

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/08

A61K 35/54 A61P 35/00

G01N 33/50



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01807877. X

[43] 公开日 2003 年 6 月 4 日

[11] 公开号 CN 1422332A

[22] 申请日 2001.4.10 [21] 申请号 01807877. X
[30] 优先权
[32] 2000. 4.10 [33] US [31] 09/545,659
[86] 国际申请 PCT/US01/11713 2001.4.10
[87] 国际公布 WO01/77303 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 李荣皓 L·鲍尔德 J·P·玛瑟

[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 5 页

[54] 发明名称 人卵巢间皮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卵巢间皮细胞群体，以及分离和培养卵巢间皮细胞的方法。通过小心操作卵巢间皮细胞的微环境，可以得到多次传代，其中卵巢间皮细胞能够成为卵巢表面上皮细胞或颗粒细胞。另外，本文还公开了使用人卵巢间皮细胞的几种方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 基本纯的人卵巢间皮细胞群体, 其中所述卵巢间皮细胞具有分化成卵巢表面上皮细胞或颗粒细胞的多能性。

2. 依照权利要求1的卵巢间皮细胞, 其中在营养培养基中维持的所述卵巢间皮细胞保留了分化成卵巢表面上皮细胞或颗粒细胞的多能性。

3. 依照权利要求1的卵巢间皮细胞, 其中所述卵巢间皮细胞能够通过至少一种细胞表面标记的表达而得到鉴定。

4. 依照权利要求3的卵巢间皮细胞, 其中所述细胞表面标记是细胞角蛋白。

5. 依照权利要求4的卵巢间皮细胞, 其中所述细胞角蛋白选自下组: 细胞角蛋白1、细胞角蛋白5、细胞角蛋白6、细胞角蛋白7、细胞角蛋白8、细胞角蛋白10、细胞角蛋白11、细胞角蛋白13、细胞角蛋白15、细胞角蛋白16、细胞角蛋白18、和细胞角蛋白19。

6. 依照权利要求5的卵巢间皮细胞, 其中所述卵巢间皮细胞还表达波形蛋白作为细胞表面标记。

7. 依照权利要求6的卵巢间皮细胞, 其中所述卵巢间皮细胞具有立方上皮细胞的形态。

8. 分离基本纯的卵巢间皮细胞群体的方法, 包括:

a) 显微解剖人胎卵巢间皮细胞来源;

b) 将卵巢间皮细胞来源置于营养培养基中, 其培养条件足以维持所述卵巢间皮细胞的存活, 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、 α -生育酚、重组人heregulin β 1、牛血清清蛋白、和抑酶肽;

c) 维持合适的培养条件, 该条件足以使卵巢间皮细胞由卵巢间皮细胞来源迁移至营养培养基中;

d) 维持合适的培养条件, 该条件足以使卵巢间皮细胞形成聚集体或单层结构; 并

e) 将所述聚集体或单层结构传代培养,以获得基本纯的卵巢间皮细胞群体。

9. 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所述卵巢间皮细胞群体施用于所述受体。

10. 在非人哺乳动物受体中生成卵巢组织模型的方法,包括将权利要求1所述人卵巢间皮细胞群体施用于所述受体,其中首先在基本营养培养基中维持所述卵巢间皮细胞,然后施用于所述受体中能够支持所述卵巢间皮细胞的生长和分化的部位。

11. 向受体提供细胞疗法的方法,包括将权利要求1所述人卵巢间皮细胞施用于所述受体,其中首先在营养培养基中培养所述卵巢间皮细胞,然后施用于所述受体中能够支持所述卵巢间皮细胞的生长和分化的部位。

12. 提供卵巢间皮组织特异性生物学成分的来源用于至少一种药物的药物开发的方法,包括分离权利要求1所述人卵巢间皮细胞群体,并使用所述卵巢间皮细胞或其任意部分作为开发中药物的作用靶。

13. 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所述人卵巢间皮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。

人卵巢间皮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卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞的卵巢间皮细胞群体、分离卵巢间皮细胞的方法、卵巢间皮细胞的表征、和卵巢间皮细胞的用途。

技术背景

卵巢癌是女性死于癌症的最常见起因之一（Boring C.C. 等人，CA-Cancer J. Clin., 41: 19 - 36, 1991）。在大约80 - 90%的卵巢癌病例中，认为卵巢表面上皮是发生癌性转化的组织源（Nicosia S.V., 《Pathology of Human Neoplasms》即人肿瘤病理学，纽约，Raven出版社，第435 - 486页，1988; Scully R.E., Am. J. Pathol., 87: 686 - 720, 1977）。卵巢表面上皮（OSE）是覆盖卵巢表面的细胞单层，而且在卵巢门处与体腔间皮相连（Dubeau L. 等人，Anticancer Research, 10: 1233 - 1240, 1990）。认为OSE细胞衍生自覆盖性腺嵴的间皮细胞。间皮细胞基质化，迁移到卵巢内，并成为颗粒细胞。颗粒细胞（卵巢中的主要内分泌细胞类型之一）首先在出生前阶段作为围绕卵母细胞的单层细胞出现于原始卵泡。当每个卵泡变得活泼时，卵母细胞开始变大，而颗粒细胞开始分裂，数目增加，并分泌雌激素。当卵泡成熟时，颗粒细胞停止分裂，而卵泡在称为排卵的过程中喷出卵母细胞。排卵后，颗粒细胞就分化成分泌孕酮的发育中黄体的黄体细胞。

由于缺乏人卵巢组织模型，因而难以确认卵巢表面上皮是否癌性生长的源头。另外，由于仍在改进能够分离OSE细胞并仍然保持其原始特征的培养条件，因而缺乏关于卵巢表面上皮细胞在卵子发生和卵泡

形成过程中的发育的理解。能够可靠分化成多种细胞类型（诸如OSE细胞和颗粒细胞）的卵巢前身细胞的鉴定、分离、和表征对于理解卵巢细胞的生物学和为什么发生癌性转化（像卵巢癌）及（或许）如何能够预防转化可能是重要的。然而，卵巢前身细胞像许多前身细胞一样，数目较少且难以分离。一旦分离了，却难以培养卵巢前身细胞而又保持它们的前身性状。推测存在颗粒细胞和OSE细胞的前身，但是迄今完成的工作只分离得到OSE细胞和颗粒细胞，而未能分离得到这两种细胞类型的共同前身。

已经有关于人OSE细胞的分离和培养方法的几份报告（Kruk P. A. 等人, *Laboratory Investigation*, 63(1): 132 - 136, 1990; Siemens C. H. 和Auersperg N., *Journal of Cellular Physiology*, 134: 347 - 356, 1988; Auersperg N. 等人, *In Vitro*, 20(10): 743 - 755, 1984)。在这些报告中，分离和培养的人OSE细胞早已处于最终分化形式。还报告了兔OSE细胞和颗粒细胞的分离和表征（Piquette G. N. 和Timms B. G., *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 26: 471 - 481, 1990）。然而，其中OSE细胞早已分化，因而使得对与早期OSE发育相关的事件或早期OSE发育过程中的早期癌性转化的研究工作变得困难。有些研究项目已经完成了颗粒细胞前身的鉴定。通过随机X染色体灭活技术和使用磷酸甘油酸激酶-1（PGK-1）（糖酵解酶变体）的X连锁异源酶变体，测定得知小鼠卵巢中颗粒细胞克隆前身的数目较少（大约5个）（Telfer E. 等人, *J. Reprod. Fert.*, 84: 105 - 110, 1988）。涉及卵巢颗粒干细胞的其它研究证明颗粒细胞而非卵母细胞是卵巢中端粒酶活性的来源，因而，正如作者所述，他们的结果支持他们的假设即颗粒细胞是由一群干细胞产生的（Lavranos T. C. 等人, *Biol. of Reproduction*, 61: 358 - 366, 1999）。卵巢前身细胞研究中的一种考虑提倡使用胎儿而非成年卵巢作为细胞来源，因为胎儿中的前身细胞可能具有比成人更高的活性和更多的数目。为此，已经描述了来自称为卵巢网的卵巢区域的胎儿上皮细胞，但是并未描述这些细胞具有分化成任何其它类型的卵巢间皮细胞的多能性（Dubeau 等人, *Anticancer Research*,

10: 1233 - 1240, 1990)。

因此，需要鉴定、分离、培养、和表征具有多能性的卵巢间皮细胞的方法。本文所述方法克服了许多上述缺点，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卵巢间皮细胞群体，它们具有分化成卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞的多能性。

在另一方面，本发明涉及分离基本纯的人卵巢间皮细胞群体的方法，它们具有分化成卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞的多能性。

在还有一个方面，本发明涉及维持基本纯的人卵巢间皮细胞群体的方法，它们具有分化成卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞的多能性，以及维持或培养这些卵巢间皮细胞并使之保持多能性的方法。

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

在还有一个方面，本发明涉及通过将基本纯的人卵巢间皮细胞群体导入非人哺乳动物受体来生成卵巢组织模型的方法。

在另一方面，本发明涉及提供细胞疗法的方法，即将基本纯的人卵巢间皮细胞群体导入异源受体中能够支持卵巢细胞的增殖和生长的部位。

在另一方面，本发明涉及提供卵巢间皮组织特异性生物学成分的来源用于开发药物的方法，其中基本纯的人卵巢间皮细胞群体用作卵巢间皮细胞生物学成分的来源，而且一种或多种上述卵巢间皮生物学成分是开发中药物的作用靶。

在另一方面，本发明涉及提供核酸或蛋白质的来源用于生物测定法开发的方法，其中基本纯的人卵巢间皮细胞群体用作核酸或蛋白质的来源，而且所述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

本专利的文件包括至少一幅彩图。专利和商标事务所将在收到请求和必需的费用后提供本专利及彩图的拷贝。

图1A的显微照片显示了人卵巢间皮细胞自实体卵巢组织向外生长。图1B的显微照片显示了人卵巢间皮细胞作为细胞簇在悬浮培养中的生长。图1C的显微照片显示了人卵巢间皮细胞作为单层的生长。

图2显示了免疫组织化学分析的结果，其中单克隆抗体5C8特异识别人胎卵巢组织中的卵巢间皮细胞。图2A显示了100x的放大倍数，图2B显示了400x的放大倍数。

图3显示了卵巢间皮细胞簇的免疫过氧化物酶染色结果。图3A显示了卵巢间皮细胞关于细胞角蛋白19的染色。图3B显示了卵巢间皮细胞关于细胞角蛋白13和16的染色。图3C显示了卵巢间皮细胞关于细胞角蛋白10、11、和18的染色。图3D显示了卵巢间皮细胞关于波形蛋白的染色。图3E显示了卵巢间皮细胞关于受到单克隆抗体5C8识别的卵巢间皮细胞表面抗原的染色。

图4显示了组织重组实验的结果，其中将人卵巢间皮细胞与大鼠尿殖窦间充组织重组并移植到小鼠中。图4A、4B、和4C显示了卵巢表面上皮细胞类似囊状结构的形态。

图5显示了免疫组织化学分析的结果，其中能够通过抗卵巢单克隆抗体5C8特异检测（棕色，以箭头指示）卵巢癌中的癌性上皮细胞。

发明详述

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“卵巢表面上皮细胞”和“OSE细胞”可以互换，指人类来源的“卵巢表面上皮细胞”和“OSE”细胞。

“卵巢间皮细胞”指衍生自中胚层且早就定型成为具有卵巢本质的细胞的人类细胞。更具体的说，本发明的卵巢间皮细胞指处于间皮细胞阶段与成为最终分化成卵巢表面上皮细胞或颗粒细胞之前阶段之间的细胞。本发明卵巢间皮细胞就是驻留在间皮细胞阶段，而且恰好在定型成为最终分化的卵巢间皮细胞类型之前。本发明的卵巢间皮细胞具有成为卵巢表面上皮细胞或颗粒细胞的多能性。

“多能性”指细胞仍能成为多种细胞但不再能够成为身体内任何细胞类型（即不再全能）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，“预定的卵巢”指多能细胞处于原始卵泡阶段之前且处于最终分化的卵巢细胞（诸如颗粒细胞或卵巢表面上皮细胞）阶段之前的发育阶段。称为“预定的卵巢”的细胞被定型成为卵巢细胞，但尚未开始发育成最终分化的卵巢细胞。引起预定的卵巢细胞开

始分化的因素有多种。非限制性范例包括暴露于血清、暴露于孕酮、雌激素、促黄体素（LH）、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。

“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。

“外植体”指取自人胎的卵巢组织。通常将外植体用作卵巢细胞的来源。可以通过几种方法由外植体分离细胞。一种方法是将卵巢组织外植体(整个组织或切成小块)置于已知成分基本培养基中,并使卵巢细胞由实体组织块自然迁移到培养基中。另一种方法是将卵巢组织进行酶促消化或机械处理,促使细胞离开实体组织。

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,则细胞分别具有“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。中间层即中胚层生成几种器官(包括但不限于心脏、肾脏、间皮、和性腺)、结缔组织(如骨、肌肉、腱)、和血细胞。

在用于本文时,“基本纯的”卵巢间皮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%或更多卵巢间皮细胞的细胞群体。

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。

“已知成分培养基”、“基本细胞维持培养基”、“营养培养基”、和“基本营养培养基”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；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、卵巢细胞曾在其中生长的培养基。在营养培养基中生长的卵巢细胞可能释放促进前分化原始状态的卵巢间皮细胞连续存活、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，或者添加用于饲养卵巢细胞的营养培养基。

“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℃和大约5% CO₂及增湿。应当在无菌条件下执行所有组织培养技术和设备。

“卵巢间皮细胞簇”、“卵巢间皮细胞球”、和“卵巢细胞簇”在全文中可以互换，指卵巢间皮细胞群体块。卵巢间皮细胞簇能够形成约略类似球形的三维结构。

“移植重组体”在用于本文时指卵巢间皮细胞簇与间充组织一起放置的组合单位。间充组织可以具有卵巢或非卵巢来源。间充组织可以来自移植受体的异源物种。间充组织还可以来自卵巢间皮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-96小时、更优选大约6小时-48小时、甚至更优选过夜（大约24小时）。

“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、 β -球蛋白、和 γ -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。

人卵巢间皮细胞的分离和维持

本发明的卵巢间皮细胞是由人胎卵巢组织分离得到的。胎儿的年龄在大约1周 - 大约40周之间、优选大约8周 - 大约30周之间、甚至更优选大约17周 - 大约25周之间。可以通过大体解剖、外观、和在胎儿中的定位来鉴定卵巢组织。辨别卵巢的几个大体解剖和外观特征是其新月形状和在腹腔中的定位。卵巢还可能与输卵管相连。一旦进行了鉴定，即首先通过基本营养培养基的清洗来清理胎儿卵巢组织，然后进行显微解剖。显微解剖的目的是除去与卵巢相连的组织，将实体卵巢组织块分成完整组织块的小块使得基本营养培养基更多的接触组织块中的卵巢细胞，和/或将卵巢细胞与卵巢组织块分开。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，显微解剖胎儿卵巢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卵巢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卵巢组织。酶量取决于胎儿的年龄和卵巢组织的大小。在一个实施方案中，使用胶原酶 - 分散酶的酶处理可能降低总的细胞产量。因此，应降低酶的用量，或者根本不用。在其它实施方案中，酶处理可能增加总的细胞产量。因此，可以单独使用酶处理，或者联合显微解剖方法使用。极其多种基本细胞维持培养基可用于将液体的pH维持在促进卵巢间皮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Iscoe氏修改Eagle氏培养基（IMEM）。另外，可以使用Ham和Wallace, 1979, Meth. Enz.,

58: 44; Barnes和Sato, 1980, Anal. Biochem., 102: 225; 或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, 纽约中描述的任何基本营养培养基。

然后将小块卵巢组织置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。为了获得促进卵巢间皮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、 α -生育酚、重组人heregulin、抑酶肽、胎牛血清、和牛血清清蛋白。在一个优选实施方案中, 使用下列量的营养物来促进卵巢间皮细胞的存活和生长: 至少大约10ng/ml 胰岛素且不超过大约1mg/ml 胰岛素, 更优选大约10 μ g/ml 胰岛素; 至少大约1 μ g/ml 转铁蛋白且不超过大约100 μ g/ml 转铁蛋白, 更优选大约10 μ g/ml 转铁蛋白; 至少大约1ng/ml 表皮生长因子且不超过大约1000ng/ml 表皮生长因子, 更优选大约50ng/ml 表皮生长因子; 至少大约0.1 μ g/ml α -生育酚且不超过大约1mg/ml α -生育酚, 更优选大约5 μ g/ml α -生育酚; 至少大约0.1nM 重组人heregulin且不超过大约100nM 重组人heregulin, 更优选大约10nM 重组人heregulin; 至少大约1 μ g/ml 抑酶肽且不超过大约100 μ g/ml 抑酶肽, 更优选大约5 μ g/ml 抑酶肽; 至少大约0.1% 牛血清清蛋白(BSA)且不超过大约50% BSA, 更优选大约2% BSA。

卵巢间皮细胞由卵巢组织迁移至卵巢组织所处培养基中。在一个实施方案中, 卵巢间皮细胞以簇形式由卵巢组织迁移至培养基中。在另一个实施方案中, 卵巢间皮细胞以单细胞形式由卵巢组织迁移至培养基中。在另一个实施方案中, 由卵巢组织迁移出来的卵巢间皮细胞不再包埋在卵巢组织中, 而只是与组织松散相连。可以在不同底层上培养卵巢间皮细胞。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, 在经层粘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卵巢间皮细胞。在一个优选实施方案中，在经层粘连蛋白包被的组织瓶中在上文所述优选营养培养基中培养卵巢间皮细胞。组织培养板或瓶的大小与将要置于板或瓶中的卵巢组织的量成正比。熟练技术人员可以通过逐步增加置于组织培养板或瓶中的卵巢组织来确定瓶或板的正确大小。当首次将卵巢组织置于板或瓶中时，培养基就总浊度而言通常是清澈的。当卵巢间皮细胞由卵巢组织碎块迁移出来后，培养基将变得越来越不透明和越来越混浊。当由于由卵巢组织迁移出来的卵巢间皮细胞的数量增加或由于卵巢间皮细胞的生长而培养基高度混浊时，向板或瓶中加入更多营养培养基以补充卵巢细胞消耗掉的营养物。或者，当随着卵巢间皮细胞的数量增加而培养基变得混浊时，可以由培养板或瓶取出少量细胞并检查细胞存活力，例如通过锥虫蓝染色检查。已经超越限度容纳过多细胞的板或瓶将开始显示细胞存活力下降。熟练技术人员就可以将板或瓶的内容物转移至更大（如更大的体积）的其它板或瓶以容纳数目渐增的细胞。在一个实施方案中，将板或瓶的整个内容物转移至更大体积的另一个板或瓶。在另一个实施方案中，将卵巢细胞悬浮液分成几份，将每份置于分开的板或瓶中，然后向卵巢细胞中加入营养培养基（也称为“传代培养”）。当在上文所述优选营养培养基中在经层粘连蛋白包被的瓶中培养时，卵巢间皮细胞形成细胞簇。组织培养瓶与层粘连蛋白包被的联合培养能够将间充质细胞与卵巢间皮细胞簇分开。间充质细胞迁移遍及整个培养基，而卵巢间皮细胞簇与卵巢组织在物理距离上紧密相连。在另一个实施方案中，在上文所述优选营养培养基中在经层粘连蛋白包被的组织培养板中培养卵巢间皮细胞。在这个实施方案中，卵巢间皮细胞形成单层。

在优选营养培养基中在经层粘连蛋白包被的组织培养瓶中培养的卵巢间皮细胞将形成在物理距离上与卵巢组织紧密相连的细胞簇。当需要富集卵巢间皮细胞时，可以采用的一种方法是通过酶处理分离卵巢间皮细胞，随后分离卵巢间皮细胞簇。可以用于酶处理的酶的范例包括但不限于胶原酶—分散酶和胰蛋白酶。在一个实施方案中，使用

胶原酶-分散酶由培养瓶壁和由卵巢组织解离卵巢间皮细胞簇，优选使用至少大约10% (w/v) 胶原酶-分散酶，更优选使用至少大约1% 胶原酶-分散酶，最优选使用至少大约0.1% 胶原酶-分散酶。使用密度梯度分离卵巢间皮细胞簇。可用于实现细胞分离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™）、胶体样聚乙烯吡咯烷酮包被的硅胶（即珀可™）、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，使用能够中和胶原酶-分散酶的密度梯度。这种密度梯度的一个范例是BSA。BSA的用量是优选营养培养基的大约50% (v/v)、更优选大约25%、更优选大约10%、更优选至少大约0.1%、最优选大约1% - 3%。在有些情况中，一次密度梯度足以富集卵巢间皮细胞群体。在其它情况中，将需要应用超过一次密度梯度。期望的产物是基本纯的卵巢间皮细胞簇群体。

在一个实施方案中，基本纯的卵巢间皮细胞簇群体是通过以足以沉淀卵巢间皮细胞簇且使单个间充质细胞留在上清液中的离心速度将卵巢细胞通过密度梯度（像BSA）离心而分离得到的。将包含卵巢间皮细胞的细胞沉淀重悬于足以维持卵巢间皮细胞存活的营养培养基中，并置于经生物学底层（例如层粘连蛋白）包被的组织培养瓶中。可以将整个卵巢间皮细胞重悬液置于一个瓶中。或者，若重悬的卵巢间皮细胞高度富集且具有高密度的卵巢间皮细胞，则可以将卵巢间皮细胞重悬液分到几个装有优选营养培养基的瓶中。在一个优选实施方案中，使用下列量的营养物来促进基本纯的卵巢间皮细胞群体的存活和生长：至少大约10ng/ml 胰岛素且不超过大约1mg/ml 胰岛素，更优选大约10μg/ml 胰岛素；至少大约1μg/ml 转铁蛋白且不超过大约100μg/ml 转铁蛋白，更优选大约10μg/ml 转铁蛋白；至少大约1ng/ml 表皮生长因子且不超过大约1000ng/ml 表皮生长因子，更优选大约50ng/ml 表皮生长因子；至少大约0.1μg/ml α-生育酚且不超过大约1mg/ml α-生育酚，更优选大约5μg/ml α-生育酚；至少大约0.1nM 重组人heregulin且不超过大约100nM 重组人heregulin，更优选大约

10nM 重组人heregulin; 至少大约1 μ g/ml 抑酶肽且不超过大约100 μ g/ml 抑酶肽, 更优选大约5 μ g/ml 抑酶肽; 至少大约0.1% (体积比) 牛血清清蛋白(BSA)且不超过大约50% BSA, 更优选大约0.5% BSA。

饲养卵巢间皮细胞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卵巢间皮细胞。在另一个实施方案中, 可以用曾经培养这些细胞的条件培养基来饲养卵巢间皮细胞。因为要求保护的卵巢间皮细胞对于本发明而言是独特的, 而且将分泌这些细胞特异的因子, 所以由卵巢间皮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经层粘连蛋白包被的组织培养瓶中培养时, 卵巢间皮细胞形成簇。当底层是经层粘连蛋白包被的组织培养板时, 卵巢间皮细胞形成贴壁的基质单层。在本发明的一个优选实施方案中, 在卵巢间皮细胞的整个培养过程中维持卵巢间皮细胞彼此的细胞-细胞接触以促进较高的增殖速度。添加条件培养基也可以促进卵巢间皮细胞更好的生长。熟练技术人员能够通过随着向营养培养基中添加渐增量的条件培养基来确定添加条件培养基是否有利于卵巢间皮细胞的生长。可以通过对添加条件培养基之前和之后单位体积培养基中的细胞计数来测定细胞的生长。或者, 细胞的存活力(如锥虫蓝)可用于评估向培养条件中添加条件培养基是否有利于卵巢间皮细胞的生长。促进卵巢间皮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。本发明的卵巢间皮细胞可以传代多次而不诱导这些卵巢间皮细胞分化成最终分化的卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞。

卵巢间皮细胞的表征

以本文公开的方式分离得到的本发明的卵巢间皮细胞群体具有几个定义特征。首先, 卵巢间皮细胞处于可以描述成“预定的卵巢”的阶段。在间皮祖细胞中, 有些预定将成为卵巢间皮细胞。本文要求保

护的卵巢间皮细胞群体就驻留在这种发育阶段。本发明的卵巢间皮细胞具有成为卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞的能力，但是尚未开始分化成其中任一种细胞。

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卵巢间皮细胞的鉴定。颗粒细胞系形成卵泡的壁。颗粒细胞的形态是立方形。可用于检测卵巢间皮细胞的标记包括但不限于卵巢间皮细胞表面上的波形蛋白、细胞角蛋白（CK）1、5、6、7、8、10、11、13、15、16、18、和19、以及抗卵巢单克隆抗体5C8。可以使用的、对CK和波形蛋白特异的抗体的范例包括但不限于来自Sigma化学公司的抗细胞角蛋白（CK）抗体克隆4.62、克隆8.12、克隆8.13和来自Sigma化学公司的抗波形蛋白抗体克隆13.2。抗CK抗体和抗波形蛋白抗体可用于免疫组织化学或流式细胞计量术中对MTE细胞的直接或间接染色。用于检测卵巢间皮细胞的标记可用于直接和间接免疫荧光、免疫组织化学、和流式细胞计量术。

在基本营养培养基中将本发明的卵巢间皮细胞维持在它们的原始前分化状态。本文公开的基本细胞维持培养基或优选营养培养基或者条件培养基可用于在体外培养卵巢间皮细胞。组织培养板上的不同类型的底层可用于获得卵巢间皮细胞的簇或单层。经层粘连蛋白包被的瓶联合本文公开的优选营养培养基的使用将产生卵巢间皮细胞簇，而经层粘连蛋白包被的板联合本文公开的优选营养培养基的使用将产生卵巢间皮细胞单层。本发明的卵巢间皮细胞可以在不含血清的营养培养基或包含血清的营养培养基中培养。正如本领域普通技术人员众所周知的，通常向营养培养基中添加血清以进一步增强细胞的生长。血清中包含许多血清生物分子，但是本发明的卵巢间皮细胞可以在缺乏这些血清生物分子群体时生长。可以通过添加在血清中发现的一种或多种蛋白质（例如牛血清清蛋白或BSA）来增强卵巢间皮细胞的生长。

本发明的卵巢间皮细胞具有在本文公开的优选基本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，多能性得到维持，本发明的卵巢间皮细胞能够分化成卵巢表面上皮细

胞和颗粒细胞。另外，正如本文公开的，在每次传代后的任意时间点，卵巢间皮细胞可以用作免疫原、用于细胞疗法、用于生物测定法、用于建立人卵巢模型、或用于药物发现和/或开发。

本发明卵巢间皮细胞的另一个特征是在移植到受体哺乳动物的肾膜下后能够分化成卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞。在移植前，卵巢间皮细胞具有分化成颗粒细胞或卵巢表面上皮细胞的能力。正如本文公开的，卵巢间皮细胞可以卵巢间皮细胞簇或单层的形式生长，然后联合间充组织并置于受体哺乳动物的肾膜下。优选的是，将人卵巢间皮细胞簇联合大鼠尿殖道间充组织，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卵巢细胞。

卵巢间皮细胞的用途

作为免疫原的用途

卵巢间皮细胞的一种用途是作为免疫原。通过本文公开的方法分离和培养的卵巢间皮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卵巢间皮细胞作为免疫原的施用。将卵巢间皮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接种。可以通过不同路径来执行免疫接种方法，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，例如每周一次将免疫原注射到小鼠足垫中达几周。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，将小鼠接种免疫原性量的卵巢间皮细胞，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., 1975, *Nature*, 256: 495 - 497的一般体细胞杂交技术，依照Buck D.W.等人, 1982, *In Vitro*, 18: 377 - 381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州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，可以使用本发明的卵巢间皮细胞作为免疫原，生成针对卵巢间皮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卵巢间皮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。卵巢间皮细胞特异抗体的其它用途包括但不限于生物学测试和纯化（即例如通过流式细胞计量术或抗体淘选来分离卵巢间皮细胞）、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)、生物学标记(即其它卵巢或非卵巢细胞的鉴定)、临床诊断(即组织样品中癌性卵巢细胞的鉴定)。

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中,例如在性腺区域中,可以有效量将免疫原诸如卵巢间皮细胞导入性腺区域。可以将数量渐增的卵巢间皮细胞导入异源受体,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。

卵巢间皮细胞用于药物发现的用途

卵巢间皮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多能的、预定的卵巢间皮细胞群体,那么卵巢间皮细胞群体可能分泌迄今尚未发现或表征的蛋白质。因此,由卵巢间皮细胞分泌的蛋白质可以作为作用靶用于药物发现。在一个实施方案中,可以将药物制成在体内靶向卵巢间皮细胞上的特异蛋白质。药物的结合可能促进卵巢间皮细胞分化成卵巢表面上皮细胞或颗粒细胞。当期望卵巢表面上皮细胞或颗粒细胞新生时,例如用于在癌症治疗(如化疗、放疗、等)后取代受损细胞,这种方法可能是有用的。在另一个实施方案中,对卵巢间皮细胞的调控蛋白特异的药物可用于阻滞特定细胞类型的生长,例如在癌症(即卵巢癌、子宫癌、等)的情况中。

卵巢间皮细胞用于细胞疗法的用途

在另一种用途中,将卵巢间皮细胞系用于细胞疗法。卵巢间皮细胞移植是细胞疗法的这样一种范例。在期望不同类型的卵巢细胞(即OSE细胞或颗粒细胞)的情况中,可以采用卵巢间皮细胞移植,因为本发明的卵巢间皮细胞具有多能性,而且能够分化成卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞。为了实践这种用途,使用本文公开的方法分离卵巢间皮

细胞，并在基本营养、已知成分营养培养基中进行培养。在经层粘连蛋白包被的组织培养瓶中培养卵巢间皮细胞以获得卵巢间皮细胞簇。将卵巢间皮细胞簇在标准保温条件下培养大约半天 - 至少大约一次细胞周期传代、更优选至少大约两次细胞周期传代、最优选至少大约三次细胞周期传代。然后将卵巢间皮细胞聚集体施用于受体并使之分化。或者，卵巢间皮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卵巢间皮细胞，装入投递装置，然后施用于受体。在另一个实施方案中，将卵巢间皮细胞聚集体置于肾膜下，并使之分化成OSE或颗粒细胞。在另一个实施方案中，将卵巢间皮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。

卵巢间皮细胞用于生成组织模型的用途

卵巢间皮细胞的另一种用途是在非人哺乳动物中构建人卵巢组织模型。人卵巢组织模型可用于研究卵巢发育或卵巢癌变的多个方面，这是卵巢癌研究的重要领域。将卵巢间皮细胞球置于间充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个卵巢间皮细胞球置于间充组织的顶端。间充组织可以是卵巢或非卵巢组织，而且可以衍生自与用于分离卵巢间皮细胞的物种不同的物种。在一个工作实施例中，将人卵巢间皮细胞置于大鼠间充质尿殖道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卵巢间皮细胞，然后联合来自不同器官的间充组织，熟练技术人员可以逐步方式确定人卵巢间皮细胞生长的最佳组合。在有些实施方案中，使用不同物种（如大鼠）作为间充组织的来源，联合人卵巢间皮细胞使用。异源物种的使用允许将人特异标记用于测定已分化人卵巢细胞的身份。若使用大鼠间充组织，则假阳性的可能性降低。同样，使用尿殖道间充组织取代卵巢间充组织降低了鉴定已分化卵巢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个卵巢间皮细胞球、甚至更优选大约5 - 8个卵巢间皮细胞球置于大鼠尿殖道间充组织的顶端。优选使用大约 1×10^4 - 大约 5×10^6 个间充质细胞，甚至更优选

使用大约 2×10^5 - 大约 5×10^5 个间充质细胞。然后将包含卵巢间皮细胞球且其置于间充组织上的移植重组体置于受体哺乳动物的肾膜下。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物的免疫细胞。另一种方法是给予受体环孢菌素或其它T细胞免疫遏制药。在使用小鼠作为受体哺乳动物时，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，将人卵巢间皮细胞球置于大鼠尿殖间充组织上，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，然后收获移植物并分析卵巢间皮细胞分化。在有些情况中，需要取移植物的一小部分用于分析。卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞特异标记（包括但不限于细胞角蛋白1、5、6、7、8、10、11、13、15、16、18、和19、促卵泡激素（FSH）受体、促黄体素（LH）受体、和芳香酶（aromatase））可用于确认已分化卵巢间皮细胞的身份。确认标记的非限制性方法是免疫组织化学分析、免疫荧光、和流式细胞计量术。鉴定已分化卵巢间皮细胞和评估移植成功与否的另一种方法是对卵巢表面上皮细胞（OSE）中存在的 17β -羟基类固醇脱氢酶（ 17β -HSDH）或颗粒细胞中存在的 $\delta 5-3\beta$ -羟基类固醇脱氢酶进行染色。这些标记可以分开使用，或者彼此联合。另外，这些标记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）小鼠中构建人卵巢模型。可以如下构建人卵巢模型：通过本文公开的方法分离和培养的人卵巢间皮细胞，使用人卵巢间皮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。卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞特异标记包括但不限于细胞角蛋白（即CK1、5、6、7、8、10、11、13、15、16、18、和19）、促卵泡激素（FSH）

受体、促黄体素（LH）受体、和芳香酶。将卵巢表面上皮细胞和颗粒细胞特异标记用于分析组织模型系统的功效。或者，使用已分化卵巢间皮细胞特异标记。这些标记的非限制性范例是细胞角蛋白19、波形蛋白、和单克隆抗体5C8。评估卵巢间皮细胞分化结果的还有一种方法是形态学。卵巢表面上皮细胞具有扁平或柱状上皮细胞的外观。

卵巢间皮细胞在生物测定法中的用途

本文公开的卵巢间皮细胞可用于多种生物测定法。在一种用途中，将卵巢间皮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卵巢间皮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卵巢间皮细胞分化成OSE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卵巢间皮细胞分化成颗粒细胞。卵巢间皮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）和使用来自卵巢间皮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。来自卵巢间皮细胞的蛋白质可用于鉴定与卵巢间皮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。涉及卵巢间皮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（诸如间充组织）如何促进卵巢间皮细胞的分化。

实施例

实施例1：卵巢间皮细胞的分离和培养

由加利福尼亚州Alameda县的Advanced Bioscience Research即高级生物科学研究所获得孕龄17-25周的人胎卵巢。取得卵巢，并在组织培养基中在湿冰浴中运至实验室。抵达后，立即将卵巢清除过多的结缔组织，小心的与输卵管分开，并用新鲜的组织培养基清洗五次。

将卵巢用剪刀剪碎或用刀片切成小块（厚度小于1mm）。将每个卵

养物用3%低聚甲醛原位固定1小时。用磷酸盐缓冲液(PBS)洗去固定剂后,将细胞在封闭缓冲液(5%山羊血清和0.1%吐温20溶于PBS)中保温30分钟,用PBS漂洗,然后在一抗中保温1小时,用PBS漂洗,然后用抗小鼠Ig-辣根过氧化物酶保温1小时。用于表征卵巢间皮细胞的标记和例示抗体是来自Sigma化学公司的CK19和抗细胞角蛋白抗体克隆4.62(图3A)、来自Sigma化学公司的CK13和CK16和抗体克隆8.12(图3B)、来自Sigma化学公司的CK10、CK11、和CK18和抗体克隆8.13(图3C),来自Sigma化学公司的波形蛋白和抗波形蛋白单克隆抗体克隆13.2(图3D),和抗卵巢上皮单克隆抗体5C8(图3E)。单克隆抗体5C8是使用卵巢间皮细胞作为免疫原而制备的。

实施例3: 为了生成针对卵巢间皮细胞的单克隆抗体而提供免疫原的来源的方法

正如本文公开的分离和培养卵巢间皮细胞,然后作为免疫原用于生成针对卵巢间皮细胞的一组单克隆抗体。每只小鼠通过一次注射大约 1×10^6 个卵巢间皮细胞而每周免疫一次。在每只小鼠的足垫进行免疫。5次注射后,由小鼠取血,检查卵巢间皮细胞的滴度。当小鼠中卵巢间皮细胞的滴度超过1:1000(卵巢细胞:总细胞)时,处死小鼠,并收获淋巴结。由淋巴结制备淋巴细胞,并融合骨髓瘤细胞系以生成杂交瘤。通过流式细胞术(荧光激活细胞分选机或FACS)和免疫组织化学对杂交瘤筛选特异结合卵巢间皮细胞的单克隆抗体。通过重复有限稀释来获得克隆杂交瘤细胞系。杂交瘤克隆5C8是结合卵巢间皮细胞的单克隆抗体克隆。图2显示了免疫组织化学分析的结果,其中单克隆抗体克隆5C8可特异识别人胎卵巢中的卵巢间皮细胞。

实施例4: 卵巢间皮细胞用于生成人卵巢组织模型的用途

为了移植到异源受体中或在异源受体中生成人卵巢组织模型而制备组织移植重组体。为了制备组织移植重组体,将由传代3次后的单层培养物收获的卵巢间皮细胞置于大鼠尿殖窦间充组织的顶端。将移植

巢的组织块直接置于经层粘连蛋白新鲜包被且装有10ml本文所述优选营养培养基的T75烧瓶中。可以进行进一步解离,即将卵巢用胶原酶-分散酶(0.5%)于37℃消化30分钟,但是该步骤将降低卵巢间皮细胞的回收率。在添加10 μg/ml 胰岛素、10 μg/ml 转铁蛋白、5 μg/ml α-生育酚、10nM 重组人heregulin β 1、50ng/ml 表皮生长因子、5 μg/ml 抑酶肽、和2% (体积比) BSA的F12/DMEM中于标准保温条件培养细胞。在一周内,细胞由外植体迁移出来,并增殖形成汇合的细胞培养物。该阶段的培养物包括卵巢间皮细胞和间充质细胞二者。间充质细胞迁移至整个烧瓶,但卵巢间皮细胞保持在组织外植体附近(图1A)。为了富集卵巢间皮细胞,通过用0.1%胶原酶-分散酶保温30分钟,将培养物从培养瓶上脱壁。该处理将间充质细胞解离成单个细胞,但卵巢间皮细胞仍然成簇。然后通过离心穿过BSA梯度(1%-3% BSA溶于F12/DMEM)5分钟来分离卵巢间皮细胞。吸去包含大多数间充质细胞的上清液,而剩余的细胞沉淀包含大多数卵巢间皮细胞。将卵巢间皮细胞重悬于培养基,并以1:5(1份细胞悬浮液:5份总悬浮液体积)的稀释倍数进行涂布。培养基是添加10 μg/ml 胰岛素、10 μg/ml 转铁蛋白、5 μg/ml α-生育酚、10nM 重组人heregulin β 1、50ng/ml 表皮生长因子、5 μg/ml 抑酶肽、和0.5% (体积比) BSA的F12/DMEM。细胞在悬浮液中生长成簇(图1B)。以这种方式将细胞增殖大约4-5代。当培养基中存在血清或平板经过层粘连蛋白的包被时,在悬浮培养中生长的细胞能够附着于平板侧壁,并生长成卵巢间皮细胞单层(图1C)。当卵巢间皮细胞保持彼此接触时,单层培养物传代良好。

实施例2: 卵巢间皮细胞系的表征

由悬浮培养物收获卵巢间皮细胞。为了直接将成簇的细胞染色,将细胞簇包埋在最佳切割温度(OCT)化合物中,并在干冰上冷冻。由OCT块上切下冷冻切片(5-10 μm厚),在盖玻片上解冻,并用3%低聚甲醛固定1小时。通过将来自悬浮培养物的细胞簇在存在2% BSA时涂布在分室载玻片上来制备卵巢间皮细胞的单层培养物。将单层细胞培

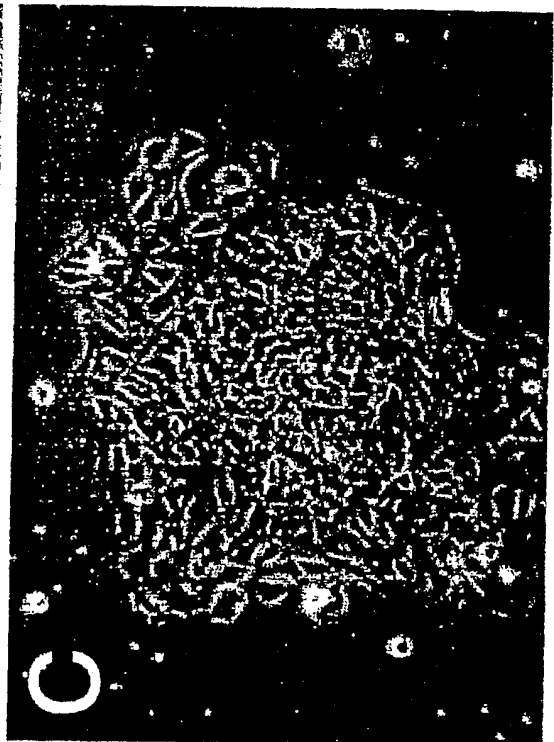
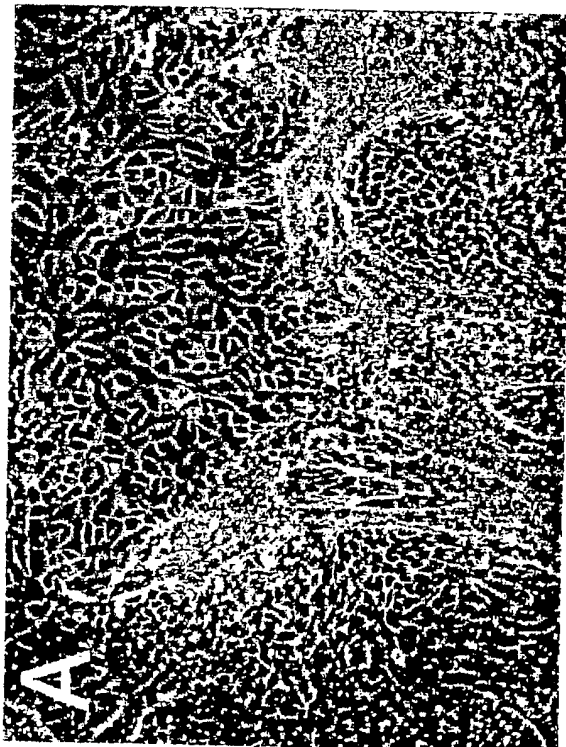
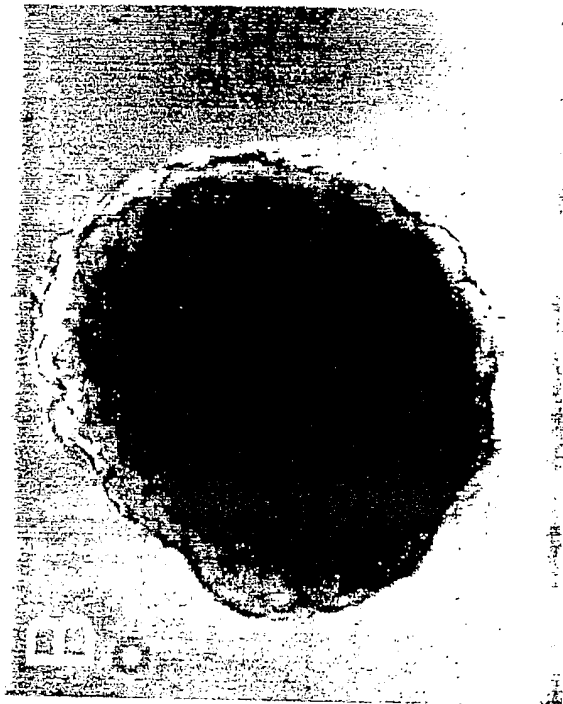


图1

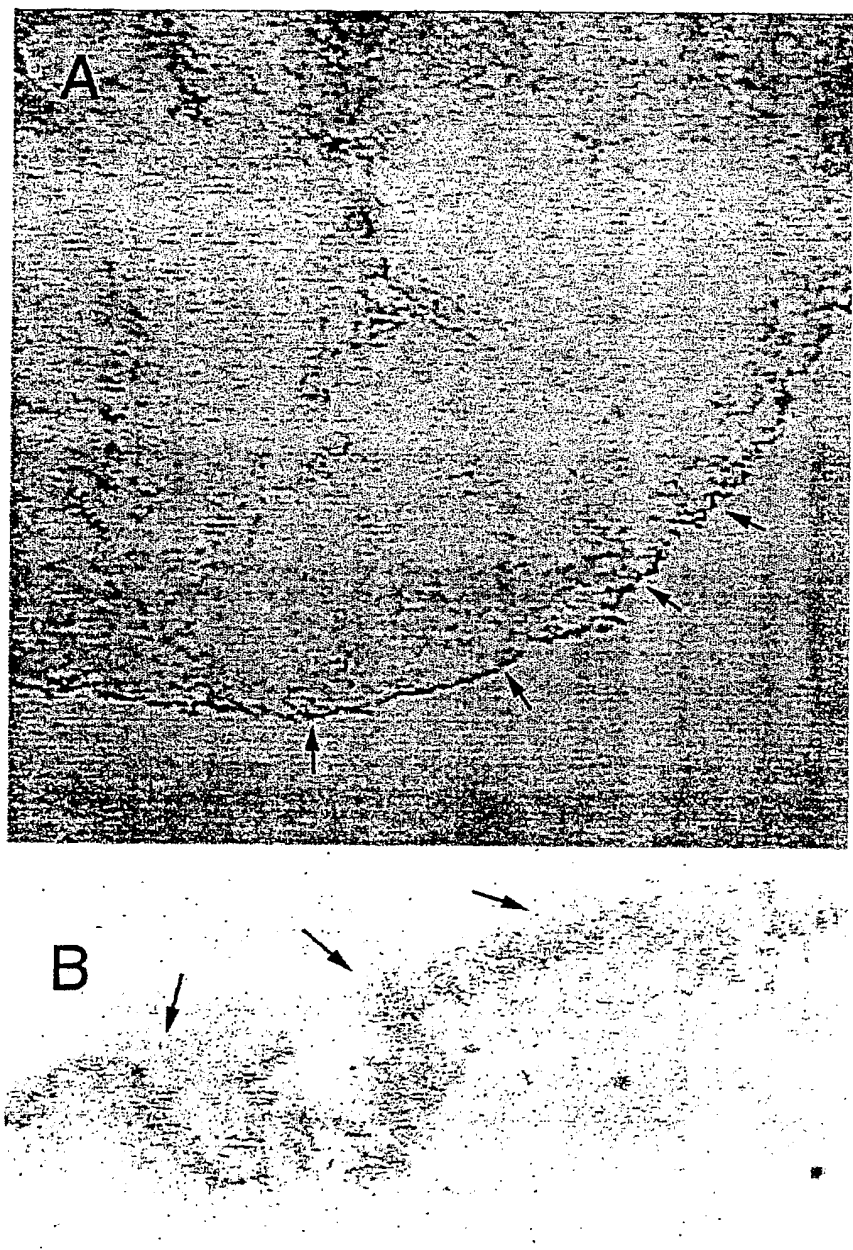


图 2

重组体在琼脂平板上培养大约24小时。然后将移植重组体植入裸鼠肾膜下。在切除移植重组体组织并进行组织学分析前，使植入物生长大约2个月。结果显示卵巢间皮细胞形成囊状结构（图4A、4B、和4C）。在有些囊中，卵巢表面上皮细胞的上皮细胞衬是一层薄薄的、稀疏的、松散附着的细胞（图4A、4B、和4C）。

实施例5：卵巢表面上皮细胞在生物测定法中的用途

使用本发明的卵巢间皮细胞作为免疫原，生成了对卵巢间皮细胞特异的单克隆抗体，诸如克隆 5C8。将这些抗体用于对来自卵巢癌女性患者的卵巢组织冷冻切片染色。单克隆抗体 5C8 在卵巢癌患者中显示对癌性上皮细胞的强烈染色（图 5）。因此，单克隆抗体（诸如克隆 5C8）的功用可以延伸至临床环境下的诊断目的。

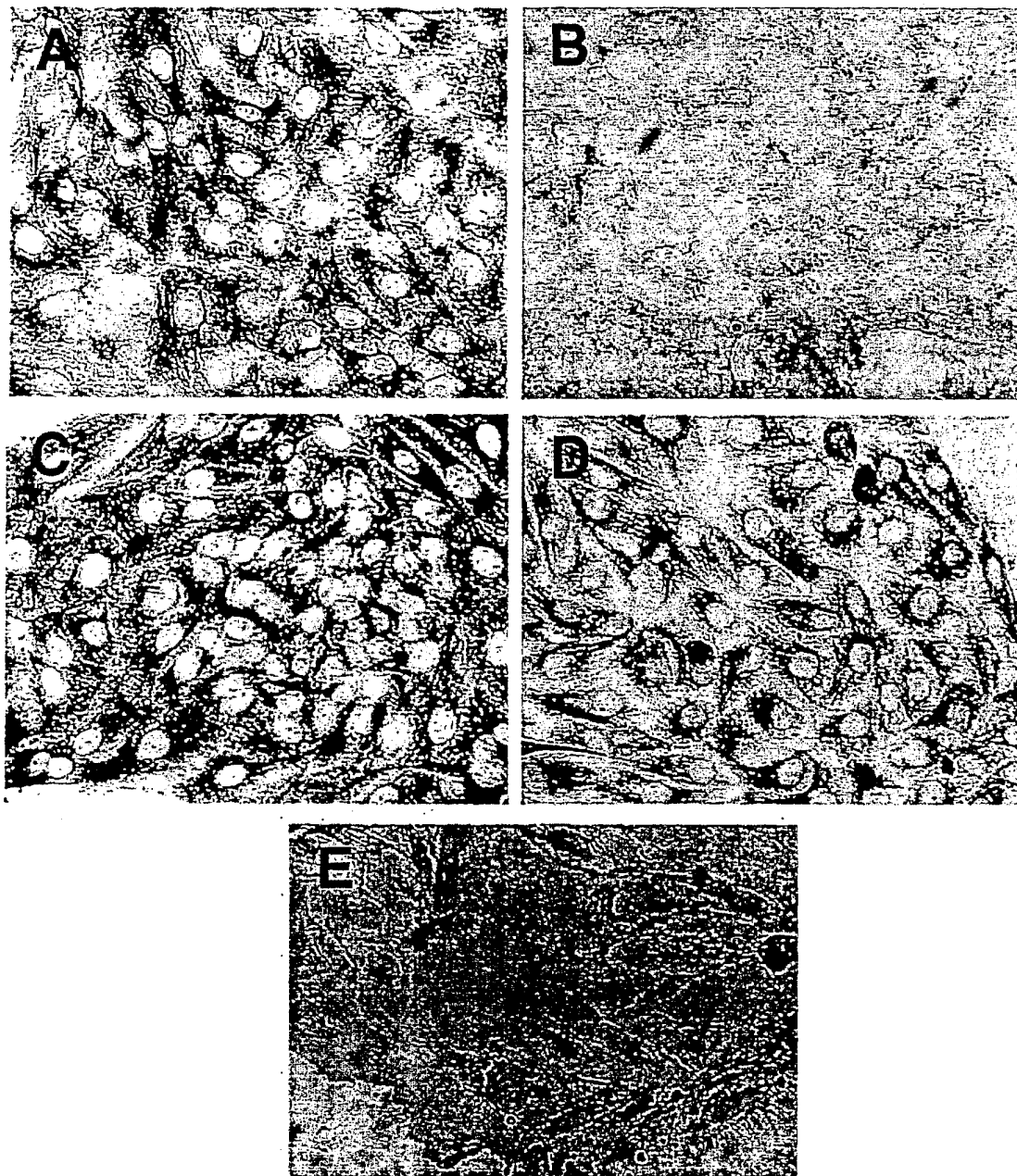


图 3

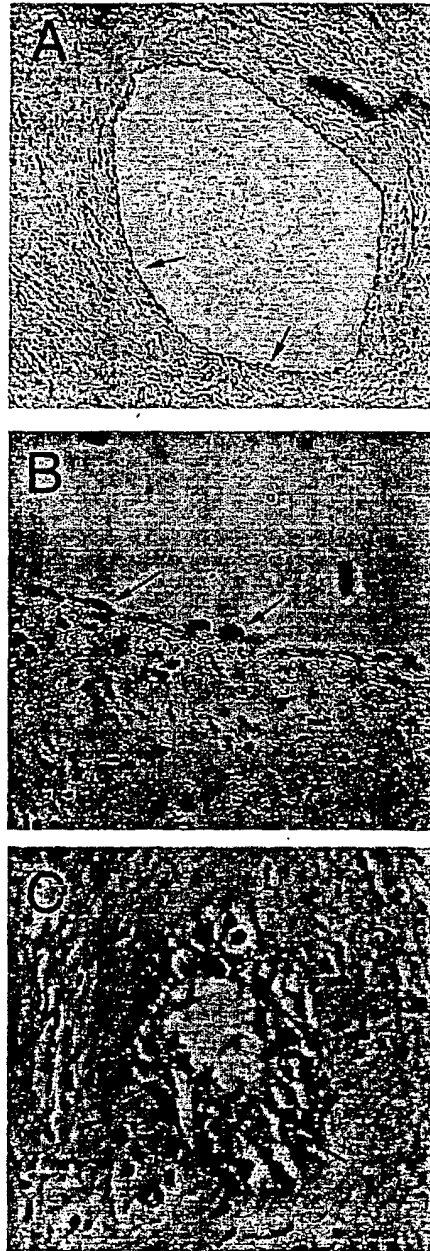


图 4

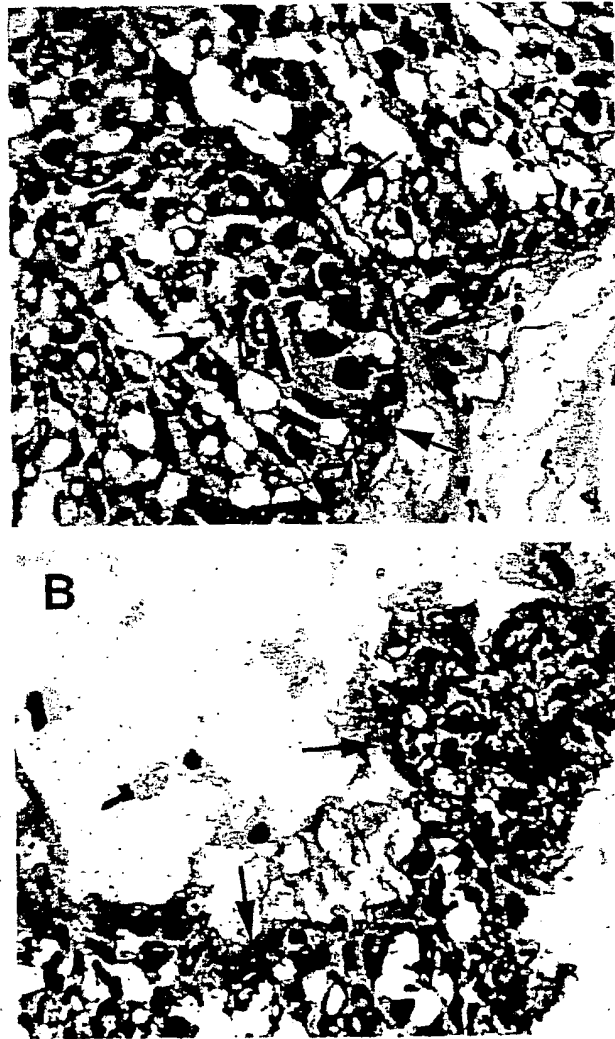


图 5