

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/00

C12N 5/08

C12N 15/63



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02816528.4

[43] 公开日 2005 年 9 月 7 日

[11] 公开号 CN 1665920A

[22] 申请日 2002.6.21 [21] 申请号 02816528.4

[30] 优先权

[32] 2001.6.22 [33] US [31] 60/300,535

[86] 国际申请 PCT/US2002/019646 2002.6.21

[87] 国际公布 WO2003/000848 英 2003.1.3

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.23

[71] 申请人 干细胞股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 E·拉加西 T·奥斯丁

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 3 页 说明书 25 页 附图 13 页

[54] 发明名称 肝移植细胞、测定及其应用

[57] 摘要

提供了充分浓缩的哺乳动物肝移植细胞群体。提供了分离和培养这种肝移植细胞的方法。从许多的来源获得祖细胞，包括胎儿和成人组织。所述细胞在实验评价移植中 useful，并可作为谱系和细胞特异性产物的来源，包括对于确认这些细胞中特异性表达的基因有用的 mRNA 种型，以及作为发现可影响它们的因子或分子的目标。

ISSN 1008-4274

1. 一种从肝组织分离的哺乳动物肝移植细胞的组合物, 其特征在于, 所述组合物中至少 80% 的细胞特征为 R2, 且选自 5E12; Ep-Cam; CD49f; 和 E-钙粘着蛋白以及 HLA^低 5 及 HLA^低 的标记呈阳性;

所述组合物包含能够生长为成熟肝细胞的细胞。

2. 如权利要求 1 所述的肝移植细胞组合物, 其特征在于, 所述细胞是 CD117 和 CD14 阴性的。

3. 如权利要求 1 所述的肝移植细胞组合物, 其特征在于, 所述细胞是人类细胞。

- 10 4. 如权利要求 1 所述的肝移植细胞组合物, 其特征在于, 所述细胞经遗传修饰而包含外源 DNA 载体。

5. 一种富集哺乳动物肝移植细胞组合物的方法, 其中, 所述组合物中至少 80% 的细胞特征为 R2, 且选自 5E12; Ep-Cam; CD49f; 和 E-钙粘着蛋白以及 HLA^低 的标记呈阳性, 其特征在于, 所述方法包括:

- 15 将特异性识别 5E12、Ep-Cam、CD49f 和 E-钙粘着蛋白的试剂和特异性识别 I 型 HLA 抗原的试剂及肝细胞样品结合;

选择 R2 群体;

选择那些选自 5E12; Ep-Cam; CD49f 和 E-钙粘着蛋白的标记呈阳性的细胞,

选择那些低阴性表达 I 型 HLA 抗原的细胞;

- 20 以提供有肝移植活性的细胞富集群体。

6. 如权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括选择阴性表达 CD117 和 CD14 的细胞的步骤。

7. 如权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞是人类细胞。

- 25 8. 一种为宿主动物提供功能性肝细胞和/或胆囊细胞的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

将包含完全纯净的哺乳动物肝移植细胞组合物的细胞群体导入所述宿主动物, 其中, 所述组合物中至少 80% 的细胞特征为 R2, 且选自 5E12; Ep-Cam; CD49f; 和 E-钙粘着蛋白以及 HLA^低 的标记呈阳性。

9. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞阴性表达 CD117 和 CD14。

- 30 10. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞是人类细胞。

11. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述功能性肝细胞分泌白蛋白或

α -1-抗胰蛋白酶。

12. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述功能性肝细胞分泌 α -1-抗胰蛋白酶。

13. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述功能性肝细胞分泌白蛋白。

5 14. 如权利要求 1 所述的肝移植细胞组合物，其特征在于，所述细胞经遗传修饰而包含外源 DNA 载体。

15. 一种体外细胞培养物，其特征在于，所述培养物包含哺乳动物肝移植细胞，所述细胞特征为 R2，且选自 5E12；Ep-Cam；CD49f；和 E-钙粘着蛋白以及 HLA^低 标记呈阳性，所述培养物带有或不带有饲养细胞层。

10 16. 如权利要求 15 所述的体外培养物，其特征在于，所述哺乳动物肝移植细胞是人类细胞。

17. 一种嵌合型免疫缺陷小鼠，FAH^{-/-}小鼠或 FAH^{-/-}免疫缺陷小鼠，其特征在于，所述小鼠包括：

15 从完全纯净的哺乳动物肝移植细胞组合物产生的功能再生肝细胞和/或胆囊细胞，其中，所述组合物中至少 80% 的细胞特征为 R2，且选自 5E12；Ep-Cam；CD49f；和 E-钙粘着蛋白以及 HLA^低 标记呈阳性。

18. 如权利要求 17 所述的嵌合小鼠，其特征在于，所述哺乳动物的肝移植细胞是人类细胞。

19. 一种筛选在哺乳动物肝移植细胞中特异性表达的遗传序列的方法，其特征
20 在于，所述方法包括：

从权利要求 1 所述的细胞群体、权利要求 15 所述的体外细胞培养物或权利要求 17 所述的嵌合小鼠中分离出 RNA，

从所述 RNA 制造探针，

筛选与所述探针杂交的核酸群体。

25 20. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括在所述肝移植细胞和第二种不同细胞群体间比较所得杂交结果。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述核酸群体以阵列表现。

22. 一种筛选影响哺乳动物肝移植细胞生存能力、生长、代谢功能或分化的方法，其特征在于，所述方法包括：

30 接触如权利要求 1 所述的细胞群体，如权利要求 15 所述的体外细胞培养物或如权利要求 17 所述的嵌合小鼠，并

测定所述试剂对所述肝移植细胞生存能力、生长、代谢功能或分化的影响。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述试剂是怀疑对人肝细胞有毒性的药物。

24. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述试剂是人类肝炎病毒。

5 25. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述试剂是人类肝炎病毒疫苗。

26. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，所述试剂是抗病毒试剂。

肝移植细胞、测定及其应用

5

介 绍

机体依靠肝脏来发挥许多重要的功能,包括调节、合成以及分泌许多维持机体正常状态的重要物质;存储许多营养物质如糖原(葡萄糖)、维生素和矿物质;提纯、转化和清除废物质、药物和毒素。然而,它独特的特性和功能使得它容易受到许多因素的损害,这样的损害对于一个人的健康影响甚大。

10 肝脏中最丰富和代谢最活跃的细胞是肝实质细胞。肝小叶是六边形的,在周围有6个门三联体,每个包含一门静脉分支、肝动脉分支和胆管,它们都由一层肝细胞紧紧连接在一起。肝细胞很少分裂,但它们具有对于合适的刺激会反应性增殖的独特能力,例如取走一部分肝脏。这个过程包括限制性的增生,那通常使得肝脏恢复到在它原来重量的5-10%之内。

15 肝脏具有在损伤后独特的再生能力。这一过程开始是“成熟”肝细胞的增殖;其他细胞谱系包括胆管上皮细胞(BEC)和窦状隙细胞稍后增殖。肝再生在部分肝切除术以及受伤而损害了部分肝脏如病毒、毒素或缺血性损害之后起着重要的作用。然而,过度的损害会达到“不可逆点”,然后正常组织就被疤痕组织替代。肝脏的再生能力也由于预先存在的或重复发生的肝损害或疾病而削弱。

20 已经发现许多表面决定簇是骨髓源性干细胞和能生长为肝细胞的细胞所共有的,包括啮齿动物中的c-kit、CD34和Thy-1,以及人类中的c-kit和CD34(见Omori等,(1997)Hepatology 26:720-727; Lemmer等(1998)J.Hepatol 29:450-454; Peterson等(1998)Hepatology 27:433-445; *ibid*(1999)Science 284:1168-1170; Baumann等(1999)Hepatology 30:112-117; Lagasse等(2000)Nature Med 11:1229-
25 1234)。这些发现对于基因治疗和肝细胞移植具有重要的临床含义,这是两种治疗暴发性肝衰竭和肝脏遗传代谢紊乱的新方法。

一些事实表明一些不成熟的肝细胞系可以BEC和肝细胞都不同。例如Fiorino等(1998)In Vitro Cell Dev Biol Anim 34(3):247-58报导了分离了有条件转化的肝祖细胞系。Coleman和Presnell(1996)Hepatology 24(6):1542-6讨论了增殖
30 肝细胞培养物中表型的转变,这表明了成熟肝细胞有两种不同分化的能力。卵细胞

前体被认为位于 Herring 管或临近胆管。对于卵细胞增殖来说胆管细胞是需要的，表明它要么是前体的来源或它起到支持或诱导的作用。Kubota 等，国际专利申请 WO02/28997 揭示了一种 ICAM-1 表达前体细胞群体。

中间丝蛋白，特别是胆管特异性细胞角蛋白 19(CK19)和肝细胞特异性 HepPar1 抗原在肝器官形成过程中限定了肝前体细胞发展的进程。小管肝细胞增殖共同含有肝细胞和 BEC 的表型特征。在肝细胞分化的过程中，HepPar1 抗原的表达增加，CK14 和 CK19 的表达丢失。相比之下，当前体细胞转化为管板细胞时，CK19 在分化了的胆管表达增加，然而 CK14 和 HepPar1 抗原的表达丢失。所以肝前体细胞分化步骤的标志就是获得或丢失特异性的表型特征。所述前体细胞定向分化为肝细胞或胆管上皮细胞谱系结果是导致一种标记的表达和其他标记的丢失。早期的报导提出在活体中存在这样两种能力的前体细胞，见于 Douarin(1975)Med. Biol. 53: 427-455; Shiojiri 等 (1991)Cancer Res. 51:2611-2620; Haruna 等 (1996) Hepatology 23(3):476-81; Tatenno 和 Yoshizato(1996)Am J Pathol 149(5):1593-605; 和 Haque 等(1996) Lab Invest 75(5):699-705。白蛋白和 α -胎蛋白的表达也是肝细胞有用的标记。

肝前体细胞的讨论可见于 Susick 等(2001)Ann. N. Y. Acad. Sci. 944:398-419; 美国专利第 5,576,207 号; 以及美国专利申请第 20020016000 号。

为了进一步描述肝前体细胞以及它们来源细胞的特征，关键是要有很好定义的模型系统，它能够解释“环境”因素和调节细胞更新的内在细胞因素之间复杂的相互作用，这和特异性细胞表型的定义能够使得成熟肝细胞生长是一样的。对于调节正在发育和成年肝脏以及胆树中细胞谱系的特性和分化因素的确认和描述是有重要意义的。对于肝脏移植细胞的进一步描述有重要的科学和临床意义。

发明概述

提供了分离和描述肝移植细胞(LEC)的方法，它是具有移植到肝脏和促进分化肝细胞增长能力的前体细胞。所述细胞可根据前向扫描和自身荧光来分离，和/或通过特异的细胞表面标记物的表达。所述细胞在实验评价的移植中 useful，并可作为谱系和细胞特异性产物的来源，包括对于确认这些细胞中特异性表达的基因有用的 mRNA 种型，以及作为发现作用于它们的因子或分子的目标。

为肝移植细胞的生长和分析，包括克隆分析，提供了体外和活体系统。促克隆形成测定可在体外存在一饲养层间质细胞时实施。所述细胞也可以在体外不存在饲

养层时扩增。这些培养系统适合培养和描述肝移植细胞。在活体中所述细胞移植到肝脏,这种移植可以通过 FAH 缺陷型动物肝细胞的种群恢复(repopulation)来进行实验性的测试。

- 已发现所述肝移植细胞在评价和肝特异性病毒相关的治疗中有效,例如肝炎 A、B、C、D、E 病毒等,尤其是人类肝炎病毒。还发现所述细胞在培养肝细胞增殖的毒理学测试中 useful,并作为一种提供肝代谢副产物的方法,例如肝细胞药物转化的产物。

附图简述

- 图 1A 显示了人类胎儿肝细胞前向扫描、自身荧光和生存力(碘化丙锭)的染色,以及根据这些特征分为 R1 和 R2 群体。图 1B 显示了 R2 群体中亚群细胞抗原决定簇 5E12 和 I 型 HLA 的表达。

图 2A 和 2B 显示了 R2 群体白蛋白和 CK19 的异类表达,在 5E12 表达分类之前。

图 3A-3D 显示了人类胎儿肝细胞的表型分析。

- 图 4 显示了来自带有 5E12、EpCAM、CD49f、E-钙粘着蛋白和 HLA 的 R2 群体的细胞染色。图 4A、4D 和 4G 显示了 5E12 对比 I 型 HLA 染色。多边形区域表明了用来挑选 5E12⁺、HLA^低 LEC 的门。图 4B、4E 和 4H 显示了分别利用 E-钙粘着蛋白; EpCAM 和 CD49f 相应的图,如 x 轴。图 4C、4F 和 4I 显示了在图 4B、4E 和 4H 中门控表达 5E12 的群体分析。数据表明 5E12、EpCAM、E-钙粘着蛋白和 CD49f 之间的染色的等价。

图 5A-5F 显示了来源于体外培养两个星期后的人类胎儿肝 LEC 群体上白蛋白、 α -胎蛋白(afp)和 CK19 的染色。

- 图 6A 和 6B 显示了循环的人类 α -1-抗胰蛋白酶(AAT) (9A) 和来自 NOD-SCID 小鼠的血清白蛋白(ALB) (9B) 的水平,其中这些小鼠是接受了总肝细胞、分选的总肝细胞或分选的 R2 5E12⁺HLA^低细胞移植 6 周后的小鼠。这些数据表明了来自 LEC 的功能性肝细胞的移植和发生。

图 7A-7F 显示了在接受移植 6 周后的 NOD-SCID 小鼠肝脏里移植的人类胎儿肝细胞中检测到人类 ALB 或 CK19 蛋白质。图 10A-10F 是来自单个肝脏的连续部分。这些数据显示 LEC 能够产生肝细胞。人类白蛋白表达的地方也表达 CK19。

- 图 8A 显示了人类成年 R1 和 R2 群体肝细胞的染色;以及 R2 群体 5E12、HLA 的染色。图 8B 显示了在活体培养后白蛋白和 α -1-抗胰蛋白酶的表达。

图 9A-9H 显示了人成年肝组织的分析，如图 3 对于胎儿细胞的描述。

图 10A-10H 显示了胎儿和成年肝脏中 LEC 的染色。

图 11 显示了培养两周后的肝移植细胞的形态学，其中这些细胞成长为典型的单层上皮细胞。

5 表 2 显示了人肝移植细胞的限制性稀释。

表 3 显示了通过免疫染色对 LEC 进行筛选。

具体实施方案的描述

10 分离和标记肝移植细胞 (LEC)，并当活体移植时证明是能够发展为肝细胞的前体细胞。用作肝移植细胞的浓缩细胞群体在移植中是有用的，会提供一种恢复肝脏功能的受体；对于药物筛选；体外和活体中的肝发育模型；体外和活体中的筛选分析来限制生长和分化的因素，并标记参与肝脏发育和调节的基因；等等。天然的细胞可以用于这些目的，或它们可被遗传的修饰而提供改变了的能力。

发育为再生肝细胞的能力可以在活体中测定，例如在免疫缺陷的动物，如 RAG、15 SCID、裸鼠 (nude) 等，在 FAH^{-/-}动物中或被击昏的带有异源的、同源的或异种供体细胞的免疫缺陷型动物中，通过这个系统中这些供体细胞提供功能性的能力。FAH 的表达是一种人类遗传性障碍的缺陷，酪氨酸血症类型 1。FAH 的功能由所移植的肝细胞提供。或者，也可用体外法来测定生物功能，通过在肝细胞产生的条件下培养合适的生长因子和/或细胞活素。当在培养生长时，受试细胞生长为单层，有典型的上皮细胞形态。

所述发明的肝移植细胞可根据生存力、前向扫描、自身荧光和细胞表面标记物的表达来富集。例如在用碘化丙锭 (PI) 染色后死亡的细胞染色明亮因为它们不能排除染料。然而有生存能力的细胞当用碘化丙锭染色时是阴性至很低。重要的细胞在 PI^低亚群中被发现，在非常亮和阴性之间，如图 1 所示。前向扫描也可以用来对重25 要细胞门控，它们有较高的前向扫描，如图 1 显示。

在高前向扫描的群体中，PI^低细胞、肝移植细胞是阳性和/或阴性选择性的表达特异性标记物。通过流式细胞计数分析和筛分细胞表面标记物，如那些下面描述的，可以分选有生存力的细胞。一种这样的重要阳性选择标记物是 5E12 表位。其他的标记物，可以和 5E12 交换的应用来进行阳性选择，包括 ep-cam、e-钙粘着蛋白和30 CD49f。优选的所述细胞也选择来低表达 I 型 HLA 抗原，例如 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C。其他的标记物，可以和 I 型 HLA 抗原交换的应用，包括 CD38 和 CD54。另外，所述

细胞也可以被阴性选择或标记为阴性的表达 CD117 和/或 CD14。虽然不通常用来选择, 细胞质蛋白白蛋白和 CK19 都表达是 LEC 的特点。

定 义

- 5 在对以下提供的标记物和细胞的定义中, 所述名词典型的将按照人类蛋白质、细胞等定义, 其中人类细胞优选的是所述发明的实施方案。那些文中的技术员明白其他哺乳动物也可以用作细胞的来源, 将利用那个群体同源的相似物和功能上相关的标记物从这样的非人类群体选择细胞。

- 10 **肝脏移植。**如这里所应用的, 名词“肝脏移植细胞”指一种细胞群体, 当移植到动物时, 成长为成熟肝细胞。肝前体细胞发育的潜力可以通过功能性和表型的标准来评定。功能上, 肝细胞被特征性的描述为能够弥补 FAH 缺陷, 并会表达肝特异性蛋白质, 包括白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶、 α -胎蛋白等等。肝细胞功能上还特征性的描述为能够被肝炎病毒感染, 例如肝炎病毒 A (HAV); 肝炎病毒 B (HBV); 肝炎病毒 C (HCV); 肝炎病毒 D (HDV); 肝炎病毒 E (HEV); 等等。所述发明的肝移植细胞也
- 15 能够成长为 BEC, 它在功能上被特征性的描述为表达细胞角蛋白 19, 并在单层细胞间形成多细胞管道和胆小管。

- 阳性和阴性染色。**所述受试的肝移植细胞特征性的描述为表达细胞表面标记物。虽然在文中提到细胞的特定标记物是“阳性”或“阴性”是很普通的, 但实际的表达水平是定量的特性。所述细胞表面分子的数量可对数级的变化, 但仍特征性的描述为“阳性”。文中那些技术人员也明白染色为阴性的细胞, 例如一种标记物
- 20 特异性试剂的结合水平并没发现和对照组不同, 例如一种同型匹配的对照; 会表达少量标记物。染色水平的特性使得细胞群体之间有微妙的变化。

- 细胞的染色密度可以通过流式细胞计数法监测, 其中激光检测荧光色素的定量水平(它和被特异性试剂结合的细胞表面标记物的量是成比例的, 例如抗体)。流式
- 25 细胞计数, 或 FACS 也可以用来根据和特异性试剂结合的密度来分离细胞群体, 和其他的参数一样, 如细胞大小和光散射。虽然染色的绝对水平会和特定的荧光色素和反应制剂不同, 数据可以标准化为对照。

- 为了标准化分类为对照, 每个细胞记录为拥有特定染色密度的数据点。这些数据点根据对数范围显示, 其中测定的单位是任意的染色密度。在一个实施例中, 一个
- 30 样品中的最亮染色细胞的密度会比未染色细胞多 4 log。当以这种方式显示时, 落在染色密度最高 log 中的细胞显然是明亮的, 然而那些在最低密度中的是阴性

的。所述“低”阳性染色细胞有比同型匹配对照亮度高的染色水平，但不及通常在所述群体中发现的最明亮染色细胞密集。低阳性细胞拥有和所述样品的阴性以及明亮染色阳性细胞相比的独特性质。一种可供选择的对照可利用一种在其表面有限定密度标记物的底物，例如一种人造珠或细胞系，它们提供了密度的阳性对照。

5 *前体细胞的来源*。用作细胞来源的体外细胞群体包括新鲜的或冷冻的肝细胞群体、胆管细胞群体或胰腺细胞群体等等，它们是从胚胎、胎儿、儿童或成年人组织获得的。所述方法还包括细胞分离的富集或提纯步骤，通过对于其他细胞特异性标记物的阳性选择。所述前体细胞可从任何哺乳动物物种获得，例如人类、马、牛、猪、狗、猫、啮齿类动物例如小鼠、大鼠、仓鼠、灵长类动物等等。

10 *R2 群体*。包含如上所述肝移植前体细胞的细胞群体可以根据前向扫描、自身荧光和重要染料(如碘化丙锭，7-AAD 等)存在时的生存能力来分离。这里所应用的 R2 群体，指的是活的、高前向扫描、自身荧光的细胞群体，如图 1 显示。在用重要染料碘化丙锭(PI)染色后所述重要细胞染色不是很明亮，例如它们是(PI^{low})。这个群体的细胞富集为肝移植前体细胞，也包含一些污染细胞，它们可能是成纤维细胞、
15 内皮细胞等等。

5E12。所述发明的肝移植细胞对于 5E12 抗原是阳性表达的。5E12 单克隆抗体最先是制备用来针对人神经细胞的。认识到所述抗体是一种大约是 125kDa 的蛋白质。产生 5E12 单克隆抗体的杂交瘤细胞系已由美国模式培养物保藏所(ATCC)保藏，登录号为_____ (见审理中的专利申请 60/119725)。

20 *Ep-cam*。所述发明的肝移植细胞阳性表达 ep-cam。这种抗原也已知为上皮面抗原(ESA)和上皮糖蛋白 2(EGP-2)。Ep-cam 作为媒介调节 Ca²⁺独立同型细胞-细胞之间的黏附。活体中，Ep-CAM 的表达和上皮增殖的增加相关联，并和细胞分化负相关。已经证明 Ep-CAM 对于许多组织都有调节上皮组织形成的功能。所述序列由 Szala 等揭示(1990)Proc. Nat. Acad. Sci. 87:3542-3546。抗体是商业应用的，例如
25 来自 BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, 目录号 347197。

E-钙粘着蛋白。所述发明的肝移植细胞阳性表达 e-钙粘着蛋白。E-钙粘着蛋白是一种 120kDa 的位于上皮细胞黏附连接处跨膜糖蛋白。它通过 5 个细胞外的钙-结合重复区域形成钙依赖性细胞-细胞黏附。细胞表面的表达导致了细胞分选，以及由特异的细胞外区域所产生的亲同种抗原相互作用特异性。所述的细胞外区域将
30 它和细胞质成分 β -连接素或片球蛋白(PG)相连，结果和 α -连接素以及肌动蛋白丝网状结构相连。抗体是商业上可获得的，例如来自 BD Biosciences, Pharmingen, San

Diego, CA, 目录号 610181。

CD49f。所述发明的肝移植细胞阳性表达 CD49f。整合素 α -6 (CD49f) 是 150kDa 的跨膜蛋白，它是由上皮细胞主要表达的整合素杂二聚体的一部分。 α -6 和整合素 β 1 链相连而形成 VLA-6，并和整合素 β 4 链相连而形成层粘蛋白和纤连蛋白受体。CD49f 主要表达于 T 细胞、单核细胞、血小板、上皮和内皮细胞，周围神经细胞和胎盘滋养层细胞。它的序列见于 Tamura 等 (1990) *J. Cell Biol.* 111:1593-1604。抗体是商业上可获得的，例如来自 BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, 目录号 557511。

I 型 HLA。所述发明的肝移植细胞低阴性表达 I 型 HLA。I 型 HLA 位点的例子为 HLA-A、-B 和 -C。所述 I 型 MHC 抗原是多形的 2-链细胞表面糖蛋白。I 型抗原的轻链是 β -2-微球蛋白。重链的分子量是 44,000，并由 90 个氨基酸的 3N-末端的细胞外区域，一个较小的疏水膜-跨越片段和一个较小的亲水细胞内 C-末端区域组成，见 Malissen 等 (1982) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79:893-897。抗体是商业上可获得的，例如来自 BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, 目录号 557349，它与人型主要组织相容性 I 型抗原的单形抗原决定簇起反应。

CD54。由成年肝组织分离而得的肝移植细胞阴性表达 CD54。从胎儿组织分离来的细胞可能是阳性或阴性表达 CD54，但通常没有 CD54 阳性细胞明亮，例如 5E12⁺ 群体中发现的细胞。CD54 也被知道为细胞间黏附分子 (ICAM-1)，90 (kDa)。所述 CD54 抗原是白细胞功能相关抗原-1 (CD11a/CD 18) 的配体，并同时影响白细胞 LFA-1-依赖黏附到内皮细胞和包含细胞-细胞间接触的免疫功能。所述 CD54 抗原可在成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞上被诱导。在正常的组织中，CD54 抗原的密度在内皮中最高，并由于各种因素而增加，例如暴露于细胞活素、炎症以及肿瘤转化。ICAM-1 的核苷酸序列由 Simmons 等揭示 (1988) *Nature* 331:624-627, 1988。抗体是商业上可获得的，例如来自 BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, 目录号 347977。

CD117。所述发明的肝移植细胞阴性表达 CD117。CD117 识别酪氨酸激酶 c-Kit 受体。这个受体已经特定的用于干细胞包含进来，包括造血干细胞。同样也存在多种同源异性的 c-Kit，这是由于交替的 mRNA 拼接、蛋白水解以及在特定的细胞类型中应用隐藏的内部助催化剂而导致的结果。结构上，c-Kit 细胞外包含 5 个免疫球蛋白样的区域，以及一个被细胞内插入的 77 氨基酸分为两个部分的催化区域；所述的序列见于 Yarden 等 (1987) *EMBO J.* 6(11):3341-3351。抗体是商业上可获得的，

例如来自 BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, 目录号 340529。

5 *CD14*。所述发明的肝移植细胞阴性表达 *CD14*。*CD14* 是单-拷贝的基因编码 2 种蛋白质形式：50-至 55-kD 糖基磷脂酰肌醇-锚着的膜蛋白 (m*CD14*) 和单核细胞或肝来源的缺乏锚的可溶性血清蛋白质 (s*CD14*)。两种分子对于脂多糖 (LPS)-依赖性信号转导是关键的，s*CD14* 使得缺乏 m*CD14* 的细胞具有 LPS 敏感性。所述序列见于 Govert 等 (1988) *Science* 239:497-500。抗体是商业上可获得的，例如来自 BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA。

10 *CD34*。所述发明的肝移植细胞阴性或阳性表达 *CD34*。*CD34* 是选择性的表达于人类造血前体细胞上的分子质量大约为 110kD 的单基因细胞表面抗原。所述基因除了由造血前体细胞表达外还由小管内皮表达，它是单-链 105-120kDa 重 O-糖基化跨膜糖蛋白。所述序列见于 Simmons 等 (1992) *J. Immun.* 148:267-271。抗体是商业上可获得的，例如来自 BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA., 目录号 550760。

15 *CD38*。所述发明的肝移植细胞阴性或阳性表达 *CD38*，但通常没有 *CD38* 阳性细胞明亮，例如 5E12⁻群体中发现的细胞。*CD38* 是一种带有一条较短的 N-末端细胞质尾和 4C-末端细胞外 N-糖基位点的 300-氨基酸的 型跨膜蛋白。所述序列见于 Jackson 等 (1990) *J. Immun.* 144:2811-2815。所述标记物通常和淋巴细胞、原始粒细胞以及幼红细胞相关联。抗体是商业上可获得的，例如来自 BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, 目录号 347680。

20 肝移植细胞的分离

所述受试的肝移植细胞，通过用来富集有所述特征细胞的技术，从复杂的细胞混合物中分离出来。例如，一种群体的细胞可以选自 R2 群体，来表达 5E12、e-钙粘着蛋白、ep-cam 和 CD49f 中的一种或几种。所述细胞任选的选择性的低或阴性表达 HLA I 型抗原 (这里称为 HLA^低)。CD45 和 CD38 可与 HLA 交换应用。

25 为了将细胞从组织中分离出来，可应用一种合适的溶液来分散或悬浮。这样的溶液通常是一种平衡盐溶液，例如生理盐水、PBS、Hanks 平衡盐溶液等等，合适的用胎儿小牛血清或其他天然的发生因子补充，和一种可接受的低浓度缓冲液协同作用，通常是 5-25mM。合适的缓冲液包括 HEPES、磷酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液等等。

30 所述的受试细胞是大的母细胞，所以初始分离可通过文中所知的各种方法选择母细胞，包括淘析、Ficoll-Hypaque 或应用前面数据和钝散射来门控母细胞的流

式细胞计数分析。

所述受试细胞群体的分离然后将应用亲和分离以提供相当纯净的群体。亲和分离的技术包括应用涂上-抗体的磁珠进行的磁分离，亲和色谱法，与单克隆抗体结合的细胞毒试剂或和单克隆抗体联合应用，例如补体和细胞毒素，以及用附着在固体基质上的抗体“淘选”例如平皿培养或其他合适的技术。提供精确分离的技术包括荧光活化细胞分检器，它可有不同程度的掺杂，例如多种颜色的通道、小角度和钝光散射检测通道、阻抗通道等等。可以通过应用和死亡细胞相关的染色(碘化丙锭, 7-AAD)来筛选去除死亡细胞。任何对于所选细胞的生存能力没有不合适损害的技术都可以运用。

10 所述亲和剂可以是上述细胞表面分子特定的受体或配体。抗体配制的详细情况以及它们合适的应用为特定结合成分对于文中的那些技术员来说是熟知的。

将抗体应用为亲和试剂有特定的意义。合适的，这些抗体作为标记物在分离中应用。标记物包括可以用于直接分离的磁珠，可以用和载体结合的亲和素或链霉亲和素去除的生物素，可以用于荧光活化细胞分检器的荧光色素等等，使得可以方便的分选特定的细胞类型。有用的荧光素包括藻胆蛋白，例如藻红蛋白和别藻蓝蛋白、15 荧光黄和德克萨斯红。每种抗体常常用一种不同的荧光素标记，这使得可以独立的分选每种标记物。

所述抗体加入到细胞悬浮液，保温一段时间足以结合所应用的细胞表面抗原。通常保温至少大约 5 分钟，少于大约 30 分钟。理想的在反应混合物中含有足够浓度的抗体，使得分离的效率不为抗体的缺乏而限制。通过滴定决定合适的浓度。细胞分离的培养基可以是任何维持细胞生存能力的培养基。一种优选的培养基是包含 0.1-0.5% BSA 的磷酸缓冲盐溶液。多种培养基是商业上可获得的，并可根据细胞的特性应用，包括 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(dMEM)、Hank'碱性盐溶液(HBSS)、Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液(dPBS)、RPMI、Iscove 培养基、含有 5mM EDTA 的 PBS 等25 等，常常用小牛胎儿血清、BSA、HSA 等等补充。

所述标记的细胞然后根据上述的表型分离。所述分离出来的细胞可以在任何合适的保持细胞生存能力的培养基中收集，通常在收集试管的底部有一垫层血清。多种培养基是商业上可获得的，并可根据细胞的特性应用，包括 dMEM、HBSS、dPBS、RPMI、Iscove 培养基等等，常常用小牛胎儿血清补充。

30 高度富集肝移植活性的组合物以这种方式获得。所述受试的群体是细胞组合物的 50%或更多，通常是细胞组合物的 90%或更多，可以大约是肝细胞群体的 95%或

更多。所述富集的细胞群体可以直接应用,或可以在液态氮温度冷冻并存储长时间,解冻并能再使用。所述细胞通常存储在 10%DMSO、50%FCS、40%RPMI 1640 培养基。一旦解冻,所述细胞可以通过应用生长因子和/或间质细胞繁殖和分化来扩增。

所述方法在肝细胞功能的体外或活体模型的发展中是有用的,在基因治疗和人工器官的构建的实验中也是有用的。发育中的肝细胞作为一种新的生长因子和药物的宝贵来源,也充当病毒或疫苗(例如肝炎病毒)产物,也用作研究肝寄生虫或在肝中有一发展阶段的寄生虫,(例如疟疾生物),也用作药物和工业化合物的体外毒性和代谢实验,也用作基因治疗实验(由于肝脏是机体最大的脉管器官),也用作构建人工移植的肝脏,也用作肝诱变和癌发生的研究。

10

功能测定

一项用来测定肝祖细胞在活体中能力的重要分析是遗传性酪氨酸血症 1 型的动物模型,这是一种严重的常染色体隐性代谢疾病,它会影响肝脏和肾脏,它的病因是缺乏延胡索酰乙酰乙酸水解酶(FAH)。用 2-(2-硝基-4-三氯-甲基)-1,3-环己二酮(NTBC)处理小鼠纯合子被破坏的 FAH 基因(FAH^{-/-})消除了新生致死氯并恢复了肝和肾的功能。所述的动物模型,例如由 Grompe 等描述(1995) Nature Genetics 10: 453-460; Overturf 等(1996) Nat. Genet. 12(3):266-73; 等等。

在所述发明的一种实施方案中,用肝移植细胞重构 FAH 小鼠,可以用肝祖细胞或包含检测标记物的小鼠细胞。例如所述细胞可以导入小鼠,它可以是用放射线处理过的小鼠,使得初始重构肝脏,然后为了选择性的肝脏重构将 NTBC 取出。或者,NTBC 可以在导入肝移植细胞后立即取出。所述的重构动物对于筛选疫苗和抗肝炎病毒的药物是有用的,例如肝炎病毒 A、B、C、D、E; 生物活性药物的代谢和毒性试验; 等等。

25

体外细胞培养

所述富集的细胞群体在体外可以在各种培养条件下生长。当在培养生长时,所述受试细胞生长为单层,有典型的上皮细胞形态。培养基可以是液态或半液态的,例如包含琼脂、甲基纤维素等等。所述细胞群体可以合适的悬浮在适当营养的培养基中,例如 Iscove 改进的 DMEM 或 RPMI-1640,常常用小牛胎儿血清(大约 5-10%)、L-谷氨酰胺、硫醇、特定的是 2-巯基乙醇以及抗体例如青霉素和链霉素来补充。

所述受试细胞可以在含有饲养层细胞的共培养基中生长。适合应用为饲养层细

胞的间质细胞包括骨髓间质细胞例如 SYS-1 细胞系, FFS-1 成纤维细胞系等等。其他可以用作饲养层细胞的包括来源于人类或其他动物的成纤维细胞; 来源于相同物种如肝, 通过原始培养的胎儿成纤维细胞; ST0 成纤维细胞系; 等等。这些细胞层为培养基提供了未定义的成分, 并会抑制多能细胞的分化。存在饲养层细胞的培养对于无性培养特别有用, 例如其中单个祖细胞扩增为一群体。

可应用体外培养的细胞, 尤其是克隆产生培养的细胞, 进行功能性测定。例如, 评定培养细胞表达肝特异性蛋白的能力, 包括白蛋白和 α -1 抗胰蛋白酶。表达可利用任何合适的形式, 包括培养物上层清液中蛋白质存在的 RT-PCR、ELISA, 等等。也可以评定培养细胞表达胆道蛋白的能力, 例如 CK19。

所述培养物包括细胞有反应的生长因子。生长因子如这里定义的, 是在培养物中或在完整的组织中, 通过特异性的作用于跨膜受体能够提高细胞生存、生长和/或分化的分子。生长因子包括多肽和非-多肽因子。可以应用于培养受试细胞的特异生长因子括但不局限于肝细胞生长因子/散射因子(HGF)、EGF、TGF α 、酸性 FGF(见 Block 等; J. Biol Chem, 1996 132:1133-1149)。选择特定的培养条件来达到特定的目的, 例如保持祖细胞的活性, 等等。另外, 除了生长因子, 所述受试细胞可以在含有间质或饲养层细胞的共培养物中生长。适合应用于祖细胞生长的饲养层细胞在文中是已知的。

所述受试共培养细胞可以用于多种途径。例如, 营养培养基, 它是一种有条件的培养基, 可以在不同的阶段和成分分析时分离。分离可通过 HPLC、反相-HPLC、凝胶电泳、等电子聚焦、透析或其他非-降解技术来完成, 可通过分子量、分子体积、电荷、它们的组合等来分离。可以组合一种或多种这些技术来进一步富集特定的提高祖细胞活性的部分。

所述受试细胞可以在间质细胞-自由基培养物中扩增, 例如如 Suzuki 等描述的 (2000) Hepatology 32:1230-1239。这样的培养物优选的生长在提供一层细胞外基质成分的培养基上, 例如层粘蛋白、IV 型胶原、I 型胶原、纤维连结蛋白等等。所述培养基通常包括生长因子, 例如 HGF、EGF 等等。

所述肝移植细胞可以和一种培养系统联合应用于分离和评价与肝细胞及 BEC 分化和成熟相关的因素。因此, 可以应用所述细胞来测定培养基的活性, 例如有条件的培养基, 评价液体所含生长因子的活性, 包括形成特定的结构, 等等。培养法也可以作为用来处理药物和其他化合物的方法, 来测定肝代谢对于重要药物的作用。例如, 可以分离和测试肝代谢的产物的毒性和效力。

移 植

肝脏衰竭包括和严重的肝损伤及功能不良相关联的系统并发症。它可能在没有预先存在肝疾病的病人中发生或是在慢性肝损伤上继发的。急性肝脏衰竭的诊断需要存在症状，包括黄疸和脑病。爆发性肝衰竭损害所有的肝脏功能，导致胆红素代谢减少，氨和肠源性蛋白质的清除减少，凝血因子产物减少。它也会导致肾脏衰竭、休克和脓毒病。没有肝移植，超过 50% 的病人将死亡，病因通常是来自以上疾病的组合。即使在最好的环境中死亡率超过 50%。处理的方法包括一般的支持疗法直至肝可以再生和恢复功能。在没有预先存在疾病的急性肝衰竭中，肝移植是可以救命的。

所述受试细胞可以用来恢复受者的肝脏功能。同种异体的细胞可以用于分离祖细胞和接下来的移植。肝功能不良的多数临床表现来源于细胞损害和正常肝容量的损害。例如，病毒性肝炎导致肝细胞的损害和死亡。在这种情况下，表现可包括出血的增加、黄疸和循环中肝细胞酶的水平增加。由于肝功能不良起源于疾病如肿瘤，所述受试细胞可以从自体同源的肝组织分离，并在治疗后应用来恢复肝功能。

肝疾病有许多原因，从微生物感染和赘生物(肿瘤)到代谢和循环的问题。肝炎包括肝细胞炎症和损害。这种类型的损伤可来自损害性药物、毒素或免疫攻击。然而，肝炎最普通的原因是病毒感染。在美国三种主要的病毒导致肝炎：肝炎病毒 A、B 和 C。它们每年总共感染将近 500,000 美国人。另外，细菌、真菌和原生动物可感染肝脏，而且肝脏在某种程度上几乎不可避免的卷入所有的血源性感染中。

许多药物可损害肝脏，从肝脏化学轻微无症状的改变到肝衰竭和死亡。肝毒性可是或不是剂量相关的。羟苯基乙酰胺(Acetaminophen)是一种肝毒性的药物；二苯乙内酰脲(抗惊厥药)和异烟肼(抗结核药)就是能引起“病毒样”肝炎的药物例子。环境和工业毒素可导致肝脏广泛的改变。肝损害不一定是剂量依赖的，可以从轻微无症状的炎症到爆发性的衰竭或进行性的纤维化和硬化。

肝代谢过程的问题可以是先天的或后天获得的。这些病症中的一些，如威尔逊病(肝豆状核病)和血色沉着病可表现为肝炎或硬化。威尔逊病是少见的遗传性疾病，其特点为不能将铜分泌入胆汁，导致肝脏和神经系统中铜的毒性聚积。血色沉着病是一种铁超负荷综合症导致铁沉积和随之发生的各种器官的损害，包括肝、心脏、胰腺和垂体腺。这个疾病可能是肠道吸收铁增加或多次输血引起的，因为常常在循环红细胞中发现铁。

肝可受许多疾病的影响，尤其是自身免疫的病症，其中免疫系统攻击机体自身

正常组织。一些例子包括风湿病，例如系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎，以及感染性肠疾病，例如溃疡性结肠炎和克罗恩病(节段性回肠炎)。

为了多种目的可将基因在培养或移植前导入细胞，例如预防或减少易感性，取代失去转变功能的基因，等等。或者，表达反义 mRNA 或核糖酶的载体被导入，因此阻断了表达不想表达的基因。其他基因治疗的方法是导入药物抗性基因来使得正常祖细胞有一优势并受选择性压力的支配，例如多种药物抗性基因(MDR)，或抗细胞凋亡基因如 bcl-2。文中所知的多种技术可用来转染所述靶细胞，例如电穿孔、钙沉淀 DNA、融合、转染、脂质转染等等。所述 DNA 特殊的导入方式对于所述发明的实施不是关键的。

许多对于将外源性基因转入到哺乳动物细胞中去有用的载体可以利用。所述载体可以是游离基因，例如质粒、病毒源性载体如巨细胞病毒、腺病毒等等，或可以整合入靶细胞基因组，通过同源重组或随机整合，例如反转录病毒源性的载体，例如 MMLV、HIV-1、ALV 等等。祖代和干细胞遗传改变见 Svendsen 等，(1999) Trends Neurosci. 22(8):357-64; Krawetz 等(1999) Gene 234(1):1-9; Pellegrini 等，Med Boil Eng Comput. 36(6):778-90; 以及 Alison(1998) Curr Opin Cell Biol. 10(6):710-5。

或者，所述肝祖代可以是终生免疫-非终生免疫的例如见 Kobayashi 等(2000) Science 287:1258-1262。在这样的操作中，将终生免疫的基因序列，例如癌基因，以可以将其容易去除的方法导入细胞，例如利用位点特异性的重组酶如 cre-lox 系统。

为了证明拥有遗传修饰的祖细胞，可以运用各种方法。所述细胞的基因组可以用限制性酶消化，应用或不应用 DNA 扩增。聚合酶链反应；凝胶电泳；限制性分析；Southern、Northern 和 Western 印迹；测序等等都可以被运用。所述细胞可以在各种环境下生长，来保证所述细胞在保持表达导入 DNA 的能力同时也能够分化。可以运用各种体外和活体的试验来确保保持所述细胞的多种能力。

所述细胞可以以任何生理上可接受的方法给药，通常是血管内，包括静脉内，例如通过肝脏门静脉；脾脏内给药等，然而它们也可以导入其他合适的位点，所述细胞可以因此找到合适的再生和分化的位点。通常，至少施用 $1 \times 10^3/\text{Kg}$ 的细胞，更通常的是至少大约 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 的细胞，优选 $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 或更多。所述细胞可以通过注射、导管或其他方法导入。

所述受试细胞可用作培养细胞，可以产生作为生物人工肝生物反应器的肝细

胞，其中肝细胞通过膜或其他生理屏障从灌注液分离。四种在中空-纤维膜中利用肝培养细胞的装置(Circe Biomedical HepatAssist®、Vitagen ELADTM、Gerlach BELS 和 Excorp Medical BLSS)现在正处于临床评价阶段。虽然生物人工肝的发展协助装置(BLADs)治疗急性肝衰竭，然而慢性肝衰竭的炎症或急性失代偿，很重要，它却很难完成，部分是因为肝细胞在培养基中很难生存。通过培养受试的肝移植细胞，对这样的装置持续提供肝细胞。

生物人工肝生物反应器提供一种或多种功能：氧化解毒(主要通过细胞色素 P450 酶系统)；生物转化(例如尿素合成、糖尿化(gluconuridation)和硫酸盐化作用)；分泌(通过胆汁系统)；蛋白质和大分子合成；中间代谢(糖原异生、脂肪酸和氨基酸)；以及免疫和激素系统的调节。

现在临床评价中的 BLADs 是以应用中空-纤维筒装肝细胞(hollow-fiber cartridge housing hepatocyte)，它在中空纤维腔外部位培养。灌注通过所述中空纤维筒腔内部分是全血，或是血浆流。可以将一种氧合器放置在生物反应器前来提高灌注流中可利用氧的水平，并用柱或过滤器在到达肝细胞前减少毒素。

其他的装置可以以轴向流动途径越过和/或通过非纺织聚酯纤维灌注血浆；通过处于高度多孔的用肝细胞接种的聚氨酯泡沫结构中心的通道；通过微孔多聚砜中空-纤维膜；微孔聚乙烯形式的树脂材料；等等。所述祖细胞和/或后代肝细胞可以装入胶囊。

20 表达试验

检查肝移植细胞中基因的表达是特别重要的。所述的表达组基因可以和许多重要的细胞相比较，例如如文中所知的成年肝祖细胞、干细胞、造血细胞等等。例如，可以进行实验来测定在发展过程中被调节的基因。

任何文中所知的用来检测特异 mRNAs 的合适的定量和定性的方法都可以应用。mRNA 可以被检测，通过例如和微阵列杂交，在组织中原位杂交，通过反转录酶-PCR，或在包含多聚 A⁺mRNA 的 Northern 印迹中。本文中的一项技术可以容易的应用这些方法来测定两个样品之间 mRNA 转录物的大小和量的不同。例如，祖细胞中特定 mRNA 的水平和参考样品中 mRNAs 的表达相当，例如肝细胞或其他分化细胞。

任何适合检测和比较样品中 mRNA 表达水平的方法都可以和所述发明的方法联合应用。例如，样品中 mRNA 的表达水平可以通过从样品中产生的一库表达序列标记(ESTs)测定。基因库中 ESTs 相关表达的列举可以用来估计初始样品中基因转录

物的相关表达。实验样品 EST 分析的结果然后可以和参考样品的 EST 分析作比较,后者是用来测定选择性多聚核苷酸相关表达水平,尤其是和这里描述的一种或多种分化表达基因相关的多聚核苷酸。

或者,实验样品中的基因表达可以应用基因表达(SAGE)方法连续分析实施
5 (Velculescu 等 *Science*(1995)270:484)。SAGE 包括从单个转录物中特异性位点分离出短小独特的序列标记物。所述序列标记物被连接、克隆和排序。初始样品中特定转录物的频率通过相关序列标记物和所述序列群体相遇的次数反映。

试验样品中的基因表达也可以应用差别显示(DD)方法分析。在 DD 中,由特异性多聚核苷酸序列(限制性酶位点)限定的片段应用为独特的基因标识符,它和所表
10 达基因中关于片段长度或片段部位的信息相联系。样品中表达基因的相关表达然后可以在所有可能的片段库中根据和那个基因相关联片段的相关表达来估计。开展 DD 的方法和组合物在文中是熟知的,见例如 U. S. 5, 776, 683; 和 U. S. 5, 807, 680。

或者,在样品中基因表达中应用杂交分析,它是以核苷酸相互作用的特异性为基础。寡核苷酸或 cDNA 可以用来选择性的识别或俘获特异性序列组合物的 DNA 或
15 RNA,对和已知俘获的序列杂交的 RNA 或 cDNA 的量进行定性或定量的测定,以提供关于样品中的细胞信息库中特定信息相关表达的信息。可设计杂交分析使得同时筛选成百至上千基因的相关表达,通过应用,例如,有高密度形式的阵列-基础技术,包括过滤器、显微镜载物片或微芯片或应用光谱分析的液体-基础技术(例如质谱分析)。下面详细叙述了在所述发明诊断方法中应用阵列的例子。

20 可以实施和阵列杂交,其中所述阵列可根据文中所知的任何合适的方法制造。例如,U. S. 5, 134, 854 中描述的制造大寡核苷酸阵列的方法,以及 U. S. 5, 455, 934 中描述的应用光-控合成技术。应用计算机控制系统,单体异质阵列通过同时在大量反应位点连接转换为聚合物异质阵列。或者,微阵列通过将合成前的寡核苷酸沉积在固体底物上而产生,例如 PCT 出版的申请号 WO 95/35505 中描述的。

25 收集来自带有阵列的样品的杂交数据的方法在文中也是熟知的。例如应用一种检测荧光标记物创造细胞样品的多聚核苷酸,通过扫描微阵列检测可察觉的标记物的存在来检测样品中多聚核苷酸的杂交。用来检测装置上荧光标记目标的方法和装置在文中是已知的。通常,这样的检测装置包括显微镜和用来将光对准底物的光源。光子计数器检测来自底物的荧光,然而 x-y 转化步骤变化了底物的位置。一种可以
30 应用于所试方法的共焦检测装置描述于美国专利号 5, 631, 734。一种扫描激光显微镜描述于 Shalon 等, *Genome Res.* (1996)6:639。应用合适的激发线,对每个应用

的荧光团进行扫描。然后为了接下来的分析结合来自扫描的数字图象。对于任何特定的阵列成分,将来自一个样品的荧光信号的比例和来自另外一个样品的荧光信号作比较,并测定相关的信号密度。

分析从和阵列杂交收集数据的方法在文中也是熟知的。例如,当杂交检测包括
5 荧光标记物时,数据分析可包括从所收集的数据测定荧光密度的步骤,荧光密度是底物位置的函数,去除无关项,即背离预先确定的统计分布的数据,并可从剩余数据计算靶物的相对结合力。所得的数据可以显示为一张每个区域密度根据靶物和探针之间结合力而变化的图。

模式匹配可以手工实施,或应用计算机程序实施。配制底物矩阵(例如阵列)的
10 方法,设计寡核苷酸应用于这样的矩阵,探针的标记、杂交条件、杂交矩阵的扫描以及产生模式的分析,包括对比分析,例如描述于 U. S. 5,800,992。

在另外一种筛选方法中,所述试验样品在蛋白质水平分析。可以应用任何方法测定试验样品中分化表达的多肽的缺失或存在或改变的量来完成诊断。例如,检测可以利用带有标记抗体的细胞或组织切片染色(例如来自活组织切片检查),依照传
15 统的方法实施。细胞可以被渗透而沾染胞质分子。通常,将特异结合所述发明分化表达多肽的抗体加入样品中,保温一段时间而足以使得结合抗原决定簇,通常至少大约 10 分钟。所述抗体可以为了直接检测而标记(例如应用放射性同位素、酶、荧光素、化学荧光物等),或可以和第二抗体或试剂联合应用来检测结合(例如生物素和辣根过氧化物酶结合的亲和素,和荧光化合物结合的第二抗体,例如荧光素、罗
20 丹明、得克萨斯红等等)。可以通过许多方法测定是否存在抗体结合,包括游离细胞的流式细胞计数法、显微镜方法、放射摄影术、闪烁计数等等。可以应用任何合适的可供选择的定量或定性测试分化表达多肽水平或量的方法,例如 ELISA、western 印迹、免疫沉淀反应、放射性免疫测定等等。

25

筛选试验

所述受试细胞对于体外试验和筛分是有用的,可以检测到作用于肝移植细胞和由所述肝移植细胞产生的肝细胞的试剂。很多的试验可以用于这个目的,包括毒理学试验、蛋白质结合的免疫测定;细胞生长、分化和功能活性的测定;激素的制造;等等。

30

在生物活性试剂、病毒等的筛选试验中,所述受试细胞,通常是包含受试细胞的培养物,和重要的试剂接触,并通过监测输出参数估计试剂的效果,例如标记物

的表达、细胞生存能力等等。所述细胞可以是如上述的新近分离、培养和遗传改变的等。所述细胞可以环境诱导克隆培养物的变异体：例如分离为独立的培养物并在不同的条件下生长，例如和或不和病毒一起；存在或不存在其他细胞活素及它们的化合物。细胞对于试剂，特别是药物试剂反应的方式，包括反应的时间是对于所述

5 细胞生理状态的重要反应。

参数是细胞可计量的成分，尤其是可以精确测定的成分，理想的用高通量系统。一种参数可以是任何细胞成分或细胞产物，包括细胞表面决定簇、受体、蛋白质或构象或遗传翻译后的修饰，脂类、糖类、有机或无机分子、核酸例如 mRNA、DNA 等，或来自这样的细胞成分或它们的化合物的一部分。虽然大多数参数将提供定量的读出，但在一些例子中，半-定量或定性的结果是可以接受的。读出的信息可包

10 括单个确定的值，或可包括平均值、中位数或方差等。特征性的，对于每个由于相同试验的多样性产生的参数将获得一个参数读出值范围。变异性是期望的，应用标准统计方法加用以提供单一值的普通统计方法将获得每组试验参数值的范围。

筛选用的重要试剂包括已知或不知的化合物，包括许多化学种类，主要是有机

15 分子，包括有机金属分子、无机分子、基因序列等等。所述发明的一个重要方面就是评价候选药物，包括毒性试验来测试肝炎病毒的作用，例如肝炎 A、B、C、D、E 病毒；抗病毒药物；等等。

除了复杂的生物试剂外，例如病毒，候选试剂包括包含对于结构相互作用，特别是氢键结合，必需的功能基团的无机分子，典型的包括至少一种胺、羰基、羟基

20 或羧基，常常至少两个功能性化学基团。候选试剂常常包括环碳或被以上一个或多个基团取代的杂环结构和/或芳香或聚芳香结构。候选试剂也见于生物分子，包括肽、多聚核苷酸、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物或它们的化合物。

药物活性的药物、遗传活性的分子等包括在内。重要的化合物包括化疗药物、

25 激素或激素拮抗剂等等。适合这项发明的示例药物试剂是那些在“疗法的药理学基础” (The Pharmacological Basis of Therapeutics) 中描述的，Goodman 和 Gilman, McGraw-Hill, 纽约(1996), 第九版，选自以下章节：水、盐和离子(Water, Salts and Ions)；影响肾脏功能和电解质代谢的药物(Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism)；影响胃肠道功能的药物(Drugs Affecting

30 Gastrointestinal Function))；微生物疾病的化学疗法(Chemotherapy of Microbial Diseases)；肿瘤疾病的化学疗法(Chemotherapy of Neoplastic

Diseases); 作用于血液形成器官的药物(Drugs Acting on Blood-Forming organs); 激素和激素拮抗剂(Hormones and Hormone Antagonists); 维生素, 皮肤病学(Vitamins, Dermatology) 和毒理学(Toxicology), 这里都包含进来作参考。还包括毒素和生物及化学竞争试剂, 例如见 Somani, S. M. (编), “化学竞争试剂”(Chemical Warfare Agents), 学术出版社, 纽约(1992)。

试验化合物包括上面描述的所有种类的分子, 还进一步包括未知内容的样品。来自天然资源如植物的自然出现化合物的混合物是有重要意义的。虽然许多样品包含溶液化合物, 可以溶解在合适溶剂中的固体样品也可以被测定。有意义的样品包括环境样品, 例如地面水、海水、矿废物等等; 生物样品, 例如由农作物配制的溶解产物, 组织样品等等; 人造样品, 例如在药物配制过程中的时间进程; 以及配制作分析之用化合物库等等。有意义的样品包括评定潜在治疗值的化合物, 例如药物候选物。

术语“样品”也包括上面所述的液体, 并在其中加入如了附加的成分, 例如影响离子强度、pH、总蛋白浓度等的成分。此外, 所述样品也通过处理而完成至少部分化学分离或浓缩。可以将生物样品保存, 如果照看它而减少化合物的降解, 例如在氮下、冷冻或它们的联合。应用的样品体积要足够而使得测量可以察觉, 通常是大约 0.1 μ l-1ml 的生物样品就足够了。

包括候选试剂的化合物从许多来源获得, 包括合成或天然化合物库。例如, 可利用许多方法任意和有指导的合成多种有机化合物, 包括生物分子, 包括任意寡核苷酸和寡肽的表达。或者, 自然化合物文库, 以细菌、真菌、植物和动物浸出物的形式是可利用或容易制造的。此外, 天然或合成制造的文库和化合物通过传统的化学、物理和生化方法很容易被修饰, 并可以用来制造组合文库。已知的药物试剂可接受指导的或任意的化学修饰, 例如酰化、烃化、酯化、酰胺化等等, 来制造结构类似物。

通过将所述试剂加入到至少一种, 通常大量细胞样品, 通常和缺少试剂的细胞联合, 对生物活性进行筛选。测定对所述试剂反应参数变化, 通过和参考培养物的比较评价结果, 例如存在和不存在所述试剂, 用其他试剂获得等等。

所述试剂可方便的以溶液的形式或容易的以可溶解的形式加入培养物中的细胞培养基。所述试剂可以流通系统加入, 为流注, 间歇或连续的, 或者将化合物药丸(bolus)逐一或递增的加入至其他静止的溶液, 并且其他的溶液和加入的试验化合物是相同的。第一液体流通过所述细胞, 接着是第二。在单一溶液方法中, 将试

验化合物药丸加入至细胞周围的培养基体积中。所述培养基的成分总浓度不应该在加入药丸后明显变化，或处于流通方法中两种溶液之间。

优选的试剂制剂不包括附加成分，例如防腐剂，它可能对制剂总体有明显的影响。因此优选的制剂基本上包括生物活性化合物和生理上可接受的载体，例如水、乙醇、DMSO 等等。然而，如果化合物是没有溶剂的液体，所述制剂本质上包括所述化合物本身。

大量的试验可以根据不同的试剂浓度而同时实施，来获得对于不同浓度的不同反应。正如文中所知的，测定试剂的有效浓度典型的应用浓度范围是 1:10，或其他粗材测定，稀释液。所述浓度如果需要，可进一步用第二组稀释液限定。典型的，这些浓度之一充当阴性对照，例如零浓度或低于所述试剂发现的水平或处于或低于不产生表型可察觉变化的试剂浓度。

可以利用各种方法定量测试所选择标记物的存在。为了测定存在的分子的量，一种便利的方法就是用可检测的部分标记分子，可以是荧光的、发光的、放射性的、酶活性的等等，特别是一种对于高亲和结合参数有特性的分子。荧光部分事实上容易用来标记任何生物分子、结构或细胞类型。免疫荧光部分可以指导结合的不光是特异的蛋白质，也可以是特异的结构、分裂产物或位点修饰，如磷酸化。单个肽和蛋白质可以设计为自发荧光，例如通过表达它们为细胞内部绿色荧光的蛋白质嵌合体(回顾见 Jones 等(1999)Trends Biotechnol. 17(12):477-81)。因此，抗体可以被基因修饰而提供荧光染料作为它们结构的一部分。依赖所选的标记物，可以应用除荧光标记物的方法测定参数，应用例如免疫测定技术，如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)，同种酶免疫测定和相关非-酶技术。核酸的数量，尤其是信使 RNAs，也是有意义的参数。这些可以通过依赖核酸核苷酸序列的杂交技术测定。所述技术包括聚合酶链反应，基因阵列技术。见分子生物学的现代议定书，Ausubel 等编，John Wiley&Sons，纽约，NY，2000；Freeman 等(1999)Biotechniques 26(1):112-225；Kawamoto 等(1999)Genome Res 9(12): 1305-12；和 Chen 等(1998)Genomics 51(3):313-24。

实施例

下面实施例的给出是为了向文中那些普通的技术人员提供如何进行和应用所试发明的完整揭示和描述，不是为了限制所述发明所认定的范围。已经做了努力来保证所应用数字的精确性(例如数量、温度、浓度等等)但一些实验错误和偏差是允

许的。除非另外表明，部分是重量区分的，分子量是平均分子量，温度是摄氏温度；压力是处于或接近大气压。

在这个说明书中引用的所有出版物和专利申请这里包含进来做参考，好象每个单独出版物或专利申请是特殊和单独表明包含做参考。任何出版物的引用是为了在
5 填写日期前揭示它，不应该认为承认所述发明没有利用先前发明早于这样出版物的权利。

已经明白这项发明不限于所述的特定方法、协定、细胞系、动物种或类，这些都是可以变化的。同样明白了这里应用的术语仅仅是为了描述特定的实施方案，而不是为了限制所述发明的范围，它的范围只有被附属的权利要求所限制。

10 如这里所应用的单数形式“一个”、“一种”和“这种”包括复数对象除非上下文另外明确规定。因此，例如提及“一个细胞”就包括大量这样的细胞，提及“蛋白质”就包括一种或多种蛋白质以及为文中的技术员所知的等价物，等等。这里所应用的所有技术和科学术语与所述发明的文中一个普通技术员通常明白的有相同意义，除非另外明确规定。

15

实施例 1

人类肝细胞流式细胞分选

双重激光流式细胞分析以及将人类肝细胞从胎儿和成年组织中分选出来在 Becton Dickinson FACSVantage SE 上实施。一种氩离子激光和氦氖激光应用为主要和次要刺激源分别在 488nm 波长发射 150mW，633nm 波长发射 30mW。前向光散射
20 和直角被线形放大，并通过 48nm 带通过滤器测定，在前向扫描检测器前运用 0.60D 中性密度过滤器，为了衰减来自较大细胞群体的高水平前向角度散射信号。在这种装置中，前向扫描轴上有足够的动力范围来捕获和测量来自肝组织中发现的多种大小范围细胞的前向角度散射信号，在单个线性十倍程中。典型的前向扫描放大器放大设置的范围是 8-16。FITC、PE 和 PI 荧光色素在 488nm 处都被激发，分别应用
25 530/30、585/42、610/20nm 带通过滤器测定荧光发射。APC 和 APCCy7 荧光素在 633nm 处被激发，并分别应用 660/20 带通和 750 长通过滤器测定荧光发射。所有的免疫荧光测定都用对数放大。

每个荧光通道的电压设置应用 Spherotech RFP 30-5 参考粒子校准。校准后，
30 应用单色对照经验性的产生补偿设置。

流式细胞仪上的流体学装置的结构为了肝衍生组织中发现的细胞独特大小的

分布和特征而最优化。应用一种传统制造的口径为 130 μ m 的油嘴以及一种 10psi 的鞘压装置。所述鞘储器、样品存放器和接受管架都通过冷却回流器保持在 4℃。

肝衍生细胞的培养亚群可以通过在细胞悬浮液中加入 PI 而确认, 对所述细胞进行流式细胞计数, 并分析数据, 数据是前向扫描与 PI 荧光的绘图。可根据以下的特征溶解三种不同群体; 表现为低前向扫描、低水平荧光(R1)的小细胞簇; 表现为高前向扫描和中度荧光(R2)的大细胞簇, 以及包含第三种不同簇的死亡细胞, 这种簇带有连续的低至中等水平的前向扫描信号和非常高水平的荧光。结果在图 1 中显示。所述 R2 亚群通过进行如上所述的缺乏 PI 的分析证明了是自发荧光的。可根据以下的特征溶解两种不同群体; 表现为低前向扫描、低水平荧光的小细胞簇; 表现为高前向扫描和中度荧光的大细胞簇。

聚集物的区别是应用脉冲处理, 通过描绘前向扫描峰的高度对宽度, 后者形成了第三区域的基础。一种分选的门定义为这三个区域交叉点。所述靶群体的初步富集在第一轮分选中完成。所述富集产物然后再被分选为相关纯度。产物的纯度总是通过再分析而校验。

实施例 2

肝祖细胞的分离

先前冷冻的肝细胞或新近分离的肝细胞用 5E12 染色。所述细胞通过应用 5E12Ab 的 MACS 柱富集 5E12, 然后分选 5E12⁺的细胞。或者, 5E12⁺的细胞在染色后直接分选。为了分选, 细胞在 R1 和 R2 门之间分离。R2/5E12⁺细胞代表了体外或活体试验中的大多数肝移植细胞。所述细胞的特征被描述为在相同的细胞中表达 ck19 和白蛋白(如图 2A 和 2B 显示)。除了 5E12 外, 对于较低水平 I 型 HLA 表达的选择为肝移植富集, 应用和人类 I 型 HLA A、B、C 起反应的抗体(W6-32 抗体)。当门控 R2 细胞时, 三种不同簇亚群的细胞可以通过分析 5E12 对比 I 型 HLA 的荧光, 如二维密度或等值线图而溶解(图 1)。一种亚群表现为 5E12 和 HLA-

I 型 HLA 都是阴性染色(5E12⁻HLA⁻); 第二种亚群表现为较低相关水平的 5E12 荧光和较高水平的 I 型 HLA 荧光(5E12⁻HLA⁺); 以及一种第三亚群表现为较高水平的 5E12 荧光和较低水平的 I 型 HLA 荧光(5E12⁺HLA^低)。

然而单染色分析, 例如一种颜色, 不必然提供明显的群体差别, 图中明显的是, 在两种颜色的图中细胞分为不同的亚群。

结果

提供一种方法来富集肝祖代群落，通过分选细胞表面的抗原表达。从分选的人类胎儿肝细胞促克隆形成试验所得的结果：通过生存能力 (PI)、大小 (FS) 和自身荧光分选细胞，然后进一步通过表面抗体分离，并用 FFS 或 BMS-6 平皿培养。在分选 (ck19/白蛋白或仅仅 ck19) 后产生的所述肝群落的繁殖能力 2 周后在培养物中比较。只有 R2 门控的细胞 (FS⁺PI^低) 产生群落。

所述 5E12 抗体富集人类胎儿和成年肝祖细胞。图 1 举例说明了用 5E12 单克隆抗体对人类胎儿肝细胞 (16 g. w.) 染色。包括在 R2 门中的细胞用 5E12 或同型匹配的对照 mAb 染色。

表 1 和表 2 显示了分选的 5E12 肝细胞限制性稀释分析的结果。人类胎儿肝细胞应用 MACS 柱富集为 5E12 阳性细胞。LR2、5E12 阳性细胞在 BMS-6 基质上的 96 孔培养皿中分选，每孔 1-500 细胞。通过 ELISA 监测人类白蛋白的表达，为了检测培养孔中祖细胞集落。

表 1
分选的 5E12 阳性细胞的限制性分析

应用 ACDU 分选的 5E12+肝细胞和 8 种稀释点 (1、5、10、25、50、125、250、500 细胞) 进行分析。在第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天通过 ELISA 检测到了白蛋白阳性的孔。

天数	R2/5E12
D7	1/39
D14	1/50
D21	1/79
D28	1/147

实施例 3
肝移植细胞表型特征

获得人类胎儿肝细胞和成年肝细胞并维持在 4℃。为了制造细胞悬浮液，将组织切碎，重新悬浮在 Ca²⁺ 自由的缓冲盐溶液中，在 37℃透明质酸酶存在的条件下用胶原酶消化 30 分钟。任选的，所述细胞悬浮液另外在 37℃用胰蛋白酶/EDTA 消化 20 分钟。所述细胞悬浮液通过 70μm 尼龙过滤器过滤并在包含 2%FBS、2mM EDTA 的 IMDM 中重悬浮。在试样量的细胞中加入两种或多种预先滴定过的抗体化合物，如图 3 和 4 显示。对所有染色利用同型匹配对照。如实施例 1 和实施例 2 所描述的

通过流式细胞计数分析所述细胞。

数据(图 3A)显示 CD14 不对 LEC 细胞染色(R2, 5E12⁺HLA^低)。CD54、CD38 和 CD34 阳性沾染所述 LEC(图 3B-3D)。图 4A、4D、4G 显示了 LEC 典型的染色式样。图 4B、4E 和 4H 显示了 E-钙粘着蛋白、EpCam 和 CD49f 与 5E12 相比在 R2 群体上有相似的染色形态。图 4C、4F 和 4I 显示了所述 LEC 群体选择 E-钙粘着蛋白、EpCam 或 CD49f 一律是 5E12 阳性的。这些数据证明 5E12、E-钙粘着蛋白、EpCam 和 CD49f 可以在选择 LEC 中交换应用。

实施例 4

10

人类肝细胞的体外试验

肝细胞包括肝祖细胞显示在应用为饲养物的间质细胞上生存和繁殖。这些细胞的体外培养可以使得从肝脏分离和评定祖细胞。两种不同的饲养间质细胞系应用为饲养物, BMS-6, 一种骨髓间质系和 FFS-1, 一种胎儿成纤维细胞。这个试验是以饲养细胞独立的共培养系统和肝祖细胞的性质为基础的, 后者应该是带有肝移植能力的高繁殖细胞。

15

材料和方法

饲养层配制和培养环境: FFS-1 鼠成纤维细胞(来源于 ST0)用丝裂霉素处理 5 小时(10 μ g/ml, Sigma, St Louis, MO)并以 5 $\times 10^4$ 细胞/cm² 平皿培养。BMS-6 鼠骨髓间质以 1.6 $\times 10^4$ /cm² 平皿培养。所述饲养层在 1:1 的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基和含 10%FCS 的培养基-199 混合物中培养。

20

应用流式细胞计数分离富集的肝细胞成分: 应用典型的组织消化步骤和单细胞悬浮液配制肝细胞制剂, 并通过多-参数的流式细胞计数分析它。特异的肝细胞亚群分离是通过应用荧光激活的细胞分选器而完成的, 这种分选器(FACSTM)由 Becton Dickinson 免疫细胞计数系统制造。特别的, FACS Vantage SE 配置了氩、氪和氩-氖离子激光, 它们提供了三种空间上分离的激发源。这个步骤使得我们可运用很多商业上可利用的荧光探针来分析独立的细胞特征。在这个仪器中配置特殊的亚系统使得可以将编号的单细胞沉积物直接加到先前用饲养层细胞培养的组织培养皿单孔中。计算机辅助的高速数据获得系统使得可从每个单一细胞收集到总共 9 个独立的数据参数。可以收集列表形式的包含多于一百万事件数据文档的能力使得可以方便的区分十分低频率的亚群。数据参数以列表形式数据文档收集并用软件程序 Flowjo(www.Treestar.com)分析。将纯净的肝细胞群体直接分选入先前用饲养层细

30

胞培养过的 96-孔或 24-孔培养皿的单孔中。

冷冻细胞的规定: 在 IMDM+10%FCS 和 40%FCS 中的重悬浮肝细胞放在冰上 5 分钟, 然后以 1:1 和 IMDM+10%FCS 和 15%DMSO 混合。然后在 -80℃ 液态氮中冷冻细胞。

肝炎感染的规定: 带有包含肝炎的人类血清的温育肝细胞放在冰上一小时, 然后将细胞放在间质上平皿培养并培养细胞 2 周。

结果

通过 MACS 或分选或两者, 将肝细胞群体分离进入 R2/5E12+对比 R2/5E

12-中。然后将所述细胞培养 2 周, 并通过在正在形成的集落中的白蛋白和 ck19 的表达来评定 CFC-LBC (形成细胞-肝多能集落的集落), 如图 8 所示。所述肝集落频率通过应用 3 种不同细胞浓度的限制性稀释液计算。数据在表 3 和图 8 中显示 (人类成年肝细胞)。

限制性的稀释试验可以利用细胞分选和 ELISA 的联合来测定限制性稀释液。例如, 细胞可根据 R2 门、5E12 的表达和 HLA 抗原的表达分选。所述分选细胞如上所述稀释入 96 孔的平皿中, 并在体外培养 14 天, 然后通过 ELISA 分析 α -胎蛋白、白蛋白和 α -1-抗胰蛋白酶的表达。

实施例 5

肝炎感染的体外模型

为通过肝炎病毒体外感染肝集落提供一种方法。分离包含肝移植祖细胞的胎儿肝细胞 (18g. w.) 并用肝炎病毒 D (HDV) 感染, 培养 2 周。将细胞培养 2 周, 固定并对白蛋白 (APC-蓝)、细胞角蛋白 19 (FITC-绿) 和 HDV (PE-红) 染色来识别被肝炎 D 病毒的肝祖细胞。用 Hoechst 对细胞核复染。

胎儿肝细胞和来自感染 HDV 病毒病人的血清一起温育。1 小时后, 将所述样品放在间质上并离开 2 周。固定培养物并用肝和抗 HDV 标记物对其染色。这些培养方法支持了感染肝炎病毒细胞的生长。

实施例 6

人类肝移植细胞群体的体外扩增

将已经富集为具有 HLA^{hi}5E12+表型的肝祖细胞的人类肝移植细胞平皿培养或在提供细胞黏附、粘连和繁殖的细胞外矩阵 (ECM) 中培养。所述细胞在联合矩阵构成层粘蛋白的合适基础培养基中培养, 同时存在肝移植细胞 (LEC) 培养基。图 11 显示

了细胞的形态。

肝移植细胞(LEC)培养基: DMEM/F12(50:50)和 L-谷氨酰胺; 10%胎牛血清; 地塞米松(10^{-7} M); 烟酰胺(10mM); β -巯基乙醇(0.05mM); 青霉素/链霉素(1X); 重组人类肝细胞生长因子(40ng/ml); 重组人类表皮生长因子(20ng/ml)。

- 5 在体外扩增的整个过程中, 扩增细胞的促克隆形成潜力在间质共培养试验中评定, 如上面对于未培养肝细胞所描述的。所述分泌的肝蛋白质, 白蛋白、 α -1 抗胰蛋白酶或 α -胎蛋白通过来自 ECM 加 LEC 培养基上或间质共培养基中繁殖细胞的培养上清液的 ELISA 分析来监测。

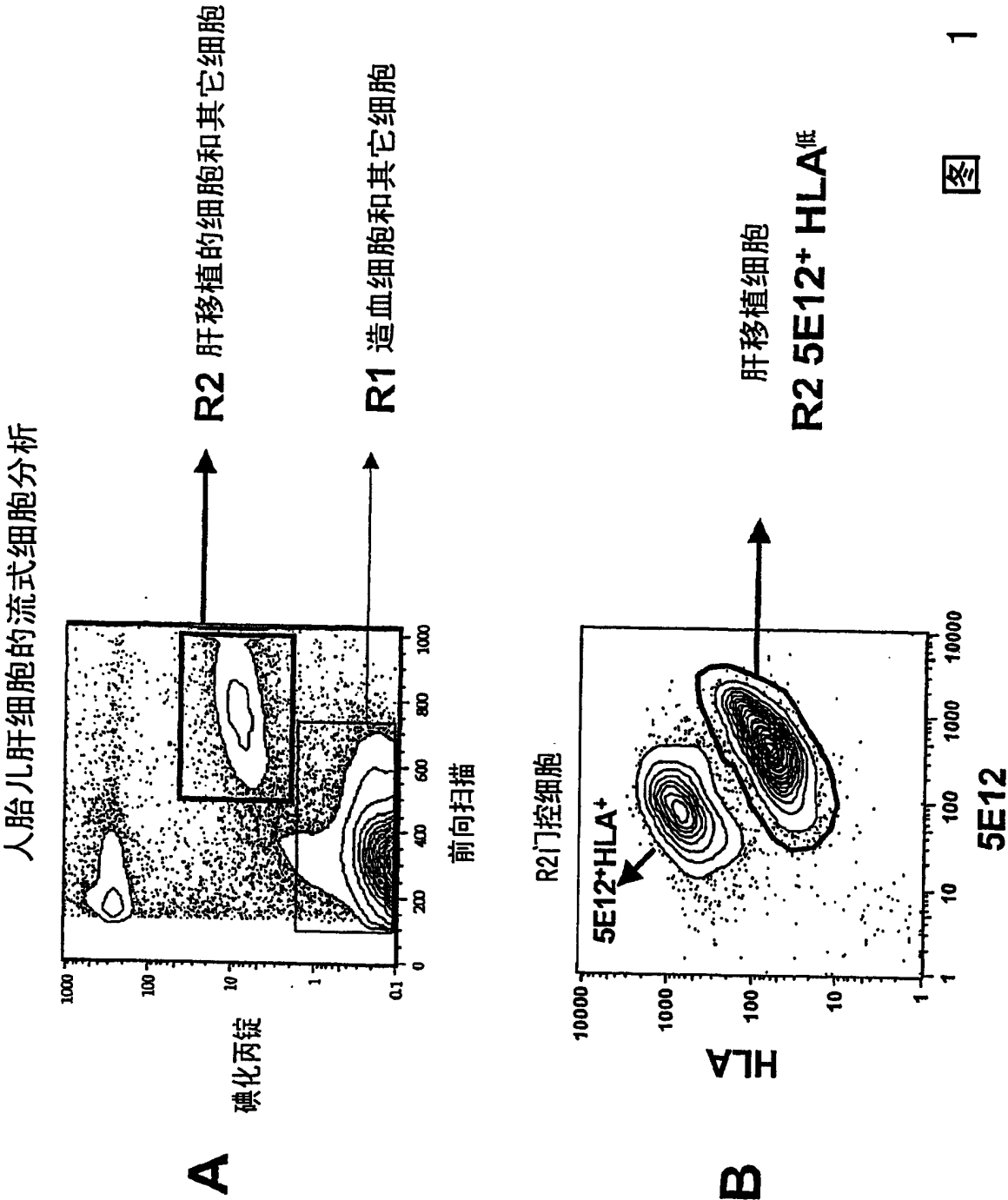
- 10 通过在 ECM 加 LEC 培养基上培养扩增的细胞的移植潜力可通过在多种合适动物模型中移植来评定, 包括 NOD-SCID 小鼠或 NOD-SCID/FAH 小鼠。另外一种方法是诱导扩增细胞的分化, 作为一种提高改善肝移植或长时间肝细胞功能的方法。通过在 ECM 加 LEC 培养基上培养扩增的细胞可暴露于另外的生长因子、细胞活素或分化试剂来提高成熟肝细胞分化状态。这种处理对于扩增和分化细胞移植潜力的影响可以通过在上述动物模型中移植来评价。

15

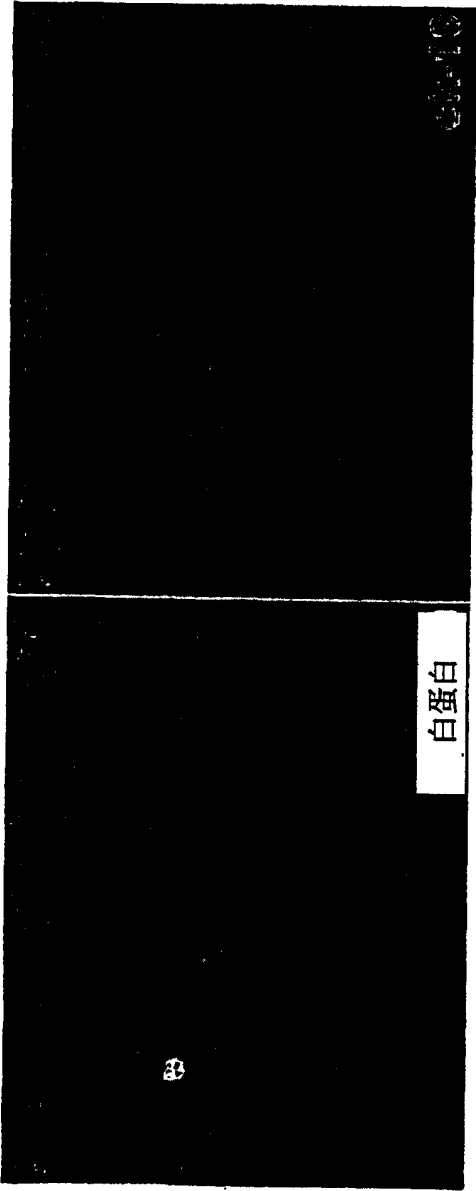
实施例 7

人类肝移植细胞群体的移植

- 人类肝细胞的移植和肝细胞分化潜力通过移植入 NOD-SCID 小鼠而评定。简单的, 将人类肝细胞重新悬浮在注射缓冲液中(50% Matrigel BD Biosciences #356234, 50% DMEM)并在冰上培养直至注射。将注射缓冲液中总共 20ml 的细胞注射入新生 0-48 小时的 NOD-SCID 小鼠肝脏中。来自被注射小鼠的血清在移植 5-6 周后通过 ELISA 分析人类肝-特异性蛋白质的存在(白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶, 或 α -胎蛋白)。图 6 中, 接受总肝细胞、分选总肝细胞或分选 R2 5E12⁺ HLA^低细胞移植 6 周后的 NOD-SCID 小鼠血清中发现循环人类 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)和白蛋白(ALB)。
- 25 移植了 10,000 个分选 R2 5E12⁺ HLA^低细胞的小鼠中 AAT 或 ALB 水平要比移植了 75,000 个未分选总肝细胞或 10,000 或 40,000 个分选总肝细胞小鼠中的高或相等。移植了分选 R2 5E12⁺HLA^低细胞的小鼠持续 5 个月重复发现人类 AAT 或 ALB, 表明了持久的移植和持续的肝分化。图 7 显示了在接受移植 6 周后的代表性 NOD-SCID 小鼠肝脏中的移植人类胎儿肝细胞中发现了人类 ALB 或 CK19 蛋白质。在处死动物
- 30 时由 ELISA 分析发现的人类 AAT 和 ALB 的血清水平在底部组中显示。

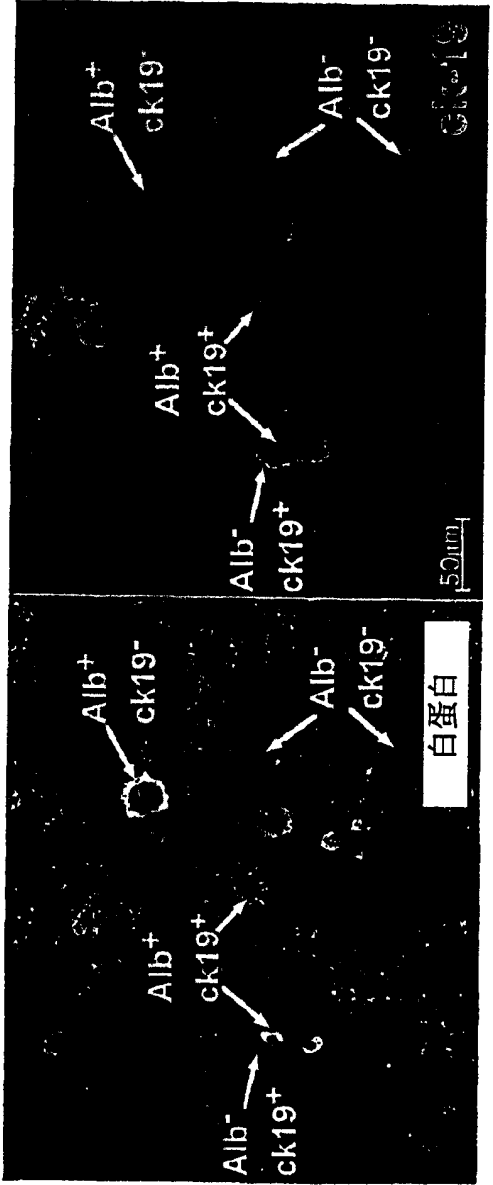


人胎儿肝细胞群体的异质性
R1门



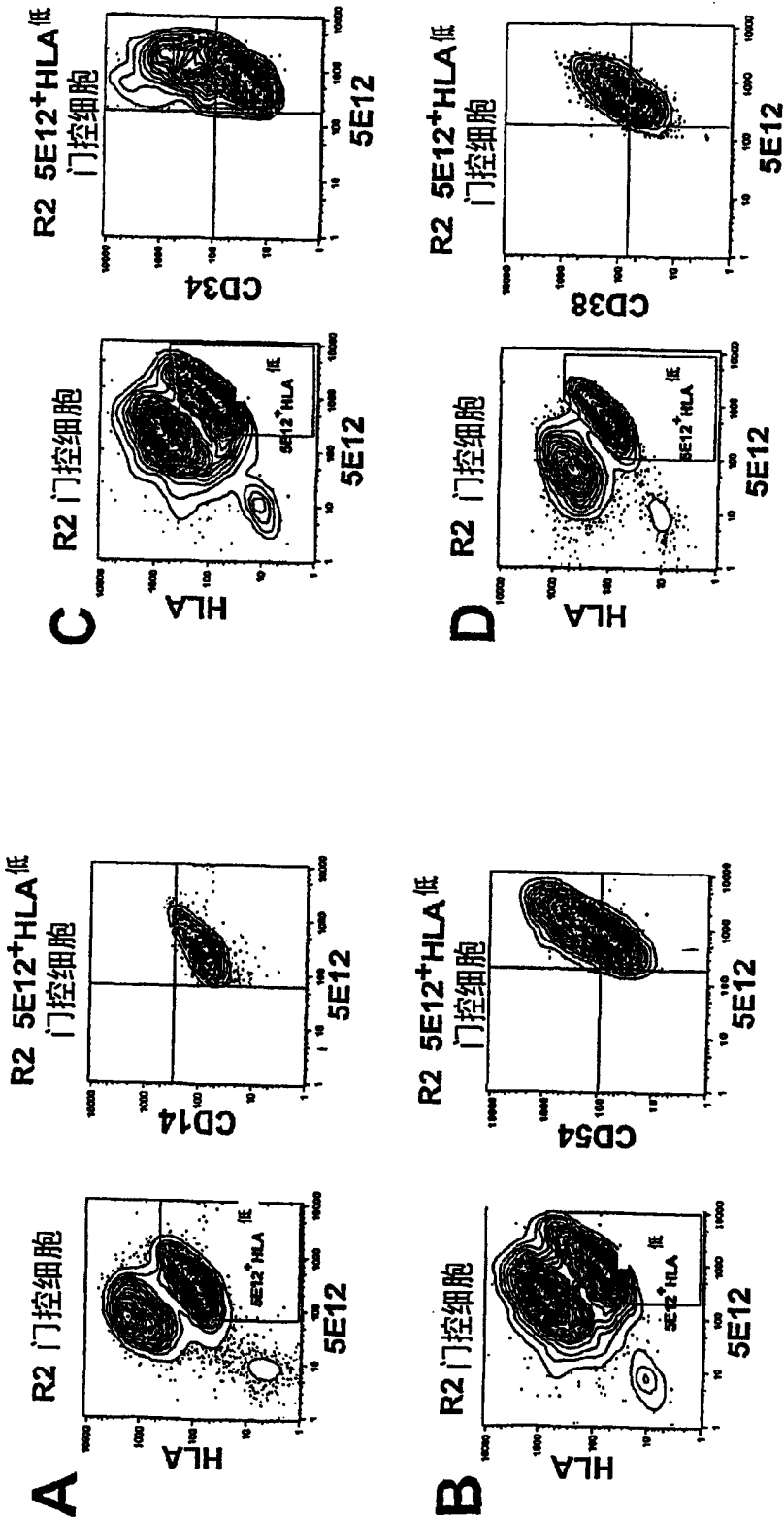
A

R2门



B

人胎儿肝细胞表型分析



图

3

人胎儿肝脏

E-钙粘着蛋白⁺HLA^低 或 EpCAM⁺HLA^低 或 CD49f⁺HLA^低
识别与 5E12⁺HLA^低 相同的群体

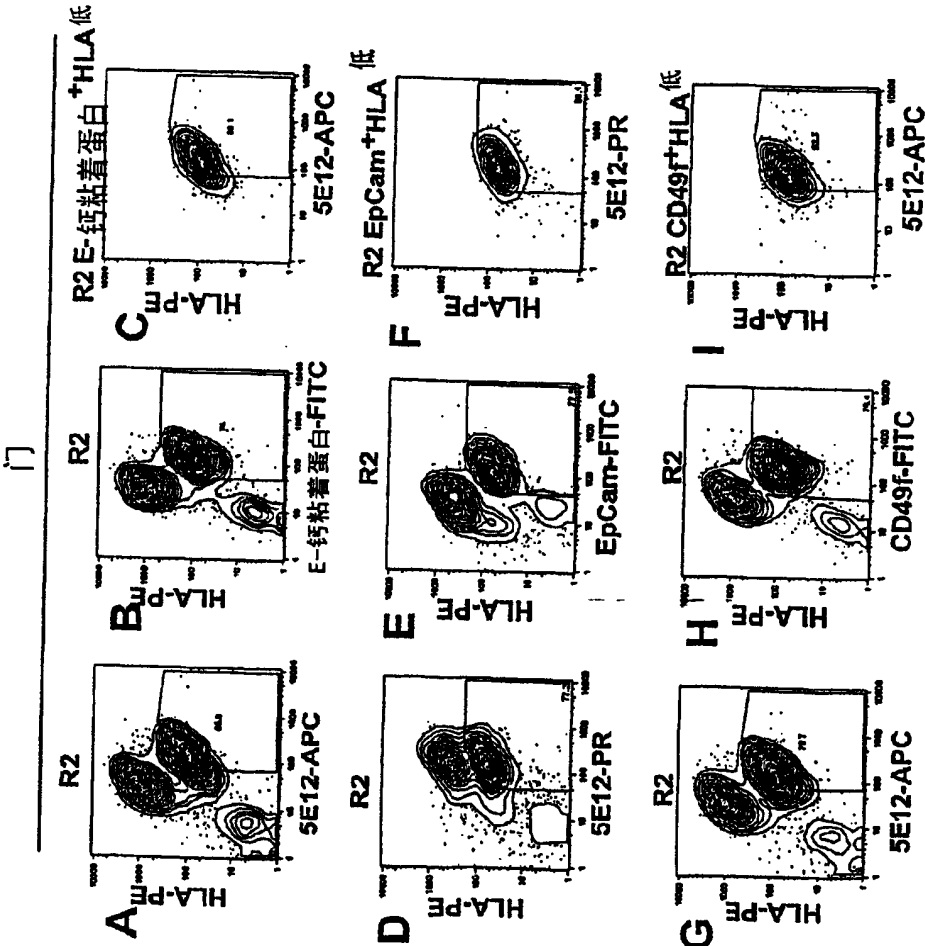


图 4

两周后培养物中的R2 5E12⁺HLA^低克隆

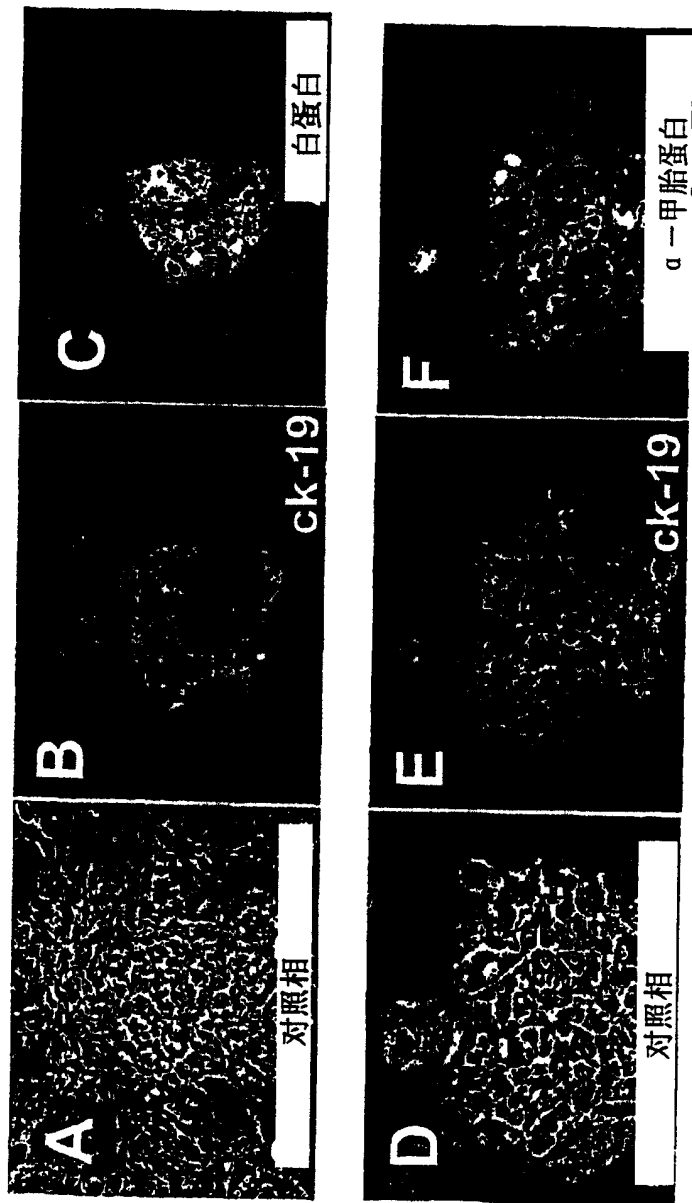


图 5

R2 5E12⁺ HLA^低 肝祖细胞的移植

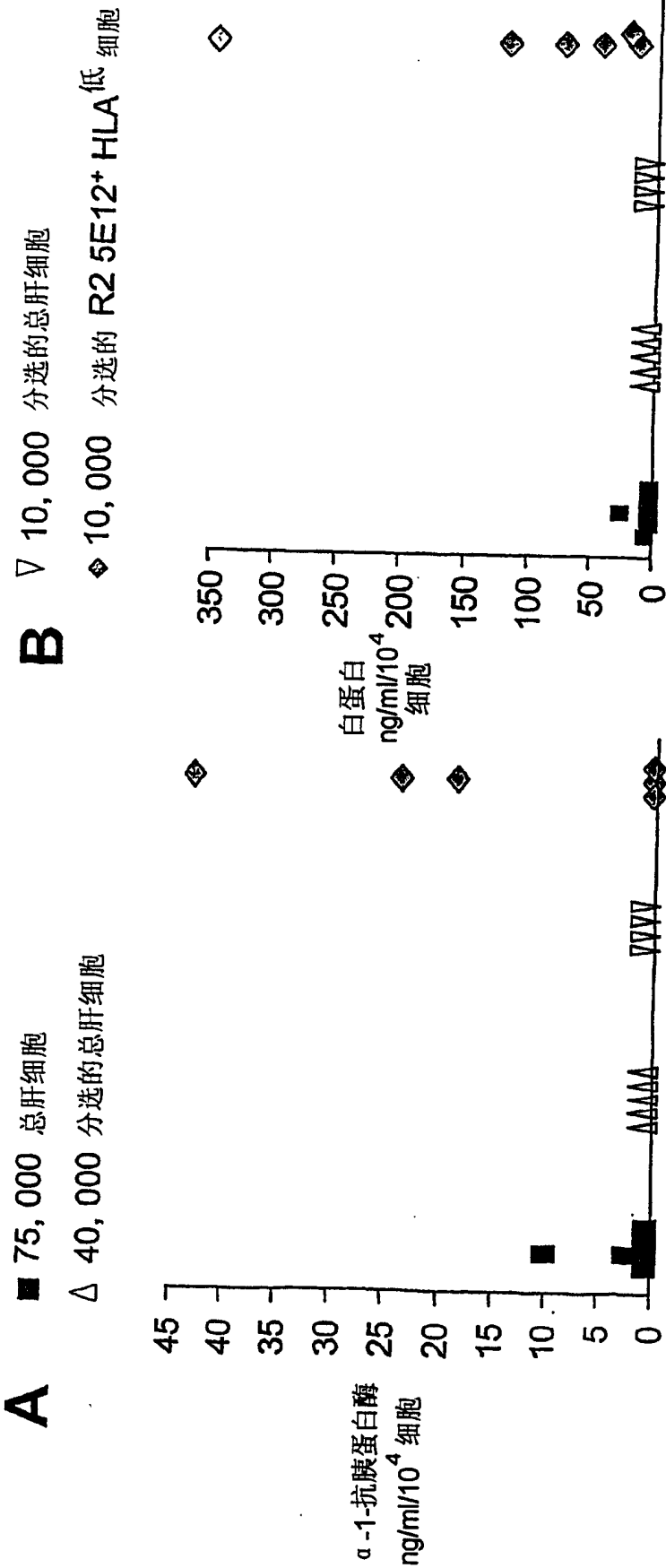
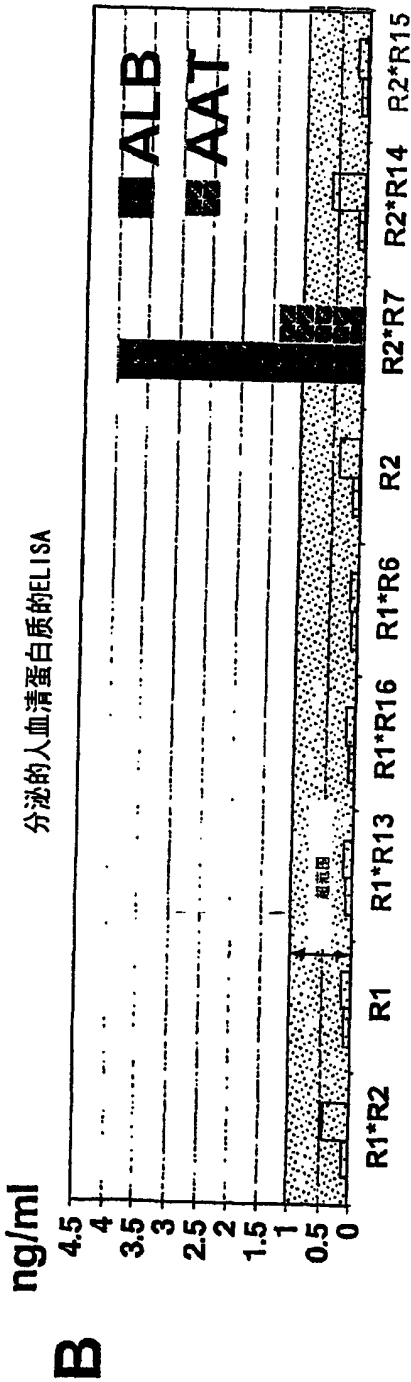
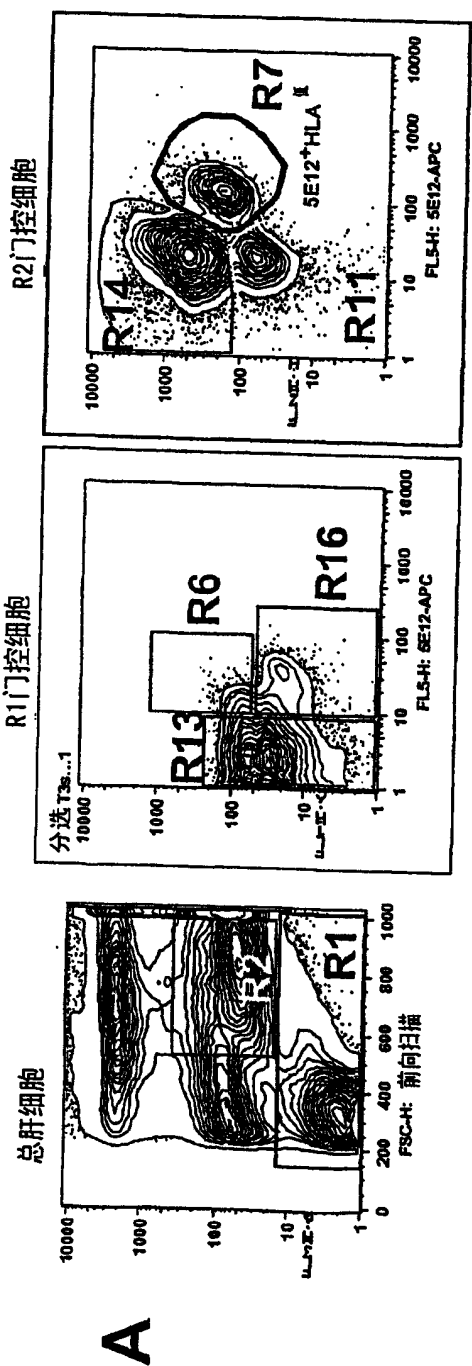
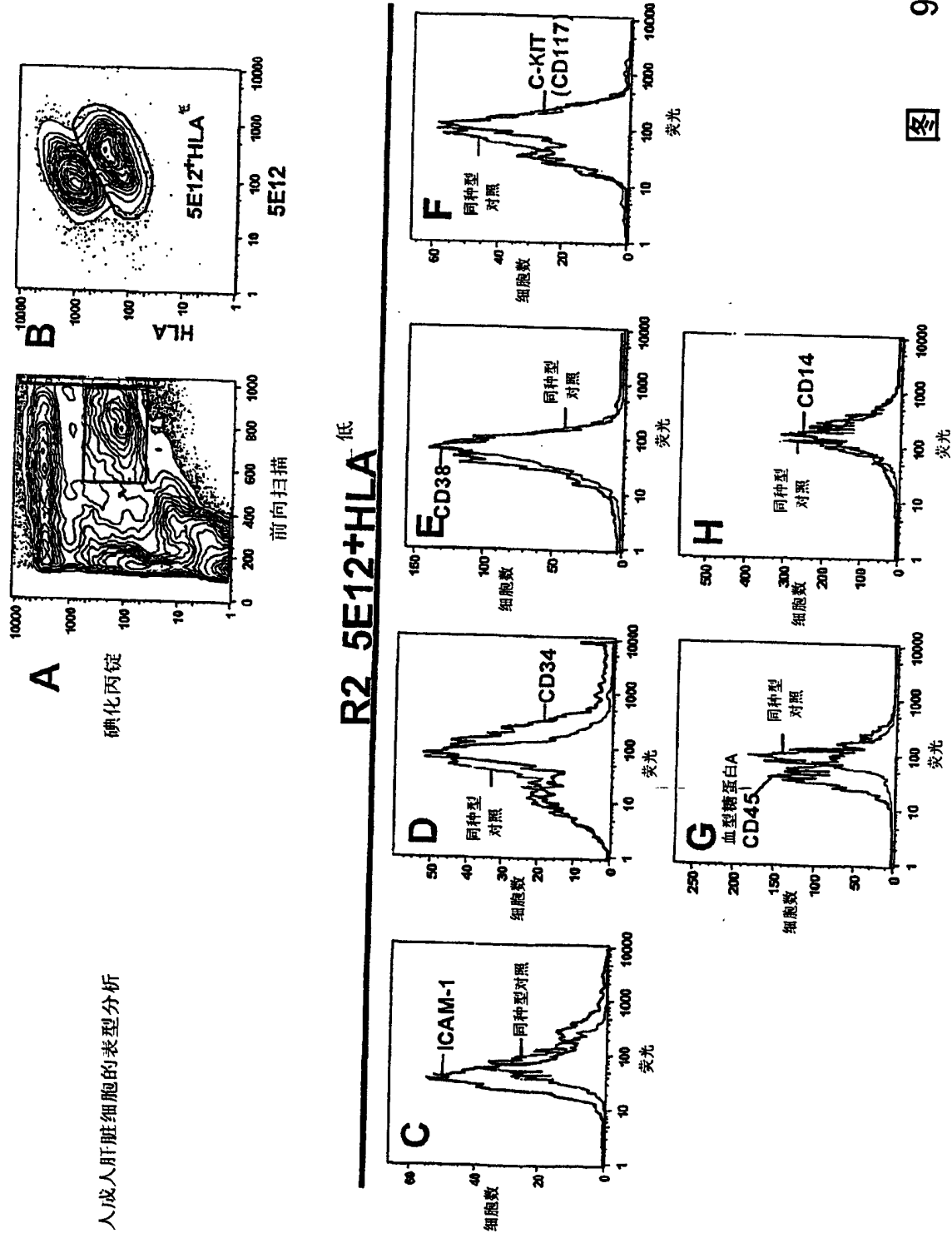


图 6

人成人肝脏的亚细胞群体的分离



BMS6上2周，每个群体分选5000细胞



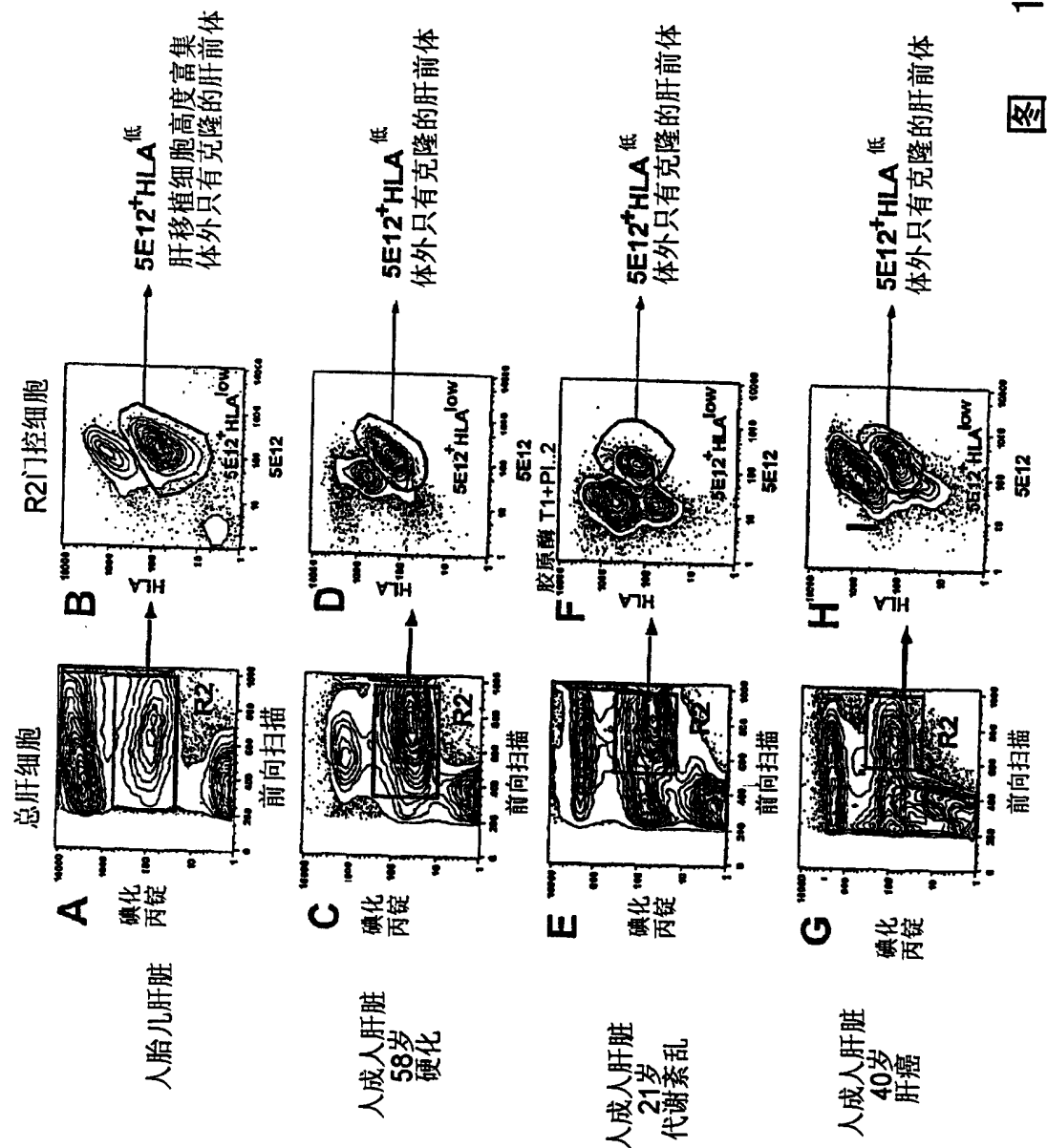


图 10

肝移植细胞在无基质的培养物上的体外表达

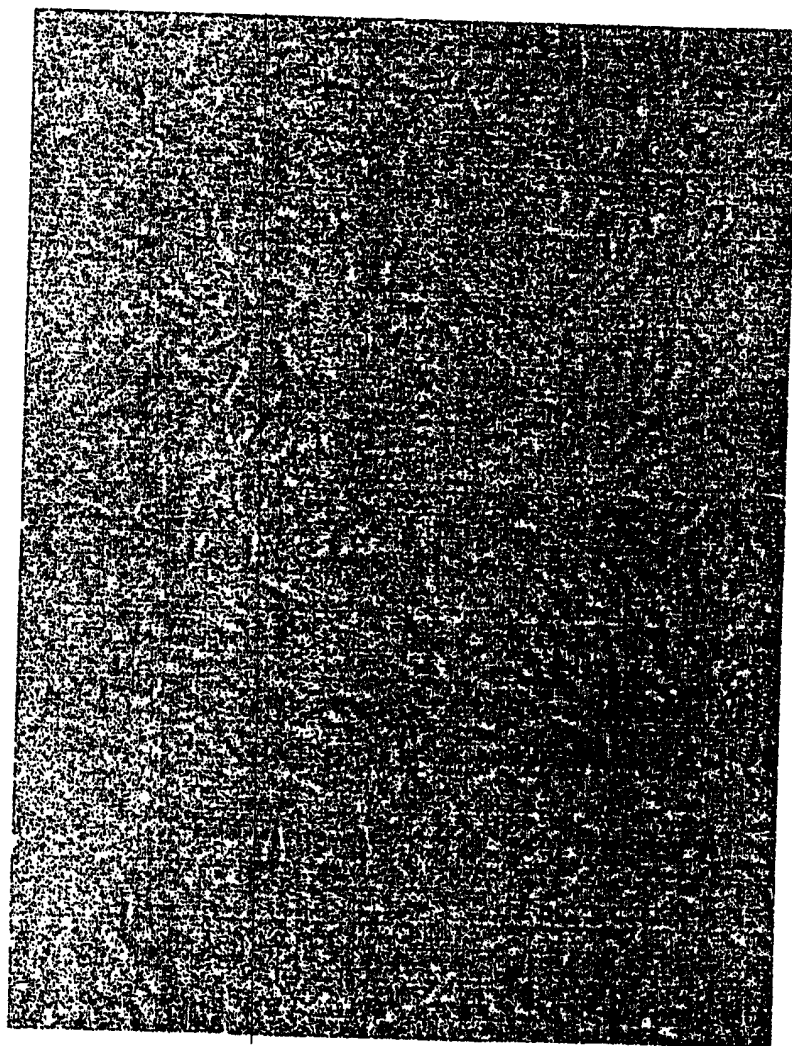


图 11

分选后，人肝脏移植细胞(LEC)的有限稀释分析

	ALB	AAT	AFP
R1 和 R2	1/14,975	1/374,377	0
R2	1/308	1/249	1/940
R2 5E12+	1/20	1/28	1/74
R2 5E12-	1/1,546	1/916	1/7,488
R2 5E12+ HLA ^低	1/7	1/4	1/59
R2 5E12+ HLA+	1/2,135	1/1,053	1/374,378

LEC活性的差异倍数			
	ALB vs. R2	AAT vs. R2	AFP vs. R2
R2	N/A	N/A	N/A
R2 5E12+	15.4	8.9	12.7
R2 5E12-	-5	-3.6	-7.9
R2 5E12+ HLA ^低	44	62.2	15.9
R2 5E12+ HLA+	-6.9	-4.2	-398

表 2

用免疫染色体筛选LE(qck19+/Alb+)

组织#	样品	克隆频率	差异倍数 相对于总细胞 相对于5E12-
样品A 新鲜组织	总细胞	1/1,045	
	5E12 后 MACS	1/218	4.8
样品B 新鲜组织	总细胞	1/1487	
	5E12 后 MACS	1/291.6	5.1
样品C 冻结组织	总细胞	1/306	
	5E12 后 MACS	1/57.3	5.3
	分选细胞 R2*5E12-	1/711	-2.3
	R2*5E12+	1/96.1	3.2 7.4
	R2*5E12+ 后 MACS	1/80.0	3.8 8.8
样品D 新鲜组织	分选细胞R2	1/691	
	R2*5E12-	1/21413	-30.9
	R2*5E12+	1/2000.0	-2.9 10.7

表 3