其中贮藏的器官或组织的生存能力为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40%和 30%。
22. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述器官或组织在存储期间用一种或多种能增强器官移植的活性试剂处理。另一方面,所述器官在存储期间用一种或多种活性试剂处理,所述活性试剂选自抗体、酶、类固醇、抗生素、蛋白酶、核酸酶、载体、核酸、蛋白质、肽、脂质、碳水化合物、盐、矿物质、维生素、缓冲剂、气体、电脉冲、机械应力(延伸和/或压缩)、辐射或毒素。
23. 一种制备可移植的胰岛制剂的方法,该方法包括步骤:从给体获得胰腺或胰腺组织;将 ET-Kyoto 溶液或其等价物注入一个或多个胰管;分离  $\beta$ -胰岛细胞;冷却胰腺或胰腺组织到预先选定的温度;并且在设备中维持胰腺或胰腺组织在预先选定的温度,在贮藏期间的温度自预先选定的温度的变化不超过 2℃。
24. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述设备内部的温度从设定温度的变化不超过 1℃。
25. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述设备内部的温度从设定温度的变化不超过 0.5℃。
26. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述设备的设定温度大于 0、1、2、3、4、5 或 6℃。
27. 如权利要求 23 所述的方法,其中分离  $\beta$ -胰岛细胞的步骤使用胶原酶来完成。
28. 如权利要求 23 所述的方法,其中分离的  $\beta$ -胰岛细胞的回收率为至少 35%。
29. 如权利要求 23 所述的方法,其中分离的  $\beta$ -胰岛细胞的回收率为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、35%、30%、25%和 20%。
30. 如权利要求 23 所述的方法,其中分离的  $\beta$ -胰岛细胞的纯度为至少 70%。
31. 如权利要求 23 所述的方法,其中分离的  $\beta$ -胰岛细胞的纯度为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、35%、30%。
32. 如权利要求 23 所述的方法,其中分离的  $\beta$ -胰岛细胞的生存能力为至少 80%。
33. 如权利要求 23 所述的方法,其中分离的  $\beta$ -胰岛细胞的生存能力为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40%和 30%。
34. 如权利要求 23 所述的方法,其中人类白介素 -1 拮抗剂选自:一种或多种白介素 -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 基因转录物的修饰剂;一种或多种 IL-1 $\beta$  基因转录物的修饰剂;一种或多种以表达 IL-1 $\beta$  为目标的 siRNA;一种或多种 IL-1 $\beta$  受体阻滞剂;一种或多种白介素 -1 受体拮抗剂蛋白;一种或多种调节 IL-1 $\beta$  释放的活性剂;一种或多种中和 IL-1 $\beta$  的抗体;一种或多种阻断 IL-1 $\beta$  受体的抗体;一种或多种重组的自然地存在 IL-1 $\beta$  受体拮抗剂;一种或多种能抑制 IL-1 $\beta$  释放的阴离子输送抑制剂,脂氧素和  $\alpha$ -生育酚;一种或多种能抑制蛋白水解酶将惰性的 IL-1 $\beta$  前体转化成其成熟的活性形式的类罂粟碱;一种或多种能中和 IL-1 $\beta$  的生物学功能的抗体,及其混合物或组合物。
35. 如权利要求 23 所述的方法,进一步包含给患者提供肿瘤坏死因子拮抗剂,所述的

肿瘤坏死因子拮抗剂选自基因转录抑制剂、惰性的肿瘤坏死因子、肿瘤坏死因子受体阻滞剂和可溶的肿瘤坏死因子受体。

36. 一种存储可移植的器官或组织的方法,该方法包括步骤:

获得可移植的器官或组织;

将该器官或组织置于保存液中;

冷却该器官或组织到预先选定的温度;

并且维持该器官或组织在预先选定的温度,在贮藏期间的温度自预先选定的温度的变化不超过 1°C。

37. 如权利要求 36 所述的方法,其中所述的可移植的器官或组织的生存能力为至少 80%。

## 用来保存用于移植的胰腺组织和胰岛细胞的设备和方法

### 发明领域

[0001] 本发明总的来说涉及胰岛移植领域,更为具体地,涉及用于改进移植前的胰腺组织和胰岛细胞的保存的新的设备和方法。

### [0002] 发明背景

[0003] 在不限制本发明保护范围的情况下,本发明背景的描述是关于胰岛细胞移植的。

[0004] 在授权给 Mullen 等人的第 5,679,565 号美国专利中,示教了一种用于改善胰岛保存的方法。Mullen 示教了用于制备和贮藏胰岛的方法、溶液和腔室(chamber)。所述方法包括将胰腺与温的胶原酶溶液接触,在所述温的胶原酶溶液中消化该胰腺以形成温的消化物,向该温的消化物中加入冷的防腐剂溶液,在温度为 0-15°C 之间搅动该温的消化液/冷的防腐剂溶液,从而进一步消化所述的温的消化液中包括的部分消化的胰腺,以形成冷的消化物并且收集来自该冷的消化体中的液体以形成分离的胰岛。本发明的所述的冷的防腐剂溶液和胰岛防腐剂溶液包括 D-甘露醇, K-乳糖醛酸酯(K-lactobionate) 和缓冲剂。

[0005] 在由 Toledo 等人提交的第 20070009880 号美国专利申请中示教了另一种方法,所述的专利申请关于用于存储给体器官的方法和溶液。简要地说, Toledo 等人示教了保存、贮藏和移植哺乳动物给体器官的方法。该方法包括冷藏保存的冷却,装载预冷冻室保存,低温保存,以及洗涤溶液,所述的洗涤溶液至少包含聚乙烯吡咯烷酮、钙通道阻滞药、核苷、氯化钾、聚乙烯乙二醇,至少一种氨基酸,和类固醇,所述的溶液温度在 2-4°C 和 / 或 0-2°C, 获得给体的器官,将其用一种或多种所述溶液灌注,将其沉浸在一种或多种所述溶液中并且在 0°C 以上或在低于 0°C、-20°C、-80°C 和 -196°C 下进行贮藏。所述低温保存溶液还包含低温贮藏试剂。保存的器官可以从冷库直接移植或者通过冷却该洗涤冷藏保存溶液至 2-4°C, 先后用洗涤溶液和保存溶液灌注该器官进行冷藏,然后将其移植。

[0006] 在由 Gen 提交的第 20020164795 号美国专利申请中还示教了另一种方法和组合物,是关于用于保存动物细胞、组织或器官的贮藏剂以及它们的保存过程。简要地说,申请涉及用于保存动物细胞或器官的贮藏剂以及保存过程。采用常规的细胞存储方法,所述的方法通过在 -196°C 的特低温度下冷冻。在融化和熔解后细胞的生存率很低,约 10-30%。有效期非常短为 12-72 小时。贮藏剂可以使得蛋白被蛋白类贮藏剂稳定化,以及通过加入多酚来预防、治疗并且改善由器官移植手术引起的器官损伤。

### [0007] 发明概述

[0008] 尽管有组合物和试剂用于改善移植器官的保存,但是还需要延长存储的时间长度并改善在器官取出、处理及运输之后的器官的质量。由于用于移植的器官的有效性还跟不上器官的需求,为了使可用的给体器官的有限资源最大化,改善的方法是必要的。

[0009] 本发明不仅增加用于能活的器官的存储时间,还提高用于移植的器官的品质。增加贮藏时间、生存能力和器官品质对于允许对器官的测试、运输的时间和移植的成功率都是至关重要的。

[0010] 在一个实施方案中,本发明包括一种用于贮藏器官或组织的设备和方法,其中所述的器官或组织悬浮于一种用于维持生存能力的溶液中,并且该器官、组织或细胞在整个

贮藏期间内在冷却单元中冷却,其中在该设备内平均温度从设定温度变化不超过 2°C。一方面,该设备在 18 分钟内将器官或组织从体温冷却至约 4°C。另一方面,该设备进一步包括一个或多个保护气的入口,所述的保护气选自 CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub> 或 O<sub>2</sub>。另一方面,该设备包括一个或多个测定器官或细胞的温度的探头。另一方面,该设备内部的温度从设定温度的变化不超过 1°C。另一方面,该设备的设定温度大于 0、1、2、3、4、5 或 6°C。一方面,该器官或组织包含至少一部分的肝脏、肺、角膜、肌肉、心脏、胰腺、胰岛、肾、胸、眼睛、耳朵、骨或骨髓。另一方面,该器官或组织在贮藏期间用一种或多种能提高器官移植质量的活性试剂处理。另一方面,该器官或组织在存储期间用一种或多种活性试剂处理,活性试剂选自抗体、酶、类固醇、抗生素、蛋白酶、核酸酶、载体、核酸、蛋白质、肽、脂质、碳水化合物、盐、矿物质、维生素、缓冲剂、气体、电脉冲、机械应力(延伸和/或压缩)、辐射或毒素。在再另一方面中,该贮藏的器官或组织的生存能力至少为 80%。某个方面,该贮藏的器官或组织的生存能力为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40% 和 30%。

[0011] 在另一个实施例中,本发明包括一种保存器官或组织的方法,该方法通过获得用于移植的器官或组织,将该器官或组织置于保存液中,冷却该器官或组织到预先选定的温度,并且在贮藏期间内维持该器官或组织在预先选定的温度,其中温度自预先选定的温度的变化不超过 2°C。一方面,该设备在 18 分钟内将器官或组织从体温冷却至约 4°C。另一方面,该设备进一步包括一个或多个保护气的入口,保护气选自 CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub> 或 O<sub>2</sub>。另一方面,该设备包括一个或多个用于测定器官、组织或细胞的温度的探头。另一方面,该设备内部的温度从设定温度的变化不超过 1°C。另一方面,该设备的设定温度大于 0、1、2、3、4、5 或 6°C。一方面,该器官或组织包含至少一部分的肝脏、肺、角膜、肌肉、心脏、胰腺、胰岛、肾、胸、眼睛、耳朵、骨或骨髓。另一方面,该器官或组织在存储期间用一种或多种能增强器官移植质量的活性试剂处理。另一方面,该器官或组织在贮藏期间用一种或多种活性试剂处理,活性试剂选自抗体、酶、类固醇、抗生素、蛋白酶、核酸酶、载体、核酸、蛋白质、肽、脂质、碳水化合物、盐、矿物质、维生素、缓冲剂、气体、电脉冲、机械应力(延伸和/或压缩)、辐射或毒素。在再另一方面,该贮藏的器官或组织的生存能力至少为 80%。某个方面,该贮藏的器官或组织的生存能力为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40% 和 30%。

[0012] 更为具体地,本发明还可以与改进的组合物和制备可移植的胰岛制剂的方法一起使用,该方法比如,从给体获得胰腺或胰腺组织;将 ET-Kyoto 溶液或其等价物注入一个或多个胰管;分离 β-胰岛细胞;并且在胰岛移植的时候用人类白介素-1 拮抗剂治疗患者。在一个实施方案中,其中 β-胰岛细胞用适当的胶原酶,如人类胶原酶处理。在一个特定的例子中,该胰岛从胰腺提取后在 ET-Kyoto 溶液中加工。一方面,人类白介素-1 拮抗剂选自:一种或多种白介素-1β (IL-1β) 基因转录物的修饰剂;一种或多种 IL-1β 基因转录物的修饰剂;一种或多种以表达 IL-1β 为目标的 siRNA;一种或多种 IL-1β 受体阻滞剂;一种或多种白介素-1 受体拮抗剂蛋白;一种或多种调节 IL-1β 释放的活性剂;一种或多种中和 IL-1β 的抗体;一种或多种阻断 IL-1β 受体的抗体;一种或多种重组的自然地存在 IL-1β 受体拮抗剂;一种或多种抑制 IL-1β 释放的阴离子输送抑制剂、脂氧素 (lipoxin) 和 α-生育酚;一种或多种抑制蛋白水解酶将惰性的 IL-1β 前体转化成其成熟的活性形式的类罂粟碱;一种或多种能中和 IL-1β 的生物学功能的抗体,及其混合物或组合物。在一个特定的例子中,IL-1β 拮抗剂是阿那白滞素 (anakinra)。该方法还可以进一步包括同时

给患者提供肿瘤坏死因子拮抗剂,所述的肿瘤坏死因子拮抗剂选自基因转录抑制剂、惰性的肿瘤坏死因子、肿瘤坏死因子受体阻滞剂和可溶的肿瘤坏死因子受体。

[0013] 一方面,分离的  $\beta$ -胰岛细胞的回收率为至少 35%。另一方面,分离的  $\beta$ -胰岛细胞的回收率为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、35%、30%、25% 和 20%。再另一个方面,分离的  $\beta$ -胰岛细胞的纯度为至少 70%。一方面,分离的  $\beta$ -胰岛细胞的纯度为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、35%、30%。在一个特定的方面,分离的  $\beta$ -胰岛细胞的生存能力为至少 80%。在某些方面,分离的  $\beta$ -胰岛细胞的生存能力为 100%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40% 和 30%。

[0014] 本发明的另一方面是一种制备可移植的胰岛制剂的方法,该方法包括下列步骤:从给体获得胰腺或胰腺组织;将 ET-Kyoto 溶液或其等价物注入一个或多个胰管;在胰岛素抑制剂的存在下从获得的胰腺或胰腺组织中分离  $\beta$ -胰岛细胞;并且在胰岛移植的时候用人类白介素-1 拮抗剂治疗患者。胰岛素抑制剂的实例包括血清  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶、利马豆胰岛素抑制剂、Kunitz 抑制剂、卵类粘蛋白抑制剂或大豆抑制剂。

[0015] 本发明的另一个实施方案是一种制备可移植的胰岛制剂的方法,其通过从给体获得胰腺或胰腺组织;在胰岛素抑制剂的存在下从获得的胰腺或胰腺组织中分离  $\beta$ -胰岛细胞;并且在胰岛移植的时候用人类白介素-1 拮抗剂和肿瘤坏死因子拮抗剂治疗患者。一方面,可移植的胰岛制剂的生存能力为至少 80%。

[0016] 附图的简要说明

[0017] 为了更完全地理解本发明的特征和优点,在此参考本发明的详述以及所附的图,其中:

[0018] 图 1 对比了现有技术下在 37°C 下 48 小时的猪胰腺保存,采用传统的猪胰腺冷藏保存在 4°C 下和采用本发明的保存设备同样在 4°C 下 48 小时的猪胰腺保存;

[0019] 图 2 是显示了每区域的胰岛数量的图表,其对比了现有技术下胰腺使用保存溶液贮藏在 37°C、4°C 下和本发明(每区域胰岛细胞数量(40X));

[0020] 图 3 对比了人类胰岛细胞在 37°C、22°C、4°C 下和使用本发明的设备和方法在 4°C 下分别保存 48 和 72 小时后的形态学;

[0021] 图 4 通过用两种不同的染料着色对比了人类胰岛细胞在 37°C、22°C、4°C 下或使用本发明的设备和方法在 4°C 下保存 48 小时后的生存能力;

[0022] 图 5 显示了测量期间的温度变化。在测量期间所有的温度都在 0.5°C 的误差范围内。在 5 分钟内温度均达到了 22.0°C、37.0°C 和 4.0°C 的设定值并维持稳定。KFC 的温度按照初始设置迅速降至 6.0°C 并以 0.3°C/小时的速度逐渐降至 1.0°C。所有的温度都是由带有 80PK-1K- 型珠形温差电偶的温度计 54II 测定的;

[0023] 图 6 显示了保存 24、48 和 72 小时的猪胰岛的形态学。在第 1 组(在 37.0°C 保存)和第 2 组(在 22.0°C 保存)中 48 小时后,大的胰岛趋向于消失。在低温设置之间,第 3 组(在 4.0°C 保存)的胰岛与第 4 组(保鲜冷却系统,箭头)的胰岛相比似乎具有更不清楚的界限。原始放大 200 $\times$ ;

[0024] 图 7A 是显示了通过双硫脲着色计算出的猪胰岛回收率的图。公式:保存后的胰岛数目/新分离的胰岛数目(0 小时)(%)。低的温度设定值(在 4.0°C 保存和保鲜冷却系统)能够维持高的回收率。在 48 小时时,第 1 组(在 37.0°C 下保存)的胰岛回收率为

48.7±28.6%，第2组（在22.0℃下保存）为46.6±15.5%，第3组（在4.0℃下保存）为61.5±20.0%，第4组为73.9±17.3%（保鲜冷却系统。分别地，KFC相对于37.0℃和22.0℃的P-值为<0.01，相对于4.0℃的P-值为<0.05）。在72小时时，第1组的胰岛回收率为35.8±18.5%，第2组为31.1±16.6%，第3组为43.5±14.3%，第4组为61.0±22.0%（分别地，KFC相对于37.0℃的P-值为<0.01，相对于22.0℃的P-值为<0.001，相对于4.0℃的P-值为<0.05，Newman-Keuls测试）；

[0025] 图7B是显示了当胰岛等价物被计算在内时的猪胰岛纯度的评价曲线图。在24小时时，第1组的纯度降至85.0±10.0%，第2组中降至83.3±7.6%，第3组中降至82.5±5.0%，第4组中降至85.0±9.4%。在48小时时，第1组的纯度为75.8±20.6%，第2组为78.3±2.9%，第3组为76.7±5.8%，第4组为84.5±9.9%。在72小时时，第1组的纯度为68.6±23.8%，第2组为73.3±14.7%，第3组为77.5±8.7%，第4组为84.0±9.6%。第4组与第1组在48小时、72小时时，胰岛的纯度有明显的不同（P-值在48小时时<0.01，在72小时时<0.05。Newman-Keuls测试）；

[0026] 图7C显示的是通过台盼蓝染色测定的在纯化前(Pre)、保存24、48和72小时后的猪胰岛细胞的生存能力。在24小时时，在37.0℃、22.0℃、4.0℃和KFC的情况下胰岛生存能力分别降至82.1±6.2%、85.0±5.7%、86.0±3.3%和91.1±3.3%。在48小时时，在37.0℃、22.0℃、4.0℃和KFC的情况下胰岛生存能力分别降至80.7±0.2%、85.2±6.4%、83.7±6.6%和90.5±5.4%（KFC相对于37.0℃的P-值为<0.05。Dunnett's测试。图7C）。在72小时时，在37.0℃、22.0℃、4.0℃和KFC的情况下胰岛生存能力分别降至78.0±9.1%、80.0±4.6%、82.0±1.8%和89.1±2.6%（KFC相对于37.0℃的P-值为<0.05。Dunnett's测试。图7C）；并且

[0027] 图8是显示了由KFC保存72小时的猪胰岛的体外功能用刺激指数作为量度标准的图。计算出刺激指数(SI)，并且与保存在37.0℃下（作为常规的保存设置）的胰岛的SI值进行对比。在37℃下保存72小时的胰岛的平均SI为1.4±0.4，KFC的条件下胰岛的平均SI为3.0±2.1，KFC的条件下保存的胰岛的平均SI明显较高（P<0.03，不成对的t-检验，3个独立的研究）。

[0028] 发明详述

[0029] 尽管下面详细讨论了本发明的各种实施例的制造和使用，但是应当认识到本发明提供了许多可应用的发明构思，这些构思可以在大量特定的环境下被具体化。这里讨论的特定的实施方案只是说明本发明制造和使用的特定方式，而不限定本发明的范围。

[0030] 为了便于理解本发明，下面定义了大量的术语。这里定义的术语具有与本发明相关的领域内普通技术人员通常所理解的含义。术语如“一个”、“一”和“该（所述）”不意图仅仅指一个单一的实体，而包括可以用一个特定的例子来说明的一般的种类。这里的术语用于描述本发明特定的实施例，其用法不限定本发明，除了在权利要求书中所描述的。

[0031] I型糖尿病(DM)是一种有着重大社会和经济影响的疾病。在美国19岁及以下大约有120,000人患有这种疾病，全部年龄段共有300,000到500,000人，全世界共有1.5亿人患有这种疾病。每年在美国有30,000例新诊断出的案例。在美国DM是儿童最常见的慢性疾病之一<sup>1</sup>。在美国每年这种疾病的治疗和并发症的花费为900亿美元。

[0032] 胰岛细胞移植(ICTx)是I型糖尿病(T1DM)的一种有希望的疗法，然而，其广泛应



用的局限性是由于一些关键的问题<sup>2</sup>。这些问题之一是 ICTx 需要大量的胰岛来达到不依赖胰岛素的状态<sup>3</sup>。需要多给体 - 单接受者移植,这是由于需要大量的胰岛用以产生有效的 ICTx。

[0033] 另一个问题是在某些国家严重地缺乏 ICTx 给体,比如日本<sup>4</sup>。有时在这些国家难以找到用于临床的 ICTx 和用于基础研究的尸体给体。先前本发明人报道了临床人类胰岛的国内运输<sup>5</sup>,然而,对于临床人类胰岛的国际运输却存在许多问题,包括 FDA 规则和长期存储。此外,一旦胰岛移植成为标准疗法,由于存在大量的 I 型糖尿病患者,给体的缺乏仍将是主要的问题。在美国目前已有超过一百万的 I 型糖尿病患者,并且每年器官捐赠的数量少于 8000。

[0034] 使用猪胰岛的胰岛移植是解决该问题的一个吸引人的替代品。事实上,已有一些报道表明使用猪胰岛用于临床的 ICTx 的可能性<sup>(6,7)</sup>。猪胰岛同样有一些困难。首先,猪胰岛是脆弱的<sup>(8,9)</sup>。这种脆弱是由于猪胰岛细胞与人类胰岛相比不具有坚固的囊的事实<sup>(10)</sup>。因此,分离的猪胰岛细胞容易受到酶如胰蛋白酶和胶原酶的削弱或破坏。这些酶在各种应力如离心分离机的剪切力,细胞培养和缺氧的环境下削弱猪胰岛细胞。为了将其应用于临床的 ICTx,需要有效地保存脆弱的猪胰岛的方法。

[0035] 已有许多用于低温器官保存有效的和创新的方法的报道<sup>(11,12)</sup>。对于胰腺, Obermaier 等人最近报道了为了防止胰腺缺血 / 再灌注伤害,在 4°C 和其它温度下进行胰腺保存是有效的<sup>13</sup>。然而,多数公布的报道是用于整个器官和有限种类的细胞的,用于细胞悬浮液的报道相对较少,尽管似乎低温对于猪胰岛的保存是最有效的<sup>14-16</sup>。此外,合适的温度设置对于胰岛保存仍然是有争议的<sup>17</sup>。因此,不清楚哪个温度设置对于胰岛是最好的以及胰岛,尤其是猪胰岛的最稳定的保存方法效果如何。Fujiya 公司(德岛,日本)开发了一种新的冷却系统,它可以成功地保存新收获的植物和水果新鲜超过 180 天。保存的植物和水果成为“冬眠状态”。该冷却系统被称为“保鲜冷却系统”(KFC)。该冷却系统可以通过使用计算机频繁辨别物质的内部和表面的温度以及冷藏库内部的温度,以最小的误差逐步冷却来控制物质的温度,所述的温度从 -20°C 到室温。本发明证明了 KFC 系统的应用有效地保存猪胰岛。

[0036] 胰岛分离:从 2008 年 6 月到 2008 年 9 月在美国德克萨斯州由 Owen 有限公司从猪身上获得胰腺作为研究环境。在去除脉管、脂肪、结缔组织和一部分连接的叶片后,这些胰腺被立即运输到 Baylor Institute for Immunology Research (BIIR),在运输中采用两层方法(充氧的全氟化碳和威斯康星州大学溶液),通过 Ricordi 方法和 COBE2991 细胞处理器进行分离和纯化,其此前由本发明人在 Matsumoto S、Noguchi H、Naziruddin B 等人, Improvement of pancreatic islet cell isolation for transplantation, Proc (Bayl Univ Med Cent) 2007 ;20 (4) :357-362 中描述。

[0037] 培养基:将胰岛在用于胰岛的培养基中培养。简要地说,该培养剂包含 CMRL 培养基 (Sigma-Aldrich, 美国) 与人类血清白蛋白, 1M 氢氧化钠和碳酸氢钠。这些培养基通过过滤 (2.4 μm, 美国) 灭菌并在 4°C 下存储在常规的冷藏库中。胰岛用这些培养基 (放置 2,000-3,000 IEQ 胰岛 / 孔) 保存在 12 孔的组织培养盘 (Falcon, 美国) 中,用于评价胰岛的回收率、纯度和生存能力。胰岛同样保存在培养瓶中用于静态培育。在培养过程中,没有经历培养基的变化。

[0038] 冷却系统的胰岛保存和温度设置:胰岛的保存设置被分为4组。第1组的胰岛被培养在37°C,5% CO<sub>2</sub>的培养条件下。第2组的胰岛被培养在22°C,5% CO<sub>2</sub>的培养条件下。第3组的胰岛被培养在4°C,在常规的冷藏库中。第4组的胰岛被培养在“快速冷却条件”的环境下;从室温(RT)快速冷却至4°C,之后以0.5°C/小时的速度逐步冷却降至1.5°C。

[0039] 温度测量:每个温度都是由具有80PK-1K-型珠形温差电偶的温度计(54II, Fluke, 美国)测定的。长期温度由Fluke View Forms软件进行分析。

[0040] 形态学:所有的胰岛都经历组织学检查,所述组织学检查利用在显微镜下的双乙酸盐和苏木精-曙红染色的荧光性。

[0041] 胰岛细胞数目和生存能力:胰岛数目和生存能力是按照Matsumoto S, Noguchi H, Yonekawa Y, Okitsu T, Iwanaga Y, Liu X, 等人, Pancreatic islet transplantation for treating diabetes, Expert Opin Biol Ther 2006;6(1):23-37, 中描述的进行计算,相关部分合并于此作为参考。简要说,在用培养基洗涤胰岛并从5mL样品中取出100 μL之后,对至少两个样品利用双硫脲染料的荧光性、在显微镜下计算胰岛的数目。按照先前的描述,胰岛的数目被转化为胰岛当量(IE)。细胞生存能力是使用选择渗透性膜染料FDA/PI,通过着色在荧光显微镜下评定的。将至少两个胰岛样品评定生存能力,所述的评定使用1%台盼蓝(Sigma 化学公司)用于至少两个样品。

[0042] 静态培育(体外功能):在由KFC体外保存后,为了评价胰岛细胞功能,按照先前的描述进行静态培育<sup>18</sup>。简要说,将等份胰岛(50-100IEQ)平行地与2.8或20mM葡萄糖一起在37°C下培育2小时。将上清中的胰岛素浓度通过ELISA(Alpco, Salem, NH)进行评定。通过荧光计测量胰岛团的DNA含量,从而将胰岛素的浓度标准化。葡萄糖刺激的胰岛素释放表达为刺激指数(SI)。SI按照暴露于高葡萄糖之后的胰岛素释放与在基本条件下的胰岛素释放的比值计算。

[0043] 统计学:描述性的统计学表示为平均值±S.E.,具有定量变量的范围和定性变量的数量(百分数)的中间值。通过使用单边的变量分析(ANOVA)、Kruskal-Wallis测试、Welch测试、Newman-Keuls测试、Dunnett's测试和不成对的t-检验,只要是合适的都可以进行单变量的分析。<0.05的p-值被认为是在统计学上显著的,并且所有报道的p-值都是双边的。所有的分析都是在State Mate III for Windows中进行的。

[0044] 图1对比了猪胰腺保存在现有技术的37°C下48小时,猪胰腺采用传统的冷却单元保存在4°C下和采用本发明的保存设备保存在同样在4°C下48小时。简要说,将八(8)克胰岛细胞切成三块并在列出的温度下贮藏在UW溶液中。使用本发明保存的胰腺最接近地类似于新分离出的猪胰腺。

[0045] 图2是显示了是每区域活的胰岛数量的图表,其对比了现有技术下胰腺使用保存溶液存储在37°C、4°C下和本发明(每区域胰岛细胞数量(40X))。发现使用本发明(标注为KFC)与37°C或标准的4°C冷藏保存的组相比胰岛数量明显较高。

[0046] 图3对比了人类胰岛细胞在37°C、22°C、4°C下或使用本发明的设备和方法在4°C下分别保存48和72小时后的形态学。发现本发明的设备和方法与其它的存储方法和设备相比能够以最高的水平保存人类胰岛。简要说,将人类胰岛细胞在列出的温度下,在使用或不使用本发明的条件下,置于培养基中48或72小时。

[0047] 图4通过用两种不同的染料着色,对比了人类胰岛细胞在37°C、22°C、4°C下或使

用本发明的设备和方法在4℃下保存48小时后的生存能力。人类胰岛细胞在列出的温度和列出的时间下在贮藏的培养基中分离出来。本发明的设备和方法与现有的用于保存和存储的方法相比再一次显示出更高的生存能力。

[0048] 胰岛分离数据显示在表1中。将七个猪胰腺被用于胰岛分离。在去除相连的叶片后平均胰腺重量为 $153.3 \pm 44.5$ g。平均热缺血时间（定义为在猪被杀的时间与胰腺被保存在冷的存储溶液中的时间之间的间隔）为 $45.6 \pm 7.9$ 分钟。平均冷缺血时间（定义为胰腺被保存在冷的贮藏溶液中的时间与胰腺被移出保存溶液用于分离的时间之间的间隔）为 $121.3 \pm 2.2$ 分钟。通过电泵进行胶原酶灌注的平均时间为 $10.7 \pm 1.5$ 分钟。第I阶段的时间（定义为溶液开始循环的时间和开始收集组织的时间之间的间隔。（19））为 $10.4 \pm 2.6$ 分钟，第II阶段的时间（定义为第I阶段结束的时间和胰岛收集结束的时间之间的间隔。（19））为 $40.7 \pm 5.7$ 分钟。纯化后的平均胰岛当量（IE，仅高纯部分）为 $603,805.2 \pm 291,752.0$ IE。平均纯度和平均生存能力分别为 $93.4 \pm 5.2\%$ 和 $98.0 \pm 3.0\%$ 。

[0049] 表1:猪胰岛分离数据

[0050]

胰腺重量 (g) *	$153.3 \pm 44.5$
WIT (分钟)	$45.6 \pm 7.9$
CIT (分钟)	$121.3 \pm 2.2$
灌注时间**	$10.7 \pm 1.5$
第I阶段消化时间*** (分钟)	$10.4 \pm 2.6$
第II阶段收集时间**** (分钟)	$40.7 \pm 5.7$
平均胰岛 IE, 纯化前	$1,049,654.6 \pm 290,590.5$
平均胰岛 IE, 纯化后	
(总计)	$784,206.4 \pm 254,520.5$
(高纯部分 <sup>§</sup> )	$603,805.2 \pm 291,752.0$
平均胰岛 IE/g, 纯化后 <sup>§§</sup>	$4904.2 \pm 2352.7$
平均纯度 <sup>#</sup> (%)	$93.4 \pm 5.2$
平均生存能力 <sup>#</sup> (%)	$98.0 \pm 3.0$

[0051] 猪 n = 7。

[0052] WIT:热缺血时间,CIT:冷缺血时间（定义为从获得的胰腺被放入冰冷的冷却器盒子的时间到开始分离的时间）。

[0053] IE:胰岛当量。

[0054] \* 处理的胰腺重量,去掉一部分连接的叶片、脂肪和连接的组织,

[0055] \*\* 灌注:由电泵注射胶原酶的时间,

[0056] \*\*\* 第I阶段收集:溶液开始循环和组织开始收集之间的时间,

[0057] \*\*\*\* 第II阶段收集:第I阶段结束和胰岛收集结束之间的时间。<sup>§</sup> 高纯部分:定义为<sup>§§</sup> 胰岛 IE/g:纯化的胰岛 IE/ 用于处理的胰腺重量,

[0058] # 高纯部分的纯度和生存能力。

[0059] 在测量过程中,所有的温度相对于开始时的温度都在 0.5℃的范围内(图 5)。在 5 分钟内温度均达到了 22.0℃、37.0℃和 4.0℃的设定值并维持稳定。KFC 的温度按照初始设置迅速降至 6.0℃并以 0.3℃/小时的速度逐渐降至 1.0℃。

[0060] 在 24 小时时,各组胰岛之间不存在明显的形态学差异。然而,在 48 小时后,在第 1 组(37℃)和第 2 组(22℃)中大的胰岛逐渐消失。在低温设置之间,第 3 组(4.0℃)的胰岛与第 4 组(图 6,箭头)的胰岛相比似乎具有更多不清楚的界限。

[0061] 在 24 小时时,在第 1 组中胰岛的回收率为  $51.8 \pm 23.0\%$ ,在第 2 组(图 7A)中为  $82.5 \pm 26.0\%$ 。另一方面,在低温下培养比如在 4℃下和 KFC 的使用中,回收率会高很多。它们是  $95.4 \pm 5.75\%$  (4℃)和  $97.5 \pm 14.2\%$  (KFC)。低温可以维持高的回收率。在 48 小时后,这个趋势更加明显。在 48 小时时,第 1 组的胰岛回收率为  $48.7 \pm 28.6\%$ ,第 2 组为  $46.6 \pm 15.5\%$ ,第 3 组为  $61.5 \pm 20.0\%$ ,第 4 组为  $73.9 \pm 17.3\%$ 。在 72 小时时,第 1 组的胰岛回收率为  $35.8 \pm 18.5\%$ ,第 2 组为  $31.1 \pm 16.6\%$ ,第 3 组为  $43.5 \pm 14.3\%$ ,第 4 组为  $61.0 \pm 22.0\%$ ; (KFC 分别相对于 37.0℃的 P- 值为  $< 0.01$ ,相对于 22.0℃的 P- 值为  $< 0.001$ ,相对于 4.0℃的 P- 值为  $< 0.05$ ,Newman-Keuls 测试,图 7A)

[0062] 在计算胰岛当量时进行胰岛纯度的评价。在 24 小时时,第 1 组的纯度降至  $85.0 \pm 10.0\%$ ,第 2 组降至  $83.3 \pm 7.6\%$ ,第 3 组降至  $82.5 \pm 5.0\%$ ,第 4 组降至  $85.0 \pm 9.4\%$ 。在 48 小时时,第 1 组的纯度为  $75.8 \pm 20.6\%$ ,第 2 组为  $78.3 \pm 2.9\%$ ,第 3 组为  $76.7 \pm 5.8\%$ ,第 4 组为  $84.5 \pm 9.9\%$ 。在 72 小时时,第 1 组的纯度为  $68.6 \pm 23.8\%$ ,第 2 组为  $73.3 \pm 14.7\%$ ,第 3 组为  $77.5 \pm 8.7\%$ ,第 4 组为  $84.0 \pm 9.6\%$ 。第 4 组与第 1 组在 48 小时、72 小时时,胰岛的纯度有明显的不同(P- 值在 48 小时时  $< 0.01$ ,在 72 小时时  $< 0.05$ 。Newman-Keuls 测试,图 7B)。

[0063] 测定了在纯化前(Pre)、保存 24、48 和 72 小时后的细胞的生存能力。纯化前的平均生存能力为  $95.2 \pm 6.2\%$ 。在 24 小时时,在 37.0℃、22.0℃、4.0℃和 KFC 的情况下胰岛生存能力分别降至  $82.1 \pm 6.2\%$ 、 $85.0 \pm 5.7\%$ 、 $86.0 \pm 3.3\%$ 和  $91.1 \pm 3.3\%$ 。在 48 小时时,生存能力降至  $80.7 \pm 0.2\%$  (37℃)、 $85.2 \pm 6.4\%$  (22℃)、 $83.7 \pm 6.6\%$  (4℃)和  $90.5 \pm 5.4\%$  (KFC), (KFC 相对于 37.0℃的 P- 值为  $< 0.05$ 。Dunnett' s 测试,图 7C)。在 72 小时时,生存能力降至  $78.0 \pm 9.1\%$  (37℃)、 $80.0 \pm 4.6\%$  (22℃)、 $82.0 \pm 1.8\%$  (4℃)和  $89.1 \pm 2.6\%$  (KFC), (KFC 相对于 37.0℃的 P- 值为  $< 0.05$ 。Dunnett' s 测试。图 7C)。

[0064] 发明人研究了由 KFC 保存 72 小时的猪胰岛的体外功能。按照先前的描述计算出刺激指数(SI),同时与保存在 37.0℃下(作为常规的保存设置)的胰岛的 SI 值进行对比。在 37℃下保存 72 小时的胰岛的平均 SI 为  $1.4 \pm 0.4$ ,KFC 的条件下胰岛的平均 SI 为  $3.0 \pm 2.1$ ,KFC 的条件下保存的胰岛的平均 SI 明显较高(P  $< 0.03$ ,不成对的 t- 检验,图 8)。

[0065] 本发明能与新的保存溶液使用,如:(a) 给胰岛细胞移植物的接受者使用白介素-1 阻滞剂,(b) 在通过 ET-Kyoto 保存溶液获得器官的同时用导管保存给体的胰腺,和/或(c) 在给体胰腺消化的过程中使用胰蛋白酶抑制剂。ET-Kyoto 溶液,和它的修饰物,包括在各种压力条件下稳定细胞膜的作为非还原二糖的海藻糖。ET-Kyoto 溶液的两个变化形式具有不同的电解质含量,如 Na 100mmol/L, K 44mmol/L(所谓的“细胞外”溶液)和“细胞内型” IT-Kyoto 溶液,如, Na 20mmol/L, K 130mmol/L,和海藻糖 35gr/l。本发明可以使用的

溶液的非限制性的列表,总结在表 2 中。

[0066] 表 2:保存溶液的列表

[0067]

溶液	E-C	C-S	UW	LPD-G	ET-Kyoto	IT-Kyoto	nEt-Kyoto	C
Na+	10	17	30	165	100	20	107	100
K+	115	115	125	4	44	130	44	15
Mg <sup>++</sup>	5	5	5	2	-	-	-	13
Ca <sup>++</sup>	-	-	-	-	-	-	-	0.25
Cl <sup>-</sup>	15	15	-	101	-	-	-	-
CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	10	10	-	-	-	-	-	-
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> <sup>-</sup>	58	58	25	36	26	25	25	-
SO <sub>4</sub> =	5	5	5	-	-	-	-	-
葡萄糖	195	-	-	56	-	-	-	-
葡糖酸盐	-	-	-	-	100	100	100	-
乳糖醛酸盐	-	-	100	-	-	-	-	80
腺苷	-	-	5	-	-	-	-	1
谷氨酰胺	-	-	3	-	-	-	-	1
Alopurinol	-	-	1	-	-	-	-	1
海藻糖	-	-	-	-	120	-	120	-
棉子糖	-	-	30	-	-	-	-	-
右旋糖苷 40(g/L)	-	-	-	20	-	-	-	-
甘露醇 (g/L)	-	37.5	-	-	-	-	-	60
EDTA (g/L)	-	0.075	-	-	-	-	-	-
HES (g/L)	-	-	50	-	30	30	30	-
NAC	-	-	-	-	-	-	10	-
Db c-AMP	-	-	-	-	-	-	2	-
硝化甘油	-	-	-	-	-	-	0.44	-

pH	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.3
同渗容摩 (**)	355	420	325	335	370	370	600	360

[0068]

[0069] E-C :Euro-Collins. C-S :Collins-Sacks. UW :威斯康星州 -Beltzer 大学。LPD-G :低钾右旋糖苷 - 葡萄糖。ET-K :细胞外型 Kyoto。IT-K :细胞内型 Kyoto。nET-K :新的 ET-K ; C :施尔生液 (Celsior)。EDTA :乙二胺四乙酸。HES :羟乙基淀粉。NAC :N- 乙酰半胱氨酸。Db c-AMP :二丁基环 AMP。除了 (\*)gr/L,所有的浓度以 mMol/L 计。(\*\*) 同渗容摩表达为 Osm/L。

[0070] 胰岛素抑制剂的例子包括,但不限于血清  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶、利马豆胰蛋白酶抑制剂、Kunitz 抑制剂、卵类粘蛋白抑制剂或大豆抑制剂。至今还没有机械装置可以依据糖尿病患者的血清葡萄糖水平来有效地调节注射胰岛素的剂量。这导致了并不完美的糖控制,导致的低血糖症反应可能是危险的。

[0071] 胰腺移植 - 优点 :胰腺移植是完善的 I 型糖尿病的治疗方法。它通过伴随着肾移植 [ 同时的胰腺和肾移植 (SPK) ], 在肾移植之后 [ “胰腺在肾之后” (PAK) ] 或单独的胰腺移植 (PTA) 来完成。在 1999 年美国的胰腺移植中,同时的胰腺和肾移植占 75%, 并且仍然是适合 50 岁以下的 I 型糖尿病伴随肾衰竭的患者手术的选择<sup>19</sup>。PTA 的适应症占总数的不到 10%, 客观性差些但包括危及生命的低血糖症无意识,迫使不断地需要看护者在场和侵袭性的糖尿病神经病变。减轻低血糖症无意识是接受一生的抑制免疫反应的风险最具说服力的理由。正是这群选择 PTA 的患者同样被认为是合适的候选人用于分离的胰岛细胞移植。

[0072] 胰腺移植主要的成就是胰岛素 - 不依赖和一些糖尿病相关的并发症的避免、延迟或衰退。成功的胰腺移植有益于生活方式的改善是毫无疑问的,并且可以达到长期的血糖量正常<sup>20~22</sup>。或许关于糖尿病次生并发症的最大的益处是改善自主神经病和周围神经病;更好的心脏功能会导致更好的患者生存<sup>23</sup>。不仅改善了神经传导速度,这表明神经鞘内的神经恢复,而且改善了传导振幅,这表明轴突的再生<sup>24</sup>。然而,为了患者受益,移植必须在严重的传感器运动神经病发作之前进行。通常,糖尿病患者视网膜病在移植后不能改善,这是由于 90% 的 SPK 患者在移植的时候已经具有永久的损伤<sup>25</sup>。

[0073] 胰腺移植 - 发病率和死亡率 :胰腺移植是完善的外科手术。它被认为是一种发病率和死亡率关联的主要的外科手术。额外的发病率和死亡率与固有的抑制免疫反应治疗相关。使用的技术需要将整个胰腺器官连同外分泌的和内分泌的成分和十二指肠袢一起全体移植。

[0074] 与外科手术相关的具体的并发症是血管吻合<sup>26</sup>。最近的数据表明 SPK 的技术失败率为大约 8%,PAK 为大约 13%,PTA 为大约 11%。移植血栓症 (代表性的静脉的) 出现在 2-14% 的病例中导致早期的移植失功 (graftloss)<sup>27</sup>。

[0075] 特定的并发症与同种异体移植物的肠内排泄物的类型有关 :肠的或到膀胱的。对于膀胱排泄物 ; 并发症包括紧接着手术后的血尿症、尿漏、尿逆流胰腺炎、代谢性酸中毒和由胰腺外分泌进入膀胱的液体和重碳酸盐引起的脱水,以及由于胰腺外分泌酶作用于膀胱和尿道上皮细胞引起的无菌的膀胱炎。在 8% 到 23% 的病例中,这些并发症使手术转化肠

排泄物成为必要<sup>28</sup>。对于肠排泄物,主要的并发症是吻合的肠渗出伴随腹部内的脓肿形成,潜在地导致了脓毒症、多器官功能衰竭甚至死亡。上述的大量并发症是与移植的胰腺或移植的十二指肠袢的外分泌部分相关的。尽管通常使用强烈的免疫抑制,但是胰腺移植后的排斥率为大约 30%,有 10%的移植失功。全国性的移植存活率,根据 UNOS 所记载的,3 个月为 88.5%,1 年为 80%,3 年为 52.9%以及 5 年为 40.7%。肾-胰腺移植的结果要好一些(分别为 87.7%、83.8%、77.2%和 67.5%)。在十年的期间内(1991-2000),每年由于胰腺移植的死亡率为每 1000 名患者 36.3 到 82.3 名,,每 1000 名患者肾-胰腺移植的患者的死亡率范围为 31.1 ~ 63.2 名<sup>29</sup>。

**[0076]** 胰岛细胞移植-全器官胰腺移植的替代品:全器官胰腺移植出现的替代品是胰岛细胞移植(ICT)。这个过程是基于从尸体给体获得的器官中的 Langerhans 胰岛的酶分离<sup>30~32</sup>;将所获得的胰岛通过门静脉系统的经皮导管插入术注入到接受者的肝脏<sup>33</sup>。这个过程允许选择性地移植产生胰岛素的细胞群从而避免切开手术和十二指肠与外分泌的胰腺的移植并避免与其相关的发病率。

**[0077]** 当前有两种胰岛细胞移植的趋势,即使用立即的和延迟的灌输方式。立即移植致力于在胰岛分离和胰岛灌输之间使用尽可能最短的时间。选择性的方法意味着在分离之后和移植之前胰岛的短期培养。这确保增加胰岛分离物的纯度并且不影响胰岛的生存能力和功能,而且当该手术在半选择性的环境下进行时似乎可以产生好的结果<sup>34,35</sup>。

**[0078]** 尝试了将不同的解剖学上的部位用于胰岛细胞灌输<sup>36~38</sup>。目前,门静脉是灌输的优选的位点,提供相对容易的通入、高的静脉流速和肝脏双重的循环系统(动脉的和门静脉的)。肝脏具有好的再生能力并且是胰岛素活动的主要的位点之一。肝脏部位似乎还授予胰岛一些免疫上的特权。当与全器官胰腺移植相比时,ICT 具有减少的手术风险,更快和更经济,是作为门诊病人手术来进行的,因此获得了患者好的认可。

**[0079]** 最初使用 ICT 的努力只得到中等的的结果。抑制免疫反应疗法与使用在完全的器官移植中的相似,基于高剂量的类固醇和钙依赖磷酸酶抑制剂-这两种试剂都具有致糖尿病的作用<sup>39</sup>。由位于加拿大埃德蒙顿的 Alberta 大学的研究者组开始的处理胰岛上的改变<sup>30,32</sup>和抑制免疫反应的改变显著地改善了该结果,因此避免了高剂量的类固醇和使用西罗莫司(sirolimus)、他克莫司(tacrolimus)和 dacluzimab。他们的规程要求,大体上是,进行两次胰岛细胞灌输以达到完成胰岛素-非依赖所需要的关键的细胞量。在治疗的这些变化作为“埃德蒙顿规程”被采用,其在世界范围内的几个移植中心使用<sup>33,40</sup>。来自埃德蒙顿小组最近的报道显示,在该中心 65 名患者已接受胰岛移植,44 名患者成为不依赖胰岛素的<sup>3</sup>。在五年的跟踪中,~80%存显示在 C-肽标志功能移植的胰岛,然而,只有~10%保持不使用胰岛素。在美国其它的中心报道了相似的结果<sup>41</sup>。在本领域另一个近期的进展中,明尼苏达州小组说明了从单个的给体胰腺分离的胰岛细胞的边界剂量足够实现严重的 I 型糖尿病患者的胰岛素不依赖<sup>42</sup>。

**[0080]** 关于该手术的发病率包括与肝穿刺、门静脉套管和肝功能测试(LFT)增加相关的并发症。与肝穿刺相关的并发症是囊下的或内部-软组织出血,腹膜内出血(累积频数:4%必须输血),胆囊穿刺(2%),胆汁渗出(1%)。气胸和/或血胸是非常少见的。已有报道在肝脏内形成脂肪块(脂肪变性)<sup>43</sup>。很有可能这些并发症的影响范围可以通过使用较小的导管和使用超声图记录仪指导来接近门静脉<sup>24</sup>和使用纤维蛋白胶来封闭肝脏穿刺的小

孔来降低。门静脉套管和灌输的并发症包括门静脉支流血栓症(2%)和局部较小的门静脉血栓症(2%)。在这一系列的报道中没有一个是必须外科手术或另外的有创手术的。

[0081] LFT暂时的增加是常见的(93%的病例),多达46%的患者发展成显著的上升(AST两倍基线或更高),但通常在移植两周内回到正常水平<sup>44</sup>。在手术过程中会遭遇疼痛,主要是由于脉间的通路和门静脉压力的上升。在手术后疼痛并不常见<sup>45</sup>。

[0082] 给体的因素包括年龄、先前存在的胰岛损伤、未意识到的糖尿病、淀粉体、脂肪渗透、长时间处于ICU、血液动力学的稳定性和影响肌肉收缩力的药物治疗需求。器官获取的质量是重要的,包括避免热缺血和胰腺被膜的损伤。

[0083] 采用常规的运输培养基时,冷缺血时间(在给体交叉夹紧和开始分离之间的时间)不应当超过8小时。这包括运输和当将其浸入到威斯康星州大学(UW)溶液中存储捐赠者的胰腺。一种新的器官保存方法使用两层保存技术<sup>46</sup>。这涉及使用两种溶液-威斯康星州大学(UW)溶液和全氟萘烷。全氟萘烷是一种全氟化碳,它具有存储氧气并将其缓慢地释放给所存储的器官的能力,从而能维持细胞的ATP含量,这对于器官存储环境下的细胞生存能力是非常重要的。所述两层技术使得能够使用更长的冷缺血时间,存储在UW溶液中6-8小时与存储在两层方法中24小时对比得到相当的结果<sup>46</sup>。影响临床等级的胰岛分离的因素包括:最佳的一批酶、在处理期间的温度控制、试剂质量和胰岛培养。之前本发明人已经说明了用含乌司他丁(ulinastatin)的M-Kyoto溶液保存的胰管改善了胰管的完整性,这对于胶原酶传输是关键。采用这项技术临床等级的胰岛被成功地从无心跳的给体中分离出来<sup>48</sup>,因此,可移植的胰岛可以从有心跳的给体中获得。

[0084] 临床等级的胰岛回收率达到了所使用的胰腺的18-35%。胰岛细胞灌输递送了正常细胞量的40-85%,但是估计移植物移入占25-50%<sup>45</sup>。因此,为了达到胰岛素不依赖,在大多数病例中必须进行另一次胰岛细胞灌输。移植的胰岛的总数影响胰岛素不依赖的获得。

[0085] 在当前的分离和保存技术下灌输总数超过9,000胰岛当量/kg关联着好的移植结果<sup>27</sup>;这一般地通过使用两个给体的胰腺来实现。接受者因素包括抗凝作用和避免细胞活素活化作用和避免胰岛细胞毒性或胰岛素抵抗能力的抑制免疫反应。

[0086] 用于移植的胰岛的分离过程在大多数中心中,是在FDA的严格管理下在特别设计的机构中,在清洁的环境下,使用制定的规程进行。新的机构的建立需要可观的材料投资,接着是合适的认证过程并必须要有技术的人力<sup>47</sup>。

[0087] 胰岛细胞移植(ICT)研究的焦点是集中开发一种安全有效的手术最终替代外科的胰腺移植,并且具有理想的免疫抑制疗法,所述的免疫抑制疗法安全和有效地防止排斥,同时使消极地影响移植接受者的生活质量的副作用最小化。

[0088] 皮质类固醇类和高剂量的钙依赖磷酸酶抑制剂作为免疫抑制剂与所移植的胰岛的衰竭有关,并返回到胰岛素治疗。非常值得期待的是使用一种疗法提供足够的抑制免疫反应来预防早期的和晚期的排斥反应,并最小化类固醇和高剂量的钙依赖磷酸酶抑制剂作为免疫抑制剂的使用。

[0089] 在我们的研究所中进行了这项研究作为ICT埃德蒙顿规程的修正。遵循埃德蒙顿规程,除了:a)可以在移植的早期阶段给予依那西普(Etanercept)和阿那白滞素(Anakinra)来使由于炎症引起的胰岛损失最小化,这相应地会改善胰岛灌输;b)抗



胸腺细胞球蛋白 (Thymoglobulin) 可以替代达珠单抗 (daclizumab) 给药用于诱导;c) Sitagliptin (Januvia) 可以用来加强胰岛移植功能。依那西普和阿那白滞素以这种方式的使用在文献中没有描述并且根据我们所知目前在本国没有被应用到任何胰岛细胞规程中。然而,可以通过这种方式获得所期望的低的副作用毒性以及潜在的相当多的免疫学的优点:也就是,能够减少雷帕霉素 (Rapamycin) 或他克莫司的剂量,如果这两种试剂是有毒性的。依那西普和阿那白滞素的使用是当前的规程对埃德蒙顿修改的主要方式之一。

[0090] 此外,本发明开发了一种新的胰岛分离规程,该规程最初在日本开发用于非心跳给体。特别地,在胰腺获得时的胰管保存,在胰腺消化期间的胰岛素抑制和胰岛友好的纯化溶液改善了胰岛的质量和数量。

[0091] 程序 - 器官获得和运输:用于胰岛分离的胰腺的获得是从尸体给体完成的,其是依据美国器官共享网络 (UNOS) 指导在全国范围标准器官的获取的一部分。器官的获得是由有资格的移植外科组联同地方的器官获取组织一起完成的。外科医生和 OPO 必须熟悉获得和运送胰岛用于胰岛细胞分离。此外,为了更长的冷缺血时间,他们必须具有适当的设备和运送材料。

[0092] 依据 UNOS 的规章,将给体的胰腺运送到加工机构用作标准的给体胰腺。在运输过程中其被存储在单独的威斯康星州大学 (UW) 溶液或含有充氧的全氟化碳 (PFC) 溶液或一种适当的运送培养基的溶液中。胰管也被保存在含有乌司他丁<sup>32</sup>的 M-Kyoto 溶液中或一种适当的保存溶液中。

[0093] 当实验室组和医疗主任认为已经准备好时,在任何情况下都应尽快做出一切努力来移植胰岛细胞。该研究的每个步骤(获得、分离、接受者的准备、胰岛灌输)中,研究的受试者不会被分配不同的期限。然而,在给体手术中,或者在实验室分离胰岛的操作中,或者在放射线组的时间安排中,或者在接受者的准备中都可能会存在后勤上的延迟。为了防止细胞的损耗,可以通过向威斯康星州大学溶液中加入全氟化碳来延长分离前的存储,以及分离后的存储,但是在移植前可能会通过将胰岛培养在培养箱中来延长。由于这些期限可能会因患者的不同而有些变化,这些在患者之间的时间点的差异可以是显著的并且与建立血糖控制的成功或失败相关。同样的,全氟化碳溶液的使用,和/或胰岛培养的使用可以与不同的患者相关。

[0094] 胰岛分离:从给体胰腺分离胰岛将会在贝勒研究院胰岛细胞处理实验室 (ICPL) 发生,其使用由 Ricordi 等人<sup>32</sup>描述的修正的“自动化的方法”。ICPL 包括一个 10,000 级超净间用于处理胰岛,一个 QA/QC 实验室来进行产品释放测试和一个冷冻室用于存储样品和试剂。迄今为止作为验证,ICPL 已完成了二十九次胰岛分离。此外,实验室已在 FDA 许可规程 1173IA 下处理了五个用于移植的胰岛产品,用于测试远地分离的胰岛产品的安全和功效。远地验证规程与在佛罗里达迈阿密的糖尿病研究协会协作同时进行。最近,ICPL 进行了 8 次临床等级的胰腺的胰岛分离并且 5 次分离的胰岛已被成功地移植到四个 I 型糖尿病患者。近来作为验证,我们使用来自 SERVA 的胶原酶进行了另外的三次胰岛分离。胰岛生产和全部的三个分离的质量将会依照该协议进行移植的认证。

[0095] 人类尸体给体胰腺可以被 ICPL 接收并依照先前由实验室确认的方法分离胰岛。所用的器官、胰岛和胰岛细胞产品的处理都是包含在 10,000 等级超净间中的 100 等级的生物研究安全性橱柜中完成的。

[0096] 这些方法如下：胰腺通过器官获取组织 (OPO) 获得并在运输培养基中运送。优选地胰管也保存在含有乌司他丁的 M-Kyoto 溶液或一种适当的保存溶液中。培养基会根据由哪个 OPO 获取器官而变化。可以仔细研究这种变化的培养基 / 运输。

[0097] 验证程序 - 胰岛灌输之前的释放测试：每个胰岛制剂最终产品的测试包括胰岛细胞数、纯度、生存能力、无菌状态、内毒素和效能。胰岛细胞数、纯度、生存能力、内毒素的结果在灌输前是可获得的，并且必须满足化验批次的释放标准。无菌状态和效能测试的最终结果直到灌输结束后才可获得。如果这些结果不能满足释放标准，在得知结果后立即采取校正步骤。此外，在决定最终安排之前测试胰岛分离的产品。如果中间测试没有通过释放标准，细胞将不会被移植。

[0098] 胰岛细胞灌输：定位。胰岛细胞灌输是在 Baylor 大学医学中心或 BaylorAll Saints 医学中心的介入性放射学病房由介入性放射学家来完成的。该手术是在为介入性手术设计的病房中进行的，使用无菌技术并且如果需要有权使用全身麻醉。

[0099] 准备和麻醉：接收患者并准备手术。获得该手术的知情同意书。

[0100] 右下方侧位胸、右上方腹部和腹上部区域用进行基于碘酒的消毒准备。局部麻醉 IV 级镇静通常就足够了。局部麻醉是使用由介入性放射学家决定的来选择的麻醉剂并使用该区域的肋间神经阻滞术完成的。

[0101] 门静脉套管：门静脉套管的导入是通过使用 3.5MHz 探针，实时超声波检查法获得的。

[0102] 穿刺位点：手术是通过肝的经皮直接穿刺来完成的。门静脉的右边或左边分支可被选作套管并且相应地由介入性放射学家选择穿刺位点。

[0103] 技术：将 22G 的千叶针用于通入门静脉，之后是使用 Seldinger 技术通过准绳将门静脉进行套管。将 4-5Fr 导管引入门静脉。可以根据进行手术的介入性放射学家的判断改变针和导管的尺寸。

[0104] 门静脉造影照片：为了评价解剖学和流动，门静脉造影以手工注射低渗透作用的碘酸盐作为对照，通过导管获得的。推荐使用最小限度的对照。

[0105] 胰岛细胞灌输 - 袋系统：胰岛细胞灌输袋系统是由含有体积为 200mL 的胰岛悬浮液的 600mL 的灌输袋组成的。胰岛细胞的灌输使用 1 或 2 个袋系统。当用于灌输的胰岛体积超过 5mL 时，需要多于一个袋。每个包含胰岛的袋加入 35IU/kg 肝磷脂。灌输物中的肝磷脂最大剂量是 70IU/kg。如果灌输过早的结束，残留的肝磷脂剂量应当被计算达到总的 35IU/kg，并应随着生理盐水流给入门静脉。

[0106] 袋中的内容物仅通过重力灌输进入接受者的门静脉系统。然后使用 50mL 的移植培养基冲洗该袋，冲洗液从袋灌注到门静脉系统。然后在包含胰岛的另一个袋或多个袋中重复这个程序。

[0107] 灌输完成：在灌输完成后，用额外的移植基质冲洗灌输导管和袋，确保没有胰岛留在袋接口或三通旋塞阀中。在灌输结束后不再重复门静脉造影以避免胰岛毒性。

[0108] 门静脉压力评估：通过三通连接器内联直接测量来获得门静脉血压。在适当地调整系统的零点后在心脏血管监视器上读出量度。

[0109] 门静脉测量的时间选择：可以在手术之前，在每个胰岛细胞袋灌输的中途和在每次用冲洗溶液冲洗袋结束之后获得门静脉 (PV) 血压。最后的门静脉压力也要归档。

[0110] 门静脉压力变化的管理：期望在胰岛细胞灌输的过程中门静脉压力上升。下列情形需要调整治疗：在手术前门静脉压力在 20mm Hg 以上是胰岛细胞灌输的禁忌症候。

[0111] 如果在灌输期间的任何时间 PV 血压超过两倍基线值但小于 18mmHg，灌输可以停止 10 分钟并再次测定血压。如果血压在两倍基线值以下并且小于 18mm Hg 则可以重新开始灌输。如果不是，在 10 分钟后再次测定。

[0112] 如果 PV 血压超过两倍基线值但低于 18mm Hg 手术可以继续。如果任何时间 PV 血压超过 22mm Hg，应停止灌输直至血压降至 18mm Hg 以下。如果 PV 血压超过 22mm Hg 长于 10 分钟，或超过 18mm Hg 20 分钟以上，将手术结束。

[0113] 移除门静脉导管：移除门静脉导管然后退出导入鞘直到顶端在软组织中。将放射学家选择的止血剂置于装满碘酒的注射器顶端并注射进鞘在外部的末端。使用由放射学家选择的硬物 / 套管针 / 线使止血剂进一步到达内部鞘端。然后将鞘从塞子中退出。这时塞子应该容易在肝脏软组织中看到。如果可能放置第二个塞子。

[0114] 恢复：手术过后患者在介入性放射科恢复区域观察由医师决定的足够长的时间，然后转移到移植服务中心过夜停留。在手术后第二天获得肝功能测试和肝的 Doppler 超声记录图。

[0115] 住院：恢复之后，患者被医院接收并在移植服务下观察 1-2 天。停留的时间长短可以由患者在第 0 天耐受抗胸腺细胞球蛋白的初始剂量的情况怎样来决定。在移植后第 2、第 4 和第 6 天患者将会回到医院接受随后的抗胸腺细胞球蛋白给药。出院的标准包括：不显示出血的实验室测试结果，包括，但不限于，血色素和血球容积计水平。LFT 在可接受的范围内（少于两倍标准的上限），并且开放的主、左和右门静脉没有明显的流血，或者在胰岛细胞灌注后第二天完成的 Doppler 超声记录图。

[0116] 本发明描述了一种有效的新的设计的冷却系统来建立一种新的猪胰岛的存储方法。发明人使用了 KFC 冷却系统，它最初是由 FUJIYA 公司开发用于保存植物和食物如收获的兰花、水果和小虾。该冷却系统最初是为了达到“冬眠状态”用于商业农业领域的长期冷却保存而设计的。这个冷却系统的温度设置可以通过外部的检测计算机容易地改变并紧密地控制。发明人已经报道了使用该系统逐步冷却用于整体的鼠肝脏保存与传统的在 UW 溶液中 4°C 保存相比具有一些优势 (23)。在本公开中，发明人第一次证明了 KFC 可以有效地保存猪胰岛并维持生存能力至少达到 72 小时。

[0117] 由 KFC 缓慢逐步地冷却可以提供类似于冬眠的环境。事实上，一些冬眠哺乳动物如松鼠或仓鼠通过平衡 ATP 合成速率和 ATP 利用速率来保护它们的新陈代谢 (24, 25)。该冬眠过程可以导致稳定的离子梯度并调节新陈代谢的减少 (26)。此外，已显示人类心肌细胞可以获得“冬眠状态” (27)。因此胰岛细胞可以获得这种冬眠状态。同样下降的温度减少了由细胞破坏性的酶如胰蛋白酶导致的自我分解。

[0118] 发明人已证明了新的 KFC 逐步冷却系统具有允许猪胰岛存储达到 72 小时的优势。然而，该 KFC 系统是用于贮藏脆弱的猪胰岛细胞有希望的系统。

[0119] 预期在本说明书中讨论的任何实施方案都可以实现关于本发明的任何方法、试剂盒、试剂或组合物，反之亦然。而且，本发明的组合物可以用于实现本发明的方法。

[0120] 应该理解这里描述的特定的实施方案意在说明而不是作为本发明的限制。本发明的主要特征可以在不脱离本发明的范围下，应用到各种实施方案中。本领域技术人员应该

认可,或者能够确定只使用常规实验,可以得到这里描述的特定的程序的大量的等价物。认为这些等价物是在本发明的范围内,并且被权利要求所覆盖。

[0121] 所有的在说明书中提及的出版物和专利申请是用于说明本发明所属的技术领域的技术人员的水平。将所有的出版物和专利申请在此并入作为参考,其程度与如同每个单独的出版物或专利申请被特定地和分别地说明作为参考一致。

[0122] 当词语“一个 (a)”或“一种 (an)”与术语“包含 (comprising)”在权利要求和/或说明书中联合使用时,可能是指“一个”,但它也包含“一个或更多”、“至少一个”和“一个或多个”的意思。尽管公开支持了仅指选择性的和“和/或”的定义,权利要求中术语“或”的使用是指“和/或”,除非明确地指出仅指选择性的或该选择性是互斥的。贯穿该申请,术语“约”是用来表明数值包括装置,用来测定数值的方法的固有的误差变化,或在研究主体之间存在的变化。

[0123] 如同本说明书和权利要求书中使用的词语“包含” (comprising) (和任何形式的包含,如“包含 (comprise)”和“包含” (comprises)),“具有 (having)” (和任何形式的具有,如“具有” (have) 和“具有” (has)),“包括” (including) (和任何形式的包括,如“包括” (includes)”和“包括” (include)) 或“含有 (containing)” (和任何形式的含有,如“含有” (contains) 和“含有” (contains)) 是包含的或开放式的,并不排除另外的、没有陈述的元素或方法步骤。

[0124] 这里使用的术语“或它们的结合”是指在该术语之前列出的项目的所有的改变和结合。例如,“A、B、C 或它们的结合”预期包括:A、B、C、AB、AC、BC、或 ABC 的至少一个,并且如果在特别的环境下顺序是重要的,还包括 BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC 或 CAB。继续这个例子,特别地包括含有重复一个或多个项目或术语的结合,如 BB、AAA、MB、BBC、AAABCCCC、CBBAAA、CABABB 等等。技术人员应该理解在任何结合中项目或术语的数目通常是没有限制的,除非文中另有说明。

[0125] 这里公开的和要求权利的全部组合物和/或方法根据本公开在没有不过度的试验的条件下可以制备和完成。本发明的组合物和方法是按照优选的实施例描述的,对于本领域技术人员显然的是,在这些步骤中或在这里描述的方法的随后步骤中可以使用该组合物和/或方法的变形而不偏离本发明的观念、精神和范围。所有这些类似的对于本领域技术人员显而易见的替代和修改,被认为是在由附加的权利要求所限定的本发明的精神、范围和构思内的。

#### [0126] 参考文献

[0127] 1. LaPorte RE, Matsushima M, Chang YF: Prevalence and Incidence of Insulin-Dependent Diabetes. In: "Diabetes In America," 2nd edition. National Diabetes Data Group, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH Publication No. 95-1468, 1995, 37-47.

[0128] 2. Ikemoto T, Noguchi H, Shimoda M, et al. Islet Cell Transplantation for the Treatment of Type 1 Diabetes in USA. J Hepato-biliary-Pancreatic Surg. 2009 ;16 : 118-123.

[0129] 3. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al. Five-year follow-up after

clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005 ;54 :2060-2069.

[0130] 4. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, et al. Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation. *Lancet*. 2005 ;365(9471) :1642-1644.

[0131] 5. Ichii H, Sakumaa Y, Pileggia A et al. Shipment of Human Islets for transplantation. *Am J Transplant*. 2007 ;7 :1010-1020.

[0132] 6. O' Neil JJ, Stegemann JP, Nicholson DT, et al. The isolation and function of porcine islets from market weight pigs. *Cell Transplant*. 2001 ;10 :235-46.

[0133] 7. Calafiore R. Perspectives in pancreatic and islet cell transplantation for the therapy of IDDM. *Diabetes Care*. 1997 ;20 :889-96.

[0134] 8. Krickhahn M, Meyer T, Bühler C, et al. Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation : numbers, purity, yield and in vitro function. *Ann Transplant*. 2001 ;6 :48-54.

[0135] 9. Bottino R, Balamurugan AN, Smetanka C, et al. Isolation outcome and functional characteristics of young and adult pig pancreatic islets for transplantation studies. *Xenotransplantation*. 2007 ;14 :74.

[0136] 10. Rood PP, Buhler LH, Bottino R, et al. Pig-to-nonhuman primate islet xenotransplantation : a review of current problems. *Cell Transplant*. 2006 ;15 :89-104.

[0137] 11. Matsumoto S, Kandaswamy R, Sutherland DE et al. Clinical application of the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical plus 02) method of pancreas preservation before transplantation. *Transplantation*. 2000 ;70 :771-774.

[0138] 12. Jacob SW. Studies in organ preservation by actual freezing and reduction of the freezing point. *Cryobiology*. 1964 ;1 :176-80.

[0139] 13. Obermaier R, Drognitz O, Benz S, et al. Pancreatic ischemia/reperfusion injury : impact of different preservation temperatures. *Pancreas*. 2008 ;37 :328-32.

[0140] 14. Frankel BJ, Gylfe E, Hellman B, et al. Maintenance of insulin release from pancreatic islets stored in the cold for up to 5 weeks. *J Clin Invest*. 1976 ;57 :47-52.

[0141] 15. Korbitt GS, Pipeleers DG Cold-preservation of pancreatic beta cells. *Cell Transplant*. 1994 ;3 :291-7.

[0142] 16. Matsumoto S, Lawrence O, Rigley T, et al. University of Wisconsin solution with trypsin inhibitor Pefabloc improves survival of viable human and primate impure islets during storage. *Cell and Tissue Banking*. 2001 ;2 :15-21.

[0143] 17. Kin T, Senior P, Gorman DO, et al. Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transplant International*. 2008 ;21 :1029-1035.

- [0144] 18. Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, et al. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat.* 1990 ;27 :185.
- [0145] 19. Allen RD, Nankivell BJ, Hawthorne WJ, O'Connell PJ, Chapman JR : Pancreas and islet transplantation: an unfinished journey. *Transplant Proc* 2001 ; 33(7-8) :3485-8.
- [0146] 20. Gruessner RWG, Sutherland DER, Drangstveit MB, Bland BJ, Gruessner AC: Pancreas transplants from living donors: short- and long-term outcome. *Transplantation Proc* 2001, 33(1-2) :819-820.
- [0147] 21. Sutherland DE, Gruessner RW, Dunn DL, Matas, AJ, Humar A, Kandaswamy R, Mauer SM, Kennedy WR, Goetz FC, Robertson RP, Gruessner AC, Najarian JS: Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. *Ann Surg* 2001, 233(4) :463-501.
- [0148] 22. Robertson RP, Sutherland DE, Lanz KJ: Normoglycemia and preserved insulin secretory reserve in diabetic patients 10-18 years after pancreas transplantation. *Diabetes* 1999, 48(9) :1737-1740.
- [0149] 23. Fiorina P, La Rocca E, Astorri E, Lucignani G, Rossetti C, Fazio F, Giudici D, di Carlo V, Cristallo M, Pozza G, Secchi A: Reversal of left ventricular diastolic dysfunction after kidney-pancreas transplantation in type 2 diabetic uremic patients. *Diabetes Care* 2000, 23(12) :1804-1810.
- [0150] 24. Allen RD, Al-Harbi IS, Morris JG, Clouston PD, O'Connell PJ, Chapman JR, Nankivell BJ: Diabetic neuropathy after pancreas transplantation: determinants of recovery. *Transplantation* 1997, 63(6) :830-838.
- [0151] 25. Chow VCC, Pai RP, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RDM, Mitchell P, Nankivell BJ: Diabetic retinopathy after combined kidney-pancreas transplantation. *Clinical Transplantation* 1999, 13(4) :356-362.
- [0152] 26. Sollinger HW, Odorico JS, Knechtle SJ, DAlessandro AM, Kalayoglu M, Pirsch JD: Experience with 500 simultaneous pancreas-kidney transplants. *Ann Surg* 1998, 228(3) :284-96.
- [0153] 27. Reddy KS, Stratta RJ, Shokouh-Amiri MH, Alloway R, Egidi MF, Gaber AO: Surgical complications after pancreas transplantation with portal-enteric drainage. *J Am Coll Surg* 1999 ;189(3) :305-313.
- [0154] 28. Gruessner AC, Sutherland DE: Pancreas transplant outcomes for United States (US) cases reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and non-US cases reported to the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of October, 2000. *Clinical Transplants* 2000, (1) :45-72.
- [0155] 29. 2001 Annual Report of the U.S. Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry for Transplant Recipients: Transplant Data 1991-2000. Department of Programs, Division of Transplantation, Rockville, MD; United Network for Organ Sharing, Richmond, VA; University Renal Research and

Education Association, AnnArbor, MI.

[0156] 30. Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C: Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes* 1997, 46(7) :1120-1123.

[0157] 31. Lakey JRT, Warnock GL, Shapiro AMJ, Korbitt GS, Ao Z, Kneteman NM, Rajotte RV: Intraductal collagenase delivery into the human pancreas using syringe loading or controlled perfusion. *Cell Transplant* 1999, 8(3) :285-292.

[0158] 32. Ricordi C, Lacy PE, Scharp DW: Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes* 1989, 38(Suppl. 1) :140-142.

[0159] 33. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth EL, Warnock GL, Kneteman NN, Rajotte RV: Islet transplantation in seven patients with Type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343 :230-238, 2000.

[0160] 34. Rutzky LP, Bilinski S, Kloc M, Phan T, Zhang H, Katz SM, Stepkowski SM: Microgravity culture condition reduces immunogenicity and improves function of pancreatic islets. *Transplantation* 2002 Jul 15, 74(1):13-21.

[0161] 35. Gaber AO, Fraga DW, Callicutt CS, Gerling IC, Sabek OM, Kotb M Y: Improved in vivo pancreatic islet function after prolonged in vitro islet culture. *Transplantation* 2001, 72(11) :1730-1736.

[0162] 36. Matarazzo M, Giardina MG, Guardasole V, Davalli AM, Horton ES, Weir GC, Sacca L, Napoli R: Islet transplantation under the kidney capsule corrects the defects in glycogen metabolism in both liver and muscle of streptozocin-diabetic rats. *Cell Transplant* 2002, 11(2) :103-112.

[0163] 37. Hirshberg B, Montgomery S, Wysoki MG, Xu H, Tadaki D, Lee J, Hines K, Gaglia J, Patterson N, Leconte J, Hale D, Chang R, Kirk AD, Harlan DM: Pancreatic islet transplantation using the nonhuman primate (rhesus) model predicts that the portal vein is superior to the celiac artery as the islet infusion site. *Diabetes* 2002, 51(7) :2135-2140.

[0164] 38. Levy MM, Ketchum RJ, Tomaszewski JE, Naji A, Barker CF, Brayman KL: Intrathymic islet transplantation in the canine: I. Histological and functional evidence of autologous intrathymic islet engraftment and survival in pancreatectomized recipients. *Transplantation* 2002, 73(6) :842-852.

[0165] 39. Drachenberg CB, Klassen DK, Weir MR, Wiland A, Fink JC, Bartlett ST, Cangro CB, Blahut S, Papadimitriou JC: Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation* 1999, 68(3) :396-402.

[0166] 40. Ricordi C, Strom TB: Clinical islet transplantation: Advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol.* 2004 Apr; 4(4) :259-68.

- [0167] 41. Froud T, Ricordi C, Baidal DA, Hafiz MH, Ponte G, Cure P, Pileggi A, Poggioli R, Ichii H, Khan A, Ferreiraa JV, Pugliese A, Esquenazi VV, KenyonNS, Alejandro R. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplantation* 2005;8(8):2037-2046
- [0168] 42. Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, Matsumoto I, Ihm S-H, Zhang H-J, Parkey J, Hunter DW, Sutherland DER. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005;293(7):830-835
- [0169] 43. Markmann JF, Rosen M, Sigelman ES, Soulen MC, Deng S, Barker CF, Naji A. Magnetic resonance-defined periportal steatosis following intraportal islet transplantation: a functional footprint of islet graft survival? *Diabetes* 2003;52(7):1591-1594
- [0170] 44. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Rneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001;50(4):710-719.
- [0171] 45. Owen, RJT, Ryan, EA, O' Kelly, K, Lakey, JRT, McCarthy, MC, Paty, BW, Bigam, DL, Rneteman, NM, Korbitt, GS, Rajotte, RV, Shapiro, AMJ. Percutaneous transhepatic pancreatic islet cell transplantation in type 1 diabetes mellitus: Radiologic aspects. *Radiology* 2003;229:165-170.
- [0172] 46. Matsumoto S, Qualley SA, Goel S, Hagman DK, Sweet IR, Poitout V, Strong DM, Robertson RP, Reems JA. Effect of the two-layer (University of Wisconsin solution-perfluorochemical plus 02) method of pancreas preservation on human islet isolation, as assessed by the Edmonton Isolation Protocol. *Transplantation* 2002;74(10):1414-1419
- [0173] 47. Rastellini C, Braun M, Cicalese L, Benedetti E. Construction of an optimal facility for clinical pancreatic islet isolation. *Transplant Proc* 2001;33(7-8):3524.
- [0174] 48. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Yamada Y. Transplantation from nonheartbeating donor pancreata using modified Ricordi islet isolation method. *Transplantation* 2006;82(4):460-5.
- [0175] 49. Ryan EA, Shandro T, Green K, Paty B W, Senior PA, Bigam D, Shapiro AM, Vantyghem MC. Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. *Diabetes*. 2004 Apr;53(4):955-62.
- [0176] 50. Levy MF, Jennings L, Abouljoud MS, Mulligan DC, Goldstein RM, Husberg BS, Gonwa TA, Klintmalm GB. Quality of life improvements at one, two, and five years after liver transplantation. *Transplantation* 1995;59(4):515-518.



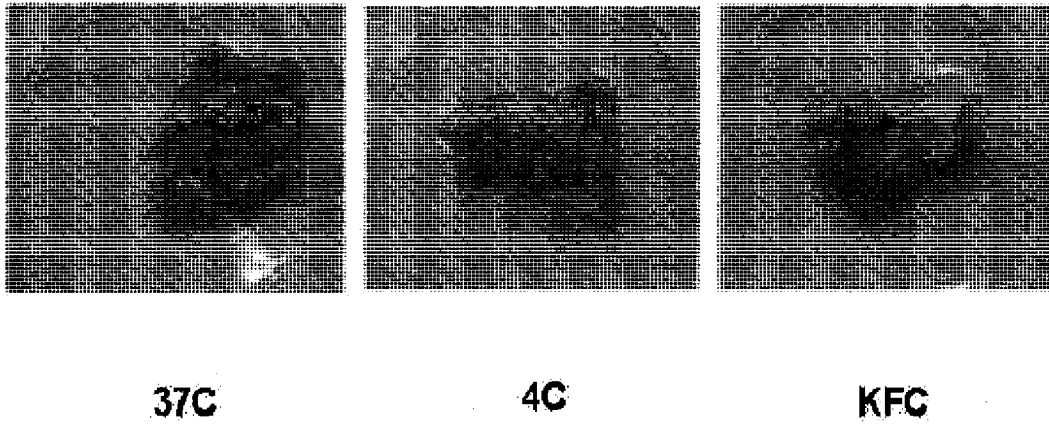


图 1

保存的猪胰腺中每HPF的胰岛

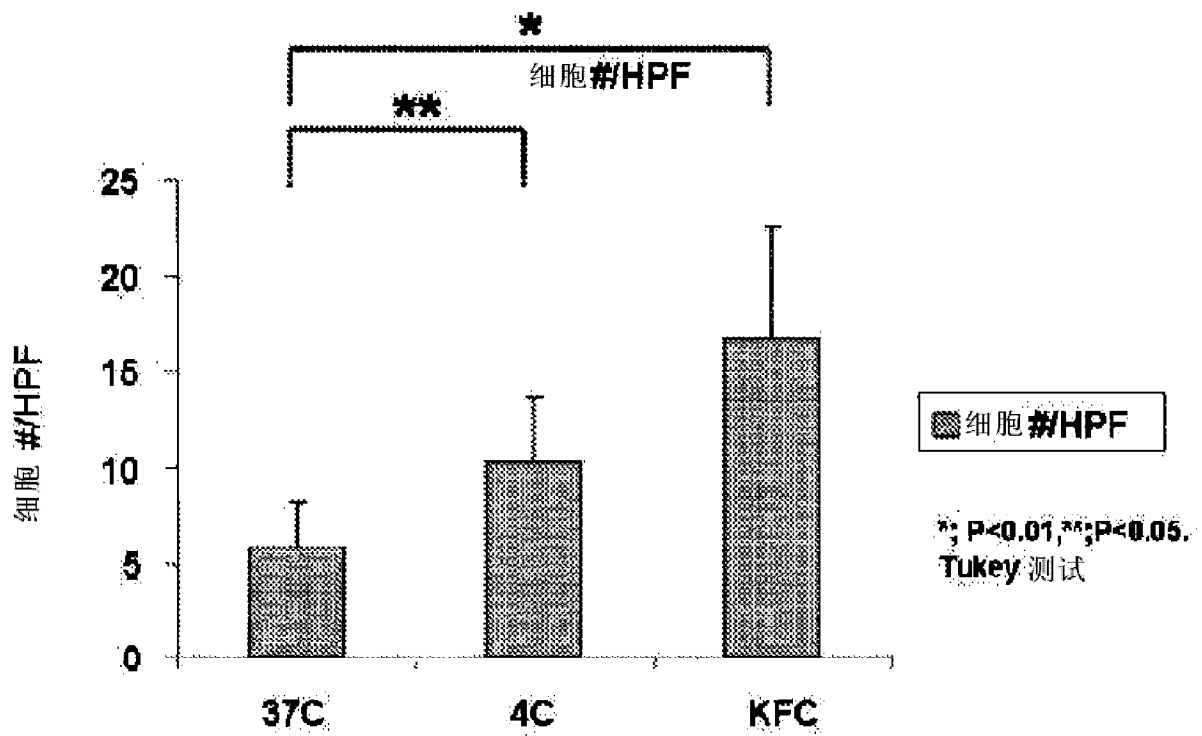


图 2

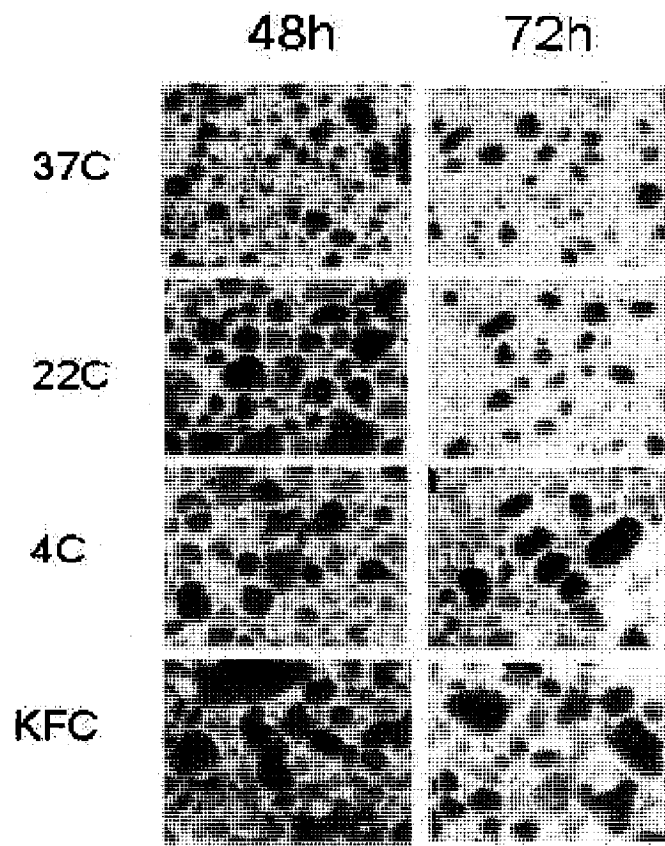


图 3

### 胰岛生存能力

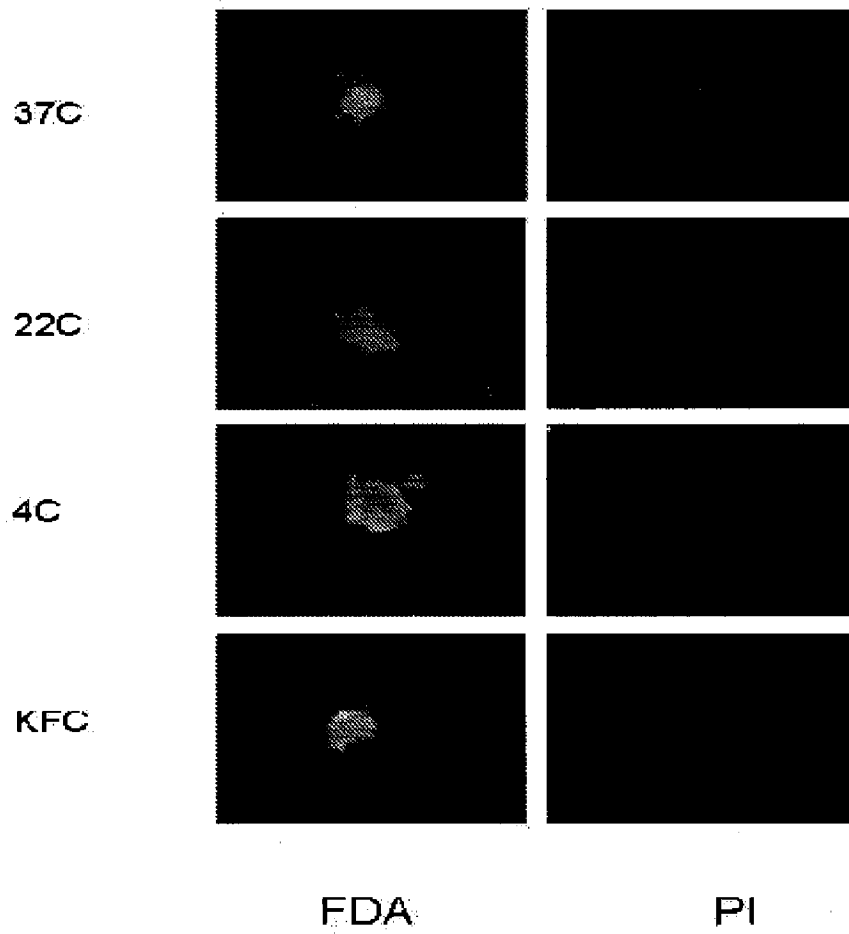


图 4

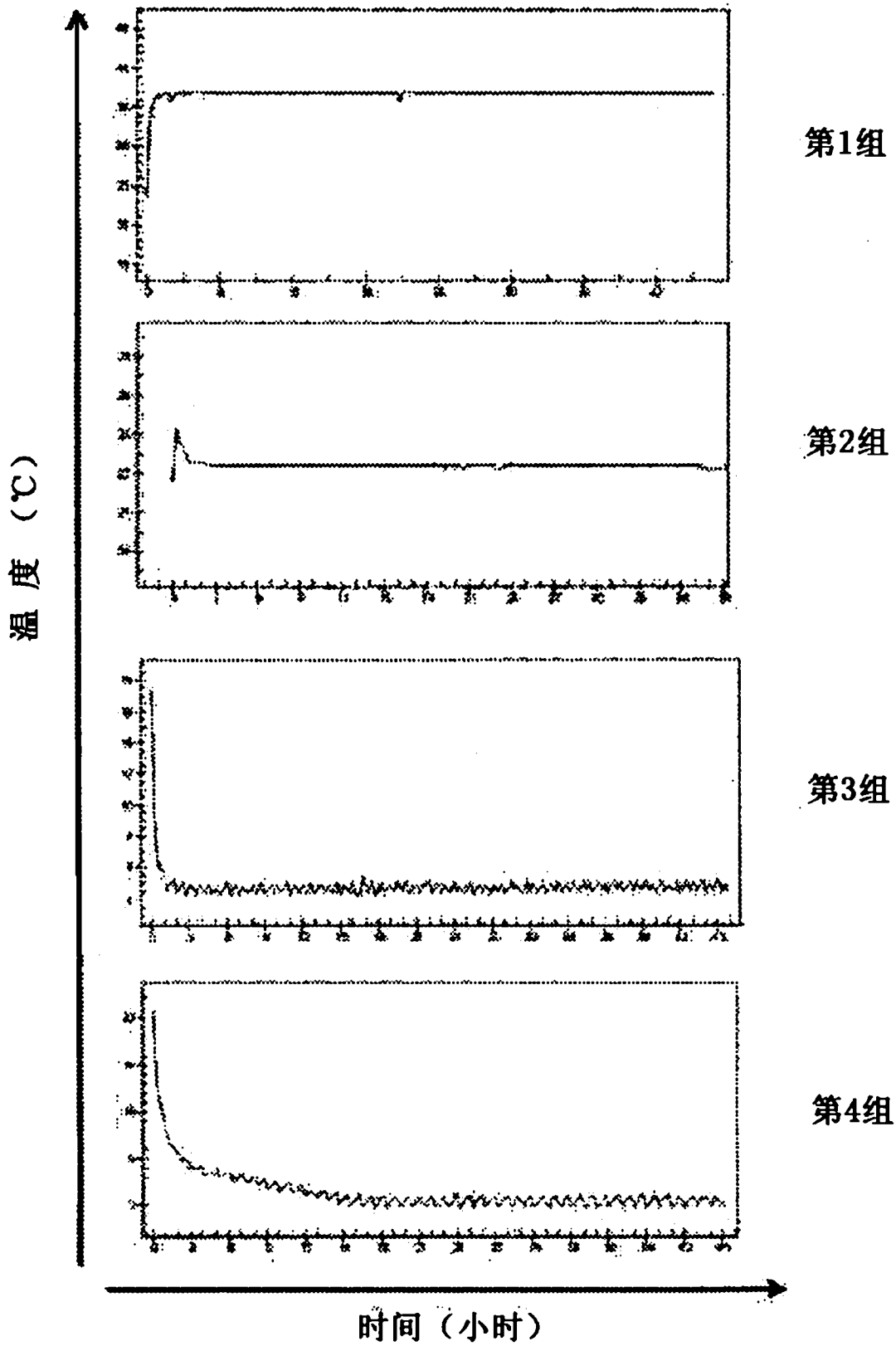


图 5

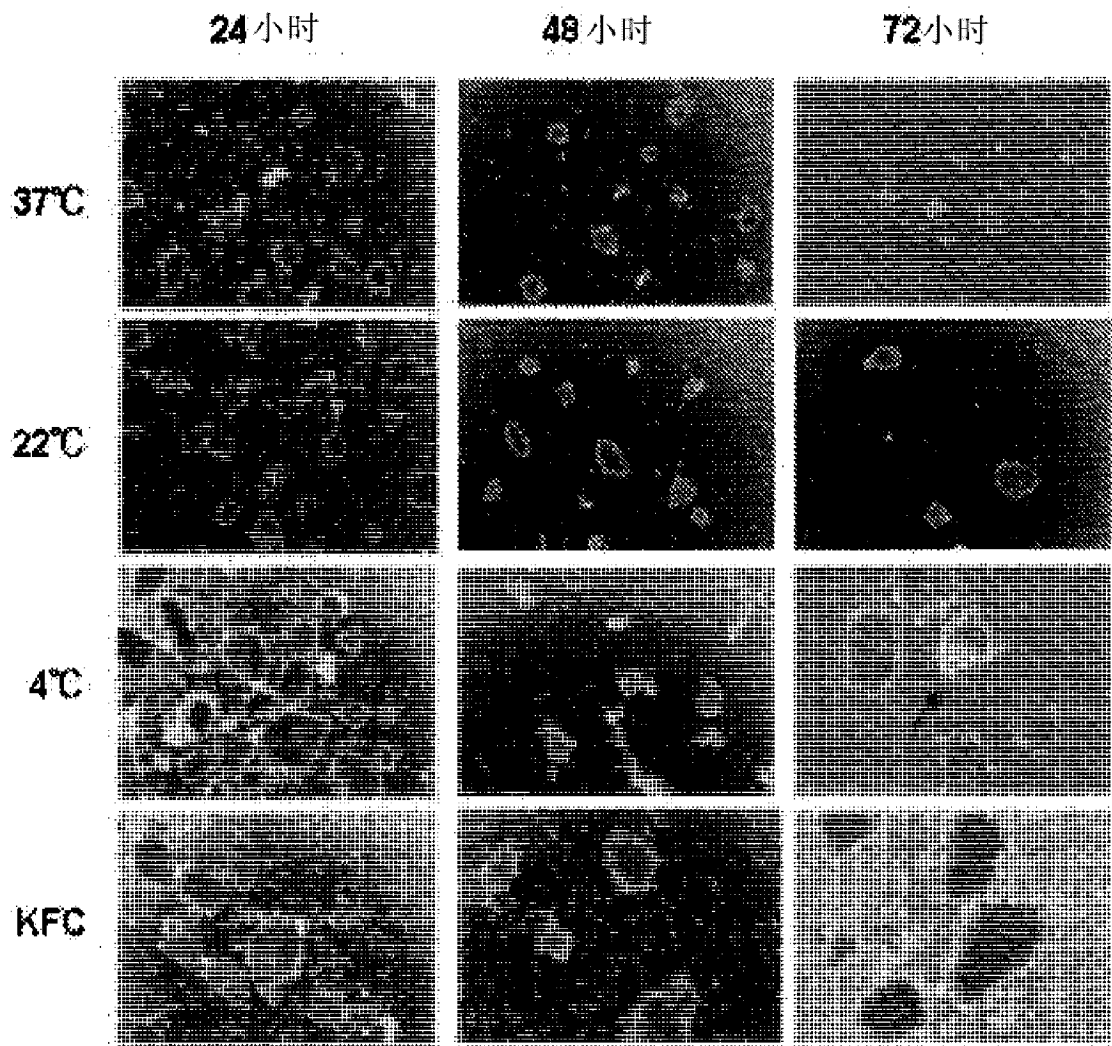


图 6

在每个设置下的胰岛回收率

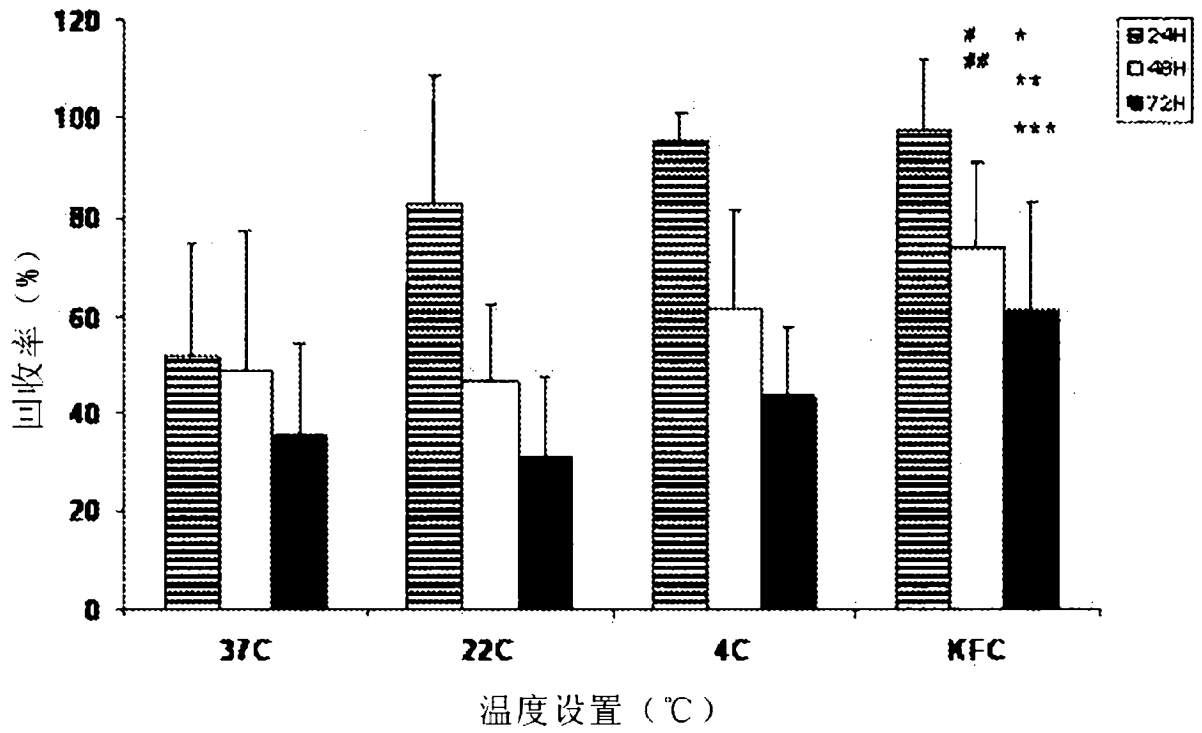


图 7A

纯度变化

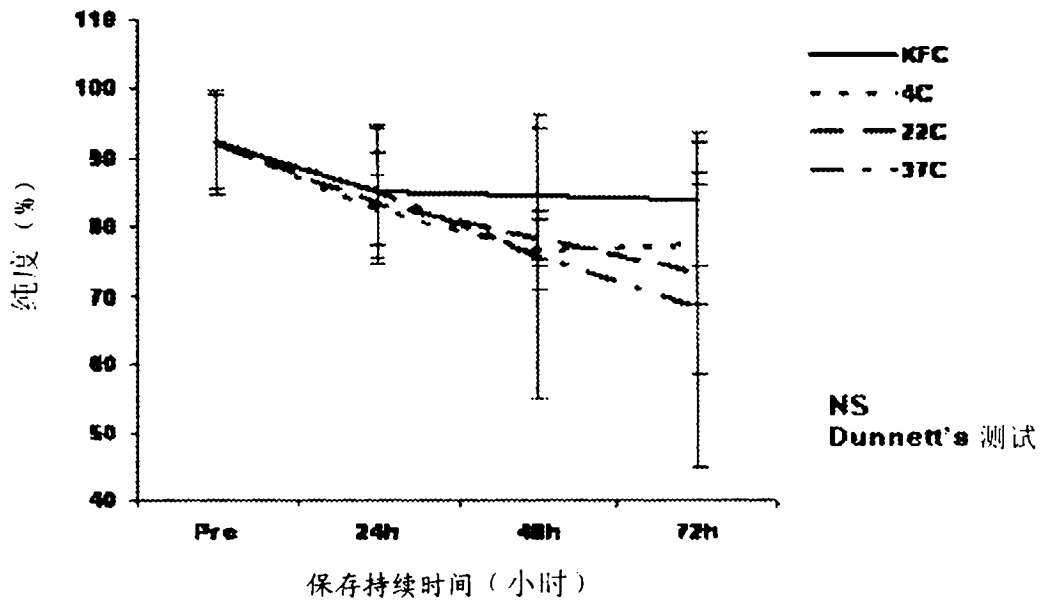


图 7B

### 生存能力变化

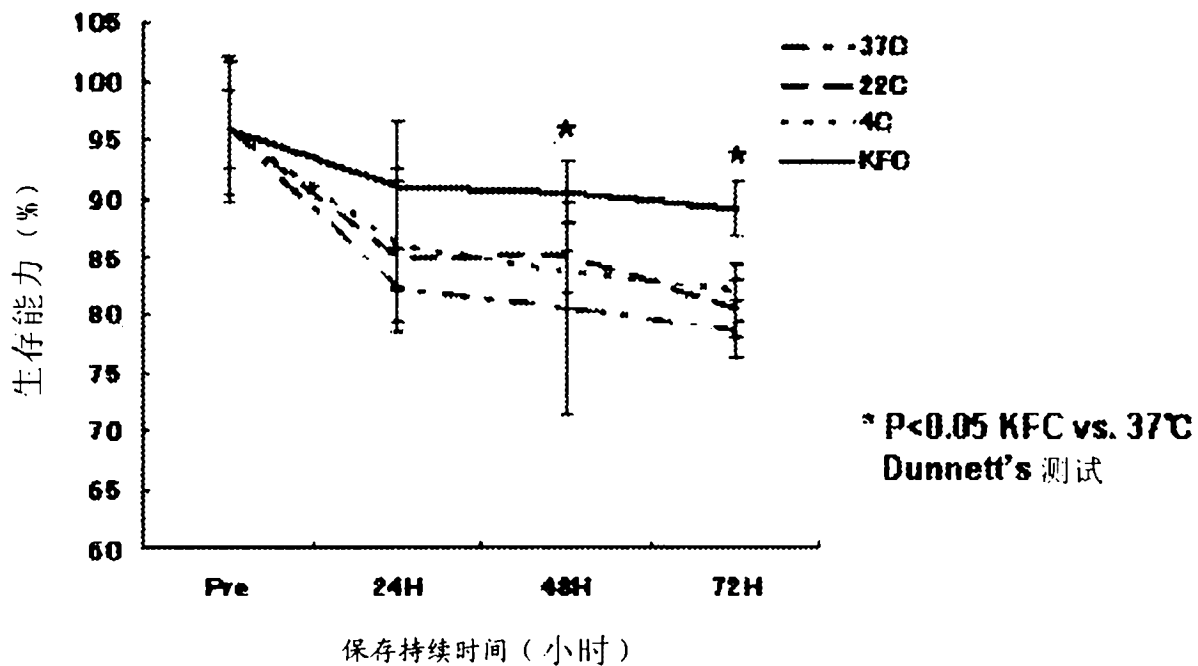


图 7C

### 刺激指数

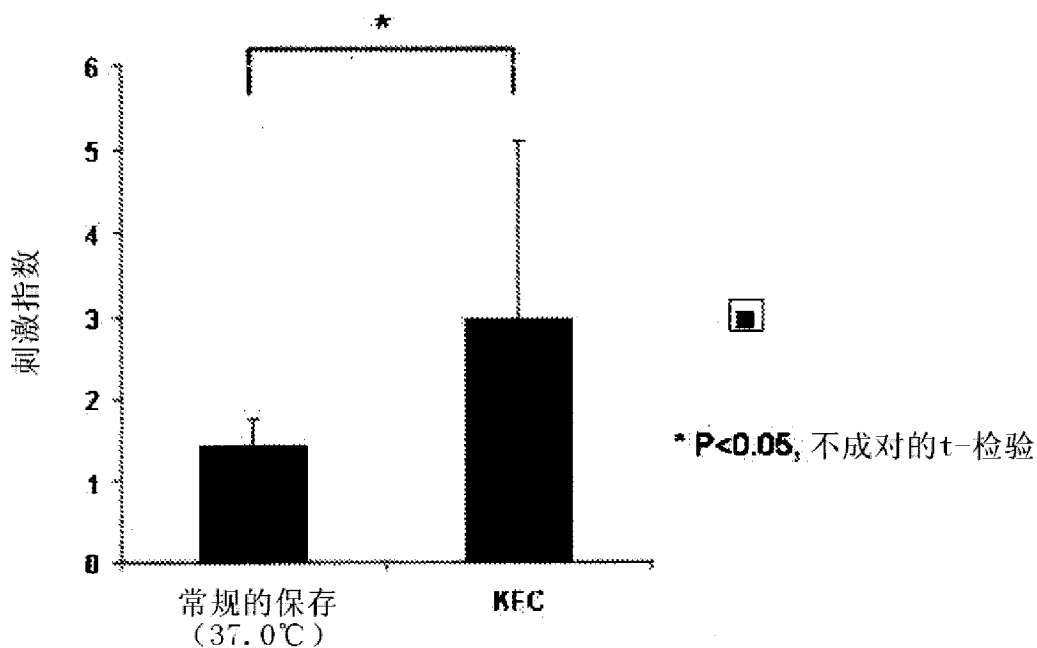


图 8