



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03806699.8

[43] 公开日 2005 年 7 月 20 日

[11] 公开号 CN 1643133A

[22] 申请日 2003.3.24 [21] 申请号 03806699.8

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 25 [33] US [31] 60/367,181

[86] 国际申请 PCT/US2003/009091 2003.3.24

[87] 国际公布 WO2003/083064 英 2003.10.9

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.22

[71] 申请人 华盛顿大学

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 M·R·哈默曼

[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 罗菊华

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 12 页

[54] 发明名称 嵌合胰腺

[57] 摘要

增加哺乳动物受体胰腺量的新方法、组织和组合物，包括从哺乳动物供体收获未成熟胰腺组织和在允许该胰腺组织变得形成血管和成熟、由此发育为在受体中至少产生胰岛素的有功能嵌合内分泌胰腺的条件下将所述组织移植到哺乳动物受体的腹膜腔。本发明也包括适合移植到哺乳动物受体腹膜腔来增加该哺乳动物受体的胰腺量的哺乳动物未成熟胰腺组织，以及用于处理胰腺组织、受体免疫抑制和受体共刺激阻断的方法和组合物。

1. 一种增加哺乳动物受体胰腺量的方法，包括从至少一个哺乳动物供体收获未成熟胰腺组织和在允许该胰腺组织变得形成血管和成熟、由此发育为在受体中至少产生胰岛素的有功能嵌合内分泌胰腺的条件下将所述组织植入哺乳动物受体的腹膜腔。

2. 权利要求1的方法，其中哺乳动物受体是人。

3. 权利要求2的方法，其中哺乳动物供体是猪。

4. 权利要求3的方法，其中所述组织的收获是从供体妊娠期的大约第20天至大约第35天实施的。

5. 权利要求2的方法，其中将所述组织植入邻近供体肠系膜上动脉分支的部位。

6. 权利要求5的方法，其中将所述组织植入供体网膜囊。

7. 权利要求1的方法，其中所述组织包含至少一个基本上未形成血管、至少基本上不含抗原呈递细胞的胰原基的至少一个未消化的、未离解的部分。

8. 权利要求7的方法，其中所述原基至少包含腹胰原基。

9. 权利要求7的方法，其中所述原基至少包含背胰原基。

10. 权利要求7的方法，其中所述组织包含至少一个完整胰。

11. 权利要求1的方法，进一步包括将至少一种免疫抑制组合物给予受体来降低所述受体对所述组织排斥的机会的步骤。

12. 权利要求1的方法，进一步包括将至少一种共刺激阻断组合物给予所述受体来降低所述受体对所述组织排斥的机会的步骤。

13. 权利要求1的方法，进一步包括处理所述组织来增强该组织移植后生长和发育的步骤。

14. 适合移植到哺乳动物受体腹膜腔内来增加哺乳动物受体胰腺量的哺乳动物未成熟胰腺组织，所述组织包含至少一个基本上未形成血管、至少基本上不含抗原呈递细胞的胰原基的至少一个未消化的、未离解的部分。

15. 权利要求 14 的组织，其中通过在移植前和收获后在冰冷条件下制备或保存它，使得所述组织适合移植。

16. 权利要求 14 的组织，其中通过将所述组织接触生长因子，使得所述组织适合移植。

17. 权利要求 14 的组织，其中所述组织包含至少一个腹胰原基。

18. 权利要求 14 的组织，其中所述组织包含至少一个背胰原基。

19. 权利要求 14 的组织，其中所述组织包含至少一个完整胰。

20. 一种治疗需要这种治疗的哺乳动物受体的糖尿病的方法，包括从至少一个哺乳动物供体收获未成熟胰腺组织并在允许该胰腺组织变得形成血管和成熟、由此发育为在受体中至少产生胰岛素的有功能嵌合内分泌胰腺的条件下将所述组织植入哺乳动物受体的腹膜腔。

嵌合胰腺

相关申请

本申请享有 2002 年 3 月 25 日申请的美国临时申请系列号 60/367,181 的优先权权益,将该美国临时申请并入这里,如同在这里全部重新叙述。

本发明中的政府权利

本发明是在来自国立健康研究院的政府拨款 R01 DK53497 的支持下进行的。美国政府在本发明中具有某些权利。

发明领域

本发明涉及生物技术领域,尤其是增加哺乳动物受体胰腺量的方法、组织和组合物。

发明背景

自发或原发性糖尿病是糖类、脂肪和蛋白代谢的慢性紊乱,其特征在于其绝对或相对胰岛素不足、禁食性高血糖、糖尿和向动脉粥样硬化、微血管病、肾病和神经病变发展的惊人趋势的完全表现形式。葡萄糖未充分使用是所有糖尿病患者的特征,但是仅一些具有因 β 细胞损失导致的清楚明确的严重胰岛素不足。大量其他糖尿病患者罹患与对外周组织胰岛素的明显抗性相关的胰岛素分泌反应损害。

短语“自发性糖尿病”包含具有上述共同特征的一组异质疾病。已经鉴定了该疾病的至少两个主要和几个少见的变型。一个主要变型 - 胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM) (I 型) 占糖尿病患者的大约 10%。第二个主要变型 - 非胰岛素依赖性糖尿病 (NIDDM) (II 型) 代表全部糖尿病患者的剩余 90%。缺乏使用外源制备的胰岛素的规律胰岛素替代疗法和/

或仔细监测糖尿病患者的饮食，这种患者会经历广泛的衰弱症状，其中一些可进展为昏迷并最终死亡。

在哺乳动物中，胰腺是负责维持血糖正常的主要器官。通常，成熟哺乳动物胰腺由称作背侧胰腺和腹侧胰腺的2个胰芽（或原基）发育而来。在发育过程中这些原基将融合形成胰腺，尽管背侧原基首先出现并产生胰腺的大部分。腹侧原基出现于胆管旁边并形成胰腺头部和钩突部分。

成熟胰腺具有外分泌（消化）和内分泌（激素）功能。外分泌功能包括分泌酶帮助消化。胰腺激素功能包括至少分泌胰岛素和胰高血糖素，两种激素一起帮助调节血液葡萄糖水平。在内分泌胰腺内部，是组织成称作胰岛的区域的 β 细胞产生和分泌胰岛素。胰高血糖素是由胰岛内部的 α 细胞分泌的。

已经做了很多尝试通过手术方法来替代糖尿病受体中胰腺量和/或功能。例如，将来自人尸胰腺的消化和分离的胰岛移植给免疫抑制的糖尿病人是建立的治疗糖尿病的方法，但是是实验性方法。在现有技术条件下，这个技术的主要限制是可利用进行移植的人胰腺组织的供应不足。此外，在消化和分离步骤过程中胰岛组织可能损失或退化，而且移植后仅一部分被移植的胰岛移入宿主。胰岛内 β 细胞的量增加也可能是次佳的，因为这种移植物显示出扩充 β 细胞群的潜力有限。此外，免疫抑制和任何尸体移植中涉及的有关问题可能十分重要。

本领域也已知未成熟完整大鼠胎胰腺同基因移植到大鼠肾被膜下间隙、前眼室、睾丸、皮下袋、第三心室和颊袋。这种工作也包括胰岛素处理对所移植组织的生长和分化的作用。

也已知胶原酶消化和分离的成熟大鼠和仓鼠胰岛移植给仓鼠皮肤皱褶和纹状肌组织，其中分离的胰岛重新形成血管。已知至少两个免疫抑制方案，环孢菌素A（CsA）和15-脱氧精脒菌素（DOS）对这种异种移植有用。类似地，已知分散发育中大鼠胰腺（切碎、分离和胶原酶消化）注射到四氧嘧啶糖尿病大鼠的腹膜腔或肾囊下部位至少短暂逆转它们的糖尿病。

猪胎胰腺的分离胰岛簇也已经用作人糖尿病患者的异种移植物。因此，已知从猪胎分离胰岛并将胰岛注射到人糖尿病患者的静脉。这种步骤的一个显著问题是需要用环孢菌素、泼尼松龙和硫唑嘌呤维持免疫抑制。另外的问题是这种移植物无助于受体达到循环葡萄糖水平的控制。

现有方法的缺点是明显的。分散和聚集细胞方法需要大量供体组织并且通常每个受体需要多个供体。也需要强劲的免疫抑制帮助避免移植细胞的急性排斥。而且，在分散形式细胞和聚集移植物的情况下，实际植入可能难以控制并且未曾产生单一发育中嵌合器官。除了其它差异，现有的完整成年或未成熟胰腺组织的植入所利用的组织发育得比本发明的组织实质上更高并且没有集中于腹膜作为移植位置。结果，现有技术显示超急性和/或急性血管排斥风险增加以及多余和不必要外分泌胰腺功能发生的可能。仅本发明允许发育为新形成血管的嵌合胰腺器官，该器官具有内分泌但没有外分泌功能，同时基本上避免或降低了至少超急性和急性血管移植排斥。

本发明的嵌合胰腺实质上增加或至少能够增加宿主内的有功能重量，在宿主内建立至少接近正常水平的血糖（glycemia）。这至少由下列事实反映：1) 植入时未成熟胰腺组织移植物中缺乏胰岛素和移植两周后发育中胰岛中存在这种分泌的胰岛素；和 2) 链脲菌素糖尿病大鼠中未成熟胰腺组织的移植和随该组织发育和成熟宿主所产生的血糖正常之间延迟大约 30 天。

因此，并鉴于任何现有方法不能产生人糖尿病的有效治疗，需要开发将未成熟胰腺组织移植给哺乳动物受体来增加受体胰腺量的新方法、组织和组合物。

发明概述

本发明的一个实施方案涉及增加哺乳动物受体胰腺量（pancreatic mass）的新方法，包括从哺乳动物供体收获未成熟胰腺组织和在允许胰腺组织变得形成血管和成熟，由此发育为在受体中至少产生胰岛素的有功能的嵌合内分泌胰腺的条件下将所述组织移植到哺乳动物受体的腹

膜腔。

本发明的另一个实施方案是适合移植到哺乳动物受体腹膜腔用于增加该哺乳动物受体胰腺量的哺乳动物未成熟胰腺组织。

本发明的另一个实施方案是免疫抑制移植到哺乳动物受体腹膜腔内的未成熟胰腺组织移植物的受体来降低移植组织排斥机会的免疫抑制组合物和方法。

本发明的另一个实施方案是共刺激阻断移植到哺乳动物受体腹膜腔的未成熟胰腺组织移植物的受体的免疫反应来降低移植组织排斥机会的受体共刺激阻断组合物和方法。

本发明的另一个实施方案包括处理收获的组织增强移植后组织生长和发育的组合物和方法。这个实施方案可以包括在移植前将适合移植到哺乳动物受体腹膜腔的分离的哺乳动物未成熟胰腺组织与生长因子共同孵育，增加哺乳动物受体中移植组织的移植后生长和发育。

在这里的每个实施方案中，未成熟胰腺组织可以包含胎儿哺乳动物胰腺组织，它在收获时基本上未被供体形成血管和基本上不含抗原呈递细胞。

本发明的一个目的是提供将未成熟哺乳动物胰腺组织移植给哺乳动物受体增加该受体的胰腺量的方法、组织和组合物。

在下文中，其它方面和特征一部分是明显的，一部分将被指出。

附图说明

图 1A 是移植到小鼠网膜 (omentum) 后 14 天的胚胎 (E) 第 28 天的猪后肾 (pm)。

图 1B 和 1C 显示了移植到小鼠网膜后 14 天的猪后肾的苏木精 (hemotoxylin) 和伊红 (“H&E”) 染色的石蜡包埋切片。肾小球被标为 (g)；

图 1D 图解了移植到小鼠网膜后 14 天的已发育猪后肾用小鼠特异性内皮细胞标记抗 CD31 染色的石蜡包埋切片。在猪后肾中描绘了染色阳性 (CD31 阳性) 的小鼠来源的血管结构 (箭头和箭头尖)；显示了 A&B (A)

及 C 和 D 的放大率。

图 2A 是移植到小鼠网膜后 14 天的猪后肾 (m)；

图 2B - 2E 显示了移植的后肾的 H&E 染色切片。肾小球被标为 (g)，显示了 A&B(B)，C，D 和 E 的放大率；

图 3A 是来自 E12.5 Lewis 大鼠胚胎的十二指肠 (duo) 的切片照片。背侧胰腺原基 (dp) 和腹侧胰腺原基 (vp) 被标出；

图 3B 是去除十二指肠的 dp 和 vp 的 H&E 染色切片；

图 3C 是图 3B 和 3C 所示背侧胰腺的高倍视图，显示了管泡状细胞 (tubulo-acinar cells) 的凝聚束 (condensing cord) (箭头)；

图 4A 显示了从 E12.5 Lewis 大鼠胚胎获得的胰腺原基的 H&E 染色切片；

图 4B 显示了抗胰岛素抗体染色的原基的相邻切片，组织切片中显示没有阳性染色；

图 4C 至 4F 显示了移植后两周的胰腺原基，4C 和 4E 显示了对照染色切片，4D 和 4F 显示了抗胰岛素抗体的染色。箭头描绘了胰岛为阳性染色结构；

图 5A 是移植到成年 Lewis 大鼠腹膜后 6 周的腹侧胰腺原基的对照抗体染色的切片。阴性染色组织用箭头描绘；

图 5B 是抗胰岛素抗体染色的相邻切片。箭头描绘了胰岛组织。该组织经历了生长，移植后 2 周时存在更多胰岛。

图 5C 和 5D 分别是另一个对照抗体染色切片和另一个抗胰岛素染色切片的高倍视图。

图 5E 和 5F 是抗胰岛素抗体染色的组织切片，其中待连接导管上皮的发育中导管状胰岛用箭头描绘；

图 6 图解了移植后大约十五周的胰腺原基，显示出腹膜脂肪包绕的基质内胰岛组织的嵌合器官结构，箭头描绘胰岛；

图 6A 是 H&E 染色切片；

图 6B 是对照染色的切片；

图 6C 和 6D 是抗胰岛素染色的切片；

图 7A 显示了移植后十五周恢复的胰腺组织切片，箭头表示胰岛；

图 7B 为了对比，显示了来自新生大鼠的背侧胰腺原基切片，腺泡细胞用箭头尖表示，而胰岛用箭头表示；

图 8A 显示了胰岛内细胞的电子显微镜图像，其中细胞被含有代表结晶胰岛素（箭头）的偏心浓密核的神经分泌颗粒填充；

图 8B 显示了颗粒的更高放大图像；

图 9 显示了同基因移植、未手术对照和诱导的糖尿病大鼠在三十五天期间的对比葡萄糖水平；

图 10 显示了同基因移植、未手术对照和诱导的糖尿病大鼠在四个月期间的对比葡萄糖水平；

图 11A 是显示异种移植（xeno-transplanted）（大鼠给载体处理的小鼠）未成熟胰腺组织在移植后四周的横截面的玻片；

图 11B 是显示异种移植（大鼠给共刺激阻断处理的小鼠）未成熟胰腺组织在移植后四周的横截面的玻片；和

图 12 显示了显示不同染色方案的异种移植大鼠胰腺的横截面：

图 12A 显示了对照血清；

图 12B 显示了突出产生胰岛素的细胞的抗胰岛素抗体的使用；和

图 12C 显示了突出胰岛的组合 Gomori 染色（每栏用箭头标明）。

详细说明

提供下列详细说明书帮助那些本领域技术人员实施本发明。本说明书不应被解释为过分限制本发明，因为本领域普通技术人员可以在不背离本发明发现的精神或范围的情况下作出这里讨论的实施方案的改动和变型。

本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请、数据库和其它参考文献，这里参考的所有相关申请和其中引用的所有参考文献的全部内容并入作为参考，如同在这里全部重新叙述和如同具体和单独指明每个出版物、专利、专利申请、数据库或其它参考文献并入作为参考。

本发明的一个实施方案涉及增加哺乳动物受体的胰腺量的新方法，

包括从哺乳动物供体收获未成熟胰腺组织和在允许胰腺组织被起源于宿主的血管形成血管和成熟，由此发育为在受体中至少产生胰岛素的有功能的嵌合内分泌胰腺的条件下将所述组织移植到哺乳动物受体的腹膜腔中。该未成熟胰腺组织可以包括未成熟哺乳动物胰腺组织，它在收获时至少基本上未被供体形成血管和至少基本上不含抗原呈递细胞。

一个优选的实施方案包括从至少一个胚胎哺乳动物供体，优选猪供体，收获未成熟胰腺组织，所述组织包括至少一个基本上未形成血管的背侧、腹侧或背侧和腹侧组合胰腺原基，基本上不含抗原呈递细胞。所述组织移植到糖尿病人患者的腹膜腔，在邻近肠系膜上动脉分支的部位。移植后，所述组织形成血管和成熟，由此发育为在受体中至少产生胰岛素的有功能的嵌合内分泌胰腺。所述优选方法也可以包括将免疫抑制或共刺激阻断给予受体的免疫系统来辅助预防移植组织排斥。

所述优选方法也可以包括处理该组织以增加该组织移植后生长和发育的方法和组合物。

可以基于已知移植方案以及各种因素包括类似的生理学、器官大小、抗原谱、供体可利用性和胰腺内分泌功能的类似性来选择与宿主相容的合适哺乳动物供体。

人受体的优选哺乳动物供体可以是饲养为无病原体 and 可能有一些人蛋白如衰变加速因子和 CD59 转基因的猪，或 α -gal 转移酶缺陷猪。猪是对于人受体的优选异种供体，原因是，除了其它因素，它们可比较的器官大小和它们作为供体的一般可利用性。此外，猪和人的葡萄糖内环境稳定过程和胰岛素分泌调节非常相似。

此外，对于同种异体移植给人受体，可以优选人未成熟胰腺组织。

在一个优选实施方案中，未成熟胰腺组织可以包括至少一个胚胎背侧或胰腺原基，它在收获的时候在供体中基本上未形成血管。所述组织可以进一步包括背侧和腹侧原基两者，一个或多个这样的原基，完整胰腺（背侧和腹侧原基或融合原基），或来自一个或多个供体的这种组织。尽管优选使用完整原基，但是包括这种组织的未消化、未离解部分也在本发明未成熟胰腺组织的范围内。

可以在适当发育阶段从至少一个供体收获未成熟胰腺组织，即，在背侧和腹侧原基变为融合之前立即或之后数天，和供体血管形成和抗原呈递细胞在该组织内产生和分布之前。优选，在未成熟胰腺开始形成和可以从供体组织分割出来之后很快，和来源于胰腺内或来自胰腺外部的血管存在之前收获未成熟胰腺组织。特别优选在血管形成前收获，因为从中获得胰腺原基的发育中胚胎尚未形成成熟抗原呈递细胞，或者如果它们已经形成，但尚未迁移到无血管的胰腺原基中。在这个时候，可以认为该未成熟胰腺组织不含或至少基本上不含抗原呈递细胞。

胰腺发育中太迟收获的组织，例如已经具有可见血管的组织可能含有更多抗原呈递细胞和细胞表面抗原，因此存在更多被受体排斥的威胁。在发育和血管形成的优选时间收获的组织将基本上不含抗原呈递细胞，这意味着与血管形成的移植物移植或含有抗原呈递细胞的那些相比，至少非同基因移植物移植中超急性和急性血管排斥的机会大大降低。

收获胰腺组织的具体发育阶段将根据供体物种而变化。在大鼠中，胰腺在 22 天妊娠期的第 11-12 天形成，收获未成熟胰腺组织的优选时间是大约 12 天至大约 13 天之间。在小鼠中，胰腺在 19 天妊娠期的第 10-11 天形成，优选的收获时间是从大约第 11 天至大约第 12 天。在猪中，胰腺在 115 天妊娠期的第 16-18 天形成，优选收获时间是从大约第 20 天至大约第 38 天，更优选的收获时间是大约第 25 天至大约第 35 天和最优选的收获日期是大约第 29 天。在人中，胰腺在 270 天妊娠期的第 31-40 天形成，优选的收获时间是从大约第 40 天至大约第 50 天或妊娠的前三月早期。

在本发明的一个方面中，受体是哺乳动物并且可以是任何年龄。优选的受体是人，更优选他是 II 型或 I 型糖尿病患者。在另一个优选实施方案中，这种受体由于罹患上面提及疾病之一而显示出有功能的胰腺量减轻。

一个优选方法包括在允许未成熟胰腺组织变得形成血管和成熟，由此发育为在受体中至少产生胰岛素的有功能的内分泌嵌合胰腺的条件

下，将包括胚胎哺乳动物供体的至少一个完整胰腺原基的未成熟胰腺组织植入哺乳动物受体的腹膜腔。使用本领域普通技术人员已知方法将该胰腺组织植入受体腹膜腔。

在一个实施方案中，胰腺组织被植入接近受体的邻近肠系膜上动脉分支的网膜，和优选被植入网膜囊（pouch of omentum）。使用这里所述技术移植的未成熟胰腺组织最初无血管形成，和因此生长和至少部分通过受体血管变得形成血管，发育为至少一个嵌合内分泌胰腺。嵌合胰腺的特征是成熟和有功能胰岛的形成，它们至少可以产生胰岛素并使其外在化，可能还有胰高血糖素和生长抑素。

受体的血管形成可能促进移植异种组织的接受。更具体地，移植的时候，移植物中缺乏现存血管形成和移植组织和受体之间缺乏血管吻合（anastomosis）有助于至少避免组织的超急性和急性血管排斥。因此，本发明的异种移植能够避免多种严重类型器官排斥中的两种和形成血管和发育为宿主内有功能的嵌合器官。

对于未成熟胰腺组织的同种异体移植，任何胚胎原基可以移植到需要这种移植物的相同物种的受体。如果需要，可以使用本领域已知的任何方法如混合淋巴细胞反应实施供体和受体之间 MHC（主要组织相容性复合体）单倍型匹配。

本发明嵌合内分泌胰腺的血管形成和成熟的适合条件也可以包括使用手术前或后方法和组合物促进移植组织发育和发挥功能以及预防移植物排斥。在同基因移植和一些情况的同种异体移植中，可能没有移植胰腺组织的宿主排斥，因此，可以免去免疫抑制和/或共刺激方法和组合物。此外，本发明未成熟胰腺组织可以被改变而适用于本发明，这可通过用生长因子和增加其在宿主内生长和发育，产生胰岛素的 β 细胞在宿主内的发育，和降低移植排斥可能性的其它化合物和组合物处理实现。

本发明的另一个实施方案是用于未成熟胰腺组织移植到哺乳动物受体腹膜腔来增加哺乳动物受体的胰腺量的受体共刺激阻断组合物和方法（见实施例方案 1 和方案 2）。正如已知的，CD4+ T 细胞在无血管

形成、急性、T细胞介导的同种和异种移植排斥中起着主要作用。因此，已经证明通过阻断受体T细胞反应的共刺激对准CD4⁺T细胞的活化和/或功能来对抗这种排斥在本发明中有效。对准和下调宿主对移植组织的T细胞反应的合适免疫调节试剂和方法可以使用并包括在本发明中。

第一个这种方法包括可以在移植之前、移植过程中和之后给予受体的CTLA4Ig (Genetics Institute, Cambridge MA) 和抗CD2 (Pharmingen, San Diego CA) 的组合物。

共刺激阻断的第二个方法包括也可以在移植之前、移植过程中和之后给药的抗CD11a (Pharmingen, San Diego CA), 抗CD45RB (克隆23G2, Pharmingen, San Diego CA) 和抗CD154 (克隆MR1, Pharmingen, San Diego CA) 的组合物。

至少在异种移植的情况下，本发明可以包括对受体的免疫抑制方法和组合物。这通常通过在移植后免疫抑制受体来进行。环孢菌素A (CSA) 处理可以提供足够的免疫抑制来预防供体组织的排斥。医学领域中已知预防移植排斥的CSA处理方法。Gruber (1992), *Transplantation* 54: 1-11 描述了局部免疫抑制技术。在美国专利5,560,911中，公开了抗自然发生的人抗动物抗体上独特型的抗体用于抑制异种移植排斥。也已知抗淋巴细胞球蛋白预防移植排斥 (Lacy et al. (1981), *Diabetes* 30: 285-291)。作为免疫抑制的替代，可以在移植前处理植入的胰腺，降低其抗原性。Faustman WO 92/04033 (1992) 公开了通过表面修饰降低移植物免疫原性的示例方法。

在本发明的一个优选方面，给予接受未成熟胰腺组织的受体的免疫抑制组合物将基于使用已经证明较少致糖尿病的那些免疫抑制试剂。例如，对于这里所述的移植目的，皮质类固醇、环孢菌素A或他克莫司的使用可能是有限的。成功免疫抑制治疗的实例可以基于Edmonton方法 (Shapiro et al, 2000) 中使用的那些，它需要长期高剂量 sirolimus (不致糖尿病的)，长期低剂量他克莫司 (致糖尿病的) 和短期 daclizumab。

通过移植前，但在收获后，在冰冷 (大约4摄氏度) 条件下制备或

保存它，可以使未成熟胰腺组织适合移植。本发明可以进一步包括通过使分离的哺乳动物未成熟胰腺组织接触生长因子、生长培养基和增加移植后组织生长和发育的其它化合物和组合物，使胰腺组织适合移植。一个这种组合物可以包括收获后和移植前 HamsF12 : Dulbecco's 改良 Eagles 培养基（优选 50-100ul 的 50:50 混合物）中的肝细胞生长因子（优选 10-9M）和 VEGF（优选 5ug/ml）。在一个优选实施方案中，该组织与所述组合物在 4 摄氏度孵育 3/4-3 小时。

收获的组织可以用各种生长因子和生长促进剂或其组合来处理，以增加移植发育。例如，使收获的组织接触肝细胞生长因子（HGF）可以增加 β 细胞增殖和增加体内胰岛量。类似地，血管内皮生长因子（VEGF）可以用于增加胰岛的血管形成。可以采用来设计和实现增加发育和成熟方案的其它生长因子除了其它的，包括：表皮生长因子（EGF）家族配体，它可以调节器官培养中维持的胰腺原基内内分泌细胞的谱系决定； β 动物纤维素（BTC），它支持 β 细胞分化；和神经调节蛋白（NRG-4），它影响产生抑生长素的 β 细胞的发育；类视黄醇拮抗剂，它抑制体外腺泡分化；转化生长因子家族（TGFs）的成员、生长因子（IGFs）、胃泌素、活化素 A 和成纤维细胞生长因子（FGF）家族的成员。

移植物特别是 β 细胞发育的增加，可以通过手术后给受体施用胰岛素来增加，特别是外源胰岛素。在一个优选实施方案中，本发明包括移植后将外源胰岛素给予患者而增加移植组织发育的步骤。

发育足够时间后，证明本发明的移植组织能够分泌胰岛素。通过组织移植到腹膜腔，分泌的胰岛素直接释放到受体门静脉系。因此，使用本发明方法和组合物移植未成熟胰腺组织有助于增加受体的有功能内分泌量（mass）。

而且，在发育足够时间后，证明嵌合胰腺缺乏外分泌胰腺组织。实际上，它由图 7 所示的胰岛和基质组织组成。因此，不需要设计从嵌合胰腺排出外分泌胰腺分泌物的方法。

实施例

下列实施例描述了本发明的实施方案。从对这里公开发明的说明书或实施的理解，本文权利要求范围内的其它实施方案对本领域技术人员将很明显。说明书和实施例一起旨在被认为仅仅为了示例，本发明的范围和精神由实施例之后的权利要求来表示。

猪至小鼠移植的共刺激阻断方案

方案 1: 在这个实施例中，发育中猪后肾组织（发育中肾原基）从供体猪移植到小鼠受体。处理方法包括在移植前 2 天和 1 天，移植当天和移植后第 5 天处理给受体 C57B1/6J 小鼠施与 CTLA4Ig 组合物，0.5 mg/天；和在移植当天和移植后第 3, 7 和 10 天给予抗 CD2 组合物，0.5mg。图 1A 显示了移植到小鼠网膜后 14 天的猪后肾（m）。图 1B 和 1C 显示了石蜡包埋后肾的 H&E 染色的切片。肾小球被标为（g）。图 1D 图解了小鼠特异性抗 CD31（6）染色的石蜡包埋切片。猪后肾中描绘了血管（箭头）和肾小球毛细血管环（箭头尖）。这些血管和环来源于小鼠（小鼠特异性抗 CD31 染色阳性）。肾小球（g）被标出。因此，证明移植的猪组织没有被大鼠受体排斥，和事实上，在其发育过程中得到发育和被受体血管化。

方案 2: 也通过猪至小鼠后肾移植来示例这个方法和组合物。用如下物质处理受体小鼠：抗 CD11a，在移植当天和移植后第 0, 1, 7 和 14 天静脉注射 0.2mg；抗 CD45RB，在移植前第 3 天和 2 天静脉注射 0.2mg，移植前 1 天 0.3mg 和移植当天和移植后第 1-10 天 0.1mg；和抗 CD154，移植前一天，移植当天和移植后第 2 和 4 天静脉注射 0.25mg。图 2A 所示的是移植到小鼠网膜后 14 天的猪后肾（m）。图 2B-2E 显示了 H&E 染色切片。图 2B 中标出了输尿管（u）。描绘了生肾带（发育中肾单位）（图 2C 和 D 的箭头）。图 2D 和 2E 中标出了肾小球（g）。再次，移植后图证明了宿主内形成血管和发育的后肾，而没有排斥。

胚胎胰腺原基的移植导致胰岛形成

在解剖显微镜下从 E12.5 Lewis 大鼠胚胎手术收获由背侧和腹侧胰腺组成的胰腺原基，并在无菌条件下悬于冰上盐水溶液（见图 3A）。取出后 2 小时内，胰腺原基植入成年 Lewis 大鼠的网膜内。移植后两周，

杀死成年 Lewis 大鼠，取出胰腺移植物进行组织学分析。苏木精和伊红染色的组织团块的固定石蜡包埋切片的组织学检查揭示移植的胰腺原基已经生长并发育为含有胰岛的组织。

图 3A 所示的是来自 E12.5 Lewis 大鼠胚胎的十二指肠 (duo) 的切片照片。背侧胰腺 (dp) 和腹侧胰腺 (vp) 被标出。图 3B 所示的是除去十二指肠的背侧和腹侧胰原基的 H&E 染色切片。图 3C 是 3B 所示背侧和腹侧胰腺原基的更高倍视图。

为了确定 E12.5 的胰腺原基中是否存在胰岛素的免疫反应性，我们实施了另外的染色。图 4A 显示了从 E12.5 Lewis 大鼠胚胎获得的胰腺原基的 H&E 染色切片。图 4B 显示了抗胰岛素抗体染色的相邻切片。在 E12.5 中没有检测到胰岛素的阳性染色。

完整胰腺原基移植到 Lewis 大鼠网膜两周后，组织经历了分化。图 4C 所示的是对照抗体染色的切片，4D 是相邻的胰岛素染色切片。描绘了相应的阴性 (4C) 和阳性 (4D) 组织 (箭头尖)。4E 所示的是另一个移植胰腺，移植后 2 周的对照染色切片，4F 是相邻的胰岛素染色的切片。描绘了胰岛 (箭头)。显示了 A&B (A), C&D (C) 和 E&F (E) 的放大率。

为了表征 2 周以上胰腺原基的生长和发育和胰岛素免疫反应的模式，我们检测了 E12.5 胰腺原基移植后 6 或 15 周，宿主腹膜中存在的结构。图 5A 所示的是移植到成年 Lewis 大鼠腹膜后 6 周，来源于胰腺原基的对照抗体染色的切片。图 5B 所示的是抗胰岛素抗体染色的相邻切片。描绘了胰岛组织 (箭头)。图 5C 和 5D 所示的是另一个对照抗体染色切片 (图 5C) 和抗胰岛素抗体染色的相邻切片 (图 5D) 的高倍视图。图 5E-F 是抗胰岛素抗体染色的切片，其中描绘了保持与导管上皮 (d) 连接的发育中导管状胰岛 (箭头)。显示了 A&B (A), C&D (C) 及 E 和 F 的放大率。

图 6 图解了移植后 15 周的胰腺原基。图 6A 所示的是 H&E 染色切片，和图 6B 是对照血清染色的切片。图 6C 所示的是相应抗胰岛素抗体染色的切片。图 6D 显示了放大的胰岛，用抗胰岛素抗体染色。箭头描绘胰岛。A 中显示了 A-C 的放大率和 D 中显示了放大率。“器官”是新的，

由被腹膜脂肪包绕的基质内的胰岛组织组成。在腹膜中没有提示活跃的外分泌活动的炎症反应。

组合 Gomori 方法将 β 细胞染成紫色和腺泡细胞染成亮粉色。图 7A 所示的是移植后 15 周的发育了的胰腺原基切片。图 7B 中显示了新生大鼠背侧胰腺的切片。描绘了胰岛（箭头）和腺泡细胞（箭头尖）。正如所预期的，图 7B 中存在组合 Gomori 阳性（亮粉色）腺泡组织。相比之下，图 7A 中仅存在被未染色基质包绕的胰岛组织。（B）显示了放大率。

用电子显微镜观察描述 β 细胞是否含胰岛素颗粒。图 8A 显示了胰岛内的细胞。其细胞质被含有代表结晶胰岛素的偏心浓密核的神经分泌颗粒填充（箭头）。图 8B 所示的是颗粒的更高放大图像。

通过胰腺原基移植治疗链脲菌素糖尿病

测定基线血液葡萄糖水平（第 0 天）后，在 Lewis 大鼠中诱导链脲菌素糖尿病。对照组（对照， $n=8$ ）接受载体代替链脲菌素。链脲菌素或载体后第 5 天，测定血液葡萄糖水平。在一些链脲菌素糖尿病大鼠中，10 个胰腺原基移植到腹膜（ $n=3$ 个移植物）。其它大鼠接受假手术（ $n=7$ 个糖尿病）。在载体或链脲菌素给予后第 14, 28 和 35 天早上 8 点再次测定葡萄糖水平。如图 9 所示，与对照相比，在第 5, 14, 28 和 35 天，糖尿病大鼠中葡萄糖水平升高。相比之下，第 35 天，对照和移植的（以前血糖高）大鼠之间的葡萄糖水平没有差异。****那天与对照的 $p < 0.01$;**
***那天与对照的 $P < 0.05$, Dunnetts 多比较程序。**

在 10 个胰腺原基移植给移植组后 18 周，使用 Brown et al, Diabetes 30: 9-13 (1981) 所述方法对对照大鼠的第二组（ $n=6$ ），糖尿病大鼠（ $n=4$ ）和移植的（以前血糖高）大鼠（ $n=6$ ）实施葡萄糖耐受检测。大鼠过夜禁食，用毛巾包裹紧，并给予 D-葡萄糖，以 0.5g/kg 体重的剂量快速注射到尾静脉。随后从尾静脉收集血液样品。使用 10, 20 和 30 分钟值测定葡萄糖消失（%/分钟）速度的 k 值。对照大鼠和糖尿病大鼠葡萄糖消失的 k 值（%/分钟）分别是 2.92 ± 0.44 和 0.48 ± 0.26 ，与 Brown et al 报道的值可比较（对照 > 糖尿病， $p < 0.01$ ）。移植大鼠

的 k 值是 2.82 ± 0.46 ，与对照没有显著差异和与糖尿病动物相比明显增加。

每周测定大鼠葡萄糖水平用于产生图 9 所示的数据。血糖量正常持续了 4 个月（16 周）（图 10）。

胚胎胰腺原基的异种移植

将 E12.5 Lewis 大鼠胰腺原基移植到 C57B1/6J 小鼠的网膜中。完全和以前的一样用共刺激阻断剂处理一些宿主小鼠 [hCTLA4-Ig: 移植当天 (0 天) 和移植后第 2 和第 4 天腹腔内注射 0.2 mg; 抗 CD45RB (克隆 23G2): 移植前 3 天 (-3 天) 至 0 天静脉注射 0.1 mg, 和移植后第 1-10 天腹腔内注射 0.1mg; 和抗 CD154: 在移植后 0, 2 和 4 天腹腔内注射 0.25 mg]。其它小鼠用载体注射液处理。

图 11A 显示了移植到载体处理的 C57B1/6J 小鼠网膜后 4 周的 Lewis 大鼠胰腺原基。图 11B 显示了移植到用共刺激阻断剂处理的 C57B1/6J 小鼠网膜后 4 周的 Lewis 大鼠胰腺原基。与图 11A 所示的未分化组织相比，图 11B 中可见胰岛（箭头）。

图 12 显示了移植到接受共刺激阻断的成年 C57B1/6J 小鼠网膜后 4 周的第二个 E12.5 Lewis 大鼠胰腺原基。图 12A, 对照血清; 图 12B, 抗胰岛素抗体; 图 12C, 组合 Gomori 染色。描绘了胰岛（箭头）。

图1

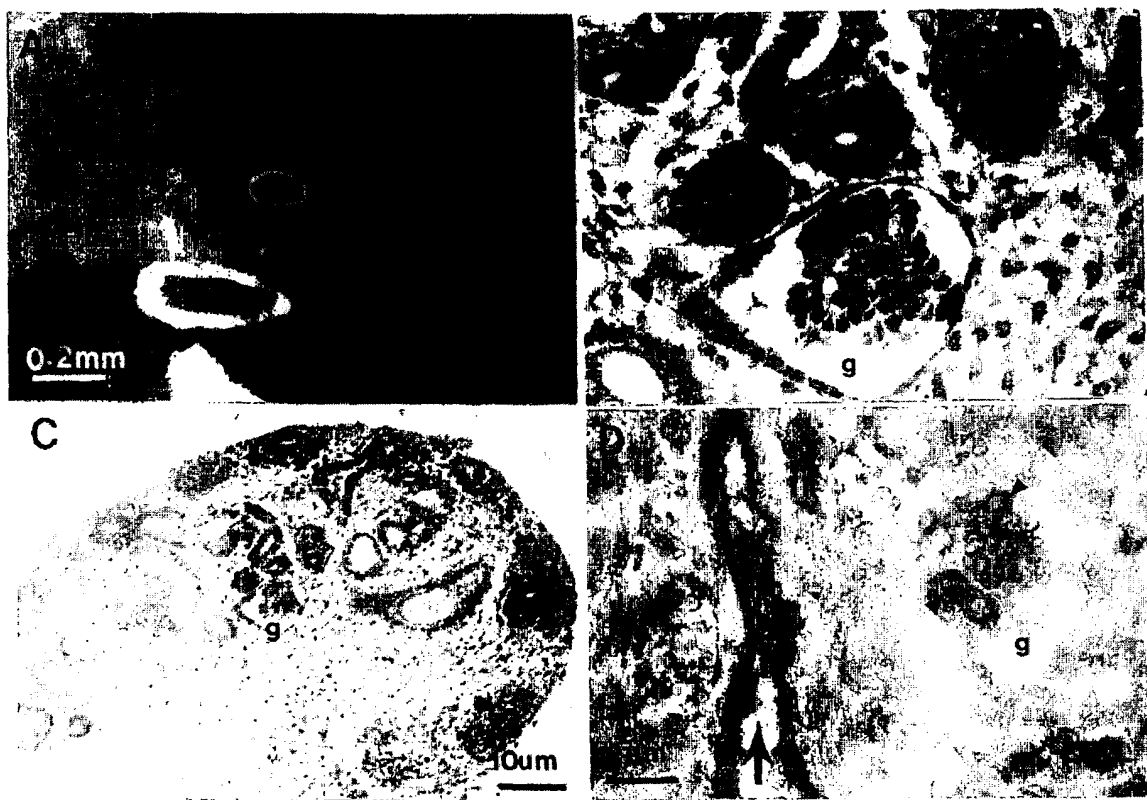


图2

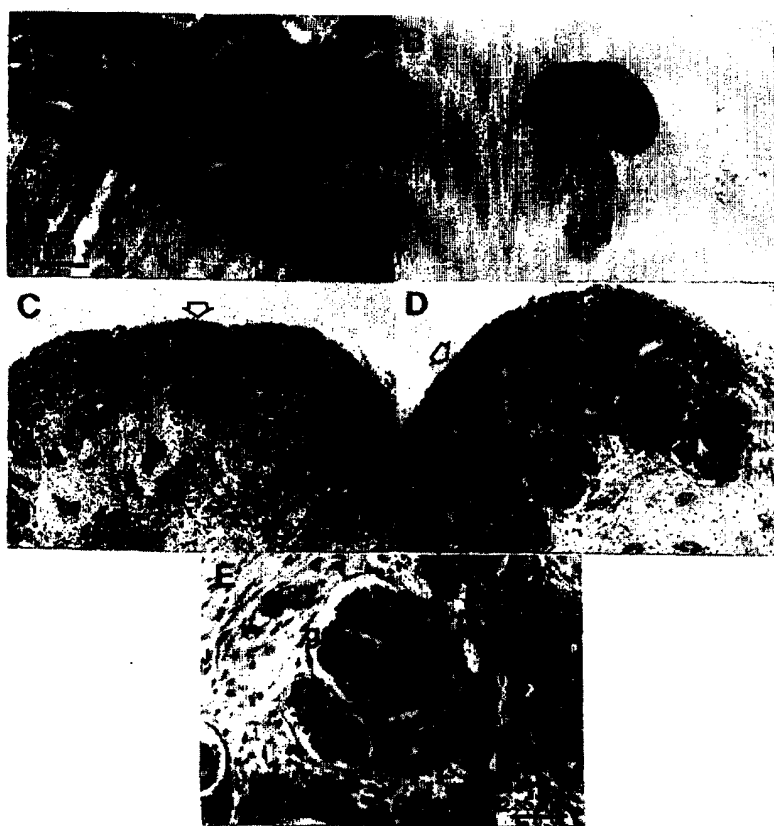


图 3

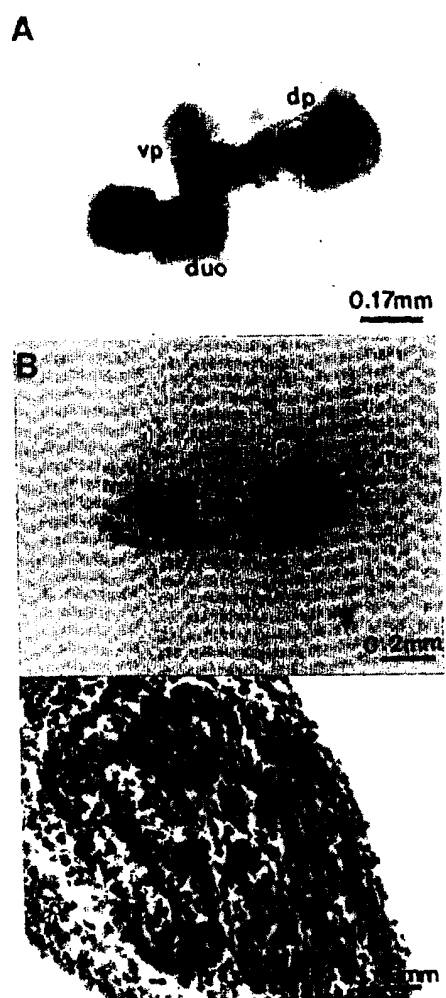


图4



图5

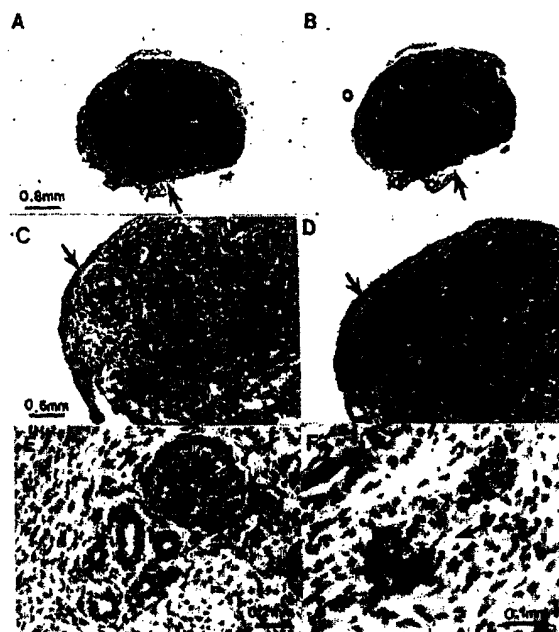


图6

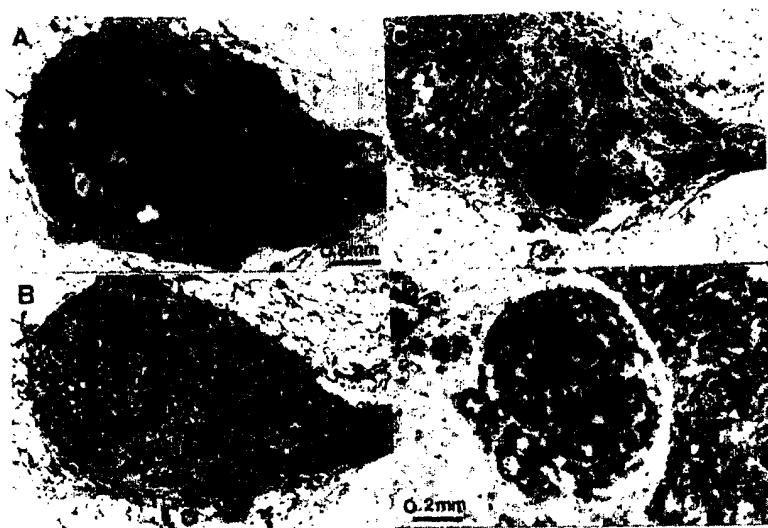


图7

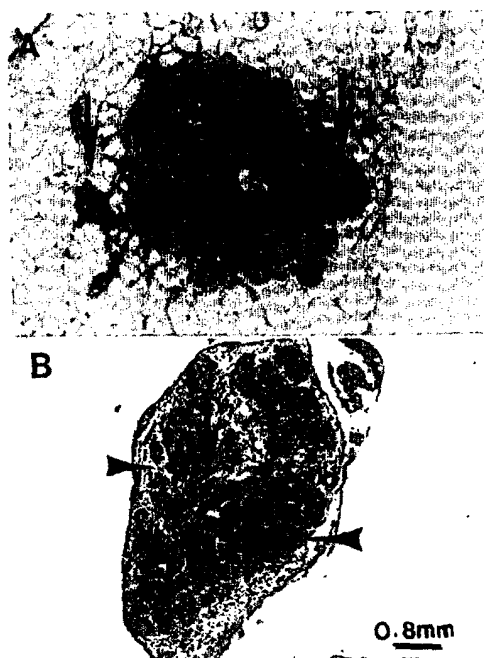


图 8

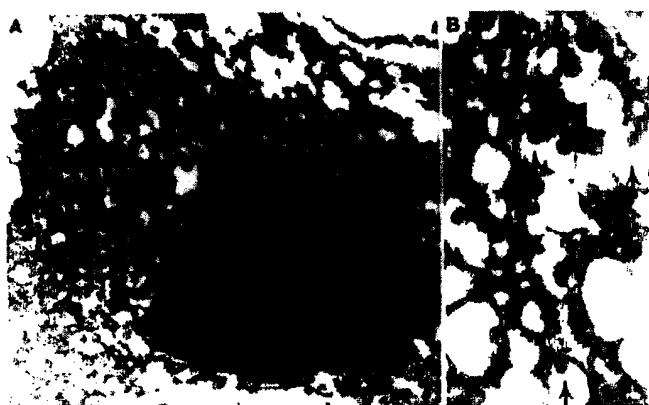


图9

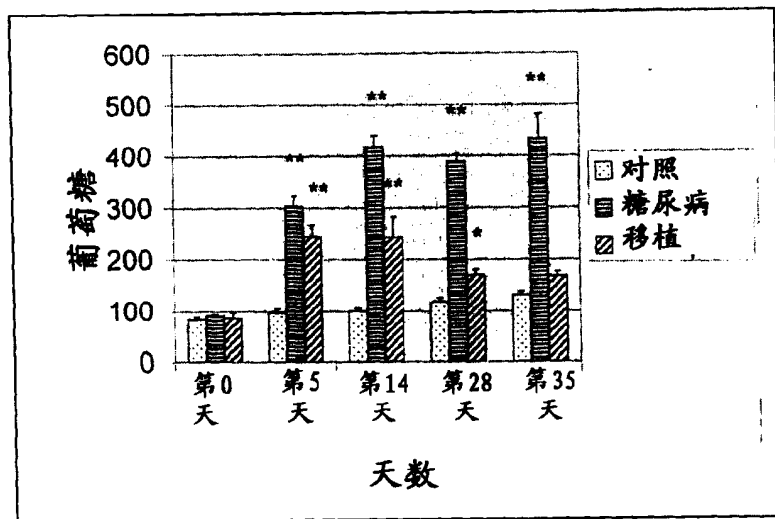


图10

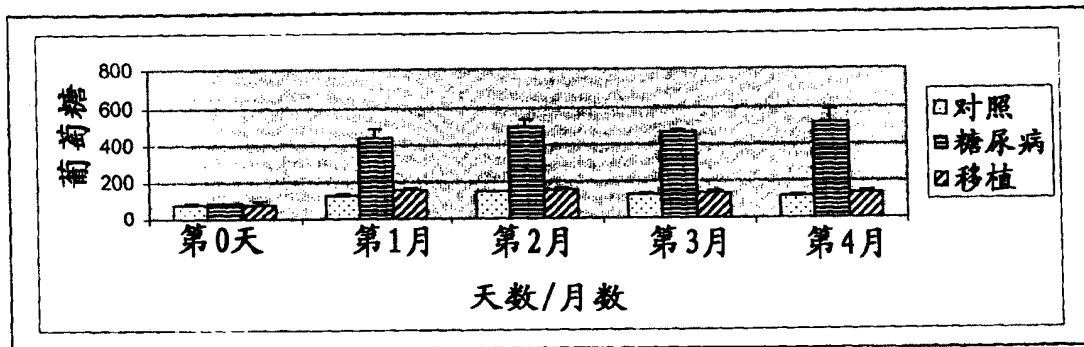


图 11

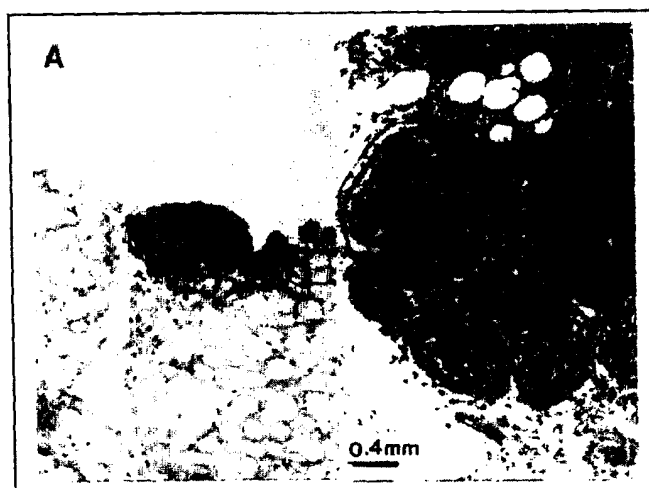


图12

