



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107530379 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680024439.5

(22)申请日 2016.03.11

(30)优先权数据

62/131,540 2015.03.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2016/000072 2016.03.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/141460 EN 2016.09.15

(71)申请人 佩特尼资源有限公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 蒂莫西·J·基弗

詹尼弗·E·布鲁因

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 35/39(2015.01)

A61K 31/155(2006.01)

A61K 31/4439(2006.01)

A61K 31/4985(2006.01)

A61P 3/00(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

C12N 5/071(2010.01)

C07C 279/26(2006.01)

C07D 417/12(2006.01)

C07D 487/04(2006.01)

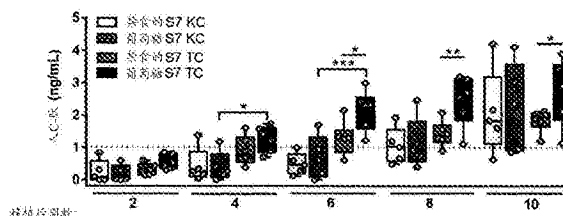
权利要求书5页 说明书36页 附图36页

(54)发明名称

用于治疗肥胖症和2型糖尿病(T2D)的胰腺内分泌祖细胞疗法

(57)摘要

本文提供了治疗对象的2型糖尿病(T2D)、肥胖症、葡萄糖耐受不良和胰岛素抵抗中的一种或多种或者控制对象的体重增长的治疗方法,以及使用所述疗法的方法。特别地,所述对象可以是使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者,并且所述疗法可以包括将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象,使所述细胞在所述对象体内成熟以产生群。



1. 治疗对象的2型糖尿病 (T2D) 的方法,所述方法包括:
 - (a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象;以及
 - (b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。
2. 治疗对象的2型糖尿病 (T2D) 的方法,所述方法包括:
 - (a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象,其中所述对象是使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者;以及
 - (b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。
3. 治疗对象的2型糖尿病 (T2D) 的方法,所述方法包括:
 - (a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象,其中所述对象正在使用一种或多种小分子抗糖尿病药物治疗;以及
 - (b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟,以产生包含胰腺内分泌细胞的群。
4. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述方法还包括使用一种或多种小分子抗糖尿病药物治疗所述对象。
5. 如权利要求2、3或4所述的方法,其中所述一种或多种小分子抗糖尿病药物选自以下:二肽基肽酶4 (DPP-4) 抑制剂;噻唑烷二酮类;以及双胍类。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述抗糖尿病药物选自:西他列汀;甲福明;以及罗格列酮。
7. 如权利要求2、3或4所述的方法,其中所述一种或多种小分子抗糖尿病药物选自以下:氯茴苯酸类;磺酰脲类;二肽基肽酶4 (DPP-4) 抑制剂;双胍类;噻唑烷二酮类; α -葡萄糖苷酶抑制剂;钠-葡萄糖转运子2 (SGLT-2) 抑制剂;以及胆汁酸螯合剂。
8. 如权利要求7所述的方法,其中所述小分子抗糖尿病药物选自:瑞格列奈;那格列奈;格列吡嗪;格列美脲;格列本脲;沙格列汀;西他列汀;利拉利汀;甲福明;罗格列酮;吡格列酮;阿卡波糖;米格列醇;卡格列净;达格列净;依帕列净;以及考来维仑。
9. 如权利要求2至8中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是西他列汀。
10. 如权利要求2至8中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是甲福明。
11. 如权利要求2至8中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是罗格列酮。
12. 治疗对象的肥胖症的方法,所述方法包括:(a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象;以及(b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。
13. 治疗对象的肥胖症的方法,所述方法包括:(a) 向所述对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;(b) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象;以及(c) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟,以产生包含胰腺内分泌细胞的群。
14. 如权利要求12或13所述的方法,其中使所述胰腺内分泌祖细胞在体内成熟以产生包含至少2%胰腺内分泌细胞的群。
15. 如权利要求13或14所述的方法,其中所述一种或多种小分子抗糖尿病药物选自以下:氯茴苯酸类;磺酰脲类;二肽基肽酶4 (DPP-4) 抑制剂;双胍类;噻唑烷二酮类; α -葡萄糖苷酶抑制剂;钠-葡萄糖转运子2 (SGLT-2) 抑制剂;以及胆汁酸螯合剂。
16. 如权利要求13、14或15所述的方法,其中所述小分子抗糖尿病药物选自:瑞格列奈;那格列奈;格列吡嗪;格列美脲;格列本脲;沙格列汀;西他列汀;利拉利汀;甲福明;罗格列酮;吡格列酮;阿卡波糖;米格列醇;卡格列净;达格列净;依帕列净;以及考来维仑。

17. 如权利要求13至16中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物选自:西他列汀;甲福明;以及罗格列酮。

18. 如权利要求13至17中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是西他列汀。

19. 如权利要求13至17中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是甲福明。

20. 如权利要求13至17中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是罗格列酮。

21. 治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的方法,所述方法包括:(a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象;以及(b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

22. 治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的方法,所述方法包括:(a) 向所述对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;(b) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象;以及(c) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

23. 如权利要求21或22所述的方法,其中使所述胰腺内分泌祖细胞在体内成熟以产生包含至少2%胰腺内分泌细胞的群。

24. 如权利要求22或23所述的方法,其中所述一种或多种小分子抗糖尿病药物选自以下:氯茴苯酸类;磺酰脲类;二肽基肽酶4 (DPP-4) 抑制剂;双胍类;噻唑烷二酮类; α -葡萄糖苷酶抑制剂;钠-葡萄糖转运子2 (SGLT-2) 抑制剂;以及胆汁酸螯合剂。

25. 如权利要求22、23或24所述的方法,其中所述小分子抗糖尿病药物选自:瑞格列奈;那格列奈;格列吡嗪;格列美脲;格列本脲;沙格列汀;西他列汀;利拉利汀;甲福明;罗格列酮;吡格列酮;阿卡波糖;米格列醇;卡格列净;达格列净;依帕列净;以及考来维仑。

26. 如权利要求22至25中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物选自:西他列汀;甲福明;以及罗格列酮。

27. 如权利要求22至26中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是甲福明。

28. 如权利要求22至26中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是罗格列酮。

29. 如权利要求22至26中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是西他列汀。

30. 改善患有T2D的对象的血糖控制的方法,所述方法包括:

(a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入对象,其中所述对象是使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者;以及

(b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

31. 改善患有T2D的对象的血糖控制的方法,所述方法包括:

(a) 向所述对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;

(b) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象,其中所述对象是使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者;以及

(c) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

32. 如权利要求30或31所述的方法,其中所述血糖控制通过H1A_{1c}水平来测量。

33. 如权利要求31或32所述的方法,其中所述一种或多种小分子抗糖尿病药物选自以下:氯茴苯酸类;磺酰脲类;二肽基肽酶4 (DPP-4) 抑制剂;双胍类;噻唑烷二酮类; α -葡萄糖苷酶抑制剂;钠-葡萄糖转运子2 (SGLT-2) 抑制剂;以及胆汁酸螯合剂。

34. 如权利要求31、32或33所述的方法,其中所述小分子抗糖尿病药物选自:瑞格列奈;

那格列奈;格列吡嗪;格列美脲;格列本脲;沙格列汀;西他列汀;利拉利汀;甲福明;罗格列酮;吡格列酮;阿卡波糖;米格列醇;卡格列净;达格列净;依帕列净;以及考来维仑。

35. 如权利要求31至34中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物选自:西他列汀;甲福明;以及罗格列酮。

36. 如权利要求31至35中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是甲福明。

37. 如权利要求31至35中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是罗格列酮。

38. 如权利要求31至35中任一项所述的方法,其中所述抗糖尿病药物是西他列汀。

39. 胰腺内分泌祖细胞群用于治疗对象的2型糖尿病(T2D)的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中;并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

40. 胰腺内分泌祖细胞群和一种或多种小分子抗糖尿病药物用于治疗对象的2型糖尿病(T2D)的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中;并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

41. 如权利要求39或40所述的用途,其中所述一种或多种小分子抗糖尿病药物选自以下:二肽基肽酶4(DPP-4)抑制剂;噻唑烷二酮类;以及双胍类。

42. 如权利要求41所述的用途,其中所述抗糖尿病药物选自:西他列汀;甲福明;以及罗格列酮。

43. 如权利要求39或40所述的用途,其中所述一种或多种小分子抗糖尿病药物选自以下:氯茴苯酸类;磺酰脲类;二肽基肽酶4(DPP-4)抑制剂;双胍类;噻唑烷二酮类; α -葡萄糖苷酶抑制剂;钠-葡萄糖转运子2(SGLT-2)抑制剂;以及胆汁酸螯合剂。

44. 如权利要求43所述的用途,其中所述小分子抗糖尿病药物选自:瑞格列奈;那格列奈;格列吡嗪;格列美脲;格列本脲;沙格列汀;西他列汀;利拉利汀;甲福明;罗格列酮;吡格列酮;阿卡波糖;米格列醇;卡格列净;达格列净;依帕列净;以及考来维仑。

45. 如权利要求42至44中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是西他列汀。

46. 如权利要求42至44中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是甲福明。

47. 如权利要求42至44中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是罗格列酮。

48. 胰腺内分泌祖细胞群用于治疗对象的肥胖症的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中;并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

49. 胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于治疗对象的肥胖症的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

50. 如权利要求48或49所述的用途,其中所述胰腺内分泌祖细胞适于在体内成熟以产生包含至少2%胰腺内分泌细胞的群。

51. 如权利要求49或50所述的用途,其中所述一种或多种小分子抗糖尿病药物选自以下:氯茴苯酸类;磺酰脲类;二肽基肽酶4(DPP-4)抑制剂;双胍类;噻唑烷二酮类; α -葡萄糖苷酶抑制剂;钠-葡萄糖转运子2(SGLT-2)抑制剂;以及胆汁酸螯合剂。

52. 如权利要求49、50或51所述的用途,其中所述小分子抗糖尿病药物选自:瑞格列奈;那格列奈;格列吡嗪;格列美脲;格列本脲;沙格列汀;西他列汀;利拉利汀;甲福明;罗格列酮;吡格列酮;阿卡波糖;米格列醇;卡格列净;达格列净;依帕列净;以及考来维仑。

53. 如权利要求49至51中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物选自:西他列汀;

甲福明;以及罗格列酮。

54. 如权利要求49至53中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是西他列汀。

55. 如权利要求49至53中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是甲福明。

56. 如权利要求49至53中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是罗格列酮。

57. 胰腺内分泌祖细胞群用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

58. 胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

59. 如权利要求57或58所述的用途,其中所述胰腺内分泌祖细胞适于在体内成熟以产生包含至少2%胰腺内分泌细胞的群。

60. 如权利要求58或59所述的用途,其中所述一种或多种小分子抗糖尿病药物选自以下:氯茴苯酸类;磺酰脲类;二肽基肽酶4 (DPP-4) 抑制剂;双胍类;噻唑烷二酮类; α -葡萄糖苷酶抑制剂;钠-葡萄糖转运子2 (SGLT-2) 抑制剂;以及胆汁酸螯合剂。

61. 如权利要求58、59或60所述的用途,其中所述小分子抗糖尿病药物选自:瑞格列奈;那格列奈;格列吡嗪;格列美脲;格列本脲;沙格列汀;西他列汀;利拉利汀;甲福明;罗格列酮;吡格列酮;阿卡波糖;米格列醇;卡格列净;达格列净;依帕列净;以及考来维仑。

62. 如权利要求58至61中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物选自:西他列汀;甲福明;以及罗格列酮。

63. 如权利要求58至61中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是甲福明。

64. 如权利要求58至61中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是罗格列酮。

65. 如权利要求58至61中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是西他列汀。

66. 胰腺内分泌祖细胞群用于改善患有T2D的对象的血糖控制的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

67. 胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于改善患有T2D的对象的血糖控制的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

68. 如权利要求66或67所述的用途,其中所述血糖控制通过H1A_{1c}水平来测量。

69. 如权利要求67或68所述的用途,其中所述一种或多种小分子抗糖尿病药物选自以下:氯茴苯酸类;磺酰脲类;二肽基肽酶4 (DPP-4) 抑制剂;双胍类;噻唑烷二酮类; α -葡萄糖苷酶抑制剂;钠-葡萄糖转运子2 (SGLT-2) 抑制剂;以及胆汁酸螯合剂。

70. 如权利要求67、68或69所述的用途,其中所述小分子抗糖尿病药物选自:瑞格列奈;那格列奈;格列吡嗪;格列美脲;格列本脲;沙格列汀;西他列汀;利拉利汀;甲福明;罗格列酮;吡格列酮;阿卡波糖;米格列醇;卡格列净;达格列净;依帕列净;以及考来维仑。

71. 如权利要求67至70中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物选自:西他列汀;甲福明;以及罗格列酮。

72. 如权利要求67至70中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是甲福明。

73. 如权利要求67至70中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是罗格列酮。

74. 如权利要求67至70中任一项所述的用途,其中所述抗糖尿病药物是西他列汀。

75. 商业包装品,其包含:(a) 胰腺内分泌祖细胞群;以及(b) 治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物。

76. 商业包装品,其包含:(a) 胰腺内分泌祖细胞群;(b) 治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;以及(c) 用于治疗T2D的说明书。

77. 商业包装品,其包含:(a) 胰腺内分泌祖细胞群;以及(b) 用于治疗T2D的说明书。

78. 商业包装品,其包含:(a) 胰腺内分泌祖细胞群;(b) 治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;以及(c) 用于治疗肥胖症的说明书。

79. 商业包装品,其包含:(a) 胰腺内分泌祖细胞群;以及(b) 用于治疗肥胖症的说明书。

80. 商业包装品,其包含:(a) 胰腺内分泌祖细胞群;(b) 治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;以及(c) 用于血糖控制的说明书。

81. 商业包装品,其包含:(a) 胰腺内分泌祖细胞群;以及(b) 用于血糖控制的说明书。

用于治疗肥胖症和2型糖尿病(T2D)的胰腺内分泌祖细胞疗法

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗对象的代谢失调、医学病况和相关的病理病况的方法。特别地,本发明涉及从多能干细胞分化得到的细胞单独地或结合抗糖尿病药物,用于实现对象的体重减轻、葡萄糖耐受改善和/或胰岛素敏感性增强的用途。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2015年3月11日提交、标题为“用于治疗肥胖症的疗法”的第62/131,540号美国临时专利申请的权益。

[0004] 发明背景

[0005] 肥胖症正在迅速成为全球性的流行病,这种流行病遍及所有的年龄和社会经济群体。全世界超重和肥胖症的人数已经从1980年的8.57亿上升至2013年的21亿(Ng,et al., Global,Regional&National Prevalence of Overweight and Obesity in Children and Adults During 1980-2013:A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study,Lancet (2014))。另外,已知肥胖症是发展多种疾病的主要风险因素,包括2型糖尿病(Type 2 Diabetes)或2型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus) (T2D)。

[0006] 国际糖尿病联合会(International Diabetes Federation)估计,全世界约3.8亿人患有糖尿病,其中多至95%患有T2D。在T2D中,身体不能适当地使用胰岛素,或者身体是胰岛素抵抗的。通常T2D的特征为高血糖症、胰岛素抵抗和低胰岛素水平。T2D被认为是主要由于有遗传倾向的人的肥胖症和运动缺乏。

[0007] 饮食、运动和体重控制是管控T2D的基础。然而,可能需要药物治疗,其中一种或多种药物用于控制血糖水平。目前用于治疗T2D的药物是口服药,包括氯茴苯酸类、磺酰脲类、二肽基肽酶4(“DPP-4”)抑制剂、双胍类、噻唑烷二酮类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂和钠-葡萄糖转运子2(“SGLT2”)抑制剂。另外,可注射的药物,例如胰淀素模拟物和肠降血糖素模拟物用于治疗T2D。

[0008] 第二种糖尿病,1型糖尿病(T1D),是其中胰腺产生很少的胰岛素或不产生胰岛素的慢性病况。过去,除了控制饮食、运动和体重之外,采用胰岛素施用来治疗T1D。然而,最近的治疗已经包括胰岛(islets of Langerhans)的移植,这种治疗受困于可移植的胰岛的缺乏。因此,更最近地,治疗研发专注于开发适于植入的胰岛素分泌细胞的来源。一种此类方法是由多能干细胞(如胚胎干细胞)生成胰岛素分泌细胞。

[0009] 人胚胎干细胞衍生的定形内胚层的富集培养物的产生,以及此类细胞进一步分化为胰腺内分泌前体细胞是已知的(例如,US2009/0170198;Rezania,A.et al.Diabetes 2012;Rezania,A.et al.Stem Cells 2013;Bruin,J.E.et al.2013;Bruin,J.E.et al.Stem Cell Research 2014)。已公布的专利申请US2012/0039955也描述了,具有链脲菌素(STZ)诱导的T1D样状态的SCID小鼠,在移植了包封的胰腺内分泌前体细胞群之后血糖降低。还已知,随后将胰腺内分泌前体细胞移植到体内,允许更进一步分化为功能性胰腺内分泌细胞。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明部分基于以下意外的发现：在高脂肪饮食 (HFD) 喂养的小鼠中，相比单独的小分子抗糖尿病药物或祖细胞移植，胰腺内分泌前体细胞 (阶段4细胞) 与小分子抗糖尿病药物的联合疗法更加有效。此外，令人意外的是，HFD和抗糖尿病药物均不影响人胚胎干细胞 (hESC) 衍生的细胞在体内成熟以及响应葡萄糖而适当地分泌胰岛素的能力。干细胞成熟的环境对于从成熟过程得到的分化细胞至关重要。本发明的实施方案还基于以下发现：胰腺内分泌前体细胞可以具有作为治疗对象的2型糖尿病 (T2D) 的治疗剂的特定功效，其中所述对象是使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者。本发明的实施方案还基于以下幸运的发现：采用胰腺内分泌前体细胞与小分子抗糖尿病药物的组合治疗可用于治疗T2D、肥胖症、葡萄糖耐受不良和/或胰岛素抵抗。或者，本文描述的方法可以用于改善血糖控制。本发明的另外的实施方案还基于以下幸运的发现：单独的胰腺内分泌前体细胞的移植，引起对象的体重减轻。此外，通过移植进一步分化的细胞 (即阶段5、阶段6或阶段7细胞) 也实现了体重减轻。

[0012] 在第一个实施方案中，提供了用于治疗对象的2型糖尿病 (T2D) 的方法，所述方法包括：(a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入对象；以及 (b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0013] 在另一实施方案中，提供了用于治疗对象的2型糖尿病 (T2D) 的方法，所述方法包括：将胰腺内分泌祖细胞群植入对象。

[0014] 在另一实施方案中，提供了用于治疗对象的2型糖尿病 (T2D) 的方法，所述方法包括：(a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入对象，其中所述对象是使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者；以及 (b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0015] 在另一实施方案中，提供了用于治疗对象的2型糖尿病 (T2D) 的方法，所述方法包括：将胰腺内分泌祖细胞群植入对象，其中所述对象是使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者。

[0016] 在另一实施方案中，提供了用于治疗对象的2型糖尿病 (T2D) 的方法，所述方法包括：(a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入对象，其中所述对象使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗；以及 (b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0017] 在另一实施方案中，提供了用于治疗对象的2型糖尿病 (T2D) 的方法，所述方法包括：将胰腺内分泌祖细胞群植入对象，其中所述对象使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗。

[0018] 在另一实施方案中，提供了用于治疗对象的肥胖症的方法，所述方法包括：(a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入对象；以及 (b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0019] 在另一实施方案中，提供了用于治疗对象的肥胖症的方法，所述方法包括：将胰腺内分泌祖细胞群植入对象。

[0020] 在另一实施方案中，提供了用于控制对象的体重增长的方法，所述方法包括：(a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入对象；以及 (b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0021] 在另一实施方案中,提供了用于控制对象的体重增长的方法,所述方法包括:将胰腺内分泌祖细胞群植入对象。

[0022] 在另一实施方案中,提供了用于治疗对象的肥胖症的方法,所述方法包括:(a) 向对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;(b) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象;以及(c) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0023] 在另一实施方案中,提供了用于治疗对象的肥胖症的方法,所述方法包括:(a) 向对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;以及(b) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象。

[0024] 在另一实施方案中,提供了用于控制对象的体重增长的方法,所述方法包括:(a) 向对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;(b) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象;以及(c) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0025] 在另一实施方案中,提供了用于控制对象的体重增长的方法,所述方法包括:(a) 向对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;以及(b) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象。

[0026] 在另一实施方案中,提供了用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的方法,所述方法包括:(a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入对象;以及(b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0027] 在另一实施方案中,提供了用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的方法,所述方法包括:将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象。

[0028] 在另一实施方案中,提供了用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的方法,所述方法包括:(a) 向对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;(b) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象;以及(c) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0029] 在另一实施方案中,提供了用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的方法,所述方法包括:(a) 向对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;以及(b) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象。

[0030] 在另一实施方案中,提供了改善患有T2D的对象中的血糖控制的方法,所述方法包括:(a) 将胰腺内分泌祖细胞群植入对象,其中所述对象是使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者;以及(b) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0031] 在另一实施方案中,提供了改善患有T2D的对象中的血糖控制的方法,所述方法包括:将胰腺内分泌祖细胞群植入对象,其中所述对象是使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者。

[0032] 在另一实施方案中,提供了改善患有T2D的对象中的血糖控制的方法,所述方法包括:(a) 向对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;(b) 将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象,其中所述对象是使用一种或更多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者;以及(c) 使所述胰腺内分泌祖细胞群在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0033] 在另一实施方案中,提供了改善患有T2D的对象中的血糖控制的方法,所述方法包括:(a)向对象施用治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物;以及(b)将胰腺内分泌祖细胞群植入所述对象,其中所述对象是使用一种或多种小分子抗糖尿病药物进行治疗的候选者。

[0034] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群用于治疗对象的2型糖尿病(T2D)的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中;并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0035] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群用于治疗对象的2型糖尿病(T2D)的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中。

[0036] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群和一种或多种小分子抗糖尿病药物用于治疗对象的2型糖尿病(T2D)的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中;并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0037] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群和一种或多种小分子抗糖尿病药物用于治疗对象的2型糖尿病(T2D)的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中。

[0038] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群用于治疗对象的肥胖症的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中;并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0039] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群用于治疗对象的肥胖症的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中。

[0040] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群用于控制对象的体重增长的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中;并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0041] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群用于控制对象的体重增长的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中。

[0042] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于治疗对象的肥胖症的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0043] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于治疗对象的肥胖症的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中。

[0044] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于控制对象的体重增长的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0045] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于控制对象的体重增长的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中。

[0046] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0047] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中。

[0048] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的用途,

其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0049] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良或胰岛素抵抗的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中。

[0050] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群用于改善患有T2D的对象的血糖控制的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0051] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群用于改善患有T2D的对象的血糖控制的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中。

[0052] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于改善患有T2D的对象的血糖控制的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中,并且在体内成熟以产生包含胰腺内分泌细胞的群。

[0053] 在另一实施方案中,提供了胰腺内分泌祖细胞群和治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物用于改善患有T2D的对象的血糖控制的用途,其中所述细胞适于植入所述对象中。

[0054] 在另一实施方案中,提供了商业包装品,其包含:(a)胰腺内分泌祖细胞群;以及(b)治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物。

[0055] 在另一实施方案中,提供了商业包装品,其包含:(a)胰腺内分泌祖细胞群;以及(b)治疗有效量的一种或多种小分子抗糖尿病药物。

[0056] 所述方法还可以包括使用一种或多种小分子抗糖尿病药物治疗对象。所述一种或多种小分子抗糖尿病药物可以选自以下:二肽基肽酶4 (DPP-4) 抑制剂;噻唑烷二酮类;和双胍类。所述抗糖尿病药物可以选自:西他列汀;甲福明;和罗格列酮。所述一种或多种小分子抗糖尿病药物可以选自以下:氯茴苯酸类;磺酰脲类;二肽基肽酶4 (DPP-4) 抑制剂;双胍类;噻唑烷二酮类; α -葡萄糖苷酶抑制剂;钠-葡萄糖转运子2 (SGLT-2) 抑制剂;和胆汁酸螯合剂。所述小分子抗糖尿病药物可以选自:瑞格列奈;那格列奈;格列吡嗪;格列美脲;格列本脲;沙格列汀;西他列汀;利拉利汀;甲福明;罗格列酮;吡格列酮;阿卡波糖;米格列醇;卡格列净;达格列净;依帕列净;和考来维仑(colsevelam)。所述抗糖尿病药物可以为西他列汀。所述抗糖尿病药物可以为甲福明。所述抗糖尿病药物可以为罗格列酮。

[0057] 所述胰腺内分泌祖细胞可以在体内成熟,以产生包含至少2%胰腺内分泌细胞的群。所述胰腺内分泌祖细胞可以是包封的。所述胰腺内分泌祖细胞可以是未包封的。所述胰腺内分泌祖细胞可以是宏观包封的。所述胰腺内分泌祖细胞可以是微囊包封的。所述包含胰腺内分泌细胞的群可以是混合的群。所述包含胰腺内分泌细胞的群可以包含成熟的胰岛细胞。所述包含胰腺内分泌细胞的群可以包含成熟的胰腺内分泌细胞。所述包含胰腺内分泌细胞的群可以包含 β 细胞。所述包含胰腺内分泌细胞的群可以包含 α 细胞。

[0058] 所述商业包装品还可以包含用于治疗T2D的说明书。所述商业包装品还可以包含用于治疗肥胖症的说明书。所述商业包装品还可以包含用于血糖控制的说明书。

[0059] 附图简述

[0060] 图1A示出了图表,其描述了在施用低脂肪饮食(10%脂肪),高脂肪饮食(45%脂肪;60%脂肪),或高脂肪、高碳水化合物饮食(西方)后在指定天数时来自实施例1的小鼠的

禁食体重。

[0061] 图1B示出了图表,其描述了在施用低脂肪饮食(10%脂肪),高脂肪饮食(45%脂肪;60%脂肪),或高脂肪、高碳水化合物饮食(西方)后在指定天数时来自实施例1的小鼠的禁食血糖水平。

[0062] 图1C示出了图表,其描述了实施例1的小鼠在对小鼠进行口服葡萄糖刺激期间第47天时血糖值的原始值和曲线下面积。

[0063] 图1D示出了图表,其描述了实施例1的小鼠在口服葡萄糖刺激期间在第47天采集的样品中的胰岛素水平。

[0064] 图1E示出了图表,其描述了在第42天针对实施例1的小鼠进行的胰岛素耐受测试的结果。

[0065] 图1F示出了在第43天针对实施例1小鼠的亚组进行双能量x射线吸收测量法(DEXA)评估近期脂肪的结果。

[0066] 图1G示出了第47天至第49天针对实施例1的小鼠测量的在清晨禁食4至6小时后的瘦素水平。

[0067] 图2A示出了图表,其描述了实施例2的小鼠在移植后8、12、16和20周,在禁食过夜后和口服混合餐刺激后40分钟测量的人C-肽水平。

[0068] 图2B和2C示出了实施例2的小鼠在移植后18周进行腹膜内葡萄糖耐受测试(ipGTT)的人C-肽测量结果,其中图2B为标准化的基线水平,并且图2C为原始水平(ng/mL)。

[0069] 图2D-2F示出了实施例3的小鼠在移植后24周进行精氨酸耐受测试的人胰岛素和胰高血糖素的结果,其中(E)示出了移植接受体在0分钟和15分钟的胰高血糖素水平,并且(F)示出了假处理的小鼠(假处理,条纹柱)和移植接受体(处理,实心柱)仅在15分钟时的胰高血糖素水平。

[0070] 图3示出了图表,其描述了装置中对于胰岛素(Ins)、胰高血糖素(Gcg)或这两种激素有免疫反应性(Ins+/Gcg+)的细胞百分比。

[0071] 图4A和4B示出了图表,其描述了实施例4的小鼠在移植后12周和24周测量的HbA1C水平。

[0072] 图4C示出了图表,其描述了实施例4的小鼠在移植后20周并且在禁食过夜后和口服餐刺激后40分钟测量的血糖水平。

[0073] 图4D和4E示出了图表,其描述了实施例4的小鼠在移植后18周(4D)和24周(4E)进行腹膜内葡萄糖耐受测试的结果。

[0074] 图4F示出了图表,其描述了实施例4的小鼠在移植后22周进行胰岛素耐受测试的结果。

[0075] 图5A-5F示出了在结合抗糖尿病药物的祖细胞移植后,饮食诱导的肥胖症被逆转,其中对使用10%脂肪的饮食且无药物(黑色/灰色;所有图块;n=8只小鼠)、60%脂肪的饮食且无药物(A和B;n=每组7-8只小鼠)、60%脂肪的饮食加上甲福明(A和C;n=每组7-8只小鼠)、60%脂肪的饮食加上西他列汀(A和D;n=每组8只小鼠)、或者60%脂肪的饮食加上罗格列酮(A和E;n=每组8只小鼠)喂养的小鼠,评估禁食体重。(A)中示出了针对来自所有处理组的假处理小鼠的体重跟踪。示出了来自各个处理组的假处理小鼠(实线,实心符号)和移植接受体(处理;虚线,空心符号),连同低脂肪饮食(LFD)对照作为参考(B-E)。各个线

状图表右侧的箱线图示出了第2天至第12天的体重变化,各个数据点表示单个小鼠。线状图表的数据表示为平均值 $\pm$ SEM。(F)移植前(第2天)和移植后(第75天)的体重。

[0076] 图5G示出了图表,其描述了实施例6小鼠在移植后20周相对的附睾脂肪垫重量比体重。

[0077] 图5H示出了图表,其描述了实施例6小鼠在移植后20周评估的血浆小鼠瘦素水平。

[0078] 图6A-6E示出了图表,其描述了实施例6小鼠在移植后12周进行口服葡萄糖耐受测试的结果。

[0079] 图6F示出了图表,其描述了实施例6小鼠在移植后4周(6F)进行葡萄糖腹膜内注射之前(0)或之后60分钟(60)的小鼠C-肽水平。

[0080] 图6G示出了实施例6小鼠在禁食过夜后和腹膜内葡萄糖刺激后60分钟测量的人C-肽分泌的结果。

[0081] 图7A和7C示出了图表,其描述了向小鼠施用实施例1的饮食后,第5天(7A)和第32天(7C)进行口服葡萄糖耐受测试的结果(这些是附随图1的另外的时间点)。

[0082] 图7B和7D示出了图表,其描述了实施例1小鼠在第5天(7B)和第32天(7D)的体重。

[0083] 图7E、7F和7G示出了实施例1小鼠第47天至第49天在清晨禁食4至6小时后的血浆水平。7E是游离脂肪酸的图表,7F是甘油三酯的图表,并且7G是胆固醇的图表。

[0084] 图8示出了4张图表,其描述了实施例2的阶段4、第4天的细胞的关键标志物的流式细胞计数结果,显示出突触泡蛋白与NKX6.1、嗜铬粒蛋白与NKX2.2、PDX1与Ki67、以及PAX4与OCT3/4的共表达。

[0085] 图9A和9B示出了图表,其描述了实施例4的小鼠在移植后18周(9A)和24周(9B)进行腹膜内葡萄糖耐受测试的结果。

[0086] 图9C和9D示出了图表,其描述了实施例4的小鼠在移植后22周进行胰岛素耐受测试的结果。

[0087] 图10A、10B和10C示出了图表,其描述了实施例4的小鼠在施用该饮食后36周并且在移植或假手术后29周的胰腺切片中的 β 细胞质量(10A), α 细胞质量(10B)以及免疫染色的胰岛素与胰高血糖素比例(10C)。

[0088] 图10D-10G示出了图表,其描述了实施例4的小鼠的体重(10D)、附睾脂肪重量(10E)、血浆瘦素水平(10F)和肝脏重量(10G)。

[0089] 图11A示出了2张图表,其描述了实施例6小鼠的亚组的禁食血糖水平(左侧)和体重水平(右侧)。

[0090] 图11B示出了2张图表,其描述了向实施例6小鼠施用低脂肪饮食或高脂肪饮食后的禁食血糖水平(左侧)和体重水平(右侧)。

[0091] 图11C示出了图表,其描述了向实施例6小鼠施用低脂肪饮食或高脂肪饮食后2周进行口服葡萄糖耐受测试的结果。

[0092] 图11D示出了图表,其描述了向实施例6小鼠施用低脂肪饮食或高脂肪饮食后3周进行胰岛素耐受测试的结果。

[0093] 图12A和12B示出了2张图表,其描述了针对雌性(12A)和雄性(12B)小鼠,相对于以天计的移植后时间绘制的以克计的体重,其中1M=100万,5M=500万,S4=阶段4细胞,并且S7=阶段7细胞。在移植前约4天并且在移植后约每2-4周,将小鼠在禁食4小时(通常7am-

11am) 后称重,并且零 (0) 是移植当天。

[0094] 图13A和13B示出了2张图表,其描述了针对雌性 (13A) 和雄性 (13B) 小鼠,相对于以周计的移植后时间绘制的以克计的体重,其中1M=100万,5M=500万,S4=阶段4细胞,并且S7=阶段7细胞。在移植后2、4、8、12、16、20和24周,将小鼠在禁食过夜 (通常5pm-8am,约15hrs.) 后称重,并且零 (0) 为移植当天。

[0095] 图14A和14B示出了描述了以克计的体重 (BW-14A) 和以mM计的血糖 (BG-4小时禁食-14B) 的2张图表,其比较了在非糖尿病小鼠中的移植的阶段7细胞与人胰岛移植,其中人胰岛移植小鼠的一个亚组是非糖尿病的 (即,非STZ处理的),并且其余为“糖尿病的” (即,经STZ处理的)。

[0096] 图15A-15C示出了3张图表,其比较了对照小鼠与移植了阶段7细胞 (S7) 的小鼠以及移植了人胰岛细胞的小鼠 (与图14相同的小鼠),其中 (15A) 描述了在随机喂养小鼠中测量的小鼠瘦素 (ng/ml), (15B) 描述了得自双能量x射线吸收测量法 (DEXA) 的脂肪质量 (g), 并且 (15C) 描述了随机喂养小鼠的小鼠瘦素 (ng/ml) 除以脂肪克数。

[0097] 图16A-16C示出了3张图表,其比较了对照小鼠与移植了阶段7细胞 (S7) 的小鼠以及移植了人胰岛细胞的小鼠 (与图14和15相同的小鼠),其中 (16A) 描述了瘦体质量, (16B) 描述了脂肪质量,并且 (16C) 描述了通过双能量x射线吸收测量法 (DEXA) 测量的身体脂肪%。

[0098] 图17A-17D示出了4张图表,其比较了对照小鼠与移植了阶段7细胞 (S7) 的小鼠以及移植了人胰岛细胞的小鼠 (与图14和15相同的小鼠),图 (17A) 为左肾或右肾 (带有移植物的肾脏) 或两者的肾周脂肪重量。图17B-D分别为附睾脂肪、肠系膜脂肪以及合并的所有脂肪垫的重量。

[0099] 图18A-18C示出了3张图表,其比较了在皮下无装置小鼠和肾小囊 (KC) 植入小鼠中的阶段4细胞移植和阶段6细胞移植与对照小鼠 (无细胞移植-假手术),示出了C-肽ng/ml (18A); 体重 (18B); 以及每周的禁食血糖 (18C)。

[0100] 图19示出了图表,其跟踪了在皮下植入在TheraCyte装置中的阶段7细胞的移植 (S7+Tc处理) 之后,或者在未经包封并且在肾小囊 (KC) 下植入在TheraCyte装置中的阶段7细胞的移植之后,在指定时间点的单个小鼠 (在X轴上的动物数) 中的人C-肽,动物数为10和40时移植不成功。

[0101] 图20示出了图表,其跟踪了在皮下植入在TheraCyte装置 (TC) 中的阶段7细胞的移植之后,或者在未经包封并且在肾小囊 (KC) 下植入在TheraCyte装置 (TC) 中的阶段7细胞的移植之后,在指定时间点的小鼠体内人C-肽。

[0102] 发明详述

[0103] 当结合附图阅读时,将会更好地理解以下的本发明详细描述。为说明本发明的目的,附图展示了本发明的实施方案。然而,本发明不限于所示出的明确安排、实施例和手段。

[0104] 本发明涉及以下发现:将胰腺内分泌前体细胞单独地或者结合施用治疗有效量的抗糖尿病药物植入对象中,以进一步分化为功能性胰腺内分泌细胞,导致了对象的体重减轻。另外,包含单独地或结合施用治疗有效量的所选抗糖尿病药物的联合疗法移植胰腺内分泌前体细胞,以进一步分化为功能性胰腺内分泌细胞,导致改善了2型糖尿病 (T2D) 模型哺乳动物中的葡萄糖耐受和胰岛素抵抗。

[0105] 因此,本发明的实施方案提供了用于治疗对象的肥胖症的方法,其包括:(a)将胰腺内分泌祖细胞群植入对象;以及(b)使胰腺内分泌前体细胞群在体内成熟。任选地,所述方法可以包括向对象施用治疗有效量的一种或多种抗糖尿病药物。或者,本发明的实施方案提供了用于治疗对象的肥胖症的方法,其包括:(a)将胰腺内分泌祖细胞群植入对象;以及(b)使胰腺内分泌前体细胞群在体内成熟以产生包含约2%或更多胰腺内分泌细胞的细胞群。任选地,所述方法可以包括向对象施用治疗有效量的一种或多种抗糖尿病药物。另外,本发明的实施方案可以提供用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良和胰岛素抵抗的方法,其包括:(a)将胰腺内分泌祖细胞群植入对象;(b)使胰腺内分泌前体细胞群在体内成熟;以及(c)向对象施用治疗有效量的一种或多种抗糖尿病药物,其中所述抗糖尿病药物选自:二肽基肽酶4抑制剂、噻唑烷二酮类和双胍类。或者,本发明的其他实施方案提供了用于治疗对象的肥胖症的方法,其包括:(a)将胰腺内分泌祖细胞群植入对象;(b)使胰腺内分泌前体细胞群在体内成熟以产生包含约2%或更多的胰腺内分泌细胞的细胞群。任选地,所述方法包括向对象施用治疗有效量的一种或多种抗糖尿病药物。另外,本发明提供了用于治疗患有T2D的对象的肥胖症、葡萄糖耐受不良和胰岛素抵抗的方法,其包括:(a)将胰腺内分泌前体细胞群植入对象;(b)使胰腺内分泌前体细胞群在体内成熟以产生包含约2%或更多的胰腺内分泌细胞的群;以及(c)向对象施用治疗有效量的一种或多种抗糖尿病药物,其中所述抗糖尿病药物选自:二肽基肽酶4抑制剂、噻唑烷二酮类和双胍类。在另一些实施方案中,各种指明的胰内胚层品系细胞或者本文定义的胰祖细胞,包括4、5、6和阶段7的细胞或者来源于本文描述的体外成熟方法的胰腺内分泌细胞,可以单独或相结合、但独立于任何抗糖尿病药物使用,并且用于治疗肥胖症、葡萄糖耐受不良、血糖控制以及治疗胰岛素抵抗。

[0106] 用于提供对本发明有用的胰腺内分泌前体细胞的干细胞或多能干细胞,根据它们在单细胞水平自我更新和分化的能力来定义,是未分化的细胞,包括但不限于:人胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、人脐带组织来源细胞、人羊水来源细胞、人胎盘来源细胞和人孤雌生殖体来源干细胞。所述干细胞的特征还在于,它们在体外分化为来自多个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的各种细胞品系的功能性细胞的能力。所述干细胞还在移植后形成多个胚层的组织,并且在注射至囊胚后基本促成多数(即便不是全部)的组织。

[0107] 干细胞是分化的,这种分化是未特化(“未受约束(uncommitted)”)或特化较少的细胞获得特化细胞的特征的过程。分化的细胞是在细胞品系中处在更加特化(“受约束(committed)”)的位置的细胞。术语“受约束(committed)”,当用于分化过程时,是指已经在分化途径中进行至这样的点的细胞,其中在正常情况下,该细胞将继续分化成为特定的细胞类型或细胞类型的亚组,并且在正常情况下不能分化成为不同的细胞类型或者恢复为分化较少的细胞类型。

[0108] 标志物可以用于表征干细胞和各种分化的细胞。本文使用的“标志物”是在目标细胞中有差异地表达的核酸或多肽分子。就这一点而言,有差异的表达意指相较于未分化的细胞、相同品系中处于另一分化阶段的细胞或者不同品系的细胞,具有升高的阳性标志物水平和降低的阴性标志物水平。相较于其他细胞,目标细胞中的标志物核酸或多肽的可测水平足够地更高或更低,使得可以使用本领域已知的多种方法中的任何方法来识别目标细胞,并与其他细胞区分。

[0109] 分化过程通常被视为通过多个连续的阶段进行。为了本发明的一个实施方案的目的,在分步分化中,“阶段1”是指分化过程中的第一步,其中多能干细胞分化成为表达定形内胚层特征性标志物的细胞(“阶段1细胞”)。“阶段2”是指第二步,表达定形内胚层细胞特征性标志物的细胞,分化成为表达肠管细胞特征性标志物的细胞(“阶段2细胞”)。“阶段3”是指第三步,表达肠管细胞特征性标志物的细胞,分化成为表达前肠内胚层细胞特征性标志物的细胞(“阶段3细胞”)。“阶段4”是指第四步,表达前肠内胚层细胞特征性标志物的细胞,分化成为表达胰腺内分泌前体细胞特征性标志物的细胞(“阶段4细胞”)。在其他实施方案中,分步分化过程包括使胰前肠前体细胞分化成为胰腺内分泌前体细胞(“阶段5细胞”)或未成熟内分泌细胞(“阶段6细胞”),并且之后进一步分为成为更加成熟的内分泌细胞(“阶段7细胞”),通过对具有给定阶段的细胞特征的特异性标志物来识别各个阶段。然而,实际编号的阶段不是限制性的,因为具体的细胞群由该群中的任何细胞类型定义,所述细胞类型由在同一群中相对于其他细胞类型表达的标志物来识别。

[0110] 应注意,在特定的群中,不是所有的细胞均以相同的速率经历所述阶段。因此,在体外细胞培养物中常检测到有相比该群中存在的大多数细胞其分化途径进展更少或更多的细胞存在,特别是在较后的分化阶段。为了说明本发明的目的,本文描述了与上文识别的阶段相关的各种细胞类型的特性。

[0111] 本文使用的“定形内胚层”或“内胚层品系细胞”或其等同物,是指表达了以下标志物中至少一种的细胞:FOXA2(也被称为肝细胞核因子3- β (“HNF3- β ”))、GATA4、SOX17、CXCR4、Brachyury、Cerberus、OTX2、goosecoid、C-Kit、CD99和MIXL1。定形内胚层细胞特征性标志物为CXCR4、FOXA2和SOX17。

[0112] 本文使用的“肠管细胞”或其等同物是指来源于定形内胚层的细胞,其特征可以在于它们相比定形内胚层细胞具有显著增加的HNF4- α 的表达。

[0113] 本文使用的“前肠内胚层细胞”或“PDX1胰内胚层细胞”或其等同物是指表达以下标志物中至少一种的细胞:PDX1、FOXA2、CDX2、SOX2和HNF4- α 。前肠内胚层细胞可以特征在于相比肠管细胞具有增加的PDX1表达。

[0114] 本文使用的“胰前肠前体细胞”或“胰祖细胞”或“阶段4细胞”(S4细胞)或其等同物,是指表达以下标志物中至少一种的细胞:PDX1、NKX6.1、HNF6、SOX9、FOXA2、PTF1a、PROX1和HNF4 α 。更具体地,可以通过PDX1、NKX6.1和SOX9中至少一种的表达呈阳性并且具有NGN3和NeuroD的低表达来识别胰前肠前体细胞。

[0115] 本文使用的“胰腺内分泌前体细胞”或“阶段5细胞”(阶段5细胞)或“胰内胚层细胞”或其等同物,是指能够成为胰腺激素表达细胞并且表达以下标志物中至少一种的胰内胚层细胞:NGN3;NKX2.2;NeuroD1;ISL1;PDX1;PAX4;PAX6;NKX6.1或ARX。胰腺内分泌前体细胞可以特征在于它们表达NKX2.2、NKX6.1、PDX1和NeuroD1。

[0116] 本文使用的“胰腺内分泌细胞”或“胰腺激素表达细胞”或“表达胰腺内分泌品系特征性标志物的细胞”或“阶段6或阶段7细胞”(S6或S7细胞)或其等同物,是指能够表达以下激素中至少一种的细胞:胰岛素、胰高血糖素、生长激素抑制素、饥饿素和胰多肽。除了这些激素之外,胰腺内分泌细胞特征性标志物包括以下的一种或多种:NGN3、NeuroD1、ISL1、PDX1、NKX6.1、PAX4、ARX、NKX2.2、MNX1(Hb9)和PAX6。表达 β 细胞特征性标志物的胰腺内分泌细胞,可以特征在于它们表达胰岛素和以下转录因子中至少一种:PDX1、NKX2.2、NKX6.1、

NeuroD1、ISL1、HNF3- β 、MAFA、MX1和PAX6。“更加成熟的内分泌细胞”表达了胰腺内分泌细胞特征性标志物,但是具有相比未成熟的内分泌细胞更加成熟的表型,意味着更加成熟的内分泌细胞不仅是胰岛素+、MAFA+、NKX6.1+和PDX1+的,还显示出葡萄糖响应性胰岛素分泌。

[0117] 本文使用的“功能性胰 β 细胞”或“ β 细胞”或其等同物,是指如US20150353895提及的、能够具有葡萄糖响应性并且对PDX-1和NKX6.1呈阳性的胰岛素阳性细胞;或者如W02015002724提及的“SC- β 细胞”。在另一些实施方案中,功能性胰 β 细胞表达了至少一种内源性成熟胰 β 细胞特征性标志物,所述标志物选自:胰岛素、C-肽、PDX 1、MAFA、NKX6-1、PAX6、NEUROD1 (或NEUROD)、葡萄糖激酶 (GCK)、SLC2A 1、PCS 1、KCNJ1 1、ABCC8、SLC30A8、SNAP25、RAB3A、GAD2、PTPRN、NKX2-2、PAX4、IRX1和IRX2。

[0118] “适当的生长因子”或“适当的因子”或其等同物,是指那些用于将细胞群从一个阶段分化至另一个阶段或者分化至进一步分化的阶段的特定生长因子和试剂。用于各分化步骤或阶段的适当因子或试剂,在以下文献中详细描述:D'Amour,KA.et al.2005,D'Amour,KA.et al.2006,Kroon E.et al.2008,Schulz T.et al.2012,Rezania A.et al.2014,Bruin J.et al.2014,Pagliuca FW.et al.2014,Agulnick A.D.et al.2015 (还参见W0/2014/160413)等。

[0119] 对本发明的方法有用的细胞,可以是任何以下细胞的群:阶段4或阶段5胰腺内分泌前体细胞,或者阶段6或阶段7胰腺内分泌细胞,以及直至但不包括成熟 β 细胞的所有细胞,并且统称为“胰腺内分泌祖细胞”。或者,对所述方法有用的细胞还可以包括内分泌细胞和体外成熟的胰腺内分泌细胞。或者,对本发明有用的细胞可以是任何以下细胞的群:未成熟的胰腺内分泌细胞,或者不仅胰岛素+、MAFA+、NKX6.1+和PDX1+还显示出葡萄糖响应性胰岛素分泌的更加成熟的内分泌细胞。优选地,本发明使用的细胞是胰腺内分泌前体细胞。

[0120] 本文使用的“对象”或其等同物,是指动物,优选哺乳动物,最优选成人或儿童。本文使用的“肥胖症”意指不期望的或者大于等于对象理想体重的约20%的身体脂肪的积累。化合物、生长因子或试剂的“有效量”或其等同物,是指在细胞培养基的剩余组分存在时,足以将细胞维持在未分化状态(例如多能细胞)或者促进细胞分化的化合物、生长因子或试剂的浓度。本领域普通技术人员可容易地确定该浓度,并且对于本文描述的多种细胞类型,有效量在至少以下文献中有详细描述:D'Amour,KA.et al.2005,D'Amour,KA.et al.2006,Kroon E.et al.2008,Schulz T.et al.2012,Rezania A.et al.2014,Bruin J.et al.2014,Pagliuca FW.et al.2014,Agulnick A.D.et al.2015等。在一些实施方案中,治疗有效量是与未接受同样处理的细胞培养物相比,或者是化合物、生长因子或试剂的治疗有效量。本文使用的“治疗有效量”或其等同物,是指向对象提供期望益处的单独给予或结合给予的一种或多种小分子抗糖尿病药物。

[0121] 在一些实施方案中,除了植入的、分化的细胞之外,本发明的方法和联合疗法使用了抗糖尿病药物,以治疗对象的肥胖症和葡萄糖耐受不良之一或两者。“抗糖尿病药物(anti-diabetic drug)”或“抗糖尿病药物(anti-diabetic medication)”,意指用于降低患有T2D的人的血糖水平的药物、试剂等。

[0122] 对本发明有用的抗糖尿病药物,可以通过多种降低血糖的方式中的任何方式起作用,包括:刺激胰岛素从胰腺产生和释放,抑制葡萄糖从肝脏释放,抑制分解碳水化合物的

胃酶,改善细胞对胰岛素的敏感性,抑制肾脏中的葡萄糖再吸收,或者减慢胃中的食物运动性。这些抗糖尿病药物包括以下口服药物:氯茴苯酸类,如瑞格列奈和那格列奈;磺酰脲类,如格列吡嗪、格列美脲和格列本脲;二肽基肽酶4(“DPP-4”)抑制剂,如沙格列汀、西他列汀和利拉利汀;双胍类,如甲福明;噻唑烷二酮类,如罗格列酮和吡格列酮; α -葡萄糖苷酶抑制剂,如阿卡波糖和米格列醇;钠-葡萄糖转运子2(“SGLT2”)抑制剂,如卡格列净、达格列净和依帕列净;以及胆汁酸螯合剂,如考来维仑。或者,可注射的药物,如胰淀素模拟物,包括普兰林肽,以及肠降血糖素模拟物,包括GLP-1受体激动剂,如艾塞那肽和利拉鲁肽。

[0123] 抗糖尿病药物以“治疗有效量”使用,意指在研究人员、兽医、医师或其他临床医生探寻的组织系统、动物或人中引起生物或医学反应的抗糖尿病药物的量,所述生物或医学反应包括所治疗疾病或病症中一种或多种症状的缓和,或者所治疗疾病或病症中一种或多种症状的严重程度降低。

[0124] 任何多能干细胞可以用于本发明以提供胰腺内分泌前体细胞、胰前肠前体细胞和成熟内分泌细胞。可以使用的多能干细胞的示例性类型包括已建立的多能细胞系,包括妊娠中任何时间提取的胚胎前期组织(如囊胚)、胚胎组织或胎儿组织,通常但非必要地,在约10至12周妊娠之前。非限制性的实例是已建立的人胚胎干细胞(hESC)或人胚胎生殖细胞系,如在NIH人胚胎干细胞登记处列出的现有362种人胚胎干细胞系中的任何细胞系,包括但不限于H1(NIH Code:WA01)、H7(NIH Code:WA07)、H9(NIH Code:WA09)(WiCell Research InstituteTM,Madison,WI,USA)、SA002(Cellartis AB CorporationTM,Goteburg,Sweden)、CyT49(ViaCyte,Inc.)。多能干细胞标志物包括,例如,以下的一种或多种的表达:ABCG2、cripto、FOXD3、CONNEXIN43、CONNEXIN45、OCT4、SOX2、NANOG、hTERT、UTF1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81。这些可以通过RT-PCR或流式细胞计数或现在或今后研发的类似技术检测。

[0125] 从已经在不存在饲养细胞的情况下培养的多能干细胞群提取的细胞也是适合的。也可以使用来源于成人体细胞的诱导的多能细胞(IPS)或重编程的多能细胞,所述成人体细胞使用大量多能相关转录因子如OCT4、NANOG、SOX2、KLF4和ZFP42的强制表达(Loh,YH.et al.2011,f;还参见IPS,Takahashi,K.and Yamanaka,S.2006)。用于本发明方法的人胚胎干细胞,也可以按照Thomson等人描述制备(第5,843,780号美国专利;Thomson,JA.et al.1998;Thomson,JA.and Marshall,VS.1998;Thomson,JA.et al.1995)。也可以使用突变型人胚胎干细胞系,如BG01v(BresaGenTM,Athens,Georgia.),或者来源于成人体细胞的细胞,如Takahashi et al.2007中公开的细胞。在某些实施方案中,适用于本发明的多能干细胞可以根据以下文献中描述的方法获得:Li et al.2009;Maherali et al.2007;Stadtfield et al.2008;Nakagawa et al.2008;Takahashi et al.2007;以及第2011/0104805号美国专利申请公开文本。在某些实施方案中,适用于本发明的多能干细胞可以被认为是“初始的(naïve)”,并且根据以下文献中描述的方法获得:Gafni et al.2013,以及Ware et al.2014。

[0126] 在某些实施方案中,多能干细胞可以来自非胚胎器官。合适细胞的其他来源包括:人脐带组织来源细胞、人羊水来源细胞、人胎盘来源细胞、以及人孤雌生殖体。在一个实施方案中,脐带组织来源细胞可以通过第7,510,873号美国专利的方法获得。在另一个实施方案中,胎盘组织来源细胞可以使用第2005/0058631号美国专利申请公开文本的方法获得。

在另一个实施方案中,羊水来源细胞可以使用第2007/0122903号美国专利申请公开文本的方法获得。这些专利申请的每一篇以其整体并入本文,因为其涉及所述细胞的分离和表征。

[0127] 多能干细胞通常在饲养细胞的层上培养,所述饲养细胞以各种方式支持多能干细胞。或者,多能干细胞可以在基本不含饲养细胞,但仍然支持多能干细胞在不经历实质分化的情况下增殖的培养系统中培养。多能干细胞在无饲养物培养物中无分化的生长,通常使用通过预先与另一种细胞类型培养来调节的培养基来支持。或者,多能干细胞在无饲养物培养物中无分化的生长,可以使用化学限定的培养基来支持。

[0128] 使用各种饲养物层或者通过使用基质蛋白质涂布的容器,可以容易地在培养物中扩增多能细胞。或者,可以使用化学限定的表面再结合限定的培养基来进行未分化细胞的常规扩增,所述培养基如以商标mTeSR™-1和TeSR™-2 (StemCell Technologies, Inc.™, Vancouver, B.C., Canada) 出售的培养基。使用酶消化、机械分离或者诸如乙二胺四乙酸(“EDTA”)的各种钙螯合剂,可以容易地从培养板移除多能细胞。或者,可以在不存在任何基质蛋白质或饲养物层的情况下于悬浮液中扩增多能细胞。

[0129] 多能干细胞可以接种在适合的培养基底上。示例性的合适培养基底是细胞外基质组分,如那些来源于基膜或者可以来源于粘附分子受体-配体偶联物一部分的细胞外基质组分。合适培养基底是以商标MATRIGEL™ (Corning Incorporated™, Corning, New York) 出售的重构基膜。

[0130] 本领域已知的其他细胞外基质组分和组分混合物适于作为替代物。根据增殖的细胞类型,其可以包括单独的或各种组合形式的层粘连蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖、巢蛋白、硫酸肝素等。

[0131] 多能干细胞可以以适合的分布并且在培养基存在的情况下接种在基底上,所述培养基促进细胞存活、增殖以及期望特性的保留。

[0132] 随着多能细胞向β细胞分化,它们分化经过了各种阶段,其中每一个阶段可以用特定标志物的存在或缺失来表征。细胞分化至这些阶段通过特定的培养条件实现,所述培养条件包括添加至培养基的某些因子的存在和缺失。通常,该过程包含多能干细胞分化成为定形内胚层细胞。然后这些定形内胚层细胞可以进一步分化成为肠管细胞,然后其可以进而分化成为前肠内胚层细胞。在一个实施方案中,前肠内胚层细胞可以分化成为胰前肠前体细胞,然后其可以进一步分化成为胰腺内分泌前体细胞。这些细胞可以再进一步分化成为胰腺激素产生细胞或胰腺激素分泌细胞。在另一个实施方案中,前肠内胚层细胞可以分化成为胰腺内分泌前体细胞,并且进一步分化成为胰腺激素产生细胞或胰腺激素分泌细胞。

[0133] 在本发明的某些实施方案中,为了得到表达胰腺内分泌前体细胞特征性标志物的细胞,使用了由多能干细胞起始的方案。该方案包括:

[0134] 阶段1:使用适当的因子处理从细胞培养系获得的诸如胚胎干细胞的多能干细胞,以诱导形成定形内胚层细胞。

[0135] 阶段2:使用适当的因子处理由阶段1得到的细胞,以诱导形成表达肠管细胞特征性标志物的细胞。

[0136] 阶段3:使用适当的因子处理由阶段2细胞得到的细胞,以诱导进一步分化成为表达前肠内胚层细胞特征性标志物的细胞。

[0137] 阶段4:使用适当的因子处理由阶段3得到的细胞,以诱导进一步分化成为表达胰内胚层品系特征性标志物的细胞,所述标志物为以下中的至少一种:PDX1、NKX6.1、HNF1 β 、PTF1 α 、HNF6、HNF4 α 、SOX9、HB9或PROX1。表达胰内胚层品系特征性标志物的细胞不显著表达CDX2或SOX2。

[0138] 阶段5:使用适当的因子处理由阶段4得到的细胞,以诱导进一步分化成为表达胰腺内分泌前体细胞特征性标志物的细胞(其能够成为胰腺激素表达细胞),特别是使NGN3的诱导最大化。此类细胞可以表达以下标志物中的至少一种:NGN3、NKX2.2、NeuroD、ISL-1、Pax4、Pax6或ARX。

[0139] 阶段6或阶段7:使用适当的因子处理由阶段5或6得到的细胞,以诱导进一步分化成为表达胰腺内分泌细胞特征性标志物的细胞,其表达能够具有葡萄糖响应性的胰岛素,并且对PDX-1和NKX6.1呈阳性,并且经常对MAFA呈阳性。

[0140] 本发明提供治疗方法,特别是用于治疗患有肥胖症、葡萄糖耐受不良和胰岛素抵抗中一种或多种的对象的的治疗方法。在一个实施方案中,所述治疗方法包括将通过本发明的方法获得或可通过本发明的方法获得的细胞植入对象。在一个实施方案中,所述治疗方法包括将多能细胞在体外分化成为胰腺前体细胞、胰腺内分泌细胞或成熟内分泌细胞,如本文所述,并且将所述分化的细胞植入对象。在另一个实施方案中,所述方法还包括培养多能干细胞的步骤,如本文所述,以及之后的分化多能干细胞的步骤。在另一实施方案中,所述方法还包括在移植步骤之后在体内分化细胞的步骤。在一个实施方案中,通过任何方法治疗的对象是哺乳动物,并且优选是人。

[0141] 在一个实施方案中,所述细胞可以作为分散的细胞被移植,或者形成可以输注至血管系统如肝门静脉中的簇。或者,细胞可以在生物相容、有孔、聚合物支撑物、可降解装置或不可降解装置中提供,或者细胞可以被包封(可以使用宏观或微观包封)以保护所述细胞免受宿主免疫系统影响。细胞可以被植入接受体内适当的部位,包括例如,肝脏、肌肉脂肪、胰腺、肾小囊下空间、网膜、腹膜、浆膜下空间、肠、胃或皮下囊袋。具有或不具有细胞容器(cell receptacle)的移植部位,可以在细胞移植之前预先血管化。例如,可以准备预先血管化的皮下部位以便进行胰岛细胞移植(参见Pepper AR.et al.2015)。实际上,发明人已经展示了,使用Pepper AR.et al.2015的方法(数据未示出)进行无装置的皮下移植后,阶段4和阶段6细胞均可以存活、成熟并起作用(即,显示出葡萄糖诱导和C-肽释放)。

[0142] 使用保护性胶囊试图保护 β 细胞免受免疫破坏具有诸多挑战(参见Tang,Q.and Desai,TA.2016)。例如,用于包封 β 细胞的材料必须是葡萄糖和胰岛素能透过的,同时防止免疫细胞和它们产生的有毒分子到达 β 细胞。将 β 细胞密封在此类胶囊中会有问题,因为在移植后高比例的胰岛会由于缺血很快死亡,该情况会由于包封而恶化,因为这种结构可以阻止胰岛的血管生成。此外,包封会降低 β 细胞响应血糖水平变化的速度,其原因是葡萄糖和胰岛素扩散通过胶囊表面与 β 细胞之间的空间所需要的时间。胰岛簇中,每个 β 细胞相邻着一条毛细血管,以便血糖变化与胰岛素释放的有效偶联。 β 细胞存活和 β 细胞作用中的问题均可以被炎性异物反应(FBR)加重,而所述炎性异物反应常由用于包封细胞的材料引起。移植接受体内的巨噬细胞将材料认作是异物,并且形成纤维壁来包含它们,其可以导致装置表面的污染以及其中细胞的窒息。

[0143] 为了增强植入体内的细胞的进一步分化、存活率或活性,可以在施用细胞之前、同

时或之后施用另外的因子,如生长因子、抗氧化剂或抗炎剂。这些因子可以通过内源性细胞分泌,并且原位接触施用的细胞。可以通过本领域已知的内源性生长因子和外源施用的生长因子的任意组合,来诱导植入的细胞分化。另外,在细胞移植之前或细胞移植之后,向对象施用一种或多种抑制免疫力的药物以防止对植入细胞的排斥可以是有益的。

[0144] 用于移植的细胞的量取决于很多因素,包括移植对象的身体状况以及对移植疗法的响应,并且可以由本领域技术人员确定。在植入患者之前,所述细胞可以在体外保持在支撑物上。或者,含有细胞的支撑物可以直接植入患者而不经过程另外的体外培养。所述支撑物可以任选地掺入至少一种有助于移植细胞的存活和作用的药剂。

[0145] 将胰祖细胞植入宿主进行体内成熟,使细胞暴露于多种环境影响,其可以是容许性的、禁止性的、有害的、有益的或其中的一些组合。此外,这些影响的多种排列和组合难以预计,并且所述影响势必取决于许多因素(例如,细胞的阶段、细胞的类型、宿主环境(包括,疾病状况、药物等))。例如,T1D模型(即,由于使用大STZ剂量破坏胰岛以模拟T1D患者的自身免疫反应而导致的绝对胰岛素缺乏,其需要胰岛素施用,但取决于胰岛素治疗的类型,运动和食物摄取也可以导致高血糖症或低血糖症)中的细胞成熟,与T2D模型(即,存在对胰岛细胞的部分损害,其中它们仍然产生胰岛素,如果有一点不足量和胰岛素抵抗,则导致由于肝脏不适当地释放葡萄糖和通过CNS的不适当的代谢调节而引起血糖升高)中的细胞成熟有很大不同。此外,T2D糖尿病药物(例如,瑞格列奈;那格列奈;格列吡嗪;格列美脲;格列本脲;沙格列汀;西他列汀;利拉利汀;甲福明;罗格列酮;吡格列酮;阿卡波糖;米格列醇;卡格列净;达格列净;依帕列净;和考来维仑)对胰祖细胞体内成熟的作用是先前未了解的。实际上报导了在导管结扎模型中,钙调磷酸酶抑制剂(例如,环孢霉素和他克莫司)阻断胰腺再生(参见例如,Heit,JJ.et al.2006;以及Nir,T D.et al.2007)。此外,暴露于高脂肪饮食看来不影响体内成熟过程(参见实施例3)。

[0146] 可能的是,可以预计来自移植β细胞的胰岛素取代对T2D会有疗效,尽管缺乏证据支持。然而,不能预计当在T2D环境中生长时,在胰岛素分泌前所必须的前体细胞成熟时间会受到怎样的影响。有证据表明,高血糖和胰岛素抵抗(T2D的关键特性)均可以危害β细胞发育(参见例如,Jonas,JC.et al.1999;以及Kahraman,S.et al.2014)。类似地,已经显示出饮食影响β细胞发育(参见例如,O'Dowd,JF.and Stocker,CJ.2013)。因此,在这种环境(高血糖症、胰岛素抵抗,类似T2D)中,胰腺前体细胞是否会成熟为β细胞并在之后适当地起作用从而改善葡萄糖体内平衡,需要实验来证明。

[0147] 如本文报导的,祖细胞的分化在雄性小鼠与雌性小鼠之间不同(相比雄性,在雌性中成熟为葡萄糖响应性β细胞更快),这是我们未预计到的(数据未示出;还参见图12和13),并且已经发现甲状腺功能减退的情况危害胰祖细胞的分化(参见Bruin,JE.et al. "Hypothyroidism impairs human stem cell-derived pancreatic progenitor cell maturation in mice" Diabetes (2016) pii:db151439. [Epub ahead of print])。因此,环境影响确实可以干扰移植细胞的成熟和功能,并且其可能是不可预计的,以至于人们不应假定在类T2D参数的情况下会发生前体细胞成熟为功能性β细胞。

[0148] 关于其他抗糖尿病药物的影响,我们先前检验了胰岛素和Exendin-4的短期效果;在测试的条件下,两者均不具有显著的效果(参见例如,Bruin,JE.et al.2013)。然而,其他人报导了药物可以危害β细胞再生,例如抑制免疫力的药物(参见例如,Nir T.et

al.2007)。

[0149] 材料和方法

[0150] hESC的体外分化以及胰祖细胞的评估

[0151] H1hESC系得自WiCell Research Institute™。所有在英属哥伦比亚大学(UBC)进行的使用H1细胞的实验,经过加拿大干细胞监督委员会和UBC临床研究伦理委员会批准。根据我们前述的14天、4-阶段方案(Bruin et al.,2013),将多能H1细胞分化成为胰祖细胞。有可用的产生胰祖细胞或内分泌前体和胰腺内分泌细胞的其他分化方案,并且已显示出响应生理葡萄糖水平而至少发育并成熟为胰岛素分泌细胞(Kroon E.et al.2008;Schulz T.et al.2012;Rezania et al.2014;Pagliuca,FW.et al.2014;Agulnick,AD.et al.2015;以及Russ,HA,et al.2015)。使用熟知的方法,在移植之前评估关键胰祖细胞标志物或内分泌细胞标志物的表达,所述方法包括常规Taqman™qPCR Arrays(Applied Biosystems™)。

[0152] 流式细胞计数

[0153] 如之前所描述的(Rezania et al.,2012),将分化的细胞释放成为单细胞悬浮液,固定、透化并对各种细胞内标志物染色。在FACS分析过程中将死亡细胞排除,并且使用同种型抗体测定门控。抗体详细信息参考表1。

[0154] 表1:用于FACS的抗体信息

[0155]

类型	抗体	来源	稀释
未缀合的初级抗体	小鼠抗-NKX6.1	Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa (Cat #F55A12)	1:400
	兔抗-突触泡蛋白	Abcam™ (Cat #ab52636)	1:800
	兔抗-嗜铬粒蛋白 A	DAKO™ (Cat# IS502)	1:10
	小鼠抗-NKX2.2	Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa (Cat# 74.5A5)	1:100
缀合的初级抗体	Alexa Fluor 647 小鼠抗-人 Ki67	BD™ cat# 561126	1:10
	PE 小鼠抗-PDX1	BD™ cat# 562161	1:40
	PE 小鼠抗-人 Pax6	BD™ cat# 561552	1:20
	Alexa Fluor 647 小鼠抗-Oct3/4	BD™ cat# 560329	1:20
二级抗体	山羊抗-小鼠 IgG AF647	Invitrogen™ (Cat# A21235)	1:4000
	PE 山羊抗-兔 Fab2 IgG (H+L)	Invitrogen™ (Cat# A10542)	1:800
同种型对照抗体	纯化兔 IgG, k 同种型	BD™ cat# 550875	1:1000
	纯化小鼠 IgG, k 同种型	BD™ cat# 557273	1:50
	PE 小鼠 IgG1, k, 同种型对照	BD™ cat # 555749	1:40
	Alexa Fluor 647 IgG1, 同种型对照	BD™ cat# 557732	1:40

[0156] 动物

[0157] 在研究过程中,将雄性SCID-beige小鼠(C.B-Igh-1b/GbmsTac-Prkdcscid-LystbgN7,8-10周龄;Taconic™)维持在12hr光照/黑暗循环。所有的实验经过UBC动物护理

委员会批准,并且根据加拿大动物护理委员会的指导进行。

[0158] 饮食和药物施用

[0159] 所有小鼠在它们到达UBC后随意获得标准的经辐射饮食 (Harlan Laboratories™, Teklad™饮食#2918) 持续2周,以便使其适应环境。在第一群组中,将小鼠安排到4个不同饮食方案 (Research Diets™) 之一,进行36周的研究 (每种饮食n=11): (1) “10%脂肪”对照饮食 (D12450K, 10kcal%脂肪, 70kcal%碳水化合物[无蔗糖]), (2) “45%脂肪”饮食 (D12451, 45kcal%脂肪[主要为猪油], 35kcal%碳水化合物), (3) “60%脂肪”饮食 (D12492, 60kcal%脂肪[主要为猪油], 20kcal%碳水化合物), 或者 (4) “西方”饮食 (D12079B, 41kcal%脂肪[主要为乳脂肪], 43kcal%碳水化合物[主要为蔗糖])。

[0160] 在第二群组中,将小鼠置于10%脂肪对照饮食 (D12450K; n=8) 持续一个研究周期,或者置于60%脂肪饮食 (D12492; n=64) 持续6周,然后在剩余的研究中进行以下处理方案之一 (n=每组16): (1) 60%脂肪饮食,无药物 (D12492), (2) 60%脂肪饮食,其中含有罗格列酮 (每天18mg/kg饮食或者约3mg/kg体重; Cayman Chemical™; Research Diets™定制饮食配方D08121002), (3) 60%脂肪饮食,其中含有西他列汀 (每天4g/kg饮食或者约750mg/kg体重; 磷酸西他列汀一水合物, BioVision™; Research Diets™定制饮食配方D08062502R), 或者 (4) 于饮用水中的60%脂肪饮食 (D12492) 和甲福明 (1,1-二甲双胍盐酸盐) (每天1.25mg/ml或者约250mg/kg体重)。

[0161] 为诱导1型糖尿病 (T1D), 进行了链脲菌素 (STZ) 的单次高剂量注射,例如,190mg/kg, (参见Rezania et al.2012), 但可以大于50mg/kg, 但通常大于150mg/kg。尽管单次高剂量模拟了β细胞的迅速且几乎完全的破坏,但仍缺乏T1D的自身免疫组分。或者,可以使用STZ的多次低剂量注射来引起免疫反应和炎症反应,其通常导致β细胞破坏,从而诱导啮齿动物产生T1D。相反,认为与高脂肪饮食 (HFD) 结合的单次低剂量STZ (15–50mg/kg之间的任何值), 更好地模拟了与炎症相关的T2D中β细胞破坏的缓慢发展。或者, HFD (无低剂量STZ) 可以用于生成T2D模型 (参见Bruin et al.2015)。然而,当小鼠不以升高的血糖和体重响应HFD时,可以施用低剂量的STZ。

[0162] 产生用于移植的胰祖细胞,特别是后期阶段的细胞的很多方法是本领域熟知的 (参见例如, Rezania, A. et al.2014; Pagliuca, F.W. et al.2014; Agulnick, A.D. et al.2015; 以及Russ, H.A. et al.2015)。

[0163] hESC来源的胰祖细胞的移植

[0164] 用于移植宏观包封的胰祖细胞的程序如下所述。宏观包封的胰腺内分泌前体细胞或胰岛素产生细胞的类似移植描述于, Rezania et al.2014, Pagliucca et al.2014以及Agulnick A.D. et al.2015。如之前所描述的 (Bruin et al., 2013), 用可吸入异氟烷将所有小鼠麻醉, 并且使移植接受体于右侧腹经皮下 (s.c.) 接受20μl TheraCyte™宏观包封装置 (TheraCyte Inc.™, Laguna Hills, CA) 中的约 5×10^6 个hESC来源胰祖细胞。假处理小鼠接受相同的手术程序, 但不植入宏观包封装置。在第一群组中, 将小鼠在7周的LFD或HFD喂养之后随机分配, 以接受细胞移植 (处理, 每种饮食n=7) 或假手术 (假处理, 每种饮食n=4)。在第二群组中, HFD喂养的小鼠 (+/-药物处理) 在施用抗糖尿病药物1周后接受移植 (每组n=8) 或假手术 (每组n=8)。LFD对照全部接受假手术。表2中总结了处理组。

[0165] 表2: 体内移植 (处理) 研究的处理组的总结

[0166]

群组#	饮食	药物	处理/假处理	样品大小
1	10%脂肪	无	处理	7
1	10%脂肪	无	假处理	4
1	45%脂肪	无	处理	7
1	45%脂肪	无	假处理	4
1	60%脂肪	无	处理	7
1	60%脂肪	无	假处理	4
1	西方	无	处理	7
1	西方	无	假处理	4
2	10%脂肪	无	假处理	8
2	60%脂肪	无	处理	8
2	60%脂肪	无	假处理	8
2	60%脂肪	罗格列酮	处理	8
2	60%脂肪	罗格列酮	假处理	8
2	60%脂肪	西他列汀	处理	8
2	60%脂肪	西他列汀	假处理	8
2	60%脂肪	甲福明	处理	8
2	60%脂肪	甲福明	假处理	8

[0167] 代谢评估

[0168] 所有代谢分析在清醒、受约束的小鼠上进行,并且经由隐静脉采集血液样品。在每个研究过程中,定期评估清晨禁食4hr后的体重和血糖水平。对于所有其他的代谢测试,在禁食后(时间0)以及在施用各种促分泌素后的指定时间点采集血液。

[0169] 在清晨禁食6小时并且通过口服灌胃或腹膜内(i.p.)注射(2g葡萄糖/kg体重,30%溶液;Vétoquinol™,Lavaltrie,QC)施用葡萄糖后,进行葡萄糖耐受测试(GTT)。在禁食过夜并且腹膜内注射葡萄糖(2g/kg)后,对来自植入细胞的经葡萄糖刺激的人C-肽分泌进行评估。在清晨禁食4小时并且施用人合成胰岛素(0.7IU/kg体重;Novolin ge™Toronto, Novo Nordisk™,Mississauga,Canada)后,进行胰岛素耐受测试(ITT)。对于每月混合餐刺激,小鼠在禁食过夜(约16小时)后,接受口服灌胃的Ensure™(8uL/g体重;Abbott Laboratories™,Abbott Park,Illinois,USA)。对于精氨酸耐受测试(ArgTT),小鼠在清晨禁食4小时后,接受精氨酸的腹膜内注射(2g/kg,40%溶液;Sigma-Aldrich™)。使用手持血糖仪(Lifescan™;Burnaby,Canada)测量了血糖水平。使用以下试剂盒在血浆中评估了小鼠激素和脂质分布:瘦素(小鼠瘦素ELISA,Crystal ChemInc.™,Downers Grove,IL),胰岛素(超灵敏小鼠胰岛素ELISA,Alpco Diagnostics™,Salem,NH),C-肽(小鼠C-肽ELISA,Alpco Diagnostics™),甘油三酯(血清Triglyceride™试剂盒,Sigma-Aldrich™),游离脂肪酸(NEFA-HR(2)试剂盒,Wako Chemical™,Richmond,VA),以及胆固醇(胆固醇E™试剂盒,Wako Chemical™)。通过测量血浆人C-肽(C-肽ELISA,80-CPTHU-E01.1;Alpco Diagnostics™)以及人胰岛素和胰高血糖素水平(K15160C-2;Meso Scale Discovery™,Gaithersburg,MD),来评估植入的hESC来源细胞的激素分泌。由使用EDTA作为抗凝剂的从隐静脉采集的全血,

使用Siemens DCA 200Vantage AnalyzerTM (Siemens Healthcare DiagnosticsTM, Tarrytown, NY) 测量了血红蛋白A1c (HbA1c) 水平。

[0170] 双能量x射线吸收测量法

[0171] 使用PIXImus Mouse DensitometerTM (Inside Outside SalesTM), 进行双能量x射线吸收测量法 (DEXA) 来测定身体组分。数据表示为脂肪%。

[0172] qRT-PCR

[0173] 在移植后29周, 收获群组1的TheracyteTM装置, 并且储存用于qPCR分析。下文描述了qPCR分析、人胰岛捐赠者、以及用于从植入组织分离RNA的程序。

[0174] 在组织收获时, 将TheracyteTM装置切割为两半, 并且在-80℃储存于RNA Later Stabilization SolutionTM (Life TechnologiesTM, Carlsbad, CA) 中直至使用。在将该装置置于2mL PBS中之前, 首先从装置外部去除过量的小鼠组织。切除装置的边缘, 剥离外膜, 并且将装置分离并置于400μl 含有0.1% (v/v) β-巯基乙醇的Qiagen Buffer RLT PlusTM (Qiagen Inc.TM, Valencia, CA) 中。收集PBS, 并且在2000xg下离心4min以收集任何溢出所述装置的细胞。将细胞团块再悬浮于同样的用于裂解相应装置的RLT Plus缓冲液中。使用Qiagen RNeasy Plus MiniTM试剂盒 (Qiagen Inc.TM) 分离RNA, 并且在16μl 不含核酸酶的水中洗脱。使用NanoDrop8000 (Thermo ScientificTM) 测量RNA浓度。从四个器官捐赠者 (年龄23-48岁; 男性两人以及女性两人) 获得人胰岛作为qPCR分析 (ProdoLabsTM, Irvine, CA) 的阳性对照。胰岛纯度为85-95%, 并且活力为90-95%。如之前所描述的 (Rezania et al., 2014), 使用静态葡萄糖刺激的胰岛素分泌测定, 在用高葡萄糖浓度 (数据未示出) 孵育后, 所有人胰岛制备物显示出2至4倍的人胰岛素分泌增多。

[0175] 由于装置中低量的人细胞/组织, 以及一些RNA会来自周围小鼠组织的高概率, 使用标准曲线来测量人RNA的量。首先, 使用高容量cDNA反转录 (High Capacity cDNA Reverse TranscriptionTM) 试剂盒 (Thermo Fisher ScientificTM/Life TechnologiesTM), 采用以下程序, 将所有RNA转化为cDNA: 25℃持续10分钟, 37℃持续2小时, 在4℃保存。使用对基因运行具有特异性的引物池 (表3) 和TaqMan PreAmpTM2x Master Mix (Thermo Fisher ScientificTM/Life TechnologiesTM), 采用以下循环条件来进行预扩增: 95℃ 10min, 8个循环的95℃ 15s和60℃ 4min, 99℃ 10min, 以及在4℃保存。为了测定人cDNA的量, 使用对人GAPDH和小鼠GAPDH具有特异性的引物, 并且基于由已知量的人细胞系cDNA得到的标准曲线运行, 对预扩增的cDNA进行实时PCR。使用Quant Studio 12K Flex Real Time PCRTM仪器 (Thermo Fisher ScientificTM/Life TechnologiesTM), 将16ng计算的人cDNA, 在常规TaqMan Low Density ArrayTM (Thermo Fisher ScientificTM/Life TechnologiesTM; 表3) 上运行。使用Expression SuiteTM软件 (v1.0.3, Thermo Fisher ScientificTM/Life TechnologiesTM) 分析数据, 并且使用ΔΔCt方法标准化至未分化的H1细胞。通过免疫荧光染色和图像定量来测量内源性胰β细胞和α细胞面积, 每只动物3个胰腺切片 (以至少200μm分离), 对胰岛素和胰高血糖素进行免疫染色。使用Image Xpress MicroTM Imaging SystemTM进行完整载玻片荧光扫描, 并且将图像拼接在一起, 并且使用MetaXpress SoftwareTM (Molecular Devices CorporationTM, Sunnyvale, CA) 进行分析。将β细胞或α细胞分数 (fraction) 计算为胰岛素阳性或胰高血糖素阳性面积/总胰腺面积, 然后将每只动物3个切片的平均值乘以胰腺重量。为了定量该装置内的内分泌组分, 使用Multi

Wavelength Cell Scoring™计数DAPI阳性细胞核的数量,或者通过对处理组不了解的研究者手动计数两种激素。表3列出了引物。

[0176] 表3:qPCR引物的列表

[0177]

基因名	测定ID	基因名	测定ID
ABCC8	Hs00165861_m1	MAFA	Hs01651425_s1
CHGB	Hs01084631_m1	NKX6.1	Hs00232355_m1
G6PC2	Hs01549773_m1	PAX6	Hs00240871_m1
GAPDH	Hs99999905_m1	PCSK1	Hs00175619_m1
GCG	Hs00174967_m1	PCSK2	Hs01037347_m1
GCCR	Hs01026191_g1	SLC30A8	Hs00545183_m1
IAPP	Hs00169095_m1	SST	Hs00356144_m1
INS	Hs00355773_m1	UCN3	Hs00846499_s1
ISL1	Hs00158126_m1		

[0178] 免疫荧光染色和图像定量

[0179] 移植前,将一部分分化的胰祖细胞在4%多聚甲醛(PFA)中固定过夜,然后包埋在1%琼脂糖中,然后进行石蜡包埋。在群组1中,于移植后29周收获Theractye™装置和各种组织(脂肪组织;肾周;回肠;骨骼肌;盲肠;空肠;脾脏;结肠;肾脏;胃腺性组织;十二指肠;肝脏;胃非腺性组织;心脏;肺;和睾丸),在4%PFA中固定,并且储存在70%EtOH中,然后进行石蜡包埋。通过Wax-it Histology Services™制备所有石蜡切片(5mm厚度)。如之前所描述的(Rezania et al.,2011)进行免疫荧光染色,并且表4中提供了初级抗体的详细信息。根据标准程序进行H&E染色,并且由独立的病理学者(Nova Pathology PC™)以盲法进行组织分析。

[0180] 表4:免疫荧光染色的抗体信息

[0181]

抗原	物种	来源	稀释
CK19	小鼠	Dako™; Denmark	1:100
C-肽	豚鼠	Abcam™; Cambridge, MA	1:100

[0182]

F4/80	大鼠	AbD Serotec TM ; Kidlington, UK	1:100
FGF21	兔	Abcam TM ; Cambridge, MA	1:50
胰高血糖素 (Ms)	小鼠	Sigma-Aldrich TM ; St Louis, MO	1:1000
胰高血糖素 (Rb)	兔	Cell Signaling TM ; Danvers, MA	1:500
胰岛素(GP)	豚鼠	Sigma-Aldrich TM ; St Louis, MO	1:1000
胰岛素(Rb)	兔	Cell Signaling TM ; Danvers, MA	1:100
胰岛素 (MAb1)	小鼠	Millipore TM ; Billerica, MA	1:200
MAFA	兔	Custom Antibody; Lifespan Biosciences TM ; Seattle, WA	1:1000
NKX6.1	兔	Custom Antibody; Lifespan Biosciences TM ; Seattle, WA	1:1000
NKX2.2	小鼠	Developmental Studies Hybridoma Bank TM ; University of Iowa; Iowa City, IA	1:100
PAX6	兔	Covance TM ; Princeton, NJ	1:250
PCNA	小鼠	BD Biosciences TM ; Mississauga, ON	1:100
PDX1	豚鼠	Abcam TM ; Cambridge, MA	1:1000
生长激素抑制 素(Ms)	小鼠	Sigma-Aldrich TM ; St Louis, MO	1:100
生长激素抑制 素(Rb)	兔	Sigma-Aldrich TM ; St Louis, MO	1:500
突触泡蛋白	兔	Novus Biologicals TM ; Littleton, CO	1:50
胰蛋白酶	绵羊	R&D Systems TM ; Minneapolis, MN	1:100

[0183] 统计学分析

[0184] 使用GraphPad PrismTM软件(GraphPad SoftwareTM),进行所有统计学分析。使用Fisher's LSD事后分析测试(post-hoc test),进行双向重复测量ANOVA,以便在不同的时间点比较HFD小鼠和LFD对照。使用Dunnett事后分析(post-hoc),进行单向重复测量ANOVA,以便在各个处理组中将不同时间点的值与基线水平(时间0)比较。使用Dunnett事后分析测试进行单向ANOVA,以便与10%脂肪对照多重比较,或者使用Student-Neuman-Keuls测试进行单向ANOVA,以便在多个组之间比较。通过使用Fisher's LSD事后分析测试的单向ANOVA来评估qPCR数据,以便将来自各种处理组的移植物与人胰岛或未经药物处理的HFD喂养的小鼠进行比较。使用未配对的t-测试来比较单个处理组中的移植效果(即,假处理相对于处理),并且当比较胰岛素或胰高血糖素促分泌素(葡萄糖,口服餐,精氨酸)施用前和施用后的样品时,使用配对的t-测试。以y=0作为基线,计算曲线下面积。对于ITT,使用每只动物的禁食血糖水平作为基线,计算了曲线上面积。对于所有分析,p<0.05被认为是统计学显著的。数据表示为平均值±SEM(线状图),或者表示为显示单个数据点的箱线图。

[0185] SH-1533细胞制备:S4D4IDP进一步分化直至第9天

[0186] 将S4D4IDP细胞解冻至两个500ml PBS-MINI垂直旋转器中的每一个中,每个旋转器采用400ml阶段5的解冻培养基。为了确保细胞悬浮液中DMSO的充分稀释,同时使细胞沉积在小瓶的底部,从各个小瓶吸出约3ml的低温保存培养基,然后将细胞转移至PBS-MINI旋转器。然后,将解冻培养基逐滴添加至旋转器,以便将细胞群稀释。解冻培养基由补充有以下物质的DMEM-HG培养基组成:2%KSR、1:200ITS-X、10ug/ml肝素、100nM LDN、1uM T3、5uM ALK5i、250nM SANT-1、50nM RA、10uM Y-27632和4ku/ml DNA酶。将各个容器置于设置为25RPM的BSC中的PBS-MINI基底上,并且提取2x 5ml样品进行使用细胞消化液计数法和NC100 NucleoCounter的细胞计数。然后将容器在设置为20RPM的PBS-MINI基底上的37℃ 5%CO₂孵育器中过夜培养。

[0187] 过夜培养后,将各个含有细胞的容器置于BSC中持续约5-10分钟,以允许细胞沉积至旋转器的底部。将大部分使用过的培养基从容器吸出,并且新鲜的阶段5培养基含有补充有以下物质的DMEM-HG培养基:2%KSR、1:200ITS-X、10ug/ml肝素、100nM LDN、1uM T3、5uM ALK5i、250nM SANT-1和50nM RA。将各个容器置于设置为25RPM的BSC中的PBS-MINI基底上,并且提取2x 5ml样品进行使用细胞消化液计数法和NC100 NucleoCounter的细胞计数。然后如上文所述,再次将培养物培养过夜,只是基底的速度升高至22RPM以帮助减少细胞簇的聚集。

[0188] 在培养的第3天,将培养基变换为阶段6培养基,其含有所有的阶段5组分加上添加100nM γ -分泌酶抑制剂(XX)。每天更换阶段6培养基使培养持续进行,直至S6D7完成,在该时间将细胞转移至灌注旋转器进行洗涤并等分成小份。使用旋转器烧瓶上的取样端口和10cc注射器,将细胞等分成500万个细胞/份,然后转移至1.5ml离心管以进行肾小囊移植。在环境温度下通过补充有2%KSR、1:200ITS-X和10ug/ml肝素的DMEM-HG基础培养基中的运载体(courier),将肾小囊小份立即转移至移植部位。通过FACS、PCR、IHC和相衬成像,对处于S6D7的细胞群完成了生物标志物表达检测。在移植前,从来自所有肾小囊小份的试剂和残余培养基采集无菌样品。

[0189] 图12、图13-雄性和雌性的SCID-Beige小鼠(C.B-Igh-1b/GbmsTac-Prkdc^{scid}-Lyst^{bgN7};Taconic,Hudson,NY)随意接受标准的经辐射饮食(Teklad饮食#2918-Harlan Laboratories, Madison, WI, USA),并且在研究过程中维持12h光照/黑暗循环。在7周大时,用可吸入异氟烷将所有小鼠麻醉,并且使移植接受体在左侧腹于肾小囊下接受约 5×10^6 个阶段4细胞(5M S4)、约 1×10^6 个阶段4细胞(1M S4)、或者约 1×10^6 个阶段7细胞(1M S7):5M S4雌性(N=10),5M S4雄性(N=11),1M S4雄性(N=5),1M S7雌性(N=9),1M S7雄性(N=9)。使用Rezania,A.et al.2014中描述的方法产生了分化的人ES细胞。在研究过程中两周一次或每月一次地在清晨禁食4小时后评估体重。

[0190] 图14-6周大的免疫受损的SCID Beige小鼠,在到达后使其适应环境1周。然后对动物注射单剂量190mg/kg的 β 细胞毒素链脲菌素(STZ),以诱导1型糖尿病的模式。将使用Rezania,A.et al.2014中描述的方法产生的150万个阶段7细胞,或者约6000个分离的人胰岛等同物(IEQ)移植至肾小囊下。对照小鼠既不接受STZ也不接受细胞移植。然后每周监控小鼠的4h禁食血糖水平和体重。人胰岛接受体小鼠由以下小鼠组成:除了未经STZ处理的小鼠之外,还有之前注射了STZ但恢复血糖量正常的小鼠(除了有一只高血糖的动物)。

[0191] 图15A-用于葡萄糖测量和取样的血液,来自清醒的受约束小鼠的隐静脉。为了激素检测,将血液采集在肝素化的毛细管中,在冰上转移至1.5ml管中,并且在7000rpm下旋转9min后将血细胞与血浆分开。在通过ELISA测定瘦素之前,将样品于-30℃储存。

[0192] 图15B至图17-在通过双能量X射线吸收测量法 (DEXA) 对异氟烷麻醉的小鼠进行代谢笼分析之后的那天,测量了小鼠的身体组分。通过解剖和对组织立即称重来测定脂肪垫和器官重量。

[0193] 图18-为了将冷冻储存的阶段4细胞分化至阶段6细胞,将细胞解冻至两个500ml PBS-MINI垂直旋转器的每一个中,每个旋转器有400ml阶段5解冻培养基。为了确保细胞悬浮液中DMSO的充分稀释,同时使细胞沉积在小瓶的底部,从各个小瓶吸出约3ml的低温保存培养基,然后将细胞转移至PBS-MINI旋转器。然后,将解冻培养基逐滴添加至旋转器,以便将细胞群稀释。解冻培养基由补充有以下物质的DMEM-HG培养基组成:2%KSR、1:200ITS-X、10μg/ml肝素、100nM LDN、1μM T3、5μM ALK5i、250nM SANT-1、50nM RA、10μM Y-27632和4ku/ml DNA酶。将各个容器置于设置为25RPM的BSC中的PBS-MINI基底上,并且提取2x5ml样品进行使用细胞消化液计数法和NC100 NucleoCounter的细胞计数。然后将容器在设置为20RPM的PBS-MINI基底上的37℃ 5%CO₂孵育器中过夜培养。过夜培养后,将各个含有细胞的容器置于BSC中持续约5-10分钟,以允许细胞沉积至旋转器的底部。将大部分使用过的培养基从容器吸出,并且新鲜的阶段5培养基含有补充有以下物质的DMEM-HG培养基:2%KSR、1:200ITS-X、10μg/ml肝素、100nM LDN、1μM T3、5μM ALK5i、250nM SANT-1和50nM RA。将各个容器置于设置为25RPM的BSC中的PBS-MINI基底上,并且提取2x5ml样品进行使用细胞消化液计数法和NC100 NucleoCounter的细胞计数。然后如上文所述,再次将培养物培养过夜,只是基底的速度升高至22RPM以帮助减少细胞簇的聚集。在培养的第3天,将培养基交换为阶段6培养基,其含有所有的阶段5组分加上添加100nM γ-分泌酶抑制剂(XX)。每天更换阶段6培养基使培养持续进行,直至S6D7完成,在该时间,将细胞转移至灌注旋转器进行洗涤并等分成小份。将细胞等分成小份用于移植。

[0194] 细胞移植在肾小囊下或在皮下无装置囊袋中,如Pepper,AR.et al.2015所描述。具体地,在细胞移植前4周,将2-cm段的5-弗伦奇 (Fr.) 条纹尼龙不透射线血管造影导管,经皮下植入SCID Beige小鼠的左下四分体。在肋架尾端切出4-mm侧边横向切口,以允许采用钝器解剖在切口线下方产生小袋。产生足够的空隙(1cm乘以3cm)。将导管段植入该空间,使得所述导管与中线平行地放置。将切口缝合。一旦植入,所述导管变得与血红蛋白粘着,导致形成密集血管化的组织,其表现出最低限度可见的轮廓。移植时,去除导管显露了血管化的内腔,其允许细胞移植灌注。

[0195] 采用吸入异氟烷将无装置接受体小鼠保持在麻醉状态下,并且以仰卧位放置。通过剃毛并消毒表面来准备植入的导管周围的区域。在植入导管上缘的头端,切出小的(4mm)切口以暴露导管。切开导管上缘周围的组织基质,以便收回和去除导管。然后使用移液管尖端将细胞递送至该空间中。将切口缝合。恢复之前,使接受体接受0.1mg/kg丁丙诺啡的皮下丸剂。

[0196] 对照动物在肾小囊下接受相同剂量的细胞,肾小囊下为啮齿类动物胰岛移植的标准部位。对于所有实验,将细胞合并、分批并且以随机分配移植到DL或KC部位。为了有助于KC移植,在左侧副腰肋下切出切口,并且将左肾脏送至伤口中。将肾小囊切开,并且在小囊

下切出空间,以允许使用PE-50管移植细胞。将肋下切口以两层闭合。

[0197] 以规则的间隔监控动物的体重和4小时禁食血糖。从移植后2周、6周和10周的随机喂养小鼠的隐静脉采集血液,并且通过ELISA (Alpco) 测定血浆的人C-肽。

[0198] 通过参考以下非限制性实施例,将进一步了解本发明。

实施例

[0199] 这些实施例中使用的所有代谢分析,使用经由隐静脉采集的血液样品来进行。在各个研究的过程中,定期评估清晨禁食4小时后的体重和血糖水平。对于所有其他的代谢测试,在禁食后(时间零点)以及在施用各种促分泌素后的指定时间点采集血液。使用PIXImus Mouse Densitometer™(Inside Outside Sales™,Madison,WI),进行双能量x射线吸收测量法(“DEXA”)来测定身体组分。数据表示为脂肪%。

[0200] 实施例1:在免疫缺陷小鼠中发展肥胖症和2型糖尿病(T2D)模型

[0201] 为了进行该实施例,将8至10周大的雄性SCID-beige小鼠(C.B-Igh-1b/GbmsTac-Prkdc^{scid}-Lyst^{bg}N7;Taconic™,Hudson,NY)维持在12小时光照/黑暗循环。使所有小鼠随意接受标准的经辐射饮食(Harlan Laboratories™,Teklad Diet™#2918,Madison,WI)持续2周,以便使其适应环境。将小鼠安排到4个不同的饮食方案(Research Diets™,New Brunswick,NJ,USA)之一,进行36周的研究(每种饮食n=11):1)“10%脂肪”对照饮食(D12450K-10kcal%脂肪;70kcal%碳水化合物,无蔗糖);2)“45%脂肪”饮食(D12451-45kcal%脂肪,主要为猪油;35kcal%碳水化合物);3)“60%脂肪”饮食(D12492-60kcal%脂肪,主要为猪油;20kcal%碳水化合物);或者4)“西方”饮食(D12079B-41kcal%脂肪,主要为乳脂肪;43kcal%碳水化合物,主要为蔗糖)。

[0202] 使用手持血糖仪(Lifescan™,Milpitas,California)测量血糖水平。使用以下试剂盒评估了小鼠血浆中的激素和脂质分布:瘦素(小鼠瘦素ELISA,Crystal Chem Inc.™,Downers Grove,IL),胰岛素(超灵敏小鼠胰岛素ELISA,Alpco Diagnostics™,Salem,NH),C-肽(小鼠C-肽ELISA,Alpco Diagnostics™),甘油三酯(血清Triglyceride™试剂盒,Sigma-Aldrich™),游离脂肪酸(NEFA-HR(2)试剂盒,Wako Chemical™,Richmond,VA),以及胆固醇(胆固醇E试剂盒™,Wako Chemical™)。通过测量血浆人C-肽(C-肽ELISA,80-CPTHU-E01.1;Alpco Diagnostics™)以及人胰岛素和胰高血糖素水平(K15160C-2;Meso Scale Discovery™,Gaithersburg,MD),来评估植入的hESC来源细胞的激素分泌。由使用EDTA作为抗凝剂从隐静脉采集的全血,使用Siemens DCA 200Vantage Analyzer™(Siemens Healthcare Diagnostics™,Tarrytown,NY),测量了血红蛋白A1c(HbA1c)水平。

[0203] 图1和图7显示了各种饮食的小鼠的体重增长、葡萄糖体内平衡的测量以及脂肪细胞表征。相比低脂肪饮食(LFD)对照(10%脂肪),全部的三种高脂肪饮食(HFD;45%脂肪、60%脂肪和西方)诱导了禁食体重(图1A)和血糖水平(图1B)的快速升高。此外,5天后,相对于LFD对照(图7A),全部三个HFD组中的小鼠在具有体重差异(图7B)之前已是严重葡萄糖耐受不良的。在第32天,相比LFD对照,HFD小鼠是葡萄糖耐受不良的(图7C)且明显更重的(图7D)。以45%脂肪饮食和60%脂肪饮食喂养的小鼠,在第42天是明显胰岛素抵抗的(相对于LFD对照,胰岛素施用后10分钟和60-120分钟更高的葡萄糖水平,以及减少的曲线上面积),而西方饮食小鼠仅在胰岛素施用后10分钟显示出明显胰岛素抵抗(图1E)。

[0204] 所有HFD组中的小鼠均发展了葡萄糖耐受不良(第47天,图1C),并且具有不同于LFD对照的胰岛素分泌动力学(无葡萄糖诱导的胰岛素分泌,或者改变的峰值胰岛素水平的时机;图1D)。相比LFD对照,所有HFD小鼠明显超重(图1A),并且具有增加的体脂肪率(图1F);以45%脂肪饮食和60%脂肪饮食喂养的小鼠,也具有显著升高的循环瘦素水平(图1G)。暴露于HFD引起血脂异常,包括相比LFD对照,所有HFD喂养小鼠的显著降低的血浆游离脂肪酸水平(图7E),45%脂肪和60%脂肪组中降低的甘油三酯水平(图7F),以及西方饮食组中升高的胆固醇水平(图7G)。免疫缺陷小鼠中HFD诱导的代谢缺陷与脂肪组织中的巨噬细胞浸润(标志为F4/80免疫反应性)无关,而在ob/ob小鼠(T2D的免疫正常模型)的附睾脂肪中观察到了F4/80阳性冠状结构的明显积累(显微图未示出)。针对来自以10%脂肪饮食或60%脂肪饮食喂养36周的实施例1小鼠和ob/ob小鼠的附睾脂肪,进行了免疫荧光染色,其中F4/80和FGF21分别为巨噬细胞和脂肪细胞的标志物。

[0205] 实施例2:由人胚胎干细胞体外生成胰腺内分泌祖细胞

[0206] 将人胚胎干细胞系H1的细胞(WA01细胞,WiCell Research Institute™,Madison,WI),作为单个细胞以 1×10^5 个细胞/ cm^2 接种至mTeSR-1™(Stem Cell Technologies™,Vancouver,BC;Cat.no.05850)中由1:30稀释的MATRIGEL™(Becton Dickinson BioSciences™,Franklin Lakes,NJ;Catalogue(“Cat.”)No.356231)涂布的皿上。在约70–80%汇合时,将H1细胞培养物用不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的1X Dulbeccos磷酸盐缓冲盐水(Invitrogen™,Carlsbad,CA;Cat.No.14190)洗涤,然后在室温下用0.02%Versene™(“EDTA”)(Lonza™,Walkersville,MD;Cat.No.17-711E)孵育12min。用mTeSR-1™洗涤释放的单个细胞,并且在1000rpm下旋转5min。将得到的细胞团块再悬浮于补充有 $10\mu\text{M}$ 的ROCK抑制剂Y-27632™(Sigma-Aldrich™,St.Louis Missouri;Cat.No.Y0503)的mTeSR-1™培养基中,并且以约 1.3×10^5 个细胞/ cm^2 接种单细胞悬浮液。每天喂养培养物,并且在接种后48hr开始分化,导致约90%起始汇合。使用以下方案使培养物分化。

[0207] 阶段1(3天):使接种在MATRIGEL™涂布表面上的未分化的H1细胞(90%汇合)接触补充有 1.2g/L 碳酸氢钠(Sigma-Aldrich™,Cat.No.S6297)、0.2%胎牛血清(“FBS”)(Hyclone™,South Logan,UT;Cat.No.SH30071.02)、 100ng/mL 活化素A(“AA”)(Peprotech™,Rocky Hill,NJ;Cat.No.338-AC-010)和 20ng/mL Wnt3A(R&D Systems, Inc.™,Minneapolis,MN;Cat.No.5036-WN)的RPMI 1640™培养基(Invitrogen™,Cat.No.22400),仅持续第1天。在之后的两天,将细胞在具有0.5%FBS、 1.2g/L 碳酸氢钠和 100ng/mL AA的RPMI中培养。

[0208] 阶段2(3天):将阶段1细胞在补充有 2g/L 碳酸氢钠、2%FBS和 50ng/mL FGF7(Peprotech™,Cat.No.100-19)的DMEM-F12培养基(Invitrogen™(Gibco™);Cat.No.10565-018)中培养3天。

[0209] 阶段3(4天):将阶段2细胞在补充有 $0.25\mu\text{M}$ SANT-1(N-[3,5-二甲基-1-苯基-1H-吡唑-4-基]亚甲基]-4-(苯基甲基)-1-哌嗪胺)(Sigma-Aldrich™,Cat.No.S4572)、 $2\mu\text{M}$ 视黄酸(“RA”)(Sigma-Aldrich™,Catalog No.R2625)、 100ng/mL Noggin™(R&D Systems™,Cat.No.6057-NG)和1%(v/v) B27(Invitrogen™(Gibco™),Cat.No.17504-044)的DMEM-HG(高葡萄糖)培养基(Invitrogen™.Cat.No.10569-044)中培养。

[0210] 阶段4(5天):将阶段3细胞在补充有 $0.1\mu\text{M}$ 2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-

基)-1,5-萘啶(“ALK5抑制剂II”,“ALK5i”)(Axxora™,San Diego,CA;Cat.No.ALK-70-445)、100ng/mL头蛋白、500nM(2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(三氟甲基)苯基)-2,4-戊二烯酰基氨基)苯并内酰胺(“TPB”)(Shanghai ChemPartner Co.,LTD™,China)和1%B27的DMEM-HG培养基中培养4天。在培养的最后一天,将细胞在37℃用5mg/mL Dispase™处理5min,然后轻缓地移液以将细胞打碎呈细胞簇(<100μm)。将细胞簇转移至聚苯乙烯125-500ml Spinner Flask (Corning™)中,并且在含有补充有0.2μM ALK5i、100nM(6-(4-(2-(哌啶-1-基)乙氧基)苯基)-3-(吡啶-4-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶,盐酸盐)) (“LDN”)BMP受体抑制剂(Stemgent™,San Diego,CA;Cat.No.04-0074)和1%B27的DMEM-HG的悬浮液中以80-100rpm旋转过夜。

[0211] 如(图2)所示出的,通过荧光激活流式细胞计数(“FACS”)和免疫荧光染色(显微图未示出)评估得到的胰腺内分泌前体细胞。如Diabetes,61,2016,2012所描述,并且使用表5中列出的抗体来进行FACS染色。简言之,在37℃将细胞在TrypLE™Express (Life Technologies™,Catalog No.12604)中孵育3至5分钟,并且释放成为单细胞悬浮液,之后将它们用含有0.2%BSA的PBS染色缓冲液(BD Sciences™,Cat.No.554657)洗涤两次。将细胞(1×10^5 个至 1×10^6 个)再悬浮于100μl 0.5%人γ球蛋白的阻断缓冲液中,其以1:4稀释于染色缓冲液以进行表面标记。以1:20的最终稀释向细胞添加直接缀合的初级抗体,然后在4℃孵育30分钟。将经染色的细胞在染色缓冲液中洗涤两次,然后再悬浮于200μl染色缓冲液中,然后在15μl 7-AAD中孵育以进行生存/死亡区分,之后在BD Canto II上进行FACS分析。通过首先在4℃用Green Fluorescent LIVE/DEAD细胞染料(Life Technologies™,Cat.No.L23101)孵育20分钟,然后在冷的PBS中单次洗涤来完成细胞内抗体染色。将细胞固定在250μl Cytofix/Cytoperm™缓冲液(BD Sciences™,Cat.No.554723)中,然后将细胞再悬浮于含有2%常规山羊血清的100μl Perm™洗涤缓冲液染色/阻断溶液中。将细胞在4℃以经验性预先确定的稀释度与初级抗体孵育30分钟,然后在Perm/Wash缓冲液中洗涤两次。然后将细胞在4℃与适当的抗体孵育30分钟,然后洗涤两次,之后在BD FACS Canto II™上进行分析。表5示出了所使用抗体的浓度。使用人胰岛或未分化的HI细胞作为阳性对照,测试了胰腺标志物的抗体的特异性。对于二级抗体,添加以下物质并且在4℃孵育30分钟:1:500的抗-小鼠Alexa Fluor™647 (Life Technologies™),1:200(v)的山羊抗-兔PE,或者1:800的驴抗-山羊Alexa 647™(Life Technologies™),然后在perm Wash缓冲液中进行最终的洗涤,并且使用获取了至少30,000个事件的BD FACS Diva Software™,在BD FACS Canto II上进行分析。

[0212] 体外分化后,98.8%的细胞表达了PDX1,并且71.7%表达了NKX6.1(图8A、8C、8D和8G),即胰内胚层的两种关键标志物。约20%的PDX1阳性细胞处于细胞周期中,如Ki67或PCNA表达所表明(图8A和8D),并且未检测到多能性标志物OCT3/4(图8A)。尽管约16%的祖细胞表达了内分泌标志物(图8A和8B),但只有2.8%的突触泡蛋白阳性细胞共表达了NKX6.1(图8A),并且大部分为多激素的(图8F),表明未成熟的内分泌细胞群。在分化的该阶段,胰岛素/C-肽阳性细胞仅很少地共表达PAX6(图8E)或NKX6.1(图8C)。

[0213]

表 5. 用于 FACS 分析的抗体列表			
抗原	物种	来源/目录号	稀释
胰高血糖素	小鼠	Sigma-Aldrich™ /G2654	1:250
胰岛素	兔	Cell Signaling Technology Inc.™, Danvers, MA/3014B	1:10
NKX6.1	小鼠	Developmental Studies Hybridoma Bank™ Iowa City, Iowa/F55A12	1:50
NKX2.2	小鼠	Developmental Studies Hybridoma Bank/74.5A5	1:100
PDX1	小鼠	BD Biosciences™, San Jose, CA/562161	1:50
Ki67	小鼠	BD Biosciences™, 558595	1:20
Pax6	小鼠	BD Biosciences™, 561552	1:20
嗜铬粒蛋白 A	兔	Dako, Carpinteria™, CA/A0430	1:40
ISL-1	小鼠	BD Biosciences™, 562547	1:20
NeuroD	小鼠	BD Bioscience™, 563001	1:40
FOXA2	小鼠	BD Bioscience™, 561589	1:80
OCT3/4	小鼠	BD Biosciences™, 560329	1:20

[0214] 实施例3:暴露于HFD不影响hESC来源的内分泌细胞的体内功能

[0215] 按照以下步骤,将实施例2的胰腺内分泌前体细胞包封在20μl TheraCyte™宏观封装装置(TheraCyte Inc.™, Laguna Hills, CA)中。将约 5×10^6 个内分泌前体细胞(处于细胞簇形式)置于容积式移液管中。使用轻微的压力,将含有细胞的毛细管尖端/活塞尖端紧贴地置于24号导管的中心内,并且使细胞从容积式移液管通过导管分配至装置中。使用钛倒钩来密封装置。然后将经包封的胰腺内分泌前体细胞经皮下移植到来自4个饮食方案中每个方案的7只SCID-beige小鼠中。用可吸入异氟烷将所有小鼠麻醉,并且使移植接受体在右侧腹经皮下接受约 5×10^6 个胰腺内分泌前体细胞。使4只假处理小鼠接受相同的手术程序,但不植入宏观封装装置。

[0216] 移植后,胰腺内分泌前体细胞在体内进一步分化,并且从所有饮食组得到的细胞于基础条件和喂养条件下在8至20周分泌了类似水平的人C-肽(图2A),并且在18周产生了强的葡萄糖刺激的人C-肽分泌(图2B、C)。类似地,通过在24周于所有饮食组中的精氨酸刺激来诱导人胰岛素分泌(图2D)。观察到了HFD组中的基础胰高血糖素分泌增多的趋势,但是因为LFD组中五分之四的小鼠具有不可测的禁食胰高血糖素水平,不可能进行统计学分析

(图2E)。精氨酸刺激的胰高血糖素水平在饮食组之间是类似的(图2E、F),并且预计约一半的循环胰高血糖素可以来源于hESC来源的细胞,如移植的与假处理的胰高血糖素水平之间的差异所表明(图2F)。

[0217] 在组织收获时将Theracyte™装置切割为两半,并且在-80℃储存在RNAlater Stabilization Solution™(Qiagen, Inc.™, Valencia, CA; Cat.No.76106)中直至使用。在将装置置于2mL PBS之前,首先从装置外部去除过量的小鼠组织。切除装置的边缘,剥离外膜,并且将装置分离并置于400μl含有0.1% (v/v) β-巯基乙醇的Qiagen™Buffer RLT Plus (Qiagen Inc.™, Cat.No.79216)中。收集PBS,并且在2000xg下离心4min以收集任何溢出所述装置的细胞。将细胞团块再悬浮于同样的用于裂解相应装置的RLT Plus缓冲液中。使用Qiagen RNeasy Plus Mini™试剂盒(Qiagen Inc.™; Cat.No.74316)分离RNA,并且在16μl不含核酸酶的水中洗脱。使用NanoDrop8000™(Thermo Scientific™)测量RNA浓度。

[0218] 从四个器官捐赠者(年龄23-48岁;男性两人以及女性两人)获得人胰岛作为阳性对照,用于定量聚合酶链反应(“qPCR”)分析(Prodo Labs; Irvine, CA)。胰岛纯度为85-95%,并且活力为90-95%。使用静态葡萄糖刺激的胰岛素分泌测定,用高葡萄糖浓度(数据未示出)孵育后,所有人胰岛制备物显示出2至4倍的人胰岛素分泌增多。简言之,将人胰岛细胞(约20至50个胰岛细胞)用Krebs缓冲液(在去离子水中的129mM NaCl、4.8mM KCl、2.5mM CaCl₂、1.2mM MgSO₄、1mM Na₂HPO₄、1.2mM KH₂PO₄、5mM NaHCO₃、10mM HEPES和0.1% BSA,然后无菌过滤)洗涤两次,然后在Krebs缓冲液中预孵育40min。然后将细胞在掺有3.3mM葡萄糖的Krebs缓冲液中孵育60min。然后将细胞转移至含有掺有16.7mM葡萄糖的Krebs缓冲液的另一个板,并孵育另外的60min。在每个孵育期后收集上层清液样品,并且在-70℃冷冻用于人C-肽ELISA(Mercodia™, Winston-Salem, NC; Cat.No.10-1141-01)测量。

[0219] 由于装置中低量的人细胞/组织,以及一些RNA会来自周围小鼠组织的高概率,使用标准曲线来测量人RNA的量。首先,使用High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™(Thermo Fisher Scientific™/Life Technologies™),采用以下程序,将所有RNA转化为cDNA:25℃持续10分钟,37℃持续2小时,在4℃保存。使用对基因运行特异性的引物池(表3)和TaqMan PreAmp 2x Master Mix™(Thermo Fisher Scientific™/Life Technologies™),采用以下循环条件来进行预扩增:95℃ 10min,8个循环的95℃ 15s和60℃ 4min,99℃ 10min,以及在4℃保存。

[0220] 为了测定人cDNA的量,使用对人GAPDH和小鼠GAPDH特异性的引物,并且基于由已知量的人细胞系cDNA得到的标准曲线运行,对预扩增的cDNA进行实时PCR。使用Quant Studio 12K Flex Real Time PCR™仪器(Thermo Fisher Scientific/Life Technologies),将16ng计算的人cDNA在常规TaqMan Low Density Array™(Thermo Fisher Scientific™/Life Technologies™;表3)上运行。使用Expression Suite™软件(v1.0.3, Thermo Fisher Scientific™/Life Technologies™)分析数据,并且使用ΔΔCt方法标准化至未分化的H1细胞。

[0221] 移植前,将一部分胰腺内分泌前体细胞在4%多聚甲醛(“PFA”)中固定过夜,然后包埋在1%琼脂糖中,然后进行石蜡包埋。在移植后29周收获Theracyte™装置以及各种组织(如上述表3所列),在4%PFA中固定,并且储存在70%乙醇中,然后进行石蜡包埋。通过Wax-it Histology Services™(Vancouver, BC)制备所有的石蜡切片(5μm厚度)。上文表4中提供

了初级抗体。使用标准程序进行了苏木精 (Hemotoxyline) 和曙红 (“H&E”) 染色, 并且由独立的病理学者 (Nova Pathology PC™, Bellingham, WA, USA) 以盲法进行了组织分析。

[0222] 移植后29周, 相比人胰岛, 经包封的hESC来源移植物具有类似的或显著更高的胰岛相关基因水平, 并且在不同的LFD组或HFD组之间不存在显著的差异 (未示出数据-CHGB; INS; CGC; SST; NKX6.1; PAX6; ISL1; MAFA; ABCC8; IAPP; PCSK1; PCSK2; GCGR; G6PC2; SLC30A8; 以及UCN3)。特别地, 当与人胰岛相比时, 在经包封的hESC来源移植物中基因CHGB、INS、CGC、SST、MAFA和PCSK1具有类似的基因表达 (即, 对于10%脂肪; 45%脂肪; 60%脂肪和西方饮食)。然而, 当与人胰岛比较时, 经包封的hESC来源移植物中的NKX6.1、PAX6、ISL1、ABCC8、IAPP、PCSK2、GCGR、G6PC2、SLC30A8和UCN3基因表达 (即, 对于10%脂肪; 45%脂肪; 60%脂肪和西方饮食), hESC来源移植细胞通常具有比人胰岛明显更高的基因表达水平。

[0223] 收获的装置中大多数的细胞是对内分泌标志物突触泡蛋白有免疫反应性的, 并且有一小部分表达了导管标志物CK19; 很少观察到胰蛋白酶阳性外分泌细胞 (显微图未示出)。移植物主要由表达胰岛素、胰高血糖素或生长激素抑制素的细胞组成, 并且饮食组之间单激素胰岛素阳性细胞和单激素胰高血糖素阳性细胞的百分比是相似的 (图3)。注意到, 相比LFD移植物, HFD移植物中有较少、但明显更高百分比的细胞对胰岛素和胰高血糖素均有免疫反应性 (图3)。除了这些少量的多激素细胞之外, 暴露于HFD通常似乎不影响hESC来源胰岛素分泌细胞的成熟状态; 在所有移植接受体中, 大多数的胰岛素阳性细胞在移植后29周共表达了PDX1、NKX2.2、NKX6.1和MAFA (显微图未示出)。

[0224] 实施例4: hESC来源的胰岛素分泌细胞改善了饮食诱导的血糖代谢障碍和胰岛素抵抗

[0225] 在移植后18周和24周, 在清晨禁食6小时并且通过口服灌胃或腹膜内 (“i.p.”) 注射 (2g葡萄糖/kg体重, 30%溶液; Vétoquinol™, Lavaltrie, QC) 施用葡萄糖后, 进行了葡萄糖耐受测试 (“GTT”)。在禁食过夜和腹膜内注射葡萄糖 (2g/kg) 后, 评估了来自植入细胞的葡萄糖刺激的人C-肽分泌。在移植后22周, 在清晨禁食4小时并且施用人合成胰岛素 (0.7IU/kg体重; Novolin ge™ Toronto, Novo Nordisk™, Mississauga, Canada) 后, 进行了胰岛素耐受测试 (“ITT”)。对于每月混合餐刺激, 小鼠在禁食过夜 (约16小时) 后, 接受口服灌胃的Ensure™ (8uL/g体重; Abbott Laboratories™, Abbott Park, Illinois, USA)。对于精氨酸耐受测试 (“ArgTT”), 小鼠在清晨禁食4小时后接受精氨酸的腹膜内注射 (2g/kg, 40%溶液; Sigma-Aldrich™)。

[0226] 在研究期间, 相比LFD对照, 在禁食条件下所有HFD组持续地超重和高血糖。相比假手术, 经包封的细胞的移植不影响体重或禁食血糖水平 (数据未示出)。然而, 在单独的移植后, 观察到了由HbA1C测量的长期血糖控制的显著改善 (图4A和4B)。在12周和24周, 相比LFD假处理对照, 所有HFD假处理小鼠的HbA1C水平升高, 并且在两种年龄中, 45-60%脂肪组中通过移植显著降低了所述HbA1C水平 (图4A和4B)。在20周, 45-60%脂肪饮食的移植接受体, 在混合餐刺激后比假处理小鼠也显示出了明显更低的葡萄糖偏移 (图4C), 并且在移植后24周, 所有HFD移植接受体具有显著改善的葡萄糖耐受 (图4E, 图9B); 在18周这些改善还不明显 (图4D, 图9A)。在24周, 45-60%组的葡萄糖耐受未完全改善, 但西方组的移植接受体具有与对照不能区分的曲线下面积 (图4E; 图9B)。还观察到在22周, 相比假处理小鼠, 经移植的HFD喂养小鼠的胰岛素敏感性显著改善了 (图4F; 图9C和9D), 其可以有助于改善HFD移植接

受体中的葡萄糖耐受(图4E)。

[0227] 为了测量内源性胰β细胞和α细胞面积,每只动物3个胰腺切片(以至少200μm分离)对胰岛素和胰高血糖素进行免疫染色。使用ImageXpress Micro Imaging System™进行完整载玻片荧光扫描,并且将图像拼接在一起,并且使用MetaXpress Software™(Molecular Devices Corporation™, Sunnyvale, CA)分析。将β细胞或α细胞分数计算为胰岛素阳性或胰高血糖素阳性面积/总胰腺面积,然后将每只动物3个切片的平均值乘以胰腺重量。为了定量装置内的内分泌组分,使用MetaXpress™中的Multi Wavelength Cell Scoring™模块,计数DAPI阳性细胞核的数量,并且通过对于处理组不了解的研究者手动计数对胰岛素、胰高血糖素或这两种激素有免疫反应性的细胞的数量。

[0228] 相比LFD假处理对照,所有60%脂肪饮食的小鼠中的β细胞质量明显更高,并且在任一饮食组中假处理小鼠和经移植的小鼠之间不存在差异(图10A)。HFD对于α细胞质量无影响,但观察到相比LFD假处理,LFD移植接受体的α细胞质量显著减小(图10B)。任一饮食的小鼠的胰腺中,胰岛素阳性面积与胰高血糖素阳性面积的比不存在显著差异(图10C)。

[0229] 实施例5:单独的细胞疗法对肥胖症表型无作用

[0230] 虽然经包封的hESC来源细胞改善了HFD喂养小鼠的葡萄糖体内平衡,但不存在对肥胖症表型的明显作用。在研究结束时(移植后29周和饮食后36周),相比LFD假处理小鼠,45-60%脂肪饮食的小鼠(假处理的和处理的)具有明显更高的体重、体脂肪率(附睾脂肪垫重量在体重的占比)和循环瘦素水平(图10D-10F)。在前7周期间,西方饮食小鼠中的肥胖症表型是更加不明显的(图1A),并且在研究结束时在西方喂养小鼠(假处理和处理)与LFD假处理对照之间不存在体重、体脂肪率或瘦素水平的显著差异(图10D-10F)。相比LFD对照,所有HFD组具有明显更高的肝脏重量(图10G)和胞质空泡化的证据,与肝脏中的膳食脂肪沉积一致(未示出)。相比假处理,以45-60%脂肪饮食喂养的移植接受体具有明显减轻的肝脏重量(未示出),尽管病理学评估没有揭示H&E染色的肝脏切片中胞质空泡化的差异(未示出)。类似地,在来自所有HFD组的肾脏切片中,观察到了肾小管上皮细胞的空泡化(与膳食脂肪沉积一致),并且细胞移植对这种表型没有作用。其他的组织疾病(脂肪组织;肾周;回肠;骨骼肌;盲肠;空肠;脾脏;结肠;肾脏;胃腺性组织;十二指肠;肝脏;胃非腺性组织;心脏;肺;和睾丸)与自发的年龄和性别相关性事件一致,并且被认为与暴露于饮食或细胞移植无关。

[0231] 实施例6:使用胰腺内分泌前体细胞移植和抗糖尿病药物的联合治疗,改善了饮食诱导的肥胖症和葡萄糖耐受

[0232] 将小鼠置于10%脂肪对照饮食(D12450K;n=8)持续一个研究周期,或者置于60%脂肪饮食(D12492;n=64)持续6周,然后在剩余的研究中进行以下治疗方案之一(每组n=16):1) 60%脂肪饮食,无药物(D12492);2) 定制的含有罗格列酮的60%脂肪饮食(每天18mg/kg饮食或者约3mg/kg体重;Cayman Chemical™, Ann Arbor, MI; Research Diets™定制饮食配方D08121002);3) 定制的含西他列汀的60%脂肪饮食(每天4g/kg饮食或约750mg/kg体重;磷酸西他列汀一水合物,BioVision Inc.™, Milpitas, CA; Research Diets™定制饮食配方D08062502R);或者4) 于饮用水中的60%脂肪饮食(D12492)和甲福明(每天1.25mg/mL或约250mg/kg体重;1,1-二甲双胍盐酸盐,Sigma-Aldrich™)。上文表2中总结了处理组。小鼠在HFD施用后迅速发展了T2D的属性(图11)。

[0233] 在移植时(药物施用后1周),所有HFD喂养小鼠明显比LFD对照更重(图5F)。在移植

后前2周内,观察到了施用抗糖尿病药物的HFD喂养小鼠的体重减轻(图5C、5D和5E)。相反,该期间在未经药物处理的HFD移植接受体(图5B)或施用任何药物的假处理小鼠(图5A-E)中,未观察到体重变化。相比假处理小鼠,所有接受抗糖尿病药物的移植接受体在第75天具有明显更低的体重(图5F),以及减轻的附睾脂肪垫重量(相对于体重;图5G),使得没有参数不同于LFD喂养假处理对照。在未经药物处理的HFD喂养小鼠中,移植对于体重(图5B和F)或循环瘦素水平(图5H)没有作用,尽管我们观察到了该群组中相对附睾脂肪垫重量的减轻(图5G)。细胞移植与甲福明或西他列汀的结合,导致了比它们各自的假处理对照显著降低的循环瘦素水平(图5G)。细胞疗法对于在罗格列酮组中恢复瘦素水平没有作用(图5G)。

[0234] 对于体重,胰祖细胞移植与T2D小分子治疗的联合疗法中似乎存在一些“协同作用”,因为任一种单独的治疗均不具有对体重的作用(参见图5A和5B)。类似地,在移植后12周,任一种单独的治疗均不具有对葡萄糖耐受的作用(参见图6A和6B),而测试的联合疗法引起了血糖和体重的显著改善。因此,联合疗法的作用大于单独治疗的总和。唯一的例外是西他列汀,其自身展现出葡萄糖耐受轻度的减少。

[0235] 在该研究期间,禁食血糖水平不受任何联合疗法的影响(数据未示出)。在移植后12周,不管经怎样的药物处理,相比LFD对照,所有HFD假处理组中的小鼠是葡萄糖耐受不良的(图6A)。在移植后12周,在未经药物处理的HFD喂养小鼠中,细胞疗法对葡萄糖耐受无作用(图6B),并且同样地,与罗格列酮的组合在该时间也是无效的(图6E)。在移植后12周,当与甲福明处理(图6C)或西他列汀处理(图6D)结合时,细胞疗法显著改善了葡萄糖耐受。口服葡萄糖刺激期间的血糖控制,在LFD对照与接受西他列汀和细胞疗法的HFD喂养小鼠之间是不能区分的,仅有的例外是灌胃后15分钟略微更高的峰值葡萄糖水平(图6D)。移植后16周,在来自经甲福明和西他列汀处理的小鼠的细胞移植接受体中,相比它们各自的假处理对照,改善的葡萄糖耐受与显著降低的禁食小鼠C-肽水平有关(图6G),该效果在4周时还不明显(图6F)。葡萄糖耐受的改善与hESC来源的移植物的功能差异无关。在16周,所有移植接受体显示出强的葡萄糖响应性人C-肽分泌,并且在使用不同的抗糖尿病药物处理的HFD喂养小鼠之间,人C-肽水平不存在差异(图6G)。

[0236] 实施例7:雄性和雌性小鼠中阶段4(S4)和阶段7(S7)细胞移植的比较

[0237] 将阶段4细胞—胰祖细胞(与上述实施例中的那些细胞类似),与进一步分化的胰腺内分泌细胞—阶段7细胞相比较,将两者植入常规饮食的正常、健康的雄性或雌性小鼠。移植后,在禁食4小时(图12)和禁食过夜(图13)后,比较了小鼠的体重。在这些研究中,不论是在4hr禁食后(图12),还是在禁食过夜后(图13),接受阶段7细胞的小鼠比接受阶段4细胞的小鼠更倾向于体重减轻。因此,对于减少体重增长,一些阶段7细胞可以是略微更优选的。

[0238] 实施例8:小鼠中的阶段7(S7)细胞移植与人胰岛细胞移植的比较

[0239] 移植前在糖尿病的(即,给予STZ)或非糖尿病的(即,未给予STZ)小鼠中,比较了阶段7细胞和人胰岛细胞,其中在移植后比较了体重(图14A)和血糖(图14B)。然而,不存在给予STZ但未经移植的对照。接受细胞移植的动物倾向于比对照动物增长更少的重量(图14A)。如图14B所示,那些接受移植的动物似乎更能够将移植后血糖调节至类似于对照小鼠。然而,如预计的,相比人胰岛处理小鼠(即,处理后约15天),S7处理小鼠具有更大的时间延迟(即,处理后约120天)。重要的是注意到,S7接受体在约100天具有正常的葡萄糖,并且其后不久比对照(低血糖的)实际更低,与人胰岛接受体的葡萄糖类似。所达到的血糖水平

对于小鼠而言是低血糖的,但是由于人天然具有更低的血糖水平,并且由于经移植的细胞是人细胞,对于人而言不会认为该血糖水平是低血糖的。可能的是,较低的血糖水平反应了这样的事实:我们正在移植具有比小鼠更低的葡萄糖水平设定点的人细胞。或者或另外,其还可以反应移植了过量数量的细胞的事实。

[0240] 当针对图14A和14B中研究的相同动物,比较小鼠瘦素水平时(图15A),经移植小鼠(阶段7或人胰岛)中的瘦素水平一致地比对照低。瘦素通常与脂肪质量成比例,并且当通过DEXA测量脂肪质量时,人胰岛和阶段7细胞均具有更低的脂肪质量(图15B)。类似地,当在对照、人胰岛处理小鼠和阶段7细胞处理小鼠之间比较身体组分时,处理小鼠一致地具有更低的瘦体质量(图16A)、脂肪质量(图16B)和身体脂肪%(图16C)。

[0241] 类似地,当在处死时采集的肾周组织(图17C)、附睾组织(图17D)、肠系膜脂肪(图17E)以及所有脂肪垫(图17F)中,比较阶段7经移植细胞与人胰岛移植或对照细胞时,图17A-D示出了减轻的脂肪重量。(注意,对于人胰岛 $n=5$,其中包括接受STZ的4只小鼠和未接受STZ的1只小鼠)。因此,在糖尿病模型小鼠中,对于减少脂肪,阶段7人胰祖细胞的移植似乎比人胰岛细胞更有效。在图17A中,示出了左肾和右肾的数据,并且注意到相对于右肾的左肾周围的肾周脂肪(除了对照,“右”肾标记为“人胰岛处理”或“阶段7处理”),并且当右肾和左肾的数据合并时,图表上的柱指定为“两侧”。在接受胰岛或阶段7细胞的小鼠中,将细胞植入右肾,除了在对照中,右肾观察到比左肾更多的脂肪累积。很可能我们观察到植入细胞的肾周围有更多的脂肪累积,因为我们推测存在胰岛素的局部累积,而胰岛素是生脂的。

[0242] 因此,人胰岛和人阶段7细胞的移植可以引起体重减轻。存在一些接受胰岛移植随后体重减轻的T1D患者的报导。这假定是由于手术、抑制免疫力的药物和/或生活方式改变。然而,体重减轻有可能是由于胰岛细胞自身。已经发现人胰岛和分化的人干细胞均产生胰高血糖素样肽-1(GLP-1)。GLP-1是肠降血糖素(即,代谢激素),已知其增加由胰 β 细胞释放的胰岛素的量,并且可以随后降低血糖。此外,当注射至动物或人体内时,GLP-1可以引起体重减轻,并且现在被用作T2D患者的药物。在这些患者中,已报导了体重减轻。

[0243] 并且,当细胞移植结合药物西他列汀时,观察到了最多的体重减轻(参见图5D)。西他列汀是已知的二肽基肽酶-4(DPP-4)的抑制剂,所述二肽基肽酶-4降解GLP-1并使其失活。因此,有可能细胞减少体重增长的一个机制是通过产生GLP-1,并且这种影响通过用西他列汀稳定GLP-1来增强。

[0244] 实施例9:小鼠中阶段7(S7)宏观包封的细胞移植的比较

[0245] 目前,包封被推荐为避免临床设置中的免疫反应的最佳方式。然而,这一点还不能确定,因为我们不能在动物模型中通过实验证实(我们使用的由TheraCyte制造的宏观包封装置,不能防止异种移植排斥)。由ViaCyte发布的早期结果表明,他们的类似装置可以在患者体内起作用。注意,虽然阶段4祖细胞在这些装置中可很好地工作,但不确定进一步成熟分化的细胞(即,阶段 >4)是否会存活。实际上胎儿胰岛相对于成熟胰岛的研究已经显示,胎儿胰岛(类似于阶段4细胞)在TheraCyte装置中存活、成熟并起作用,而成人胰岛具有低的存活率(Lee, SH. et al. 2009)。因此,可以预计来自更进一步分化方案的更类似胰岛的细胞,也不会很好地起作用。然而,最近我们得到的数据证明,阶段7细胞确实可以在这些宏观包封装置中存活并起作用(参见图19和20)。

[0246] 虽然我们测试了宏观包封,其他研究人员也在研究微观包封作为替代的策略(参

见例如,Vegas,AJ.et al.2016)。除了包封之外,也研究了诱导免疫耐受作为避免体内免疫反应的策略(Szot,GL.et al.2015)。还有待确定是否这是临床相关的方法。

[0247] 每周的禁食血糖和体重监控显示出,任何组的动物的平均重量或血糖之间不存在差异(参见图18B和18C)。然而,当比较无装置和肾小囊(KC)植入的小鼠中的阶段4细胞移植和阶段6细胞移植时,在移植的10周内,在S6KC细胞中的C-肽水平明显更高(参见图18A)。

[0248] 移植后的移植物检索以及之后的免疫组织化学分析显示出,图19和20中使用的TheraCyte装置主要包含的看来是内分泌细胞(突触泡蛋白阳性)。细胞显示运作良好,并具有良好的葡萄糖响应性C-肽产生。

[0249] 虽然本文公开了本发明的各种实施方案,但可以根据本领域技术人员的公知常识在本发明的范围内进行许多改编和修改。这些修改包括本发明任何方面的已知等同物的替代,以便以基本相同的方式得到相同的结果。数值范围包含限定该范围的数值。词语“包含(comprising)”在本文用作开放式的术语,基本等同于短语“包括但不限于”,并且词语“包含(comprises)”具有相应的含义。如本文使用的,单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“所述(the)”包括复数指代物,除非上下文中另外明确指明。因此,例如,提及“一个事物”包括多于一个的该事物。本文中文献的引用并非是承认这些文献是本发明实施方案的现有技术。本发明包括实质上如上文描述并参考所述实施例和附图的所有实施方案和变形。

[0250] 参考文献

[0251] Agulnick,A.D.et al.“Insulin-Producing Endocrine Cells Differentiated In Vitro From Human Embryonic Stem Cells Function in Macroencapsulation Devices In Vivo”Stem Cells Trans Med(2015)2015 4(10):1214-1222.

[0252] Agulnick,A.D.et al.International Application W0/2014/160413.

[0253] Bruin,JE,Rezania A,Xu J,Narayan K,Fox JK,O'Neil JJ,Kieffer TJ.“Maturation and function of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors in macroencapsulation devices following transplant into mice.”Diabetologia(2013)56(9):1987-98.

[0254] Bruin,JE,Erener S,Vela J.et al.“Characterization of polyhormonal insulin-producing cells derived in vitro from human embryonic stem cells.”Stem Cell Res.(2014)12(1):194-208.

[0255] Bruin,JE,Saber N,Braun N.et al.“Treating diet-induced diabetes and obesity with human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitor cells and antidiabetic drugs.”Stem Cell Reports(2015)4(4):605-620.

[0256] D'Amour,KA.et al.“Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm”Nature Biotechnology(2005)23:1534-1541.

[0257] D'Amour,KA.et al.“Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells.”Nature Biotechnology(2006)24(11):1392-401.Epub 2006Oct 19.

[0258] Fung,R.and Fryer B.U.S.Patent Application Publication No.2011/0104805.

[0259] Gafni,O.et al.“Derivation of novel human ground state naive

pluripotent stem cells.”Nature (2013) 504:282-286.

[0260] Heit,JJ.,et al.“Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta cell growth and function.”Nature (2006) 443 (7109) :345-349.

[0261] Kahraman,S.et al..“Maternal insulin resistance and transient hyperglycemia impact the metabolic and endocrine phenotypes of offspring.”AJP:Endocrinology and Metabolism(2014) 307 (10) :E906.

[0262] Kelly,OG.et al.“Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells.”Nature Biotechnology (2011) 29 (8) :750-756.

[0263] Kihm,A.et al.United States Patent Publication No.2005/0058631.

[0264] Kroon,E.et al.Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cell in vivo.Nature Biotechnology (2008) 26:443-452.

[0265] Jonas,JC.et al.“Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes.”J Biol Chem.(1999) 274 (20) :14112-21.

[0266] Lee,SH.et al.“Human beta-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunoisolation device:implications for diabetes cell therapies.”Transplantation(2009) 87 (7) :983-91.

[0267] Li,W.et al.“Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors.”Cell Stem Cell (2009) 4 (1) :16-19.

[0268] Loh,YH.et al.“Genomic approaches to deconstruct pluripotency.”Annu Rev Genomics Hum Genet (2011) 12:165-185.

[0269] Maherali,N.et al.“Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution.”Cell Stem Cell (2007) 1 (1) :55-70.

[0270] Mistry,S.et al.U.S.Patent No.7,510,873.

[0271] Nakagawa,M.et al.“Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.”Nature Biotechnol (2008) 26 (1) : 101-106.

[0272] Ng,M.et al.,“Global,Regional&National Prevalence of Overweight and Obesity in Children and Adults During 1980-2013:A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013”Lancet (2014) 384 (9945) :766-781.

[0273] Nir,T.,D.A.Melton and Y.Dor“Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration.”J.Clin Invest (2007) 117 (9) :2553-2561.

[0274] O’Dowd,JF.and Stocker,CJ.“Endocrine pancreatic development:impact of obesity and diet”Front Physiol. (2013) 4:170.

[0275] Pagliuca,FW.et al.“Generation of functional human pancreaticβcells in

vitro".Cell 2014159 (2):428-39.

[0276] Pepper,AR.et al."A prevascularized subcutaneous device-less site for islet and cellular transplantation"Nature Biotechnology(2015) 33 (5):518-523.

[0277] Rezania,A.Riedel MJ.Wideman RD.et al."Production of functional glucagon-secreting α -cells from human embryonic stem cells."Diabetes(2011) 60 (1):239-247.

[0278] Rezania,A.Bruin JE.Riedel MJ.et al."Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice."Diabetes(2012) 61 (8):2016-29.

[0279] Rezania,A.Bruin JE.Xu J.et al."Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6.1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells in vivo."Stem Cells(2013) 31 (11):2432-2442.

[0280] Rezania,A.,Bruin,J.E.,Arora,P.et al."Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells."Nat Biotechnol(2014) 32 (11):1121-1133.

[0281] Rezania,A.United States Patent Publication US20090170198.

[0282] Russ HA,et al."Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro."EMBO J.(2015) 34 (13):1759-72.

[0283] Schulz,T.et al."A Scalable System for Production of Functional Pancreatic Progenitors from Human Embryonic Stem Cells".Public Library of Science One(2012) 7 (5):e37004.

[0284] Stadtfeld,M.et al."Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse."Cell Stem Cell(2008) 2 (3):230-240.

[0285] Szot,GL.et al."Tolerance induction and reversal of diabetes in mice transplanted with human embryonic stem cell-derived pancreatic endoderm"Cell Stem Cell(2015) 16 (2):148-157.

[0286] Takahashi,K.et al."Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors."Cell(2007) 131:861-872.

[0287] Takahashi,K.and Yamanaka,S."Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors."Cell(2006) 126 (4):663-676.

[0288] Tang,Q.and Desai,TA."Approaching a cure for type 1 diabetes"Nature Medicine(2016) 22 (3):236-237.

[0289] Thomson,JA.et al."Isolation of a primate embryonic stem cell line."Proc Natl Acad Sci U.S.A.(1995) 92 (17):7844-7848.

[0290] Thomson,JA.and Marshall,VS."Primate embryonic stem cells."Curr Top Dev Biol(1998) 38:133-165.

[0291] Thomson,JA.et al."Embryonic stem cell lines derived from human

blastocysts.”Science (1998) 282 (5391) :1145-1147.

[0292] Thomson,JA.U.S.Patent No.5,843,780.

[0293] Thomson,JA.and Xu,J.U.S.Patent App.Pub.No.2007/0122903.

[0294] Vegas,AJ.et al.“Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice.”Nature Medicine (2016) 22:306-311.

[0295] Ware,CB.et al.“Derivation of naive human embryonic stem cells.”Proc Natl Acad Sci U S A. (2014) 111:4484-4489.

[0296] Xu,J.United States Patent Publication US20120039955.

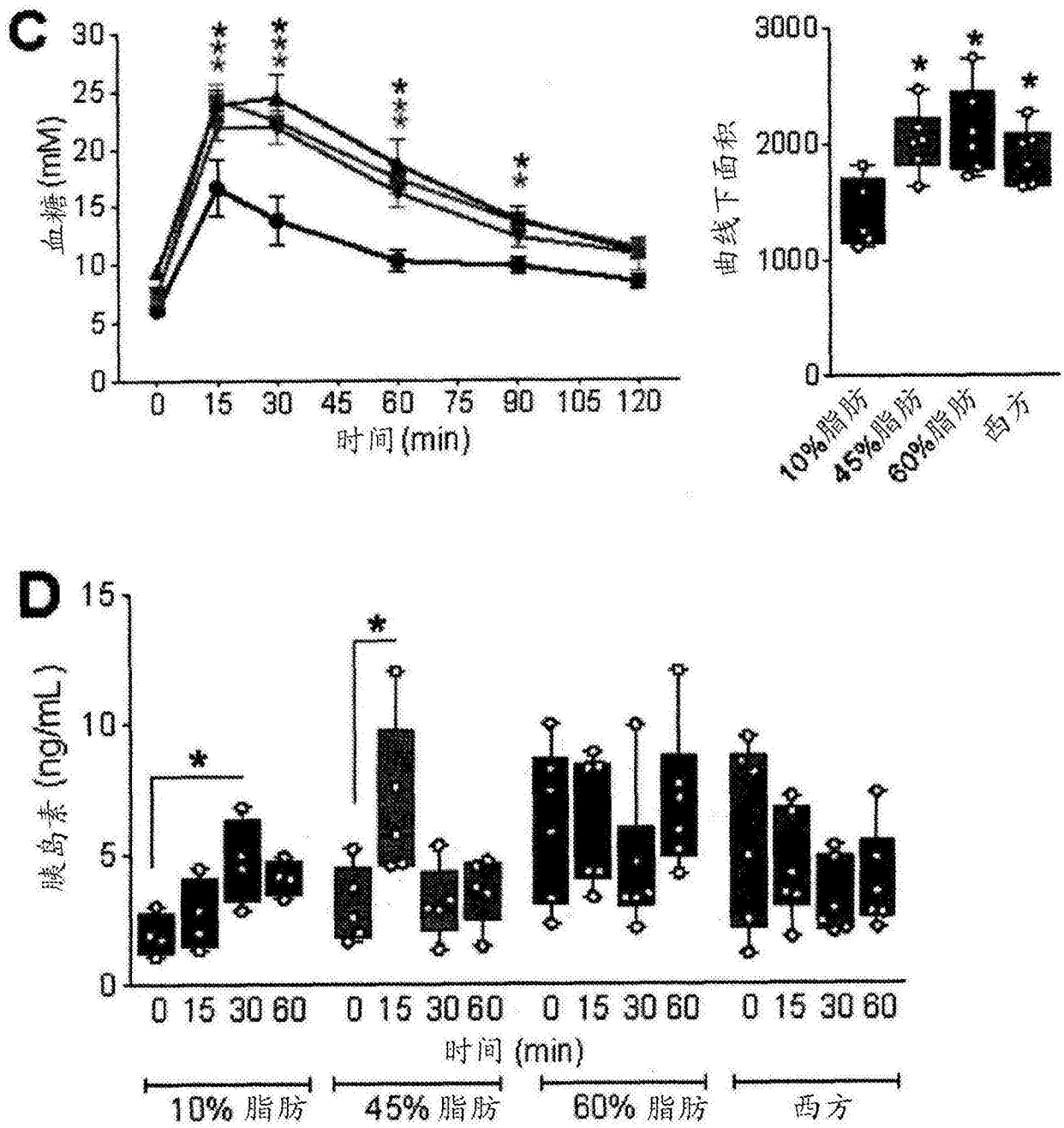


图1 (续)

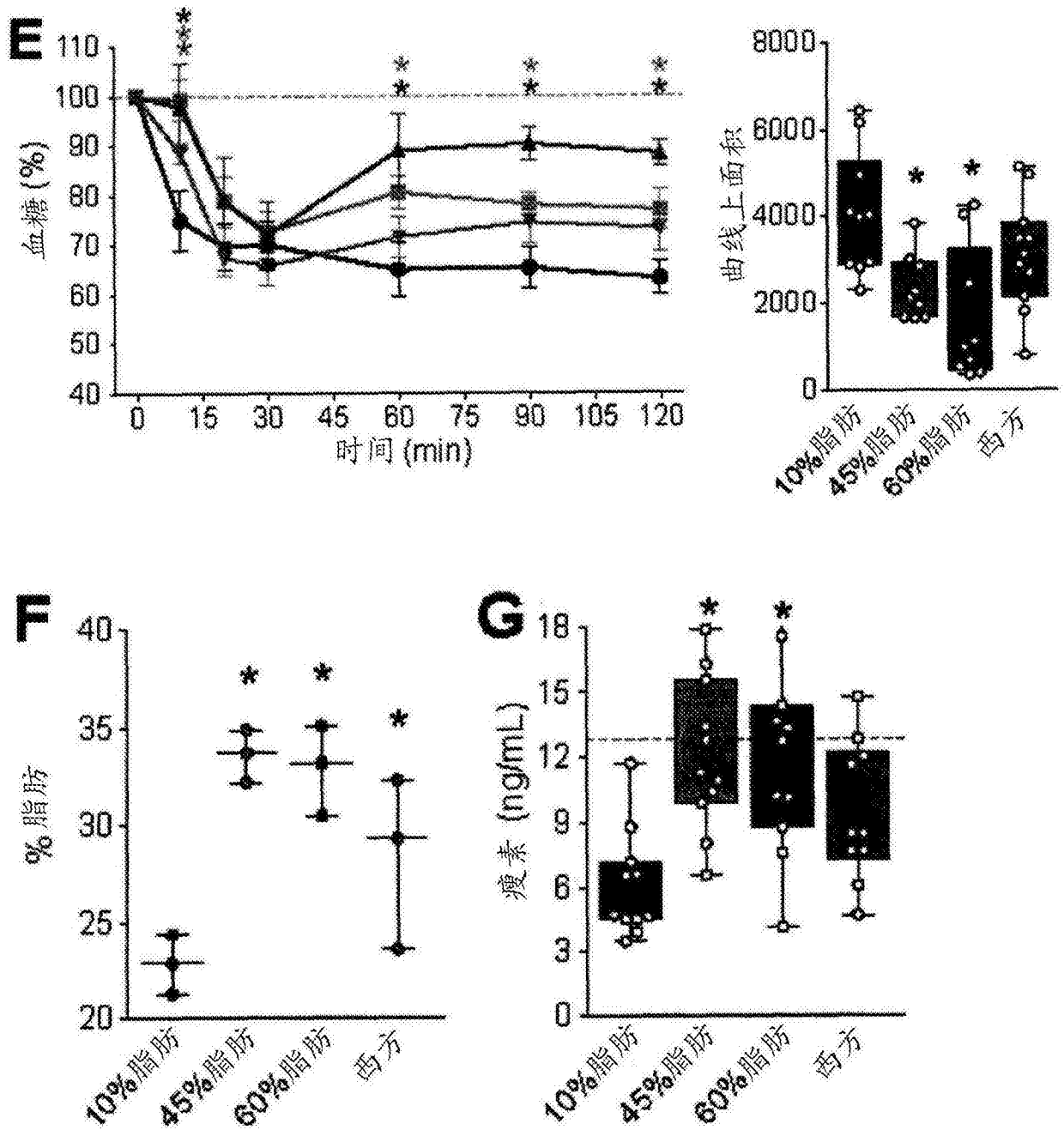


图1 (续)

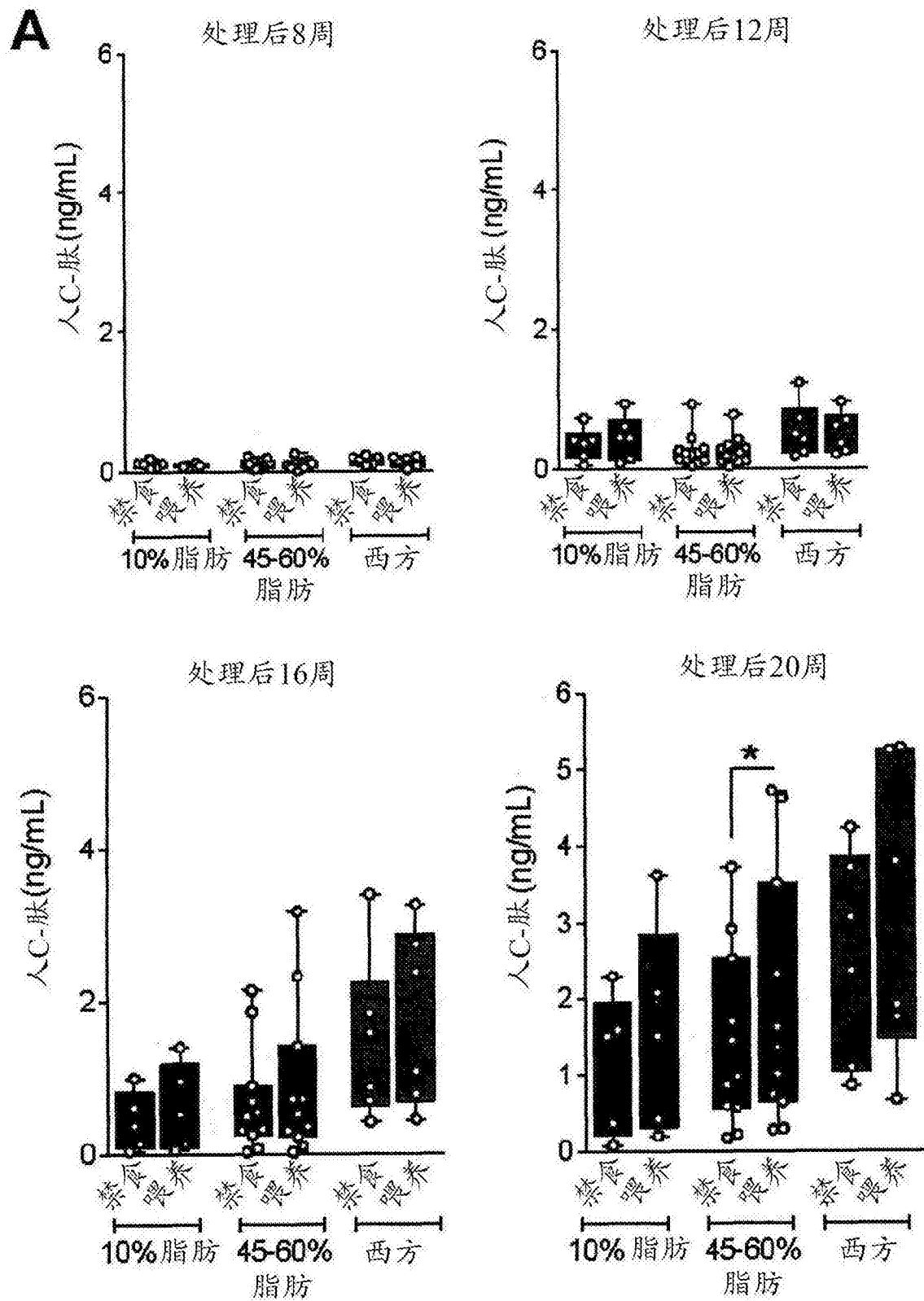


图2

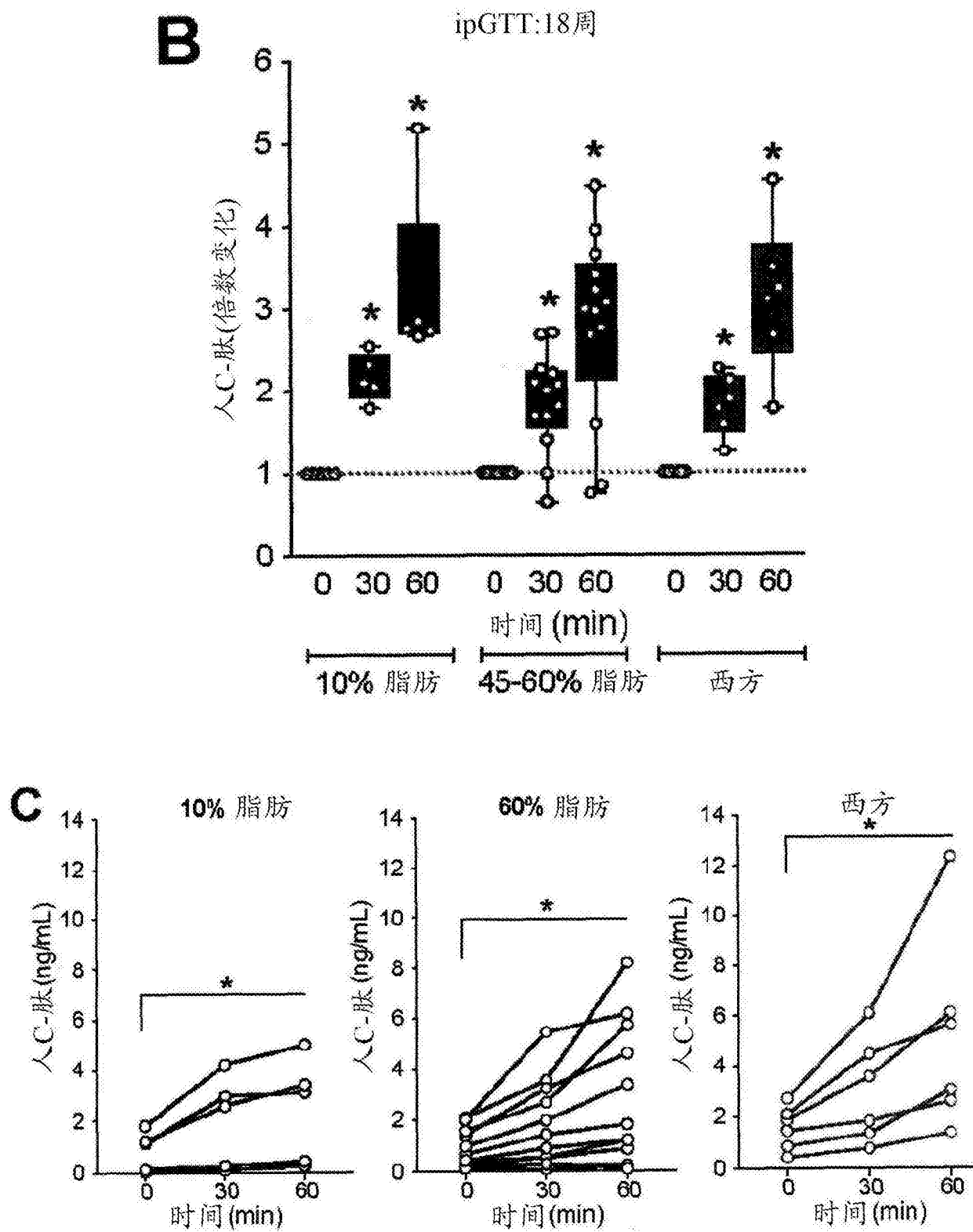


图2(续)

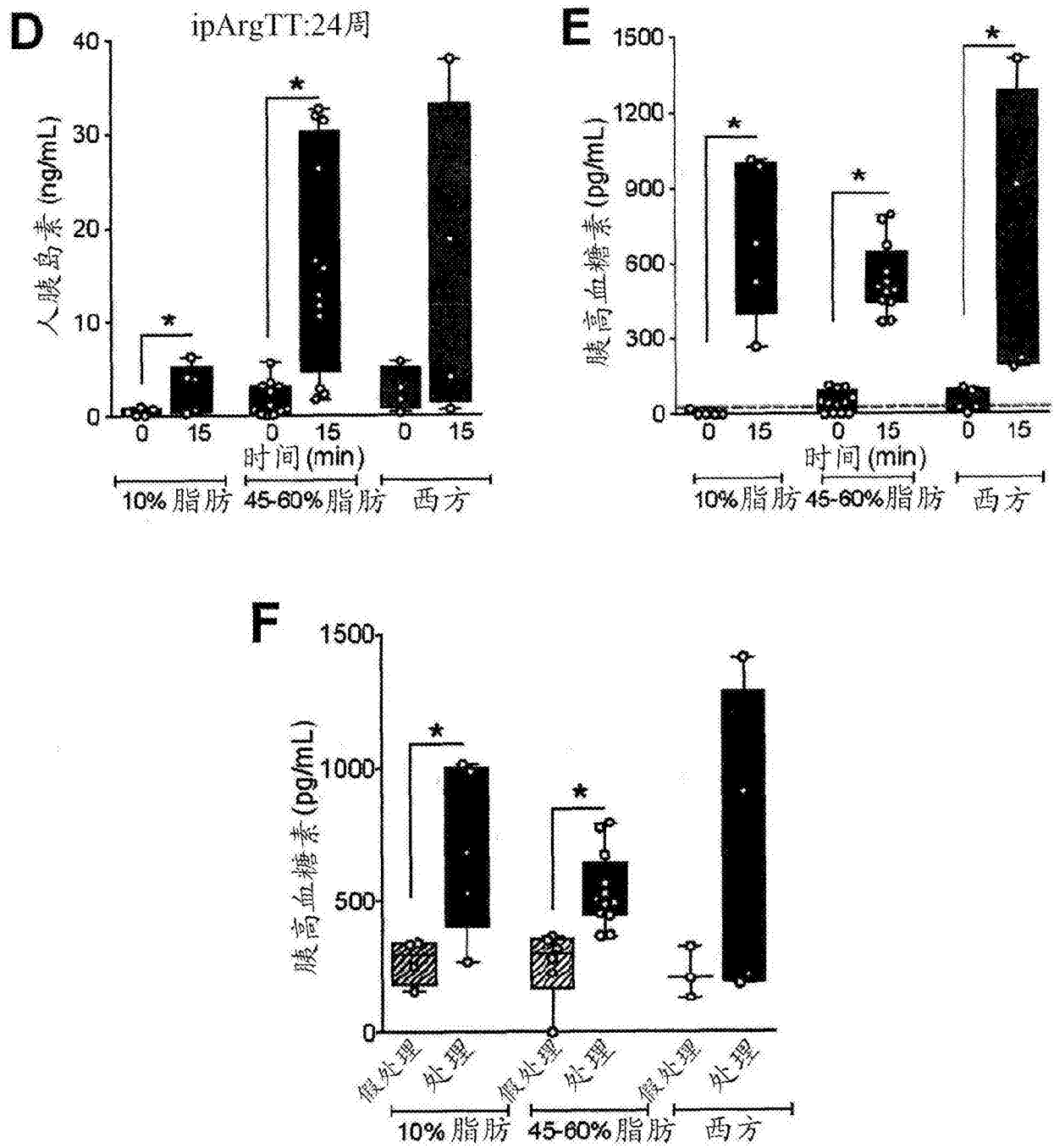


图2(续)

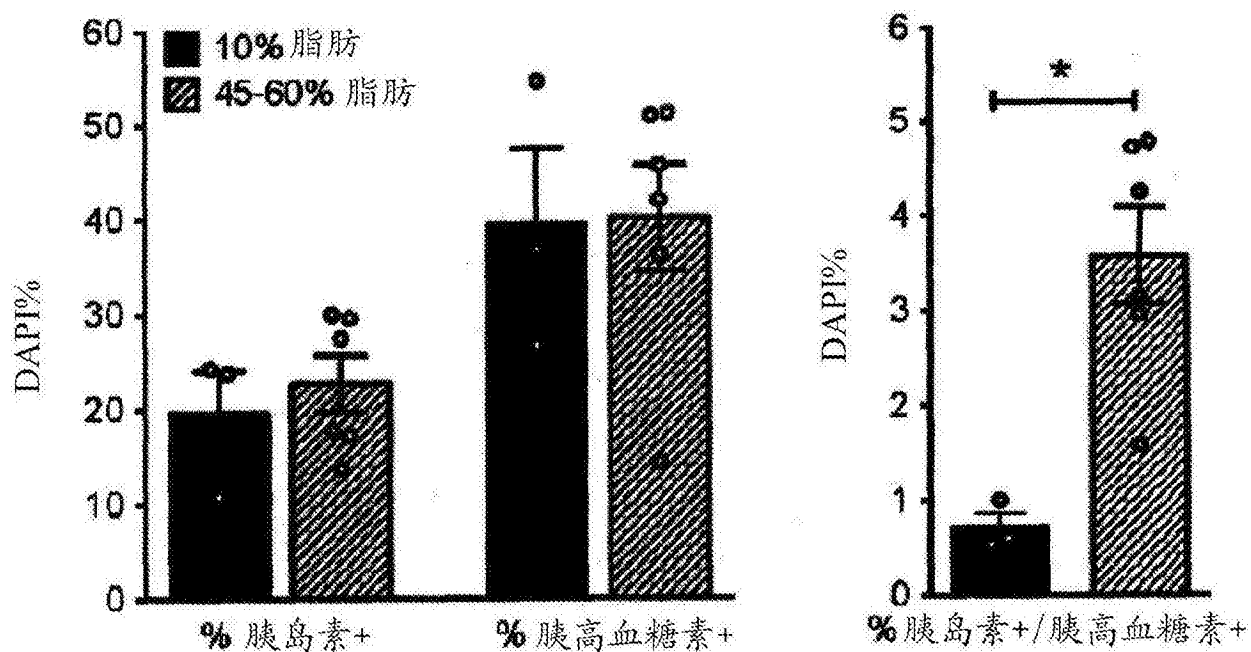


图3

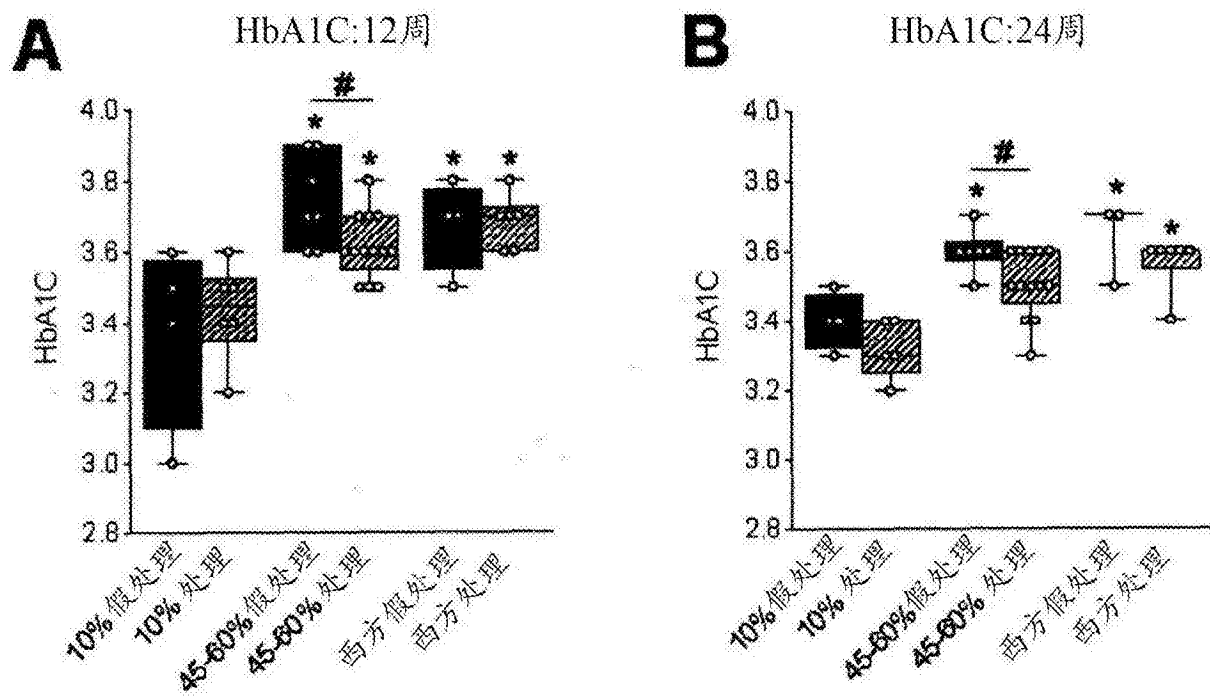


图4

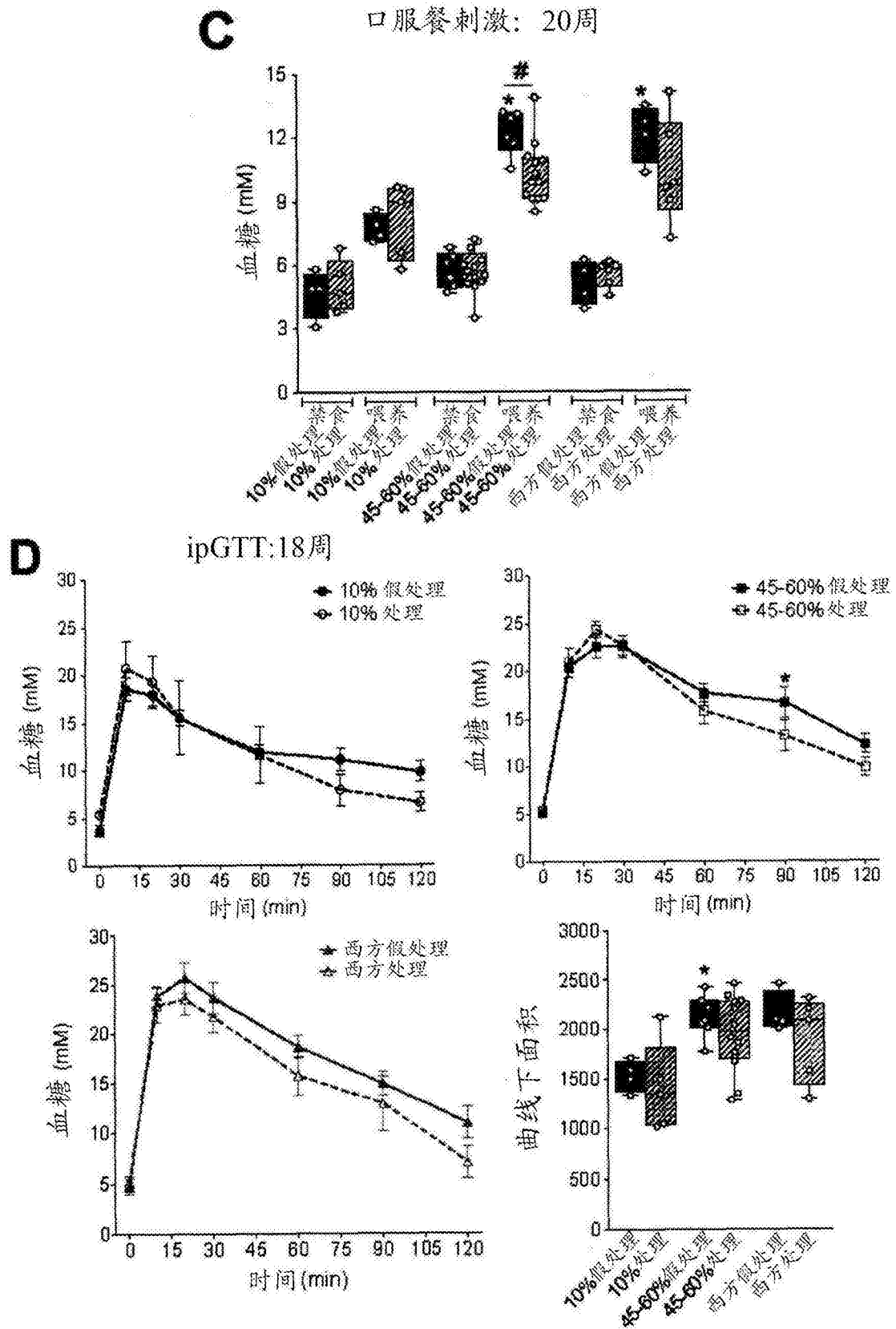


图4(续)

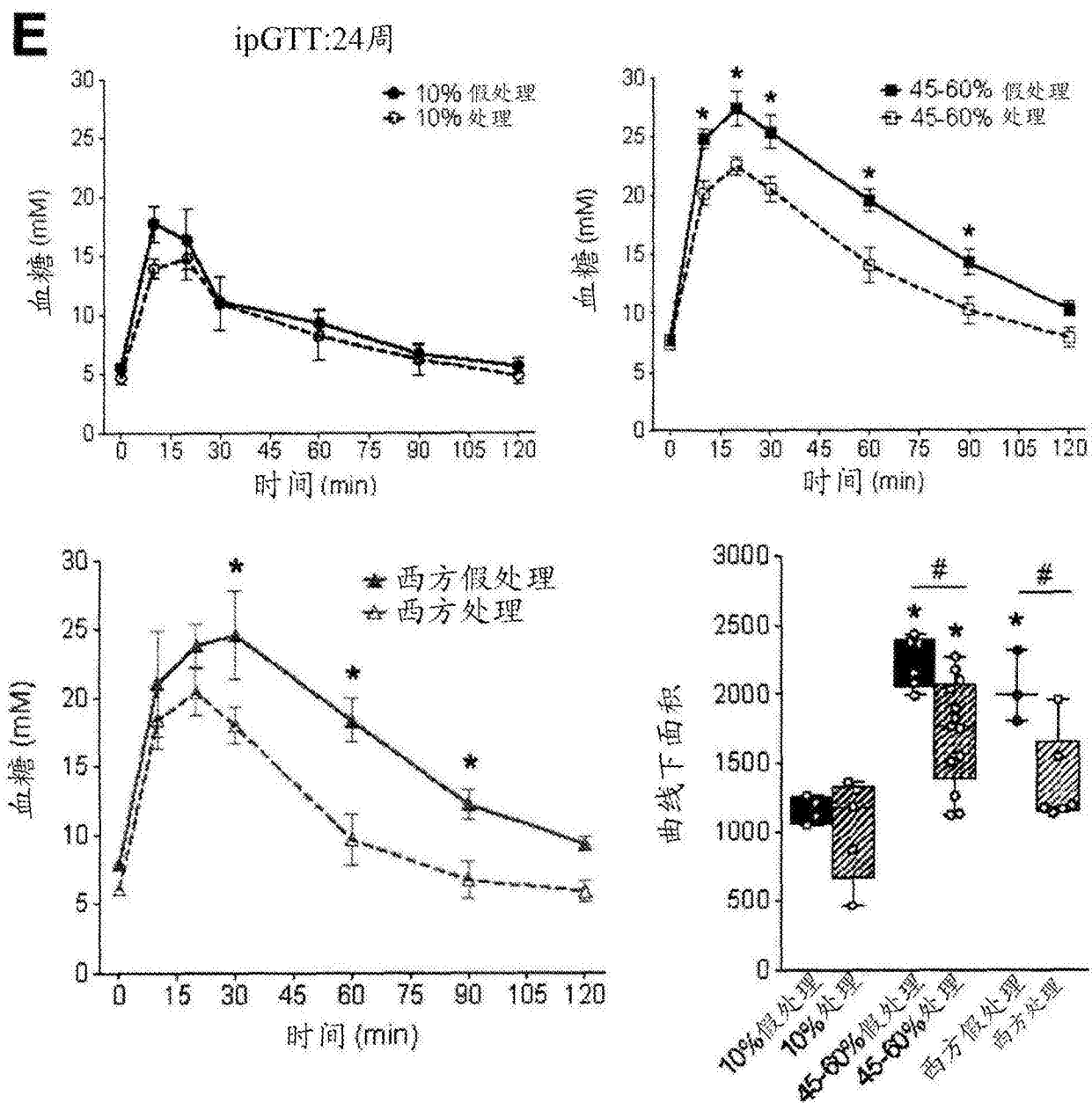


图4(续)

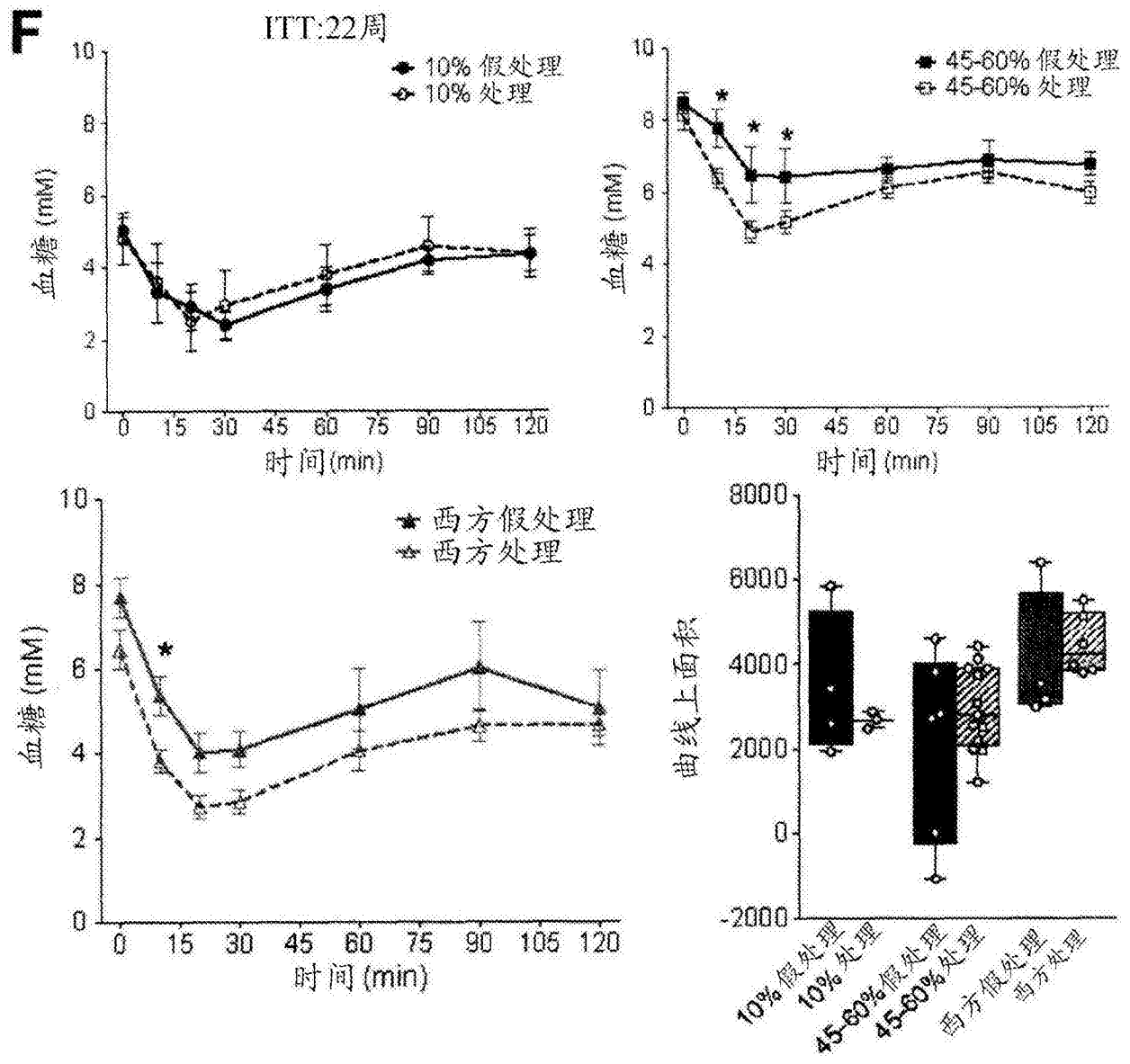


图4(续)

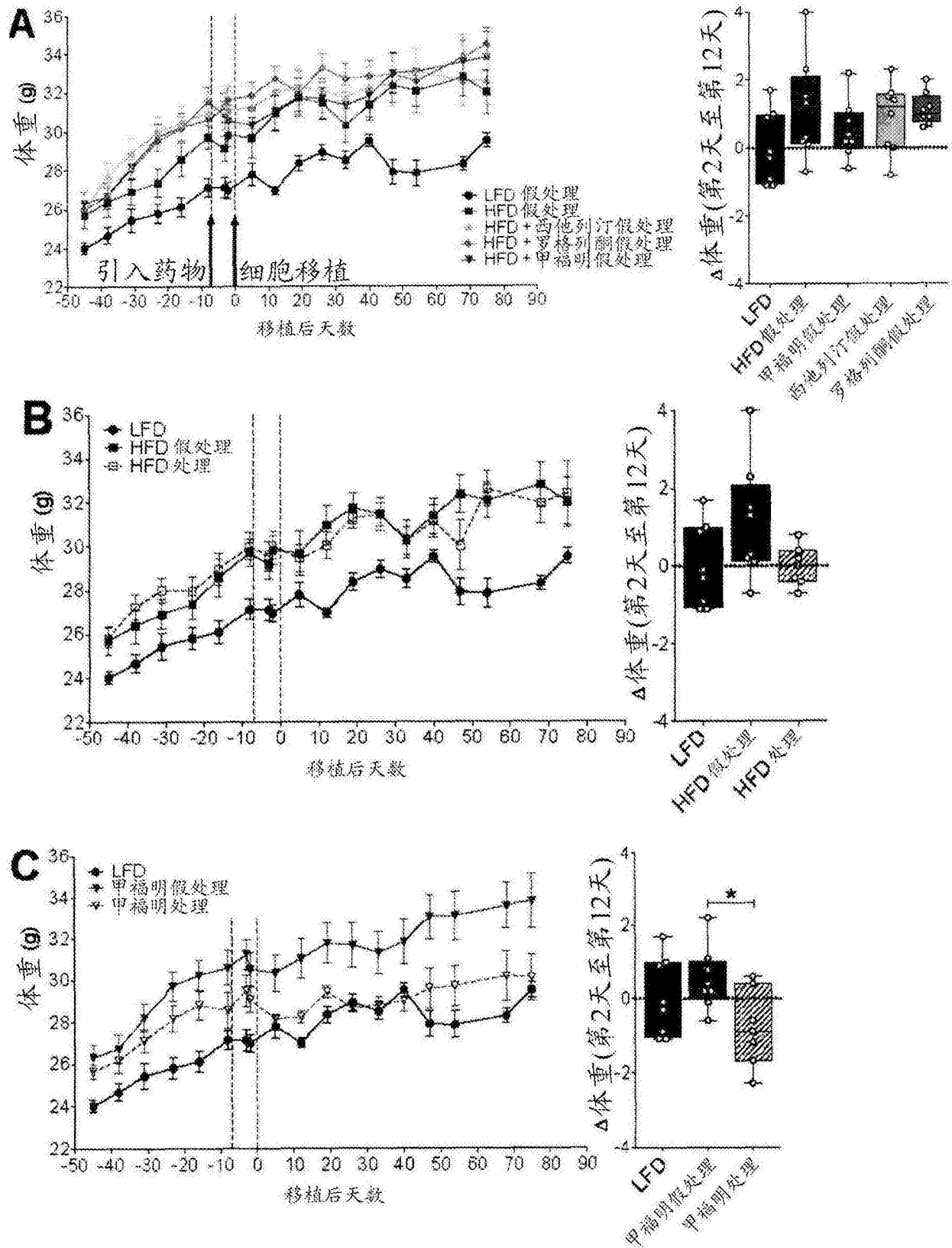


图5

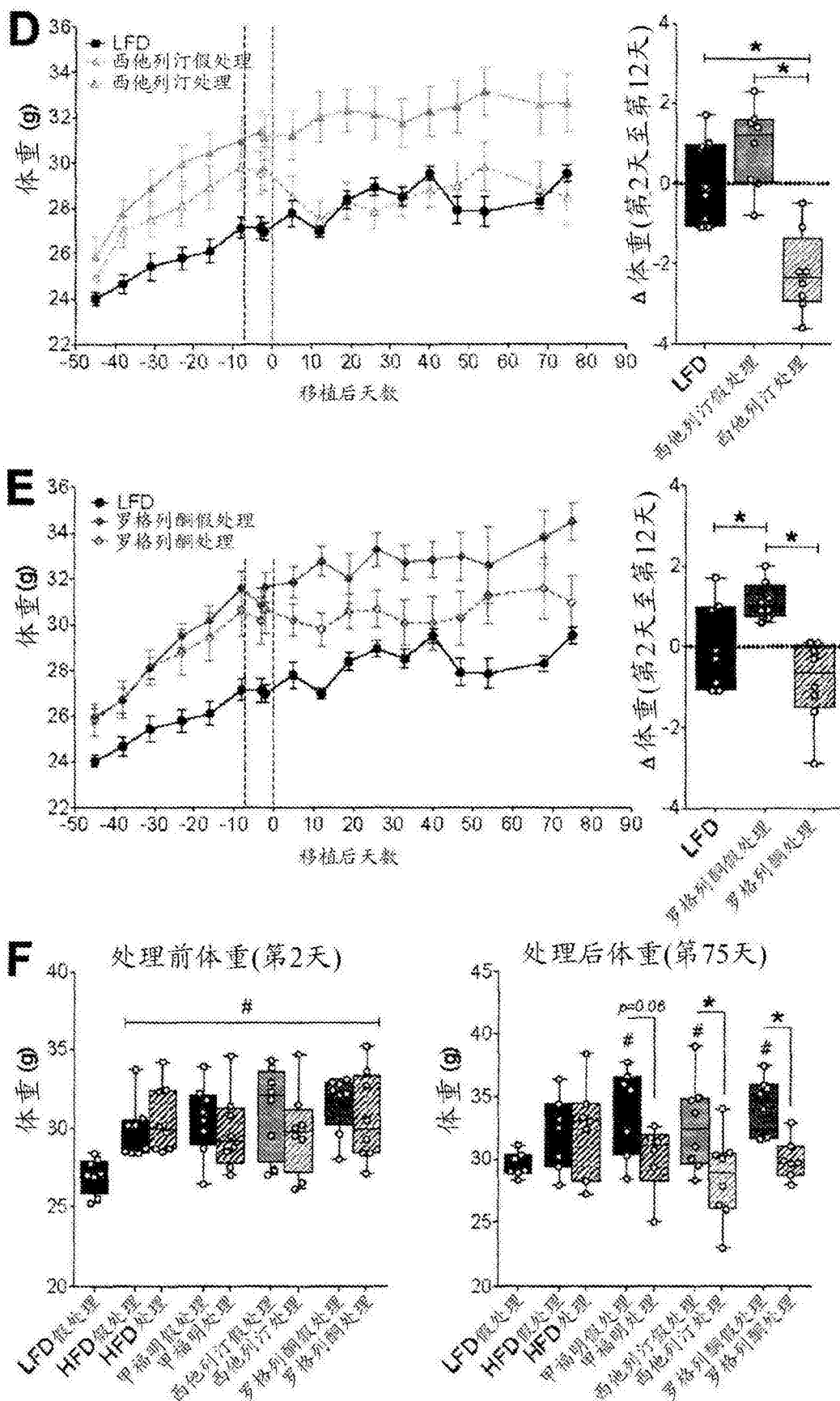


图5(续)

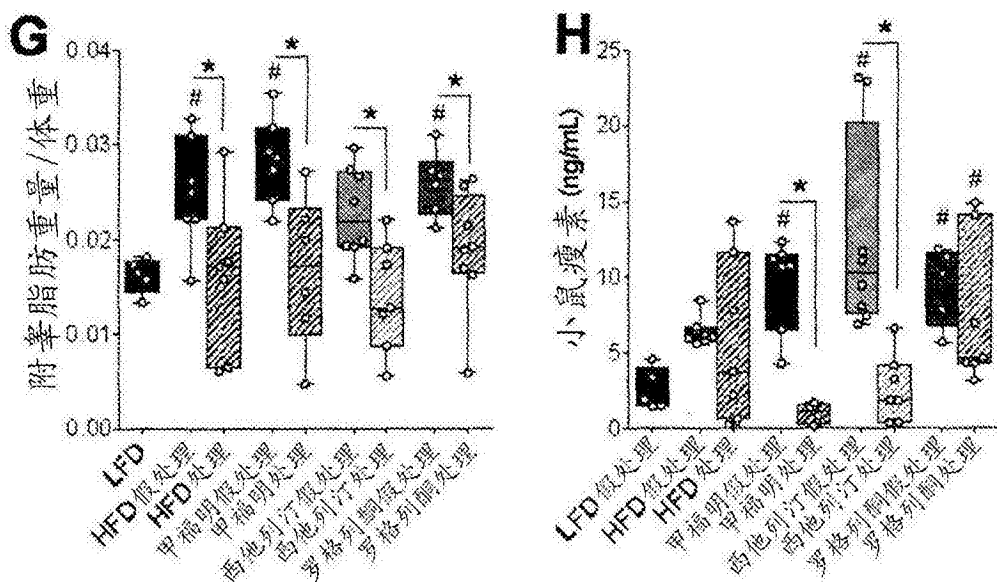


图5 (续)

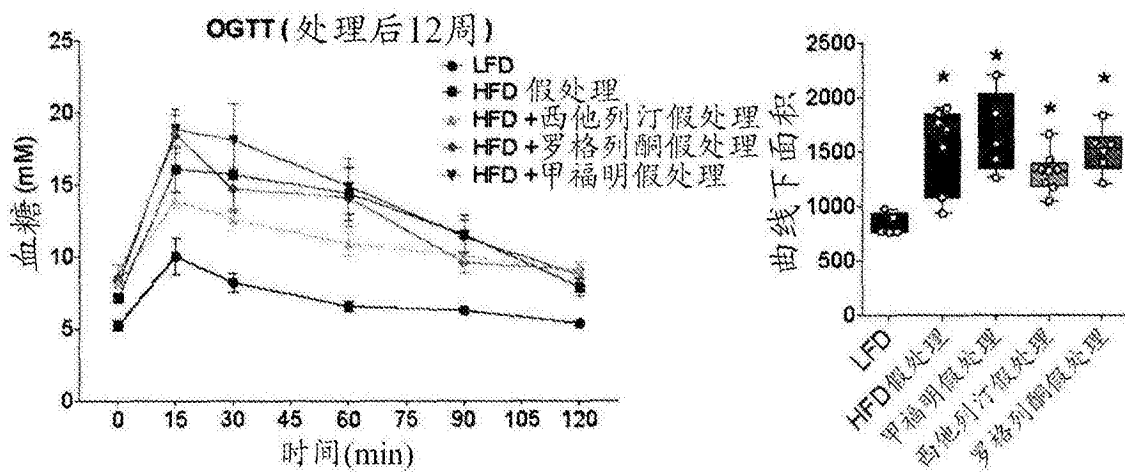


图6A

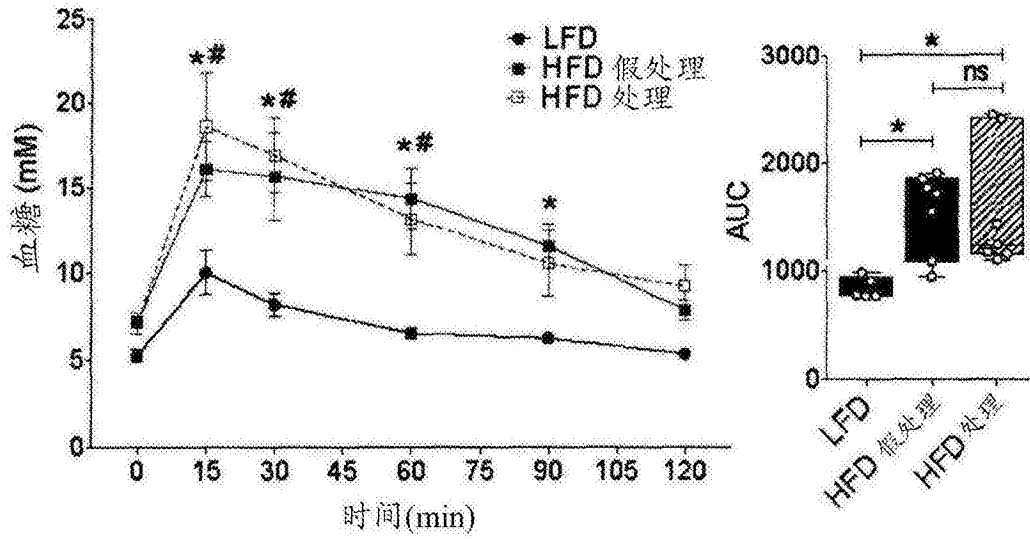


图6B

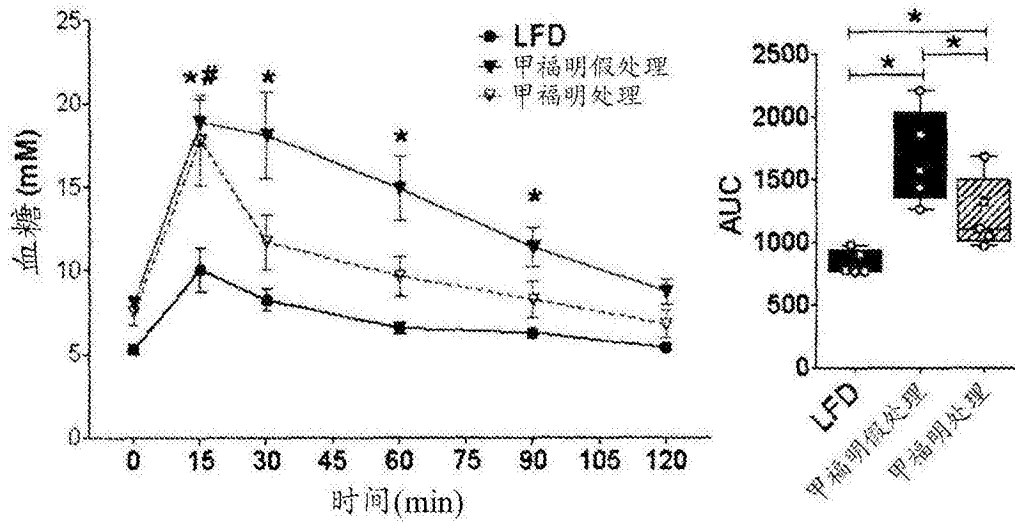


图6C

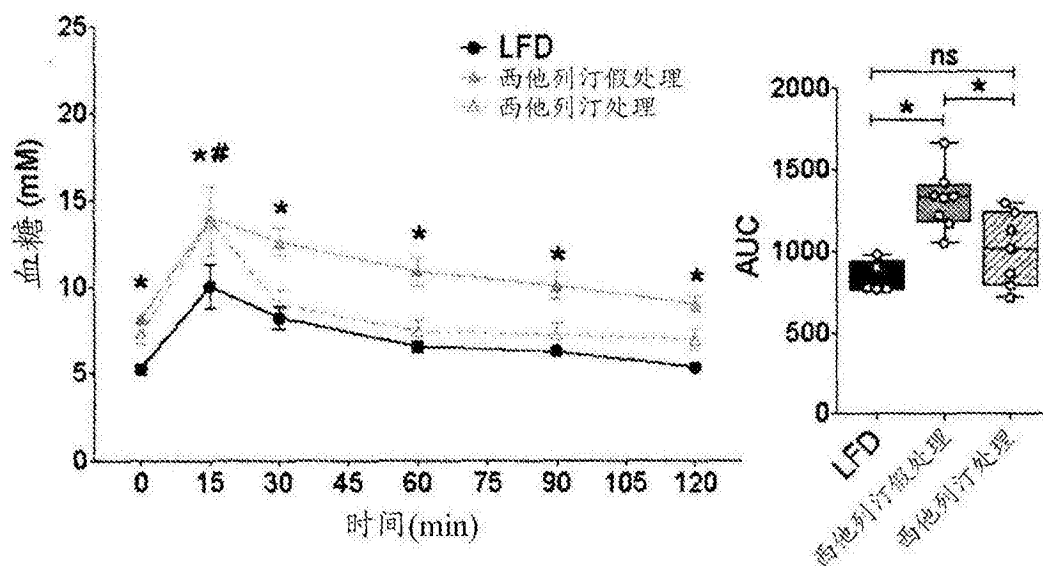


图6D

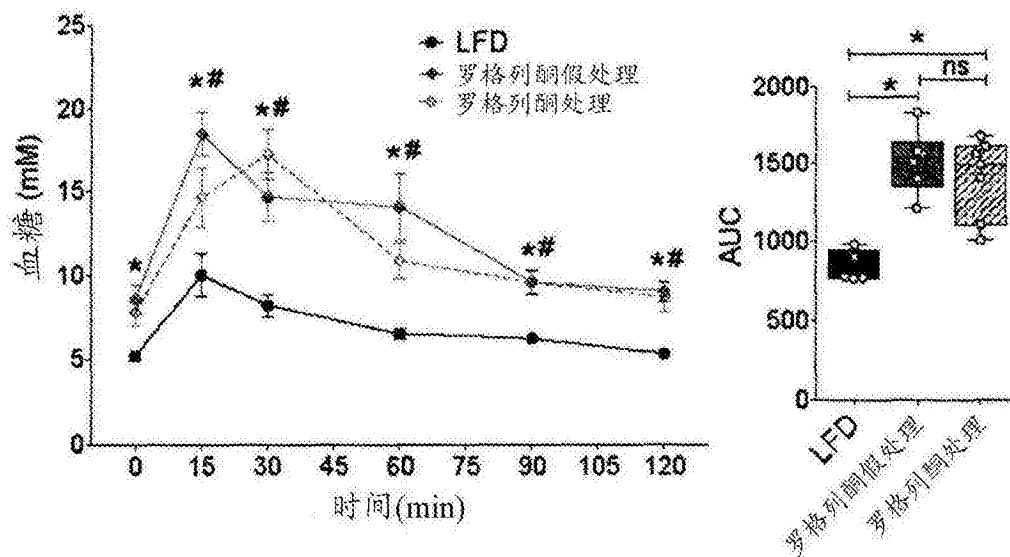


图6E

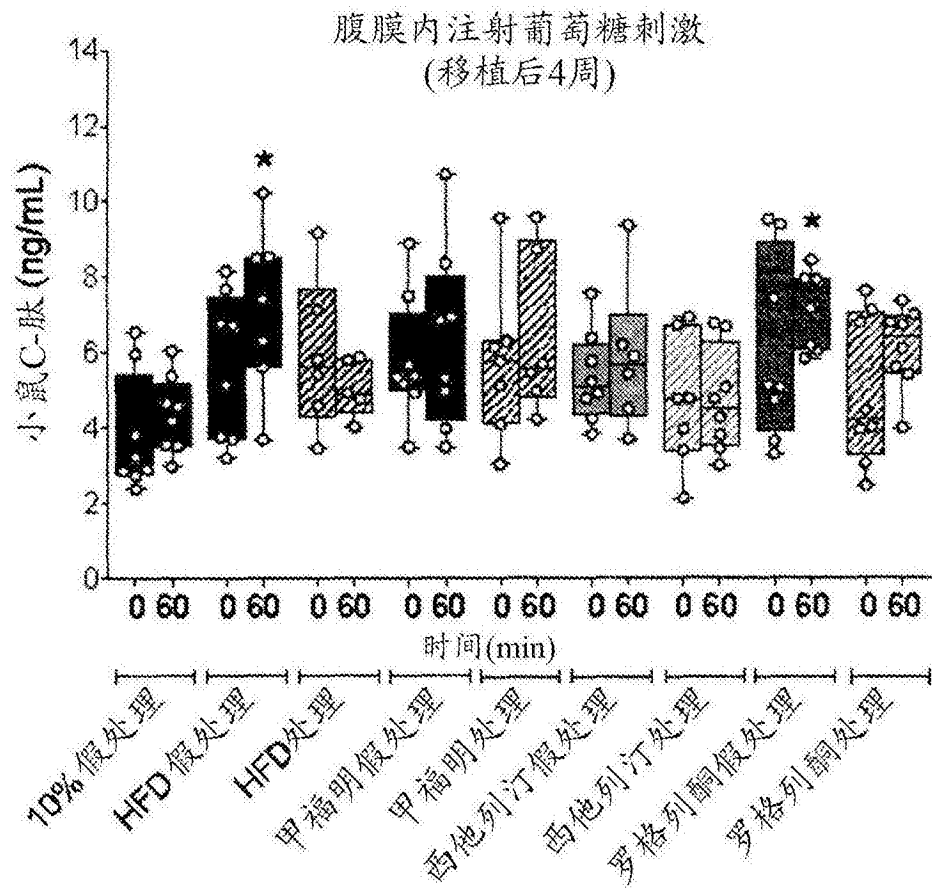


图6F

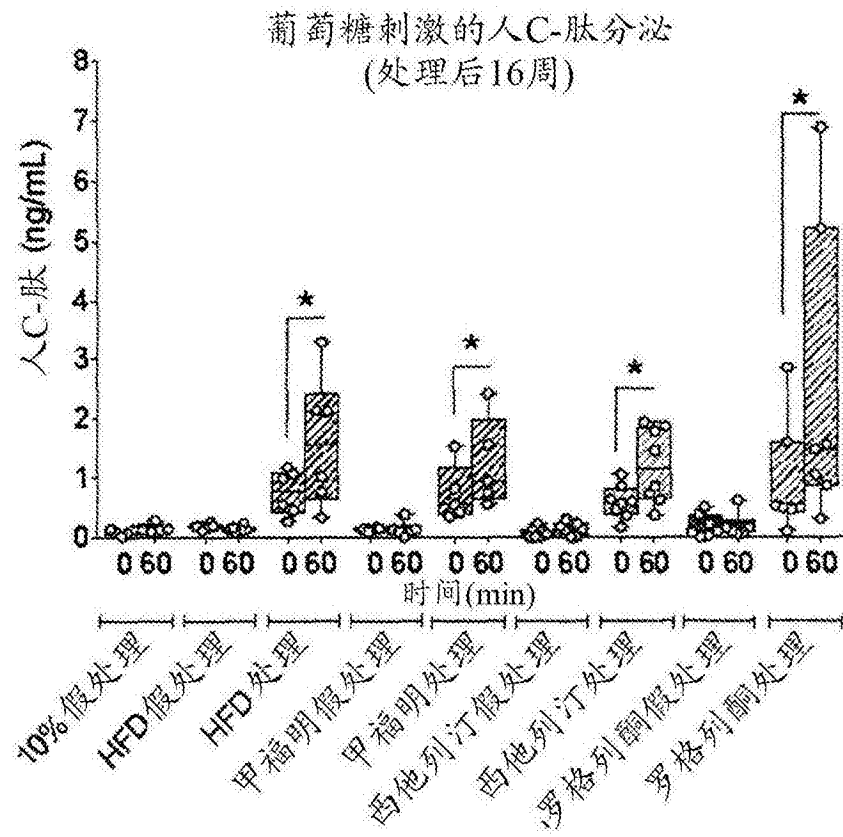


图6G

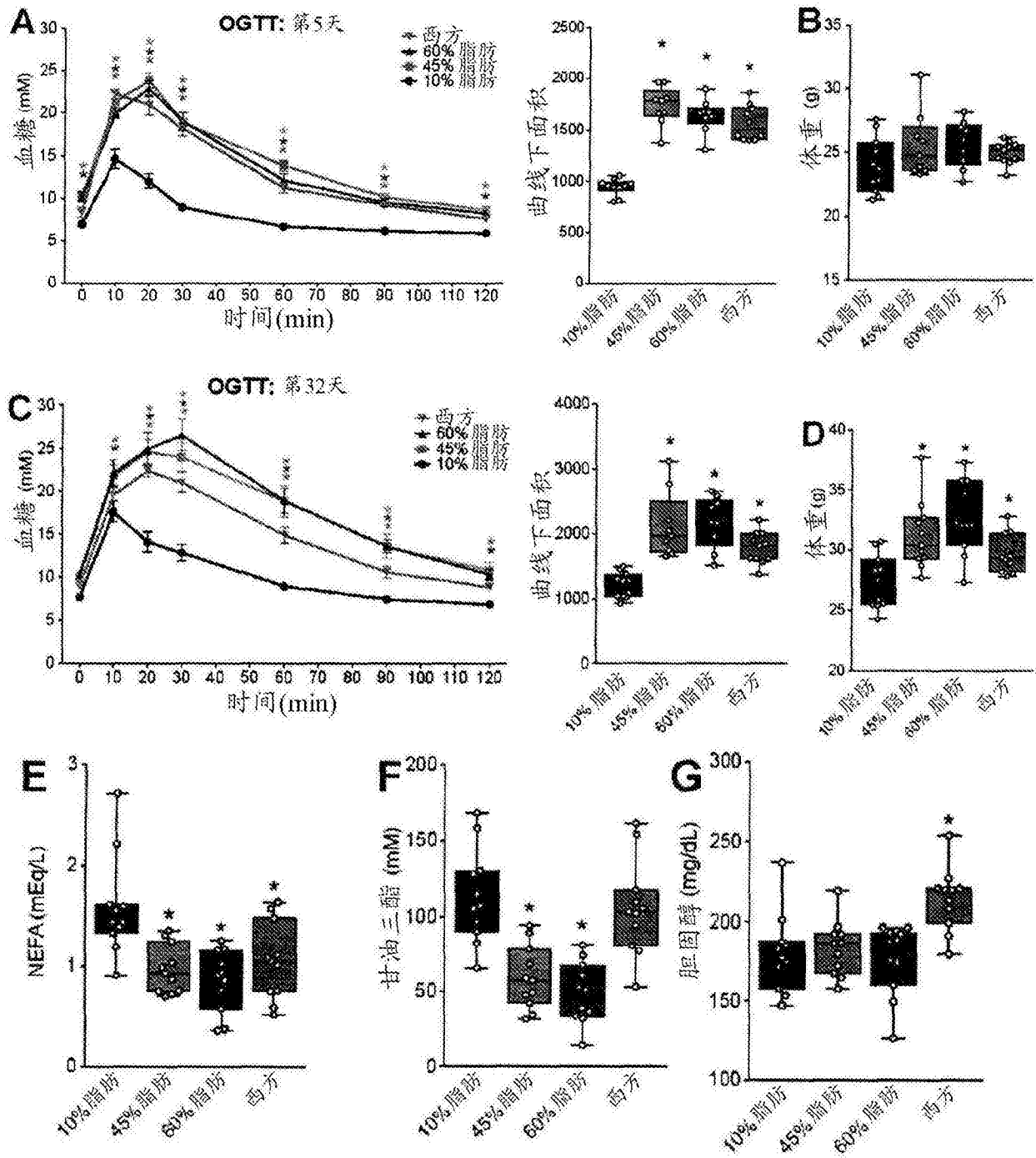


图7

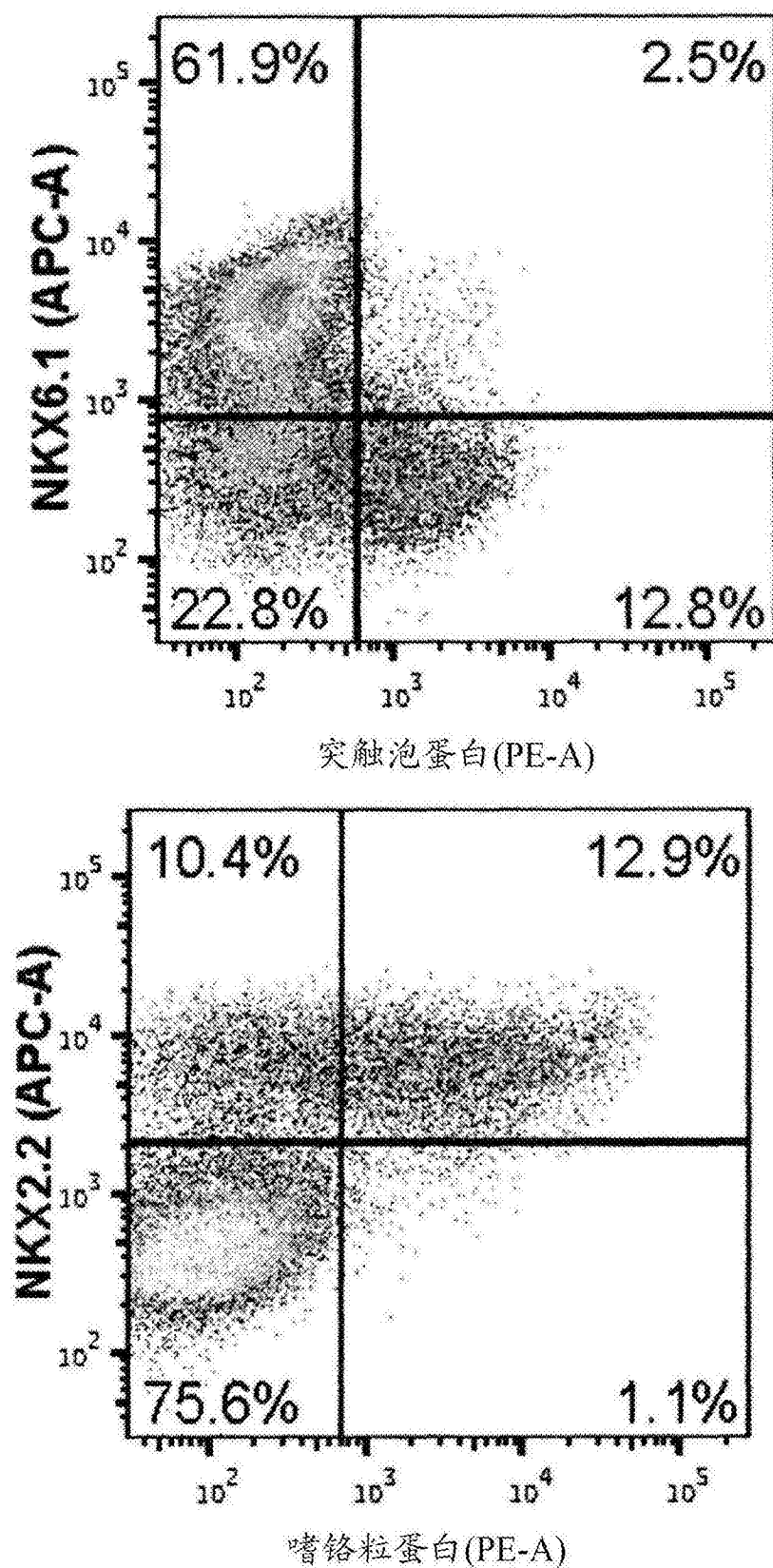


图8

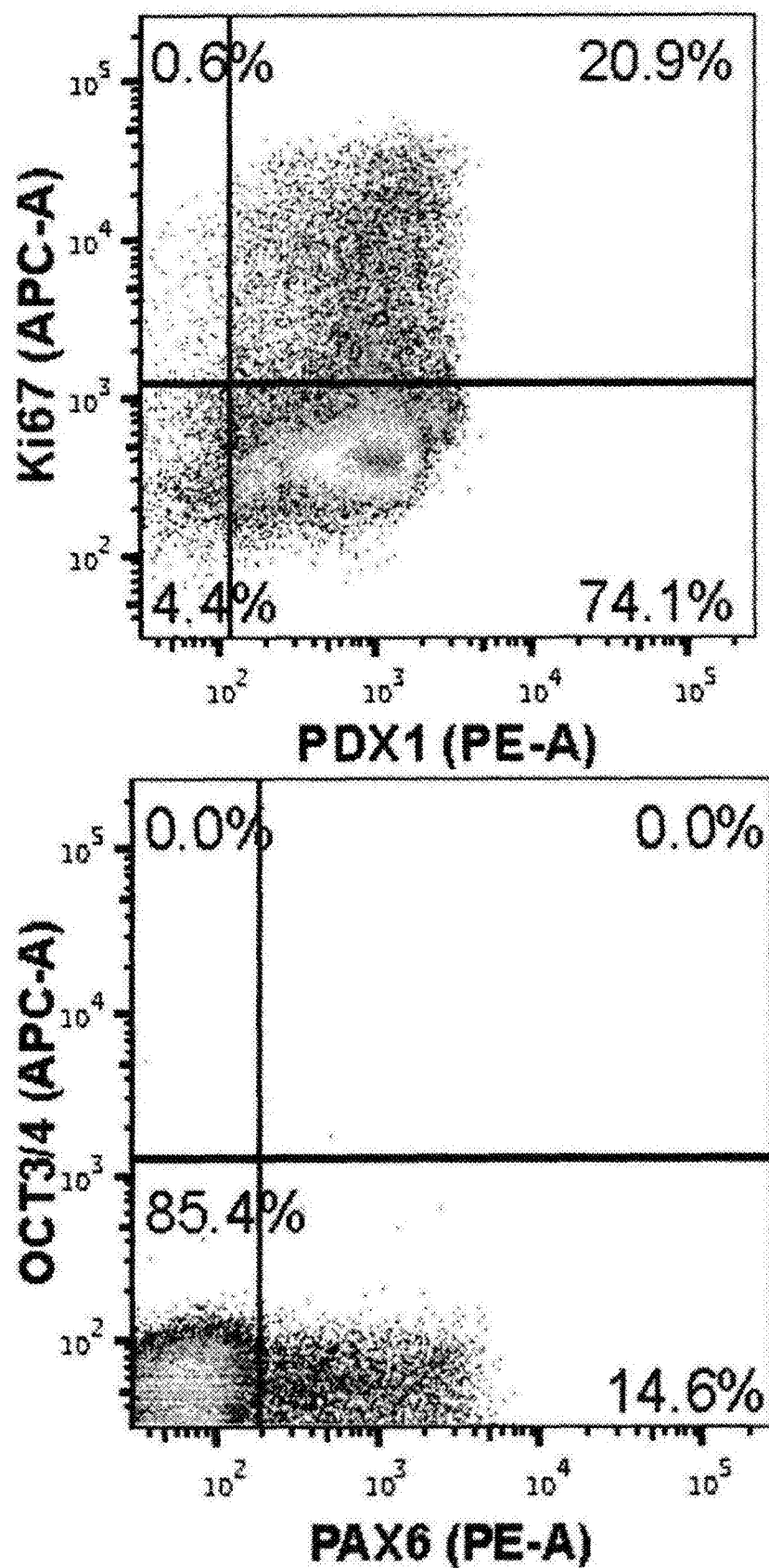


图8(续)

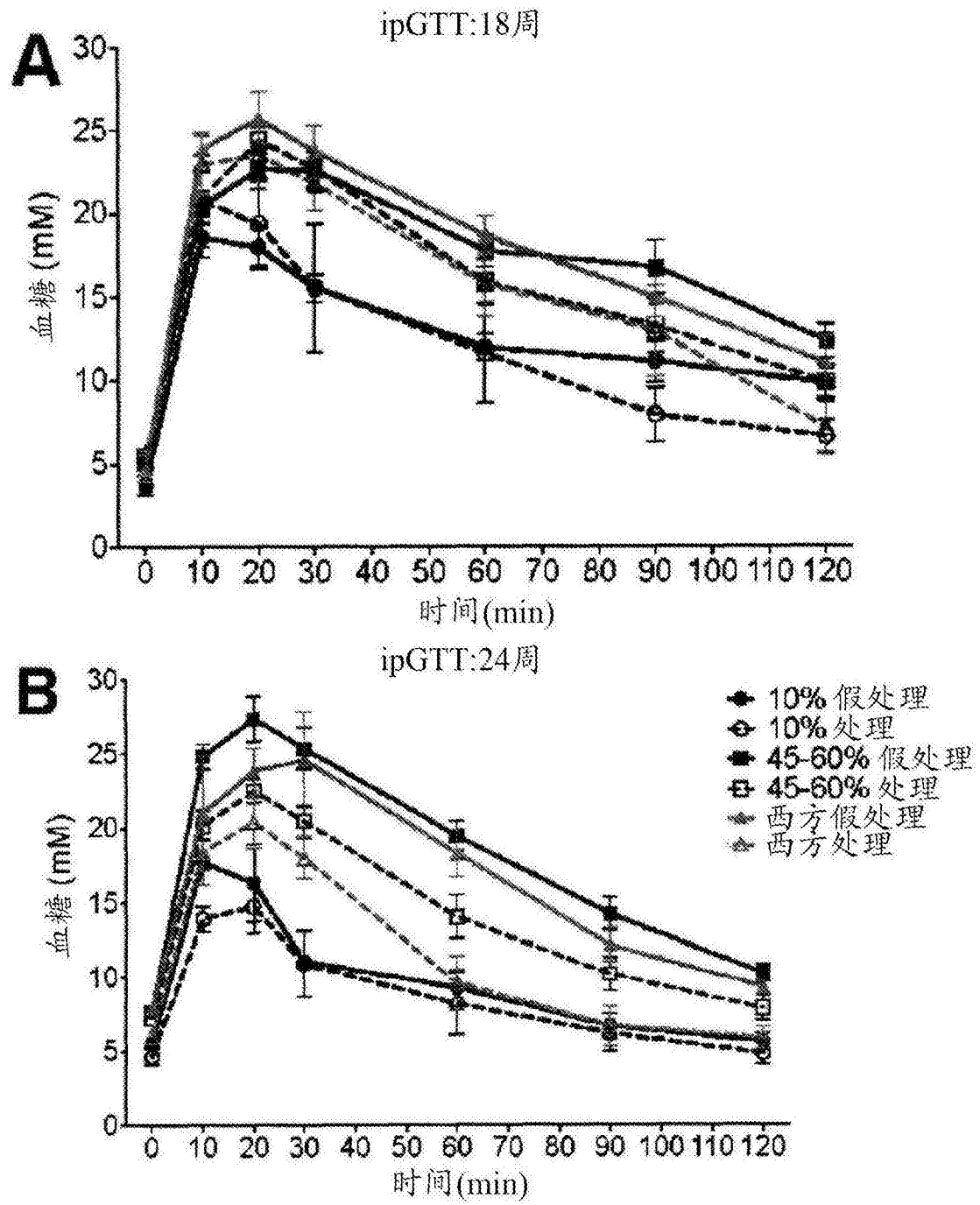


图9

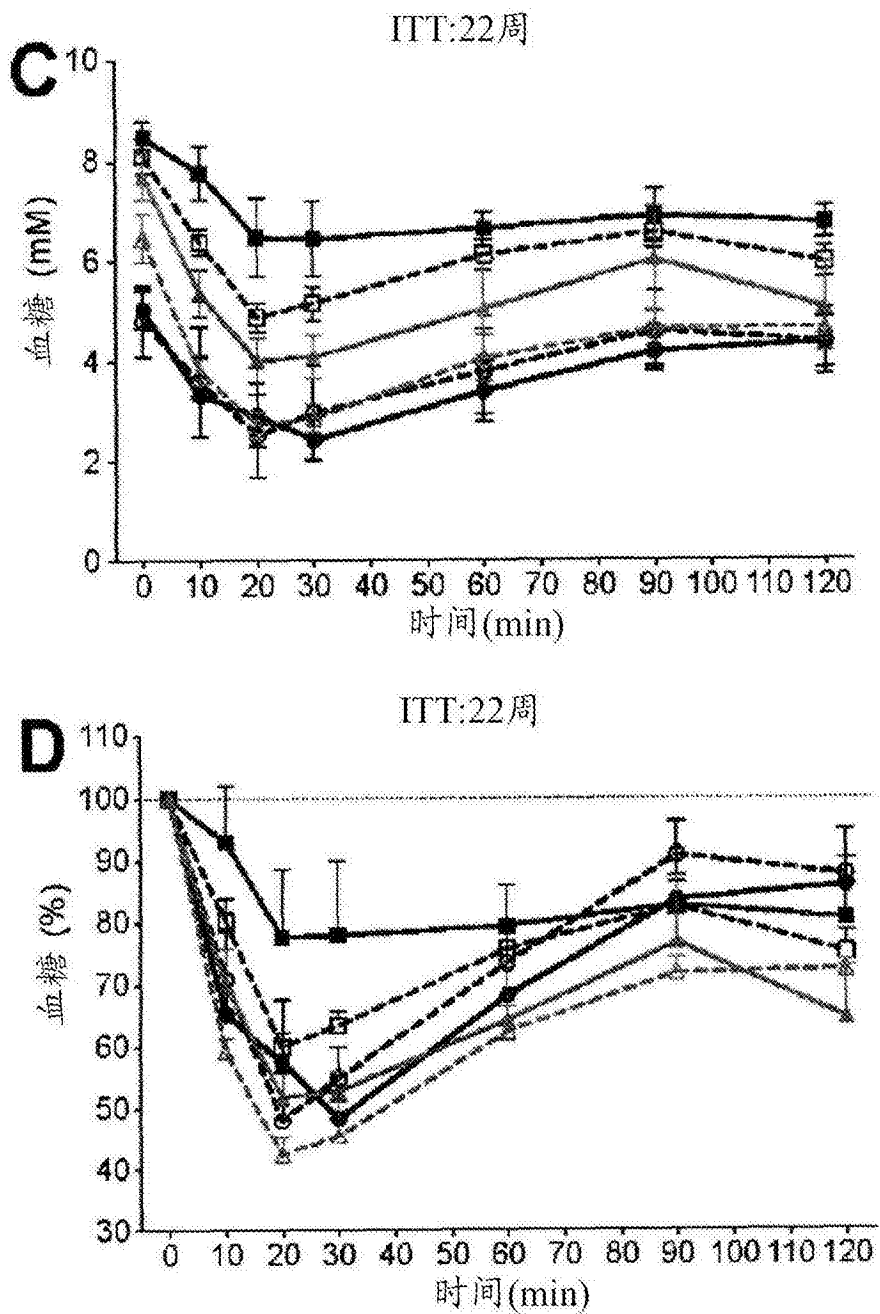


图9(续)

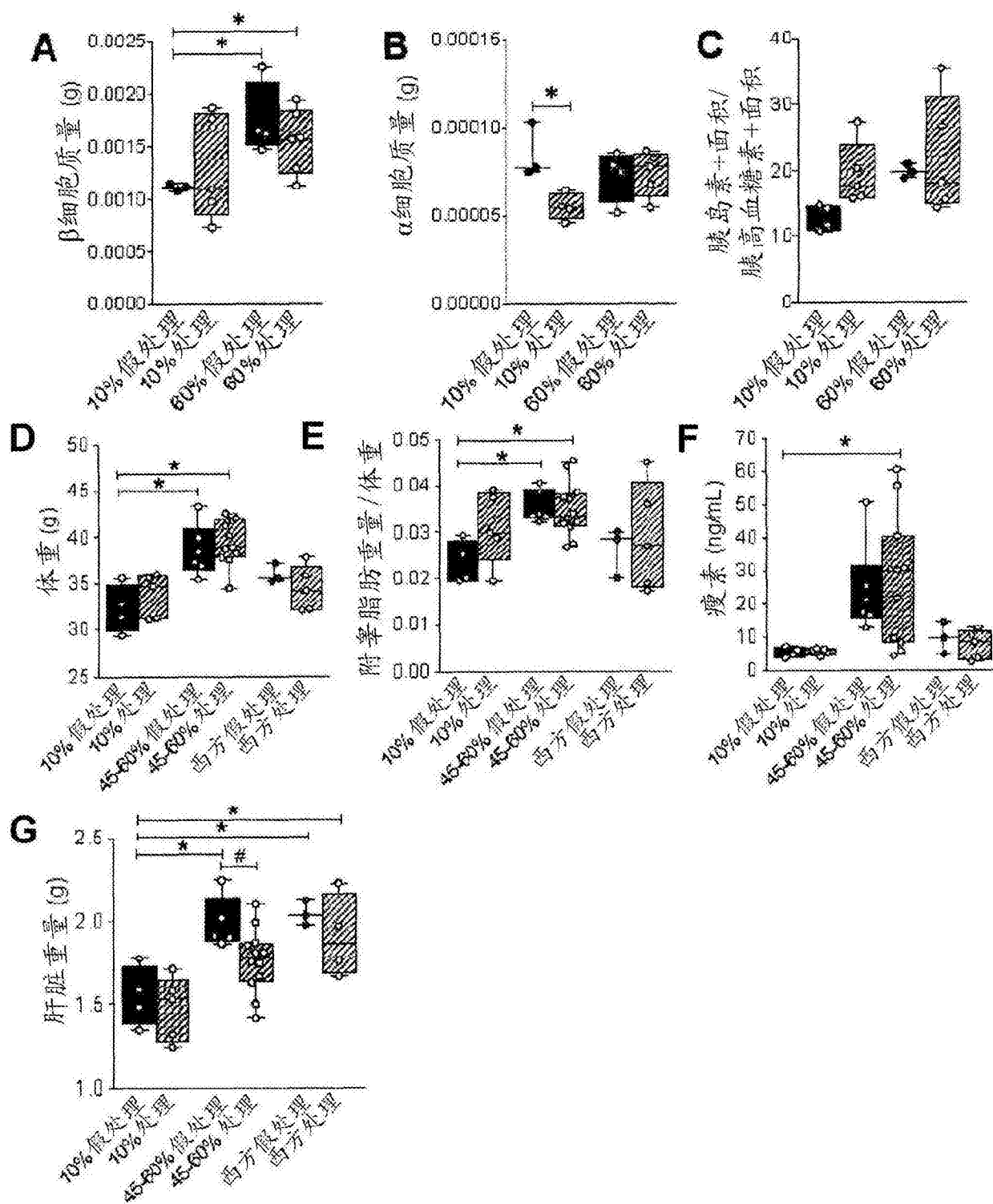


图10

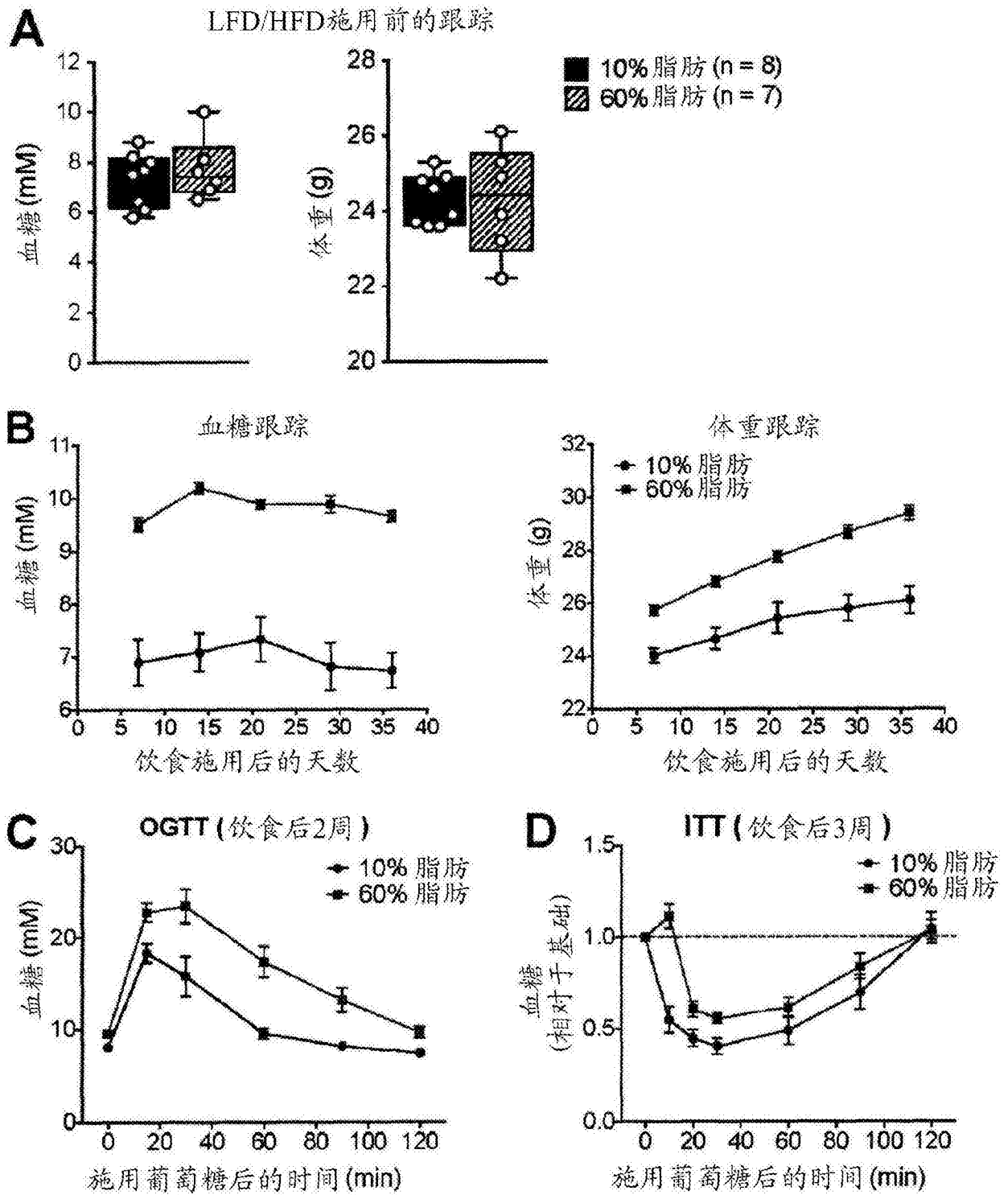


图11

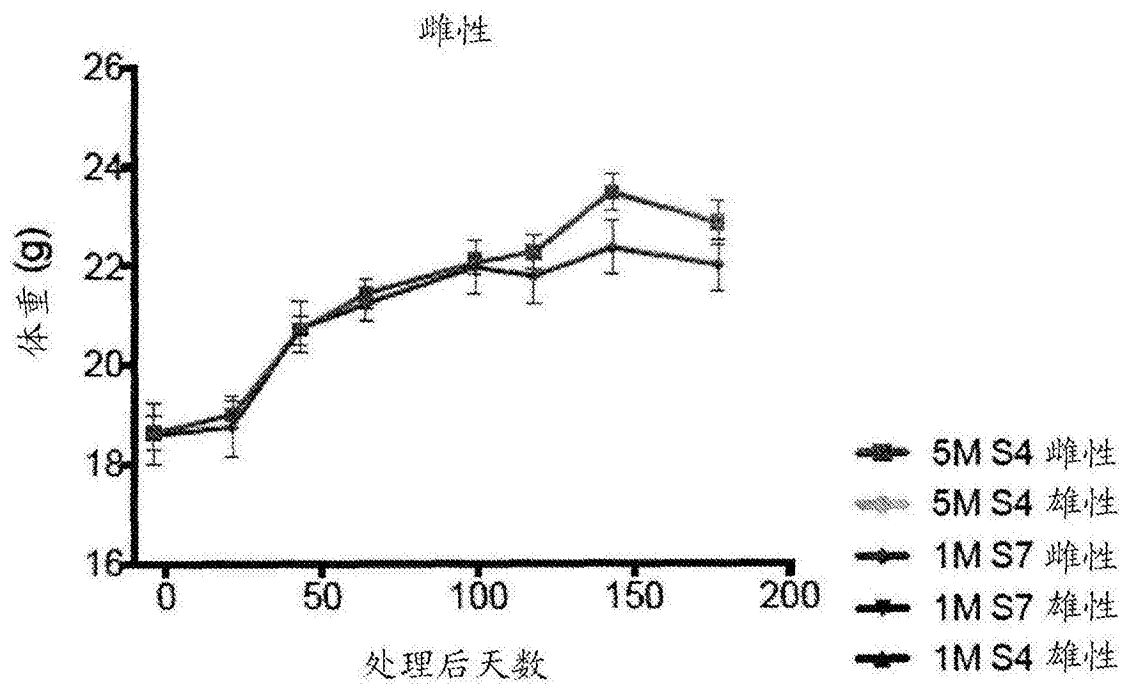


图12A

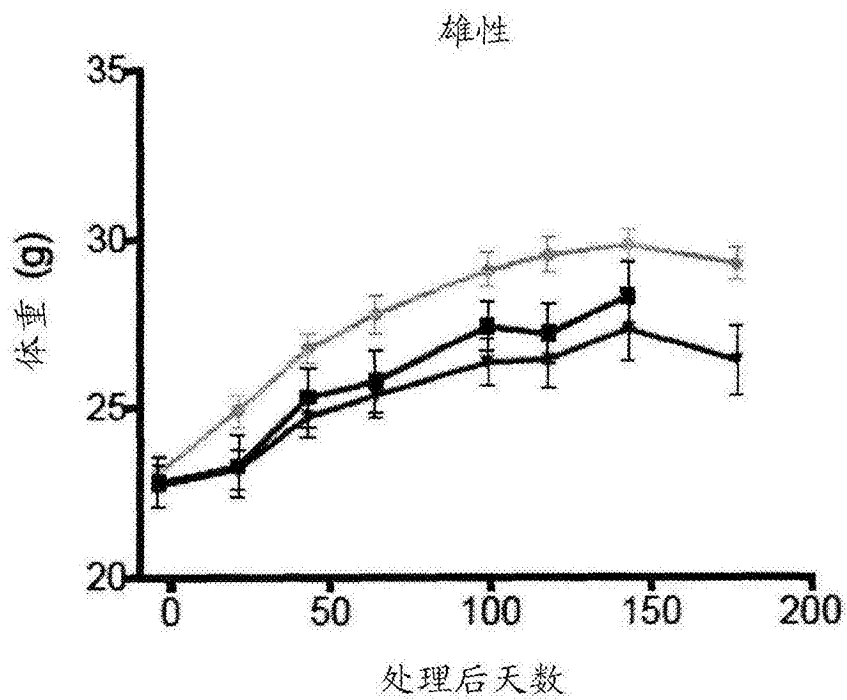


图12B

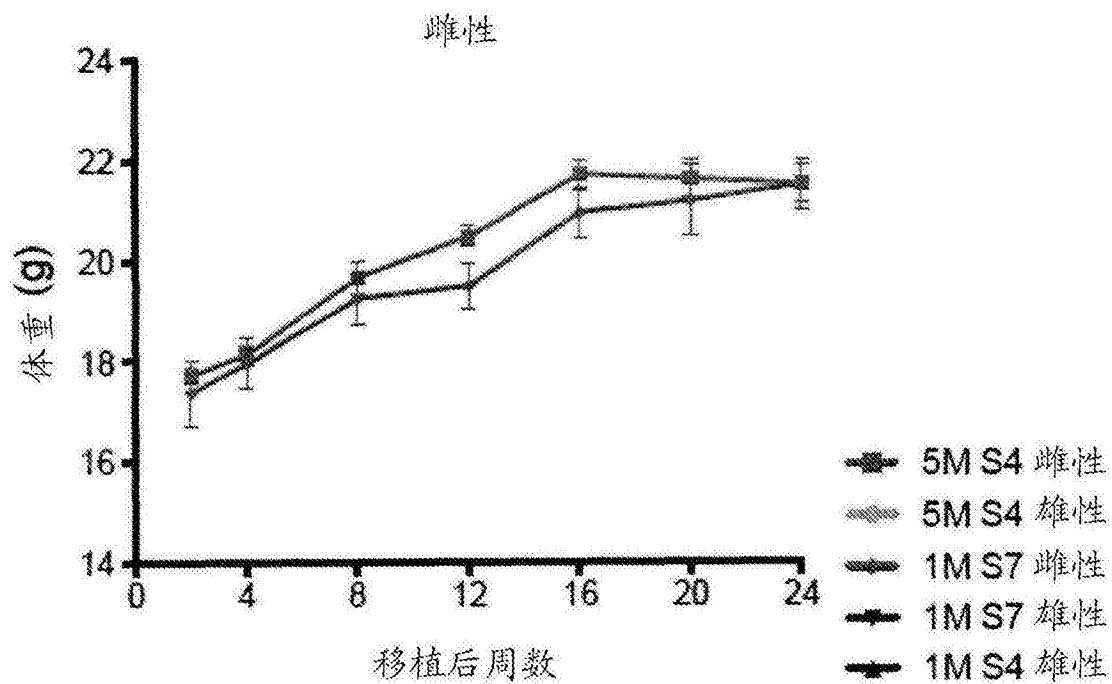


图13A

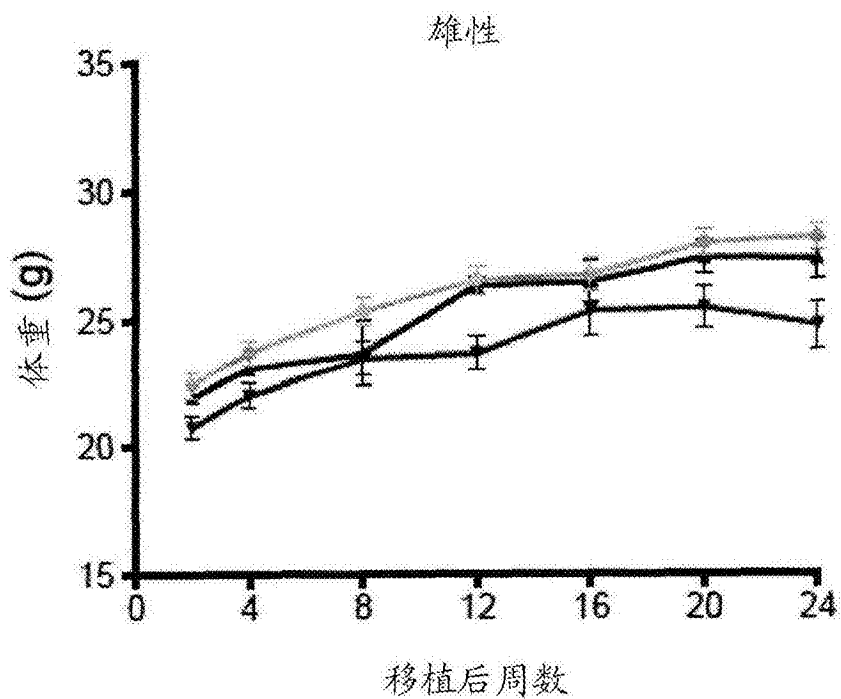


图13B

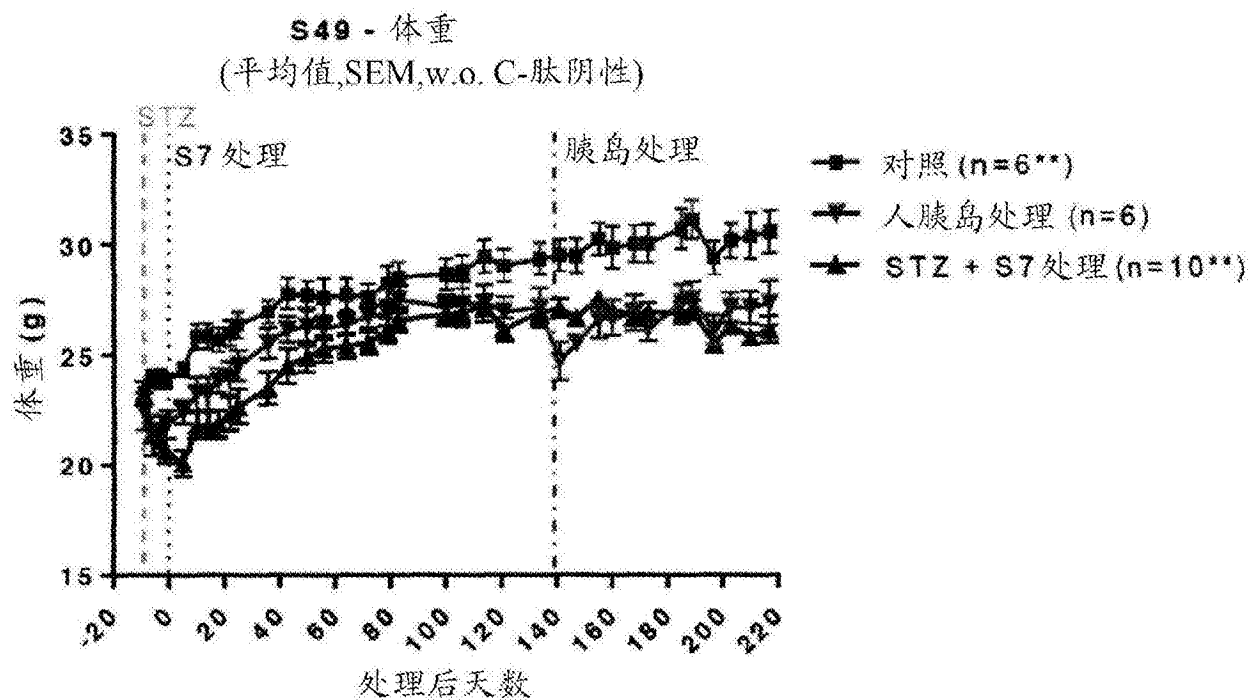


图14A

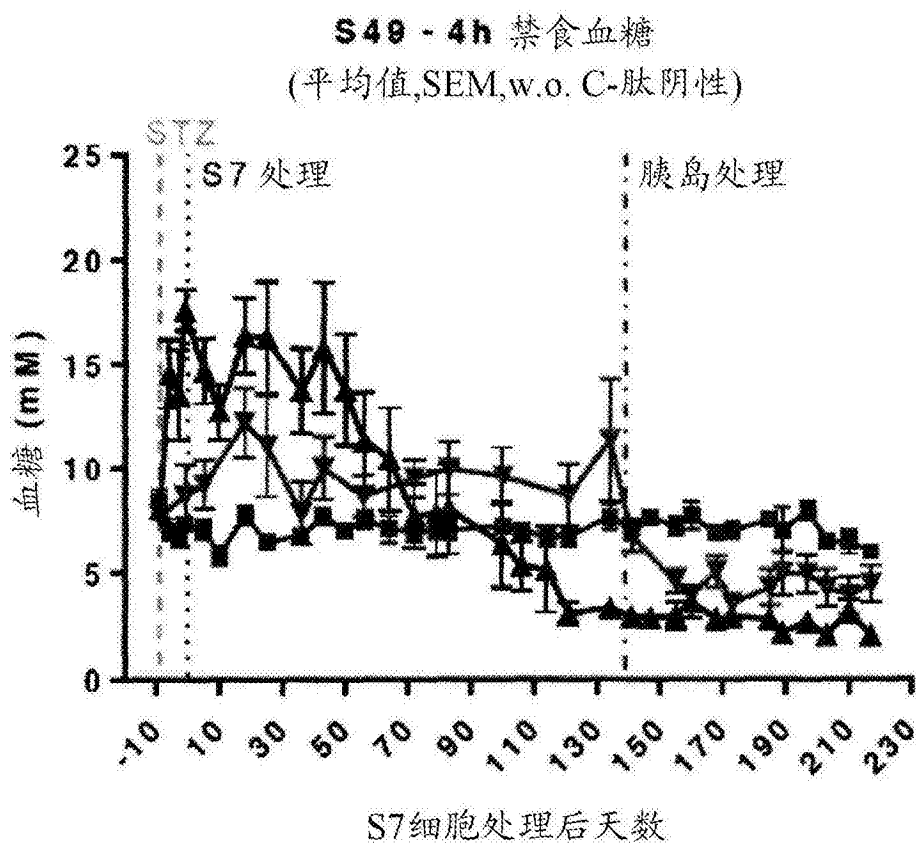


图14B

随机喂养小鼠瘦素(平均值)

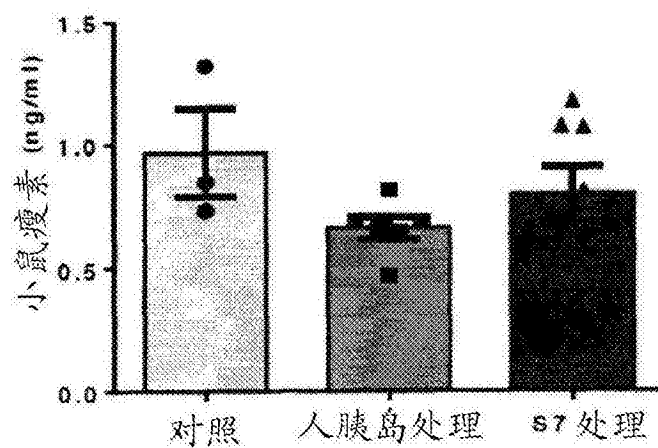


图15A

来自Dexa的脂肪质量(g)

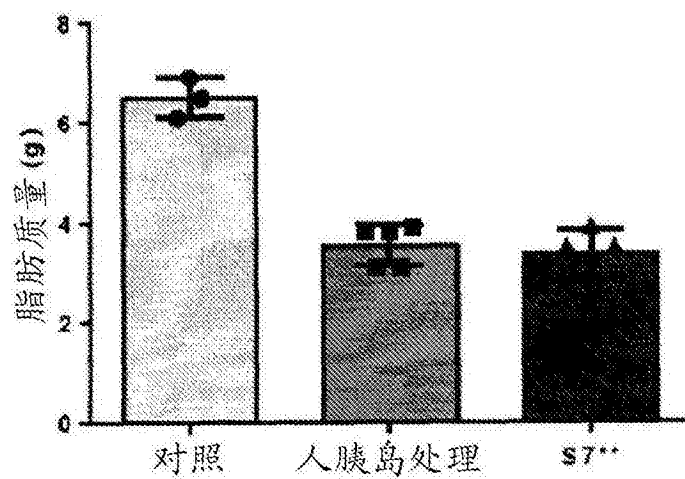


图15B

随机喂养小鼠瘦素(平均值, 除以脂肪克数)

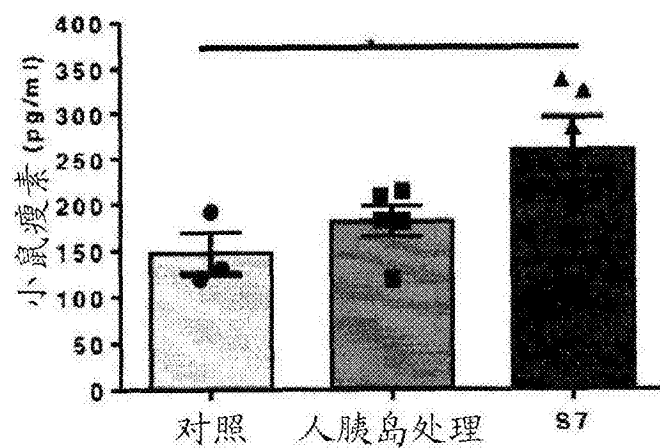


图15C

瘦体质量

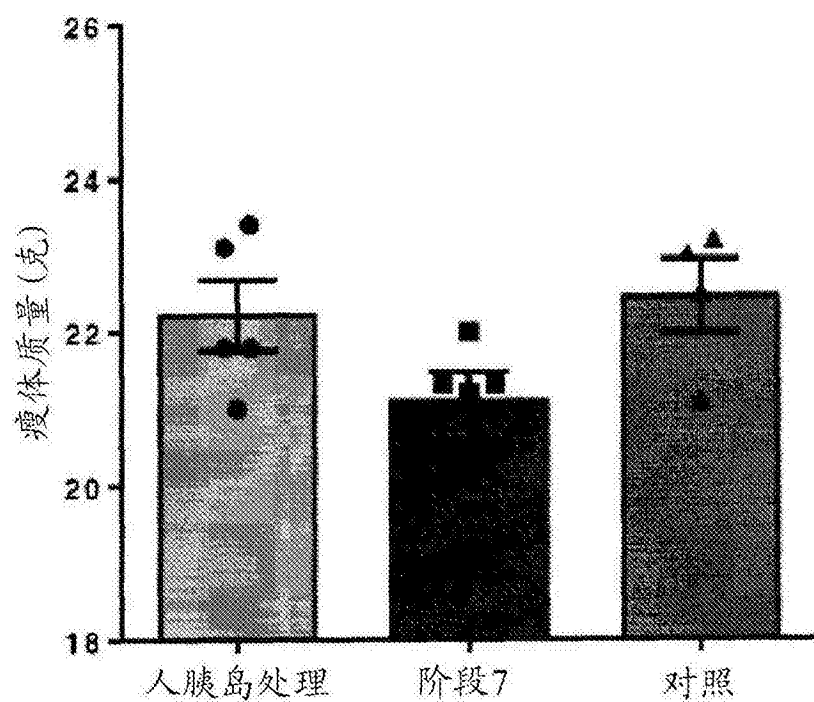


图16A

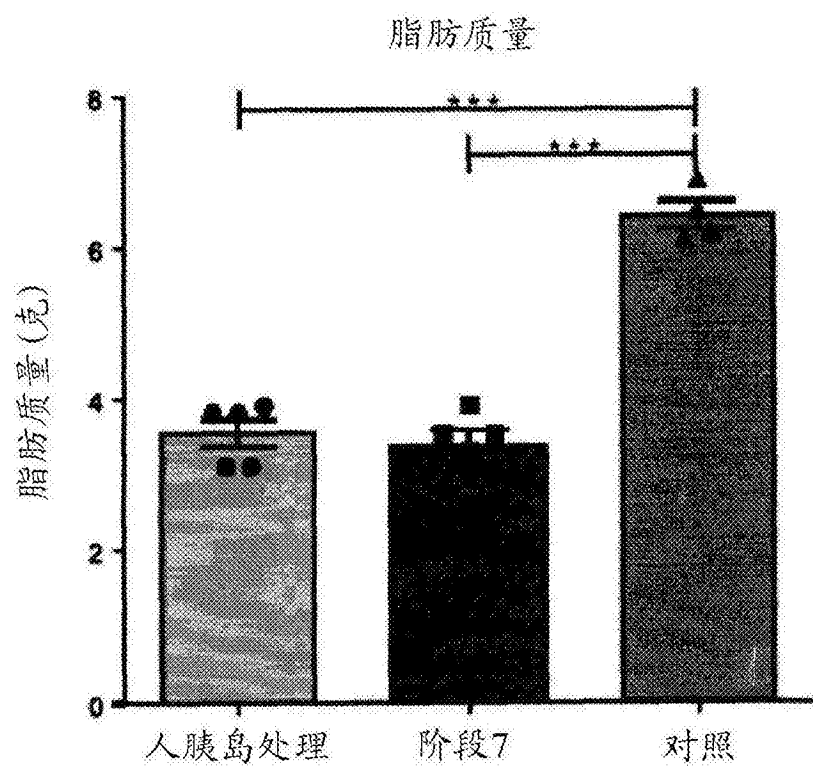


图16B

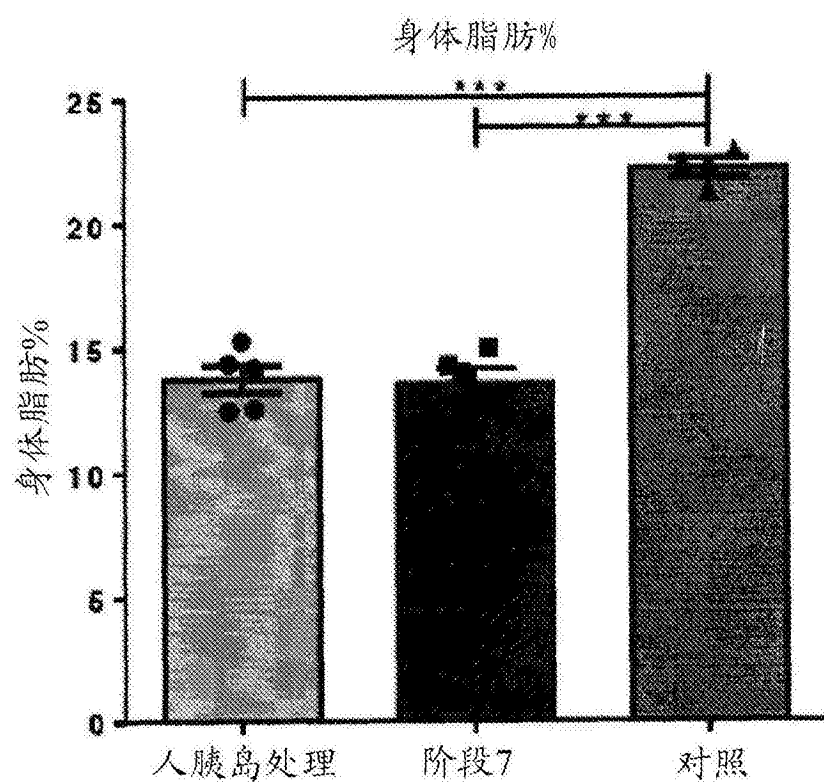


图16C

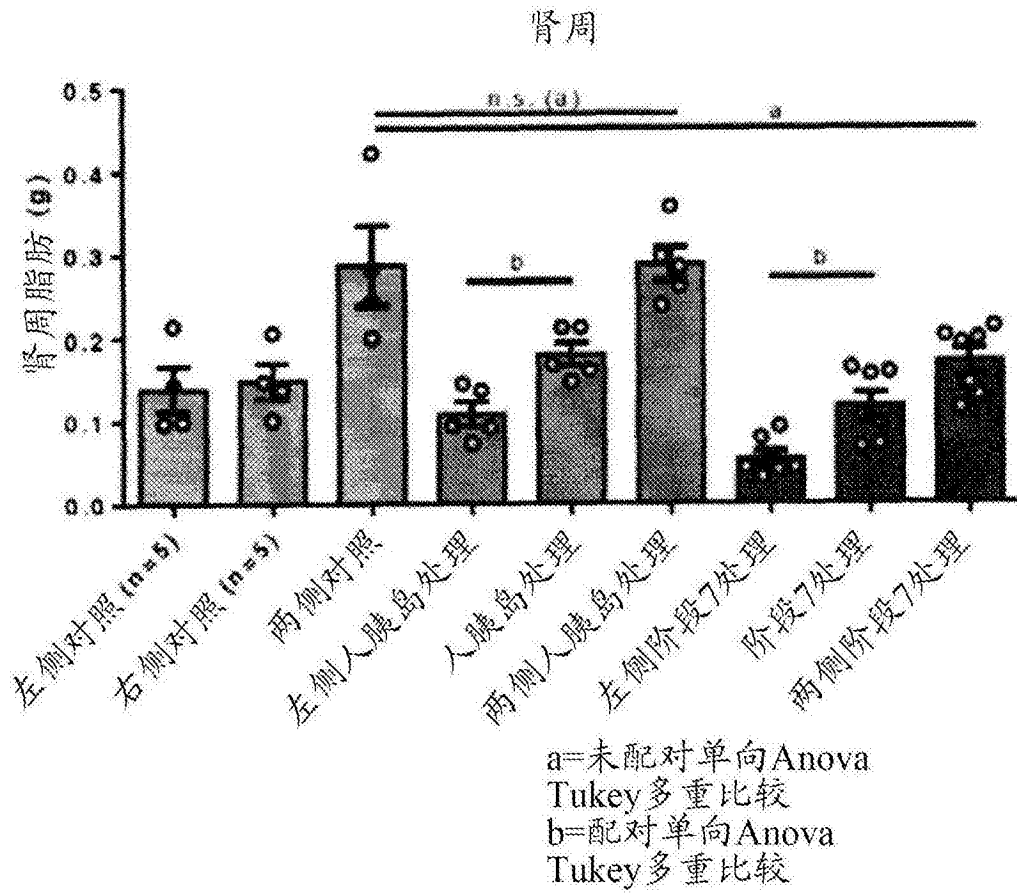


图17A

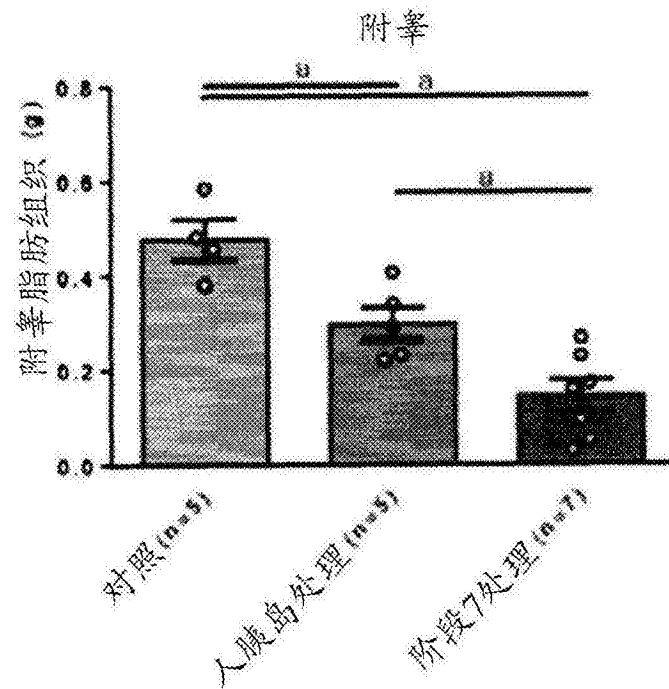


图17B

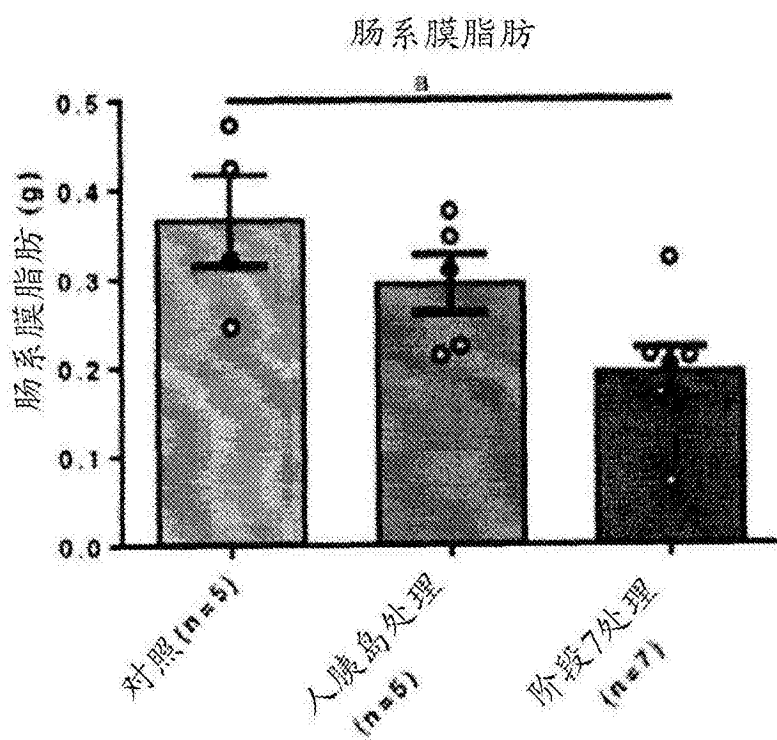


图17C

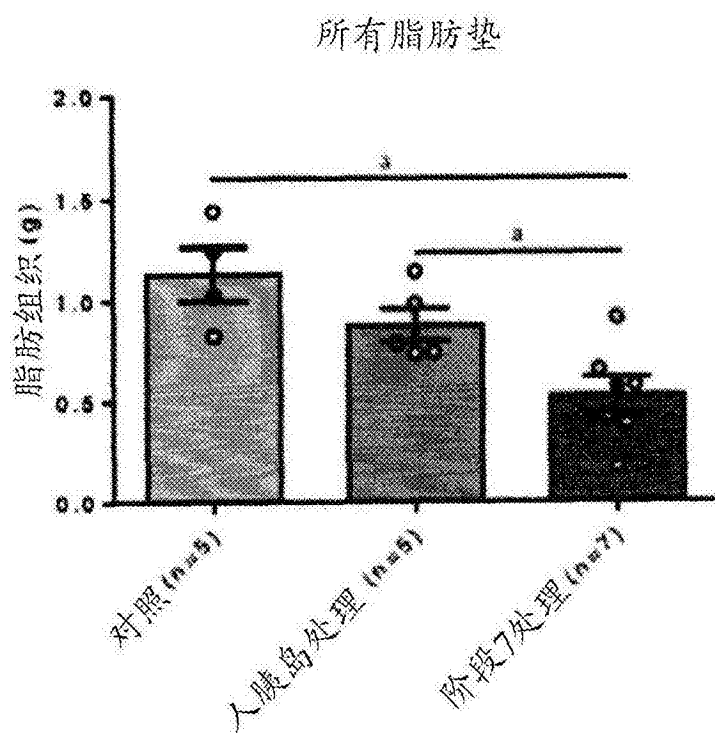


图17D

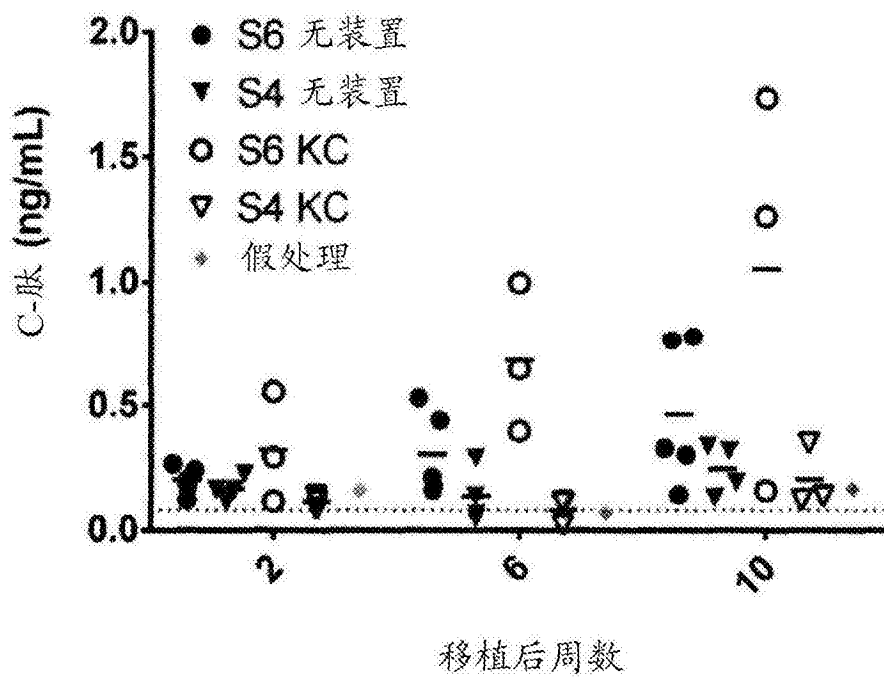


图18A

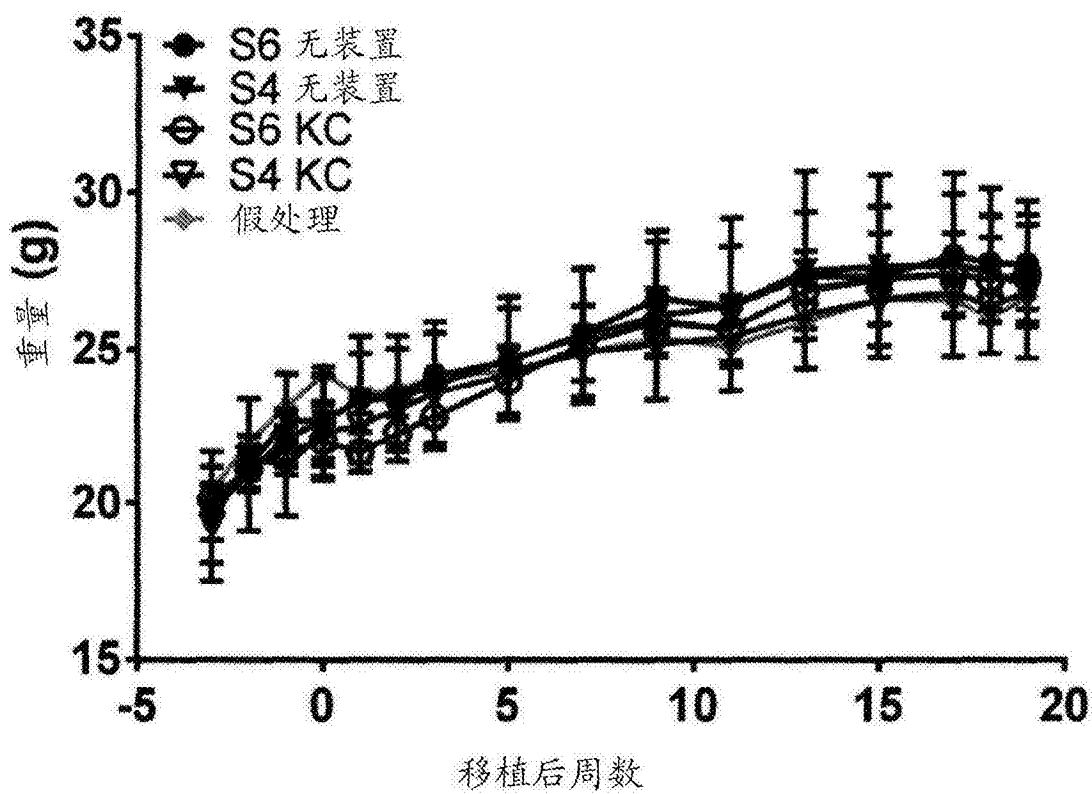


图18B

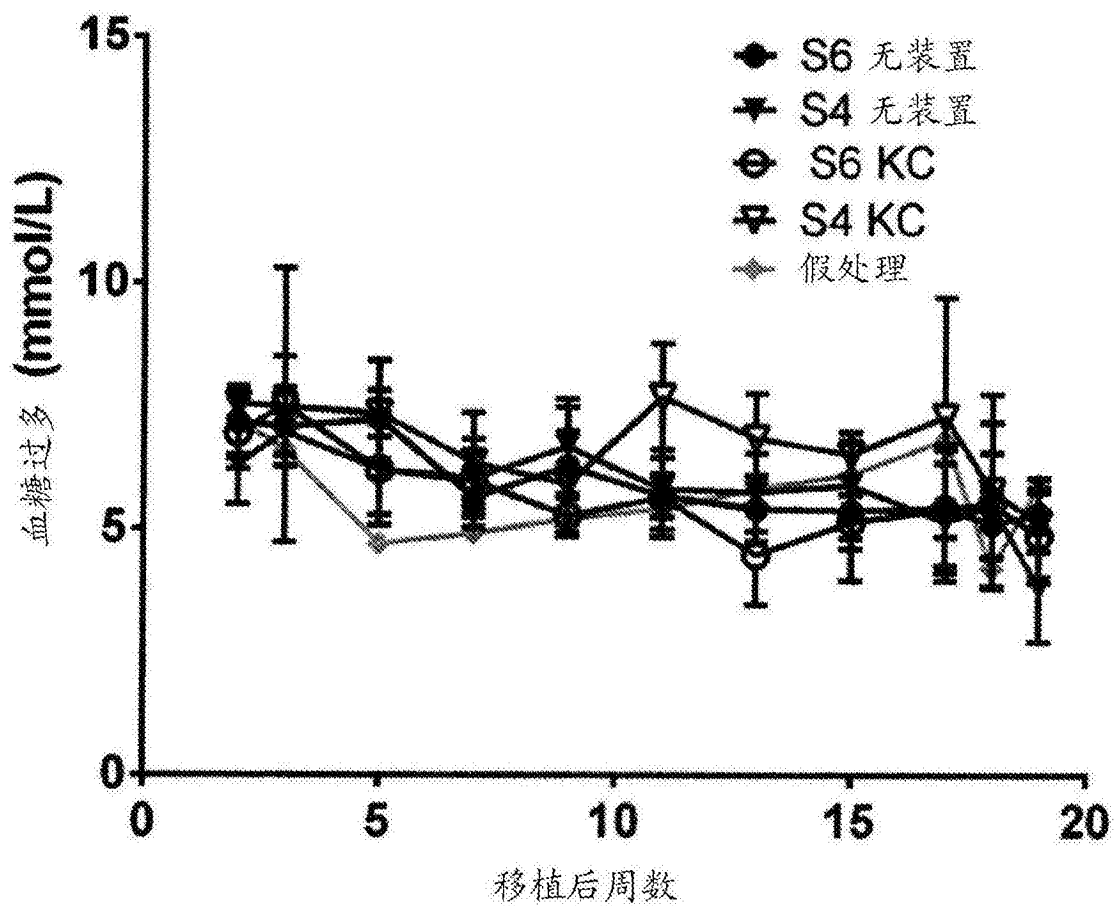


图18C

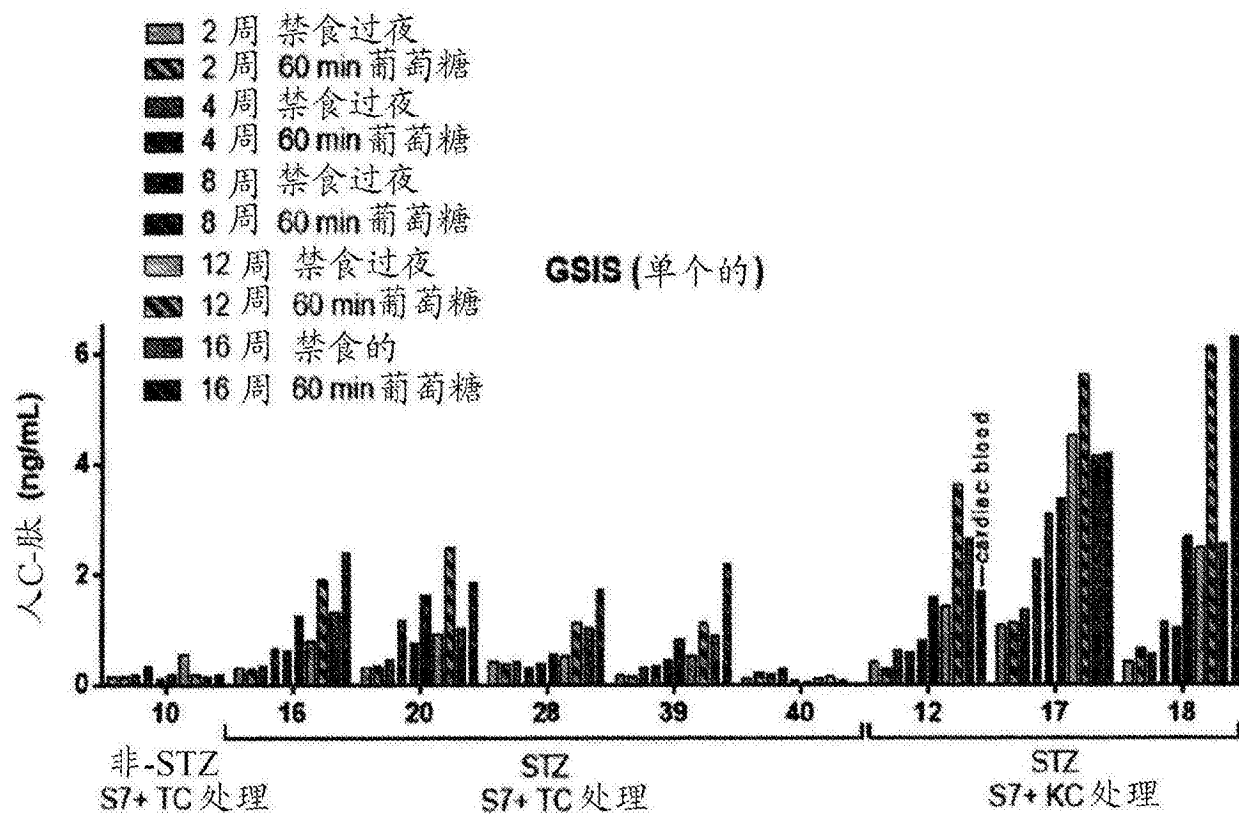


图19

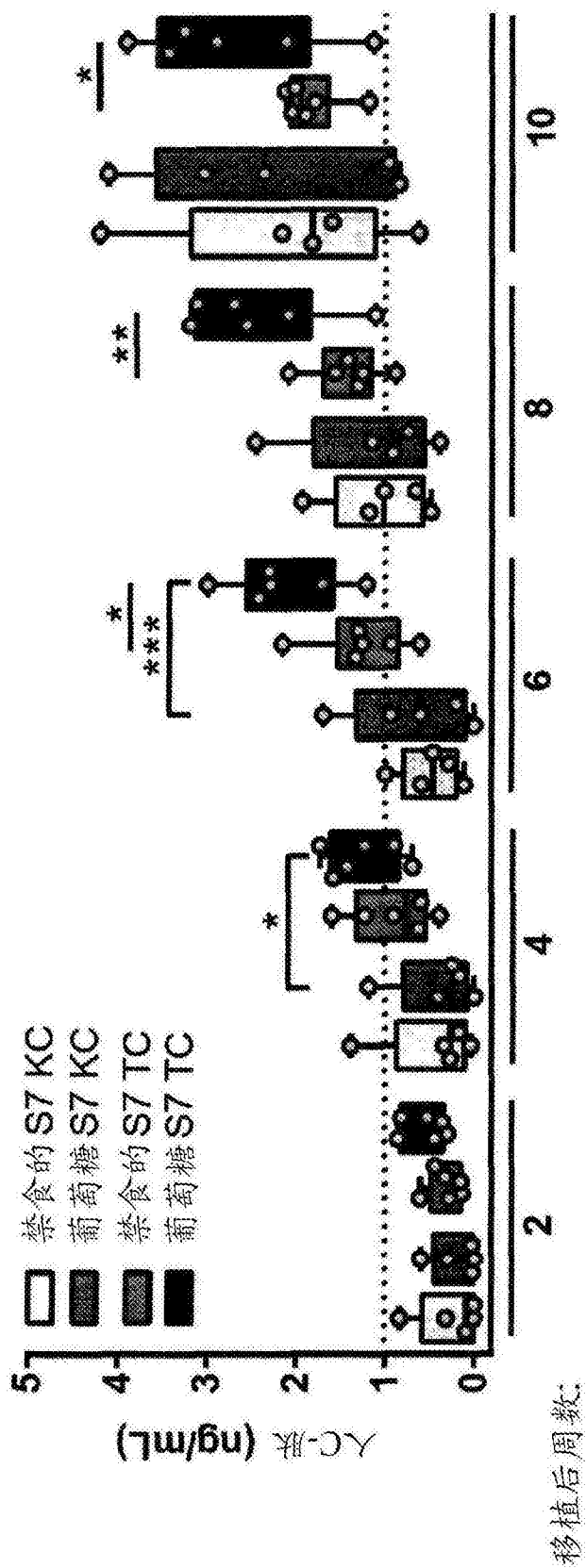


图20