

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

C12N 5/08 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

专利号 ZL 03807128.2

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100347293C

[22] 申请日 2003.3.28 [21] 申请号 03807128.2

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 28 [33] DE [31] 10214095.2

[32] 2003.2.25 [33] EP [31] PCT/EP03/02121

[32] 2003. 2. 25 [33] US [31] 10/372,657

[86] 国际申请 PCT/EP2003/003279 2003.3.28

[87] 国际公布 WO2003/083092 英 2003.10.9

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.27

[73] 专利权人 布拉斯蒂康生物科技有限责任公司
地址 德国凯尔

[72] 发明人 B·K·F·克雷默

F·费恩德里希 M·鲁恩克

[56] 参考文献

WO0214469A2 2002.2.21

CN1081715A 1994.2.9

CN1192751A 1998.9.9

US20020028510A1 2002.3.7

WO9853048A1 1998.11.26

审查员 辜学英

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭广迅 王景朝

权利要求书 4 页 说明书 39 页 附图 15 页

[54] 发明名称

来源于单核细胞的去分化的可程序化干细胞
及其制备和应用

[57] 摘要

本发明涉及从人单核细胞制备成体去分化可程序化干细胞,所述制备通过将单核细胞在含有 M-CSF 和 IL-3 的培养基中培养而进行。本发明进一步涉及含有去分化可程序化干细胞的药物组合物以及这些干细胞在靶细胞和靶组织制备中的用途。

1. 制备来源于人单核细胞的去分化的可程序化干细胞的方法，其特征在于

a) 在含有细胞生长因子 M-CSF 的适宜的培养基中增殖从分离的人血液得到的单核细胞；

b) 同时或在步骤 a) 之后在含有 IL-3 的培养基中培养单核细胞；和

c) 从培养基中分离得到人成体的去分化的可程序化干细胞。

2. 权利要求 1 所述的方法，其特征在于在步骤 b) 中向培养基中再加入巯基化合物。

3. 权利要求 2 所述方法，其特征在于使用的巯基化合物中至少有一个碳基团与硫键合，和烃基被一个或多个其它的官能团取代。

4. 权利要求 2 或 3 所述方法，其特征在于巯基化合物是 2-巯基乙醇或二甲基亚砷。

5. 权利要求 1-3 中任一项所述方法，其特征在于在步骤 b) 之后和步骤 c) 之前，使细胞与一种生物学上可接受的有机溶剂接触。

6. 权利要求 5 所述的方法，其特征在于生物学上可接受的有机溶剂是具有 1-4 个碳原子的醇。

7. 权利要求 6 所述的方法，其特征在于所述醇为乙醇。

8. 权利要求 5 所述的方法，其特征在于使细胞与生物学上可接受的有机溶剂的蒸汽相接触。

9. 权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其特征在于在步骤 c) 之后，将细胞悬浮于适宜的细胞培养基中。

10. 权利要求 9 所述的方法，其特征在于所述培养基为 RPMI 或 DMEM。

11. 权利要求 9 所述的方法，其特征在于培养基中包含一种细胞因子或 LIF。

12. 权利要求 9 所述的方法，其特征在于将细胞悬浮于液体培养基中并随后深度冷冻。

13. 权利要求 12 所述的方法，其特征在于培养基为细胞培养基。

14. 权利要求 1 所述的方法，其特征在于将步骤 c) 中获得的细胞配制成药物组合物。

15. 权利要求 14 所述药物组合物在体外制备靶细胞和靶组织中的用途。

16. 权利要求 15 所述的用途, 其特征在于:

- a) 压碎包含期望的靶细胞的组织;
- b) 从压碎的组织中获得靶细胞和/或其碎片;
- c) 在适宜的培养基中培养靶细胞和/或其碎片;
- d) 在培养过程中和之后收集培养基上清液, 作为靶细胞条件化培养基; 和
- e) 使干细胞在靶细胞条件化培养基中生长以使干细胞再程序化或分化为期望的靶细胞。

17. 权利要求 15 或 16 所述的用途, 用于制备脂肪细胞、神经元和神经胶质细胞、内皮细胞、角质细胞、肝细胞或胰岛细胞。

18. 制备来源于人单核细胞的转基因修饰的去分化的可程序化干细胞的方法, 其特征在于根据权利要求 1 至 13 中任一项所述方法制备的细胞被一个或多个基因转染。

19. 组合物, 其中含有在适宜的培养基中的权利要求 18 所述去分化的可程序化干细胞。

20. 权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞在制备治疗肝硬变的药物组合物中的用途。

21. 权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞在制备治疗胰机能不全的药物组合物中的用途。

22. 权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞在制备治疗急性或慢性肾功能衰竭的药物组合物中的用途。

23. 权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞在制备治疗激素功能低下的药物组合物中的用途。

24. 权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞在制备治疗心肌梗塞的药物组合物中的用途。

25. 权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞用于制备治疗肺栓塞的药物组合物中的用途。

26. 权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞用于制备治疗中风的药物组合物中的用途。

27. 权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞

用于制备治疗皮肤损伤的药物组合物中的用途。

28. 权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞用于制备体内生成靶细胞和靶组织的药物组合物中的用途。

29. 由权利要求 1-13 或 18 中任一项所述干细胞再次程序化获得的分化的、分离的靶体组织，其特征在于膜联表面抗原 CD14，其中排除了人单核细胞。

30. 权利要求 29 所述靶体组织，其含有选自脂肪细胞、神经元和神经胶质细胞、内皮细胞、角质细胞、肝细胞和胰岛细胞的细胞。

31. 权利要求 29 或 30 所述靶体组织，其特征在于它们被一个或多个基因转染。

32. 来自权利要求 29-31 中任一项所述的靶体组织的细胞。

33. 权利要求 32 的细胞，其选自脂肪细胞、神经元和神经胶质细胞、内皮细胞、角质细胞、肝细胞和胰岛细胞。

34. 权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞或权利要求 29-31 中任一项所述靶体组织和/或权利要求 32 或 33 的细胞包被的可移植物。

35. 权利要求 34 所述的可移植物，其特征在于所述可移植物是假器官。

36. 权利要求 35 所述的可移植物，其特征在于所述假器官选自心脏瓣膜、血管假器官、骨和关节假器官。

37. 可移植物，其特征在于所述可移植物是包含权利要求 1-13 或 18 中任一项所述去分化的可程序化干细胞或权利要求 32 或 33 所述细胞的人工的和/或生物的载体材料。

38. 权利要求 37 所述的可移植物，其特征在于所述载体材料是介入人体的囊或室。

39. 权利要求 34-37 中任一项所述可移植物，其特征在于所述可移植物都是含有权利要求 32 或 33 所述细胞的半透性孔口室系统。

40. 包含权利要求 33 所述的胰岛细胞的权利要求 38 所述囊或室在制备药物构建体中的用途，该药物构建体用作提供胰岛素的人工胰岛细胞孔口室。

41. 包含权利要求 33 所述的脂肪细胞的权利要求 38 所述囊或室在制备用于手术后乳房重塑和整形和/或美容矫正的药物构建体中的

用途，该药物构建体中包含填充有脂肪细胞的人工聚合物。

42. 权利要求 39 所述的半透性孔口室系统在制备用于体内治疗内分泌、代谢或凝血疾病的药物构建体中的用途。

来源于单核细胞的去分化的可程序化干细胞 及其制备和应用

本发明涉及由人单核细胞生成的成熟的去分化的可程序化干细胞及其制备, 以及它们在制备体细胞和组织产品中的用途。根据本发明特别优选的实施方案, 所述细胞为自体的人干细胞, 即单核细胞来源的细胞来自欲接受干细胞和/或该干细胞生成的体细胞治疗的病人。在现有技术中, 术语“干细胞”是指具有(a)自我更新能力和(b)由于其不对称分裂能力而形成至少一种和通常是多种特化细胞类型的能力的细胞(参见 Donovan, P. J Gearhart, J Nature 414: 92-97 (2001))。术语“多能性的”是指干细胞基本上能被分化为人类和动物体的所有可能的细胞类型。迄今为止, 这样的干细胞仅仅可以从胚胎组织或胚胎癌(睾丸肿瘤)中获得(参见 Donovan, P. J. Gearhart, J 在上述引文中)。胚胎干细胞的应用已经成为公众广泛讨论的话题, 尤其是在德国, 这被认为是非常严重的问题。除了胚胎干细胞涉及的伦理和法律问题, 这种细胞的医疗应用也遇到许多困难。显然, 来自于供体机体的胚胎干细胞相对于将要接受由这些胚胎干细胞生成的分化了的细胞或组织(此后称之为靶体细胞或靶组织)的受体而言是异源的。因此可以预见这类靶细胞将在未来受体的体内引发排斥反应形式的速发型免疫反应。

干细胞可以从成人的不同组织中分离到, 即从分化的个体中分离到。这些干细胞在现有技术中称之为“多能性成体干细胞”。它们在体内组织再生和稳态(homeostasis)中发挥作用。胚胎多能性干细胞与成体多能性干细胞之间的本质区别在于从各自细胞能得到的分化的组织的数目。推测起来, 这是由于多能性干细胞来源于精细胞或者能够产生精子的细胞, 而成体多能性干细胞来源于成人个体中不能产生精子的身体或体细胞。

然而, 有关获得和使用成体干细胞的实际问题还在于这些细胞的稀缺性。因而, 在骨髓中仅含有比例为 1: 10,000 的干细胞, 外周血液中为 1: 250,000, 肝脏中的比例为 1: 100,000。因此对于患者而言获得干细胞是十分昂贵和困难的。另外, 迄今为止以合理的费

用获得临床治疗所需的大量这类细胞的生产几乎是不可能的。

而与此形成鲜明对比的是，以“组织工程”或细胞治疗的方式对受损组织进行治疗的可能性却在不断提高，在“组织工程”或细胞治疗构架中，将对皮肤、肌肉、心肌、肝脏、胰岛、神经、神经元、骨骼、软骨、内皮和脂肪细胞等进行替换。

与此相关，西方世界人口年龄和疾病状况的可预见的发展决定了下一个十年是西欧，包括美国和加拿大的人口健康和医疗发展的重大转折点。仅仅在德意志联邦共和国，人口统计学进展显示，截至2015年，45-64岁年龄段的人口增长21%，超过65岁的年龄段的人口增长26%。这必然将导致病人结构和需要医疗的疾病谱产生变化。可以预见，心循环系统疾病（高血压、心肌梗塞）、源于动脉硬化和代谢疾病的血管疾病、代谢疾病如糖尿病、肝代谢疾病、肾病、以及由年龄相关的退化引起的骨骼系统疾病、神经元和神经胶质细胞损失引起的大脑退化疾病将增加并需要更新的治疗概念。

基于上述情况有关的专家迅速努力开展国内和国际间的研究和开发，去获得能够程序化生成组织（肝脏、骨骼、软骨、肌肉、皮肤等）特有的分化细胞的干细胞。

因此，本发明所要解决的问题是制备可用的成体干细胞，该干细胞的生成不产生伦理和/或法律问题，该干细胞能够以所需数量、合理的生产成本迅速按计划用于治疗用途，且该干细胞用于“细胞治疗”时不会在病人体内产生细胞排斥和诱发肿瘤尤其是恶性肿瘤形式的副作用，或者不产生值得注意的副作用。

根据本发明，该问题是通过制备来源于人单核细胞的去分化的可程序化细胞来解决的，鉴于本发明的目的，此后它被称之为“干细胞”。术语“去分化”是所属领域技术人员所熟知的，参见Weissman I. L Cell 100: 157-168, 图4, (2000)。它是指一种成体的，已经特化的(分化的)体细胞退化为干细胞，后者反过来又能够转化(程序化)成多种细胞类型的细胞。令人惊讶的是，已经证明本发明所述的方法能够导致单核细胞去分化。用这种方法制备的干细胞能够被转化(程序化)为大量不同的靶细胞/靶组织，参见实施例。本发明所述的干细胞除了表达分化的单核细胞的特异性表面抗原CD14之外，还能表达至少一种，优选两种或三种典型的多能性标记CD90、

CD117、CD123 和 CD135。在特别优选的方式中，本发明制备的干细胞表达表面抗原 CD14 和四种多能性标记 CD90、CD117、CD123 和 CD135，参见实施例 2、表 1。优选本发明的干细胞表达膜联单核细胞特异性的表面抗原 CD14，以及至少一种选自 CD117、CD123 和 CD135 的多能性标记。更优选本发明的干细胞带有抗原 CD14 与至少多能性标记 CD123 和/或 CD135 的组合。低于 3%，优选低于 1%的本发明所述的干细胞表达抗原 CD34。最优选本发明的干细胞不表达抗原 CD34。通过上述方法，首次获得了能够在短时间内再次程序化成优选的自体组织的成体干细胞。

本发明的干细胞的产生对患者是完全无害的，且在自体应用情形中与自体血液回输相类似。在抽血后 10 至 14 天内就可以以合理的成本得到通常的治疗所需要（见上文）数量的干细胞（ 10^8 至 10^9 的细胞）。另外如果作为自体应用，由于细胞和受体优选相同的遗传性，用于治疗的产品不会引起任何细胞排斥形式的免疫问题。

动物实验和培养证明，本发明所述的干细胞在引发恶性肿瘤方面是安全的，估计产生这一结果的原因是本发明所述干细胞是单核细胞来源的。

本发明所述来源于人单核细胞的去分化的可程序化干细胞的制备过程包括以下基本步骤：

- (a) 从人血中分离单核细胞；
- (b) 在装有包含巨噬细胞集落刺激因子（此后简称为 M-CSF）的细胞培养基的合适的培养容器中增殖单核细胞；和
- (c) 在白细胞介素-3（IL-3）的存在下培养单核细胞；和
- (d) 从培养基中分离得到人去分化的可程序化的干细胞。

在该过程特别优选的实施方案中，M-CSF 和 IL-3 是在步骤 (b) 中同时加入细胞培养基中的。

然而为了引起单核细胞增殖，最初在步骤 (b) 中只向细胞培养基中加入 M-CSF，随后再向细胞培养基中加入 IL-3 也是可能的。

最后，步骤 (b) 的过程也可以通过以下方式进行：单核细胞最初在仅包含 M-CSF 的细胞培养基中增殖，然后将培养基与细胞分离，再使用包含 IL-3 的另一种细胞培养基。

本发明优选的实施方案是在步骤 (b) 中，培养基与贴附于培养容

器底部的细胞分离，使人去分化的可程序化干细胞通过脱离底面并分离细胞而获得。

本发明优选的实施方案是细胞在含硫化合物的存在下进一步培养。这种培养可以是在如上所述培养步骤(b)之后独立步骤中的培养，也可以是通过在步骤(b)中向培养基中进一步加入含硫化合物而进行，其优选在培养的开始阶段加入。

意想不到的是本发明所述方法导致了单核细胞去分化，其中去分化形成的成体干细胞除了表达去分化的单核细胞特有的表面抗原CD14之外，还表达了至少一种或多种，优选所有的多能性标记CD90、CD117、CD123和CD135（参见表1）。优选本发明的干细胞表达膜联单核细胞特异性表面抗原CD14和至少一种选自CD117、CD123和CD135的多能性标记。更优选本发明的干细胞带有抗原CD14与至少多能性标记CD123和/或CD135的组合。低于3%。优选低于1%的本发明所述的干细胞表达抗原CD34。最优选本发明的干细胞不表达抗原CD34。各种标记（表面抗原）的表达可以通过商业上可获得的对各种要检测的抗原特异性的抗体，应用标准免疫测定方法去检验，参见实施例2。

在增殖和去分化过程中，由于细胞贴附于各个培养容器底部，必须将细胞在步骤(b)从培养基中分离出来，使其在去分化结束后从容器底部剥离。本发明所述优选的实施方案是贴附于底部的细胞脱离之前将细胞培养基的上清液弃去，随后贴附的细胞优选新鲜培养基清洗。清洗后再向贴附于底部的细胞加入新鲜培养基，然后进行将细胞从底部分离的步骤（参见实施例13）。

优选的实施方案是在步骤(c)的最后、步骤(d)之前，将细胞与生物学上可良好耐受的有机溶剂接触。生物学上可良好耐受的有机溶剂可以是含1-4个碳原子的醇，优选使用乙醇。

进一步的实施方案是在步骤(c)的最后、步骤(d)之前，细胞与生物学上可良好耐受的有机溶剂的蒸汽相接触。

细胞剥离也可以采用机械方法，但是优选使用例如胰蛋白酶进行的酶解剥离的方法。

这种方法获得去分化的可程序性干细胞在培养基中自由流动，能够直接进入再次程序化的过程，或者在培养基中保持几天；后一种

情况中，为了避免程序化能力的过早损失，优选向培养基中加入细胞因子或 LIF（白血病抑制因子）（参见 Donovan, P5 Gearhart, J 在上述引文中，第 94 页）。最后为了贮存的目的可将细胞深度冷冻，而不丧失可程序化性。

本发明所述的干细胞不同于迄今为止已知的胚胎来源的多能性干细胞和来源于不同组织的已知的成体干细胞，其差别在于除了带有膜联单核细胞特异性表面抗原 CD14 之外，它们表面上还带有至少一种选自 CD90、CD117、CD123 和 CD135 的多能性标记。优选本发明的干细胞带有膜联单核细胞特异性表面抗原 CD14 和至少一种选自 CD117、CD123 和 CD135 的多能性标记。更优选本发明的干细胞带有抗原 CD14 与至少多能性标记 CD123 和/或 CD135 的组合。低于 3%，优选低于 1%的本发明所述的干细胞表达抗原 CD34。最优选本发明的干细胞不表达抗原 CD34。

应用本发明所述方法生产的干细胞可以被重新程序化生成任何体细胞。干细胞的重新程序化的方法是现有技术中已知的，参见例如 Weissman I. L Science 287: 1442-1446 (2000)和 Insight Review Articles Nature 414: 92-131 (2001)，以及手册“Methods of Tissue Engineering”，Eds. Atala, A Lanza, R. P Academic Press, ISBN 0-12-436636-8; Library of Congress Catalog Card No. 200188747。

此外本发明所述的干细胞重新程序化获得的分化的分离的靶体细胞和/或靶组织都带有单核细胞的膜联 CD14 分化标记。另外，低于 3%、优选低于 1%的本发明所述的这些靶体细胞和/或靶组织表达抗原 CD34。最优选这些细胞或组织不表达抗原 CD34。如实施例 11 所示，来源于本发明所述干细胞的肝细胞表达单核细胞特有的表面标记 CD14 的同时也生成了肝细胞特有的白蛋白。来源于本发明所述干细胞的肝细胞因此而区别于天然的肝细胞。利用同样的方法，在来源于本发明所述干细胞的胰岛素产生性细胞上也检测到膜联表面标记 CD14（实施例 9）。

本发明的一个具体实施方案是去分化的可程序化干细胞用于体外制备靶细胞和靶组织（参见实施例）。因此，通过本发明所述的干细胞分化（重新程序化）获得的携带膜联表面抗原 CD14 的分化的、

分离的组织细胞也是本发明的主题。

在用于各种靶细胞和/或其碎片培养的（参见实施例 6 至 8）、包含培养基上清液的培养基中培养干细胞，使本发明所述的干细胞优选地、简单可靠地在体外分化成期望的靶细胞，例如脂肪细胞（参见实施例 6）、神经元和神经胶质细胞（参见实施例 3）、内皮细胞（参见实施例 5）、角质细胞（参见实施例 8）、肝细胞（参见实施例 7）和胰岛细胞（胰岛，参见实施例 9）。此后该上清液称之为靶细胞条件化培养基。

为了本发明所述的去分化干细胞的分化（重新程序化）可以按照如下步骤进行：

- a) 粉碎包含或由期望的靶细胞组成的组织；
- b) 得到组织细胞（靶细胞）和/或其碎片；
- c) 靶细胞和/或其碎片在适宜的的培养基中培养；
- d) 在培养过程中或培养之后收集培养基上清液，作为靶细胞条件化培养基；和
- e) 为了去分化干细胞重新程序化分化成期望的靶细胞或靶组织，将干细胞在靶细胞条件化培养基中培养。

可使用标准细胞培养基作为培养基（参见实施例）。培养基优选包含生长因子，如表皮生长因子。

靶细胞和/或其碎片（“细胞沉淀”）的培养需要经过 5-15 天，优选 10 天。上清液即靶细胞条件化培养基优选每 2-4 天后移出并用新鲜的培养基替换。得到的上清液分别在无菌条件下过滤，收集后在约 -20℃ 下贮存，或者直接用于干细胞的程序化。如上所述，通过在各种靶细胞条件化培养基中培养干细胞以使干细胞程序化为期望的靶细胞（参见实施例）。生长培养基优选另外还含有一种靶细胞特异性生长因子，例如“肝细胞生长因子”或“角质细胞生长因子”（参见实施例）。

本发明的一个具体实施方案是本发明所述的去分化的程序化干细胞本身用于制备适合体内生成靶细胞和靶组织的药物组合物。

这种药物制剂可以包含悬浮于生理上良好耐受的介质中的本发明所述干细胞。适合的介质例如 PBS（磷酸盐缓冲液）或含有 20% 的人白蛋白溶液的生理盐水等等。

这些药物制剂中包含本发明所述的有活力的去分化的可程序化干细胞，它们的表面带有 CD14 表面标记和至少一种以上的多能性干细胞标记 CD90、CD117、CD123 和/或 CD135，其相对于制剂中存在的细胞总数的百分含量为 1、2、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50%、优选为 60 或 70%，特别优选为 80 或 90%和最优选为 100%的，这些药物制剂任选进一步含有药学上可良好耐受的佐剂和/或载体物质。

干细胞制剂包含的本发明所述的有活力的、去分化的、可程序化干细胞的表面带有 CD14 表面标记和至少一种以上的多能性干细胞标记 CD90、CD117、CD123 和/或 CD135，其相对于制剂中存在的细胞总数的百分含量为 1、2、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58 或 59%、优选至少 60%；例如 PBS 或 RPMI 等细胞良好耐受的细胞培养或转移培养基的细胞悬浮液，或者含有 50%人白蛋白溶液和 10%DMSO 的 RPMI 的合适的贮存培养基中深度冷冻的细胞制剂都是优选的。

有活力细胞的数目和上述组合物中它们的比例可以通过使用“台盼蓝染料排除技术”光学检测，因为使用这种染料能够用光学检测区分无活力细胞和有活力细胞。

通常，如果在存在足够数量的功能性干细胞的前提下，在药物制剂中存在一些不能达到本发明所述的去分化可程序化细胞的标准细胞，不会影响临床治疗。然而也可能根据该制剂中含有的本发明所述的去分化细胞特有的表面标记，利用现有技术中已知方法中的手段去除非去分化的细胞，以获得基本上纯的包含期望细胞的制剂。适合的方法例如“免疫磁珠分选”，参见 Romani 等人，J. Immunol. Methods 196: 137-151 (1996)。

通过直接接触特定细胞类型的细胞群，干细胞能够进一步自动地在体内分化形成该类型的细胞。利用能够再分化的细胞制备组织的方法（“组织工程”）是现有技术中已知的。例如，Wang, X. 等人

(“Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells” Am. J. Pathol. 158 (2): 571-579 (2001)) 已经证明在 FAH- (富马酰乙酰乙酸水解酶) 缺陷小鼠中, 某些小鼠体内成体胰脏细胞能够被转化为肝细胞中, 由此能够完全弥补这些动物的代谢功能的损失。进一步的例子为 Lagasse 等人, “Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo”, Nature Medicine, 6 (11): 1229-1234 (2000) 的实验。作者指出骨髓中的造血干细胞在转移入 FAH-缺陷的小鼠体内后能够转化成肝细胞从而弥补代谢功能的损失; 也可以参见 Grompe M. 的综述 “Therapeutic Liver Repopulation for the Treatment of Metabolic Liver Diseases” Hum. Cell, 12: 171-180 (1999)。

特别优选的本发明所述去分化的干细胞在体内分化的应用形式是注射、输液或将干细胞植入体内特定的细胞群中, 通过使干细胞直接与细胞群接触而使干细胞在其中分化成特定细胞类型。注射或输液时细胞可以在 PBS (磷酸盐缓冲液) 中施用。

相关的适应症优选的例子有: 肝硬变、胰机能不全、急性或慢性肾衰、激素功能低下、心肌梗塞、肺栓塞、中风和皮肤损伤。

因此本发明优选的实施方案是去分化、可程序化干细胞在制备治疗肝硬变、胰机能不全、急性或慢性肾衰、激素功能低下、心肌梗塞、肺栓塞、中风和皮肤损伤的药物组合物的应用。

由本发明所述的干细胞获得的靶细胞的治疗用途涉及的许多概念都是已知的 (参见 Science 287: 1442-1446 (2000) 和 Nature 414: 92-131 (2001))。

更优选的使用涉及注射本发明所述的去分化的干细胞入腹膜, 由于其周围细胞的影响, 它们可以就地分化为腹膜细胞。当肾机能不全的病人需要腹膜透析时, 这些细胞能够通过半透膜取代肾功能, 将依赖肾排出的废物释放到腹膜中经透析液将其排出。

因此通过干细胞再程序化获得的特征在于膜联 CD14 抗原的分化的、分离的靶体细胞和/或靶组织也是本发明的目的, 其中排除了人单核细胞。这些靶体细胞和/或靶组织优选含有脂肪细胞、神经元和神经胶质细胞、内皮细胞、角质细胞、肝细胞和胰岛细胞。

然而，细胞也可以直接引入将要重建的器官中。这种引入通过被相应的分化的细胞或能够分化的细胞包裹的基质构建体来完成。基质构建体通常是生物可降解的，当新引入的细胞和已有细胞长在一起时，其可以排出体外。从这个观点出发，例如细胞，优选是胰岛细胞、肝细胞、脂肪细胞、皮肤细胞、肌细胞、心肌细胞、神经细胞、骨细胞、内分泌细胞等形式的自体移植物开始被考虑用于例如器官部分手术切除后的重建，用于如创伤后的修复，或用于如在器官功能缺失或不全时的支持用途。

本发明所述的干细胞和由其获得的靶细胞通常被用于包裹可移植物以提高生物相容性。因此被去分化的可程序化干细胞或靶体细胞和/或靶组织所包裹的可移植物也是本发明的目的。本发明所述的实施方案是这些可移植材料是假器官。在特别优选的实施方案中，假器官是心脏瓣膜、人工血管、人工骨骼和关节。

可移植物也可以是包含在分化的可程序化干细胞或靶细胞的人工和/或生物载体材料。此时载体材料可以是引入人体的囊或室。

在一种本发明的实施方案中，包含如胰岛细胞的本发明所述分化的体细胞的袋用于制备作为提供胰岛素的人工胰岛细胞孔口室（port chamber）的药物构建体。

在一种本发明的进一步实施方案中，包含本发明所述分化的体细胞如脂肪细胞的囊或室用于制备一种填充了脂肪细胞的人造聚合物，它可作为手术后乳房构建以及在整形和/或美容矫正时的进一步适应症的药物构建体。

此外，包含多种不同来源的内分泌细胞的半透性孔口室系统能够用于体内治疗内分泌、代谢或凝血功能紊乱。所述内分泌细胞例如产生甲状腺素、类固醇、ADH、醛固酮、褪黑素、5-羟色胺、肾上腺素、去甲肾上腺素、TSH、LH、FSH、瘦素、缩胆囊素、胃泌素、胰岛素、胰高血糖素或凝血因子的细胞。

因此包含分化的分离的靶体细胞的半透性孔口室系统的可移植物也是本发明的目的。在本发明不同的实施方案中，这些半透性室系统用于制备体内治疗内分泌、代谢或凝血紊乱的药物构建体。

由本发明所述的干细胞得到的靶细胞能够另外用作体外生物反应器的细胞培养物，进行例如解毒的反应。这种形式的应用特别适

合急性状况，如急性肝功能衰竭时作为肝细胞生物反应器。

上述构建体的制备及其在相关治疗过程中的实施已经在现有技术中多次记载。例如 Lalan, S 等人的综述 “Tissue engineering and its potential impact on surgery” World J. Surg. 25: 1458-1466 (2001); Nasser, B. A 等人 “Tissue engineering: an evolving 21st-century science to provide replacement for reconstruction and transplantation” Surgery 130: 781-784 (2001) 以及 Fuchs, J. R. 等人, “Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction” Ann. Thorac. Surg. 72: 577-591 (2001)。

最后本发明所述的多能性干细胞开创了转基因修复和治疗的广阔前景。本发明优选的实施方案中，去分化可程序化干细胞本身或者最终由它们分化得到的靶体细胞和/或靶组织被一种或多种基因转染。这样用于维持某些器官例如肝、肾的代谢所需的一种或多种基因被恢复和/或支持或再次导入。例如干细胞或源自所述干细胞的肝细胞被 FAH (富马酰乙酰乙酸水解酶) 基因转染。在 FAH 缺陷的小鼠模型中脾内注射 1000 个 FAH 阳性供体肝细胞，6-8 周之后就足以完全遍及其肝脏，完全弥补了肝硬化导致的代谢功能损失 (参见 Grompe, M 等人, Nat. Genet. 12: 266 ff. (1996))。

通过“多药抗性基因”转染干细胞或通过程序化干细胞获得的相应的靶细胞 (例如造血细胞、肝细胞、卵巢细胞、肌细胞、神经细胞、神经元细胞、神经胶质细胞、软骨细胞和骨细胞等)，在恶性疾病情况下通过重建相应的造血功能使得长期的基本化疗成为可能，或者产生辐射抗性。

本发明详细说明如下：

本发明所述方法的起始原料是来自于人血的单核细胞。它们优选是自体单核细胞，即来源于欲利用本发明所述的干细胞或由其产生的靶细胞进行治疗病人的血液中的单核细胞。

为了得到单核细胞，首先将经过根据已知方法用抗凝剂处理的血液分离，优选离心，得到血浆、白细胞和红细胞。离心后血浆在上清液中，之下是含有全部白细胞的一层，这一层也被称之为“棕黄层”。再下面含有红细胞相 (血细胞比容)。

然后利用已知方法如离心分离“棕黄层”得到单核细胞。根据优选的方法，不同的“棕黄层”包被在淋巴细胞分离介质（例如 Ficoll Hypaque）上再离心。通过进一步离心和漂洗，从血液中得到单核细胞组分（参见实施例 1）。

从全血中获得单核细胞的其他方法例如“荧光激活细胞分类术”（FACS），“免疫磁珠分选”（参见 Romani 等人, J. Immunol. Methods 196: 137-151 (1996)）和“磁激活细胞分类术”（MACS）或者所谓的“Rosetting 法”（参见 Gelig-Meyling, F 等人, “Simpliflex prozedure for the separation of human Tand non-T cells” Vox Sang. 33: 5-8 (1977)）。

根据本发明，任何分离的人血都能得到单核细胞且血液也可来源于如脾脏、淋巴结或骨髓等器官。尤其当从人血中分离单核细胞是不可能的（如在贫血或白血病情况下）或数量不足，以及在同种异体应用情况下（如在多个器官去除的构架中），则考虑从器官中获得单核细胞，脾脏可用作分离单核细胞的来源，。

为了制备足够量的本发明所述的干细胞，首先必须增殖单核细胞。为此使用本发明所述包含 M-CSF（巨噬细胞集落刺激因子）的适合单核细胞生长的培养基。M-CSF（也被称之为 CSF-1）由单核细胞、成纤维细胞和内皮细胞生成。培养基中 M-CSF 的浓度为 2 - 20 $\mu\text{g/l}$ 培养基，优选 4 - 6 $\mu\text{g/l}$ ，特别优选为 5 $\mu\text{g/l}$ 。

M-CSF 结合到单核细胞上特异性的 c-Fms 受体（也称之为 CSF-1R），该受体只存在单核细胞表面，仅与 M-CSF 结合（Sherr C. J 等人, Cell 41(3): 665-676 (1985)）。M-CSF 和受体的特异性相互作用诱发了单核细胞的分裂，单核细胞在含有 M-CSF 或其类似物的培养基中培养，该 M-CSF 或其类似物能与受体结合而活化受体。由于没有与 c-Fms 受体的亲和力，不能诱导单核细胞分裂，所以其他生长因子例如 GM-CSF（粒细胞-单核细胞集落刺激因子）和 G-CSF（粒细胞集落刺激因子）都不适合。

该方法特别优选的实施方案是在方法的步骤 b) 中向细胞培养基中同时加入 M-CSF 和 IL-3。培养基中 IL-3 的浓度可以为 0.2 - 1 $\mu\text{g/l}$ ，优选 0.3 - 0.5 $\mu\text{g/l}$ ，特别优选是 0.4 $\mu\text{g/l}$ 的 IL-3。

但是也可以最初在步骤 b) 中只向培养基中加入 M-CSF，随后再加

入 IL-3。

进一步实施方案是培养容器中最初装有只包含 M-CSF 的细胞培养基，其在细胞分离之后就被另外包含 IL-3 的细胞培养基替换。

在本发明优选的实施方案中，所述方法中步骤 b) 中的细胞在含硫化合物如巯基化合物的存在下再培养，在该含硫化合物中至少一个烃基与硫原子相连，所述烃基被一个或多个功能基取代。巯基化合物是指含有至少一个与烃基结合的巯基 (SH) 的化合物。通过另外使用所述的含硫化合物能够使来自单核细胞的细胞去分化而得到的表达一种或多种干细胞标记 CD90、CD117、CD123 和 CD135 的干细胞的数目增加。

所述功能基优选羟基和 / 或胺基。特别优选的实施方案中含硫化合物是 2-巯基乙醇。进一步优选的实施方案中含硫化合物是二甲基亚砷 (DMSO)。

含硫化合物的用量以硫为基准大约为 4 - 大约 200 $\mu\text{mol/l}$ 。优选大约为 100 $\mu\text{mol/l}$ 。

当使用 2-巯基乙醇时，培养基中含有大约 3 - 大约 13 μl ，优选约为 7 $\mu\text{l/l}$ 的 2-巯基乙醇。

IL-3 和任选的含硫化合物的处理可以同时或者在有 M-CSF 参予培养的单核细胞增殖后进行，优选增殖以及 IL-3 和任选的含硫化合物的处理同时进行。同时进行的增殖和去分化持续不超过 10 天，IL-3 和任选的含硫化合物的处理时间至少为 3 天，最多为 10 天，优选为 6 天。

因此，根据本发明，当在同时含有 M-CSF、IL-3 和任选的巯基化合物的培养基中培养单核细胞时，到细胞从培养容器底部剥离为止的时间间隔为至少 3 天，最多 10 天，优选 5 - 8 天，特别优选 6 天。

在本发明优选的实施方案中，所述方法按以下方式进行。在步骤 b) 中，单核细胞最初在只含有 M-CSF 的培养基中增殖，在该培养基中增殖持续至少 2 天，优选 3 天，特别优选 4 天，最长为 7 天。随后在 IL-3 和任选的巯基化合物存在下再培养 3 天。然而，优选在只含有 M-CSF 的培养基中最多持续 4 天，接下来在 IL-3 和任选的巯基化合物存在下培养 3、4、5 或 6 天。

如实施例 2 和 13 所述，为了使增殖和去分化同时进行，单核细

胞被分离出来后转移至含有 M-CSF、IL-3 和任选的含硫化合物特别是 2-巯基乙醇或 DMSO 的培养基中。

由于其具有吸附特性,在制备过程中单核细胞和来自于它们的干细胞贴附于与各自培养容器的底部。根据本发明优选的实施方案,在步骤 c) 之后培养基与贴附于培养容器的底部的细胞分离后被弃去。优选随后用培养基漂洗贴附于底部的细胞,然后用新鲜培养基覆盖细胞(参见实施例 13)。

在该步骤中上述增殖和去分化培养基可以被用作培养基,例如标准细胞培养基 RPMI 也可用作培养基。

根据本发明进一步优选的实施方案,为了提高生产过程最后在培养基中自由漂浮的干细胞的数目,可在步骤 c) 的最后和步骤 d) 之前将细胞与生物学上良好耐受的有机溶剂接触。溶剂的用量为 $10\mu\text{l}$ - 1ml。该溶剂优选为含 1-4 个碳原子的醇,特别优选加入乙醇。根据本发明特别优选的实施方案,将细胞与前面定义的生物学上可良好耐受的有机溶剂蒸汽相接触,优选乙醇蒸汽(参见实施例 2)。与有机溶剂优选乙醇蒸汽接触的时间为 4-12 小时,优选 8-10 小时。

本发明所述的方法优选在其表面预先涂覆有胎牛血清(FCS)的培养容器中进行(参见实施例 2)。也可以选择使用男性供体的 AB 血清。用 FCS 的覆盖实施如下:使用前用 FCS 覆盖培养容器的表面,且在几个小时、特别为 2-12 小时,特别优选 7 个小时的接触时间后,用适当的方法去除没有粘附在表面的 FCS。

如果在步骤 c) 之后,任选在换培养基之后,进行有机溶剂处理,在这个步骤中细胞已经一定程度上从底部剥离。(进一步)剥离可以用机械方法完成,例如使用精良的细胞刮棒,刮片或吸管尖(参见实施例 13)。

根据本发明方法优选的实施方案,在适当的酶例如胰蛋白酶的作用下完成完全的剥离(参见实施例 2)。将细胞与胰蛋白酶溶液($0.1 - 0.025\text{g/l}$, 优选 0.05g/l) 在 $35 - 39^\circ\text{C}$, 优选 37°C 下在二氧化碳存在下接触 2-10 分钟。

然后通过标准的方法抑制胰蛋白酶的活性,此时利用标准方法,例如离心和在一个实施方案中在步骤 d) 的最后在适宜的培养基中将

其悬浮，可以获得自由漂浮的去分化程序化干细胞。它们悬浮于适宜的培养基例如 RPMI1640 或 DMEM 中，能够立即分化成希望的靶细胞。但是它们也能够培养基中保存几天。在优选的实施方案中，如果欲将细胞作为去分化的可程序化干细胞贮存在培养基中超过约 48 小时，则培养基中应含有细胞因子或 LIF 因子(白血病抑制因子)，参见 Nature 414: 94 (2001, Donovan, P. J Gearhardt, J 在上述引文中)。在包含这些因子的培养基中干细胞能够作为去分化程序化干细胞保持至少 10 天。

在优选的实施方案中，为了长期贮存，细胞悬浮在液体培养基中，然后深度冷冻。活细胞深度冷冻的技术是现有技术中已知的，参见 Griffith M 等人“Epithelial Cell Culture, Cornea, in Methods of Tissue Engineering”, Atala A Lanza R. P Academic Press 2002, 第 4 章第 131-140 页。优选的用于本发明干细胞深度冷冻的悬浮培养基是含 FCS 的 DMEM，参见实施例 2。

参考如下实施例进一步解释和说明本发明。

如果在实施例中没有进一步限定，所用的培养基和物质的组成如下：

1. 青霉素 / 链霉素溶液

每毫升生理氯化钠溶剂 (0.9% 的 NaCl) 中 10,000 单位作为青霉素 G 钠盐的青霉素和 1000 μ g 作为硫酸链霉素的链霉素。

2. 胰蛋白酶 - EDTA

每升含 0.5g 胰蛋白酶和 0.2g EDTA (4Na)

3. 胰岛素

约 28 单位 / mg 的产生自大肠杆菌 (E. coli) 的人重组胰岛素

4. 含 L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 (1x, 液体 (11875))

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 培养基 1640 是广泛用于哺乳动物细胞的营养培养基。

成分	分子量	浓度(mg/l)	摩尔浓度(nM)
无机盐			
硝酸钙 (Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O)	236	100.00	0.424
氯化钾 (KCl)	75	400.00	5.30
硫酸镁 (MgSO ₄)	120	48.84	0.407
氯化钠 (NaCl)	58	6000.0	103.44
碳酸氢钠 (NaHCO ₃)	84	2000.0	23.800
磷酸二氢钠 (Na ₂ HPO ₄)	142	800.0	5.63
另外的成分			
葡萄糖	180	2000.00	11.10
还原型谷胱甘肽	307	1.50	0.0032
酚红	398	5.00	0.0125
氨基酸			
L-精氨酸	174	200.00	1.10
L-天冬酰胺	132	50.00	0.379
L-天冬氨酸	133	20.00	0.150
L-二盐酸半胱氨酸	313	65.00	0.206
L-谷氨酸	147	20.00	0.136
L-谷氨酰胺	146	300.00	2.05
甘氨酸	75	10.00	0.133
L-组氨酸	155	15.00	0.0967
L-羟脯氨酸	131	20.00	0.153
L-异亮氨酸	131	50.00	0.382
L-亮氨酸	131	50.00	0.382
L-盐酸赖氨酸	146	40.00	0.219
L-甲硫氨酸	149	15.00	0.101
L-苯丙氨酸	165	15.00	0.0909
L-脯氨酸	115	20.00	0.174
L-丝氨酸	105	30.00	0.286
L-苏氨酸	119	20.00	0.168
L-色氨酸	204	5.00	0.0245
L-酪氨酸二钠二水合物	261	29.00	0.110
L-缬氨酸	117	20.00	0.171
维生素			
生物素	244	0.20	0.008
D-泛酸钙	477	0.25	0.0005
氯化胆碱	140	3.00	0.0214
叶酸	441	1.00	0.002
异肌醇	180	35.00	0.194
烟酰胺	122	1.00	0.0081
对氨基苯甲酸 (PABA)	137	1.00	0.0072
盐酸吡哆醇	206	1.00	0.0048
核黄素	376	0.20	0.0005
盐酸硫胺素	337	1.00	0.0029
维生素 B12	1355	0.005	0.0000369

参见: Moore G. E. 等人, J. A. M. A. 199: 519 (1967)

5. PBS (Dulbecco 磷酸盐缓冲液) 参见 J. Exp. Med. 98:167 (1954)

成分	g/l
KCl	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2
NaCl	8.00
Na ₂ HPO ₄	1.15

6. 2-巯基乙醇

合成质量; 含量>98%, 密度 1.115 - 1.116, 参见如 Momo J. 等人, J. Am. Chem. Soc. 73:4961 (1951)。

7. Ficoll - Hypaque

淋巴细胞分离培养基 (蔗糖 / 表氯醇共聚合产物, Mg 400,000; 密度 1.077, 泛影酸钠调节)

8. 视黄酸

1.5ml 的 PBS 溶液中含有 300 μ l 维生素 A 酸 (C₂₀H₂₈O₂), 其相应的浓度为 1mM。当用作神经元和神经胶质细胞的程序化培养基时, 10ml 培养基中含有 150 μ l 维生素 A 酸 (相应浓度为 10⁻⁶M)。

9. DMEM

Dulbecco 改性的 Eagle 培养基 (高葡萄糖)

参见 Dulbecco, R. 等人, Virology 8: 396 (1959); Smith, J. D. 等人, Virology 12: 158 (1960); Tissue Culture Standards Committee, In Vitro, 6: 2 (1993)

10. L-谷氨酰胺

液体: 29.2mg/ml

11. II 型胶原酶

参见 Rodbell, M. 等人, J. Biol. Chem. 239: 375 (1964)。

12. 白细胞介素 - 3 (IL-3)

来源于大肠杆菌的重组人白介素 (Yang Y. C. 等人, Cell 47: 10 (1986)), 其中所含的包括成熟 IL-3 的 133 个氨基酸残基和包括甲硫氨酰形式的 134 个氨基酸残基的比例约为 1: 2; 计算分子量约

为 17.5kD, 特异性活性 $1 \times 10^3 \text{U}/\mu\text{g}$ (R&D 目录 No. 203-IL)

13. 巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)

来源于大肠杆菌的重组人 M-CSF, 其中含有包括 N-末端甲硫氨酸的 135 个氨基酸残基的单体 (18.5KD), 它是以分子量为 37kD 同型二聚体存在 (SIGMA 目录 No. M6518)。

14. 抗体

实施例中应用的抗 CD14、CD31、CD 90、CD117、CD123、CD135 抗原的抗体都是商业上可以得到的。它们从下列来源得到:

CD14: DAKO, 单克隆小鼠抗人 CD14、单核细胞、克隆 TÜK4, 代码为 M0825, Lot 036 Edition 02.02.01;

CD31: PharMingen International, 单克隆小鼠抗大鼠 CD31 (PECAM-1), 克隆 TLD-3A12, 目录编号 22711D, 0.5mg;

CD90: Biozol Diagnostica, Serotec, 小鼠抗人 CDw90

克隆 No. F15-42-1, MCAP90, 批号 0699;

CD117: DAKO, 单克隆小鼠抗人 CD117, c-kit, 克隆号 104D2, 代码 No. M 7140, Lot 016, Edition 04.05.00;

CD123: Research Diagnostics Inc. 小鼠抗人 CD123 抗体, 克隆 9F5, 目录号 RDI-CD123-9F5;

CD135: Serotec, 小鼠抗人 CD135, MCA1843, 克隆号 BV10A4H2

实施例 1

从全血液中分离单核细胞

为了避免血液凝固和为了饲养细胞, 在一个 3 室带状装置中将 450ml 全血和 63ml 稳定溶液混合。该稳定溶液组成为每升水中含有 3.27g 柠檬酸, 26.3g 柠檬酸三钠盐, 25.5g 右旋糖和 22.22g 二羟基磷酸钠盐。溶液的 pH 值为 5.6 - 5.8。

上述混合物在 20℃ 以 4000rpm 条件下“高速离心”7 分钟以分离血液中的成分。结果形成了 3 层颗粒和非颗粒成分。通过将带状装置接入为此目的提供的一个加压机器上, 把红血球压入下层的袋中, 把血浆压入上层袋中, “为此目的提供的棕黄层”保留在中间袋中, 其体积约为 50ml。

将 50ml 新鲜制备的“棕黄层”分成每份 25ml 的 2 份, 将每份

以 25ml 的事先加入到 2 个 50ml 的 Falcon 试管中 Ficoll-Hypaque 分离介质覆盖。

将该混合液在 2500rpm 下不间断离心 30 分钟。之后，红细胞和死细胞仍然留在 Ficoll 相下面的“棕黄层”中，而白细胞包括单核细胞被分离出来，形成在 Ficoll 上的白色界面。

将单核细胞的白色界面小心的吸出并用 10ml 磷酸盐缓冲液 (PBS) 混合。

然后将混合物在 1800rpm 下有间断地离心 3 次，每次 10 分钟；每次离心后将上清液吸出，离心管中装满新鲜的 PBS。

离心管 (Falcon 试管) 底部收集的沉淀含有单核细胞组分，即单核细胞。

实施例 2

单核细胞的增殖和去分化

单核细胞的培养和增殖和细胞去分化都是在具有下列组成的营养培养基中一步完成的：

RPMI 1640 培养基	440 ml
胎牛血清 (FCS)	50ml
青霉素/链霉素溶液	5ml
2-巯基乙醇 (贮存液)	5ml
总体积	500ml

营养培养基还含有 2.5ug/500ml 的 M-CSF 和 0.2ug/500ml 的白细胞介素 - 3 (IL-3)。

将实施例 1 中分离的单核细胞转移到一个 6 孔板上的 5 个孔中 (每孔直径为 30 毫米)，每次每个孔中的加入量约 10^5 个细胞。在每个孔中用 2 毫升上述营养培养基填满。该 6 孔板事先用纯的灭活的 FCS 装满，约 7 小时后将胎牛血清轻轻倒出，由此得到 FCS 包被的 6 孔板。每孔中的精确剂量的细胞数目可根据一个已知的方法来确定，参见 Hay R. J “Cell Quantification and Characterisation” in Methods of Tissue Engineering, Academic Press 2002, 第 4

章，第 55-84 页。

盖上 6 孔板的盖子在 37℃ 培养箱中放置 6 天。细胞在 24 小时后沉到孔的底部。每隔一天吸去上清液，将 6 孔板的每一个孔再次装满 2ml 新鲜的营养培养基。

在第六天，将 2 毫升 70% 乙醇加入到 6 孔板中未使用的第 6 个孔中，盖上 6 孔板的盖子在 37℃ 培养箱中继续培养 10 个小时。

接着，在 6 孔板中含有细胞的每一个孔中用吸管加入 1 毫升用 PBS 以 1: 10 稀释的胰蛋白酶溶液。盖上 6 孔板在 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 下放置 5 分钟。

之后在 6 孔板的每个孔中加入 2 毫升 RPMI 1640 培养基阻断胰蛋白酶的活性。将每个孔的所有上清液（1 毫升胰蛋白酶 + 2 毫升培养基）吸出，收集到一个 15ml 的 Falcon 管中，在 1800rpm 下离心 10 分钟。弃去上清液，沉淀用新鲜的 RPMI 1640 培养基混合（2 毫升/10⁵ 细胞）。

该细胞悬液可直接用来分化成不同的靶细胞。

或者，在离心弃去含胰蛋白酶的上清液后，细胞和作为冷冻培养基的 DMSO/FCS 混合，在 10⁶ 个/ml 的浓度下深度冷冻。

冷冻培养基中含 95% 的 FCS 和 5% 的 DMSO。每次约 10⁶ 个细胞置于 1ml 培养基中按照下述的步骤冷却：

冰浴 30 分钟；

在 -20℃ 下于预冷的发泡聚苯乙烯 (Styropor) 盒中放置 2 小时；

在 -80℃ 下于发泡聚苯乙烯 (Styropor) 盒中放置 24 小时；

在 -180℃ 下于液氮 (N₂) 中的试管中贮藏。

为了观察根据上述方法得到的来源于单核细胞的去分化的可程序化干细胞的群体的免疫组织化学表型，每次取 10⁵ 个细胞并在载玻片上固定为细胞离心涂片器 (cytospin) 制剂以用于进一步组织化学染色 (Watson, P. "A slide centrifuge; an apparatus for concentrating cells in suspension on a microscope slide" J. Lab. Clin. Med 68: 494-501 (1966))。之后可利用 Cordell, J. L 等人 (文献见下) 描述的应用 APAAP 红色复合物的技术对细胞进行染色。如果没有另外指出，加入的一抗是用 PBS 以 1: 100 稀释的，每次实验中使用 200μl 该浓度的抗体。作为一抗使用的单克隆抗体

抗如表 1 所列的细胞抗原表位。图 6 显示染色的细胞离心涂片器制剂和相应的干细胞标记物 CD90, CD117, CD123 和 CD135 的证据。

和染色技术有关的文献:

Cordell J.L., et al. "Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)." J. Histochem. Cytochem. **32**: 219-229 (1984).

和标记物有关的文献:

CD14

Ferrero E., Goyert S.M. "Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14" Nucleic Acids Res. **16**: 4173-4173 (1988).

CD31

Newman P.J., Berndt M.C., Gorski J., White J.C. II, Lyman S., Paddock C., Muller W.A. "PECAM-1(CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily" Science **247**: 1219-1222 (1990).

CD90

Seki T., Spurr N., Obata F., Goyert S., Goodfellow P., Silver J. "The human thy-1 gene: structure and chromosomal location" Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 6657-6661 (1985).

CD117

Yarden Y., Kuang W.-J., Yang-Feng T., Coussels L., Munemitsu S., Dull T.J., Chen E., Schlessinger J., Francke U., Ullrich A. "Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand." EMBO J. **6**: 3341-3351 (1987).

CD123

Kitamura T., Sato N., Arai K., Miyajima A. "expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors." Cell **66**: 165-1174 (1991).

CD135

Small D., Levenstein M., Kim E., Carow C., Amn S., Rockwell P., Witte L., Burrow C., Ratajczak M.Z., Gewirtz A.M., Civin C.I.

"STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 459-463 (1994).

表 1

本发明所述干细胞抗原的表达

抗原	颜色反应
<u>干细胞标记物</u>	
CD90	+ +
CD117	+
CD123	+ +
CD135	+ (+)
<u>分化标记物</u>	
CD14 (单核细胞)	+

所示分级对应于检测到的抗原阳性程度。单核细胞在相应的特定培养基中培养 4-9 天后，反应变明显。然后，将各自的细胞离心涂片器在显微镜下与阴性对照（没有一抗时的染色）对比。

- + 细胞和一抗有清晰的颜色反应；
- + + 细胞和一抗有强烈的颜色反应。

仅对有 70% 以上的具有典型的干细胞形态(参见图 6)的活细胞的细胞离心涂片器制剂进行估计。其中只有不足 1% 的细胞表达了 CD34 抗原。

实施例 3

由成体干细胞制备神经元和神经胶质细胞

神经元和神经胶质细胞的制备是在一个直径为 100mm 的培养皿中进行的。为准备培养皿, 在每个培养皿中加入 5mm 纯的灭活的胎牛血清(FCS)以包被培养皿底部。7 小时后将没有粘附于培养皿底部的 FCS 部分吸出。将约 10^6 个根据实施例 2 制备的细胞加入到一个上述方法准备的培养皿中, 并加入 10ml 如下列组成的营养培养基:

DMEM 溶液	440ml
胎牛血清(FCS)	50ml
L-谷氨酰胺	5ml
青霉素(100U/升)/链霉素(100ug/升)溶液	5ml
总体积	500ml

营养培养基中还含有 1×10^{-6} M/500ml 的视黄酸。

用来制备神经元和神经胶质细胞的干细胞在 10 天内发生再程序化/分化, 这期间约每 3 天换培养基。此后, 细胞大多数贴附于培养皿的底部, 可以通过和以前对干细胞的描述中的类似的方式用简单的胰蛋白酶消化作用, 将其从平皿的底部剥离下来。

实施例 4

神经元前体细胞, 神经元和神经胶质细胞的证明

为了以后对由去分化的可程序化干细胞生成的靶细胞进行免疫组织化学特征分析, 将从单核细胞生成的干细胞加至盖玻片(20mm $\times$ 20mm)上(10^5 个细胞/盖玻片), 将玻璃盖放置于 6 孔板的底部(每孔直径为 30mm), 加入营养培养基(每孔 2ml)培养。在干细胞分化成各自的靶细胞后, 用下列方法将其固定: 移去营养培养基(上清液)后, 加入 2ml 甲醇固定培养的靶细胞, 甲醇的作用时间超

过 10 分钟。随后吸出乙醇，用 PBS(每次 2 毫升)冲洗孔板 2 次。之后根据 Cordell, J. L. 等人 “Immunoenzymatic labeling monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monodonal antiralkaline phosphatase (APAAP complexes)” J. Histochem. Cytochem. 32: 219-229 (1994) 中所描述的技术，用 APAAP 红色复合体将细胞染色。除非另有说明，所加的一抗是用 PBS 以 1: 100 的比例稀释的，每次 6 个孔的每 1 个中吸入 200 μ l 该浓度的抗体。

神经元前体细胞可以通过用抗 S100-抗原的抗体进行染色来检测，参见图 1 中的中间图 ($\times 200$)。

神经元是通过突触泡蛋白 MAP2(微管相关蛋白 2) 或具有相应的特异性抗体(一抗用 PBS 以 1: 300 的比例稀释)的神经丝 68 的特定表达来检测的，图 1 右图， $\times 200$ 。

神经胶质细胞例如星形胶质细胞是通过检测 GFAP(胶质原纤维相关蛋白)(一抗用 PBS 以 1: 200 的比例稀释)来确定的，图 1 左图， $\times 200$ 。

根据如 Carmiols “Cell Isolation and Selection” Methods of Tissue Engineering, Academic Press 2002, 第 2 章, 第 19-35 页中记载的方法，利用特异性抗 MAP2(神经元)或 GFAP(神经胶质细胞)的抗体，通过 MACS(磁激活细胞分选)的方式来分离神经元和神经胶质细胞。

通过染色可见的细胞的类型如图 1 所示。

实施例 5

由来源于单核细胞的去分化的可程序化的成体干细胞制备内皮细胞

Matrigel® (Beckton and Dickinson, Heidelberg, DE) 被用作培养内皮细胞基质。这种基质由纤维结合素，层粘连蛋白和胶原 I 和 IV 组成。

冷冻的基质在 4℃ 冰箱中经过 12 小时的时间缓慢融化。在此期间它的状态发生变化，即原先固态的基质变为海绵状/液体状。将这种状态下的基质加入到一个 48 孔板(每孔直径为 10mm)使得每个孔

的底部都被覆盖。

此后，此孔板在室温下放置 30 分钟，直到凝胶在底部凝固成粘附层。

紧接着，每孔加入约 1×10^2 个细胞，并加入营养培养基在 Matrigel® 上进行培养（如实施例 2 所述）。

4-5 天以后第一个管状的细胞链出现了，其在 6-8 天后发展成 3 维的细胞网络。通过各自的特异一抗（每次 200 μ l，用 PBS 以 1: 100 的比例稀释）可以鉴定在细胞上的内皮标记物 CD31 和因子 VIII。

另一种方法是将液态的基质加入到一个血管假器官中，然后用实施例 2 所述的去分化的可程序化的成体干细胞将其包被。约 6 天后可以鉴定到一大片内皮细胞以环状的方式包被在假器官上。

如图 2 所示，通过用相应的内皮特异性抗体（见上）进行染色可以显示出内皮细胞。中间的图显示的是在 Matrigel® 上培养 5 天后的细胞。第一个管状的链将单个细胞聚集组合。深棕色标记的细胞表达 CD31 抗原（用黄色滤光片，经 200 倍放大）。8 天后三维的网络结构开始慢慢形成（抗-CD31-抗原染色，黄色滤光片经 200 倍放大）。12 天后在 Matrigel® 上培养的新分化的 CD31⁺ 细胞形成一个容器状的具有着多层壁结构的三维管，形态学上使人联想到一个容器。经检测，现在几乎所有细胞都表达 CD31 抗原（CD31 染色，蓝色滤光片，经 400 倍放大），如右图所示。

实施例 6

脂肪细胞的制备

A: 为了将实施例 2 中所述成体干细胞程序化/分化成脂肪细胞，首先要制备一种条件化培养基。为此，将 20 克自体的脂肪组织，即来自于同一人供体的脂肪组织且在该供体的血液中也生成单核细胞，用如下方法处理：

首先脂肪组织在一个培养皿中压碎，然后将破碎的组织碎片过筛（孔径 100 μ m）。

然后将上述方法得到的悬浮液转移至一直径为 100mm 的培养皿中，加入 10ml 含有 30mg 的 II 型胶原酶的 DMEM 培养基。将此混合物在室温下（22 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C）放置大约 60 分钟以使胶原酶作用于脂肪细

胞。

紧接着将混合物转移至一个 50 毫升的 Falcon 管中，将此管在 1800rpm 下离心 10 分钟。

离心后弃去上清液，将由脂肪细胞和前体细胞组成的细胞沉淀转入装有 8ml 下述组成的培养基中，并在培养皿（直径为 100mm）中，在 37℃ 培养箱中培养 10 天。

DMEM 溶液	444.5ml
胎牛血清（FCS）	50ml
胰岛素溶液	0.5ml
青霉素（100U/1）/链霉素（100ug/1）溶液	5ml
总体积	500ml

胰岛素溶液含有溶解于 2ml 醋酸水溶液（由 40ml 水和 0.4ml 冰醋酸组成）中的 18mg 的胰岛素（Sigma 1-0259）。此溶液经醋酸水溶液以 1:10 比例稀释。

在 10 天的培养期间，脂肪细胞条件化培养基（FCCM）形成上清液。每种情形中 2-4 天后用新鲜的培养基替换该上清液。将每次更换培养基所获得的 FCCM 经过无菌过滤后在 -20℃ 保存。接着将 10ml 上述的 FCCM 和约 10^6 个实施例 2 所述的干细胞一起加入到一个培养皿（直径为 100mm）中。4 天后就可见包含脂肪小体的初始前体细胞（图 3A）。6 天后出现可被苏丹红染色的单个脂肪细胞（图 3B 和 C）。10 天后这些细胞出现典型的聚集并形成丛，在该步骤，肉眼已可将其看作脂肪细胞（图 3D）。

如图 3A-3D 所示，染色使得脂肪细胞可以看见，这样就与对照 3E 和 3F 有着十分明显的区别：图 3E 显示来源于单核细胞在营养培养基（如实施例 2 所述）中培养 6 天的细胞，营养培养基未加 IL-3 和 2-巯基乙醇。其中随后加入了 FCCM。这些细胞不能分化成脂肪细胞。图 F 显示的是在完全培养基（见实施例 2）中培养 6 天，然后继续在营养培养基中而不是 FCCM（见实施例 2）中培养 6 天的细胞。FCCM 含有给脂肪细胞分化提供信号所需的组分。

如图 3A, B, C, D 细胞的苏丹红染色是根据 Patrick Jr C.W 等

人“Epithelial cell Culture: reast”, in *Methods of Tissue Engineering*, Academic Press 2002, 第4章, 第141-149页中所描述的方法进行的。

B: 除了通过用苏丹红染色来鉴别脂肪细胞的表型以外, 也可以在 mRNA 水平上对脂肪细胞进行分子生物学特征的鉴别, 来检查脂肪细胞的遗传编码是否在使用脂肪细胞条件化培养基培养而进行相应的程序化之后经历了相应改变, 以及来检查从可程序化的单核细胞中程序化得到的脂肪细胞中是否可以鉴定所述脂肪细胞特有的供使核糖核酸 (mRNA) 转录物。通过聚合酶链式反应 (PCR) 的方法由分离出的 RNA 样品扩增出脂肪细胞代谢的两个特有的 mRNA 序列, 此 RNA 样品是从来源于单核细胞的去分化的可程序化的干细胞中分离得到的, 该 mRNA 在平行实验混合物中由已程序化的脂肪细胞中扩增到, 分别称为“过氧化物酶体增殖活化受体 γ ” (PPARG)-mRNA (Tontonoz, P 等人 “Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor” *Cell* 79: 1147-1156 (1994), 基因库查询号: NM-005037) 和“瘦素 (肥胖同系物, 小鼠)” - mRNA (Zhang Y 等人 “Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue” *Nature* 372: 425-432 (1994), 基因库查询号: NM-000320)。

为此需要进行的 RNA 分离、逆转录法和目标 mRNA 序列的 PCR 扩增条件的选择根据现有技术的详细记载进行, 参见 Ungefroren H 等人, “Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis”, *Cancer Res.* 58: 1741-1749 (1998)。

为此选择的引发 PCR 扩增的各种引物要能使正向 - 和反向引物结合到 mRNA 序列上, 该 mRNA 序列的染色体基因的同源区位于两个不同的外显子上, 其相互被一个大的内含子分开。这样可以确保从细胞中包含的 mRNA 获得碎片而不是由染色体 DNA 中存在的序列进行扩增。特别优选下述的用于 PPAR- γ 和瘦素的引物序列:

PPAR- γ : 正向引物; 265-288 (在外显子 1 中的相应基因序列), 反向引物: 487-465 (在外显子 2 中的相应基因序列), 其结果为 487-265bp=223bp 的扩增碎片, 见图 3G。图 3G 进一步表明在可程序

化干细胞和肿瘤细胞系 HL-60 (人早幼白血病细胞系) 中已鉴定了痕量转录的 PPAR- γ 特异性 mRNA, 尽管其比脂肪细胞本身的信号带明显窄得多。不同的是, 通过逆转录酶 PCR 在 mRNA 的水平上只能在由可程序干细胞生成的脂肪细胞中检测到脂肪细胞特异性蛋白瘦素。

可程序化干细胞 (progr. Stem cell) 作为对照, 人肿瘤细胞系 HL-60、Panc-1 和 WI-38 不转录瘦素。作为阴性对照的没有加入逆转录酶 (脂肪细胞/-RT) 的所有样品和水的样品同时进行测定。通过测定阳性对照中的 GAPDH “看家” 基因, 可以确保 PCR 扩增步骤在每个混合物中是正常进行的。

实施例 7

肝脏细胞 (肝细胞) 的制备

A: 为使实施例 2 所述的来源于单核细胞的去分化的可程序化干细胞程序化生成肝细胞, 首先要制备条件化培养基。因此将 40g 人肝脏组织进行如下处理。

首先将肝脏组织在 PBS 中漂洗几次, 基本上去除红细胞。然后在培养皿中将组织压碎, 再在室温下与分离溶液一起培养约 45 分钟。分离溶液由 40mlPBS (磷酸盐缓冲液), 10ml 用 PBS 按 1:10 稀释的胰蛋白酶溶液和 30mlIII 型胶原酶 (Rodbel M 等人 J. Biol. Chem. 239: 375 (1964)) 组成。培养 45 分钟之后将组织碎片过筛 (参见实施例 6)。

然后将混合物转入 50ml 的 Falcon 管中, 加入 PBS 至 50ml, 1800rpm 下离心 10 分钟。

离心后弃去上清液, 含有肝细胞的细胞沉淀再用 50ml 的 PBS 漂洗、离心。再次弃去形成的上清液, 将细胞沉淀引入 25ml 如下组成的培养基中, 在细胞培养瓶 (体积为 250ml) 中在 37℃培养箱培养 10 天。

肝细胞生长培养基

肝细胞生长培养基 (LCGM)	
RPMI 1640 培养基	445ml
胎牛血清 (FCS)	50ml

胰岛素溶液	0.5ml
青霉素 (100U/1) /链霉素 (100μg/1) 溶液	5ml
总体积	500ml

营养培养基另外含有 5μg (10ng/ml) 的表皮生长因子 (Pascall, I. C. 等人, J. Mol. Endocrinol. 12: 313 (1994))。胰岛素溶液的组成如实施例 6 所述。

在持续 10 天的培养期间, 肝脏细胞条件化培养基 (LCCM) 形成了上清液。2-4 天后分别用新鲜的营养培养基取代上清液。每次换培养基时得到每批 LCCM 都要经过无菌过滤 (0.2μm 孔径的膜过滤) 后 -20℃ 下贮存。

然后将 1×10^6 个去分化的干细胞在装有 10ml 如下组成的培养基的培养皿 (直径 100mm) 或培养瓶中培养。

肝细胞分化培养基

(肝细胞分化培养基, LCDM)	
LCCM	100ml
胰岛素溶液 (参见实施例 6)	0.1ml
表皮生长因子	1μg
肝细胞生长因子	2μg

肝细胞生长因子 (Kobayashi, Y. 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 220: 7 (1996)) 的使用浓度为 40ng/ml。几天以后可以观察到趋向扁平的、多角形的单倍体或二倍体细胞的形态学改变 (图 4A)。10-12 天以后, 可以通过免疫组织化学检测肝特异性抗原 α-胎蛋白来鉴定来源于去分化的干细胞的肝细胞 (Jacobsen, G. K. 等人, Am. J. Surg. Pathol. 5: 257-66 (1981)), 如图 4B 和 4C 所示。

B: 为了检查在使用肝细胞条件化培养基进行相应的程序化之后干细胞的基因编码是否产生相应的变化, 以及作为由本发明的干细胞生成的肝细胞的肝细胞特有的信使核糖核酸转录物是否可被鉴定, 除了通过 α-胎蛋白的免疫组织化学鉴定肝细胞的表型之外, 还

要进行 mRNA 水平的肝细胞的分子生物学特征的鉴定。因此在来源于单核细胞的去分化的可程序化干细胞中, 以及在平行试验的样品中, 在来源于干细胞程序化得到的肝细胞中, 通过分离的 RNA 样品的聚合酶链反应 (PCR) 方法来检测 5 种不同的肝细胞特有 mRNA 序列的存在。具体而言, 这是智人 (*Homo Sapiens*) 白蛋白 mRNA (Lawn, R. M 等人 “The sequence of human serum albumin cDNA and HS expression in *E. coli*” *Nucleic Acids Res.* 9: 6103-6114, (1981), 基因库查询代号: MM-000477)、 α -胎蛋白 mRNA (Morinaga T 等人 “Primary Structures of human α -fetoprotein and the mRNA” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4604-4608 (1983), 基因库查询代号: V01514)、人羧甲酰磷酸合成酶 I 的 mRNA (Haraguchi, Y 等人 “Cloning and sequence of a cDNA encoding human carbamyl phosphate synthetase: molecular analysis of hyperammonemia” *Gene* 107: 335-340 (1991), 基因库查询代号: D90282)、智人凝血因子 II (凝血酶, F2) mRNA (Degen, S. J. 等人 “Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin” *Biochemistry* 22: 2087-2097 (1983), 基因库查询代号: NM-000506)、智人凝血因子 VII (血清凝血酶原转变加速因子, F7) mRNA (NCBI Annotation Project. Direct Submission, 2002 年 2 月 6 日, 国家生物科技信息中心, NIH, Bethesda, MD 20894, 美国, 基因库查询代号: XM-027508)。

根据现有技术中详细记载, 进行逆转录酶方法所必需的 RNA 分离和选择目标 mRNA 序列的 PCR 扩增的条件, 参见 Ungefroren H 等人, “Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis” *Cancer Res.* 58: 1741-1749 (1998)。

选用的 PCR 扩增的各种引物要能使正向和反向引物结合到 mRNA 序列上, 该 mRNA 序列在染色体基因上的同源区位于两个不同的外显子中, 其相互被一个大的内含子彼此分开。由此确保从细胞中包含的 mRNA 获得碎片而不是由染色体 DNA 中存在的序列进行扩增。

引物序列的选择如下所示; 各种 PCR 分析的结果在图 40 中再现。

本发明的去分化的可程序化干细胞称为“*pror. stem cell*”，由其程序化得到的肝细胞成为“*pror. hepatocyte*”。

➤ α 胎蛋白：正向引物：1458-1478（在外显子 1 中的相应基因序列），反向引物：1758-1735（在外显子 2 中的相应基因序列），其结果为 1758-1458bp=391bp 的扩增碎片，见图 4D。

如图 4 所示，本身不具有可识别的 α 胎蛋白的特异性 mRNA 转录物的程序化干细胞(*pror. stem cell*)能够被程序化为含有这种 mRNA 转录物（分子量为 301bp 的阳性带）的肝细胞(*pror. hepatocyte*)。这也解释了图 4B 和 4C 所示的 α 胎蛋白免疫组织化学的检测结果。阳性对照称为人肝脏组织，肝肿瘤细胞系 HepG2 也转录 α 胎蛋白 mRNA，由 301bp 的带确认。

➤白蛋白：正向引物：1450-1473（在外显子 1 中的相应基因序列），反向引物：1868-1844（在外显子 2 中的相应基因序列），其结果为 1868-1450bp=419bp 的扩增碎片，见图 4D。

图 4D 显示了在可程序化干细胞中已有的痕量转录的白蛋白特异性 mRNA，同时都作为阳性对照的由干细胞程序化获得的肝细胞、正常肝组织以及肝肿瘤细胞系 HepG2 的肝细胞都大量表达 mRNA，可以看见清晰的谱带。

➤氨甲酰磷酸合成酶 I：正向引物：3135-3157（在外显子 1 中的相应基因序列），反向引物：4635-4613（在外显子 2 中的相应基因序列），其结果为 4635-3135bp=1500bp 的扩增碎片，见图 4D。

氨甲酰磷酸合成酶 I 是肝细胞的特异性酶，其在“尿素循环”中尿素的代谢中发挥重要作用。这种解毒作用由活性的肝细胞保证。如图 4D 所示，对于从可程序化干细胞得到的肝细胞和阳性对照（人肝脏组织和 HepG2 肿瘤细胞系）都可以看到氨甲酰磷酸合成酶 I 的特异性 mRNA 带（1500 bp）。程序化的肝细胞(*pror. hepatocyte*) mRNA 条带的一定程度上较弱的表达是由于培养皿中缺乏可用的底物。

➤凝血因子 II：正向引物：1458-1481（在外显子 1 中的相应基因序列），反向引物：1901-1877（在外显子 2 中的相应基因序列），其结果为 1901-1458bp=565bp 的扩增碎片，见图 4D。

同样的如图 4D 所示，这种肝细胞特异性蛋白仅能在程序化的肝

细胞 (pror. hepatocyte) 和来自人肝脏组织的阳性对照中在 mRNA 水平上以 444 bp 条带的表达检测到, 而可程序化干细胞 (pror. stem cell) 并不显示出这个带, 即基因不在那里转录。

►凝血因子 VII: 正向引物: 725-747 (在外显子 1 中的相应基因序列), 反向引物: 1289-1268 (在外显子 2 中的相应基因序列), 其结果为 1289-725bp=444bp 的扩增碎片, 见图 4D。

与凝血因子 II 的情形相同, 这种蛋白仅在程序化的肝细胞 (pror. hepatocyte) 和阳性对照 (人肝脏组织) 中转录 (见 656bp 的带), 尽管弱于凝血因子 II。可程序化干细胞和阴性对照 (水) 都不显示该特异性 mRNA 带。

►甘油醛脱氢酶: 这种基因也称之为“看家基因”, 能够在每个真核细胞中检测到, 被作为 PCR 扩增是否在所有样品中正常进行的对照。它同时进行测定, 并且由加入的确定量的来自各种细胞样品的 RNA 得来。

►作为阴性对照样品的水同时所有的检测中共同测定。如果 DNA 不污染水, 在 PCR 中就没有扩增, 也不会检测到条带 (以此作为反对照)。

实施例 8

皮肤细胞 (角质细胞) 的制备

为了使实施例 2 所述单核细胞源的去分化的可程序化干细胞在皮肤细胞中程序化, 首先应制备一种条件化培养基。为此 1-2cm² 完整的人皮肤作如下处理。

首先将皮肤原料在无菌条件下去除皮下组织。然后将该组织在剧烈振荡的无菌容器中用总计 10× 的 PBS 洗涤。洗涤二次之后, 再次去除组织中连接着的有区别的组织残渣。

再将皮肤原料置于直径 60mm 的培养皿, 混入 3ml 的按 1: 10 的比例用 PBS 稀释的胰蛋白酶溶液, 再将其切成小块 (约 0.5-1mm³)。随后, 再向混合物中加入 3ml 用 PBS 按 1: 100 的比例稀释的胰蛋白酶溶液, 混合物在 37℃ 下间歇振荡培养。

然后使较大的颗粒沉淀, 倒出包含角质细胞的上清液, 在 800rpm 下离心 5 分钟。这时吸出得到的上清液, 将细胞沉淀置于 3ml 如下

组成的培养基中，在 37℃ 的培养箱中在培养皿（直径 100mm）中培养 15 天。

角质细胞生长培养基

(角质细胞生长培养基, KGM)	
DMEM	333.5ml
胎牛血清 (FCS)	50 ml
Ham's F12 培养基	111 ml
青霉素 (100U/1) / 链霉素 (100 μg / 1) 溶液	5 ml
胰岛素溶液 (参见实施例 6)	0.5 ml
总体积	500 ml

营养培养基中包含 5 μg 的表皮生长因子 (参见实施例 7 的精确说明) 和 5mg 的氢化可的松 (参考 Merck 索引: 12, 4828)。

在 15 天的培养期间, 角质细胞条件化培养基 KCCM 形成上清液。每种情形中 2-4 天后用新鲜的营养培养基取代上清液。将每次换培养基得到的 KCCM 过滤除菌在 -20℃ 下贮存。

然后, 在培养皿 (直径 100mm) 或培养瓶中用 10ml 如下组成的培养基培养 1×10^6 去分化干细胞。

角质细胞分化培养基

(角质细胞分化培养基, KDM)	
KCCM	100ml
胰岛素溶液 (参见实施例 6)	0.5ml
表皮生长因子 (EGF)	1 μg
氢化可的松	1mg
角质细胞生长因子 (KGF)	2.5 μg

如 Finch 等人, Gastroenterology 110: 441 (1996) 中所述, 角质细胞生长因子的使用浓度为 25ng/ml。

几天后可以观察到细胞出现形态学上的变化。6 天之后能够检测到角质细胞特异性抗原, 即与使用的一抗都能够结合的细胞角蛋白 5 和 6 (见图 5A) (Exp. Cell. Res. 162: 114 (1986))。10 天之后培

培养基中较大的细胞个体开始粘着，这样就能够看到聚集在一起的细胞形成的可见细胞组织（图 5B）。

实施例 9

由分化的程序化干细胞制备胰岛素产生性细胞

胰岛素产生性细胞的制备是在体积约 250ml 和平壁的培养瓶（T75 细胞培养瓶）中进行的。根据实施例 13 制备的约 5×10^6 的细胞悬浮在约 5ml 的如下所述的培养基（胰岛素产生性细胞分化培养基）中，当其被引入培养瓶后，进一步与 15ml 的培养基混合。为了使细胞去分化，须将培养瓶在 37℃ 和 5% CO₂，水平放置在培养箱中培养。

培养基（根据 Rameya V.K. 等人, Nature Medicine, 6 (3), 278 - 282 (2000) 改良的)

RPMI1640	445 ml
胎牛血清 (FCS)	50 ml
青霉素 (100U/1) / 链霉素 (100 μg / 1) 溶液	5 ml
烟酰胺	620 mg
葡萄糖	360 mg
总体积	500 ml

营养培养基还包含量为 10ng/ml 的表皮生长因子和量为 20 ng/ml 的肝细胞生长因子。

在第一个小时中，细胞贴附于培养容器的底部。干细胞的分化根据胰岛素的产生进行监控。为此在间隔约 2 - 3 天后要改变培养基，每次收集细胞上清液，并于 -20℃ 下冷冻。贴附于培养瓶底部的细胞可通过实施例 2 中所述的胰蛋白酶作用而被剥离。

不同分化时间收集到的上清液中胰岛素含量可通过用于测定人胰岛素的 ELISA 法（酶联免疫吸附测定法）测定（Bruhn D. H Fölsch U. R. (Eds), Lehrbuch der Labormedizin: Grundlagen, Diagnostik, Klinik Pathobiochemie [Textbook of Laboratory Medicine, Principles, Diagnosis, Clinical Pathobiochemistry] (1999), 189 页），并与培养基的空白读数进行比较。图 8 中重复的结果表明

培养至 14 天，细胞胰岛素产量达到最大值。处在分化处理过程中的细胞产生的胰岛素的含量 14 天之后增加到 $3\mu\text{U}/\text{ml}$ ，而在对照组中没有检测到人胰岛素。图 8 中的柱状图形分别代表三个各自独立的试验每次确定的三个独立的数值。

在确定分化成本发明所述胰岛素产生性细胞的去程序化干细胞的胰岛素的含量之后，进而要确定去分化进行 3 周之后仍然能够表达单核细胞特异性表面抗原 CD14 的产生胰岛素的细胞的比例。结果发现，3 周以后有很大比例（约 30 - 40 %）的这些细胞上都检测到了单核细胞特异性抗原 CD14。

实施例 10

由去分化可程序化干细胞制备肝细胞的可选择的方法

如实施例 7 中所述，作为使用肝细胞条件化培养基（LCCM）的替代，干细胞在下述营养培养基（Ha）中被诱导分化成肝细胞。来源于干细胞的肝细胞的制备在体积约 250ml 和平壁的培养瓶（T75 细胞培养瓶）中进行。根据实施例 13 制备的约 5×10^6 的细胞被引入约 5ml 的如下面所述的改良培养基（Ha, 肝细胞分化培养基）中，当其被引入培养瓶中之后，进一步与 15ml 的培养基混合。为了细胞去分化，须将培养瓶在 37°C 和 5 % CO_2 的培养箱中水平放置培养。

肝细胞分化培养基（Ha）（根据 Schwarz 等人，“Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells”，J. Clin. Invest. 10(109), 1291-1302 (2002)）：

RPMI 1640	445ml
胎牛血清（FCS）	50 ml
青霉素（100U/1）/链霉素（100 $\mu\text{g}/1$ ）溶液	5 ml
总体积	500 ml

营养培养基中还含有量为 $3\text{ ng}/\text{ml}$ 的成纤维细胞生长因子（FGF-4）。

在第一个小时之内细胞贴附于培养容器底部。根据白蛋白产生来监控干细胞的分化。为此约间隔 2-3 天换培养基，每次收集的细胞上清液在 -20℃ 下冷冻。贴附于培养瓶底部的细胞可用实施例 2 中所述的胰蛋白酶作用进行剥离。

不同时间收集到的上清液中白蛋白含量可通过用于测定人白蛋白的 ELISA 法（酶联免疫吸附测定法）测定（根据 Bethyl Laboratories Inc. 的规程和 Schwarz 等人，在上述引文中），并与培养基的空白读数进行比较。图 9 的结果显示培养 14-28 天期间细胞的白蛋白生产保持大致恒定。分别在相对于加入 Ha 培养基的时间的第 0（培养基的空白读数）、14、21、28 和 30 天进行检测。每次检测结果分别为 5 ng/ml、450 ng/ml、425 ng/ml、440 ng/ml 和 165 ng/ml。图 9 中的柱状图形分别代表三个各自独立的试验每次确定的三个独立的数值。

实施例 11

来源于去分化干细胞的肝细胞中共表达的白蛋白和单核细胞特异性抗原 CD14 的测定

在来源于去分化干细胞的肝细胞中共表达的白蛋白和单核细胞特异性抗原 CD14 的测定一方面是通过双重染色 (A)，另一方面是通过 FACS 分析 (B) 进行的。

A) 将根据实施例 10 所述的本发明所述分化成肝细胞的干细胞在 6 孔板中的盖玻片上培养，并按照实施例 4 所述用甲醇固定。为了检测同时表达的抗原 CD14（单核细胞表型标记）和白蛋白（肝特异性标记）要使用双重染色。

为此如实施例 4 所述首先将细胞与抗人白蛋白（豚鼠抗人白蛋白）的一抗一起在按 1:50 稀释的 PBS 中培养。洗涤步骤后，然后将细胞也在按 1:50 稀释的 PBS 中与二抗小鼠抗大鼠培养 45 分钟，该二抗结合豚鼠抗体。然后再根据实施例 4 采用 Cordell J.L 等人（在上述引文中）的方法用 APAAP 红色复合物进行染色。

在第二步染色步骤中，细胞与一抗即小鼠抗人 CD14 抗体一起培养，根据实施例 4 洗涤后再使用 Hsu, S.M 等人在 “The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in

immunoperoxidase, technics ” Am. J. Clin. Pathol. 75 (6): 816-821 (1981) 中 dem DAB 复合物 (褐色) (Vector Laboratories) 的方法用 Vectastain (Vector) 的 ABC 链霉抗生物素蛋白试剂盒进行染色。

然后按照实施例 4 所述用 haemalaun 进行核对染,接着将其嵌入 Kaiser's 甘油明胶。

结果如图 10 所示。图中表明抗原 CD14 表达为褐色,其颜色随着细胞转变成肝细胞的形态学变化慢慢褪去,而白蛋白表达为红色,其颜色随着肝细胞的不断成熟而加深。图 10 中第 4 号图显示的是用肝细胞条件化培养基刺激三周后的细胞。

B) 双重标记进行的同时,利用 FACS (荧光激活细胞分类术) 分析对本发明所述干细胞分化成肝细胞进行分析。

根据实施例 10 的由干细胞分化成的肝细胞首先用细胞刮棒将细胞从培养瓶中机械分离。小心的用 PBS 将细胞从瓶上洗下,共洗涤两次,每次使用 10ml PBS 溶液。为此,将 PBS 溶液中细胞悬液置于 15ml 离心管中,在 1600rpm 下离心沉淀。得到的细胞沉淀用 PBS 稀释至每 100 μ l PBS 含有 1×10^5 个细胞。

然后在细胞悬液中加入各 10 μ l 的 FITC-标记的抗 CD14 抗体 (BD Pharmigen) 或 FITC-标记的抗白蛋白抗体 (Beckmann) 以及 FITC-标记的非特异性 IgG1 小鼠抗人抗体。培养 20 分钟之后,细胞在 500 μ l 的 PBS 中重悬两次,每次在 1600rpm 下沉淀 5 分钟,最后再转入 200 μ l 的 PBS 中。将细胞再次混悬后,利用 BD Bioscience 公司出产的 BD FACScalibur 流式细胞仪检测荧光 (参见 Franklin Lakes, NJ) (参见 Bruhn H. D Fölsch U.R. (eds.), Lehrbuch der Labormedizin: Grundlagen, Diagnostik, Klinik Pathobiochemie [Textbook of Laboratory Medicine, Principles, Diagnosis, Clinical Pathobiochemistry], 395-403 (1999), 以及 Holzer U 等人, “Differential antigen sensitivity and costimulatory requirements in human Th1 and Th2 antigen-specific CD4 (+) cells with similar TCr anidity ” J. Immunol. 170 (3): 1218-1223 (2003))。使用 Marquez M. G. 等人 “Flow cytometric analysis of intestinal intra-epithelial lymphocytes in a model of

immunodeficiency in Wistar rats" Cytometry 41 (2): 115-122 (2000) 中介绍的微软 WinMDI 程序对结果进行评价。

FACS 分析的结果在图 11 中再现。图中显示了在本发明所述去分化单核细胞 (左栏) 和分化成肝细胞的干细胞 (右栏) 中测量的 CD14 (上面一排) 和白蛋白抗原 (下面一排) 的表达。在去分化单核细胞中能检测到 CD14 的大量表达, 检测不到白蛋白的表达。而在由去分化单核细胞生成的肝细胞中检测到较少的 CD14 的表达, 白蛋白的表达则很强。

实施例 12

单核细胞来源的去分化程序化干细胞的体内应用

为了阐明可程序化干细胞在体内利用肝脏中存在的信号提供者而进行特异分化的程度, 首先将雌性 LEW 大鼠的肝脏用倒千里光碱处理来抑制肝脏中已有肝细胞的增殖活性 (参见 Lacone, E 等人 "Long-term, 11 ear-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine" Am. J. Path. 153: 319-329 (1998)), 然后将所述可程序化干细胞经门静脉注射入遗传上相同的受体动物的肝脏。

为此 LEW 大鼠在 14 天内腹膜内两次注射 30mg 双吡咯烷类生物碱倒千里光碱。随后切除经上述方法处理的肝脏的 80%, 然后将含有 5×10^5 的可程序化干细胞的 1ml PBS 溶液注入剩余肝脏的门静脉。如实施例 2 所述干细胞来自于雄性 LEW 大鼠的单核细胞。注入干细胞 5 天以后, 利用肝脏活组织穿孔对肝脏进行组织学评价, 利用具有 Y 染色体特异性探针的荧光原位杂交 (FISH) 方法检测由干细胞分化的细胞的类型 (详细记载见 Hoebee, B. 等人 "Isolation of rat chromosome-Specific paint probes by bivariate flow sorting followed by degenerate oligonucleotide primed-PCR" Cytogenet. Cell Genet. 66: 277-282 (1994))。

图 7A 显示的是给倒千里光碱预处理过并切除 80% 的雌性受体动物的肝脏进行门脉内注射第五天时, 由雄性 LEW 干细胞生成的 Y 染色体阳性 (细胞核中有红点) 的肝细胞。干细胞注射后第 25 天选择性去除同样的肝脏表明干细胞分化成肝细胞、内皮细胞和胆管上皮

(图 7B)。与此同时,肝脏已经达到正常大小,>90%的细胞具有 Y 染色体。由此可以推断注射的同源的可程序化的单核细胞源的干细胞能够在体内有效的完全恢复肝脏正常代谢功能。与此相关,图 7C 表示在施用倒千里光碱和 80%肝脏切除后,干细胞处理的对未处理的受体大鼠的 Kaplan-Meier 存活曲线(每组 n=4)。

功能性参数胆红素和氨证实了干细胞处理的长期存活的动物具有完整的代谢功能(图 7D 和 7E)

实施例 13

细胞培养瓶中单核细胞的增殖和去分化

在含有相同的营养培养基的培养瓶中,一方面进行单核细胞的大规模培养和增殖,另一方面进行细胞大量去分化,这也可以用于孔板中的培养(参见实施例 2)。营养培养基中包含 $2.5\mu\text{g}/500\text{ml}$ 的 M-CSF 和 $0.2\mu\text{g}/500\text{ml}$ 白细胞介素 3 (IL-3)。

将实施例 1 中分离的单核细胞转入体积为 250ml 和平壁的培养瓶底部(T-75 细胞培养瓶)。约 $10\text{倍} \times 10^6$ 的细胞被转入每个装有 20ml 上述营养培养基的培养瓶中。根据已知的方法(参见 Hay R. J., “ ”, Academic Press (2002), 第 4 章, 55-84 页)确定每瓶中确切的细胞数量。

细胞培养瓶在 37°C 培养箱中培养 6 天。24 小时之后,细胞贴附于瓶底。每隔一天移走上清液,并加入 20ml 新鲜的培养基。

第六天,将营养培养基从瓶中吸出,然后将每个培养瓶用 10ml PBS 漂洗两次。至此,所有没有贴附于瓶底的细胞都被移走。随后将贴附于瓶底的生长的细胞用无菌细胞刮棒剥离下来。用 PBS 冲洗从瓶上剥离的分离的细胞,收集在 50ml 的 Falcon 管中,1800rpm 下离心 10 分钟。然后弃去上清液,沉淀再用新鲜的 RPMI1640 培养基再次悬浮($2\text{ml}/10^5$ 细胞)。

细胞悬浮液可直接用于分化成不同的靶细胞。

也可以离心后将细胞与作为冷冻培养基的 DMSO/FCS 混合,以 $10^6/\text{ml}$ 的浓度深度冷冻。

冷冻培养基含有 95% 的 FCS 和 5% DMSO。约 10^6 的细胞加入 1ml 介质中。按照如下的步骤冷却:

冰浴 30 分钟;

在 -20°C 预冷的可发泡性聚苯乙烯盒中 2 个小时;

在 -80°C 的可发泡性聚苯乙烯盒中 24 个小时;

在 -180°C 液氮 (N_2) 中的试管中贮存。

图1 形成神经元和神经胶质细胞的分化

左 (GFPA)

中 (S100)

右 (突触泡蛋白)

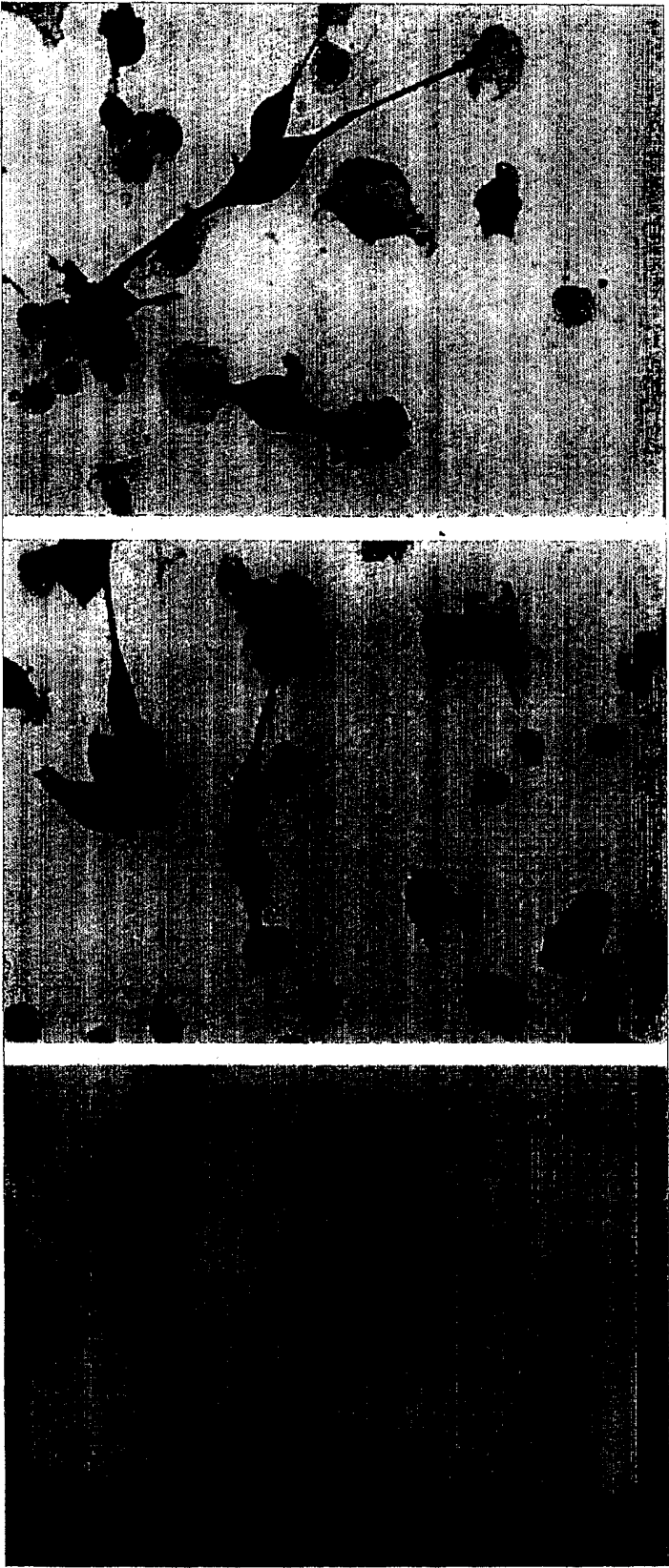
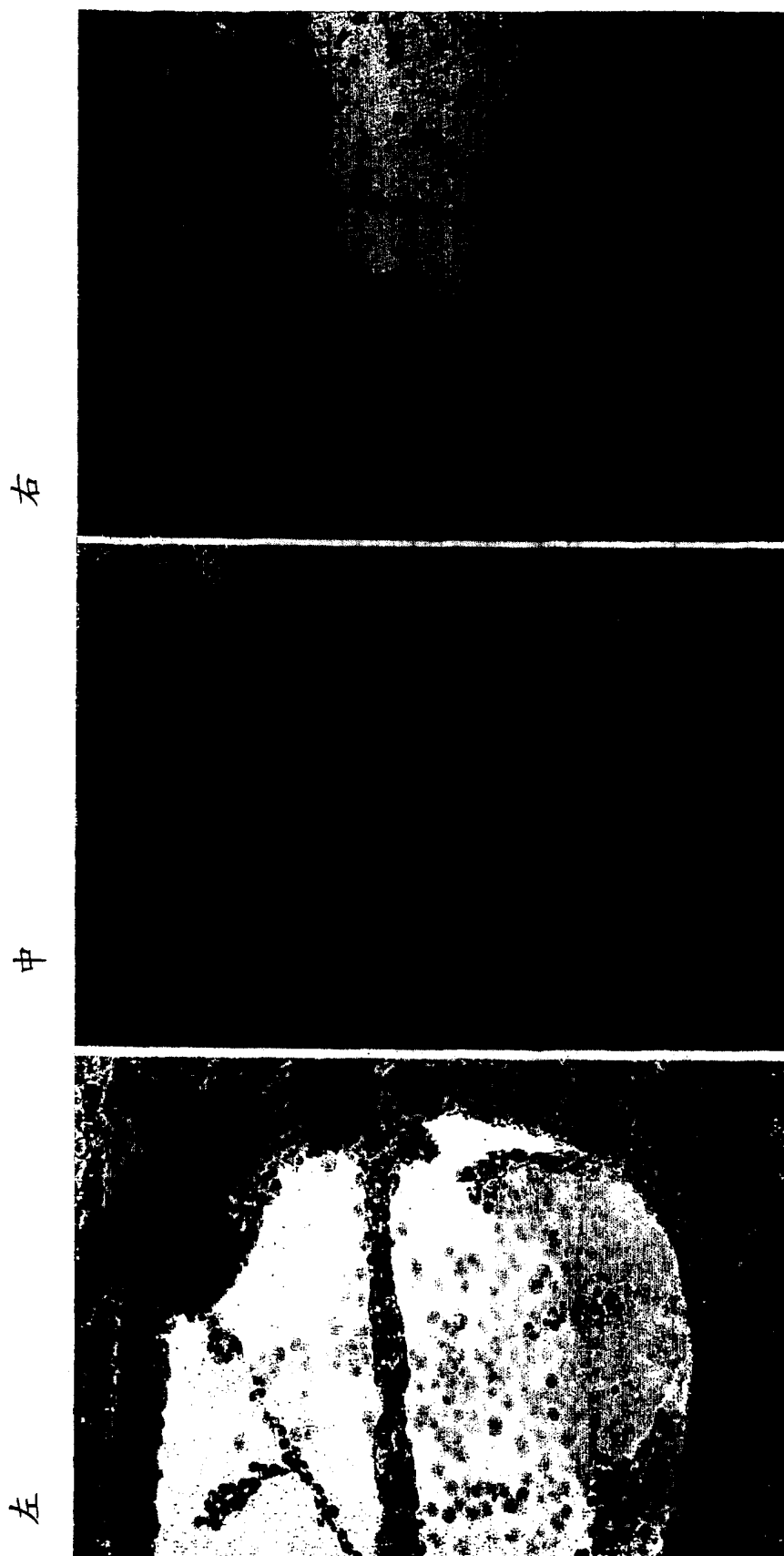


图2形成内皮细胞的分化



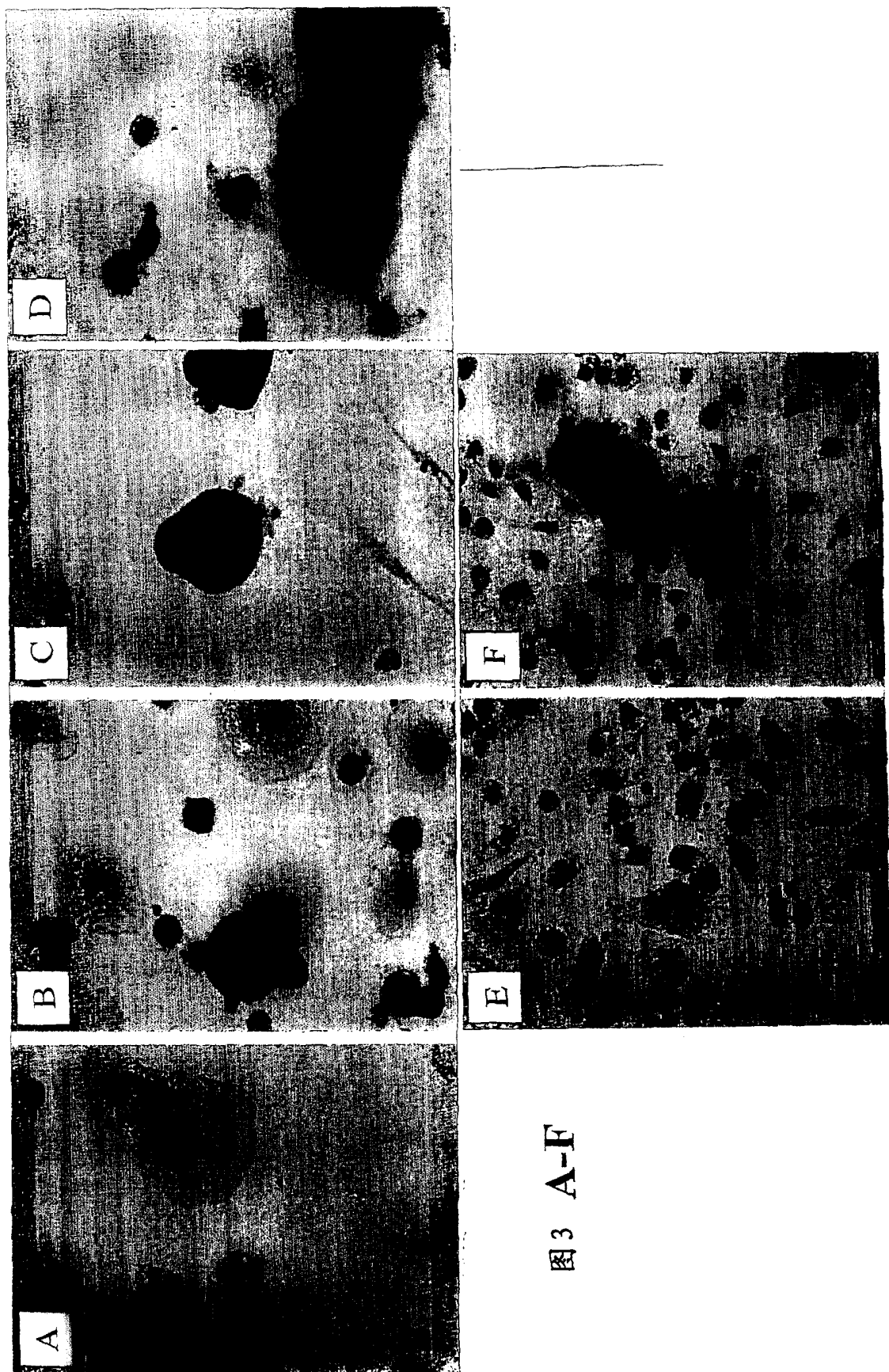
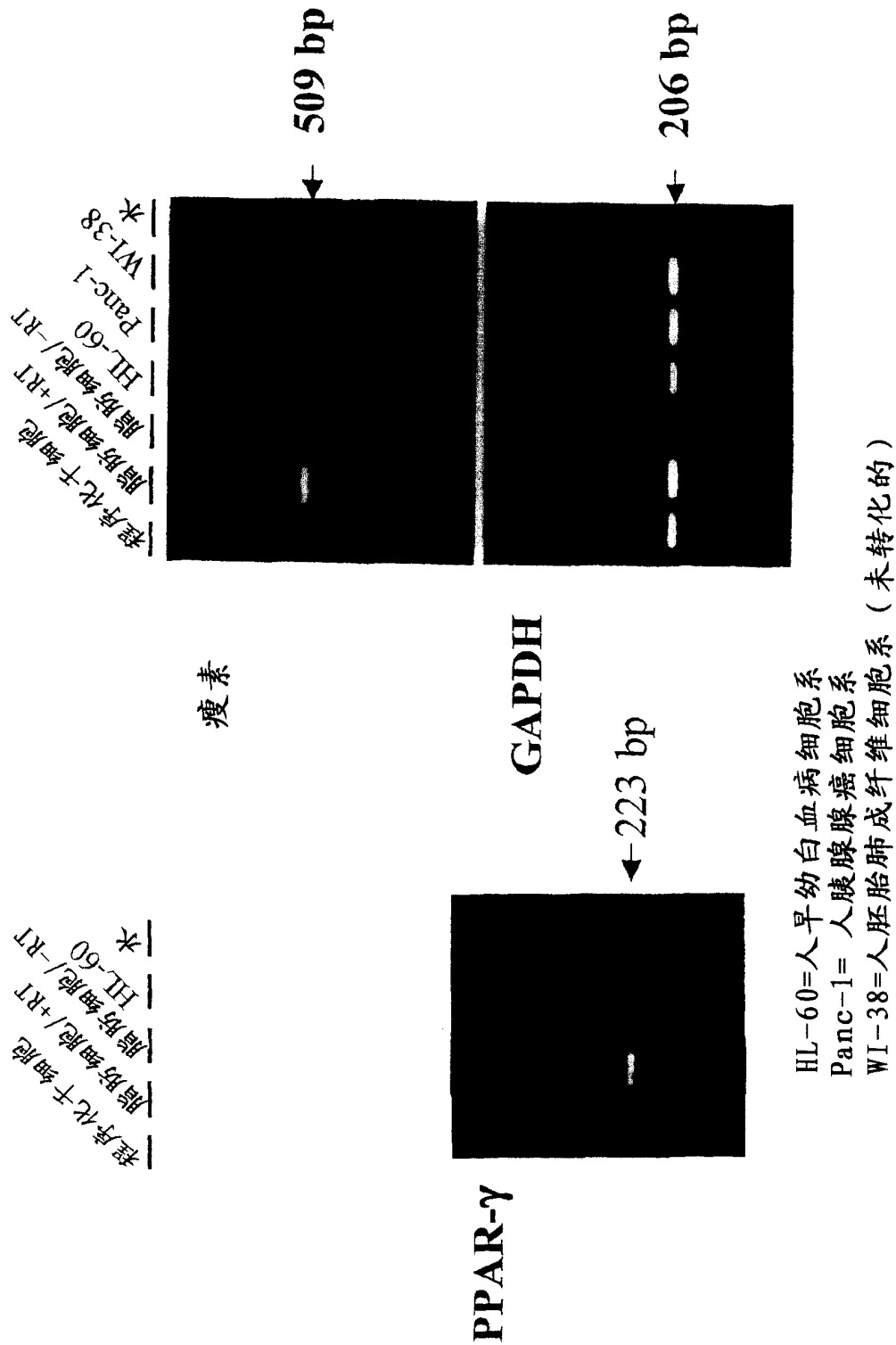


图3 A-F

图3G在单核细胞可程序化的干细胞和由其程序化得到的脂肪细胞中
脂细胞的特异性基因的RT-PCR分析



由单核细胞来源的可程序化干细胞得到的 α 胎蛋白阳性的肝细胞

图4A: 干细胞与LCGM
培养的第6天



图4B: 干细胞与LCGM培养
的第10天



图4C: 干细胞与LCGM培养
的第12天

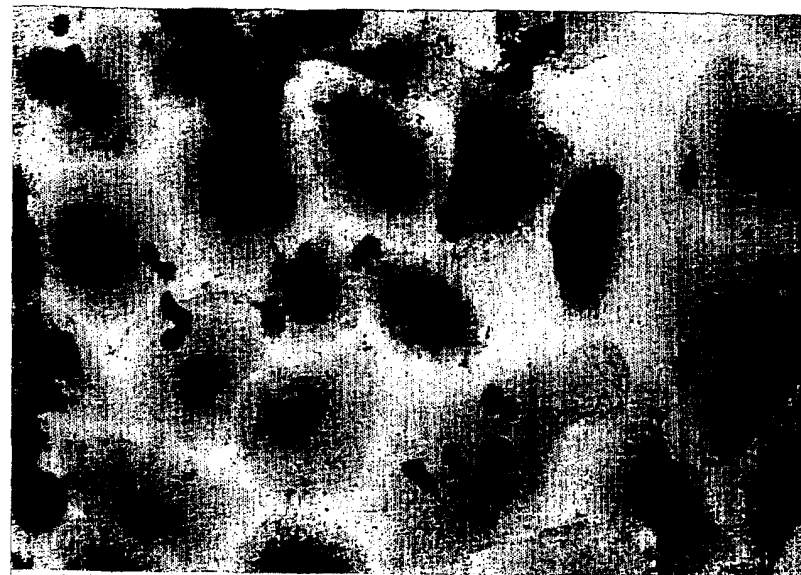
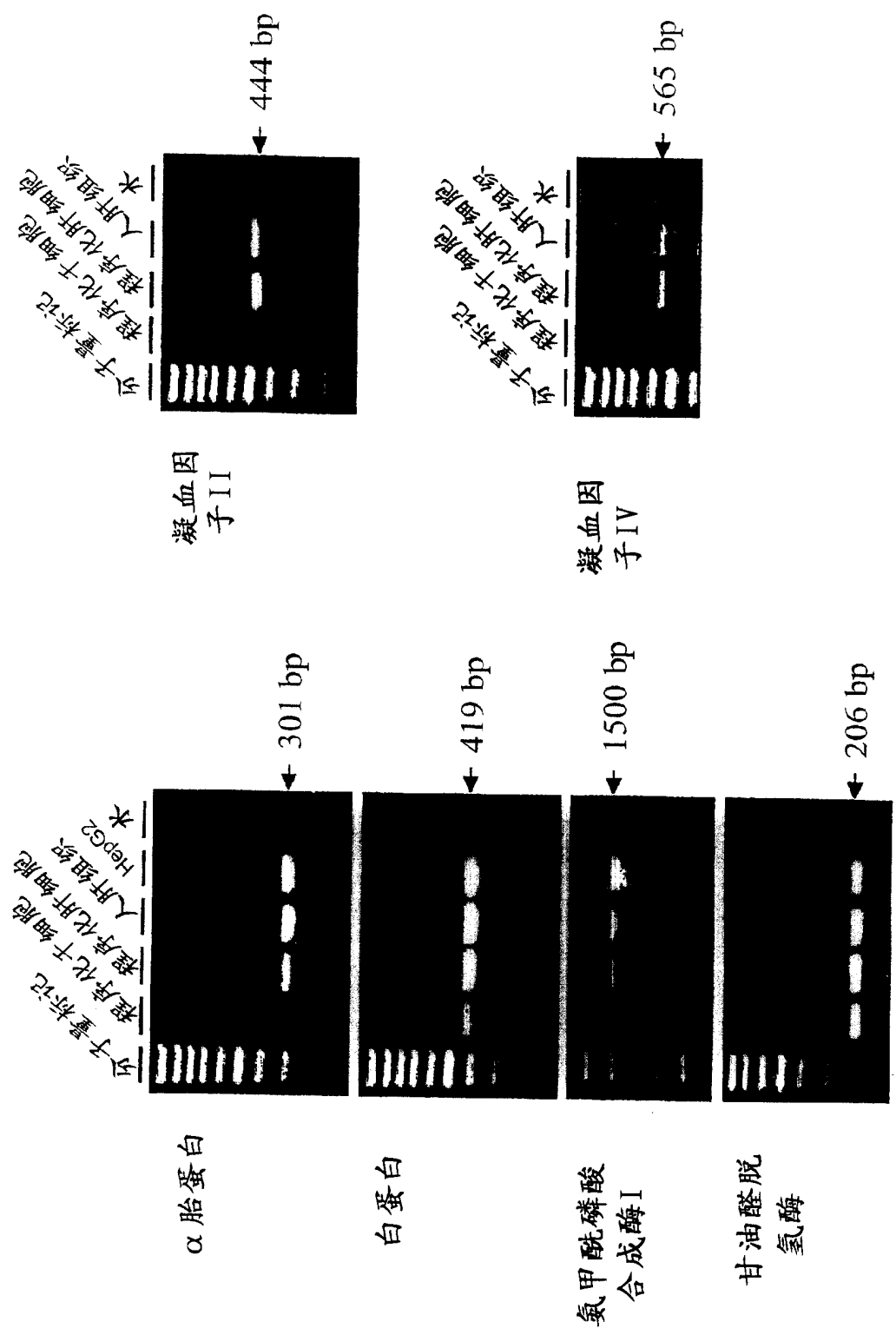


图4D 可程序化干细胞和程序化的肝细胞的肝细胞特异性
的基因的RT-PCR分析



由单核细胞来源的可程序化干细胞得到细胞角蛋白5和6
阳性的角质细胞

图5A: KCGM处理的第6天
(角质细胞条件培养基)

图5B: KCGM处理的第10天
(角质细胞条件培养基)

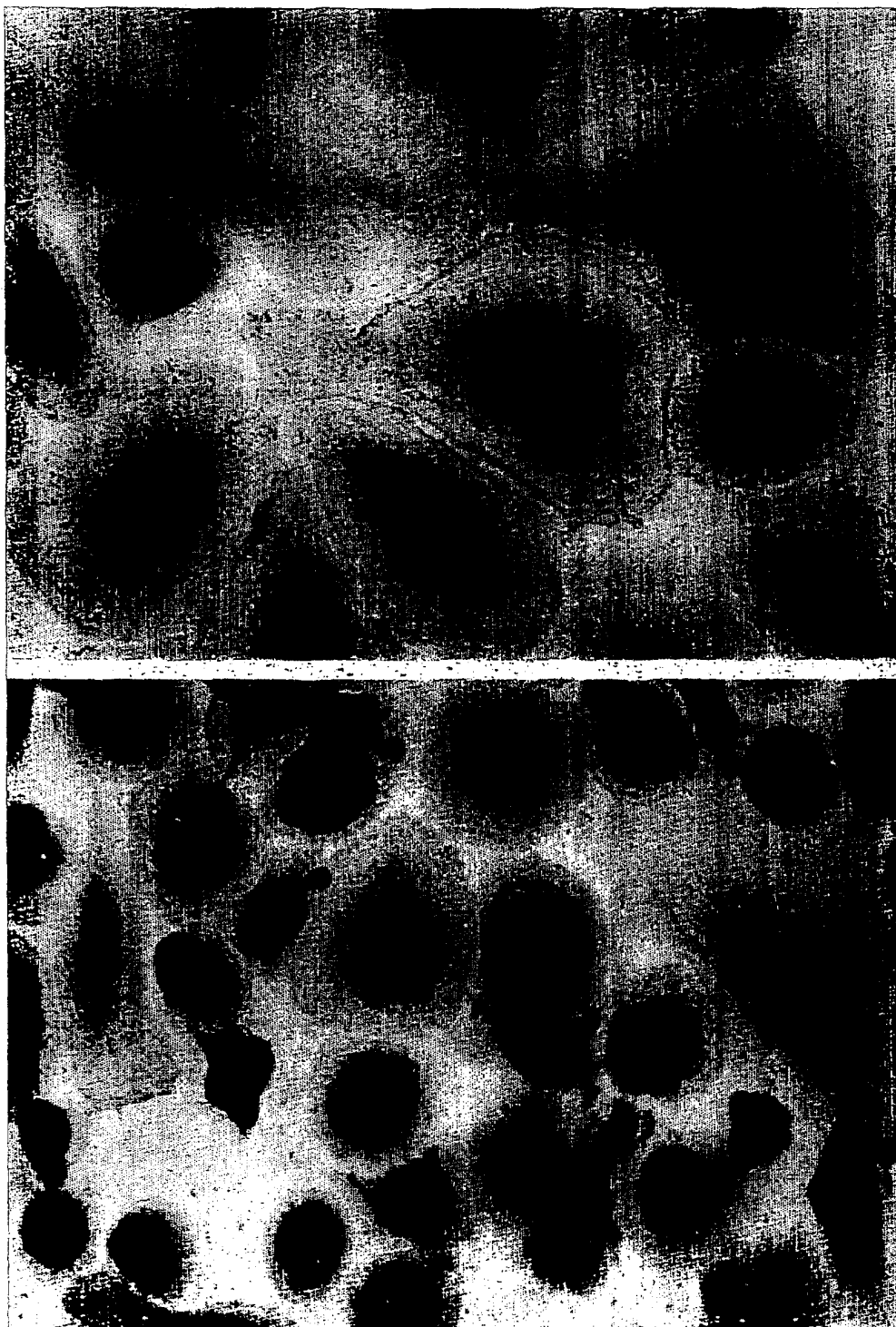
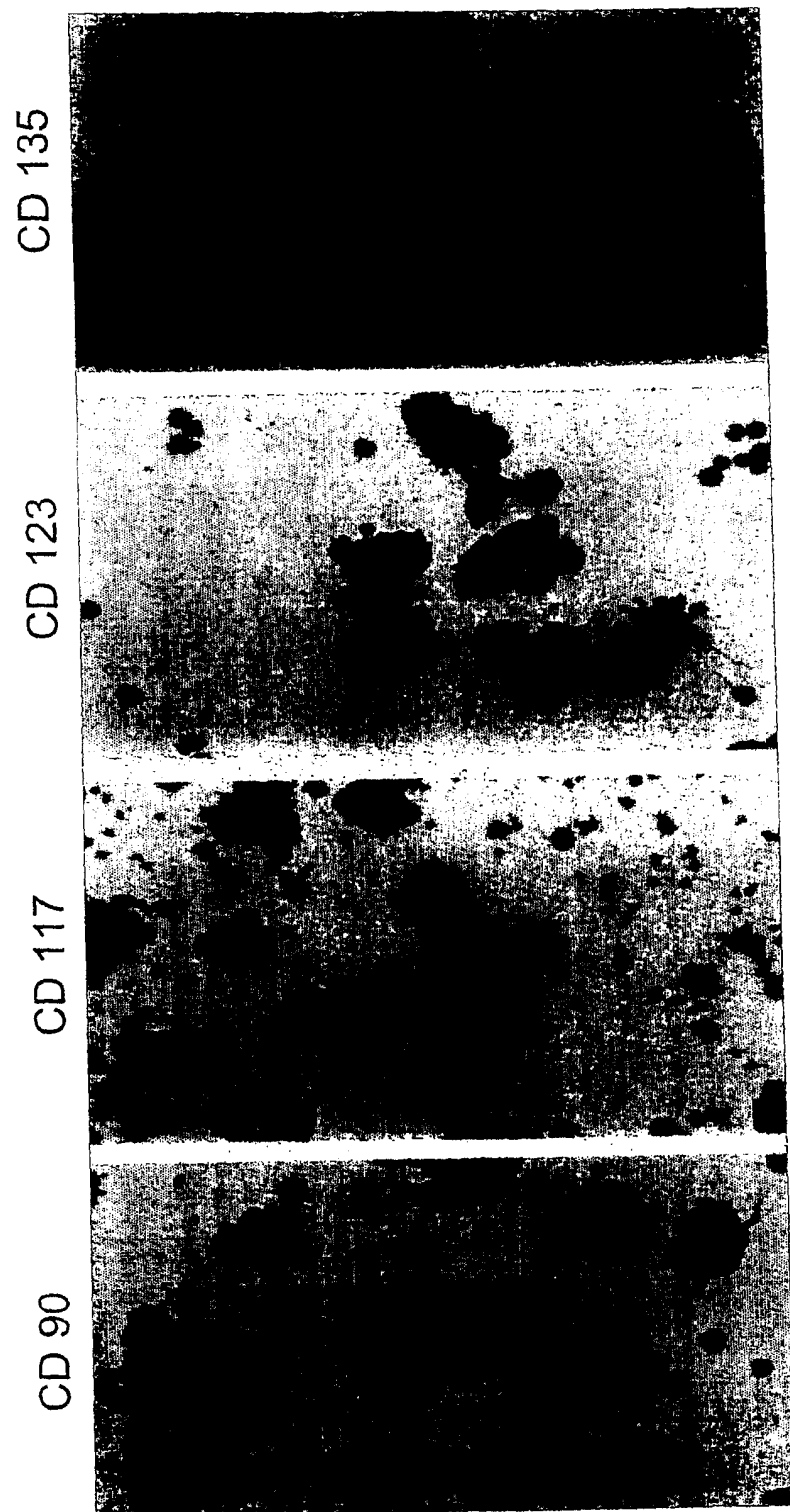


图6单核细胞来源的去分化的可程序化干细胞的干细胞标记



根据说明书所述得到去分化的可程序化干细胞显示出明显的CD117
的阳性表达和干细胞标记CD90、CD123和CD135 的强阳性表达。

图7A 来源于干细胞的肝细胞中的FISH Y染色体检测



图7B来源于干细胞的肝细胞 (↑)
内皮细胞 (↑) 和胆管上皮 (↑) 中的FISH Y染色体检测



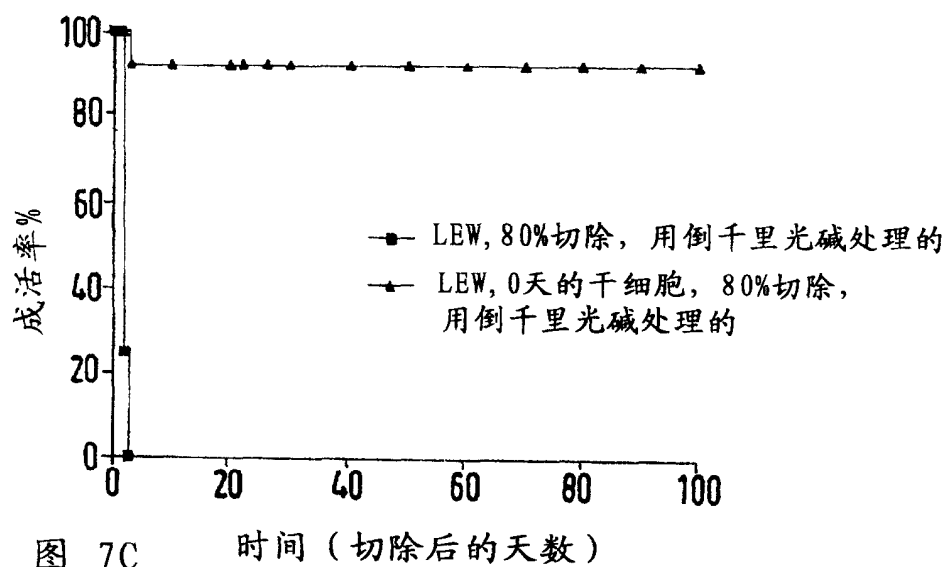


图 7C

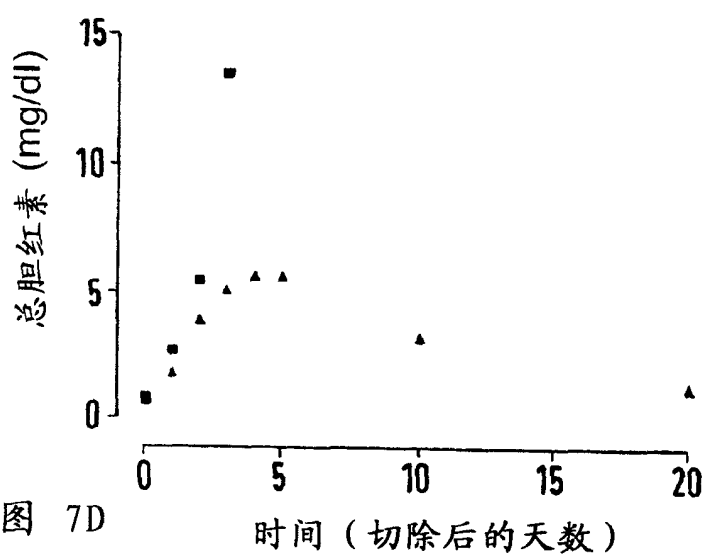


图 7D

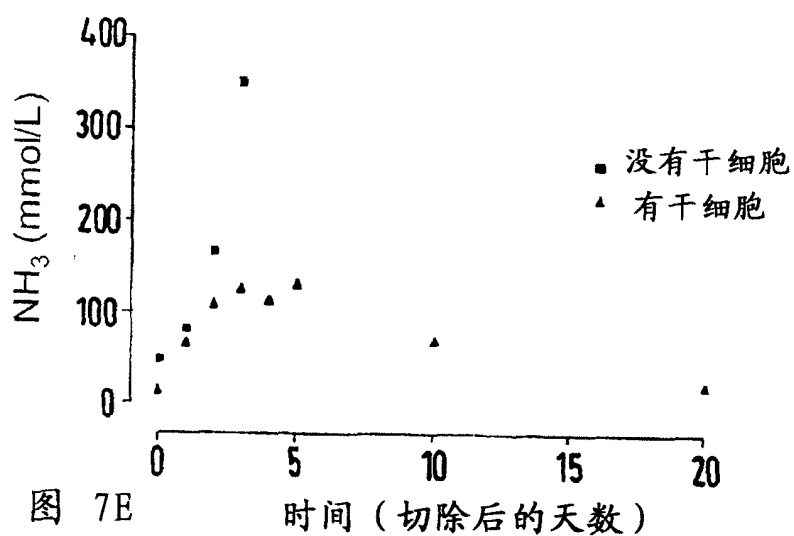


图 7E

图8 胰岛素产生性细胞

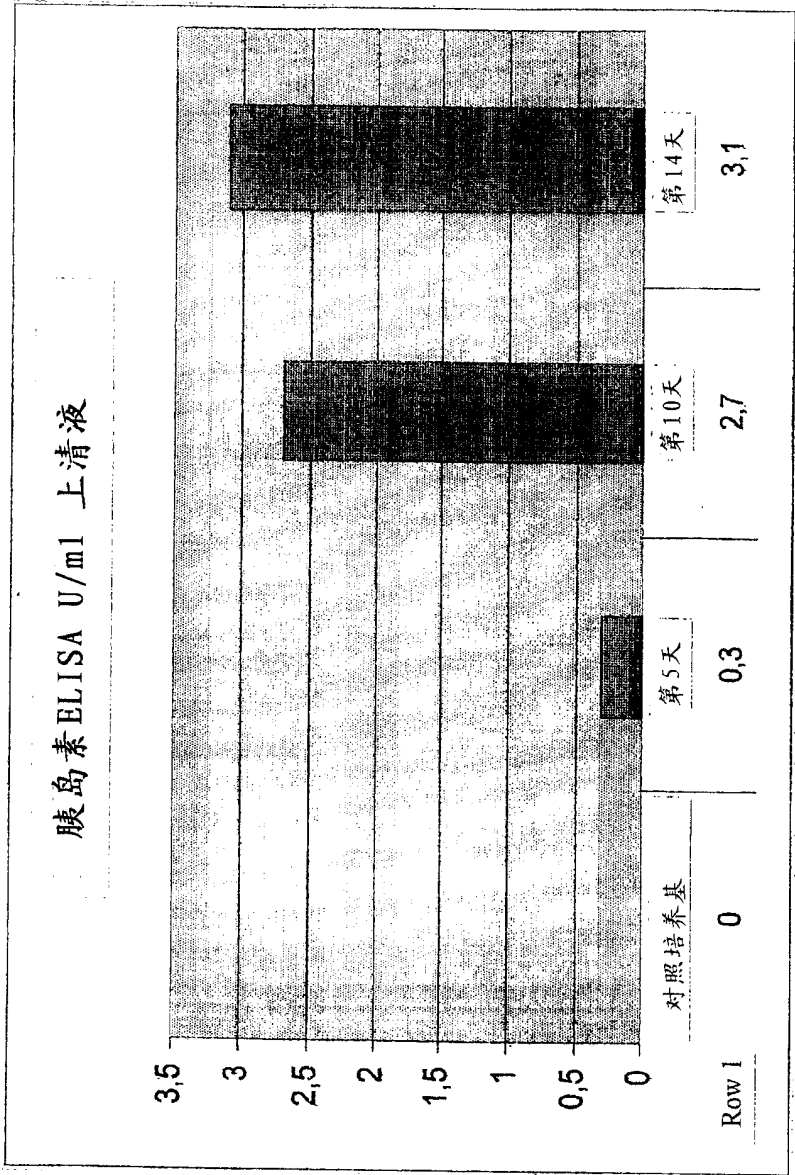


图9 肝细胞样细胞白蛋白产生时间过程

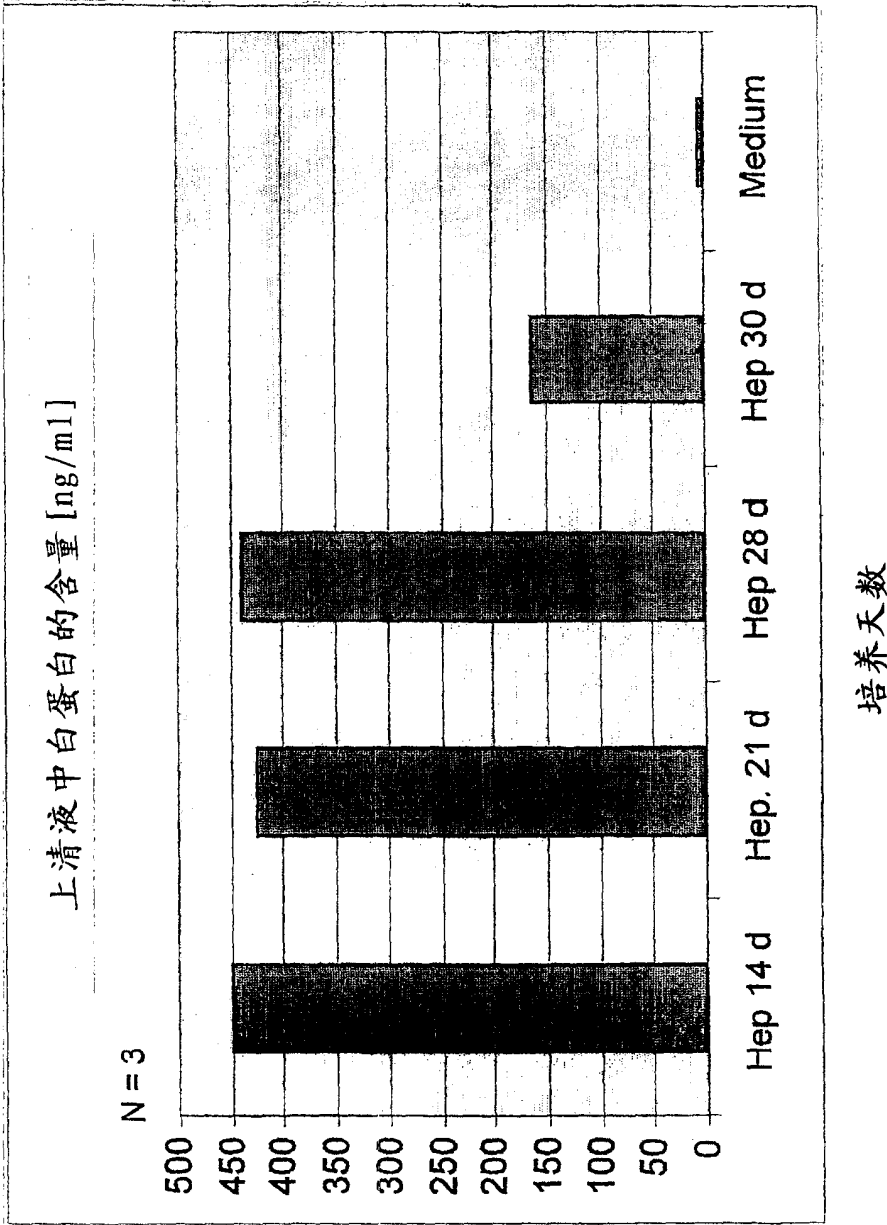


图10 来源于单核细胞的肝细胞

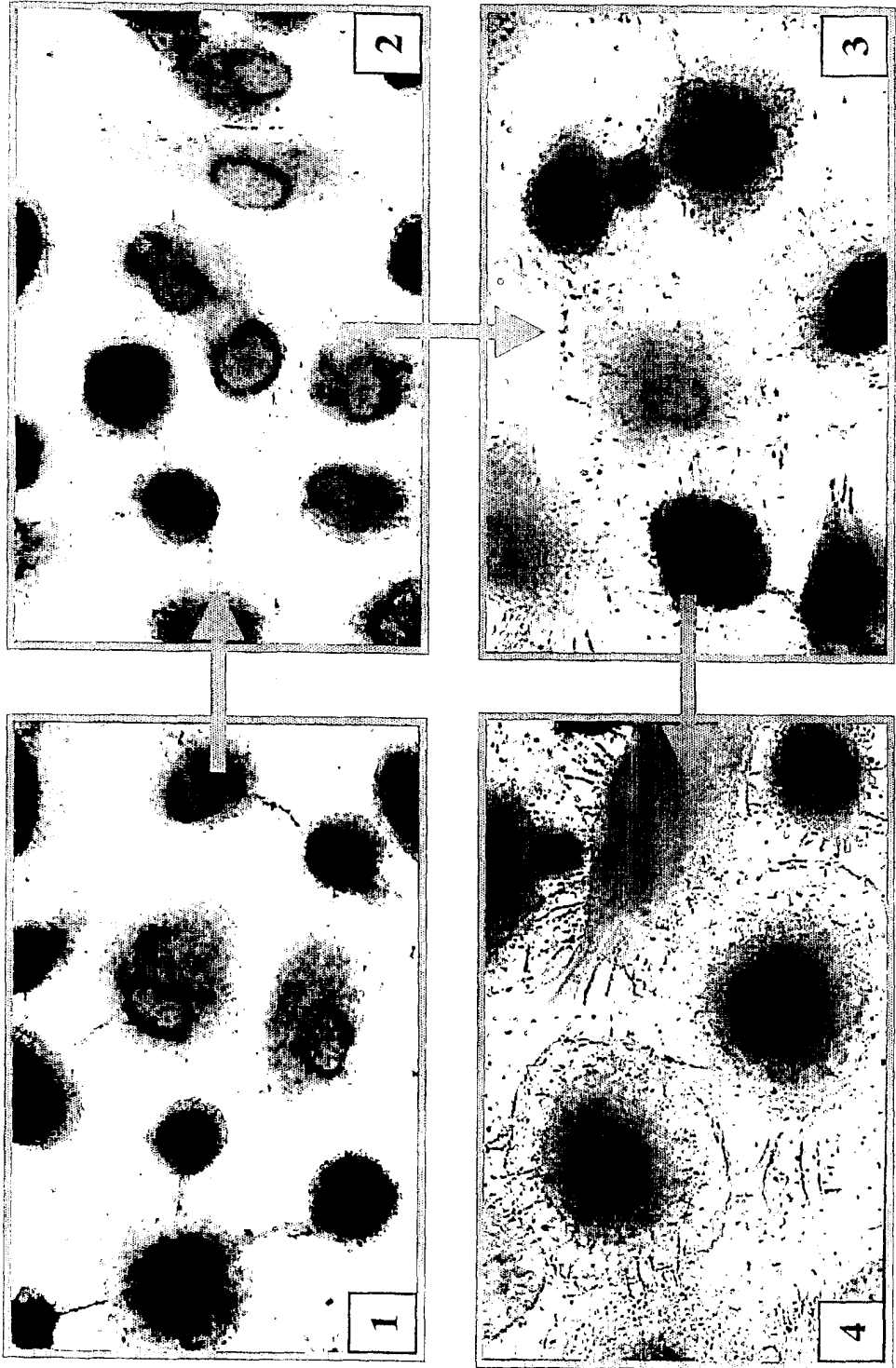


图11 FACS分析

