



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101310012 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 09

(21) 申请号 200680038298. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2006. 10. 16

C12N 5/06 (2006. 01)

(30) 优先权数据

审查员 黎舒婷

60/726, 750 2005. 10. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 04. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/040212 2006. 10. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02007/047509 EN 2007. 04. 26

(73) 专利权人 明尼苏达大学董事会

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 C·维尔法伊

M·A·布拉杰·维利兹

Y·P·赫曼瑟

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

公司 11285

代理人 张广育 刘文君

权利要求书 4 页 说明书 53 页

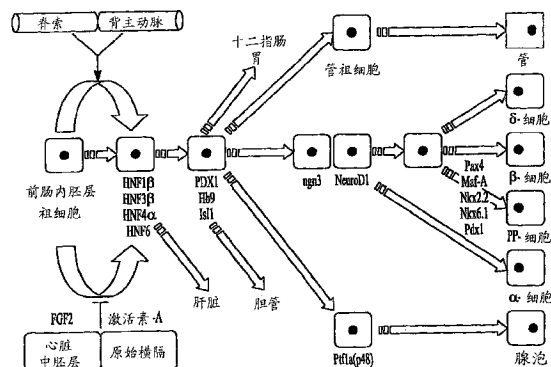
序列表 30 页 附图 14 页

(54) 发明名称

非胚胎干细胞分化成具有胰腺表型的细胞

(57) 摘要

本发明提供将非胚胎多能干细胞向胰腺谱系分化的方法。本发明进一步提供非胚胎多能干细胞及其衍生的子代,从而为受试者提供胰腺细胞。



1. 一种方法,所述方法包含将表达 Oct-4 和端粒酶且可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂和一种第二试剂相接触以产生 Pdx-1 表达升高的细胞,其中所述第一试剂是激活素 A,所述第二试剂抑制音猬因子 (SHH) 活性。

2. 权利要求 1 的方法,所述方法进一步包含将所述非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与 BMP4 相接触。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,所述方法进一步包含将 Pdx-1 表达升高的细胞与 EGF 和 / 或 HGF 相接触,以产生 Ngn3 表达升高的细胞。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述的 Ngn3 表达升高的细胞的 NeuroD 表达也升高。

5. 权利要求 3 的方法,所述方法进一步包含将所述的 Ngn3 表达升高的细胞与烟酰胺和 / 或 exendin4 相接触以产生表达胰岛素的细胞。

6. 权利要求 5 的方法,其中胰岛素表达量升高且超过所述表达 Ngn3 的细胞的胰岛素表达量。

7. 权利要求 5 的方法,所述方法进一步包含将所述的 Ngn3 表达升高的细胞与 GDF11 和 / 或 β -细胞素相接触。

8. 一种方法,所述方法包含将表达 Ngn3 的细胞与烟酰胺或 exendin4 两者中的一种或与这两者相接触以产生表达胰岛素的细胞,所述表达 Ngn3 的细胞已经通过下述过程制备: (1) 将表达 Oct-4 和端粒酶且可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂和一种第二试剂相接触以产生 Pdx-1 表达升高的细胞,其中所述第一试剂是激活素 A,所述第二试剂抑制音猬因子 (SHH) 活性;以及 (2) 将 Pdx-1 表达升高的细胞与 EGF 和 / 或 HGF 相接触,以产生 Ngn3 表达升高的细胞。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞进一步与 BMP4 相接触。

10. 权利要求 8 的方法,其中所述的 Ngn3 表达升高的细胞进一步与 GDF11 和 / 或 β -细胞素相接触。

11. 权利要求 8 的方法,其中所述的 Ngn3 表达升高的细胞的 NeuroD 表达也升高。

12. 权利要求 8 的方法,其中与烟酰胺或 exendin4 相接触的细胞的胰岛素表达量升高且超过表达 Ngn3 的细胞的胰岛素表达量。

13. 权利要求 8 的方法,其中在将所述细胞与激活素 A 和一种抑制音猬因子活性的试剂接触之前,将所述细胞首先只与激活素 A 接触。

14. 一种使表达 Oct-4 和端粒酶且可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞分化的方法,所述方法包含以下步骤:

a) 将所述的非胚胎干、非生殖且非胚胎生殖细胞与一种第一试剂相接触,其中所述第一试剂是激活素 A,

b) 将步骤 a) 中获得的细胞与激活素 A 和一种第二试剂相接触,其中所述第二试剂抑制音猬因子活性;

c) 将步骤 b) 中获得的细胞与 EGF 和 / 或 HGF 相接触;并

d) 将步骤 c) 中获得的细胞与烟酰胺和 / 或 exendin4 相接触从而产生表达胰岛素的细胞。

15. 权利要求 14 的方法,其中步骤 a)、步骤 b) 或者两者进一步包含将所述细胞与 BMP4 相接触。

16. 权利要求 14 或 15 的方法,其中步骤 d) 进一步包含将所述细胞与 GDF11 和 / 或 β -细胞素相接触。

17. 权利要求 1、8 或 14 的方法,其中所述第二试剂是环巴胺或一种抗 SHH 抗体。

18. 权利要求 5 或 6 的方法,其中所述表达胰岛素的细胞分泌胰岛素、C 肽或者它们的组合。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述胰岛素是胰岛素 -1。

20. 权利要求 1、2 和 8-15 任一项的方法,其中所述非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞是哺乳动物细胞。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

22. 权利要求 20 的方法,其中所述非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞被一种胰腺转录因子转导。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述胰腺转录因子包括 Ngn3、NeuroD1、Pdx-1、Pax4、Ptf1a/p48、Pax6、Nkx6. 1、Nkx2. 2 或它们的组合。

24. 权利要求 22 的方法,其中所述胰腺转录因子包括 Pdx-1、Ngn3 或它们的组合。

25. 权利要求 22 的方法,其中所述接触在体外进行。

26. 一种组合物,所述组合物包含一种第一试剂、一种第二试剂和表达 Oct-4 和端粒酶且可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞,其中所述第一试剂是激活素 A,其中所述第二试剂抑制音猬因子。

27. 权利要求 26 的组合物,所述组合物进一步包含 BMP4。

28. 一种组合物,所述组合物包含 EGF 或 HGF 和通过权利要求 1 的方法制备的 Pdx-1 表达升高的细胞。

29. 一种组合物,所述组合物包含烟酰胺和 / 或 exendin4 和通过权利要求 3 的方法制备的 Ngn3 表达升高的细胞。

30. 权利要求 29 的组合物,所述组合物进一步包含 GDF11 或 β -细胞素这两者中的一种或这两者。

31. 权利要求 26-30 任一项的组合物,其中所述组合物进一步包含细胞培养基或一种可药用的载体。

32. 权利要求 26 的组合物,其中所述第二试剂是环巴胺或一种抗 SHH 抗体。

33. 一种组合物,所述组合物包含通过权利要求 1、8 或 14 的方法制备的细胞以及细胞培养基或一种可药用的载体。

34. 一种组合物,所述组合物包含通过权利要求 5 或 6 的方法制备的表达胰岛素的细胞以及细胞培养基或一种可药用的载体。

35. 一种制备一种组合物的方法,所述方法包含将一种第一试剂、一种第二试剂与表达 Oct-4 和端粒酶且可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞组合,其中所述第一试剂是激活素 A,其中所述第二试剂抑制音猬因子活性。

36. 权利要求 35 的方法,所述方法进一步包含与 BMP4 组合。

37. 一种制备一种组合物的方法,所述方法包含将 EGF 和 / 或 HGF 与通过权利要求 1 的

方法制备的 Pdx-1 表达升高的细胞组合。

38. 一种制备一种组合物的方法,所述方法包含将烟酰胺和 / 或 exendin4 与通过权利要求 3 的方法制备的 Ngn3 表达升高的细胞组合。

39. 权利要求 38 的方法,所述方法进一步包含与 GDF11 和 / 或 β -细胞素组合。

40. 权利要求 35-39 任一项的方法,其中所述方法进一步包含与细胞培养基或一种可药用的载体组合。

41. 一种制备一种组合物的方法,所述方法包含将通过权利要求 5、6 或 14 的方法制备的表达胰岛素的细胞与细胞培养基或一种可药用的载体组合。

42. 权利要求 35 的方法,其中所述第二试剂是环巴胺或一种抗 SHH 抗体。

43. 表达 Oct-4 和端粒酶且可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞用于制备一种为有需要的受试者提供胰腺细胞的组合物的用途,其中所述非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞经一种方法处理,所述方法包含:

将所述非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂和一种第二试剂相接触以产生 Pdx-1 表达升高的细胞,其中所述第一试剂是激活素 A,其中所述第二试剂抑制音猬因子 (SHH) 活性。

44. 权利要求 43 的用途,所述方法进一步包含将非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与 BMP4 相接触。

45. 权利要求 44 的用途,所述方法进一步包含,在给予所述受试者之前,将 Pdx-1 表达升高的细胞与 EGF 和 / 或 HGF 相接触,以产生 Ngn3 表达升高的细胞。

46. 权利要求 45 的用途,所述方法进一步包含,将 Ngn3 表达升高的细胞与烟酰胺和 / 或 exendin4 相接触,以产生表达胰岛素或者胰岛素表达升高的细胞。

47. 权利要求 46 的用途,所述方法进一步包含将 Ngn3 表达升高的细胞与 GDF11 和 / 或 β -细胞素相接触。

48. 表达 Oct-4 和端粒酶且可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞用于制备一种为有需要的受试者提供表达胰岛素的细胞的组合物的用途,其中所述非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞经一种方法处理,所述方法包含:

a) 将所述非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂相接触,其中所述第一试剂是激活素 A;

b) 将步骤 a) 中获得的细胞与激活素 A 和一种第二试剂相接触,其中所述第二试剂抑制音猬因子活性;

c) 将步骤 b) 中获得的细胞与 EGF 和 / 或 HGF 相接触;并

d) 将步骤 c) 中获得的细胞与烟酰胺和 / 或 exendin4 相接触以产生表达胰岛素或胰岛素表达升高的细胞。

49. 权利要求 48 的用途,其中所述步骤 a)、步骤 b) 或者两者都进一步包含与 BMP-4 相接触。

50. 权利要求 48 的用途,其中所述步骤 d) 进一步包含与 GDF11 和 / 或 β -细胞素相接触。

51. 权利要求 43-48 任一项的用途,其中所述受试者是一种哺乳动物。

52. 权利要求 51 的用途,其中所述哺乳动物是人。

53. 权利要求 51 的用途,其中所述受试者具有一种胰腺的病症或损伤。

54. 权利要求 53 的用途,其中所述病症包括糖尿病、肥胖症、胰腺闭锁、胰腺炎症、 α 1- 抗胰蛋白酶缺乏症、遗传性胰腺炎、胰腺癌、胰酶缺乏症或高胰岛素血症。

55. 权利要求 54 的用途,其中所述糖尿病是 I 型或者 II 型糖尿病。

56. 权利要求 53 的用途,其中所述损伤由物理创伤、化学品、辐射、衰老、疾病或它们的组合引起。

57. 权利要求 1-25 任一项的方法制备的细胞在制备一种治疗一种胰腺的病症或损伤的药剂中的用途。

58. 权利要求 26-34 任一项的组合物在制备一种治疗一种胰腺的病症或损伤的药剂中的用途。

59. 由权利要求 35-42 任一项的方法制备的组合物在制备一种治疗一种胰腺的病症或损伤的药剂中的用途。

60. 权利要求 57-59 的用途,其中所述胰腺的病症包括糖尿病、肥胖症、胰腺闭锁、胰腺炎症、 α 1- 抗胰蛋白酶缺乏症、遗传性胰腺炎、胰腺癌、胰酶缺乏症或高胰岛素血症。

61. 权利要求 60 的用途,其中所述糖尿病是 I 型或者 II 型糖尿病。

62. 权利要求 57-59 的用途,其中所述损伤由物理创伤、化学品、辐射、衰老、疾病或它们的组合引起。

63. 权利要求 57-62 的用途,其中所述药剂进一步包含一种生理上可接受的载体。

64. 权利要求 4 的方法,所述方法进一步包含将所述的 Ngn3 表达升高的细胞与烟酰胺和 / 或 exendin4 相接触以产生表达胰岛素的细胞。

65. 权利要求 43 的用途,所述方法进一步包含,在给予所述受试者之前,将 Pdx-1 表达升高的细胞与 EGF 和 / 或 HGF 相接触,以产生 Ngn3 表达升高的细胞。

非胚胎干细胞分化成具有胰腺表型的细胞

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求以 2005 年 10 月 14 日提交的序列号为 60/726,750 的美国临时申请作为优先权基础;本申请也为 2005 年 3 月 21 日提交的序列号为 11/084,256 的美国申请的部分继续申请;美国申请 11/084,256 为 2002 年 2 月 1 日提交的序列号为 10/048,757(现在是编号为 7,015,037 的授权的美国专利)的美国申请的继续申请;美国申请 10/048,757 为 2000 年 8 月 4 日提交的并且于 2001 年 2 月 15 日作为 WO 01/11011 以英文公布的 PCT/US00/21387 的美国国家阶段申请;依据 U.S.C. 35 第 119(e) 条, PCT/US00/21387 要求以 1999 年 8 月 5 日提交的序列号为 60/147,324 和 1999 年 11 月 10 日提交的序列号为 60/164,650 的美国临时申请作为优先权基础,并且该申请是 2003 年 8 月 11 日提交的序列号为 10/467,963 的美国申请的部分继续申请;美国申请 10/467,963 是 2002 年 2 月 14 日提交并于 2002 年 8 月 22 日作为 WO 02/064748 以英文公布的 PCT/US02/04652 的美国国家阶段申请;依据 U.S.C. 35 第 119(e) 条, PCT/US02/04652 要求以 2001 年 2 月 14 日提交的序列号为 60/268,786、2001 年 2 月 15 日提交的序列号为 60/269,062、2001 年 8 月 7 日提交的序列号为 60/310,625 和 2001 年 10 月 25 日提交的序列号为 60/343,836 的美国临时申请作为优先权基础,这些申请、专利和公布的内容通过引用的方式将它们的全文纳入本说明书中。

[0003] 政府权利说明

[0004] 本发明的完成得到来自美国国立卫生研究院的编号为 U19DK61244 的美国国家拨款的政府资助。政府对本发明享有某些权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及非胚胎多能干细胞领域,具体地涉及非胚胎多能干细胞提供胰腺细胞的用途以及产生和使用它们的方法。

背景技术

[0006] 胰腺

[0007] 胰腺是一个位于腹腔的左上侧背面的狭长锥形器官。从解剖学上描述,它包含三个主要部分,包括一个头部(位于十二指肠附近的最宽的末端)、一个主体和一个尾部(位于脾脏附近的细端)。这个器官包含两种主要的组织类型:外分泌组织——包括腺泡细胞和导管细胞;以及内分泌组织——包括产生递送到血流中的激素(即胰岛素)的细胞。所述胰腺外分泌部分构成大约 95% 的胰腺质量,它为一种包含锥状分泌细胞簇(被称为腺泡)的泡腺,所述锥状分泌细胞产生消化酶(即淀粉酶、脂肪酶、磷脂酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、氨肽酶、弹性蛋白酶和各种其他蛋白质)。通过由立方导管细胞构成的导管将这些酶递送到消化系统,立方导管细胞还因消化目的而产生碳酸氢盐。位于分泌腺泡和管状导管之间的是被称为泡心细胞的连接细胞成分。

[0008] 所述内分泌胰腺部分仅构成大约 1-2% 的胰腺质量,包含被称为朗格汉斯胰岛

(胰岛细胞负责通过分泌胰岛素维持血糖水平)的激素产生细胞簇。这些簇由至少七种细胞类型组成,包括但不限于产生胰岛的 β 细胞、产生胰高血糖素的 α 细胞、产生促生长素抑制素的 δ 细胞和产生胰多肽的 PP 细胞 (Edlund, H., 2002)。另外,最近描述了一种被称为 ϵ -细胞的内分泌细胞的亚群 (Heller, R. S., et al., 2005)。这些细胞的发现是基于它们产生生长素释放肽 (ghrelin), 生长素释放肽是一种已知由消化道的肠内分泌细胞分泌的食欲刺激肽。

[0009] 内分泌胰腺和 β 细胞分化的转录级联

[0010] 内胚层特化、前肠和中肠内胚层特化和随后的胰特化通过补充转录因子调控 (图 1)。具体地说,小鼠中初始内胚层的特化涉及 Sox17 (Kanai-Azuma, M. et al., 2002) 以及 Gata-5 和 Gata-6 (Weber, H. et al., 2000; Bossard, P. 和 Zaret, K. S. 1998) 和 Mixer/Mix. 3 (Henry, G. L. 和 Melton, D. A. 1998) 的表达。其次,预期的前肠和中肠内胚层发育需要肝细胞核因子 Hnf3 β /Foxa2 (Ang, S. L., et al., 1993)。接着,其他转录因子使所述前肠和中肠内胚层定向到肝内胚层、甲状腺内胚层、肺内胚层、胃内胚层、十二指肠内胚层和胰内胚层。

[0011] 在 小 鼠 中, 胰 部 分 地 是 来 自 腹 侧 和 背 侧 前 肠 内 胚 层, 腹 侧 和 背 侧 前 肠 内 胚 层 随 后 融 合 形 成 成 熟 器 官。胰 腺 定 向 与 转 录 因 子 Hlxb9 和 Pdx-1 表 达 有 关。Hlxb9 (Hentsch, B. et al., 1996) 或 Pdx-1 (Offield, M. F. et al., 1996) 的缺失会分别导致背胰或整个胰发育不全, 尽管在 Pdx-1 缺陷的胚胎中可以检测到背胰芽。在 Hlxb9 缺陷型胚胎中, 腹胰的形成相对正常, 然而背胰特化有缺陷。

[0012] 这些表型说明, 背胰和腹胰的初始特化之间是不同的。因为不管去除两个转录因子的哪一个都会形成胰芽, 所以在 Hlxb9 或 Pdx-1 表达之前可能存在胰定向的其他信号。进一步的外分泌胰腺定向和内分泌胰腺定向分别与 Ptf1a/p48 (Ahlgren, U. et al., 1998) 和 Ngn3 (Gradwohl, G. et al., 2000) 的表达有关。众所周知地, 在更早期即在腹胰芽的特化过程中也似乎需要 Ptf1a/p48, (Kawaguchi, Y. et al., 2002)。胰腺内胚层特化需要 Pdx-1, 与之类似, 胰腺内胚层特化成内分泌谱系需要 Ngn3, 并且内分泌细胞被认为衍生自 Ngn3 表达细胞。Ngn3 也在中枢神经系统 (CNS) 中表达, 并且将这个转录因子缺失不仅影响内分泌胰腺的发育, 而且还影响神经系统的发育。体内进一步的 β -细胞定向与 Pax4 (Sosa-Pineda, B. et al., 1997)、Pax6 (Sander, M. et al., 1997)、Nkx2. 2 (Sussel, L. et al., 1998; 人 mRNA 序列的登记号 NM_002509) 和 Nkx6. 1 (Sander, M. et al., 2000) 的表达相关。

[0013] 内分泌胰腺和 β -细胞分化中的细胞外信号

[0014] 在发育过程中, 内胚层的特化需要多种因子的联合作用, 所述因子包括 TGF β 和 Wnt 家族的成员。Wnt3 在原条和发育中的中胚层中表达, 并且 Wnt3 缺失型小鼠不形成中胚层或内胚层 (Liu, P. et al., 1999)。Nodal 在上胚层和原条的前区表达 (Zhou, X. et al., 1993), 并且与 Wnt3 缺失型胚胎类似, Nodal 缺失型胚胎也不能形成中胚层和内胚层。通过非洲蟾蜍的动物帽分析 (animal cap assay) 也显示出 TGF 家族的另一个成员激活素 A (activin-A) 可以以一种剂量依赖的方式诱导中胚层和内胚层两者的特化, 高浓度的激活素 A 诱导背侧中胚层和内胚层, 低浓度诱导腹侧中胚层 (McDowell, N. et al., 1997)。

[0015] 接着的胰定向和内分泌胰腺定向也由 TGF β 和 Wnt 家族的成员以及 FGF 和刺猬因子 (hedgehog) 家族成员调控。初始内胚层特化需要 Wnt3 等信号, 但与初始内胚层特化相比,

Wnt 家族因子可能会抑制胰腺内胚层的特化。事实上,受 Pdx-1 启动子调控的 Wnt1 或 Wnt5a 的表达可以改变前肠区,现在的前肠区类似于胃的后部伸展部分而不是正常地包含临近的十二指肠,并且伴随着胰腺的缩小或完全发育不全。与这个观察结果一致,可以在小鼠胚胎胰腺中检测到几种 Wnt 信号传导抑制因子,包括 sFRP-1、-2、-3 和 -4 以及 Dkk(Heller, R. S. et al., 2002)。来自腹前肠内胚层以及背前肠内胚层的胰腺定向被音猬因子(sonic hedgehog, SHH)(Hebrok, M. et al., 2000)抑制。通过消除 SHH 受体 Patched(Ptc)可以导致更广泛地分化成胰腺上皮。来自脊索的激活素 A(Maldonado, T. S. et al., 2000)和/或 FGF2(Hardikar, A. A. et al., 2003)信号被认为在前肠内胚层中起到抑制 SHH 表达的作用。

[0016] 在腹肠内胚层中,与肝的特化相比,胰的特化至少部分地由临近的心脏中胚层产生的 FGF2 决定(Jung, J. et al., 1999),FGF2 可抑制胰的特化,但低剂量的 FGF2 对于胰从背前肠内胚层进行分化可能仍很重要(Hardikar, A. A. et al., 2003)。另外,胰的特化和分化受到 Notch 信号传导的调控(Jensen, J. et al., 2000)。去除 Notch 通路的组成成分(例如 Dll-1 或 Hes-1)可以导致加速分化成胰上皮。

[0017] 与胰腺外分泌部分的分化不同,胰腺内分泌部分的分化受内胚层-中胚层相互作用的调节(Gittes, G. K. et al., 1996),并由细胞-细胞外基质(ECM)相互作用和生长因子 BMP 家族的成员(包括激活素和 TGF β)部分地介导。内胚层-中胚层相互作用在胰腺内分泌部分的分化中有双重功能。这些相互作用对于在 E9.5 和 10.5 之间用于诱导胰腺定向很关键,而胰腺定向的内胚层和层粘连蛋白(由间充质产生)之间的相互作用接着会引导分化成一种外分泌表型(Sanvito, F. et al., 1994)。另外,由间充质产生的 TGF β 成员(例如 BMP2)可以阻止内分泌特化,同时在体内有助于胰腺外分泌部分的分化。间充质细胞产生的 FGF(例如 FGF10)也发挥作用。FGF10 似乎在 Pdx-1⁺ 胰祖细胞的增殖中发挥作用(Bhushan, A. et al., 2001)。

[0018] 糖尿病

[0019] 糖尿病是一种以可变且持续的高血糖水平(高血糖症)为特征的医学病症。糖尿病是一种严重的破坏性疾病,它在工业化国家和发展中国家都达到流行性疾病的程度。在 1985 年,全世界有大约三千万人患有糖尿病,在 1995 年增加了一亿三千五百万,并且预计到 2050 年将再增加约 50%。糖尿病在美国是第五大死亡原因。根据美国糖尿病协会(American Diabetes Association),在 2002 年,美国在糖尿病方面的花费是 1320 亿美元,包括 920 亿美元的直接花费。预计这个数字到 2020 年会超过 1900 亿美元。

[0020] 通常,糖尿病可以细分为两种不同类型:1 型糖尿病和 2 型糖尿病。1 型糖尿病的特征是循环的胰岛素很少或没有,并且在儿童或早期青少年中最为常见。它是由胰岛的产生胰岛素的 β -细胞的破坏引起的。为了生存,1 型糖尿病的病人必须每天进行多次胰岛素注射,并且每天多次检测他们的血糖水平。然而,每天多次的胰岛素注射并不能足够地模拟人体中每一分钟的胰岛素的产生和葡萄糖代谢的精确控制。血糖水平经常高于正常值会引起并发症,包括失明、肾衰竭、非愈合外周血管溃疡、过早形成心脏病或中风、坏疽和截肢、神经损害、阳痿,并且它会减少患者的整个预期寿命 10 年至 20 年。

[0021] 2 型糖尿病通常在中年或者中年之后出现,并且特别容易影响那些体重超重的人。在 2 型糖尿病中,在正常情况下需要胰岛素的体细胞失去其敏感性,并且不能正常地对胰岛素产生应答。这种胰岛素抗性在许多年内可以通过胰腺 β -细胞产生过量的胰岛素克

服。然而， β -细胞最终会逐渐地被耗尽，因为为了升高的血糖水平它们不得不产生大大过量的胰岛素。最终，过度工作的 β -细胞会死亡并且停止分泌胰岛素，从而引起血糖同时升高到足够高的水平以至于只能靠外源地注射胰岛素控制。高血压和异常的胆固醇水平通常伴随着 2 型糖尿病。这些病症与高血糖一起会增加心脏病发作、中风和导致截肢的腿部的循环系统阻塞的风险。

[0022] 还存在第三种类型的糖尿病，这种糖尿病是由遗传缺陷引起，所述遗传缺陷例如青春晚期糖尿病 (MODY)。MODY 是由于胰岛素产生细胞中的一种遗传缺陷导致的，这种遗传缺陷限制了所述细胞处理通过一种特殊的葡萄糖受体进入该细胞的葡萄糖的能力。MODY 患者中的 β -细胞不能与葡萄糖正确应答产生胰岛素，从而导致高血糖并且需要治疗，并且所述治疗最终也需要胰岛素注射。

[0023] 现有的对于胰岛素依赖的糖尿病的医学治疗局限于胰岛素给药、胰腺移植（或者是整个胰腺或者是部分胰腺）和胰岛移植。胰岛素治疗远比胰腺移植和胰岛移植更为普遍。然而，对血糖的控制并不简单。虽然需要严格地注意保持健康的饮食、运动疗法和始终注射适当量的胰岛素，但是其他因素也可以不利地影响病人的血糖控制，所述因素包括：应激、激素变化、年龄阶段、疾病或感染和疲劳。糖尿病的病人必须时刻注意威胁生命的血糖过低的（低血糖）和血糖过高的（高血糖）反应。

[0024] 与胰岛素给药相比，全胰腺移植或部分胰腺的移植被认为可以治愈患者的糖尿病。然而，由于需要终生的免疫抑制治疗，通常仅仅当需要肾移植的时候才进行移植，这使得单纯的胰腺移植的手术相对稀少。虽然胰腺移植可以成功地帮助胰岛素依赖型糖尿病的病人将他们的血糖改善至不再需要进行胰岛素注射的水平，并且减少长期并发症，但是全胰腺移植仍有许多缺点。最重要地，进行胰腺移植涉及一项大手术，并且需要终生使用免疫抑制药来预防身体免疫系统对作为异源移植物的胰腺的破坏。如果没有这些药物，所述胰腺在数天内就会被破坏。而服用这些免疫抑制药物的危险是增加感染和肿瘤的发病率，二者都会危及生命。

[0025] 与全胰腺移植相比，胰岛移植是更简单并且更安全的方法，并且通过 β -细胞的替代可以获得相同的效果。然而，缺乏用于移植的胰岛细胞仍然是胰岛细胞移植中一个未解决的问题。因为胰岛仅仅占整个胰腺的大约 2%，从将它们与不产生胰岛的胰腺的其余部分分离开需要花费大约 6 个小时。和以前需要 5-6 个器官进行一次移植相比，虽然已经有自动分离的方法使得可以从一个胰腺中分离出足够的胰岛用于一名患者的移植，但是对胰岛的需求仍然超过现在可以从尸体中获得器官的供应量。另外，经常无法实现对糖尿病症状的长效解决。

[0026] 作为胰岛素注射的替代，胰腺移植和胰岛移植可能会满足巨大的公共健康的需求。

[0027] 干细胞

[0028] 胚胎干 (ES) 细胞具有无限自我更新的能力，且可以分化成为所有的组织类型。ES 细胞来自植入后胚胎的胚泡或原始生殖细胞的内细胞群（胚胎生殖细胞或 EG 细胞）。ES（和 EG）可以通过抗 SSEA 1（小鼠）抗体和抗 SSEA 4（人）抗体的阳性染色来识别。在分子水平上，ES 和 EG 细胞表达这些未分化细胞特有的转录因子。这些转录因子包括 Oct-4 和 rex-1。Rex 的表达依赖于 Oct-4。还发现了 LIF-R（小鼠中）和转录因子 sox-2 和 rox-1。

Rox-1 和 sox-2 也在非 ES 细胞中表达。ES 细胞的另一个标志为存在端粒酶,它为这些细胞提供了在体外无限自我更新的潜力。

[0029] 从可长期扩增的干细胞群中产生功能性胰岛细胞的能力将会提供用于糖尿病患者移植的 β -细胞源。被考虑使用的一种这类的群是胚胎干 (ES) 细胞。当在体外使胚胎干细胞形成胚胎体的时候,可以在内胚层的细胞类型中检测到少量具有 β -细胞特征的细胞。最近的研究已经证明小鼠和人 ES 细胞可以相对特定地分化为肝内胚层或胰腺内胚层。使用高浓度的激活素处理可以使 ES 细胞特化为内胚层 (Kubo, A. et al., 2004)。大量的研究已表明,使用多种不同的策略,可以从 ES 细胞获得胰岛素阳性的细胞 (Lumelsky, N. et al., 2001; Hori, Y. et al., 2002; Soria, B. et al., 2000; Kahan, B. W. et al., 2003)。然而,这些研究中有一些并没有说明所检测到的胰岛素是胰岛素-1 还是胰岛素-2,胰岛素-2 还存在于在神经细胞和胚外内胚层中 (Sipione S., et al., 2004)。另一个复杂的情况是大部分的研究将 ES 细胞培养在含有胰岛素的培养基中,并且几个研究组已经证明细胞可以从这种培养基中吸收胰岛素 (Vaca P. et al., 2005; Rajagopal J. et al., 2003; Hansson M. et al., 2004)。另外一个问题,也是 ES 细胞衍生的 β -样细胞在临床应用中必须克服的问题是未分化的 ES 细胞——即使是少量存在时——形成畸胎瘤的能力 (Bjorklund et al., 2002)。

[0030] 因为糖尿病在全世界达到了一种流行的状态,所以很明显需要新的和治愈性的疗法。尽管出现了作为 1 型糖尿病的潜在治疗方法的胰岛移植,但是供体胰腺的缺乏已经成为一个限制因素。因此,需要一种丰富的、适合临床的细胞源用作胰岛素注射、胰腺移植和胰岛移植的替代疗法。

[0031] “多能成体祖细胞”(MAPC)是可以分化成一种或多种外胚层、内胚层和中胚层细胞类型的非胚胎(非 ES)、非生殖且非胚胎生殖(非 EG)细胞。MAPC 呈端粒酶阳性、Oct-3A (Oct-3/4) 阳性或它们的组合阳性。端粒酶或 Oct-3/4 已经被认为是在未分化状态下的初始产物的基因。端粒酶是无复制性衰老情况的自我更新所需。来自人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物的 MAPC 似乎是唯一迄今为止已知甚至在晚期传代细胞中表达端粒酶活性的正常非恶性体细胞(即非生殖细胞)。在 MAPC 中的端粒的长度不会持续地缩短。MAPC 在核型上是正常的。MAPC 也可以表达 SSEA-4 和 nanog。

[0032] 所述 Oct-4 基因(在人类中为 Oct-3)在人体中可被转录为至少两个剪接变体即 Oct 3A 和 Oct 3B。Oct 3B 剪接变体存在于许多分化细胞中,而有报道称 Oct 3A 剪接变体(以前也称为 Oct 3/4)是未分化的胚胎干细胞特有的 (Shimozaki et al. 2003)。Oct-4(在人类中为 Oct-3)为原肠胚形成前期胚胎、卵裂早期胚胎、胚泡内细胞群细胞和胚胎癌 (EC) 细胞中表达的转录因子 (Nichols J., et al 1998),并且当细胞被诱导分化时下调。Oct-4 的表达在确定胚胎发生和分化的早期步骤方面起到重要作用。Oct-4 与 Rox-1 一起引起锌指蛋白 Rex-1 的转录激活,Oct-4 还是维持 ES 的未分化状态所需的 (Rosfjord and Rizzino A. 1997; Ben-Shushan E., et al. 1998)。此外,也需要 sox-2 与 Oct-4 一起维持 EC/ES 的未分化状态,sox-2 在 ES/EC 和其他更高分化的细胞中表达 (Uwanogho D et al. 1995)。鼠 ES 细胞和原始生殖细胞的维持需要 LIF。

[0033] MAPC 具有体外和体内再生所有的原胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的能力。MAPC 在本文中等同于胚胎干细胞并且不同于间充质干细胞,间质干细胞也是从骨髓中分离的。

已经在各种动物模型（包括小鼠、大鼠和人干细胞对大鼠或 NOD/SCID 小鼠的异种移植）中证明了 MAPC 的生物学潜能 (Reyes, M. and CM. Verfaillie 2001 ;Jiang, Y. et al. 2002)。已经证明了这种细胞群的克隆潜能。将单遗传标记的 MAPC 注射到小鼠的胚泡（植入的胚泡）中并且胚胎发育至足孕 (Jiang, Y. et al. 2002)。对出生后的嵌合体动物的分析显示出所有组织和器官（包括肝脏）发生重建。双染色实验证明，基因标记的 MAPC 促使在这些动物中产生显著比例的明显功能性心肌病。这些动物在胚胎阶段或者在成体阶段都没有表现出任何的心脏异常或不规律。在所有这些动物中都没有观察到异常和器官功能障碍。

[0034] MAPC 能够进行扩大培养且不会失去分化潜能，并且在 NOD-SCID 小鼠中显示出能有效、长期移植并分化为多重发育谱系，并且没有形成畸胎瘤的迹象 (Reyes, M. and CM. Verfaillie 2001)。其中包括内皮谱系分化 (Verfaillie, 2002 ;Jahagirdar, et al. 2001)。

发明内容

[0035] 一个实施方案给出了通过可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型中的至少两种的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞，提供胰岛素表达细胞及其祖细胞的组合物和方法。例如，当可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型中的至少两种的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞接触激活素 A 和一种 SHH 抑制因子的时候，会产生 Pdx-1 表达升高的细胞。当这些 Pdx-1 表达升高的细胞接触 EGF 或 HGF（或者两者同时）的时候，会产生 Ngn3 表达升高的细胞。当这些 Ngn3 表达升高的细胞接触烟酰胺、exendin 或者这两者的时候，会产生胰岛素表达升高的细胞。因此，本发明涉及如下的组合物和方法。

[0036] 一个实施方案提供一种组合物，所述组合物包含一种第一试剂、一种第二试剂和可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型中的至少两种的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞，其中所述第一试剂是激活素 A，其中所述第二试剂抑制音猬因子。所述组合物也可以包含 BMP4。

[0037] 另一个实施方案提供一种组合物，所述组合物包含 EGF 或 HGF 和 Pdx-1 表达升高的细胞，其中所述的 Pdx-1 表达升高的细胞的制备是通过将可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型中的至少两种的、非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂、一种第二试剂和——任选地——BMP4 相接触以产生 Pdx-1 表达升高的细胞来实现的，其中所述第一试剂是激活素 A，其中所述第二试剂抑制音猬因子 (SHH) 活性。

[0038] 另一个实施方案提供一种组合物，所述组合物包含烟酰胺或 exendin4 这两者中的一种或这两者和 Ngn3 表达升高的细胞，其中 Ngn3 表达升高的细胞的制备通过以下方法实现：a) 将可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型中的至少两种的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂、一种第二试剂；和——任选地——BMP4 相接触以产生 Pdx-1 表达升高的细胞，其中所述第一试剂是激活素 A，其中所述第二试剂抑制音猬因子 (SHH) 活性；并 b) 将所述的 Pdx-1 表达升高的细胞与 EGF 或 HGF 接触以产生 Ngn3 表达升高的细胞。在一个实施方案中，所述组合物进一步包含 GDF11 或 β -细胞素 (betacellulin) 这两者中的一种或这两者。

[0039] 另一个实施方案提供一种组合物，所述组合物包含细胞培养基或一种可药用的载体和表达胰岛素或者胰岛素表达升高的细胞，所述细胞的制备是通过以下方法实现的：a)

将可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型中的至少两种的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂、一种第二试剂和——任选地——BMP4 相接触以产生 Pdx-1 表达升高的细胞,其中所述第一试剂是激活素 A,其中所述第二试剂抑制音猬因子 (SHH) 活性, b) 将所述的 Pdx-1 表达升高的细胞与 EGF 或 HGF 接触以产生 Ngn3 表达升高的细胞,并 c) 将 Ngn3 表达升高的细胞与烟酰胺或 exendin4 这两者中的一种或这两者相接触以产生表达胰岛素的细胞。在一个实施方案中,将所述的 Ngn3 表达升高的细胞与 GDF11 或 β -细胞素的一种或多种相接触。

[0040] 在一个实施方案中,所述组合物包含细胞培养基或可药用的载体(例如一种可药用的介质)。例如,一个实施方案提供了一种包含 Pdx-1 表达升高或 Ngn3 表达升高的细胞和细胞培养基或一种可药用的载体(例如一种可药用的介质)。在一个实施方案中,所述第二试剂是环巴胺(cyclopamine)或一种抗 SHH 抗体。

[0041] 一个实施方案提供了一种方法,所述方法包含将可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型中的至少两种的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂和一种第二试剂相接触以产生 Pdx-1 表达升高的细胞,其中所述第一试剂是激活素 A,其中所述第二试剂抑制音猬因子 (SHH) 活性。在一个实施方案中,所述的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞还与 BMP4 相接触。

[0042] 在一个实施方案中,将 Pdx-1 表达升高的细胞与 EGF 或 HGF 接触以产生 Ngn3 表达升高的细胞。在另一个实施方案中,Ngn3 表达升高的细胞中的 NeuroD 表达也升高。

[0043] 在一个实施方案中,将 Ngn3 表达升高的细胞与烟酰胺或 exendin4 这两者的一种或这两者相接触以产生表达胰岛素的细胞。在一个实施方案中,所述胰岛素表达量升高且超过所述表达 Ngn3 的细胞的表达量。在一个实施方案中,将所述 Ngn3 表达升高的细胞与 GDF11 或 β -细胞素这两者中的一种或这两者相接触。

[0044] 一个实施方案提供了将可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型中的至少两种的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞分化的方法,所述方法包含以下步骤:a) 将所述的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂相接触,其中所述第一试剂是激活素 A(持续大约 1 天至大约 9 天或更长,包括大约 3 天或大约 6 天);b) 将步骤 a) 中获得的细胞与激活素 A 和一种第二试剂相接触,其中所述第二试剂抑制音猬因子活性(持续大约 1 天至大约 9 天或更长,包括大约 3 天或大约 6 天);c) 将步骤 b) 中获得的细胞与 EGF 或 HGF 相接触(持续大约 1 天至大约 9 天或更长,包括大约 6 天);和 d) 将步骤 c) 中获得的细胞与烟酰胺或 exendin4 这两者中的一种或这两者相接触(持续大约 1 天至大约 9 天或更长,包括大约 6 天)以产生表达胰岛素的细胞。在一个实施方案中,步骤 a)、步骤 b) 或者两者进一步包含将所述细胞与 BMP4 相接触。在另一个实施方案中,步骤 d) 进一步包含将所述细胞与 GDF11 或 β -细胞素这两者中的一种或这两者相接触。在一个实施方案中,所述第二试剂是环巴胺或一种抗 SHH 抗体。

[0045] 在一个实施方案中,在体外(例如在培养中)进行所述接触。在一个实施方案中,所述接触是顺序的。在一个实施方案中,所述接触同时发生。在一个实施方案中,所述的表达胰岛素或者胰岛素表达升高的细胞分泌胰岛素(例如胰岛素-1)、C 肽或者它们的组合。

[0046] 在一个实施方案中,所述的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞是哺乳动物细胞(例如人细胞)。在另一个实施方案中,用一种胰腺转录因子转导所述的非胚胎干、非生

殖、非胚胎生殖细胞（或者它们分化的后代）。在一个实施方案中，所述胰腺转录因子包括 Ngn3、NeuroD、Pdx-1、Pax4、Ptf1a/p48、Pax6、Nkx6.1、Nkx2.2 或它们的组合。在另一个实施方案中，所述胰腺转录因子包括 Pdx-1、Ngn3 或它们的组合。

[0047] 一个实施方案提供一种为有需要的受试者提供胰腺细胞的方法，所述方法包含：a) 将可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型中的至少两种的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂和一种第二试剂相接触以产生 Pdx-1 表达升高的细胞，其中所述第一试剂是激活素 A，其中所述第二试剂抑制音猬因子 (SHH) 活性；并 b) 将所述 Pdx-1 表达升高的细胞给予所述受试者，以为之提供胰腺细胞。在一个实施方案中，所述的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞还与 BMP4 相接触。

[0048] 在另一个实施方案中，在给予所述受试者之前，将所述的 Pdx-1 表达升高的细胞与 EGF 或 HGF 接触以产生 Ngn3 表达升高的细胞。

[0049] 在另一个实施方案中，在给予所述受试者之前，将所述的 Ngn3 表达升高的细胞与烟酰胺或 exendin4 这两者中的一种或这两者相接触以产生表达胰岛素或胰岛素表达升高的细胞。在一个实施方案中，将所述的 Ngn3 表达升高的细胞与 GDF11 或 β -细胞素这两者中的一种或这两者相接触。

[0050] 另一个实施方案提供一种为有需要的受试者提供胰岛素表达细胞的方法，所述方法包含：a) 将可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型中的至少两种的非胚胎干、非生殖、非胚胎生殖细胞与一种第一试剂相接触，其中所述第一试剂是激活素 A；b) 将步骤 a) 中获得的细胞与激活素 A 和一种第二试剂相接触，其中所述第二试剂抑制音猬因子活性；c) 将步骤 b) 中获得的细胞与 EGF 或 HGF 相接触；d) 将步骤 c) 中获得的细胞与烟酰胺或 exendin4 这两者中的一种或两种相接触以产生表达胰岛素或胰岛素表达升高的细胞；并 e) 将所述表达胰岛素或胰岛素表达升高的细胞给予所述受试者。在一个实施方案中，步骤 a)、步骤 b) 或者两者进一步包含将所述细胞与 BMP4 相接触。在另一个实施方案中，步骤 d) 进一步包含 GDF11 和 β -细胞素这两者中的一种或两种。

[0051] 在一个实施方案中，所述受试者为哺乳动物（例如人）。在另一个实施方案中，所述受试者具有一种胰腺的病症或损伤。在一个实施方案中，所述病症包括糖尿病、肥胖症、胰腺闭锁、胰腺炎症、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、遗传性胰腺炎、胰腺癌、胰酶缺乏症或高胰岛素血症。在一个实施方案中，所述糖尿病是 I 型或者 II 型糖尿病。在另一个实施方案中，所述损伤由物理创伤、化学品、辐射、衰老、疾病或它们的组合引起。

[0052] 一个实施方案提供了本文公开的方法制备的细胞在制备一种治疗胰腺病症或损伤的药剂中的用途。在一个实施方案中，所述药剂进一步包含一种生理上可接受的载体或细胞培养基。

附图说明

[0053] 图 1 示出了通过补充特定的转录因子对内胚层特化、前肠和中肠内胚层特化和随后的胰腺特化的调节。

[0054] 图 2 示出了低 O_2 小鼠的 MAPC 的表型。在 5% 的 O_2 条件下获取并培养 mMAPC。(A) 某些克隆表达的 Oct-4mRNA 水平是胚胎干细胞表达的 5-40%（比在正常含氧量 (20% O_2) 条件下分离的 MAPC 的水平高 > 1,000 倍）。(B) 这被 Oct-4 蛋白的 FACS 和 Oct-4 的细胞

内染色证实。与 ES 细胞相比, MAPC 可表达 ES 水平的 Oct-4、Rex-1、Fbx15、FoxD3、Egs1、Dnmt31 和 Ecat7, 但是不表达该水平的 Nanog、Sox-2、Fgf4、Utf1、Eras、Ecat1 和 GDF3。低 O_2 获得的小鼠 MAPC 为 Sca1、Thy1、CD34、CD31、I 类和 II 类 MHC、CD44 阴性, 但是为 cKit 阳性。虽然小鼠 MAPC 表达与 ESC 相似水平的 Oct-4 mRNA, 但是它们并不形成胚胎体或者畸胎瘤 (5 只裸鼠的皮肤下植入 5×10^6 个 MAPC)。当在正常氧含量的条件下分离 MAPC 然后转移至 5% 的 O_2 条件下的时候, 没有观察到转录表型或细胞表面表型的变化, 这说明低 O_2 条件下分离选出的是更原始的细胞群, 并且所述表型在体外是不能诱导的。

[0055] 图 3A 示出了一个胰腺分化的方案。3B 和 3C 示出了 MAPC 向胰腺方向分化中应用的各种因子, 以及在所述分化过程中可能表达的各种转录因子。

[0056] 图 4 示出了 MAPC- β -细胞分化培养物的形态学外观。至第 15 天, 在附着层可以看到大片上皮样细胞斑, 其周围是“间质”样细胞。至第 18 天的时候, 这些斑开始形成三维的、形态分明的簇, 并最终出芽至培养上清液中 (21 天)。

[0057] 图 5 示出了向内分泌胰腺分化 21 天的大鼠 MAPC 的 Q-RT-PCR 评估结果。使用图 3A 中描述的顺序的方案, 将大鼠 MAPC 接种于基质胶上。每 3 天收集培养物 (第 18、21 和 24 天的数据仅代表非附着的簇的数据), 提取 RNA, 并且将通过 Q-RT-PCR 测定的转录因子和激素的水平与作为对照的 GAPDH 比较, 并且除了 Ngn-3、Nkx2.2 和 Neuro-D1 之外, 与初始大鼠胰腺中检测到的水平相比较, 而对于 Ngn-3、Nkx2.2 和 Neuro-D1, 与胎鼠 RNA 水平相比较。结果显示为 3 次实验的平均值 $\pm$ SEM。

[0058] 图 6 示出了簇的免疫组织学。上图: 在第 15 和 21 天收集的簇, 用胰蛋白酶解离并且用抗 Pdx-1、c 肽和胰高血糖素抗体染色。下图: 在第 21 天收集的簇, 并且用抗 Pdx-1 和 β -肌动蛋白的抗体进行蛋白质印迹。在两图中均以 RIN 细胞作为对照。

[0059] 图 7 示出了在体外对 18mM 葡萄糖进行应答的 c 肽分泌。用 3nM 葡萄糖培养细胞, 并且从第 16-24 天, 每天向培养物中加入 1h 的 18nM 的葡萄糖的脉冲, 之后收集上清液并且用 ELISA 检测产生的 c 肽。

[0060] 图 8 示出了在 β 样细胞簇上的功能性 K 和 Ca 通道。左侧为一个细胞簇的图像, 在所述细胞簇中加入 fura-2AM 并且将其置于倒置荧光显微镜上进行视频成像。右侧的曲线显示了图像中圆圈标出的区域中的细胞内钙离子的浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 的变化, 该变化通过 fura-2 比率反映。通过将细胞外 K 离子浓度升高至 50mM (从 3mM) 诱导 ($[Ca^{2+}]_i$) 的升高, 并且此升高被 L-型钙通道阻断剂硝苯地平 (nifedipine) (50 μ M) 抑制。

[0061] 图 9 示出了在 SZO 处理的裸鼠中移植可分化内分泌胰腺的大鼠 MAPC。Y 轴表示血糖水平 (mg/dl); x 轴是以天表示的时间。

[0062] 图 10 示出了通过 MAPC 进行的造血重建。六周龄的 NOD-SCID 小鼠在 275cGy 辐射之后接受 1 百万的 Tg-GFP MAPC IV, 并且在抗去唾液酸 GM1 注射 (第 1、11、21 天) 的保护之下进行。在 16 周之后, 处死所述动物。通过 FACS 分析 PB、BM 和脾造血细胞中是否存在供体细胞和它们的谱系分化。1/21 的移植小鼠的代表性实例。

[0063] 图 11 示出了 GFP MAPC 移植的 NOD-SCID 小鼠中的 GFP⁺ 胰岛素⁺ 供体胰岛。六周龄的 NOD-SCID 小鼠在 275cGy 辐射之后接受 1 百万的 Tg-GFP MAPC IV, 并且在抗去唾液酸 GM1 注射 (第 1、11、21 天) 的保护之下进行。在 12 周之后, 处死所述动物。70% 的 PB、BM 和脾造血细胞是 GFP⁺。也存在 7% 的 GFP⁺T 细胞。联合使用抗 -GFP- 抗体和抗胰岛素抗体

对所述动物的胰腺进行分析。显示的是来自相同的胰腺的一个 GFP⁺ 胰岛和一个 GFP⁻ 胰岛。(2 个相同动物之一的实例。)

具体实施方式

[0064] 定义

[0065] 本文使用的以下术语定义为如下的含义：

[0066] “MAPC”为“多能成体祖细胞”的缩写。在本文中它用来指能够产生（分化成）超过一种胚细胞系细胞类型的一种非胚胎干（非 ES）、非生殖、非胚胎生殖（非 EG）细胞。分化后它可以立即形成至少两个胚层（即内胚层、中胚层和外胚层）的细胞谱系。MAPC 相关术语“成体”没有严格限制。它指非胚胎体细胞。

[0067] 术语“多能”是指产生超过一种胚细胞系细胞类型的能力。MAPC 相关术语“多能”没有严格限制。MAPC 能够形成全部三种原始胚层的（即内胚层、中胚层和外胚层）细胞谱系。缩写“MAPC”中所用术语“祖”没有将这些细胞限制为特定的细胞谱系。

[0068] “扩增”是指细胞的繁殖而不分化。

[0069] “祖细胞”是在干细胞分化过程中产生的、具有其终末分化子代细胞的某些而非全部特征的细胞。定义的祖细胞（如“胰腺祖细胞”）被定向到一种细胞系，而不是定向到具体的或终末分化的细胞类型。

[0070] “自我更新”是指生成复制子代细胞的能力，所述子代细胞具有与产生它们的细胞相同的分化潜力。本文中用到的一个相似的术语是“增殖”。

[0071] 一种标记物（如 Pdx-1、Ngn3、NeuroD 或胰岛素 1）的“升高的表达”指（mRNA 和 / 或蛋白）高于亲代细胞（在所述处理（如与激活素 A 相接触）和 / 或多个处理之前的细胞）的每个细胞的平均水平（例如，如果所述亲代细胞不表达一种标记物而所述子代表达，即为表达升高；或者如果所述子代比所述亲代细胞表达的所述标记物更多，也是表达升高）。例如，一种标记物（如 Pdx-1）的升高的表达可以是，与亲代细胞相比（以每个细胞的平均水平为基础），表达升高至最多大约 1.01 倍、大约 1.015 倍、大约 1.02 倍、大约 1.025 倍、大约 1.03 倍、大约 1.035 倍、大约 1.04 倍、大约 1.045 倍、大约 1.05 倍、大约 1.055 倍、大约 1.06 倍、大约 1.065 倍、大约 1.07 倍、大约 1.075 倍、大约 1.08 倍、大约 1.85 倍、大约 1.9 倍、大约 1.95 倍、大约 2 倍（如 2×）、大约 3 倍、大约 4 倍、大约 5 倍、大约 6 倍、大约 7 倍、大约 8 倍、大约 9 倍、大约 10 倍、大约 15 倍、大约 20 倍、大约 25 倍、大约 30 倍、大约 35 倍、大约 40 倍、大约 45 倍、大约 50 倍、大约 55 倍、大约 60 倍、大约 65 倍、大约 70 倍、大约 75 倍、大约 80 倍、大约 85 倍、大约 90 倍、大约 95 倍、大约 100 倍、大约 150 倍、大约 200 倍、大约 250 倍、大约 300 倍、大约 350 倍、大约 400 倍、大约 450 倍、大约 500 倍、大约 600 倍、大约 700 倍、大约 800 倍、大约 900 倍、大约 1,000 倍、大约 2,000 倍、大约 3,000 倍、大约 4,000 倍、大约 5,000 倍、大约 6,000 倍、大约 7,000 倍、大约 8,000 倍、大约 9,000 倍、大约 10,000 倍、大约 15,000 倍、大约 20,000 倍、大约 25,000 倍、大约 30,000 倍、大约 35,000 倍、大约 40,000 倍、大约 50,000 倍、大约 60,000 倍、大约 65,000 倍、大约 70,000 倍、大约 75,000 倍、大约 80,000 倍、大约 85,000 倍、大约 90,000 倍、大约 100,000 倍或更大。

[0072] 一种试剂（如激活素 A，一种抑制 SHH、EGF、HGF、烟酰胺、exendin4、GDF11 或 β -细胞素的试剂）的有效量是指，当单独使用或者与一种或多种其他试剂联合使用的时候，使

所述的细胞有效分化的量。

[0073] “移植”或“植入”是指细胞与所研究的现有组织或位点相接触并将其引入其中的过程。在一个实施方案中,超过约 5%、超过约 10%、超过约 15%、超过约 20%、超过约 25%、超过约 30%、超过约 35%、超过约 40%、超过约 45%、超过约 50%、超过约 55%、超过约 60%、超过约 65%、超过约 70%、超过约 75%、超过约 80%、超过约 85%、超过约 90%、超过约 95%或约 100%的所给予的 MAPC 或其衍生的子代植入到胰腺或其他组织中。

[0074] 持续性是指细胞在体内抵抗排异反应并随时间(例如日、周、月、年)保持或增加数量的能力。因此,通过持续,MAPC 或子代能够占据胰腺或其他组织,或者以例如屏障装置或其他微囊的形式在体内维持。

[0075] “免疫耐受”是指外源(例如同种异体或异种的)组织、器官或细胞在受体受试者体内的存活(按数量和/或时间长度计算)。这种存活通常是对移植受体进行免疫应答能力的抑制,否则所述的免疫应答可能会因引入的外源细胞而发生。免疫耐受可包括以日、周、月或年为单位计算的持续性免疫抑制。NK 介导的免疫耐受包含于免疫耐受的定义之中。该术语也包括移植耐受所述宿主的情况。

[0076] 术语“分离的”是指不与一个或多个细胞或者一个或多个细胞组分相连接的一个或多个细胞,所述一个或多个细胞或者一个或多个细胞组分在体内是与该细胞相连接的。“富集群”指相对于体内或原代培养物中一种或多种其他细胞类型(例如非 MAPC 细胞类型),所研究的细胞(例如 MAPC)的数量的相对增加。

[0077] “细胞因子”是指诱导或增强细胞运动的细胞的因子,所述细胞运动例如 MAPC 或其他干细胞、祖细胞或分化细胞的归巢。细胞因子还可能刺激这类细胞分裂或分化。

[0078] “受试者”或细胞源可以是指脊椎动物,包括哺乳动物,例如人。哺乳动物包括但不限于人、家畜、体育动物和宠物。狗、猫、鱼、沙土鼠、豚鼠、仓鼠、马、兔、猪、小鼠、猴类(如猿、大猩猩、黑猩猩、猩猩)大鼠、绵羊、山羊、牛和鸟均包括在所述术语“动物”中。

[0079] 本文所用的“处理”、“治疗”或“疗法”包括治疗、逆转、预防、改善或抑制损伤或疾病相关病症或者损伤或疾病相关病症的症状。

[0080] “有效量”通常是指能够提供所需的效果的量。例如,有效剂量是足够实现有益或所需效果(包括临床效果)的量。可以分一次或多次给予所述剂量,并且可以包括任何预选量的细胞。关于有效剂量是多少的准确确定应该基于每个受试者的个体因素,包括体型、年龄、所要治疗的损伤或疾病和从损伤发生或疾病发作开始至今的时间。本领域的技术人员,特别是医师,应该能够确定构成有效剂量的细胞数量。剂量可以随给药方式而变化,所述给药方式例如局部的或全身的、单独的或装入胶囊的。所述效果可以是植入或其他临床的边界点,例如糖尿病的逆转或治愈。其他效果可以包括提供 β -细胞、补充内源细胞、引起血管发生和/或提供胰腺祖细胞。

[0081] “共同给药”可以包括两种或多种药剂的依次、同时和/或分开给药。

[0082] 为了在受试者体内提供胰腺细胞,有几种途径是可行的。在一个实施方案中,可以给予 MAPC 并且使得它在体内提供胰腺细胞。如本文所述,这可以通过 MAPC 自身分化或通过其他如内源细胞募集的方法来实现。或者,可以给予更加成熟的细胞,这些细胞是在离体条件下从 MAPC 分化得来的。这类细胞包括所有分化阶段的子细胞,包括能够产生成熟胰腺细胞类型的胰腺祖细胞,不能形成全部的这些类型的定向的祖细胞,和包括 β -细胞在内

的进一步分化的类型。

[0083] 术语“包含”、“包括”及类似的术语具有美国专利法中所述的含义且可表示“含”、“含有”及类似含义。本文所用到的“包含”(including)或“包括”或类似术语意为包括但不限于。

[0084] MAPC

[0085] MAPC是可以分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型的非胚胎(非ES)、非生殖和非胚胎生殖(非EG)细胞。MAPC可以为端粒酶阳性。它们也可以为Oct-3A(Oct-3/4)阳性。在体内,MAPC可以分化形成胰腺细胞,例如 β -细胞。或者,离体时,MAPC可以分化成具有胰腺表型的子代细胞。可以将MAPC或其分化的子细胞给予受试者。

[0086] 美国专利7,015,037(PCT/US 00/21387(以WO 01/11011公布))和序列号为10/467,963(PCT/US 02/04652(以WO 02/064748公布))的美国专利申请中描述了来自骨髓的人MAPC,它们关于MAPC的说明内容通过引用的方式纳入本说明书。已经在其他哺乳动物体内鉴定出MAPC。例如,美国专利7,015,037和序列号为10/467,963的美国专利申请中也描述了鼠MAPC,它们关于鼠MAPC的说明内容通过引用的方式纳入本说明书。10/467,963中也描述了大鼠MAPC,其关于大鼠MAPC的说明内容通过引用的方式纳入本说明书。专利申请PCT/US2005/038979中描述了猪MAPC,其关于猪MAPC的说明内容通过引用的方式纳入本说明书。Clavel et al. (2005)中也描述了食蟹猴(cynomologous monkey)MAPC,其关于食蟹猴MAPC的说明内容通过引用的方式纳入本说明书。

[0087] 分离和生长

[0088] 美国专利7,015,037(PCT/US00/21387(以WO 01/11011公布))和序列号为10/467,963(PCT/US02/04652(以WO 02/064748)公布)的美国专利申请描述了人和小鼠的MAPC分离方法,这些方法以及其中所公开的MAPC的鉴定都通过引用的方式纳入本说明书。

[0089] MAPC最初是从骨髓中分离的,但随后从包括大脑和肌肉在内的其他组织中得到确认(Jiang,Y.,et al.,2002)。因此,MAPC能够从多个来源分离得到,所述来源包括但不限于骨髓、胎盘、脐带和脐带血、肌肉、大脑、肝、脊髓、血液或皮肤。例如,MAPC可以来自骨髓穿刺物,骨髓穿刺物可以通过本领域技术人员能够实现的标准方法获得(例如,参见Muschler, G.F., et al.,1997;Batinic, D., et al.,1990)。因此本领域技术人员目前能够获得骨髓穿刺物、大脑或肝活检物和其他器官,并且根据这些细胞中表达(或不表达)的基因,使用本领域技术人员能够获得的阳性或阴性筛选技术来分离细胞(例如,通过功能或形态学测定法,如上述申请中公开的那些方法,对于它们教导的这些测定法,通过引用的方式将它们纳入本说明书)。

[0090] 如U.S. 7,015,037中所述的来自人骨髓的MAPC

[0091] 从骨髓穿刺物获得骨髓单核细胞,骨髓穿刺物可以通过本领域技术人员能够获得的标准方法获得(例如,参见Muschler, G.F. et al. 1997;Batinic, D. et al. 1990)。多能成体干细胞存在于骨髓(或其它器官如肝或脑)中,但不表达白细胞共同抗原CD45或成红细胞特异的血型糖蛋白-A(Gly-A)。细胞的混合群经过Ficoll Hypaque分离处理。然后用抗-CD45和抗-Gly-A抗体对细胞进行阴性筛选,除去CD45⁺和Gly-A⁺细胞群,然后回收剩下的大约0.1%的骨髓单核细胞。也可将细胞接种于纤连蛋白包被的孔中,按如下所述培养2-4周以除去CD45⁺和Gly-A⁺细胞群。

[0092] 或者,可以利用细胞特异性标记的组合、通过阳性筛选来分离细胞。阴性和阳性筛选技术都是本领域技术人员可以获得的,且适用于阴性筛选的许多单克隆和多克隆抗体也是本领域可以获得的(例如参见 Leukocyte Typing V, Schlossman, et al., Eds. (1995) Oxford University Press) 并可以通过商业途径从许多来源购得。

[0093] 例如, Schwartz 等人的美国专利 5,759,793(磁性分离)、Basch et al. 1983(免疫亲和和色谱法)和 Wysocki and Sato 1978(荧光激活的细胞分选)中也描述了从细胞群混合物分离哺乳动物细胞的技术。

[0094] 将回收的 CD45⁺/GlyA⁺ 细胞接种于用约 5-115ng/ml(可以使用约 7-10ng/ml) 血清纤连蛋白或其他适合的基质包被物包被的培养皿上。用达尔伯克氏必需基本培养基(Dulbecco's Minimal Essential Medium, DMEM) 或其他适合的细胞培养基培养细胞,添加约 1-50ng/ml(可以使用约 5-15ng/ml) 血小板源生长因子-BB(PDGF-BB)、约 1-50ng/ml(可以使用约 5-15ng/ml) 表皮生长因子(EGF)、约 1-50ng/ml(可以使用约 5-15ng/ml) 胰岛素样生长因子(IGF) 或约 100-10,000IU(可以使用约 1,000IU) LIF, 添加约 10^{-10} 至 10^{-8} M 地塞米松或其他适合的类固醇,约 2-10 μ g/ml 亚油酸和约 0.05-0.15 μ M 抗坏血酸。其他适合的培养基包括,例如, MCDB、MEM、IMDM 和 RPMI。细胞可以在不含血清、含约 1-2% 胎牛血清或者例如含约 1-2% 人 AB 血清或自体血清的环境中培养。

[0095] 当约每 3 天以约 2×10^3 个细胞/cm² 的浓度重新接种时,一般可以获得超过 40 次的细胞倍增,有些群经过了超过 70 次的细胞倍增。起始的 20-30 次细胞倍增的细胞倍增时间为约 36-48 小时。之后,细胞倍增时间延长到了 60-72 小时之久。

[0096] MAPC 的端粒长度在约 11-13KB 之间,所述 MAPC 来自于 5 个供体(年龄在约 2 岁至约 55 岁之间),以约 2×10^3 个细胞/cm² 的密度重新接种培养,经过约 23-26 次细胞倍增。这比从相同供体获得的血液淋巴细胞的端粒长度长约 3-5KB。分别在约 23 和约 25 次细胞倍增后评估的来自 2 个供体的细胞端粒长度,以及约 35 次细胞倍增后再次评估的细胞端粒长度都没有变化。这些 MAPC 的核型是正常的。

[0097] 处于 U. S. 7,015,037 所述条件下的人 MAPC 的表型

[0098] 用 FACS 对约 22-25 次细胞倍增后获得的人 MAPC 进行的免疫表型分析表明所述细胞没有表达 CD31、CD34、CD36、CD38、CD45、CD50、CD62E 和 -P、HLA-DR、Muc 18、STRO-1、cKit、Tie/Tek; 并且表达低水平的 CD44、I 类 HLA 和 β 2-微球蛋白,并表达 CD10、CD13、CD49b、CD49e、CDw90、Flk1 ($N > 10$)。

[0099] 一旦在以约 2×10^3 /cm² 重新接种的培养物中细胞经历了超过 40 次的倍增,表型就变得更加同质并且没有细胞表达 I 类 HLA 或 CD44 ($n = 6$)。当细胞以更高的汇合度培养时,它们会表达高水平的 Muc18、CD44、I 类 HLA 和 β 2-微球蛋白,这一点类似于针对 MSC 描述的表型 ($N = 8$) (Pittenger, 1999)。

[0100] 免疫组织化学表明以约 2×10^3 细胞/cm² 的接种密度培养的人 MAPC 会表达 EGF-R、TGF-R1 和 -2、BMP-R1A、PDGF-R1A 和 -B, 以及一小亚群(在约 1 和约 10% 之间) 被抗 SSEA4 抗体 (Kannagi, R1983) 染色的 MAPC。

[0101] 利用 Clontech cDNA 阵列测定了以约 2×10^3 个细胞/cm² 的接种密度培养的经过约 22 和约 26 次细胞倍增的人 MAPC 的表达基因谱:

[0102] A. MAPC 不表达 CD31、CD36、CD62E、CD62P、CD44-H、cKit、Tie; IL1、IL3、IL6、IL11、

G CSF、GM-CSF、Epo、Flt3-L 或 CNTF 的受体 ;和低水平的 I 类 HLA、CD44-E 和 Muc-18mRNA。

[0103] B. MAPC 表达细胞因子 BMP1、BMP5、VEGF、HGF、KGF、MCP1 的 mRNA ;细胞因子受体 Flk1、EGF-R、PDGF-R1 α 、gp130、LIF-R、激活素 -R1 和 -R2、TGFR-2、BMP-R1A ;粘着受体 CD49c、CD49d、CD29 和 CD10。

[0104] C. MAPC 表达 hTERT 和 TRF1 的 mRNA ;POU 结构域转录因子 Oct-4、sox-2(需要和 Oct-4 一起来维持 ES/EC 的未分化状态,Uwanogho D. 1995)、sox-11(神经发育)、sox-9(软骨发生)(LefebvreV. 1998) ;同源结构域转录因子 :Hoxa4 和 -a5(颈和胸骨骼特化 ;呼吸道的器官发生)(Packer, A. I. 2000), Hox-a9(成髓作用)(Lawrence. H. 1997)、Dlx4(头部前脑和周围结构的特化)(Akimenko M. A. 1994)、MSX1(胚胎中胚层、成体心脏和肌肉、软骨发生和骨发生)(Foerst-Potts, L. 1997)、PDX1(胰腺)(Offield, M. F. 1996)。

[0105] D. 通过 RT-PCR 确认了 Oct-4、LIF-R 和 hTERT mRNA 的存在。

[0106] E. 此外, RT-PCR 显示 MAPC 中表达 Rex-1mRNA 和 Rox-1mRNA。

[0107] MAPC 也被证明为 CD105 和 CD106 阴性。

[0108] 来自人和鼠骨髓以及来自鼠肝和脑的 MAPC 中表达 Oct-4、Rex-1 和 Rox-1。人 MAPC 表达 LIF-R 并且用 SSEA-4 染色为阳性。最后,人们发现在培养的超过 30 次细胞倍增的人 MAPC 中, Oct-4、LIF-R、Rex-1 和 Rox-1 mRNA 的水平升高,这会产生表型更加同质的细胞。相比而言,以高密度培养的 MAPC 不表达这些标记物。这涉及到约 40 次细胞倍增前就发生衰老以及无法分化成为除成软骨细胞、成骨细胞和脂肪细胞外的细胞。

[0109] 如 U. S. 7, 015, 037 所述培养 MAPC

[0110] 根据本文所述分离的 MAPC 可以用本文和 U. S. 7, 015, 037 中公开的方法来培养, U. S. 7, 015, 037 中关于这些方法的内容通过引用的方式纳入本文。

[0111] 简言之,对于 MAPC 的培养来说,优选低血清或不含血清的培养基培养以维持细胞处于非分化的状态。如本文所述,用于培养细胞的培养基添加如表 1 所述的添加物。人 MAPC 不需要 LIF。

[0112] 表 1

[0113]

胰岛素	约 10-50 μ g/ml (约 10 μ g/ml)*
运铁蛋白	约 0-10 μ g/ml (约 5.5 μ g/ml)
硒	约 2-10 μ g/ml (约 5ng/ml)
牛血清白蛋白 (BSA)	约 0.1-5 μ g/ml (约 0.5 μ g/ml)
亚油酸	约 2-10 μ g/ml (约 4.7 μ g/ml)
地塞米松	约 0.005-0.15 μ M (约 0.01 μ M)
L- 抗坏血酸 -2- 磷酸	约 0.1mM
低葡萄糖 DMEM (DMEM-LG)	约 40-60% (约 60%)

MCDB-201	约 40-60% (约 40%)
胎牛血清	约 0-2%
血小板源生长因子	约 5-15ng/ml (约 10ng/ml)
表皮生长因子	约 5-15ng/ml (约 10ng/ml)
胰岛素样生长因子	约 5-15ng/ml (约 10ng/ml)
白血病抑制因子	约 10-10,000IU (约 1,000IU)

[0114] * 括号中示出了优选浓度

[0115] 将约 10ng/mL LIF 加入到人 MAPC 中不会影响短期细胞生长 (25 次细胞倍增前的细胞倍增时间相同, Oct 4 (Oct 3/4) 表达的水平相同)。相比于使用人细胞所观察到的结果, 当将新鲜鼠骨髓单核细胞 (在第 0 天除去 CD45⁺ 细胞) 接种于 MAPC 培养基中时, 没有观察到生长。当接种鼠髓单核细胞并且培养 14 天后才缺失 CD45⁺ 细胞的细胞时, 细胞的形态和表型类似于人 MAPC 的情况。这表明需要造血细胞分泌的因子来支持鼠 MAPC 的初始生长。当单纯用 PDGF-BB 和 EFG 培养时, 细胞倍增缓慢 (超过 6 天) 而且培养物不能维持超过约 10 次细胞倍增。加入约 10ng/mL LIF 可显著增强细胞生长。

[0116] 一旦成熟培养, 就可以用含约 40% FCS 和约 10% DMSO 的 DMEM 将细胞冷冻并储存为冷冻储液。本领域技术人员也可以获得其他制备培养细胞冷冻储液的方法。

[0117] 因此, 可以在本领域可获得的培养基中培养并扩增 MAPC。这类培养基包括但不限于达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基® (Dulbecco's Modified Eagle's Medium®, DMEM)、DEME F12 培养基®、伊格尔氏基本必需培养基® (Eagle's Minimum Essential Medium®)、F-12K 培养基®、Iscove's 改良的达尔伯克氏培养基® (Iscove's Modified Dulbecco's Medium®)、RPMI-1640 培养基®。还可以获得利用很多含有或不含丙酮酸钠的低葡萄糖配方培养基。

[0118] 还考虑添加有哺乳动物血清的细胞培养基。血清通常含存活和扩增所需的细胞因子和组分。血清的实例包胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、牛血清 (BS)、小牛血清 (CS)、胎牛血清 (fetal calf serum, FCS)、新生牛血清 (NCS)、山羊血清 (GS)、马血清 (HS)、人血清、鸡血清、猪血清、绵羊血清、兔血清、血清替代品和牛胚胎液。应当理解的是如果认为需要灭活补体级联成分, 可以在约 55-65°C 下进行血清热灭活。

[0119] 可以有利地利用其他添加物来为细胞供应微量元素以使其达到最优生长和扩增。这类添加物包括胰岛素、运铁蛋白、硒化钠和它们组合。这些组分可以被包含于盐溶液中, 例如但不局限于 Hanks' 平衡盐溶液® (HBSS)、Earle's 盐溶液®、抗氧化剂添加物、MCDB-201® 添加物、磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、抗坏血酸和抗坏血酸-2-磷酸, 以及附加的氨基酸。许多细胞培养基本身就含有氨基酸, 但是有一些需要在培养细胞前进行添加。这类氨基酸包括但不限于 L- 丙氨酸、L- 精氨酸、L- 天冬氨酸、L- 天冬酰胺、L- 半胱氨酸、L- 胱氨酸、L- 谷氨酸、L- 谷氨酰胺、L- 甘氨酸、L- 组氨酸、L- 异亮氨酸、L- 亮氨酸、L- 赖氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 苯丙氨酸、L- 脯氨酸、L- 丝氨酸、L- 苏氨酸、L- 色氨酸、L- 酪氨酸和 L- 缬

氨酸。本领域技术人员能够容易地确定这些添加物的合适浓度。

[0120] 抗生素也通常被用于细胞培养基中以减轻细菌、支原体和真菌污染。通常,所用的抗生素或抗霉菌化合物为青霉素 / 链霉素的混合物,但是也可以包括但不限于两性霉素 (两性霉素 B® (Fungizone®))、氨苄西林、艮他霉素、博来霉素、潮霉素、卡那霉素、丝裂霉素、麦考酚酸、萘啶酸、新霉素、制霉菌素、巴龙霉素、多粘菌素、嘌呤霉素、利福平、大观霉素、四环素、泰乐菌素和 Zeocin。抗生素和抗霉菌添加剂在一定意义上依与所进行的工作类型而定。一种可能出现的情况是含有抗生素但细菌仍旧存在于培养物中的培养基,但是抗生素的作用是作为抑菌剂而不是杀菌机制。而且,抗生素能够干扰某些细胞类型的代谢。

[0121] 激素也可以被有利地用于细胞培养中,激素包括但不限于 D- 醛固酮、二乙基己烯雌酚 (DES)、地塞米松、 β -雌二醇、氢化可的松、胰岛素、促乳素、孕酮、促生长素抑制素 / 人生长激素 (HGH)、促甲状腺激素、甲状腺素和 L- 甲腺原氨酸。

[0122] 根据细胞类型和最终的分化细胞,脂质和脂质载体也可以被用于添加到细胞培养基中。这类脂质和载体可以包括但不限于环糊精 (α 、 β 、 γ)、胆固醇、与白蛋白缀合的亚油酸、与白蛋白缀合的亚油酸和油酸、未缀合的亚油酸、与白蛋白缀合的亚油酸 - 油酸 - 花生四烯酸、未与白蛋白缀合和与白蛋白缀合的油酸等等。

[0123] 还考虑使用饲养细胞层。饲养细胞被用于支持需要复杂营养来培养的细胞 (包括干细胞) 的生长。饲养细胞是用 γ -射线失活的正常细胞。培养过程中,所述饲养层充当其他细胞的基底层和提供细胞因子,其本身不会进一步生长或分裂 (Lim, J. W. and Bodnar, A., 2002)。饲养层细胞的实例通常有人二倍体肺细胞、小鼠胚胎成纤维细胞、瑞士小鼠胚胎成纤维细胞,但也可以是任何有丝分裂期后的、能够提供有助于实现干细胞的最优生长、存活和扩增的细胞组分和因子的细胞。在许多情况下,饲养细胞层不是保持 ES 处于未分化的增殖态所必需的,因为白血病抑制因子 (LIF) 具有抗分化的性质。因此,可以添加 LIF 来维持一些物种的 MPAC 的未分化态。

[0124] 培养的细胞可以被维持于在悬浮液中或附着到固体支撑物上,如细胞外基质成分和合成的或生物聚合物。干细胞通常需要能促使它们附着到固体支撑物上的附加因子,如 I 型、II 型和 IV 型胶原、刀豆素 A、硫酸软骨素、纤连蛋白、“超纤连蛋白”和纤连蛋白样聚合物、明胶、层粘连蛋白、聚-D 和聚-L-赖氨酸、凝血酶敏感素和玻璃粘连蛋白。

[0125] 干细胞的培养条件中也可以包括使得干细胞 (如 MAPC) 维持于未分化形式的细胞因子。培养基含有表皮生长因子 (EGF)、血小板源生长因子 (PDGF)、白血病抑制因子 (LIF; 在选定的物种中) 和其组合是有利于使细胞一定保持在自我更新的未分化态的条件。对本领域技术人员来说显而易见的是,在分化前要从培养基中移除使细胞自我更新但不分化的添加物。

[0126] 干细胞系和其他细胞与另一种细胞类型共同培养是有益的。这类共同培养的方法源于一种现象,即某些细胞可以提供尚未识别的细胞因子,所述尚未识别的细胞因子可以使得所述干细胞分化成为特定的谱系或细胞类型。这些细胞因子也能够诱导细胞表面受体的表达,其中某些可以很容易地被单克隆抗体识别。一般而言,选择用于共同培养的细胞应基于本领域技术人员希望诱导的细胞系类型,而且技术人员能够选择适合的用于共同培养的细胞。

[0127] MAPC 向胰腺细胞的分化

[0128] MAPC 和分化自 MAPC 的胰腺祖细胞可用作胰腺细胞源。可以通过将 MAPC 与适合的因子或与基质细胞或其他能够分泌负责干细胞再生、定向和分化的因子细胞一起培养来促使 MAPC 成熟、增殖和分化,所述适合的因子包括但不限于激活素 A(或 TGF β 家族的其他成员)、BMP4(或 BMP 家族的其他成员)、一种抑制音猬因子活性的试剂(包括但不限于环巴胺和抗 SHH 抗体)、EGF 或 HGF(或其他有丝分裂蛋白)、烟酰胺(可能和烟酸)、exendin(包括但不限于 exendin 4 和 exenatide(一种与 exendin-4 很像的 39-氨基酸肽)、GDF11(或骨形态发生蛋白/转化生长因子 β (BMP/TGF β) 超家族的其他成员)、 β 细胞素。

[0129] 一种抑制音猬因子 (SHH) 活性(如信号传导)的试剂包括任何的抑制音猬因子功能或表达(包括但不限于在早期胚胎的模式形成中提供信号,例如腹神经管、前-后的肢轴和腹体节的模式形成)的试剂(例如肽、蛋白(包括抗体)、小分子、药物、化学品或核酸(如 DNA 或 RNA))。这些试剂包括但不限于抗-音猬因子抗体、环巴胺 (CPA)、它们的类似物,例如环巴胺-4-烯-3-酮 (cyclopamine-4-ene-3-one) 或其他甾类生物碱。本文使用的“抑制”是指,与不存在音猬因子活性抑制剂时的 SHH 活性相比,音猬因子活性的降低(例如约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 35%、约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%或约 100%)。

[0130] 如后文中的实施例 2 所述,在体外将 MAPC 分化成胰腺祖细胞和 β -细胞。简述之,在含激活素 A(大约 0.5ng/mL 至大约 200ng/mL,例如大约 50ng/mL 至大约 100ng/mL)、BMP-4(大约 10ng/mL 至大约 100ng/mL,例如大约 20ng/mL 至大约 30ng/mL 或至大约 50ng/mL)的培养基中将 MAPC 培养大约 3 天,之后进行六天在激活素 A、BMP-4 和环巴胺(例如,大约 5 至大约 50 μ M,包括大约 10 μ M)或一种抗-SHH 抗体(大约 10 μ g/mL)中培养大约六天。这样得到的细胞随后在包含 EGF(例如,大约 5 至大约 100ng/mL,包括大约 50ng/mL)或 HGF(例如,大约 5 至大约 100ng/mL,包括大约 50ng/mL)的培养基中培养大约 6 天。这样获得的细胞随后在包含烟酰胺(大约 5 μ M 至大约 50 μ M,包括大约 10 μ M)或 exendin4(例如,大约 5nM 至大约 50nM,包括大约 10nM)、GDF11(例如,大约 10ng/mL 至大约 100ng/mL,包括大约 50ng/mL)和 β 细胞素(例如,大约 10ng/mL 至大约 100ng/mL,包括大约 50ng/mL)的培养基中培养大约 6 天。

[0131] 促进 MAPC 初始定向到胰腺内胚层(在第 9 天,Pdx-1 阳性细胞)的其他因子可以包括已知在内胚层定向中起重要作用的因子,例如 Wnt 家族、TGF- β 家族和 FGF 家族的成员。Wnt-3 在内胚层特化中起作用 (Heller et al., 2002),因为 Wnt3^{-/-} 小鼠不能形成内胚层或中胚层 (Heller et al., 2002)。胰腺(而非肝脏)内胚层的特化受 Wnt 家族成员的调控。初始内胚层特化可能依赖 Wnt-3,但与初始内胚层特化相比,Wnt 可能会抑制胰腺内胚层的特化。Dickkopf 相关蛋白 1(Dkk-1) 是分泌蛋白 Dkk 蛋白家族的一个成员,Dkk-1 通过直接高度亲和性地结合到 Wnt 复合受体 LRP5/6 并抑制 LRP5/6 与 Wnt-Frizzled 复合体相互作用从而拮抗经典的 Wnt 通路 (Nusse 2001)。因此,加入 Dkk-1 或者 β -连环蛋白抑制剂(例如一种 GSK3 抑制剂,例如 GSKSp 抑制剂 IX) (Willert et al., 1998) 可以增加 MAPC 产生 Pdx-1 阳性祖细胞的频率。

[0132] Nodal 也在内胚层特化中起作用,因为 Nodal^{-/-} 小鼠不能形成内胚层或中胚层。BMP-4 和其他的 TGF 家族成员诱导中胚层而不是内胚层的特化,因为 BMP-4^{-/-} 胚胎在妊娠早期死亡,不能形成任何结构分明的中胚层 (Winnier et al., 1995)。评估 ES 细胞分化成内胚

层的体外研究表明,高浓度的激活素 A 将细胞特化为内胚层,而不是中胚层。在随后胰腺内胚层特化所需的步骤中 (Kubo et al., 2004; D' Amour et al., 2005),激活素 A (Maldonado et al., 2000) 单独或者与 bFGF (Hardikar et al., 2003) 联合可以抑制 SHH 表达,从而阻止胰腺内胚层的特化。

[0133] FGF-8 可能在初始内胚层特化中起作用。相似地,FGF-4 至少在鸡中已经被确定在内胚层特化中起作用 (Wells et al., 2000)。FGF-2 在胰腺和肝脏特化中的作用更加复杂。如上文指出的,FGF-2 可以抑制 SHH 的产生 (Hardikar et al., 2003; Jung et al., 1999),从而会引起胰腺的特化。因此,FGF-8、FGF4、FGF-2 或它们的组合可以被应用于分化 MAPC 的方法中 (也可以与本文提到的其他因子组合)。

[0134] 来自腹侧的以及背侧的前肠内胚层的胰腺定向被音猬因子 (SHH) 抑制 (Hebrok et al., 2000)。来自脊索的激活素 A (Maldonado et al., 2000) 和 / 或 FGF-2 (Hardikar et al., 2003) 信号在前肠内胚层中起到抑制 SHH 表达的作用。或者,或进一步地,SHH 可以被环巴胺或特异的抗 SHH 抗体阻断。

[0135] 胰腺特化和分化在多个步骤中受 Notch 信号传导的调控 (Hardikar et al., 2003)。具体地,Notch 信号传导抑制定向到胰腺、到内分泌胰腺和内分泌 Ngn3 胰腺祖细胞的成熟。因此,Notch 信号传导的抑制因子可以被应用在分化 MAPC 的方法中。

[0136] 对于 Pdx-1 表达的诱导,虽然一些实验指出激活素 A 和 BMP4 的组合优于单独使用激活素 A,但是 BMP4 可能导致在培养物中还存在中胚层细胞。因此,BMP4 可能不是必要的,可以被 BMP2 或 BMP7 替代,或者可以以更低的浓度使用或仅与 BMP-4 同时使用持续几天后单用激活素 A。另外,在分化的最初的三天中激活素 A 与 Wnt-3 联合可以进一步地增强内胚层的分化。因为 Wnt 可以抑制胰腺内胚层分化,加入 Wnt-3 之后加入 Dkk-1 可以在第 9 天内诱导更大数量的 Pdx-1 阳性细胞。这可以被加入一种阻断经典的 Wnt 通路的 GSK3 抑制因子确证。可以通过测量磷酸化的 β -连环蛋白来证明 Dkk-1 或 GSK3 抑制因子的效果。之后,通过加入梯度剂量的 FGF-8 和 / 或 FGF-2 和梯度剂量的 FGF-4 和 / 或一种 FGF-2 的抑制剂 (例如 SU5402),可以确定不同的 FGF (FGF-8、FGF-4 和 FGF-2) 的作用。另外,通过例如使用一种 γ -分泌酶的抑制剂 (化合物 E, Calbiochem) 抑制 Notch 信号传导,可以影响胰腺内胚层 (Pdx-1⁺ 细胞) 的诱导。所述 γ -分泌酶的效果的评价可以通过评估 Hes1 和 Herp 的表达进行。

[0137] 在一个实施方案中,通过例如 DNA、RNA 或病毒转染或者通过蛋白转导,用一种胰腺转录因子转染所述细胞,所述转录因子包括但不限于 Ngn3、NeuroD、Pdx-1、Pax4、Ptf1a/p48、Pax6、Nkx6.1、Nkx2.2 或一种它们的组合。这些转录因子的表达可以诱导 MAPC 的胰腺分化。另外,通过本领域已知的方法 (例如同源重组 (如 U. S. 5, 641, 670)、非同源重组 (如 U. S. 6, 602, 686; RAGE (基因表达的随机激活) 技术; Athersys, Inc. (Cleveland, Ohio)) 或者本领域技术人员可获得的其他内源表达技术 (上面提及的专利中关于其中教导的内源基因激活的方法的内容,通过引用的方式纳入本文),可以在所述细胞中激活或增加所述内源因子。除了本文所述的因子 / 基因之外,还可以在本发明的方法中使用或测定所述因子 / 基因的变体、同源物或直向同源物,其中所述变体、同源物或直向同源物具有与所述因子 / 基因相同的生物学功能 / 活性。例如,本发明中使用的变体、同源物或直向同源物可以与胰腺发生涉及的因子 / 基因 (包括本文提供的那些因子 / 基因) 同源或具有序列一致性 (核

苷酸或氨基酸序列)。测定一个因子 / 基因是否同源的检测方法和程序是本领域已知的。

[0138] 识别分化的细胞并随后将其与未分化的细胞分离的方法可以用本领域公知的和本文所述的方法实施。已经被诱导分化的细胞可以通过在一定条件下选择性地培养细胞来识别,所述一定条件是使得分化的细胞数目超过未分化的细胞的条件。类似地,分化的细胞可以通过形态改变和不存于未分化的细胞中的特征来识别,所述特征例如细胞大小、细胞过程 (cellular process) 的数目、胞内细胞器分布的复杂度,以及对葡萄糖应答时胰岛素或 C-肽的产生和胰岛素或 C-肽的分泌。

[0139] 还考虑了通过细胞表达的特异性细胞表面标记物 (如细胞受体和跨膜蛋白) 来识别分化细胞的方法。针对这些细胞表面标记物的单克隆抗体可以被用于识别分化的细胞。可以通过荧光激活细胞分选术 (FACS) 和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来进行这些细胞的检测。从特定基因转录的增量调节的观点来看,分化细胞通常表现出与未分化细胞不同 (mRNA 或蛋白的表达升高或降低) 的基因表达水平,例如胰岛素-1、胰岛素-2、胰高血糖素、促生长素抑制素、NeuroD1、Pdx-1、Ngn3、Nkx6.1、Nkx2.2。反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 可以用于监测分化过程中的这些基因表达变化。此外,使用微阵列技术的全基因组分析也可以用于识别分化细胞。

[0140] 因此,一旦分化细胞被识别出来,如果需要的话,就可以将它们与未分化的细胞分离。上面详述的识别方法也提供了分离的方法,如 FACS、细胞择优培养方法、ELISA、磁珠和它们的组合。本发明一个优选的实施方案预想基于细胞表面抗原表达采用 FACS 识别和分离细胞。

[0141] 其他培养方法

[0142] MAPC 的培养密度可以在约 100 个细胞 /cm² 或约 150 个细胞 /cm² 到约 10,000 个细胞 /cm² 之间变化,包括从约 200 个细胞 /cm² 到约 1500 个细胞 /cm² 到约 2000 个细胞 /cm²。所述密度在物种之间也是可变的。此外,最优密度也可以根据培养条件和细胞源而变化。普通的技术人员能够确定对于给定的一系列培养条件和细胞的最优密度。

[0143] 而且,在具体的实施方案中,用于细胞分离、生长、扩增和 / 或分化的环境气体氧浓度包括大约 0.1% 至大约 10% 的氧的氧浓度。在其他实施方案中,所述环境气体氧浓度包括大约 1% 至大约 9% 的氧浓度。在其他实施方案中,所述环境气体氧浓度包括大约 1.5% 至大约 8% 的氧浓度。在另外的实施方案中,所述环境气体氧浓度包括大约 2% 至大约 7% 的氧的氧浓度。

[0144] 上述的范围是用于培养 Oct3/4 阳性且可分化成外胚层、内胚层和中胚层细胞类型的非-ES、非-EG、非-生殖细胞的环境气体氧浓度的示例范围,本领域的技术人员应该知道,可以使用在这些范围内涵盖的任一个氧浓度。因此,本领域的技术人员可将所述氧培养浓度设置在大约 0.1%、0.5%、1%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%,或在任何的这些百分比之间的任何其他氧浓度。在一个实施方案中,所述氧浓度是大约 2% 至大约 7%,例如大约 5%,这个浓度与生理氧浓度更加接近 (Guyton and Hall, in Textbook of Medical Physiology, W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 513-523 (1996))。在培养过程中,所述氧浓度可以在一个给定的范围内变化。所述环境气体的其他部分是常规的惰性气体,例如氮气、氩气等等,以及二氧化碳。另外,本发明的细胞在大约 5% 至大约 6% 的 CO₂ 中培养。

[0145] 在 5% 的 O_2 下分离并培养 MAPC 显示出产生的细胞发生异常更少。另外,所述条件导致 MAPC 表型轻微变化。当 5% 的 O_2 下分离并且培养啮齿类 MAPC 的时候,通过免疫组织化学测定,Oct-4 的转录物水平接近胚胎干 (ES) 细胞 (50-80%) 的水平,并且 90% 以上的细胞表达核 Oct-4 蛋白。此外,5% O_2 条件下产生的啮齿类 MAPC 的 Rex-1 表达水平接近 ES 细胞的表达水平。虽然小鼠 MAPC 表达与 ES 细胞水平相近的 Oct-4mRNA,但是它们不形成胚胎体或畸胎瘤 (5×10^6 个 MAPC 植入 5 只裸鼠的皮肤下)。

[0146] MAPC 的培养中也可以存在 GSK3 抑制剂 (例如一种 6-溴靛红 (6-bromoindirubin) 化合物,包括但不限于 6-溴靛红-3'-肟 (6-bromoindirubin-3'-oxime) (也被称作 BIO); 编号为 60/703,823 (2005 年 7 月 29 日提交) 和 60/704,169 (2005 年 7 月 29 日提交) 的美国临时专利申请,以及 PCT 申请 PCT/US2006/029736 (2006 年 7 月 31 日提交) 和 PCT/US2006/029547 (2006 年 7 月 31 日提交) 中关于在一种 GSK3 抑制因子存在的情况下培养细胞的内容,通过引用的方式纳入本文)。

[0147] MAPC 和其子细胞的用途

[0148] 通过或者直接地被引入到损伤区域或者通过全身用药 (这种方式使得细胞可以归巢到所述损伤区域),本发明的胰腺祖细胞或 β -细胞和 / 或 MAPC 可以被应用于重建胰腺。因此,本发明提供对有需要的受试者进行治疗的方法,包括将有效量的本发明的胰腺祖细胞或 MAPC 给予受试者。

[0149] 为实现本文所述的目的,可以将自身的、同种异体的或者异种的细胞给予患者以修复、取代或促进已有的和 / 或新的胰腺细胞的生长,所述细胞可为未分化的、终末分化的、或者部分分化的形式,可以是遗传上改变的或未改变的,所述给予可以通过结合可药用的载体直接引入目的位点 (例如在一种可接受的基质的表面之上或周围),或者通过全身的方式实现。

[0150] 一般而言,本发明提供治疗胰腺病症的方法。术语“胰腺病症”或“胰腺疾病”指一种胰腺功能受损的状态。可以使用本发明的组合物和方法治疗的“胰腺病症”或“胰腺疾病”的实例包括但不限于,糖尿病 (包括 1 型、2 型、MODY 和其他遗传病因引起的糖尿病)、肥胖症、胰腺闭锁、胰腺炎症、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏症、急性、慢性或遗传胰腺炎、胰腺癌 (包括胰腺的内分泌肿瘤)、由于囊性纤维化病或 ShwachmanDiamond 综合症引起的胰腺功能障碍、胰功能不全或胰酶缺乏、胰腺囊肿、高胰岛素血症、胰腺消化性疾病、遗传性外分泌胰腺障碍和胰腺损伤,所述胰腺损伤包括但不限于物理创伤 (包括但不限于外科手术)、化学品、辐射、衰老和 / 或疾病引起的损伤。

[0151] MAPC 或其分化子细胞的给药

[0152] 可通过各种本领域可利用的方法将 MAPC 或其分化子细胞给予受试者,所述方法包括但不限于局部注射、导管给药、全身注射、腹膜内注射、胃肠外给药、动脉内注射、静脉内注射、经血管注射、肌内注射、外科注射到目的组织中 (例如注射到胰腺中) 或通过直接施用到组织表面 (例如在外科手术过程中或在伤口上)。

[0153] 通过循环系统,MPAC 可以外周或局部给药。干细胞的“归巢”会将移植的细胞集中到对它们的生长和功能有利的环境中。对患者进行的用细胞因子促进归巢的预防治疗是本发明方法中考虑的另一种的替代方法。某些细胞因子 (例如诱导或增强细胞运动的细胞因子,所述细胞运动如 MAPC 或其他干细胞、祖细胞或分化细胞的归巢) 能够增强 MAPC 或其子

细胞的迁移。细胞因子包括但不限于基质细胞衍生因子-1 (SDF-1)、干细胞因子 (SCF)、血管生成素-1、胎盘衍生生长因子 (PIGF) 和粒细胞-集落刺激因子 (G-CSF)。细胞因子也包括任何能促进内皮黏附分子表达的因子,例如 ICAM、VACM 和其他能促进归巢过程的因子。

[0154] 可以通过血管生成作用来增强新形成组织的存活能力。促进血管生成的因子包括但不限于 VEGF、aFGF、血管生成素、血管紧张素-1 和 -2、 β -细胞素、bFGF、X 因子和 Xa 因子、HB-EGF、PDGF、血管调节素、促血管素、血管生成素-1、前列腺素 E1 和 E2、类固醇、肝素、1-丁酰-丙三醇和尼克酰胺。

[0155] 能够减少凋亡的因子也能促进新组织(例如胰腺组织)的形成。能够减少凋亡的因子包括但不限于 β -阻断剂、血管紧张素-转化酶抑制剂 (ACE 抑制剂)、AKT、HIF、卡维地洛 (carvedilol)、II 型血管紧张素 1 型受体拮抗剂、半胱天冬酶抑制剂、卡立泊来德 (cariporide) 和依尼泊胺 (eniporide)。

[0156] 外源因子(例如细胞因子、分化因子(例如细胞因子,如诱导细胞系定向的生长因子或血管生成因子)、血管生成因子和抗凋亡因子)可以在给予 MAPC 或其分化子细胞之前、之后或者与其同时给药。例如,一种同时给药的形式包括在给药前将所目的因子与 MAPC 悬浮液培养基混合。给药形式是可变的,可以包括首次给药后再进行后续给药。

[0157] 一种潜在地增加细胞存活率的方法是将 MAPC 或子细胞掺入到生物聚合物或合成聚合物中。由于瘢痕形成或其他障碍,注射的位置可能证实不适于细胞接种和生长,这取决于患者的情况。生物聚合物的实例包括但不限于纤连蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、凝血酶、胶原和蛋白聚糖。其构成可以包括或不包括细胞因子、分化因子、血管生成因子或抗凋亡因子。此外,这些都可以是悬浮液的形式。另一种替代品是细胞可包埋于细胞生物聚合物混合物的间隙中的三维凝胶。细胞因子、分化因子、血管生成因子、抗凋亡因子或它们的组合也可以包含于凝胶中。这些都可以经由本文所述的各种途径通过注射的方式来使用。

[0158] 所述细胞也可以被包裹在一种胶囊中,所述胶囊可以通透营养成分和氧,同时可使适当的细胞产物(例如对于胰岛细胞而言为胰岛素)释放到血流或邻近组织中。在一个实施方案中,胶囊材料具有足够的限制能力以排除可能排斥和破坏植入物的免疫细胞或抗体。这种胶囊化可以通过使用聚合物实现 (Chang, 2000)。这种聚合的胶囊化系统包括但不限于藻酸盐(例如藻酸盐微球)、多糖水凝胶、壳聚糖、藻酸钙或藻酸钡、藻酸盐和多聚赖氨酸的层状基质、可光聚合的聚(乙二醇) (PEG) 聚合物 (Novocell, Inc.)、一种称之为 Biodritin 的聚阴离子材料(美国专利 6,281,341)、聚丙烯酸酯、可光聚合的聚(乙二醇)聚合物和例如羟乙基异丁烯酸甲基异丁烯酸的聚合物。

[0159] 将细胞包入胶囊的另一种方法涉及利用光刻技术,所述光刻技术是从半导体工业改变而来以在硅微囊中装入活细胞,所述硅微囊具有仅几个纳米宽的孔 (Desai 2002)。

[0160] 也可以应用于合适的免疫相容性聚阳离子将细胞装入胶囊,所述免疫相容性聚阳离子包括但不限于聚左旋赖氨酸 (PLL) 聚阳离子或聚左旋鸟氨酸或聚(亚甲基-共-胍)氢氯化物。

[0161] 另外,可以用生物相容的半透膜对细胞进行包囊以包裹被包囊的细胞——有时在一个毛细装置内——从而形成一种微型的人造器官,所述器官例如可包含功能性胰腺或肝细胞的人造器官(例如一种肝脏或胰腺人工装置)。它通常被称作巨囊 (macroencapsulation)。它的膜允许葡萄糖、氧和胰岛素从血流中进出,并且优选地阻止免

疫系统的抗体和 T 细胞,抗体和 T 细胞可能会破坏细胞(例如胰岛)。这种膜可以被应用于一种灌注装置中,所述灌注装置是一种被移植到与动脉相接从而直接与身体的循环血液相接触的胶囊;通过这种方式,所述装置从所述血液中汲取营养成分并且将胰岛素释放到周身的循环中。另一种方法可以提供对一小群胰岛细胞(巨囊)或单个的胰岛细胞(微囊)进行包被,并且将它们植入到腹腔内的方法。通过渗透到植入组织的体液,在这些装置中可以进行营养成分和胰岛素的交换。

[0162] 所给予的细胞量可随所要治疗的受试者而变化。在一个优选的实施方案中,可以给予人受试者每天约 10^4 至约 10^8 个干细胞,更优选地约 10^5 至 10^7 个干细胞,最优选地约 3×10^7 个干细胞和任选地约 50 至约 500 μ g/kg 的细胞因子。然而,关于多少可以被认为是有效剂量的精确确定应该基于每个患者的个体因素,包括他们的身高体重、年龄、疾病或损伤、损害程度、从损伤发生开始至今的时间长短和与送递方式相关的因素(直接注射-较低剂量,静脉内-较高剂量)。本领域技术人员根据本公开内容和本领域的常识可以很容易的确定剂量。

[0163] 干细胞或其子细胞应用的一个问题是富集的或分离出的细胞群的纯度。例如,骨髓细胞包括混合的细胞群,它可以被纯化到足够产生所需效果的程度。本领域技术人员利用各种公知的方法能够很容易地测定 MAPC 或其子细胞在一个群中的百分比,所述公知的方法例如荧光激活细胞分选术(FACS)。含 MAPC 或其分化子细胞的群的优选纯度范围为约 50-55%、约 55-60%和约 65-70%。更优选的纯度范围为约 70-75%、约 75-80%、约 80-85%;最优选的纯度范围为约 85-90%、约 90-95%和约 95-100%。然而,较低纯度的群也可能是有用的,如约 25-30%、约 30-35%、约 35-40%、约 40-45%和约 45-50%。MAPC 或其子代的纯度可以根据一个群中的基因表达情况来确定。本领域的技术人员能够很容易地调整剂量(例如纯度的下降可能会需要剂量的增加)。

[0164] 本领域技术人员可以很容易地确定本发明方法中要给予的组合物中细胞和任选的添加剂、运载剂或载体的量。通常,添加剂(除了活性干细胞或细胞因子)在磷酸缓冲盐水中的存在量为约 0.001 至约 50wt%的溶液,并且活性成分以微克级至毫克级存在,如约 0.0001 至约 5wt%、优选地约 0.0001 至约 1wt%、最优选地约 0.0001 至约 0.05wt%或约 0.001 至约 20wt%、优选地约 0.01 至约 10wt%和最优选地约 0.05 至约 5wt%。当然,因此对于要给予动物或人的任何组合物,以及对于任何特定的给药方法,优选地应确定:毒性——例如通过在适合的动物模型(例如啮齿动物,如小鼠)中测定致死量(LD)和 LD₅₀——和组合物的剂量、其中组分的浓度和给予组合物周期,这些会引发适合的应答。根据本领域技术人员的常识、本文的公开内容和本文所引用的文献,这些测定不会需要过多的实验。而且,序贯给药的时间的确定也不需要过多的实验。

[0165] 当给予本发明的治疗组合物时,通常可以按可注射形式(溶液、悬浮液、乳剂)的单位剂量来配制的。适合注射的药物制剂包括无菌水性溶液和分散系。所述载体可以是溶剂或分散介质,所述分散介质包括例如水、盐水、磷酸缓冲盐水、多元醇(例如丙三醇、丙二醇、液体聚乙烯乙二醇等等)和它们适合的混合物。

[0166] 此外,可以加入各种增强组合物的稳定性、无菌度和等渗性的添加剂,包括抗菌性防腐剂、抗氧剂、螯合剂和缓冲液。通过各种抗细菌和抗真菌试剂可以确保预防微生物的作用,所述抗细菌和抗真菌试剂例如对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等等。在许多情

况下,需要包括等渗剂,如糖、氯化钠等等。可注射药物形式的延长吸收可以通过使用延缓吸收的试剂来实现,例如单硬脂酸铝和明胶剂。然而,根据本发明,所用的任何运载剂、稀释剂或添加剂都应该是与细胞相容的。

[0167] 无菌的注射溶液可以通过将实施本发明过程中所用的细胞掺入所需量的适合溶剂中来制备,根据需要,所述溶剂中可含有各种量的其他成份。

[0168] 在一个实施方案中,可以首次给予 MAPC 或其分化子细胞后,再通过进一步给予 MAPC 或其分化子细胞来维持。例如,MAPC 可以通过一种注射的方法来给予,此后通过不同或相同类型的方法来进行进一步给予。

[0169] 应当注意到的是,人受试者的治疗时间通常要比犬类或其他实验动物长,以使得治疗时间与疾病过程的长短和疗效成比例。剂量可以是几天时间的单剂量或多剂量。因此,本领域的技术人员利用本文公开的内容和本文引述的文献中的技术及本领域的公知常识,不需要过多实验就可以从动物(例如大鼠、小鼠、犬类等等)实验按比例放大以用于人。该疗法时间通常与疾病过程的时间和治疗效果成比例,并且与所治疗的受试者相关。

[0170] 包含 MAPC 或其分化子细胞的组合物的实例包括用于给药的液体制剂(包括悬浮液)和用于直接或静脉内给药(例如可注射的给药)的制剂,如无菌悬浮液或乳剂。这些组合物可以与适合的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖(dextrose)等等)混合。所述组合物也可以是低压冻干的。根据给药途径和所需制剂,所述组合物可以包含辅助物质如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲剂、胶凝剂或增粘剂、防腐剂、芳香剂、颜料等等。标准教材(如“雷明登(Remington's)药物科学”第 17 版,1985,通过引用的方式纳入本文)可被用于查阅以制备适合的制剂而不需要过多的实验。

[0171] 组合物可以方便地以液体制剂的形式来提供,例如等渗水性溶液、悬浮液、乳剂或粘稠组合物,所述液体制剂可以被缓冲到选定的 pH。液体制剂通常比凝胶、其他粘稠组合物和固体组合物容易制备。此外,液体组合物在一定程度上更容易给药,特别是通过注射。另一方面,粘稠组合物可以以适合的粘度范围配制,以提供与特定组织的更长的接触期。

[0172] 适合载体和其他添加剂的选择将取决于给药的确切途径和具体剂型的性质,所述剂型例如液体剂型(例如组合物是否被配制成为溶液、悬浮液、凝胶或另一种液体形式,如时间释放形式或液体填充形式)。

[0173] 除细胞外,溶液、悬浮液和凝胶还通常含大量的水(优选纯化的无菌水)。也可存在少量的其他成分例如 pH 调节剂(例如,如 NaOH 等的碱)、乳化剂或分散剂、缓冲剂、防腐剂、湿润剂和胶凝剂(例如甲基纤维素)。所述组合物可以是等渗的,即它们可具有与血液和泪液相同的渗透压。

[0174] 本发明组合物所需的等渗度可以使用氯化钠或其他可药用试剂来实现,所述可药用试剂例如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其他无机或有机溶质。对于含钠离子的缓冲液来说,氯化钠为特别优选的。

[0175] 如果需要的话,可以使用可药用的增稠剂来将组合物粘度维持在选定的水平。优选甲基纤维素,因为它容易购得、价格便宜且容易使用。其他适合的增稠剂包括,例如,黄单胞菌胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆(carbomer)等等。优选的增稠剂浓度取决于选定的试剂和所需的粘度。粘稠组合物通常通过在溶液中加入这类增稠剂来制备。

[0176] 可以使用可药用的防腐剂或细胞稳定剂来增加组合物的寿命。优选地,如果需要

防腐剂的话,选择不会影响本发明所述的 MAPC 或子细胞的活力或功效的组合物是本领域技术人员能预期的。

[0177] 本领域技术人员应知道,应当选择化学惰性的组合物组分。对于化学原理和药物原理领域的技术人员来说这不会存在问题,或者通过参考标准教材或简单实验(不包括过多的实验)、本文公开的内容和本文引用的文献可很容易地避免存在的问题。

[0178] 可以在考虑到具体的患者的年龄、性别、体重和身体状况这类因素和用于给药的组合物形式(例如固体与液体)后,按照剂量并通过医学和兽医领域技术人员可获得的技术来进行组合物给药。本领域技术人员根据本文公开的内容、本文所引用的文献和本领域的常识,不需要过多的实验就可以确定人或其他动物的剂量。

[0179] 用于首次给药且进一步给药或用于序贯给药的适合方案也是可变的,可以包括首次给药后进行随后的多次给药;但是,本领域技术人员根据本文公开的内容、本文所引用的文献和本领域的常识可以确定给药适合的方案。

[0180] 预防免疫排斥的移植方法

[0181] 在一些实施方案中,移植或给药前可能需要对 MAPC(或分化子细胞)进行处理或改变以降低激发宿主对移植细胞产生免疫应答的风险。可以采用本领域已知的降低激发宿主产生免疫应答风险的任何方法。下面提供了一些这类实例:

[0182] 1. 通用供体细胞:对 MAPC 进行操作使其成为通用供体细胞。尽管未分化的 MAPC 不表达 MHC-I 或 -II 抗原,但是一些分化的子细胞可能表达这些抗原的一种或两种均表达。通过消除 MHC-I 和 MHC-II 抗原并潜在地引入来自预期受体的 MHC 抗原,可以将 MAPC 修饰成为通用供体细胞,从而使得细胞不会轻易变成 NK 介导的杀伤目标,或变得对不受限的病毒复制或恶性转化易感。例如,可以通过同源重组或通过启动子区域引入点突变或通过抗原的起始外显子中引入点突变以引入终止密码子(如用嵌合体(chimeroplast))来实现 MHC- 抗原的消除。可以通过反转录病毒、慢病毒、腺伴随病毒或其它病毒转导或通过用 MHC- 抗原 cDNA 转染靶细胞来实现宿主 MHC 抗原的转移。

[0183] 2. 子宫内移植以防止发生免疫识别:MAPC 可用于子宫内移植,所述子宫内移植是用于修正遗传异常或在免疫系统发育前引入可被宿主耐受的细胞。这种方法可用于在动物中产生大量的人细胞,或者通过移植可产生正确蛋白或酶的细胞,它也可以被用于修正人胚胎的遗传缺陷。

[0184] 3. 造血嵌合和耐受诱导

[0185] 通过干细胞的使用可以带来益处,所述干细胞能够重建移植免疫系统,这种重建不会带来移植物抗宿主应答风险。所述移植物抗宿主反应是由骨髓移植物中固有的污染 T 细胞导致的。尽管从骨髓中纯化造血干细胞是常规手段,但它们在患者体内的成功移植需要同时伴有辅佐性 T 细胞。因此,要在 T 细胞的有益移植量与移植物抗宿主应答的有害效应之间达到重要的平衡。

[0186] MAPC 和 ES 细胞代表可送递的且没有移植物抗宿主应答风险的干细胞群,因为它们可以自由地扩增而不仅限于造血细胞类型,包括 T 细胞。这极大的降低了临床风险。在细胞给药的急性期中的 NK 细胞活性的暂时消除使原始干细胞移植和造血功能重建的频率增加到临床可用阈值水平,且没有长期的免疫抑制风险。

[0187] 随着 MAPC 或 ES 移植并帮助造血,新形成的 T 细胞经历了与上述宿主 T 细胞一致

的胸腺和外周的自体与非自体训练。新形成的幼稚供体 T 细胞与宿主源 T 细胞的共同暴露会导致反应活性细胞的相互消除,因此可以实现对来自 MAPC 或 ES 供体的表达同种异体抗原的 T 细胞的耐受。因此,使患者对 MAPC 或 ES 供体免疫系统的细胞组分和分子组分耐受,并且可以接受细胞、组织或器官移植物而不排斥。

[0188] 4. 天然杀伤 (NK) 细胞功能:

[0189] 可以使用任何的方法来预防免疫排斥、增加移植物移植或增加免疫耐受,例如使用能够抑制 NK 细胞功能——包括将 NK 细胞从细胞群中去除——的试剂。这种试剂包括抗 NK 细胞抗体、辐射或任何其他能抑制 NK 细胞功能的方法。NK 功能抑制在 2005 年 5 月 5 日提交的 PCT 申请号为 PCT/US2005/015740 的专利申请中有进一步描述,该申请中关于在体内抑制 NK 细胞以促进干细胞存活的方法的教导通过引用的方式纳入本文。

[0190] 在本发明的一个实施方案中,可以采用至少一种抑制 NK 细胞功能的方法,包括抑制 NK 细胞介导的细胞毒性。可以使用遗传的(受体为 NK 细胞缺陷型)或后天的(通过例如抗 -NK 抗体在体内使其消耗/失活)方法,通过消耗 NK 来去除 NK 细胞的功能。可以使用任何能够抑制 NK 细胞功能的物质(例如,与 T 细胞或 NK 细胞表面上的 P-选择素糖蛋白 1(PSGL-1)结合(美国专利公布文本 No. 2004/0116333),或者调节含 SH2 的肌醇磷酸酶(SHIP)的表达或功能(美国专利公布文本 No. 2002/0165192)的多聚体复合物)。可以被用来抑制 NK 细胞功能的任何的方法/试剂包括但不限于,化学品(例如一种化合物,包括但不限于一种药用的、药物小分子)、蛋白质(例如抗 -NK 细胞抗体)、肽、微生物、生物制品、核酸(包括编码重组蛋白质或抗体的基因)或遗传构建(例如载体,如表达载体,包括但不限于导致抗 NK 细胞活性的拮抗物表达的表达载体)。

[0191] 本领域中可以获得几个抑制 NK 细胞功能的抗体,包括但不限于抗 - 人胸腺细胞球蛋白(ATG;美国专利 No. 6,296,846)、TM- β 1(抗 -IL-2 受体 β 链抗体)、抗去唾液酸 GM1(免疫原是糖脂 GA1)、抗 -NK1.1 抗体或单克隆的抗 NK 细胞抗体(5E6;PharMingen, Piscataway, NJ)。另外,针对例如一种天然细胞毒性受体(NCR)(包括,例如 NKp46)的抗体;或针对一种白细胞相关抗原样受体家族(包括,例如 LAIR-1)的抗体;或针对杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)家族(包括,例如 KIR2DL1、KIR2DL2 或 KIR2DL3)成员的抗体,是本领域技术人员可以获得的或者可以用本领域技术人员可获得的方法制备,并且在本发明中是有用的。

[0192] 另外,像使 NK 细胞上的 LAIR-1 交联的试剂之类的方法可以被应用于抑制 NK 细胞的功能。而且,辐射(致死的、亚致死的和/或局部辐射)可以被应用于抑制 NK 细胞的功能。在一个实施方案中,抑制 NK 细胞的功能的方法是一种可以与天然杀伤细胞反应的抗体。而且,抑制 NK 细胞的功能的方法可以包括调节免疫系统的试剂,例如那些为免疫抑制开发的试剂。需要注意的是,任何的这些方法/试剂都可以单独使用或组合使用。

[0193] 因此,本文还提供了增加受试者对 MAPC 和其他细胞的免疫耐受性的方法,包括给予受试者一群 MAPC 和有效量的一种能抑制天然杀伤细胞功能的试剂,使得与没有给予所述抑制试剂的方法相比,对 MAPC 的免疫耐受性增加了。

[0194] 5. 基因疗法

[0195] MAPC 可以从体内提取并分离,在培养基中以未分化状态培养或在培养基中被诱导分化,并且用各种技术(特别是病毒转导)对 MAPC 进行遗传改造。基因物质的吸收和

表达是可证明的,且发育过程中外源 DNA 的表达是稳定的。反转录病毒和其他用于在干细胞中插入外源 DNA 的载体是本领域技术人员可以得到的 (Mochizuki, H. et al. 1998; Robbins, P. et al. 1997; Bierhuizen, M. et al. 1997; Douglas, J. et al. 1999; Zhang, G. et al. 1996)。一旦用反转录病毒载体转导,增强的绿色荧光蛋白 (eGFP) 表达会持续存在于终末分化肌肉细胞、内皮组织和来自分离的 MAPC 的 c-Kit 阳性细胞中,这表明引入到 MAPC 的反转录病毒载体的表达存在于整个分化过程中。eGFP⁺ 细胞预先由反转录载体转导并进行几周的分选以进入初始 MAPC 培养阶段,初始含有约 10 个 eGFP⁺ 细胞的培养物被诱导终末分化。

[0196] MAPC 或其子细胞给药后的受试者监测

[0197] 移植之后,可以监测所给予的 MAPC 或子细胞的生长或分化或者 MAPC 或子细胞的治疗效果。例如,可以监测血糖、血清葡萄糖和 / 或血清胰岛素。

[0198] 给药之后,受试者对所述 MAPC 或子细胞的免疫耐受性可用本领域已知的各种方法来检测,以评估受试者对 MAPC 的免疫耐受性。如果当受试者的 MAPC 耐受性不是最优是 (例如受试者的免疫系统排斥外源 MAPC),可以对受试者进行治疗性辅助免疫抑制疗法,该疗法是本领域已知的。

[0199] 遗传修饰的 MAPC 或其衍生的分化子细胞

[0200] MAPC 或其衍生的分化子细胞可以在离体条件下被遗传改造,以去除基因疗法的一个最显著的障碍。例如,可以获得受试者的骨髓穿刺物,并从穿刺物中分离出 MAPC。然后对 MAPC 进行遗传改造以表达一种或多种需要的基因产物 (例如胰腺基因,包括但不限于胰岛素、胰高血糖素、促生长素抑制素或者编码胰腺产生的消化酶的各种基因的任何基因)。然后对 MAPC 进行离体筛选或选择以识别那些已经被成功改造的细胞,并且可以将这些细胞引入受试者或者将这些细胞分化后再引入受试者,可局部地或全身地引入。或者,MAPC 可以被分化,然后在给药前对分化的细胞进行遗传改造。在两者中任一种情况下,所述细胞提供了稳定转染的、能够表达所需基因产物的细胞源。特别是当患者自身的组织 (如骨髓) 为 MAPC 源时,本方法提供了一种生产移植物的免疫安全方法。

[0201] MAPC 或分化子细胞的遗传改造的方法

[0202] 用本文所述的方法分离的细胞或它们的分化子细胞,可以用各种本领域技术人员可获得的方法通过在细胞内引入 DNA 或 RNA 来进行遗传修饰。这些方法一般会被分成四个主要的类别:(1) 病毒转移,例如,包括 DNA 或 RNA 病毒载体的使用,如反转录病毒,例如包括慢病毒 (Mochizuki, H., et al., 1998; Martin, F., et al. 1999; Robbins, et al. 1997; Salmons, B. and Gunzburg, W. H., 1993; Sutton, R., et al., 1998; Kafri, T., et al., 1999; Dull, T., et al., 1998); 猿猴病毒 40 (SV40); 腺病毒 (例如,参见 Davidson, B. L., et al., 1993; Wagner, E., et al., 1992; Wold, W., Adenovirus Methods and Protocols, Humana Methods in Molecular Medicine (1998), Blackwell Science, Ltd.; Molin, M., et al., 1998; Douglas, J., et al., 1999; Hofmann, C, et al., 1999; Schwarzenberger, P., et al., 1997); α 病毒,包括辛德比斯病毒 (Sindbisvirus) (美国专利 No. 5, 843, 723; Xiong, C, et al., 1989; Bredenbeek, P. J., et al., 1993; Frolov, I, et al., 1996); 疱疹病毒 (Laquerre, S., et al., 1998) 和牛乳头瘤病毒;(2) 化学转移,包括磷酸钙转染和 DEAE 葡聚糖转染法;(3) 膜融合转移,例如,使用加有 DNA 的膜泡囊例如脂质体 (Loeffler, J. and

Behr, J., 1993)、红细胞膜和原生质体;和(4)物理转移技术,例如 J. Wolff 的“基因疗法”(1994)第 195 页中的微注射、微发射(参见 J. Wolff 的“基因疗法”(1994)第 195 页; Johnston, S. A., et al., 1993; Williams, R. S., et al., 1991; Yang, N. S., et al., 1990)、电穿孔、核转染或直接“裸露”的 DNA 转移。

[0203] 可以通过插入预选的分离的 DNA,通过用预选的分离的 DNA 取代细胞基因组的一个区段或通过至少一部分所述细胞的基因组的缺失或失活来对细胞进行遗传改造。至少一部分所述细胞的基因组的缺失或失活可以通过各种方法来完成,包括但不限于遗传重组,例如,通过反义技术(可以包括使用核酸肽或 PNA)或通过核酶技术。一种或多种预选的 DNA 序列的插入可以通过同源重组或通过将病毒整合到所述宿主细胞基因组中来完成。非同源重组的方法也是已知的,如美国专利 6,623,958、6,602,686、6,541,221、6,524,824、6,524,818、6,410,266、6,361,972 中所述,它们关于非同源重组的全部公开内容特别地通过引用的方式纳入本文。

[0204] 还可以使用质粒表达载体和核定位序列来将所需的基因序列引入到细胞中,特别是引入到其细胞核中。用于将多核苷酸引导到细胞核的方法是本领域已知的。例如,如 Sebestyen, et al. (1998) 中所述,信号肽可以与质粒 DNA 连接,从而将所述 DNA 引导到细胞核中以实现更有效的表达。

[0205] 可以使用启动子来引入遗传物质,所述启动子应会使得所研究的基因被某些化学物质/药物正向或负向诱导,在给予一种给定的药物/化学物质后被消除,或者可被标记使得它可以在特定的细胞区室(包括但不限于细胞膜)被化学物质(包括但不限于他莫昔芬(tamoxifen)反应性突变型雌激素受体)诱导。

[0206] 任何的转染或转导技术都可以被用于在 MAPC 或子细胞中引入转录调控序列以激活所需的内源基因。这可以通过同源(例如 U. S. 5,641,670)或非同源(例如 U. S. 6,602,686)重组来完成。这些专利关于内源基因激活的方法的教导通过引用的方式纳入本文。

[0207] 靶细胞的成功转染或转导可以用本领域技术人员已知的技术利用遗传标记物来证明。例如, *Aequorea victoria* 绿色荧光蛋白已经被证明是一种识别和追踪修饰过的造血细胞的有效标记物 (Persons, D., et al., 1998)。可选择的替代标记包括 β -Gal 基因、截短的神经生长因子受体、药物选择标记(包括但不限于 NEO、MTX、潮霉素)。

[0208] 蛋白质转导

[0209] 当蛋白质与蛋白转导域(PTD)连接的时候,它们可以直接被转移至细胞,所述 PTD 是可自由、迅速穿过细胞膜的小阳离子肽结构域。例如聚精氨酸(聚精氨酸介导的蛋白转导)和 HIV- 来源的 Tat 等几个 PTD 已经被鉴定,它们允许一种融合蛋白有效地穿过细胞膜。蛋白转导的一个独特的优点是,所述转导的蛋白在所述细胞中仅短暂地存在,这一特征依赖于所表达的蛋白的内在周期。另外,可以通过加入不同量的蛋白质来控制所转导的蛋白质的胞内浓度。

[0210] 从 MAPC 中鉴定胰腺祖细胞

[0211] 为了从 MAPC 以及胰岛素-1 阳性细胞中鉴定中间祖细胞,可以在一种胰腺启动子(例如 Pdx-1、Ngn3、Pax4 和胰岛素启动子)的控制下对来自转基因小鼠的 MAPC 细胞系进行基因工程改造以表达例如荧光染料等的标记物,并且可以产生不同的杂交(例如,可以分

离来自具有 PDX1-GFP、Ngn3-YFP、Pax4-RFP 和 MIP-GFP 的小鼠,以及 Nkx6.1-GFP 和 PDX-1x Ngn3 小鼠的骨髓 (BM) 的 MAPC)。可以分离克隆群并且测试它们的多能性、表型、细胞遗传学和分化成 β -细胞样细胞的能力(评估 Pdx1、Ngn3、NeuroD1、Pax4、Nkx6.1 和胰岛素随时间的表达)。可以通过这些细胞系跟踪分化,并从分化的培养物中选择中间祖细胞。

[0212] 实施例

[0213] 下面提供的实施例目的在于证明和进一步说明本发明的某些实施方案和某些方面,且不应被解释为限制了本发明的范围。

[0214] 实施例 1

[0215] MAPC 在体内分化成 β -细胞

[0216] 如 Jiang Y et al. (2002) 中所述,用 eGFP 转基因 C57Bl/6Thy1.1 小鼠的骨髓细胞建立鼠 MAPC 细胞系。在约 5% CO₂ 和约 5% O₂ 的气体浓度下,于 10ng/cm² 的人纤连蛋白 (Sigma) 包被的培养皿 (Nunc) 上,用 60% DMEM-LG (Gibco BRL) 和 40% MCDB-201 (Sigma) 培养 MAPC,其中 40% MCDB-201 (Sigma) 含有 1×SITE (Sigma)、1×亚油酸-牛血清白蛋白 (LA-BSA) (Sigma)、0.1mM 抗坏血酸-2-磷酸 (Sigma)、1×化学成分明确的浓缩脂质 (Gibco)、0.05 μ M 地塞米松、0.1mM β -巯基乙醇 (Sigma)、100U 青霉素 (Gibco)、1000U 链霉素 (Gibco)、1000U/ml LIF (Chemicon)、10ng/ml mEGF (Sigma)、10ng/ml hPDGF-BB (R&D systems)、2%胎牛血清 (FCS) (Hyclone Laboratories)。接种的细胞密度为约 100 个细胞/cm² 且每两天进行一次细胞分皿。

[0217] 通过尾静脉注射,约 0.03-1×10⁶ 个 5% O₂ 培养的 eGFP C57Bl/6 低 O₂ 的 MAPC 被移植到 6-8 周龄的以 275cGy 辐射后的 NOD-SCID 小鼠体内 (n = 28)。在第 -1、+10 和 +20 天时腹膜内注射抗去唾液酸 GM1 抗体 (Wako) (20 μ l 储液稀释于 380 μ l 1×PBS 中) 以降低 NK 活性。

[0218] 输注后 (5-20 周) 通过外周血 (PB) 定期评估造血功能的重建,之后处死动物。在所有被处死的动物中,评估血液、BM 和脾中的 eGFP 造血细胞的存在,并且收集小肠、胰腺、肝、肺、皮肤、骨骼肌和脑以确定 MAPC 衍生细胞对非造血细胞谱系的贡献。

[0219] 如图 10 中所述,28 只小鼠中的 21 只具有 MAPC- 衍生的造血功能的指征。没有显示出植入的 7 只用具有低 Oct-4 水平 (< 1% mESC) 的 MAPC 移植,而所有其他动物接受具有 30-80% 的 mESC 的 Oct-4mRNA 水平的 MAPC。对淋巴造血组织的分析证明了多谱系植入 (图 10)。PB、BM、脾和胸腺的 FACS 分析显示出多谱系的植入,包括所有的髓样细胞、T-细胞、 β -细胞和 NK-细胞。eGFP 分类的脾 CD4/CD8T 细胞能够在混合淋巴细胞反应培养物中与 Balb/C 来源的细胞反应,并且能够产生被抗-CD3+ 抗-CD28 单克隆抗体刺激的反应 (数据未出示)。另外,约 1% 的 GFP⁺ 细胞表达 Scat+cKit 或 Thy1+cKit,表明从 MAPC 生成造血干细胞 (HSC),与 eGFP⁺CFU-Mix 和 BFU-E 可以被培养的事实以及来自初级受者的 BM 重建致死辐射二级受者的造血系统的能力相一致。

[0220] 例如肺、胰腺、心脏、肝和小肠等的其他器官也可以进行是否存在 MAPC 衍生的子细胞的分析。在肠中观察到了高水平的分布,并且分化成具有肠上皮的形态学特征和表型特征的细胞。有趣地是,在除位于隐窝的下层 3-4 个细胞之外的所有细胞中发现了植入,这与肠干细胞区室的植入相一致。这种情况已在 12 只小鼠中的 2 只中发现,这两只动物在大约第 5-6 周的时候病得很重,但是通过抗生素给药后获得改善。在第 13 周的时候处死这两

只动物。在其他 10 只动物中,没有观察到在肠上皮中的植入。对于其他器官,主要在间充质区室中观察到了低水平的植入。在心脏中,检测到 200-300 个 GFP⁺ 心肌肌钙蛋白⁺ 细胞。

[0221] 在 MAPC 移植之后的胰腺上进行胰岛素和 GFP 的免疫荧光和 GFP 的免疫组织化学。首先,按如下所述进行胰腺上的 GFP 的免疫组织化学检测。用 10% 的中性缓冲福尔马林的 PBS 溶液于 4℃ 下将胰腺固定 24 小时。用 PBS 洗涤两次后,用石蜡包埋样品。切 6 微米的切片并且置于 SuperFrost Plus 载玻片上。经过标准的脱蜡和复水之后,用蒸馏水清洗切片三次,每次 5 分钟。抗原回收通过利用 0.01M pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液 (Invitrogen) 并使用一个家用电饭煲蒸 20 分钟,接着进行 20 分钟的冷却步骤来实现。用蒸馏水快速冲洗之后,用 PBS+0.05% 的吐温 20 进行 5 分钟的切片透化处理。通过在含 1.8% H₂O₂ 的蒸馏水和 2.5% 高碘酸 (Sigma) 水溶液中相继孵育 5 分钟来阻断内源的过氧化物酶,用流动的自来水清洗 5 分钟进行分离。在 5 分钟的流动的自来水清洗之后,用含 0.02% 的硼氢化钠 (Sigma) 的蒸馏水将载玻片孵育 2 分钟。在 5 分钟的流动的自来水清洗之后,通过相继与抗生物素蛋白和生物素 (BiotinBlocking System, DakoCytomation) 一起孵育 15 分钟来阻断内源性生物素,用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗 5 分钟进行分离。在与生物素一起孵育之后,用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗切片 5 分钟。通过在 0.4% 鱼皮明胶的 PBS 溶液中孵育 30 分钟来封闭非特异性结合位点。除去封闭缓冲液并且将用 PBS+0.05% 吐温 20+1% BSA 稀释的初级抗体加到切片上并且 4℃ 下孵育过夜。兔抗 -GFP 来自 Abcam(ab6556) 并且使用 0.67 μg/ml 的浓度。第二天早晨用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗载玻片三次,每次五分钟。以 1 : 1500 稀释在 PBS+0.05% 的吐温 20 中的生物素化的抗 - 兔 F(ab')₂ 抗体被加到切片上并且孵育 30 分钟。用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗载玻片三次,每次五分钟。根据制造商说明书制备的 VectastainABC 过氧化物酶复合体 (Vector Laboratories) 被加到切片上并且孵育 30 分钟。用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗载玻片三次,每次五分钟。根据制造商的说明书,用 DAB+ (DakoCytomation) 显色。经过标准的苏木精复染、脱水和封固后,用 Nikon Coolpix 4500 数码照相机拍摄照片,所述照相机安装在 Zeiss Axioskop 2 上。

[0222] 在单染色实验的两只动物中观察到 GFP⁺ 胰岛。

[0223] 接着,按如下所述进行 MAPC 移植后的胰腺上的胰岛素和 GFP 的免疫荧光检测。用 10% 的中性缓冲福尔马林的 PBS 溶液于 4℃ 下将胰腺固定 24 小时。用 PBS 洗涤两次后,用石蜡包埋样品。切 6 微米的切片并且置于 SuperFrost Plus 载玻片上。经过标准的脱蜡和复水之后,用蒸馏水清洗切片三次,每次 5 分钟。抗原回收通过利用 0.01M 柠檬酸盐缓冲液 pH 6.0 (Invitrogen) 中使用一个家用电饭煲蒸 20 分钟,接着进行 20 分钟的冷却步骤来实现。用蒸馏水快速冲洗之后,用 PBS+0.05% 的吐温 20 进行 5 分钟的切片透化处理。通过在 0.4% 鱼皮明胶的 PBS 溶液中孵育 30 分钟来封闭非特异性结合位点。除去封闭缓冲液并且将用 PBS+0.05% 的吐温 20+1% BSA 稀释的初级抗体加到切片上并且 4℃ 下孵育过夜。豚鼠抗胰岛素来自于 DakoCytomation(A0564) 并且使用 21.25 μg/ml 的浓度。兔抗 -GFP 来自 Abcam(ab6556) 并且使用 2 μg/ml 的浓度。第二天早晨用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗载玻片三次,每次五分钟。以 1 : 125 和 1 : 450 稀释在含 1 : 1000 的 TO-PRO-3- 碘化物 (Invitrogen) 的 PBS 中的花青 -2 (Cyanine-2) 标记的抗 - 豚鼠抗体和花青 -3 (cyanine-3) 标记的抗 - 兔 F(ab')₂ 抗体 (Jackson Immunoresearch) 被加到切片上,并且孵育 30 分钟。用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗载玻片三次 (每次五分钟) 之后,使

用 ProLong Gold(Invitrogen) 对载玻片进行封固。用 BioRadRadiance 2100 获得共聚焦激光扫描图片,所述 BioRad Radiance 2100 安装在 Zeiss Axioskop 2 上。

[0224] 移植了未分化 GFP⁺MAPC 的 NOD-SCID 小鼠中,有至少两只的胰腺中被检测到 GFP⁺/胰岛素⁺胰岛(图 11)。

[0225] 实施例 2

[0226] 啮齿类 MAPC 在体外分化成 β -祖细胞和 β -细胞

[0227] MAPC 定向至内分泌胰腺系

[0228] 利用低 O₂、高 Oct-4(图 2;在一个实施方案中,高 Oct-4 是大鼠胚胎干细胞中 Oct-4 存在量或总 mRNA 的约 5%至约 25%,而低 Oct-4 通常大约少 4 个数量级)表达的小鼠 MAPC 和大鼠 MAPC(如本文描述地分离和培养),可以确定已知在内胚层→胰腺→内分泌胰腺→ β -细胞定向和分化中发挥作用的转录因子可以以正确的序列形式激活以产生最终的表达胰岛素-1mRNA 的细胞群。例如,MAPC 被诱导表达 β -细胞的转录程序,并随后当用激活素 A 和 BMP4(第 0-9 天)、抗-SHH(第 3-9 天)、EGF(第 9-15 天);烟酰胺(或 exendin 4)、 β -细胞素和 GDF11(第 15-21 天)培养的时候,相继表达转录因子(TF) Hnf3 β 、Hnf6、Pdx-1、Ngn3、NeuroD1、Pax4、Nkx61,以及胰岛素-1、胰岛素-2、胰高血糖素和促生长素抑制素的 mRNA。

[0229] 用于啮齿类 MAPC 的扩增和分化培养基(添加后文中描述的因子)在表 2 中描述。

[0230] 表 2

	成份	扩增培养基	分化培养基
[0231]	DMEM-LG (Gibco)	300 mL	300 mL
	MCDB (Sigma)	200 mL (40%)	200 mL (40%)
	FCS (Hyclone)	10 mL (2%)	10 mL (2%)
	ITS+1 (Sigma)	5 mL	5 mL
	L-抗坏血酸 (Sigma)	5 mL (0.1mM)	5 mL (0.1mM)
	青/链霉素 (Gibco)	5 mL	5 mL
	地塞米松 (Sigma)	100 μ L (0.05 μ M)	
	β -巯基乙醇 (Gibco)	500 μ L (0.1 mM)	500 μ L (0.1 mM)
	hPDGF (R&D)	500 μ L (10 ng/mL)	
	hEGF (Sigma)	500 μ L (10 ng/mL)	
	mLIF (Chemicon)	50 μ L (1000 U/mL)	

[0232] 另外,可以在室温下用 10ng/mL 的纤连蛋白(FN)包被培养皿/瓶一个小时。

[0233] 细胞因子介导的分化

[0234] 经过对不同的细胞因子和胞外基质(ECM)组分的作用的多因子分析之后可以实现细胞因子介导的分化,所述细胞因子和胞外基质组分已知在内胚层、前肠、胰腺和内分泌胰腺特化和分化中起重要作用。使用 Q-RT-PCR 测得未分化的大鼠 MAPC 并不表达显著水平的 Pdx-1、Ngn3、NeuroD1、Nkx6.1, Ins-1 和 Ins-2 的转录物(少于 35 个循环);低水平的 Hnf1、Hnf3 β 的转录物(30-35 个循环);和可检测水平的 Nkx2.2 和 Glut2 的转录物(< 30 个循环)。

[0235] 对于本文描述的 Q-RT-PCR 反应,引物序列在表 3-5 中示出并且使用如下的实验方案:用 RNeasy Mini Kit(Qiagen;Valencia CA)从细胞中提取 RNA,之后是用

DNA-Free™ (Ambion, Austin, TX) 进行 DNA 酶处理。用 TaqMan 进行 RNA 的反转录 (Applied Biosystems, Foster City, CA; 第 1 步 (孵育): 25°C, 10min; 第 2 步 (RT): 48°C, 30min; 第 3 步 (RT 失活): 95°C, 10min)。反应混合液在表 6 中示出。

[0236]

表 3

靶	组	序列	SEQ ID NO:	登记号	描述
hACVR1B v1	F1	TTACCCACACACAGTCCAA	1		
	R1	CCAAAACACGGCTTCAGTT	2	NM_004302	激活素 A 受体, IB 型 变体 1
hACVR1B v2	F1	TAGGGTGCCATTGGAGTTC	3		
	R1	ACATTGCCCCAGGTTTGTC	4	NM_020327	激活素 A 受体, IB 型 变体 2
hACVR1B v3	F1	CCTACCTCCCATTCACAGGAT	5		
	R1	GCACCCCTAAGCACAGCTACC	6	NM_020328	激活素 A 受体, IB 型 变体 3
hADAM9	F1	CCACTTGAGAAATTCATGAGCA	7		
	R1	TTTACATGACCCAGCACACC	8	NM_003816.1	解聚蛋白和金属 蛋白水解酶结构域 9
hALCAM	F1	AGGTGGCAGCTTGTGAAGAT	9		
	R1	GAGTCGGCTCCTATGGTGC	10	NM_001627	激活的白细胞 粘附分子
hCD44	F1	AGCCCATTTGTCATCTTGTC	11		
	R1	AGAGGAAGGGTGTGCTCTGA	12	NM_000610	归巢功能和 印度人血型系统
hCD164	F1	TGAGCCATTAAATTTGGGTTT	13		
	R1	AGCAGTATCTGCCTGTGCAA	14	NM_006016	唾粘蛋白

[0237]

靶	组	序列	SEQ ID NO:	登记号	描述
hDDR1	F1	AATGTTTCCTTGTGCCTGCT	15		
	R1	CCAGGTCCAGTGTTTCAGGT	16	NM_001954.3 NM_013993.1 NM_013994.1	盘状结构域 (discoidin domain) 受体家族成员1
hGPNMB	F1	CAGGCATGATGCTGAGTGAC	17		
	R1	CAGGGACCTCATCTTTGGAA	18	NM_002510.1	糖蛋白 跨膜nmb
hIL6ST	F1	TCACAAATCCTGTGGATCTGG	19		
	R1	CCCTCAGTACCTGGACCAAA	20	NM_002184 NM_175767	白细胞介素6 信号转导因子
hITGA5	F1	CCAAAGGGGAATCAGAACTCA	21		
	R1	TGGAGCAGGCCCAATATAG	22	NM_002205	整联蛋白 αV
hITGB1	F1	TGCAACAGCTCTCACTACG	23		
	R1	AAGATGGGCAACTCAAATGG	24	NM_002211	整联蛋白 $\beta 1$ 变体1a
hITGB5	F1	ACTGAGATGCTGGGCTGTCT	25		
	R1	GACCCCTTCCTGACAGTCGTC	26	NM_002213.3	整联蛋白 $\beta 5$
hNIFIE14	F1	GAGACCTTCGTCCACCTCTG	27		
	R1	CATTGACAACGGCGACATAC	28	NM_032635.2	七次跨膜结构域蛋白质
hTM4SF1	F1	CCCTTTGAACTGCCTTGTT	29		
	R1	TGCATTCATTGTGGATTGGAA	30	NM_014220.1	跨膜4超家族 成员1

[0238]

表4: 小鼠引物

靶	序列	SEQ ID NO:	产物大小	登记号
mAbcg2	TCACTGACCCCTTCCATCCTC	31		
	GGAATACCGAGGCTGATGAA	32	F1R1 = 143bp	NM 011920
mCD24a	TGGAAGAAGGAGAGCTCACAG	33		
	CATTCAGGTGTGAGGCAAGG	34	F1R1 = 75bp	NM 009846
Mmsi-1	GATGCCTTCATGCTGGGTAT	35		
	TAGGTGTAACCAGGGGCAAG	36	F1R1 = 101bp	NM 008629
mOct-4	CCAATCAGCTTGGGCTAGAG	37		
	CCTGGGAAAGGTGTCCTGTA	38	F1R1 = 129bp	NM 013633
	CAAGGCAAGGAGGTAGACA	39		
	GCTCCTGATCAACAGCATCA	40	F1R1 = 132bp	NM 013633
MSox1	CACAACTCGGAGATCAGCAA	41		
	TGTAATCCGGGTGTTCCCTTC	42	F1R1 = 127bp	NM 009233
mSSEA1	TATTCAGGAGCGATCCAAC	43		
	CTCGTTCAGTTGCTCACAA	44	F1R1 = 99bp	NM 010242

[0239]

表5

靶	序列	SEQ ID NO:	大小	登记号
AMY1	AGGAACATGTTGCCCTCAG AGTGCTTGACAAAGCCCAGT	45 46	144	NM_031502
HNF3b (FoxA2)	GGAAACATTGGGGGAACTTT GTGTGGCCCAAGCTATTAGG	47 48	99	NM_012743
GAPDH	TGCCACTCAGAAGACTGTGG GGATGCAGGGATGATGTTCT	49 50	85	NM_017008
GCG	TTTTGTGCAGTGGTTGATGA CAGCATGCCTCTCAAATTCA	51 52	80	NM_12707
GcK	GTGGAGCCCCAGTTGTTGACT GGCTCATCACCTTCTCAGG	53 54	84	NM_012565.1
HNF1b	ACCCTCACCAGCATGTCTTC GTCAGGTCGCTGGACTTCTC	55 56	150	NM_013103
HNF4a	CCTGATGCAAGAACACATGG TGATGGCTGTGGAGTCTCAG	57 58	133	NM_022180
HNF6	CTGTGAAACTCCCCCAGGTA TCATCCCCGCATAAGTGTGAA	59 60	195	NM_022671

[0240]

靶	序列	SEQ ID NO:	大小	登记号
INS1	CACCTTTGTGTCCTCACCT	61		
	GACGGGACTTGGGTGTAG	62	82	NM_019129
INS2	GAAGTGGAGGACCCACAAGT	63		
	CAGTGCCCAAGGCTGAAGGT	64	78	NM_019130
Isl1	GGGACGGGAAACCTACTGT	65	95	
	CACGAAAGTCGTTCTTGCTGA	66		NM_017339.1
NeuroD	CCCAAAGCAAACAACCACCT	67		
	GTACCCCATCCTCCTGGAAT	68	142	NM_019218.1; NM_002500 (人)
NGN3	GAGTGGGTGGGCGTACTCTA	69		
	TTGGAACTGAGCACTTCGTG	70	186	NM_021700.1; BC074939 (人)
Nkx6-1	ACTTGGCAGGACCAGAGAGA	71		
	GGAACCAGACCTTGACCTGA	72	75	NM_031737; NM_006168 (人)
P48	AGGCCCAGAAAGGTCATCATC	73	78	
	GAGGAGGGAGACCGTAGTCC	74		X98446.1; NM_178161 (人)

[0241]

靶	序列	SEQ ID NO:	大小	登记号
PAX4	AGGACAAGGCTCCCAGTGTA	75	117	NM_031799.1; BC074761 (人)
	TAGGAAGAGCTGGAGCCAAA	76		
PAX6	TCCCAGGGATCTGAGAATTG	77		
	CACAACGGTTTGAAATGACG	78	104	NM_13001; NM_001604 (人Pax6序列 的一个实例)
PDX1	TCTGCCTCTGGGACTCTTTC	79		
	GGGACCGCTCAAGTTTGTA	80	89	NM_022852; U35632 (人)
PPY	CCACCCAAAGTGGATAGGAGA	81		
	CAGCAGAAGGTAGGTGCTGG	82	102	NM_012626.1
SST	CCCAGACTCCGTCAGTTTCT	83		
	GTTGGGCTCAGACAGCAGTT	84	99	NM_12659.1
SYP	TGATCGTGTGTGCCATTTT	85		
	AACAAATACCGAAGGACACAG	86	85	NM_012664
Glut2	ATCCACATTCCGGAACAGGAC	87	80	

[0242]

靶	序列	SEQ ID NO:	大小	登记号
	CAAGGTTCCGGTGATCTTGT	88		NM_012879.1
Flk1	CCAAGCTCAGCACACAAAA CCAACCACTCTGGGAAGTGT	89 90		
VWF	CCCACCGGATGGCTAGGTATT GAGGCGGATCTGTTGAGGTT	91 92		
VE-钙粘蛋白	GGCCAACGAATTGGATTCTA GTTTACTGGCACCAACGTCCT	93 94		

[0243] 表 6

[0244]

成份	100 μ L 反应	终浓度
10x Taqman RT 缓冲液	10.0 μ L	1X
25mM 氯化镁	22.0 μ L	5.5mM
脱氧 NTPx 混合物	20.0 μ L	500 μ M/dNTP
随机六聚体	5.0 μ L	2.5 μ M
RNA酶抑制剂	2.0 μ L	0.4 U/ μ L
MultiScribe逆转录酶 (50U/ μ L)	2.5 μ L	1.25 U/ μ L
RNA (1 μ g/100 μ L 反应)	X	
无RNA酶水	38.5 μ L - X	
总体积	100 μ L	

[0245] 在反转录之后,按如下步骤进行定量实时 PCR(Q-RT-PCR):第1步:50℃,2min(孵育);第2步:95℃,10min(Taq激活);第3步:95℃,15s(变性),之后60℃,1min(延伸),并重复40个循环;第4步:95℃,15s(解离);第5步:60℃,20s(解链曲线);第6步:95℃,15s。Q-RT-PCR反应混合物在表7中给出。

[0246] 表7

[0247]

	12 μ L 反应	终浓度
Syber Green (2x)	6.0 μ L	1X
反向引物 (5 μ M)	0.25 μ L	200nM
正向引物 (5 μ M)	0.25 μ L	200nM
cDNA (10ng/ μ L)	3.0 μ L	(30ng/反应)
无RNA酶水	2.5 μ L	
总体积	12 μ L	

[0248] 在初始的系列研究中,在6、12和18天后用Q-RT-PCR测定细胞密度(大约 10^4 - 10^5 个细胞/cm²)、ECM成份(纤连蛋白、胶原、基质胶)和不同浓度(10-100ng/mL)的bFGF(10-100ng/mL)、FGF2(10-100ng/mL)、激活素A(例如大约10ng/mL-大约100ng/mL)、BMP4(例如大约10ng/mL-大约50ng/mL)、视黄酸(大约 10^{-6} M)、EGF(例如大约10-大约100ng/mL)、FGF10(例如大约50-大约150ng/mL,包括大约100ng/mL)、HGF(例如大约10-大约100ng/mL)、GDF11(例如大约50-大约150ng/mL)、环巴胺(例如大约10 μ M)、抗-SHH抗体(抗体;例如大约10 μ g/mL)、烟酰胺(例如5 μ M-大约50 μ M,包括大约10 μ M)、exendin 4(大约5nM-大约50nM,包括大约10nM)、 β -细胞素(例如大约50-大约150ng/mL)单独或者其中两者或三者的组合(以不同的时间顺序组合)对诱导转录因子、胰岛素、胰高血糖素和促生长素抑制素表达水平的影响。

[0249] 激活素A、BMP4和环巴胺或抗-SHH抗体的组合引起Pdx-1mRNA的最大的升高(>100倍)。当细胞以大约50,000细胞/cm²接种于基质胶上的时候,观察到所述的Pdx-1mRNA的最大升高。然而,当细胞维持培养超过6天的时候,MAPC衍生的细胞出现死亡。

[0250] 单独地或组合地测试后续加入的被认为在胰腺定向细胞进一步增殖和分化成成熟的内分泌腺中起重要作用的因子,包括EGF(例如大约50ng/mL)、HGF(例如大约50ng/mL)和FGF10(例如大约100ng/mL)。这些研究证明,在第6天之后去除激活素A、BMP4和环

巴胺或抗-SHH 抗体并且将存在 EGF 或 HGF 但没有 FGF10 的条件下培养细胞时,显著地增强细胞的存活。EGF、HGF 和 / 或 FGF10 组合没有累加效应。然而,当用 EGF 维持培养物的时候,超过 12 天的时候细胞也会出现死亡。在第 12 天后加入 10 μ M 烟酰胺 (Sigma, St. Louis, MO) 和 10nM 的 Exendin4 (Sigma, St. Louis, MO) 支持细胞的更好的存活并且支持进一步分化成内分泌胰腺,因为至第 18 天胰岛素-1mRNA 水平又增加 2-4 倍。当加入 GDF11 的时候,观察到 Ins1 和 Ins2mRNA 水平的进一步增加。通过调整分化过程中的不同步骤的持续时间,以及加入 β -细胞素 (50ng/mL),进行进一步优化。在 20% O2 以及 Exendin4 (或烟酰胺)、GDF11 和 β -细胞素条件下分化产生的胰岛素 1mRNA 为胰腺水平的 1% -3%。MAPC 分化成胰腺细胞的示意图在图 3 中给出。

[0251] 根据这个分化的示意图,将分化延续到第 15-18 天之后。至第 18 天,细胞簇从附着在皿底部的细胞中出芽 (图 4)。所述培养物中以及从第 18 天开始在“间质饲养层”之上的簇中的转录因子和激素 mRNA 的表达总结在图 5 中。

[0252] 这些研究证明,从第 3 天开始,Hnf3 α 、Hnf6 和 Hnf1 α 的 mRNA 表达有持续的早期的增加。Pdx-1mRNA 从第 3 天开始增加,并且表达持续地增加至第 21 天。在第 3 天检测到 Ngn3 的转录物,但是至第 12-18 天进一步增加 10,000 倍以上。它的下游靶标 Neuro-D 从第 6 天开始显著地增加。从第 15 天开始观察到 Nkx2. 2、胰岛素-1 和 -2mRNA 的显著增加。在第 18 和 21 天的培养物上清液中收集的簇表达总大鼠胰腺的约 1% 的水平的胰岛素-1mRNA、总大鼠胰腺的约 1% 的水平的胰岛素-2mRNA、总大鼠胰腺的约 0.5% 的水平的胰高血糖素 mRNA (未显示)。仍然可以检测到高水平的 Ngn-3 和 Neuro-D mRNA,这说明在所述簇中的细胞处于分化的不同阶段。出人意料地是,某些转录因子 (Ngn-3 和 Neuro-D 以及至更小范围的 HNF3 β 和 HNF6) 的水平在第 12 和 / 或 18 天表现出下降,之后该水平又再次升高。这可反映出该培养物是如何饲养的:在第 3、6、12、18 和 21 天更换一半的培养基,而在第 9 和 15 天 100% 的培养基均被更换,此时细胞因子的混合物也被更换掉。因此,由于培养基完全改变,所述培养系统本身分泌的细胞因子或者细胞因子的突然改变可能起作用。

[0253] 在第 18、21 和 24 天,检测所述附着“间质”层细胞的内胚层和中胚层特征。检测到的 Hnf 水平与饲养细胞之上的簇中检测到的水平没有显著差异。然而,在附着层中的 Pdx1、Ngn3、Neuro-D、Ins1 和 Ins2 的 mRNA 水平比非附着簇中测定的水平低 1,000-10,000 倍。另外,在所述间质层中,存在有容易检测的大量内皮基因 (F1k1、F1t1、VE- 钙粘蛋白和 vWF) 和平滑肌 (SM22 和 α SMA) 的转录物。内皮的存在可能是有益的,因为有大量的证据表明胰腺 (和肝) 的发育依赖于内皮的存在 (Matsumoto et al., 2001; Lammert et al, 2001)。

[0254] 除了内分泌胰腺转录物,也检测到低水平的外分泌胰腺转录物,包括淀粉酶。它们的水平比在新鲜胰腺组织中的水平低 10^7 - 10^8 倍 (数据未显示)。而且,其他外胚层基因——特别是肝细胞相关基因,包括 AFP 和白蛋白——也在以胰腺分化为目标的培养物中表达,表明所述分化条件不是 100% 胰腺特异的。

[0255] 在蛋白水平评估了表达的内分泌胰腺标记物。对经过胰腺分化条件 (第 0-9 天,激活素 A 和 BMP4; 第 3-9 天,抗-SHH; 第 9-15 天,EGF; 第 15-25 天,烟酰胺、 β 细胞素、exendin4 和 / 或 GDF11) 培养后约 21 天的培养大鼠 MAPC 进行免疫组织学检查。对从间质饲养层出芽的细胞簇进行胰高血糖素、c 肽和 Pdx-1 的染色。如图 6 中所示,10-20% 的细胞对 Pdx-1 染色显示出一种典型核型阳性;所述簇中 1-2% 的细胞对 c 肽染色显示出一种

典型的颗粒型阳性,所有这些细胞也为 Pdx-1 阳性;5-10%的细胞对胰高血糖素染色呈阳性,它们仅存在于细胞质中;并且作为对照,也进行大鼠胰岛素瘤(RIN)细胞的胰岛素和胰高血糖素的染色。

[0256] 还检测了在 5% O₂ 或者在 20% O₂ 下进行分化的效果。测得在 20% O₂ 下的分化产生更高水平的 Ins1。

[0257] 转录因子的转导和任选地细胞因子介导的分化

[0258] 最近发表的文献已经证明,ES 细胞(Miyazaki et al.,2004)或成体组织(肠上皮样细胞;Yoshida et al.,2002)中的胰腺谱系转录因子 PDX-1 外源性表达,或者 ES 细胞(Dominguez-Bendala et al.,2005)或成体组织(胰管细胞;Heremans et al.,2002)中的次级转录因子神经元素(neurogenin)-3 的外源性表达可以上调这些细胞中胰岛素。

[0259] 进行这样的研究,在所述研究中用腺病毒载体转导沿一种内胚层胰腺通路方向诱导的大鼠 MAPC,所述腺病毒载体表达鼠 Pdx-1 和鼠 Ngn3cDNA。所述载体包含血凝素标记的小鼠神经元素-3(Ad-Ngn3)或小鼠胰腺-和-十二指肠同源框-1(Ad-Pdx1)或增强的绿色荧光蛋白(Ad-GFP)编码序列,所有它们都在巨细胞病毒(CMV)启动子的调控下进行组成型表达(Heremans, Y., et al. 2002)。另外,编码 Ngn3 的腺病毒也包含另一个 CMV 启动子下游的 eGFP cDNA(Ad-Ngn3-GFP)。根据 He T-C. et al. 1998 描述的标准步骤扩增重组的复制缺陷型腺病毒。

[0260] 在 0 天;在激活素、BMP4 和抗-SHH 抗体初次处理后的第 6 天;或者在激活素、BMP4 和抗-SHH 抗体初次处理(接着用 EGF 处理 6 天)后的第 12 天进行转导。在 12 孔的多孔板中进行腺病毒对培养细胞的感染。用磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)(Cellgro)清洗所述细胞两次。1 个孔中的细胞被胰蛋白酶消化并且被应用于测定细胞的数目。对于单次感染实验,即 Ad-GFP、Ad-Pdx1 或 Ad-Ngn3-GFP,用含 1g/l 葡萄糖(Cellgro)的低葡萄糖的达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)将病毒稀释到 2500 的感染复数(MOI)(每个细胞 2500 个感染的病毒颗粒)。在双感染实验中,即 AdPdx1+AdNgn3 GFP,两种病毒都稀释到 1250 的 MOI。阴性对照由不含病毒的 DMEM 组成。在最后一次 PBS 清洗之后,去除细胞中的 PBS 并且每孔中加入 0.35ml 的病毒悬浮液,之后在 37℃、7.5% CO₂ 的湿润空气(21% O₂)下培养细胞。在 2 小时后,去除病毒悬浮液,用 PBS 清洗细胞两次,并且进一步用 60%低葡萄糖的 DMEM、40% MCDB-201(Sigma)(添加 2%的胎牛血清(FCS))在 37℃、7.5% CO₂ 的湿润空气(21% O₂)下培养细胞。在转导之后,所述细胞在没有细胞因子或者存在有 exendin、烟酰胺和/或 GDF11 条件下维持 3 天。

[0261] 在用所述腺病毒载体转导之后,鼠 Pdx-1 和 Ngn3mRNA 水平等于(PDX-1)或者显著地高于(Ngn3)成熟鼠胰腺中检测到的水平。当用抗 Pdx-1 和 NeuroD1 的抗体对用两种腺病毒(Ad-Pdx1 和 Ad-Ngn3,每种以 1 : 1250 的 MOI)转导的培养细胞进行染色时候,大部分的细胞染色呈阳性。

[0262] 在第 0 天的转导没有引起被认为存在于 Pdx-1 和 Ngn3 下游的转录物(如 NeuroD1)的任何变化。在第 6 天存在低水平的内源的 Pdx-1,这个时候的转导导致 NeuroD1 和 Ins1 表达有一定程度的升高。单用 Ad-Pdx-1 对第 12 天的大鼠 MAPC 进行转导可使 NeuroD1 的表达有小于 100 倍的增加,伴随着对 Ins1 和促生长素抑制素 mRNA 水平的最小限度的影响。单用 Ad-Ngn3 对第 12 天的大鼠 MAPC 进行转导可诱导 NeuroD1mRNA 的表达增加 10,000 倍

以上,伴随着使促生长素抑制素 mRNA 增加 100,000- 倍和最小限度地增加胰岛素 -1 和胰高血糖素 mRNA 水平。

[0263] 用 Ad-Pdx-1 和 Ad-Ngn3 的组合对第 12 天的大鼠 MAPC 进行转导可导致增加大鼠 Pdx-1mRNA 增加 10 倍, NeuroD1mRNA 增加 50 倍, Pax-4mRNA 增加 100 倍,伴随着 Ins1 增加 10,000 倍以上和促生长素抑制素 mRNA 增加 3,000 倍,并且没有可检测到的淀粉酶 mRNA。更早期的内胚层 TF 的水平,例如 Hnf3 β 和 Hnf6 没有被腺病毒的转导显著影响,并且其他内分泌胰腺 TF (如 Pax6 和 Nkx6.1) 仅受最低限度的影响。

[0264] 这些研究证明,虽然仅使 Ngn3 过表达可增加 NeuroD1 和促生长素抑制素的水平,但观察到它对胰岛素 -1mRNA 仅有最低限度的作用。然而, Ngn3 和 Pdx-1 的联合不仅诱导 NeuroD1 的表达,而且还诱导胰岛素 -1 的表达,这与 NeuroD1 和 Pdx1 (两种胰岛素 -1 增强子调控因子) 都高水平存在时胰岛素启动子被最大程度的激活的发现一致。

[0265] 培养细胞中的 Pdx-1、Neuro-D1 和胰岛素的免疫组织化学按如下进行。细胞用 PBS(Cellgro) 洗两次,并且用 10% 的中性缓冲福尔马林 (Sigma) 的 PBS 溶液中固定 10 分钟。用 PBS 洗两次后,用 PBS+0.05% 的吐温 20 进行 15 分钟的细胞透化处理。用含 3% H_2O_2 (Sigma) 的甲醇 (Sigma) 孵育 30 分钟来阻断内源的过氧化物酶。用蒸馏水清洗 2 分钟之后,通过相继与抗生物素蛋白和生物素 (Biotin Blocking System, DakoCytomation) 一起孵育 15 分钟以阻断内源性生物素,用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗 5 分钟进行分离。与生物素一起孵育之后,用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗细胞 5 分钟。通过与含 0.4% 鱼皮明胶 (Sigma) 的 PBS 溶液一起孵育 30 分钟以封闭非特异性结合位点。除去封闭缓冲液并且将用 PBS+0.05% 吐温 20+1% 牛血清白蛋白 (BSA) (JacksonImmunoResearch) 稀释的初级抗体加到细胞中并且 4°C 下孵育过夜。兔抗 -Pdx1 由 C.Wright, Vanderbilt University, Nashville 惠赠,并且以 1 : 2000 使用。兔抗 -NeuroD1 来自 Chemicon (AB5686),并且使用 0.67 μ g/ml 的浓度。豚鼠抗 -胰岛素来自于 DakoCytomation (A0564),并且使用 21.25 μ g/ml 的浓度。兔和豚鼠同种型对照来自于 JacksonImmunoResearch,并且使用与各自的初级抗体同样的终浓度。第二天早晨用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗细胞三次,每次五分钟。以 1 : 1500 稀释在 PBS+0.05% 吐温 20 中的生物素化的抗 -兔或抗 -豚鼠 $F(ab')_2$ 抗体被加到细胞中,并且孵育 30 分钟。用 PBS+0.05% 吐温 20 清洗细胞三次,每次五分钟。根据制造商说明书制备的 Vectastain ABC 过氧化物酶复合体 (Vector Laboratories) 被加到细胞中,并且孵育 30 分钟。用 PBS+0.05% 的吐温 20 清洗细胞三次,每次五分钟。根据制造商的说明书,用 DAB+ (DakoCytomation) 显色。用 Nikon Coolpix 4500 数码照相机拍摄照片,所述照相机安装在 Zeiss Axioskop 2 上。

[0266] 石蜡包埋的悬浮细胞的 C 肽的免疫组织化学按如下进行。用 PBS 洗细胞两次,并且用 10% 的中性缓冲的福尔马林 (Sigma) 的 PBS 溶液固定 10 分钟。用 PBS 清洗两次之后,将细胞加入含 2% VII 型低温胶凝琼脂糖凝胶 (Sigma) 的 PBS 溶液中,并且进行石蜡包埋。切 6 微米的切片并且置于 SuperFrost Plus 载玻片 (Fisher Scientific) 上。经过标准的脱蜡和复水之后,如上文在培养细胞 Pdx-1、Neuro-D1 和胰岛素的免疫组织化学中所述,染色并拍摄照片。兔抗 -C-肽 (ab1043) 来自 Beta Cell BiologyConsortium,并且以 1 : 2000 使用。

[0267] 借助超灵敏大鼠胰岛素 ELISA (Ultrasensitive Rat Insulin ELISA) 试剂盒

(Mercodia) 和大鼠 C-肽 ELISA (Rat C-peptide ELISA) 试剂盒 (Wako), 通过 ELISA 测量胰岛素和 C-肽。例如, 大鼠 Fisher MAPC 在用激活素 A、BMP4 和抗 -SHH 抗体分化 6 天, 再用 EGF 分化 6 天后, 用 Ad-Pdx-1 和 Ad-Ngn3 (两者的 MOI 都是 1250) 感染。在感染后三天, 收集上清液以测量胰岛素和 C-肽的基础水平。然后, 用 PBS 清洗细胞两次, 并且使细胞与 750 μ L 的 20mM 的葡萄糖一起孵育。一个小时之后, 测量这些细胞的上清液中的胰岛素和 C-肽的水平。还从这些细胞收集 RNA 样品以评估胰岛素和其他胰腺标记物的表达。表 8 总结了关于 C-肽分泌的结果。通过连续加入细胞因子并用 Pdx-1 和 Ngn-3 腺病毒载体转导所产生的细胞对 20mM 葡萄糖反应分泌 C-肽。

[0268] 表 8

[0269] 分化成内分泌胰腺的 MAPC 分泌的 C-肽

[0270]

	0mM 葡萄糖	20mM 葡萄糖
D15(FCS+Ad+3)	0.47+/-0.09	0.39+/-0.04
D15(ex/Nic+Ad+3)	0.36+/-0.07	0.67+/-0.02
D15(ex/Nic/GDF+Ad+3)	0.48+/-0.008	0.83+/-0.01

[0271] (以汇合密度接种 MAPC 并且相继用激活素、BMP4 和抗 -SHH 抗体 (第 1-6 天)、接着用 EGF (第 6-12 天) 处理。在第 12 天, 用 Ad-Pdx-1 和 Ad-Ngn3 转导细胞, 并且在基础培养基中维持 3 天 (FCS 2%), 或者在存在 exendin 和烟酰胺并且在有或者没有 GDF11 的条件下维持 3 天。然后使细胞接触 0mM/mL 的葡萄糖或 20mM/mL 的葡萄糖 1 小时, 并且收集培养基进行 C-肽的测量。使用一种大鼠特异的 c-肽 ELISA, 值为 ng/L。)

[0272] 所述数据证明, 通过连续地添加细胞因子并用 Pdx-1 和 Ngn-3 腺病毒载体进行转导所产生的细胞对 20mM 的葡萄糖反应时会分泌 C-肽。假定 1fmol 的 C-肽含 0.003325ng 的 C-肽, 则检测到 150.97fmol C-肽 / 孔 (0.6mL 培养基 / 孔)。因此, 这些研究证明, 诱导表达 Ins1 mRNA 和 Pdx-1 mRNA 的 MAPC 也可以对葡萄糖反应分泌胰岛素, 这是功能性 β -细胞的显著特征。

[0273] 也可以使用非病毒载体。例如, 或者从 RNA 或者从基因组 DNA (Invitrogen) 扩增编码 PDX1 和神经元素 -3 (例如人或大鼠) 的 cDNA。使用标准的方法进行 PCR 扩增, 使用的引物被设计成专门对所述基因的开放阅读框序列扩增, 引入 Kozak 序列 (ccaccATG) 以增强翻译起始并且引入独特的 HindIII (aagctt) 和 Xho I (ctcgag) 侧翼序列限制酶位点以利于进行所述 cDNA 的克隆。表 9 提供产生这些 cDNA 的引物。

[0274] 表 9

[0275]

引物名称	引物序列	RE 位点	SEQ ID NO:	来源材料
hPDX.F	atacaaagcttcaccATGAACGGCGAGG AGCAGTACTA	<i>Hind</i> III	95	总 RNA, 人胰腺
hPDX.R	atacactcgagTCATCGTGGTTCCTGCG GCCGCCGAG	<i>Xho</i> I	96	
rPDX.F	atacaaagcttcaccATGAATAGTGAGG AGCAGTACTA	<i>Hind</i> III	97	总 RNA, 大鼠胰腺
rPDX.R	atacactcgagTCACCGGGGTTCTCTGCG GTCGCAGTGGC	<i>Xho</i> I	98	
hNRG.F	atacaaagcttcaccATGACGCCTCAACC CTCGGGTGC	<i>Hind</i> III	99	基因组 DNA, 人
hNRG.R	atacactcgagTCACAGAAAATCTGAG AAAGCCAGACTG	<i>Xho</i> I	100	
rNRG.F	atacaaagcttcaccATGGCGCCTCATCC CTTGATGC	<i>Hind</i> III	101	基因组 DNA, 大鼠
rNRG.R	atacactcgagTCACAAGAAGTCTGAG AACACCAGGGTG	<i>Xho</i> I	102	

[0279] 随后, 用 *Hind*III 和 *Xho*I 消化扩增的 cDNA, 并且克隆到市售的表达载体 pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen cat. #V870-20) 的互补位点中。在进行细胞转染之前用 *Ahd*I 或 *Bgl*III 将纯化的载体线性化。通过化学转染将线性化的 cDNA 转染入 MAPC。在含有潮霉素作为筛选剂的扩增培养基中培养细胞。

[0280] 体外非转导的细胞对葡萄糖反应时的 C-肽分泌

[0281] 测定在高葡萄糖影响下的 MAPC- 子细胞的胰岛素产生。已经确定, 在 20mM 的葡萄糖影响下, 高水平表达胰岛素-1mRNA 的样品也向培养基中分泌胰岛素, 进一步表明 MAPC 可以分化成具有内分泌胰腺特征的细胞。

[0282] 另外, 测量 C-肽分泌以确定所述释放的胰岛素不是从含有胰岛素的培养基中吸收的 (图 7)。在该评估中, 在低葡萄糖 (3nM) 下培养 4 种培养物, 并且在第 16-24 天, 每天向培养物施加加入 1 小时 18nM 的葡萄糖脉冲, 之后收集上清液并测定产生的 c-肽。这些研究证明, 在上述条件下培养的 MAPC 从培养开始的第 18 天开始每天分泌 c-肽, 在第 20-22 天观察到最大分泌。

[0283] 通过 ELISA 测定胰岛素和 C-肽 (Rajagopal et al., 2003; Hansson et al., 2004)。

[0284] 钙成像以评估通道的表达

[0285] 胰腺 β 细胞对升高的葡萄糖水平产生分泌胰岛素的反应。 β 细胞上载有用于实现该功能的葡萄糖转运体、ATP-敏感的钾离子通道和电压激活的 (L-型) 钙通道。可以使用成像和全细胞膜片钳研究, 以确定干细胞衍生的胰腺 β 样细胞是否具有类似的载体和通道以对升高的细胞外葡萄糖 (3-20mM) 有反应。

[0286] 已经确定, MAPC 衍生的 β 细胞表达 K 通道和 L-型电压激活的钙通道 (用装载有 Fura-2 应答钙指示剂的细胞进行钙成像实验)。图 8 示出了一个细胞的应答。在同一簇的另 12 个细胞中和以相同方式分化的另两个簇中获得了相同的结果。数据表明, MAPC 衍生的 β 细胞具有 K 通道, 所述通道的开启受条件的控制。胞外 K 浓度的增加引起一个导致电

压激活的 Ca 通道开启的去极化。这些通道已知在对葡萄糖产生反应并导致 β 细胞分泌胰岛素中起重要作用。

[0287] β 细胞功能的体内评估

[0288] 通过将细胞移植到 SZO 处理的裸鼠的肾被膜下, 获得了 MAPC 在体外衍生的 β 细胞与从成体小鼠中分离的 β 细胞在功能上等价的证据。通过尾静脉单次静脉注射链唑霉素 (streptozotocin) (200-240mg/kg) 使小鼠形成糖尿病。根据两次连续的血糖值 $> 400\text{mg/dl}$ 确定糖尿病。用 0.015ml/g 体重的阿佛丁 (Avertin) 麻醉受体小鼠。通过侧面的切口暴露左肾或右肾, 在该肾的上极进行囊切开术, 并且使用一个细玻璃探针向所述肾的下部和前外侧面延伸, 将肾被膜与实质分开形成一个囊, 并且将所述 MAPC 衍生的细胞缓慢地注入所述囊中。没有接受细胞的小鼠作为阴性对照, 移植了 300 个成体胰岛的小鼠被用作阳性对照 (在 1 天内进行高血糖校正)。

[0289] 由于小鼠在糖尿病状态不会长期存活, 植入胰岛素小丸 (LinBit, LinShin, Scarborough (Toronto), Ontario, Canada) 以将血糖的水平降至约 300mg/dL。当血糖水平连续 3 天 $< 200\text{mg/dL}$ 的时候, 逐步地除去胰岛素小丸。或者, 可以对没有接受 MAPC 衍生的 β 细胞的那只肾进行肾被膜下的胰岛的同系移植。这将使动物血糖正常。在移植 MAPC 衍生的 β 细胞 / 移植物之后大约 2、4 或 6 周去除所述胰岛移植物。

[0290] 在一系列移植中, 第 21 天的 MAPC 衍生的子细胞被移植到 8 只 SZO 处理的动物的肾被膜之下。在细胞移植之前 5 天以上, 动物接受 SZO。所有的动物具有 $> 500\text{mg/dL}$ 的血糖水平。在第 -1 天, 皮肤下植入胰岛素小丸 (根据动物的体重移植胰岛素小丸, 例如第一个 20 克一个丸, 接下来每 5 克增加一丸)。在第 0 天, 将细胞植入肾被膜之下。在 4 只动物中, 植入 1 百万个悬浮簇 (约 10-20,000 胰岛素阳性细胞)。在另外的 4 只动物中, 植入 1 百万个悬浮簇 (约 10-20,000 胰岛素阳性细胞) + 1 百万个附着的间质细胞 (富集表达内皮的和平滑肌标记物、但内胚层转录物和胰岛素 -1 转录物的水平低的细胞) 的组合。每 1-2 天评估动物的血糖水平。在约 4 周之后, 去除胰岛素小丸, 并且观察动物 6-7 天。处死连续 2 天具有 $> 600\text{mg/dL}$ 的葡萄糖的动物。具有 $< 400\text{mg/dL}$ 的血糖的动物保留 6 天, 之后去除接受过植入的肾。然后继续维持动物 3-4 天以评估血糖水平。图 9 中显示了该示意图。

[0291] 如图 9 中所示, 仅接受上清液细胞的 1 只动物在去除胰岛素小丸后, 保持血糖基本正常 (100-200mg/dL)。去除肾后, 由于隔膜受损立即出现了一个外科手术问题。虽然进行了外科手术矫治, 所述动物仍呈病态, 并且不进食, 因此无法评估肾切除术之后的葡萄糖水平。

[0292] 接受上清液细胞和附着的间质细胞的组合的 4 只动物中有 2 只在去除胰岛素小丸后保持 350-450 的葡萄糖, 并且在肾切除术之后血糖增加到 600mg/dL 以上。

[0293] 这些研究表明, 3/8 的动物的肾移植细胞包含分泌胰岛素的细胞, 这使得血糖维持在 150-450。

[0294] 参考文献

[0295] Abe, A., et al., J. Virol. 1998 ;72 :6159-6163.

[0296] Ahlgren, U., et al., Genes Dev. 1998 ;12 :1763-1768.

[0297] Akimenko, M. A., J Neurosci 1994 ;14 :3475-86.

[0298] Alter BP, Cancer Genet Cytogenet. 1992 ;58 :206-8 ;discussion 209.

- [0299] Alvarez-Dolado M., et al. Nature. 2003 ;425 :968-973.
- [0300] Ang, S. L., et al., Development 1993 ;119 :1301-1315.
- [0301] Apelqvist, A., Nature et al., 1999 ;400 :877-881.
- [0302] Aranguren XL, et al. Keystone Symposium on stem cells. 2005.
- [0303] Babcook, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 1996 ;93 :7843-7848.
- [0304] Barker JN and Wagner JE. Nature Reviews Cancer. 2003 ;3 :526-532.
- [0305] Barker JN et al., Blood. 2003 ;102 :1915-1919.
- [0306] Barker JN et al., Blood. 2004 ;ePub.
- [0307] Barnett MJ et al., Blood. 1994 ;84 :724-732.
- [0308] Basch, et. al., J. Immunol. Methods. 1983 ;56 :269.
- [0309] Batinic, D., et al., Bone Marrow Transplant. 1990 ;6 (2) :103-7.
- [0310] Beattie, G. M., et al., Diabetes. 1996 ;45 (9) :1223-8.
- [0311] Beattie, G. M., et al., Diabetes. 1999 ;48 (5) :1013-9.
- [0312] Ben-Shushan E et al., Mol Cell Biol. 1998 ;18 :1866-1878.
- [0313] Bertrand JY et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2005 ;102 :134-139.
- [0314] Bhardwaj G et al. Nat Immunol. 2001 ;2 :172-180.
- [0315] Bhatia M et al., Nat Med. 1998 ;4 :1038-1045.
- [0316] Bhatia R et al., Blood. 1995 ;85 :3636-3645.
- [0317] Bhatia R et al., Blood. 2003 ;101 :4701-4707.
- [0318] Bhatia R et al., J Clin Invest. 1994 ;94 :384-391.
- [0319] Bhushan A, et al. Development. 2001 ;128 :5109-5117.
- [0320] Bierhuizen, M. et al., Blood. 1997 ;90 (9) :3304-3315.
- [0321] Bird, et al., Science. 1988 ;242 :423-426.
- [0322] Bittira B, et al. Eur J Cardiothorac Surg. 2003 ;24 :393-398.
- [0323] Bjorklund LMea. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 ;99 :2344-2349.
- [0324] Bodnar, A. G., et al., Science. 1998 ;279 (5349) :349-52.
- [0325] Boneva, R. S. and T. M. Folks, Ann Med. 2004 ;36 (7) :504-17.
- [0326] Borue X, et al. Am J Pathol. 2004 ;165 :1767-1772.
- [0327] Bossard, P., and Zaret, K. S. Development 1998 ;125 :4909-4917.
- [0328] Bredenbeek, P. J., et al. J. Virol. 1993 ;67 :6439-6446.
- [0329] Brice, G. T., et al., J. Acquir Imm. Defic Syndr Hum Retrovirol. 1998 ;19 :210-220.
- [0330] Brownlee, M., Nature. 2001 ;414 (6865) :813-20.
- [0331] Buckley S et al., Stem Cells. 2004.
- [0332] Cai Z. H., et al., Artif Organs. 1988 ;12 (5) :388-93.
- [0333] Camargo FD et al., J Clin Invest. 2004 ;113 :1266-1270.
- [0334] Cardona, K., et al., Nat Med. 2006 ;12 (3) :304-6.
- [0335] Carella AM et al., Blood Rev. 1997 ;11 :154-159.
- [0336] Cefalu, W. T., Am J Med. 2002 ;113 Suppl 6A :23S-35S.

- [0337] Cerdan C et al., Blood. 2004 ;103 :2504-2512.
- [0338] Chambers I et al., Cell. 2003 ;113 :643-655.
- [0339] Chang, Blood Purif . 2000 ;18 :91-96.
- [0340] Chang, P., et al., Trends in Biotech. 1999 ;17 :78-83.
- [0341] Chang, T. M., Artif Organs. 1992 ;16(1) :71-4.
- [0342] Choi K et al., Biochem Cell Biol. 1998 ;76 :947-956.
- [0343] Choi K et al., Development. 1998 ;125 :725-732.
- [0344] Clackson et al. Nature. 1991 ;352 :624-628.
- [0345] Clarke, Science. 2000 ;288 :1660-3.
- [0346] Clavel C, et al., Keystone Symposium on stem cells. 2005.
- [0347] Clothia et al., J. Mol. Biol. 11985 ;186 :651-66, 1985.
- [0348] Coligan, et al., Current Protocols in Immunology, (1991 and 1992).
- [0349] Cras-Meneur, C., et al., Diabetes 2001 ;50 :1571-1579.
- [0350] Csernus, V. J., et al., Cell Mol Life Sci 1998 ;54 :733-743.
- [0351] D' Amour KA, et al., Nat Biotech. 2005 ;23 :1432-1441.
- [0352] Dao MA and Nolta JA. Int J Mol Med. 1998 ;1 :257-264.
- [0353] Davidson, B. L., et al., Nature Genetics. 1993 ;3 :219-223.
- [0354] Deisseroth AB et al., Blood. 1994 ;83 :3068-3076.
- [0355] Desai, T. A., Exp. Opin. Biol. Ther. 2002 ;2 :633-646.
- [0356] Dominguez-Bendala, J., et al., Diabetes 2005 ;54 :720-726.
- [0357] Dor, Y., et al., Nature. 2004 ;429 (6987) :41-6.
- [0358] Douglas, J. et al., Hum. Gene Ther. 1999 ;10 (6) :935-945.
- [0359] Douglas, J., et al. Nature Biotech. 1999 ;17 :470-475.
- [0360] Drukker M, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 ;99 :9864-9869.
- [0361] Dull, T., et al., J. Virol. 1998 ;72 :8463-8471.
- [0362] Dyer MA et al., Development. 2001 ;128 :1717-1730.
- [0363] Eckfeldt CE et al., PLoS Biology. 2004.
- [0364] Edlund, H., Nat Rev Genet. 2002 ;3 (7) :524-32.
- [0365] Efrat, S., Ann NY Acad Sci. 1999 ;875 :286-93.
- [0366] Efrat, S., Ann NY Acad Sci. 2004 ;1014 :88-96.
- [0367] Efrat, S., Diabetes. 2001 ;50 Suppl 1 :S189-90.
- [0368] Efrat, S., et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1995 ;92 (8) :3576-80.
- [0369] Embury, J., et al., Diabetes 2001 ;50 :1706-1713.
- [0370] Faloon P et al., Development. 2000 ;127 :1931-1941.
- [0371] Ferrari, Science. 1998 ;279 :528-30.
- [0372] Fleischer, N., et al., Diabetes. 1998 ;47 (9) :1419-25.
- [0373] Foerst-Potts, L. Dev Dyn 1997 ;209 :70-84.
- [0374] Froguel, P. and G. Velho, Trends Endocrinol Metab. 1999 ;10 (4) :142-146.
- [0375] Frolov, I., et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996 ;93 :11371-11377.

- [0376] Gambacorti-Passerini CB et al., Lancet Oncol. 2003 ;4 :75-85.
- [0377] Gerberding, J. L., Diabetes :Disabling, Deadly, and on the Rise, in CDC At A Glance. 2006, Centers for Disease Control and Prevention.
- [0378] Gittes, G. K., et al., Development 1996 ;122 :439-447.
- [0379] Gluckman E. Stem Cells 1993 ;11 Suppl 2 :180-3.
- [0380] Good, A. H., et al., Transplant Proc., 1992 ;24(2) :559-62.
- [0381] Gradwohl, G., et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 ;97 :1607-1611.
- [0382] Grant MB et al., Nat Med. 2002 ;8 :607-612.
- [0383] Guardiola P, et al., Blood. 2000 ;95 :422-9.
- [0384] Guinan EC et al., J Pediatr 1994 ;124 :144-50.
- [0385] Gunsilius E et al., Lancet. 2000 ;355 :1688-1691.
- [0386] Gupta P et al., Blood. 1996 ;87 :3229.
- [0387] Gupta P et al., Blood. 1998 ;92 :4641-4651.
- [0388] Gussoni, Nature. 1999 ;401 :390-4.
- [0389] Gyulkhandanyan AV, et al., J Biol Chem. 2006 ;281 :9361-9372.
- [0390] Habener, J. F., ed. Molecular Basis of Pancreas Development and Function. 2001, Kluwer Academic Publishers.
- [0391] Hansson, M., et al., Diabetes 2004 ;53 :2603-2609.
- [0392] Hardikar, A. A., et al., Proc Natl Acad Sci U. S. A. 2003 ;100 :7117-7122.
- [0393] Harmon, E. B., et al., Development 2004 ;131 :6163-6174.
- [0394] Harraz M et al., Stem Cells. 2001 ;19 :304-312.
- [0395] Harris RG et al., Science. 2004 ;305 :90-93.
- [0396] Hart, A., et al. Dev Dyn. 2003 ;228 :185-193.
- [0397] Harvey K and Dzierzak E. Stem Cells. 2004 ;22 :253-258.
- [0398] Hayek, A., et al., Diabetes. 1995 ;44(12) :1458-60.
- [0399] He T-C et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1998 ;95 :2509.
- [0400] Hebrok, M., et al., Development 2000 ;127 :4905-4913.
- [0401] Heller, R. S., Dev Dyn. 2002 ;225 :260-270.
- [0402] Heller, R. S., et al., Dev Biol. 2005 ;286(1) :217-24.
- [0403] Hematti P et al., PLOS Biology. 2004 ;2 :e243.
- [0404] Hemmati-Brivanlou A et al., Dev Genet. 1995 ;17 :78-89.
- [0405] Henry GL, et al., Science. 1998 ;281 :91-96.
- [0406] Hentsch, B., et al., Genes Dev. 1996 ;10 :70-79.
- [0407] Heremans Y et al., J. Cell Biol. 2002 ;159 :303-12.
- [0408] Hering, B. J., et al., Nat Med. 2006 ;12(3) :301-3.
- [0409] Hofmann, C., et al. J. Virol. 1999 ;73 :6930-6936.
- [0410] Hogan CJ et al., Blood. 1997 ;90 :85-96.
- [0411] Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993 ;90:6444-6448(1993).
- [0412] Holmes, et al., J. Immunol. 1997 ;158 :2192-2201.

- [0413] Holyoake TL et al., *Exp Hematol.* 1999 ;27 :1418-1427.
- [0414] Hori and Kim, *Plos Biology* 2005.
- [0415] Hori, Y., et al., *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2002 ;99 :16105-16110.
- [0416] Howe CWS, Radde-Stepanick T. Hematopoietic Cell Donor Registries. In : Thomas ED, Blume, Karl G. and Forman, Stephan J., ed. *Hematopoietic Cell Transplantation*. Vol. 2. Malden, MA : Blackwell Sciences ; 1999 : 503-512.
- [0417] Huotari, M. A., et al., *Endocrinology* 2002 ;143 :4437-4446.
- [0418] Hurley RW et al., *J Clin Invest.* 1995 ;96 :511-521.
- [0419] Ianus A, et al., *J Clin Invest.* 2003 ;111 :843-850.
- [0420] Jackson, *PNAS USA.* 1999 ;96 :14482-6.
- [0421] Jahagirdar, B. N., et al. *Exp Hematol.* 2001 ;29(5) :543-56.
- [0422] Jensen, J., et al., *Diabetes* 2000 ;49 :163-176.
- [0423] Jiang Y et al., *Blood.* 2000 ;95 :846-854.
- [0424] Jiang Y et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 ;97 :10538-10543.
- [0425] Jiang Y, et al., *Exp Hematol.* 2002 ;30 :896-904.
- [0426] Jiang Y, et al., *Nature.* 2002 ;418 :41-49.
- [0427] Jiang Y, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 ;100 Suppl 1 :11854-11860.
- [0428] Johnston, S. A., et al., *Genet. Eng. (NY)* 1993 ;15 :225-236.
- [0429] Jones et al., *Nature.* 1986 ;321 :522-525.
- [0430] Jung, J., et al., *Science* 1999 ;284 :1998-2003.
- [0431] Kafri, T., et al., *J. Virol.* 1999 ;73 :576-584.
- [0432] Kahan, B. W., *Diabetes et al.*, 2003 ;52 :2016-2024.
- [0433] Kanai-Azuma, M., et al., *Development* 2002 ;129 :2367-2379.
- [0434] Kannagi, R. *EMBO J* 1983 ;2 :2355-61.
- [0435] Kantarjian HM et al., *Blood.* 2003 ;101 : :97-100.
- [0436] Kataoka, K., et al., *J Biol Chem.* 2002 ;277 :49903-49910.
- [0437] Kaufman DS et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 ;98 :10716-10721.
- [0438] Kaufman DS, and Thomson JA. *J Anat.* 2002 ;200 :243-248.
- [0439] Kawada H, et al. *Blood.* 2004 ;104 :3581-3587.
- [0440] Kawaguchi, Y., et al., *Nat Genet.* 2002 ;32 :128-134.
- [0441] Keene, C. D., et al., *J Cell Science* 2003 ;12 :210-213.
- [0442] Kemahli S et al., *Br J Haematol* 1994 ;87 :871-2.
- [0443] Kogler G et al., *J Exp Med.* 2004 ;200 :123-135.
- [0444] Kohler & Milstein, *Nature.* 1975 ;256 :495.
- [0445] Kohli-Kumar M et al., *Blood.* 84 :2050-4, 1994.
- [0446] Kojima, H., et al., *Nat Med.* 2003 ;9 :504-505.
- [0447] Korytkowski, M., et al., *Clin Ther.* 2005 ;27 Suppl B :S89-100.
- [0448] Krause DS, et al. *Cell.* 2001 ;105 :369-377.
- [0449] Ku, H. T., et al., *Stem Cells* 2004 ;22 :1205-1217.

- [0450] Kubo, A., et al. Development 2004 ;131 :1651-1662.
- [0451] Kusadasi N et al., Leukemia. 2002 ;16 :1782-1790.
- [0452] Kyba M et al., Cell. 2002 ;109 :29-37.
- [0453] Kyba M et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2003 ;100, Suppl 1 :11904-11910.
- [0454] Lagasse E, et al. Nat Med. 2000 ;6 :1229-1234.
- [0455] Lammert, E., et al., Science 2001 ;294 :264-267.
- [0456] Lanier LL. "NK Cell Recognition." Annu Rev Immunol. 2004.
- [0457] Laquerre, S., et al. J. Virol. 1998 ;72 :9683-9697.
- [0458] Larrick, et al., Methods :A Companion to Methods in Enzymology. (1991).
- [0459] Lawrence, H. Blood 1997 ;89 :1922.
- [0460] Lechner A, et al., Diabetes. 2004 ;53 :616-623.
- [0461] Lechner, A. and J. F. Habener, Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003 ;284(2) : E259-66.
- [0462] Ledermann, H. M., Diabetologia. 1995 ;38(12) :1482.
- [0463] Lee, S. H., et al., Nat Biotechnol. 2000 ;18 :675-679.
- [0464] Lefebvre V. Matrix Biol 1998 ;16 :529-40.
- [0465] Leslie, R. D., et al., J Clin Endocrinol Metab. 2006 ;91(5) :1654-9.
- [0466] Leung AYH et al., Dev Biol. 2004.
- [0467] Lewis ID et al., Blood. 2001 ;97 :3441-3449.
- [0468] Li Z, et al. Dev Biol. 2004 ;269 :252-263.
- [0469] Lim, J. W. and Bodnar, A., Proteomics. 2002 ;2(9) :1187-1203(2002).
- [0470] Liu HJ, Lamming C, C. M. V. Characterization of Human Bone Marrow and Umbilical Cord Blood Self-Renewing Multi-lineage Hematopoietic Stem Cells. 2003,
- [0471] Liu JM : Fanconi ' s anemia, in Young NS(ed) : Bone marrow failures syndromes. Philadelphia, W. B. Saunders company, 2000, p47-68.
- [0472] Liu, P., et al., Nat Genet. 1999 ;22 :361-366.
- [0473] Loeffler, J. and Behr, J., Methods in Enzymology. 1993 ;217 :599-618.
- [0474] Lumelsky, N., et al., Science 2001 ;292 :1389-1394.
- [0475] Maldonado, T. S., et al., J Gastrointest Surg. 2000 ;4 :269-275.
- [0476] Marks et al., J. Mol Biol. 1991 ;222 :581-597.
- [0477] Martin, F., et al., J. Virol. 1999 ;73 :6923-6929.
- [0478] Mathews V, et al., Diabetes. 2004 ;53 :91-98.
- [0479] Matsumoto, K., et al., Science 2001 ;294 :559-563.
- [0480] Matsuoka, T. A., et al., Proc Natl Acad Sci (USA) 2004 ;101 :2930-2933.
- [0481] Matthew, H. W., et al., ASAI0 Trans. 1991 ;37(3) :M328-30.
- [0482] Matzuk, M. M., et al., Nature 1995 ;374 :356-360.
- [0483] McDowell, N., et al., Curr Biol. 1997 ;7 :671-681.
- [0484] McEntyre, L. D. a. J. R., The Genetic Landscape of Diabetes. 2004 :NLM/NCBI.

- [0485] McEvoy RC, et al., J Clin Invest. 1984 ;74 :715-722.
- [0486] Medvinsky A et al., Cell. 1996 ;86 :897.
- [0487] Meivar-Levy and Ferber, Trends Endocrinol Metab. 2003 ;14(10) :460-6.
- [0488] Mikkola HK et al., Blood. 2003 ;101 :508-516.
- [0489] Miller, A. D., and C. Buttimore, Mol. Cell. Biol. 1986 ;6 :2895-2902.
- [0490] Miralles F, et al., Dev Dyn. 1999 ;214 :116-126.
- [0491] Miyazaki et al., Diabetes. 2004 ;53 :1030-7.
- [0492] Mochizuki, H., et al., J. Virol. 1998 ;72 :8873-8883.
- [0493] Molin, M., et al. J. Virol. 1998 ;72 :8358-8361.
- [0494] Montague, W., and Cook, J. R. Biochem J. 1971 ;122 :115-120.
- [0495] Morrison et al. Proc. Natl. Acad Sci. 1984 ;81, 6851-6855.
- [0496] Movassat, J., et al., J Clin Endocrinol Metab. 2002 ;87 :87.
- [0497] Muguruma, Y., et al., Exp Hematol. 2003 ;31 :1323-1330.
- [0498] Murtaugh, L. C., et al., Proc Natl Acad Sci U. S. A. 2003 ;100 :14920-14925.
- [0499] Muschler, G. F., et al. J. Bone Joint Surg. Am. 1997 ;79(11) :1699-709.
- [0500] Najarian, J. S., et al., Transplant Proc. 1977 ;9(1) :233-6.
- [0501] Nakano T et al., Science. 1994 ;265 :1098-1101.
- [0502] Narushima, M., et al., Nat Biotechnol. 2005 ;23(10) :1274-82.
- [0503] Nichols J et al., Cell. 1998 ;95 :379-391.
- [0504] Norgaard, G. A., et al., Dev Biol 2003 ;264 :323-338.
- [0505] Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985 ;82 :4592-4596.
- [0506] Nusse, R. Nature 2001 ;411 :255-256.
- [0507] Nyqvist, D., et al., Diabetes. 2005 ;54(8) :2287-93.
- [0508] Offield, M. F., et al., Development 1996 ;122 :983-995.
- [0509] Ohara-Imaizumi, M., et al., J Biol Chem. 2002 ;277 :50805-50811.
- [0510] Oostendorp RA et al., Blood. 2002 ;99 :1183-1189.
- [0511] Oostendorp RA et al., J Cell Sci. 2002 ;115 :2099-2108.
- [0512] Otonkoski, T., et al., J Clin Invest. 1993 ;92 :1459-1466.
- [0513] Pack, et al., Bio/Technology. 1993 ;11 :1271-77.
- [0514] Packer, A. I., Dev Dyn 2000 ;17 :62-74.
- [0515] Pelengaris S, et al., Cell. 2002 ;109 :321-334.
- [0516] Persons, D., et al., Nature Medicine. 1998 ;4 :1201-1205.
- [0517] Petersen, H. V., et al., Mol Cell Biol Res Commun. 2000 ;3 :249-254.
- [0518] Petersen, Science. 1999 ;284 :1168-1170.
- [0519] Pipeleers, D. and Z. Ling, Diabetes Metab Rev. 1992 ;8(3) :209-27.
- [0520] Pittenger, Science 1999 ;284 :143-147.
- [0521] Potocnik AJ et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1997 ;94 :10295-10300.
- [0522] Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 1992 ;2 :593-596.
- [0523] Punzel M et al., Blood. 1999 ;93 :3750-3756.

- [0524] Rackoff WR et al., Blood. 1996 ;88 :1588-93.
- [0525] Rajagopal, J., et al. Science 2003 ;299 :363.
- [0526] Rayat, G. R., et al., J Endocrinol. 2003 ;177(1) :127-35.
- [0527] Rebel VI et al., Blood. 1996 ;87 :3500-3507.
- [0528] Reichmann et al., Nature. 1988 ;332 :323-329.
- [0529] Rescan, C., et al., Lab Invest. 2005 ;85 :65-74.
- [0530] Reya T et al., Nature. 2003 ;423 :409-414.
- [0531] Reyes M et al., Ann N Y Acad Sci. 2001 ;938 :231-233 ;discussion 233-235.
- [0532] Reyes, M., et al., Blood 2001 ;98 :2615-2625.
- [0533] Reyes, M., et al., J Clin Invest. 2002 ;109 :337-346.
- [0534] Reyes and Verfaillie, Ann N Y Acad Sci. 2001 ;938 :231-233 ;discussion 233-235.
- [0535] Rideout WMr et al. Cell. 2002 ;109 :17-27.
- [0536] Robbins, et al. J. Virol. 1997 ;71(12) :9466-9474.
- [0537] Rojas, E., et al., FEBS Lett. 1990 ;261 :265-270.
- [0538] Rood, P. P. and D. K. Cooper, Am J Transplant. 2006 ;6(6) :1269-74.
- [0539] Rosario, L. M., et al., Adv Exp Med Biol. 1986 ;211 :413-425.
- [0540] Rosenfeld, L., Clin Chem. 2002 ;48(12) :2270-88.
- [0541] Rosfjord E, Rizzino A. Biochem Biophys Res Commun. 1997 ;203 :1795-802.
- [0542] Rowley J. Cancer. 1990 ;65 :2178-2184.
- [0543] Salmons, B. and Gunzburg, W. H., 1993 ;4 :129-141.
- [0544] Saltiel, A. R. and C. R. Kahn, Nature. 2001 ;414(6865) :799-806.
- [0545] Sander, M., et al., Development 2000 ;127 :5533-5540.
- [0546] Sander, M., et al., Genes Dev. 1997 ;11 :1662-1673.
- [0547] Sanvito, F., et al., Development 1994 ;1994 :3451-3462.
- [0548] Sawai, K., et al., Mol Genet Metab. 1998 ;64 :44-51.
- [0549] Scagni P et al., Haematologica 1988 ;83 :432-7.
- [0550] Schuh AC, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1999 ;96 :2159-2164.
- [0551] Schwartz RE, et al. J Clin Invest. 2002 ;109 :1291-1302.
- [0552] Schwartz RE, et al. J Clin Invest. 2002 ;96 :1291-1302.
- [0553] Schwarzenberger, P., et al., J. Virol. 1997 ;71 :8563-8571.
- [0554] Sebestyen, et al. Nature Biotech. 1998 ;16 :80-85.
- [0555] Shapiro, A. M., et al., N Engl J Med. 2000 ;343(4) :230-8.
- [0556] Shen, C. N., et al., Nat Cell Biol. 2000 ;2 :879-887.
- [0557] Shimozaki et al. Development. 2003 ;130 :2505-12.
- [0558] Sipione, S., et al. Diabetologia 2004 ;47 :499-508.
- [0559] Smith, S. B., et al., Mol Cell Biol. 1999 ;19 :8272-8280.
- [0560] Soria, B., et al., Diabetes 2000 ;49 :157-162.
- [0561] Sosa-Pineda, B., et al., Nature 1997 ;386 :399-402.

- [0562] Spangrude G et al., Science. 1988 ;241 :58.
- [0563] Sreenan S, et al., Diabetes. 1999 ;48 :989-996.
- [0564] Stock, P. G. and J. A. Bluestone, Annu Rev Med. 2004 ;55 :133-56.
- [0565] Sussel, L., et al., Development 1998 ;125 :2213-2221.
- [0566] Sutherland, D. E., et al., Surg Clin North Am. 1978 ;58 (2) :365-82.
- [0567] Sutton, R., et al., J. Virol. 1998 ;72 :5781-5788.
- [0568] Takahashi, J Clin Invest. 2000 ;105 :71-7.
- [0569] Takahashi, Nat Med. 1999 ;5 :434-8.
- [0570] Theise, Hepatology. 2000a ;31 :235-40.
- [0571] Theise, Hepatology. 2000b ;32 :11-6.
- [0572] Theunissen K and Verfaillie CM. Exp Hematol. 2004.
- [0573] Thomas E et al., Ann Int Med. 1986 ;104 :155-163.
- [0574] Thomas ED. Semin Hematol. 1999 ;36 :95-103.
- [0575] Thomson JA et al., Science. 1998 ;282 :1145-1147.
- [0576] Tian X et al., Exp Hematol. 2004 ;32 :1000-1009.
- [0577] Tolar J et al., Blood. 2003 ;ASH Abstract.
- [0578] Traggiai E et al., Science. 2004 ;304 :104-107.
- [0579] Trube, G., et al., Pflugers Arch. 1986 ;407 :493-499.
- [0580] Tsuchida, K., et al., Mol Cell Endocrinol. 2004 ;220 :59-65.
- [0581] Uwanogho D. et al., Mech Dev 1995 ;49 :23-36.
- [0582] Vaca P, et al., Stem Cells. 2005 ;[Epub ahead of print].
- [0583] Van Tendeloo, et al., Blood 2001 et al., 98 :49-56.
- [0584] Van Tendeloo, et al., Gene Ther. 2000 ;7 :1431-1437.
- [0585] Vaswani, et al., Annals Allergy, Asthma & Immunol. 1998 ;81 :105-115.
- [0586] Verfaillie C et al., Blood. 1992 ;79 :1003-1010.
- [0587] Verfaillie C et al., Blood. 1998 ;92 :1820-1831.
- [0588] Verfaillie C et al., J Exp Med. 1991 ;174 :693-703.
- [0589] Verfaillie C. Blood. 1992 ;79 :2821-2826.
- [0590] Verfaillie CM et al., J Clin Invest. 1992 ;90 :1232.
- [0591] Verfaillie CM, et al., Blood. 1996 ;87 :4770-4779.
- [0592] Verfaillie, C. M. Trends Cell Biol. 2002 ;12(11) :502-8.
- [0593] Vodyanik MA et al., Blood. 2005 ;105 :617-626.
- [0594] Wagers AJ, et al. Science. 2002 ;297 :2256-2259.
- [0595] Wagner, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992 ;89 :6099-6103.
- [0596] Wang L et al., Immunity. 2004 ;21 :31-41.
- [0597] Wang X et al., Nature. 2003 ;422 :897-901.
- [0598] Weber, H., et al., Development 2000 ;127 :4345-4360.
- [0599] Wells, J. M., and Melton, D. A. Development 2000 ;127 :1563-1572.
- [0600] Whitlow, et al., Methods :A Companion to Methods in Enzymology (1991).

- [0601] Willert K, and Nusse R. Curr Opin Genet Dev. 1998 ;8 :95.
- [0602] Williams, R. S. , et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991 ;88 :2726-2730.
- [0603] Winnier, G. , et al. , Genes Dev. 1995 ;9 :2105-2116.
- [0604] Wold, W. , Adenovirus Methods and Protocols, Humana Methods in MolecularMedicine (1998), Blackwell Science, Ltd.
- [0605] Wu GD, et al. Transplantation. 2003 ;75 :679-685.
- [0606] Wysocki and Sato, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 1978 ;75 :2844.
- [0607] Xiong, C. , et al. , Science. 1989 ;243 :1188-1191.
- [0608] Yahata T et al. , J Immunol. 2002 ;69 :204-209.
- [0609] Yanagi, K. , et al. , ASAI0 Trans. 1989 ;35 (3) :570-2.
- [0610] Yang, N. S. , et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990 ;87 :9568-9572.
- [0611] Yoder M et al. , Proc Natl Acad Sci USA. 1997 ;94 :6776.
- [0612] Yoshida et al. , Diabetes. 2002 ;51 :2505-13.
- [0613] Zambanini, A. , et al. , Diabetes Res Clin Pract. 1999 ;46 (3) :239-46.
- [0614] Zaret, K. S. Mech Dev. 2000 ;15 :83-88.
- [0615] Zeng, L. , et al. , Blood ASH Abstract 2004.
- [0616] Zhang, G. et al. , Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996 ;227 (3) :707-711.
- [0617] Zhao LR, et al. Exp Neurol. 2002 ;174 :11-20.
- [0618] Zhao R et al. , Blood. 1997 ;90 :4687-4698.
- [0619] Zhao RCH et al. , Blood. 2001 ;97 :2406-2412.
- [0620] Zhao, L. , et al. , J Biol Chem. 2005 ;280 :11887-11894.
- [0621] Zhou, X. , et al. , Nature 1993 ;361 :543-547.
- [0622] Zimmet, P. , et al. , Nature. 2001 ;414 (6865) :782-7.

[0623] 所有的出版物、专利和专利申请通过引用的方式纳入本文。虽然在以上说明书中已经描述了本发明的某些优选的实施方案,并且出于说明的目的阐释了大量详细内容,但对于本领域技术人员而言显而易见的是,在不背离本发明的基本主旨的情况下,本发明可以具有其他实施方案,并且本文所述的某些具体内容可以有許多变化。

序列表

<110> 明尼苏达大学董事会 (Regents of the University of Minnesota)

C. M. 维尔法伊 (Verfaillie, Catherine)

M. A. 布拉杰 . 维利兹 (Barajas, Miguel)

Y. P. 赫曼瑟 (Heremans, Yves)

<120> 非胚胎干细胞分化成具有胰腺表型的细胞

<130>2017.016W01

<150>US 60/726,750

<151>2005-10-14

<160>102

<170>FastSEQ for Windows Version 4.0

<210>1

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>1

ttaccccaca cacagtccaa

20

<210>2

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>2

ccaaaaacac ggcttcagtt

20

<210>3

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>3

tagggtgcca ttggagttc

20

<210>4

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>4

acattgccca ggtttgcctc

20

<210>5

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>5

cctacctccc attccaggat

20

<210>6

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>6

gcaccctaag cacagctacc

20

<210>7

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>7

ccacttgaga atttcatgag ca

22

<210>8

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>8

tttacctgac ccagcacacc

20

<210>9

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>9

aggtggcagc ttgtgaagat

20

<210>10

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>10

gagtcggctc ctatggtgtc

20

<210>11

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>11

agccatttgt tcattcttgt g

21

<210>12

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>12

agaggaaggg tgtgctctga

20

<210>13

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>13

tgagccatta attttttgggt tt

22

<210>14

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>14

agcagtatct gcctgtgcaa

20

<210>15

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>15

aatgtttcct tgtgcctgct

20

<210>16

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>16

ccaggtccag tgtttcaggt

20

<210>17

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>17

caggcatgat gctgagtgac

20

<210>18

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>18

cagggacctc atcttttgaa

20

<210>19

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>19

tcacaatcct gtggatctgg

20

<210>20

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>20

ccctcagtac ctggaccaa	20
----------------------	----

<210>21

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>21

ccaaggggaa tcagaactca	20
-----------------------	----

<210>22

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>22

tggagcaggc ccaaatatag	20
-----------------------	----

<210>23

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>23

tgcaacagct ctcacctacg	20
-----------------------	----

<210>24

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>24

aagatgggca actcaaattgg

20

<210>25

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>25

actgagatgc tgggctgtct

20

<210>26

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>26

gacccttcct gacagtcgtc

20

<210>27

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>27

gagaccttcg tccacctctg

20

<210>28

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>28

cattgacaac ggcgacatac

20

<210>29

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>29

ccctttgaac tgccttgtgt

20

<210>30

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>30

tgcattcatt tggattggaa

20

<210>31

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>31

tcactgaccc ttccatcctc

20

<210>32

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>32

ggaataccga ggctgatgaa

20

<210>33

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>33

tggaagaagg agagtcaca g

21

<210>34

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>34

cattcaggtg tgaggcaagg

20

<210>35

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>35

gatgccttca tgctgggtat

20

<210>36

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>36

taggtgtaac caggggcaag

20

<210>37

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>37

ccaatcagct tgggctagag

20

<210>38

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>38

cctgggaaag gtgtcctgta

20

<210>39

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>39

caaggcaagg gaggtagaca

20

<210>40

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>40

gctcctgate aacagcatca

20

<210>41

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>41

cacaactcgg agatcagcaa

20

<210>42

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>42

tgtaatccgg gtgttccttc

20

<210>43

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>43

tattccagga gcgatccaac

20

<210>44

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>44

ctcgttccag ttgctcaca

20

<210>45

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>45

aggaacatgg ttgccttcag

20

<210>46

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>46

agtgccttgac aaagcccagt

20

<210>47

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>47

ggaaacattg ggggaacttt

20

<210>48

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>48

gtgtggccca gctatttagg

20

<210>49

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>49

tgccactcag aagactgtgg

20

<210>50

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>50

ggatgcaggg atgatgttct

20

<210>51

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>51

ttttgtgcag tggttgatga

20

<210>52

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>52

cagcatgcct ctcaaattca

20

<210>53

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>53

gtggagccca gttgttgact

20

<210>54

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>54

ggctcatcac cttcttcagg

20

<210>55

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>55

accctcacca gcatgtcttc

20

<210>56

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>56

gtcaggtcgc tggacttctc

20

<210>57

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>57

cctgatgcaa gaacacatgg

20

<210>58

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>58

tgatggctgt ggagtctcag

20

<210>59

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>59

ctgtgaaact cccccaggta

20

<210>60

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>60

tcatcccgca taagtgtgaa

20

<210>61

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>61

cacctttgtg gtcctcacct

20

<210>62

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>62

gacgggactt ggggtgtgtag

20

<210>63

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>63

gaagtggagg acccacaagt

20

<210>64

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>64

cagtgccaaag gtctgaaggt

20

<210>65

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>65

gggacgggaa aacctactgt

20

<210>66

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>66

cacgaagtcg ttcttgctga

20

<210>67

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>67

cccaaagcaa acaaccactt

20

<210>68

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>68

gtaccccatc ctcctggaat

20

<210>69

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>69

gagtgggtgg gcgtactcta

20

<210>70

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>70

ttggaactga gcacttcgtg

20

<210>71

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>71

acttggcagg accagagaga

20

<210>72

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>72

ggaaccagac cttgacctga

20

<210>73

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>73

aggcccagaa ggtcatcatc

20

<210>74

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>74

gaggagggag accgtagtcc

20

<210>75

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>75

aggacaaggc tcccagtgtgta

20

<210>76

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>76

taggaagagc tggagccaaa

20

<210>77

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>77

tcccagggat ctgagaattg	20
-----------------------	----

<210>78

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>78

cacaacggtt tgaaatgacg	20
-----------------------	----

<210>79

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>79

tctgcctctg ggactctttc	20
-----------------------	----

<210>80

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>80

gggaccgctc aagtttgtaa	20
-----------------------	----

<210>81

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>81

ccaccaagt ggataggaga

20

<210>82

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>82

cagcagaagg tagtgtctg g

21

<210>83

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>83

cccagactcc gtcagtttct

20

<210>84

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>84

gttgggctca gacagcagtt

20

<210>85

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>85

tgatcgtgtg ttgccatttt

20

<210>86

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>86

aacaataaccg aagggcacag

20

<210>87

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>87

atccacattc ggaacaggac

20

<210>88

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>88

caaggttccg gtgatcttgt

20

<210>89

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>89

ccaagctcag cacacaaaaa

20

<210>90

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>90

ccaaccactc tgggaactgt

20

<210>91

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>91

cccaccggat ggctaggtat t

21

<210>92

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>92

gaggcggatc tgtttgaggt t

21

<210>93

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>93

ggccaacgaa ttggattcta

20

<210>94

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>94

gtttactggc accacgtcct

20

<210>95

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>95

atacaaagct tccacatga acggcgagga gcagtacta

39

<210>96

<211>37

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>96

atacactcga gtcacgtgg ttctgcggc cgccgag

37

<210>97

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>97

atacaaagct tccacatga atagtgagga gcagtac ta

39

<210>98

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>98

atacactcga gtcaccgggg ttctgcggt cgcagtggc

39

<210>99

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>99

atacaaagct tccacatga cgcctcaacc ctcgggtgc 39

<210>100

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>100

atacactcga gtcacagaaa atctgagaaa gccagactg 39

<210>101

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>101

atacaaagct tccacatgg cgcctcatcc cttggatgc 39

<210>102

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>102

atacactcga gtcacaagaa gtctgagaac accagggtg	39
--	----

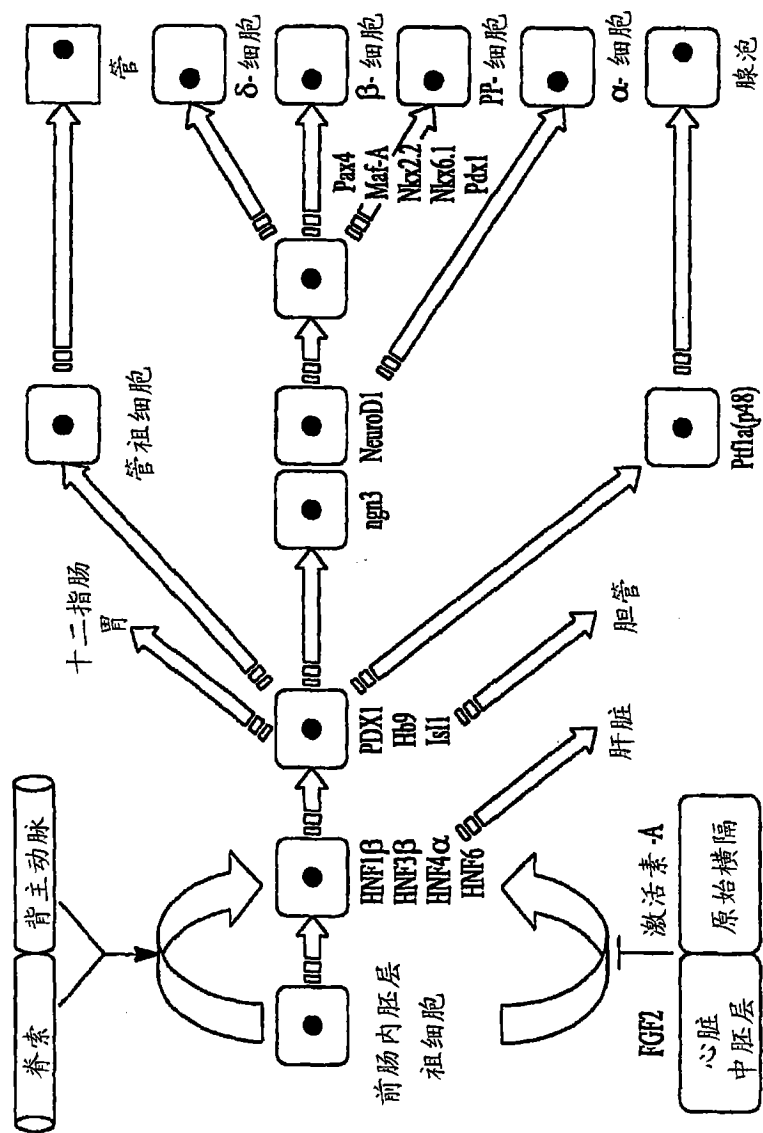


图 1

Oct4 mRNA 表达 MAPC
(相对于 GAPDH)

高 oct4 (HO)	0.3241±0.333
低 oct4 (LO)	0.0003±0.00001

图 2A

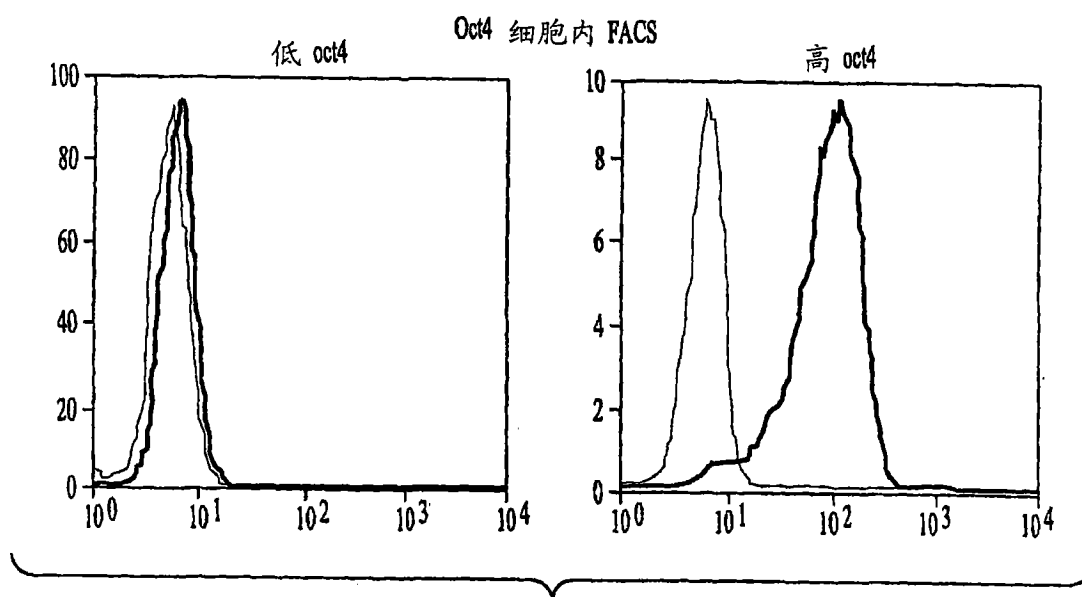


图 2B

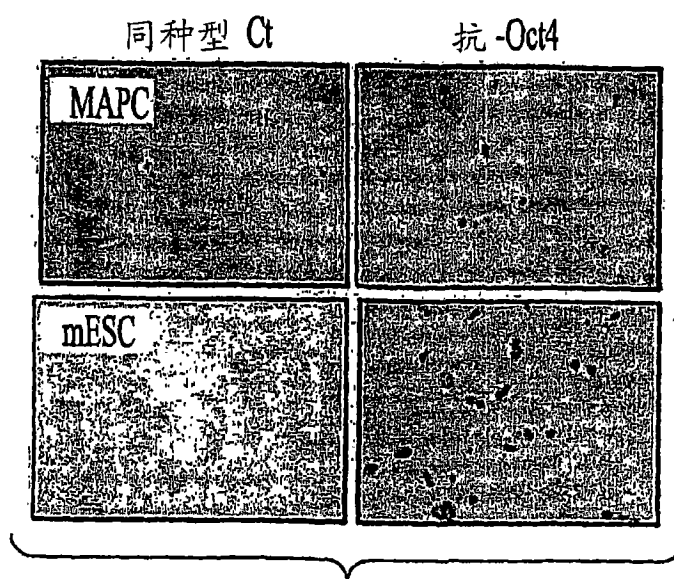


图 2C

	高 Oct 4 mMAPC
Oct3/4	20-80
Rex1	10-100
Nanog	<0.01
Sox2	<0.001
Fgf4	<0.1
Fbx15	100
FoxD3	100
Utf1	<0.1
Eras	<0.01
Tcl1	<0.01
Tdgl1	<0.01
Ecat1	<0.1
Egs1	10-30
GDF3	<0.01
Dnmt31	80-100
Ecat7	80-100

图 2D

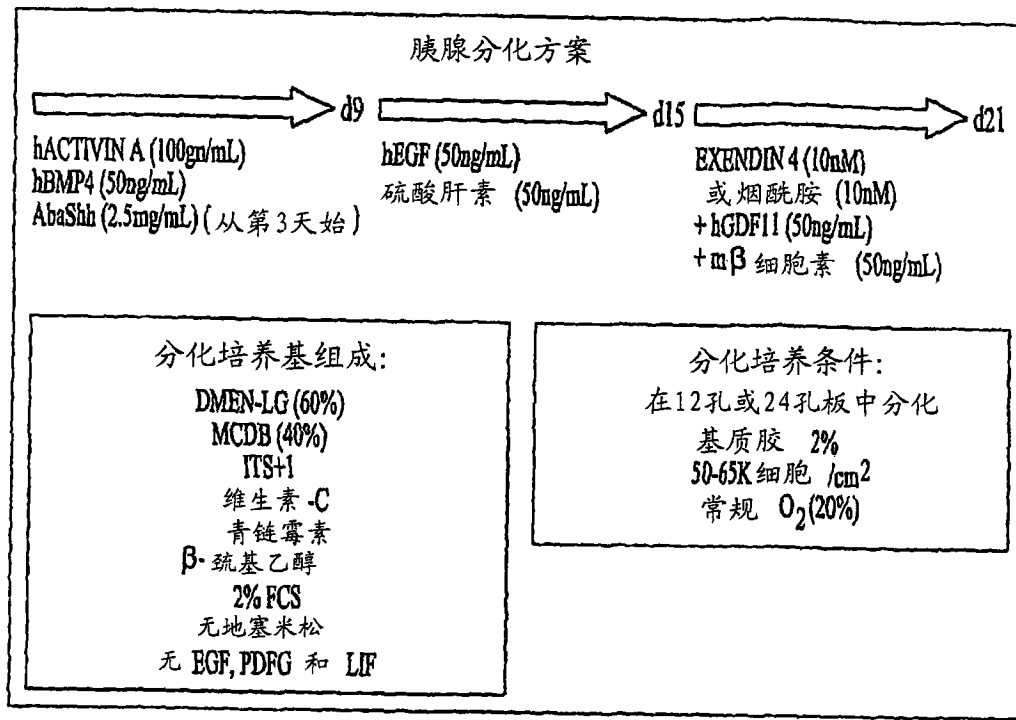


图 3A

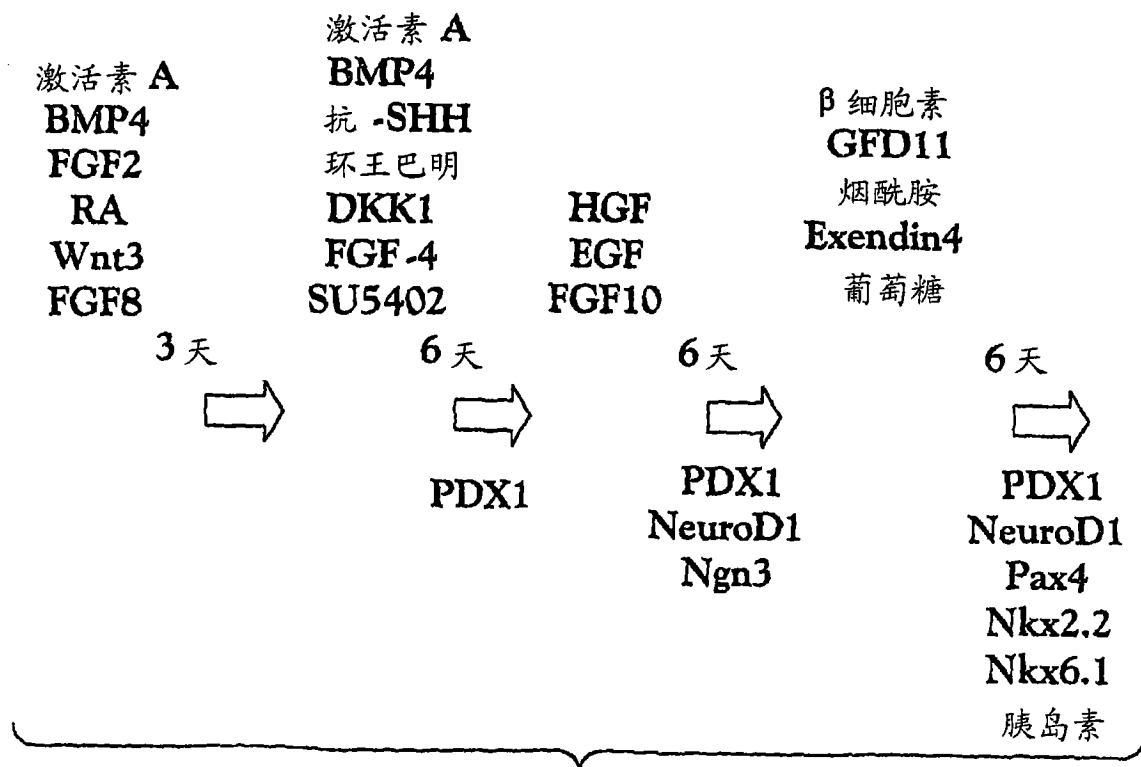


图 3B

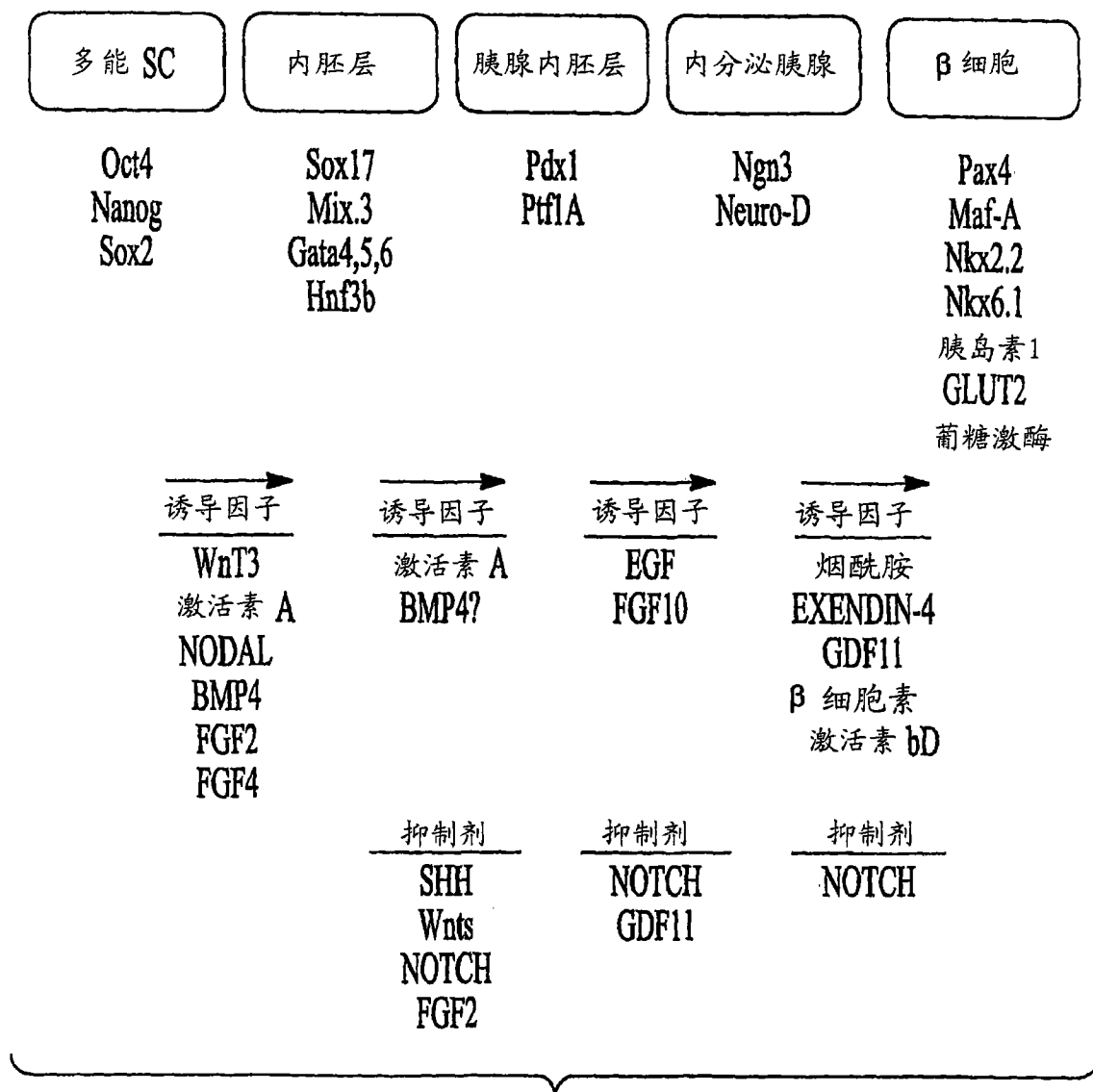


图 3C

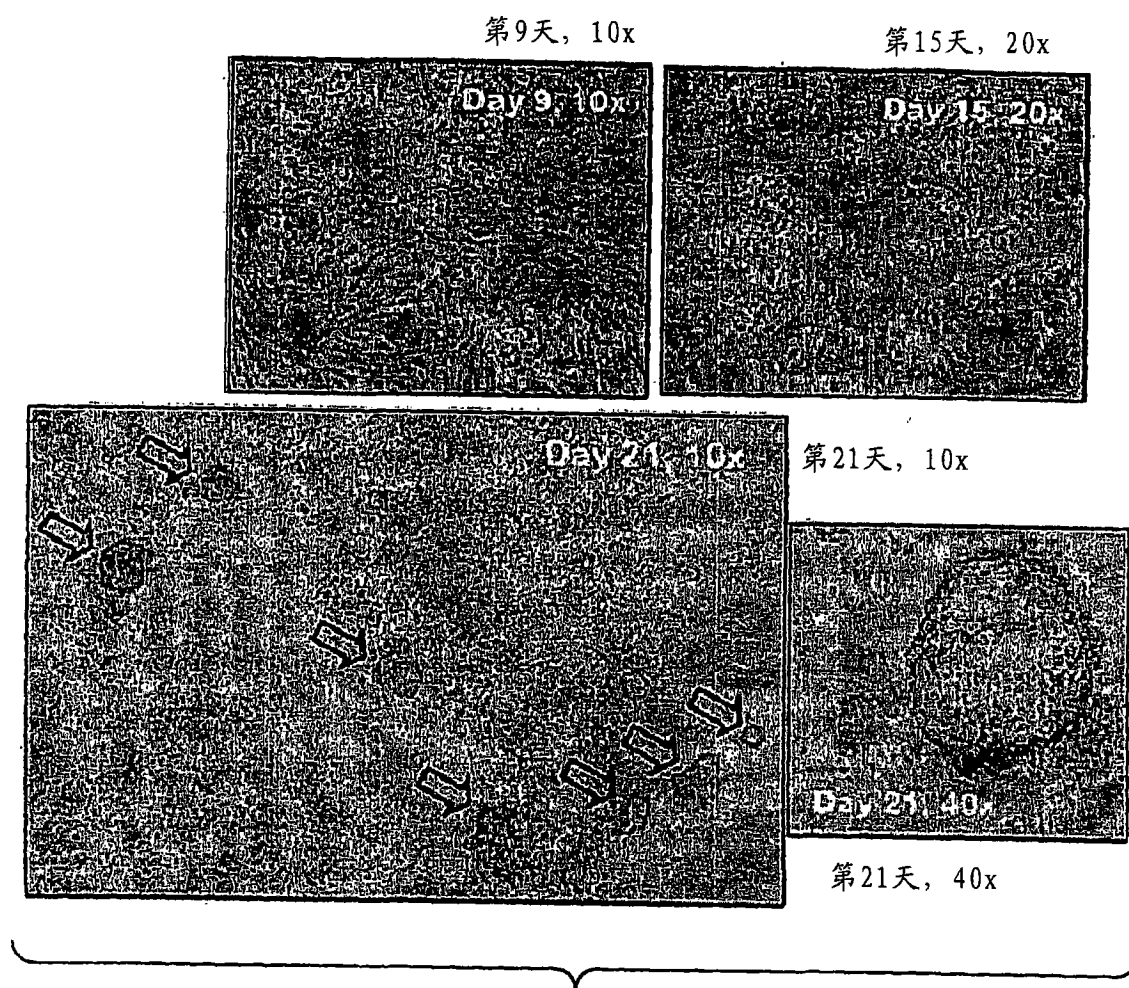


图 4

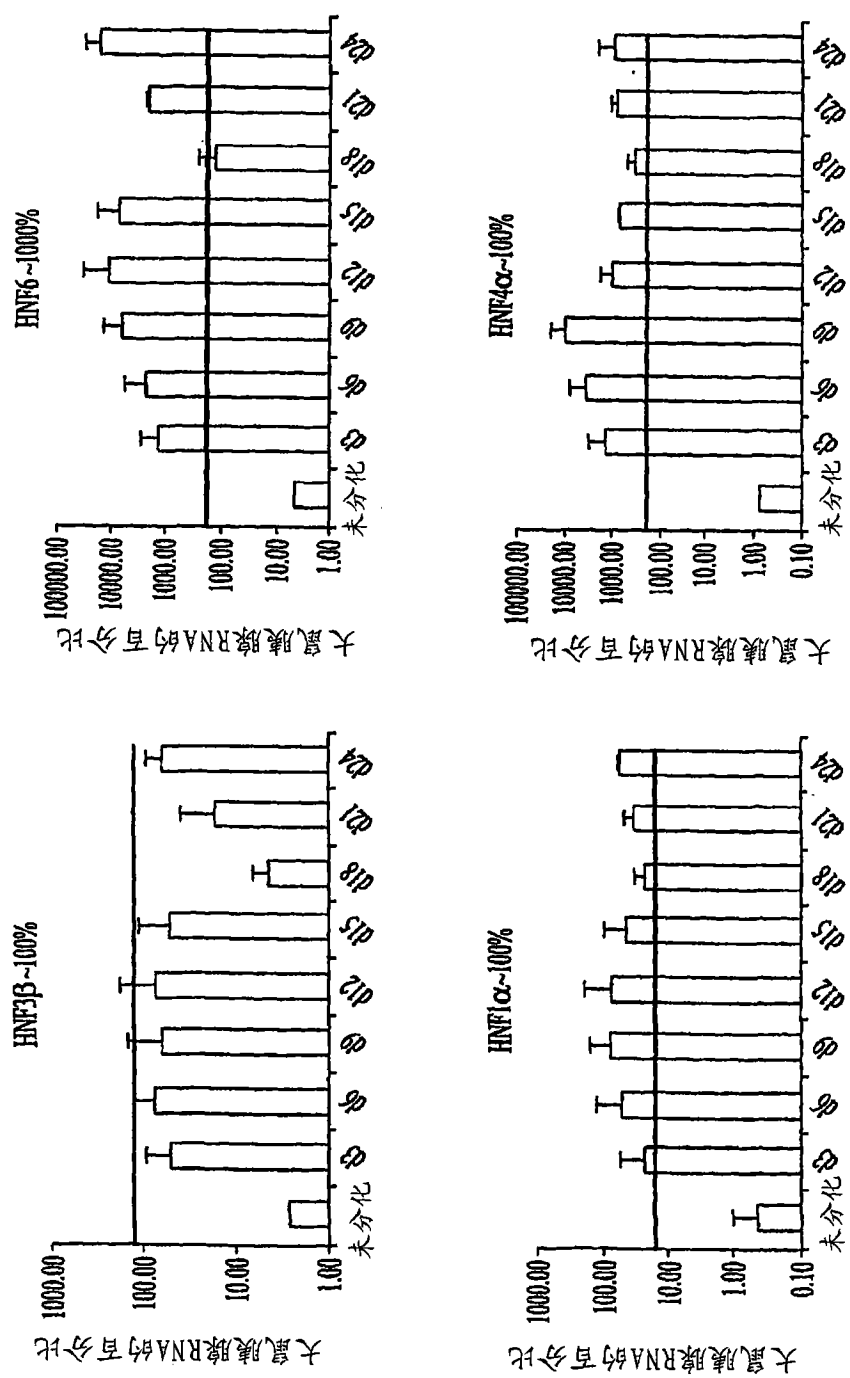


图 5A

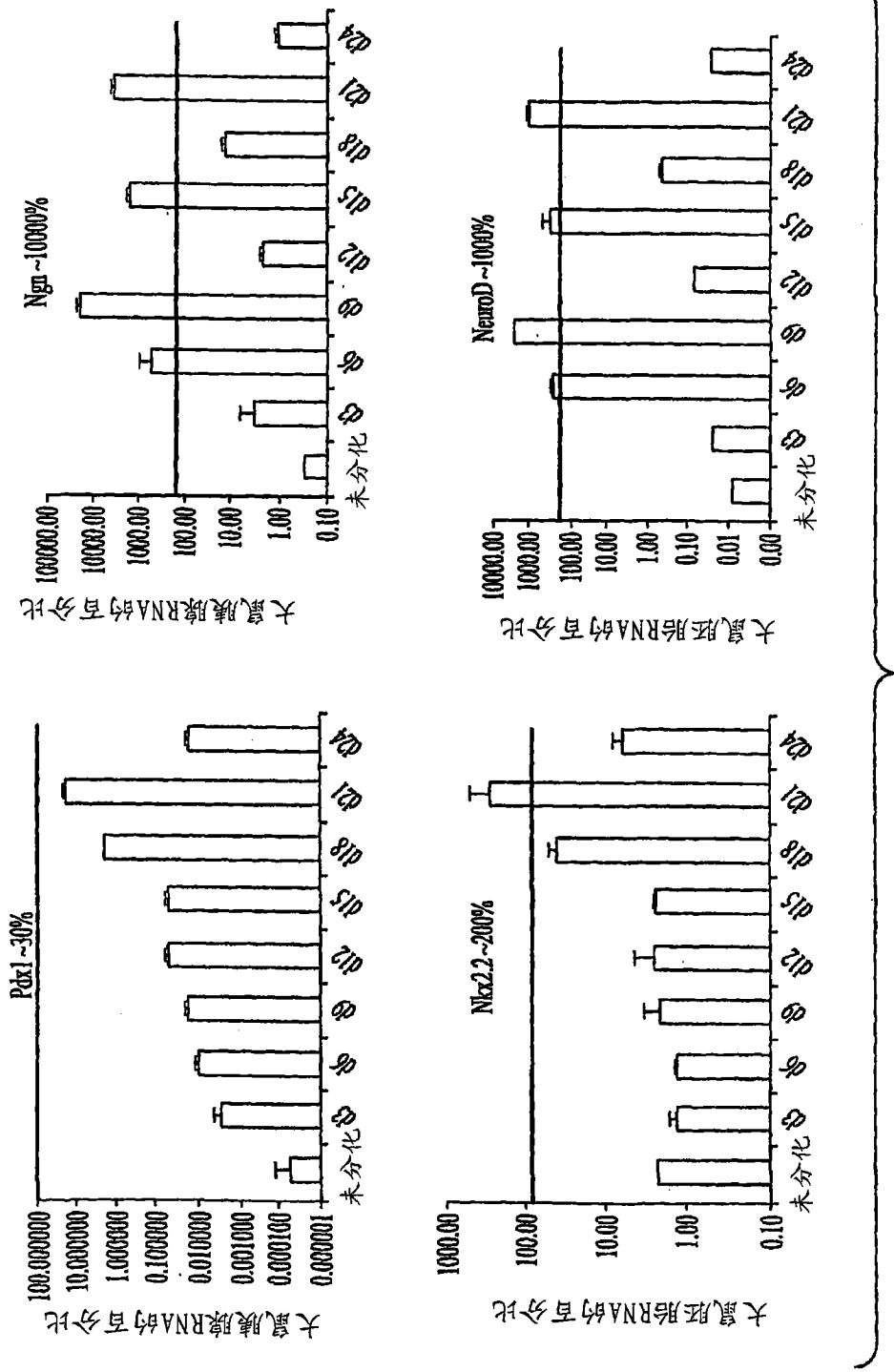


图 5B

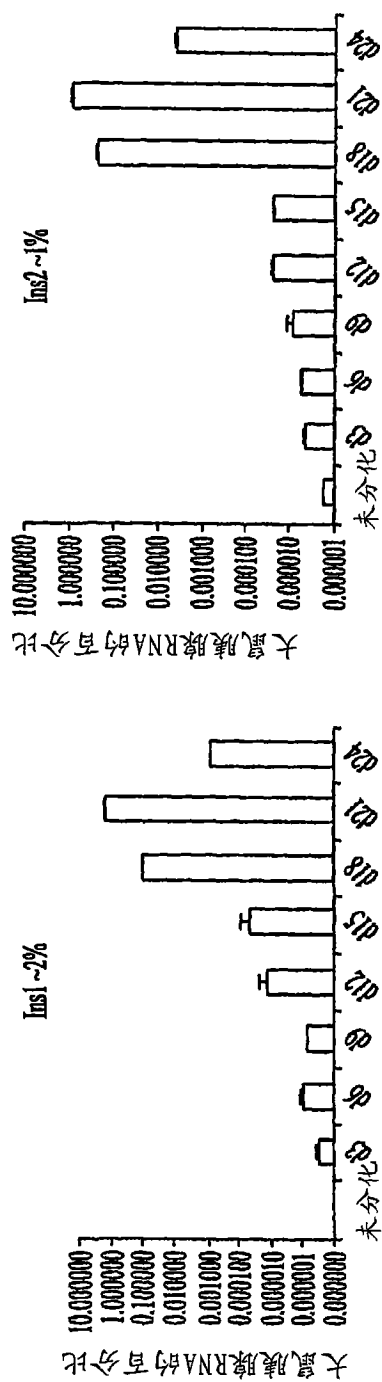


图 5C

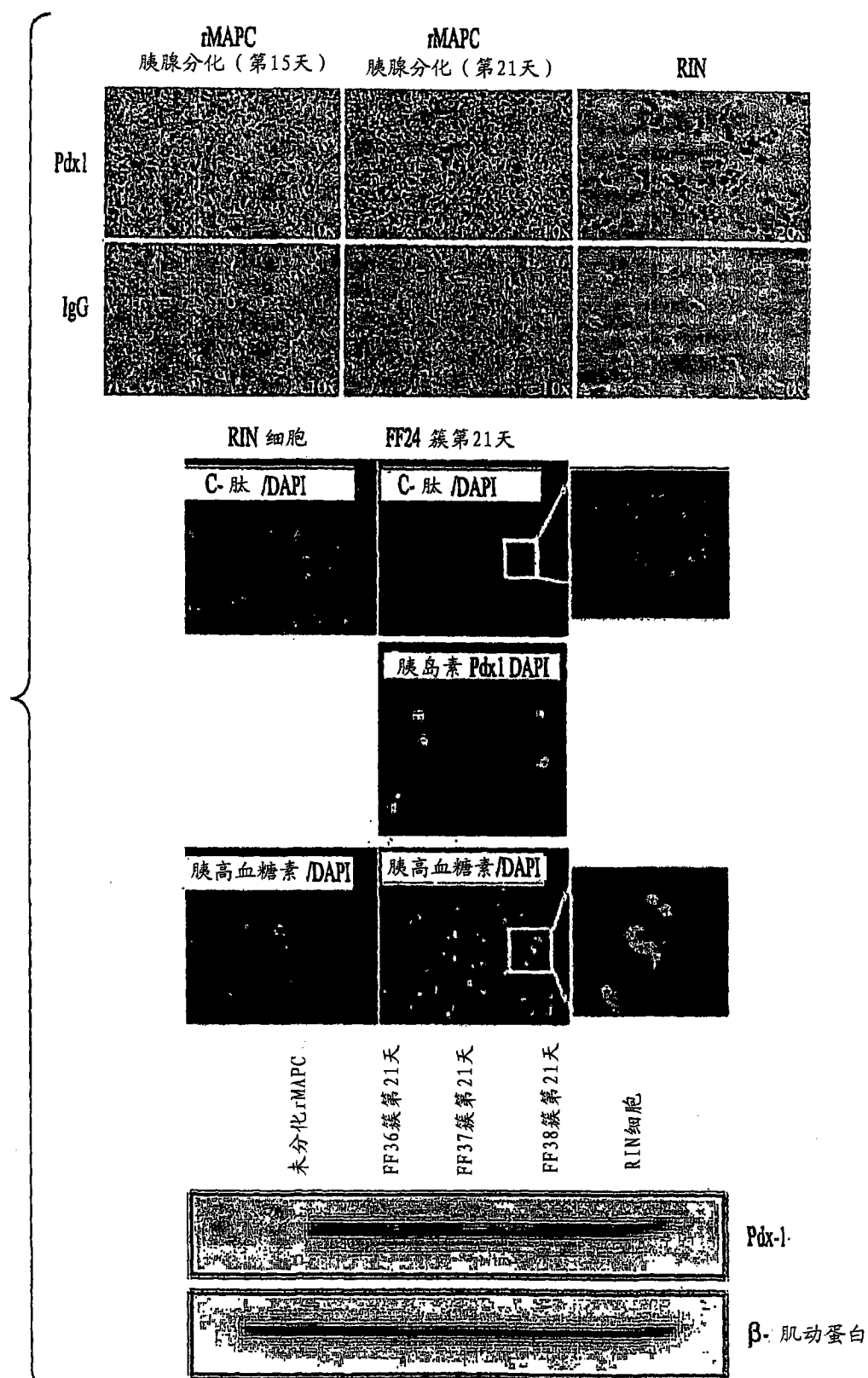


图 6

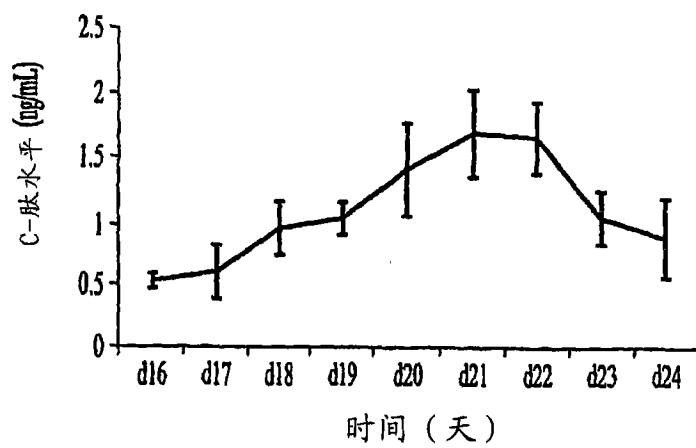


图 7

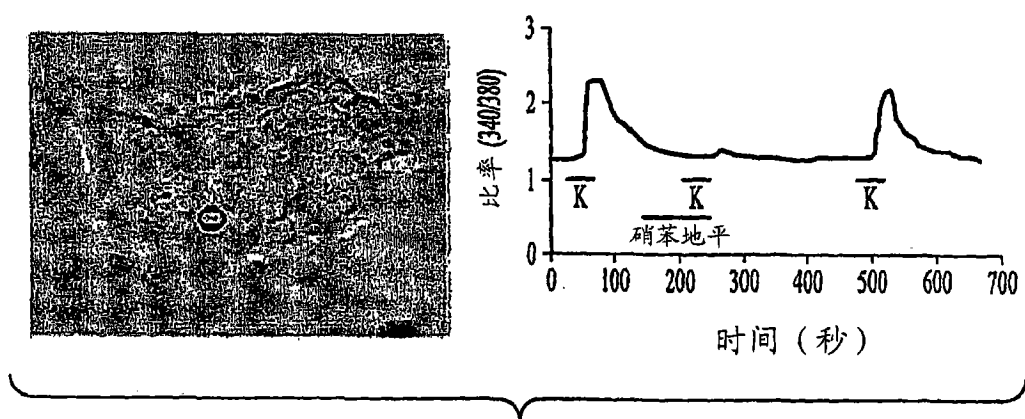


图 8

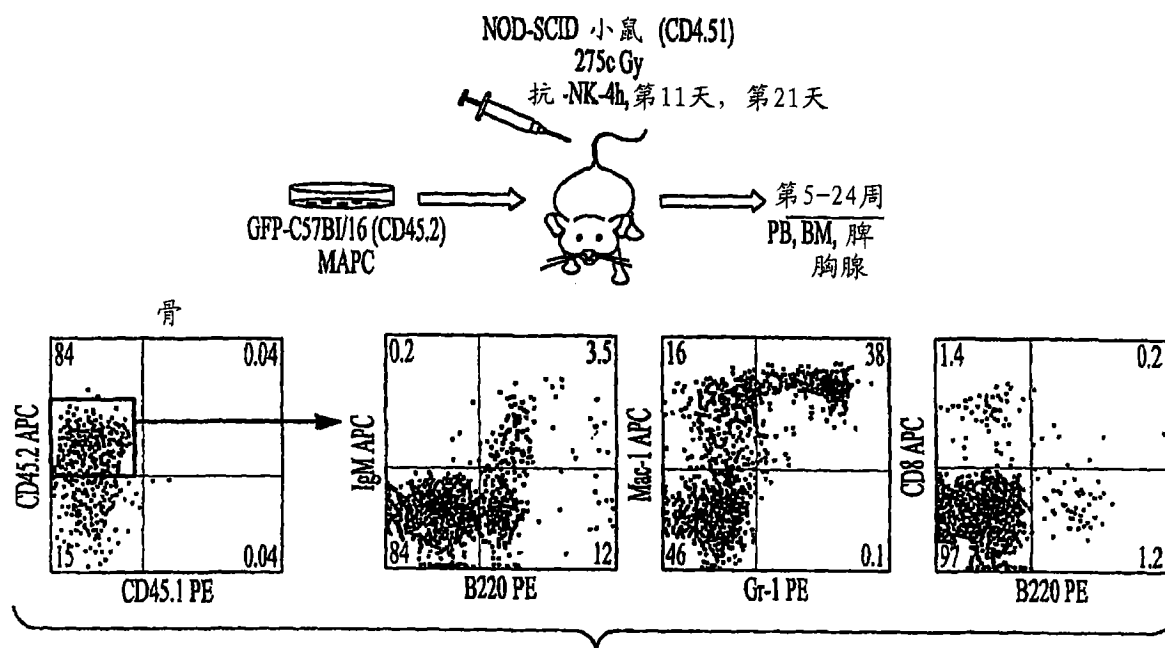


图 10A

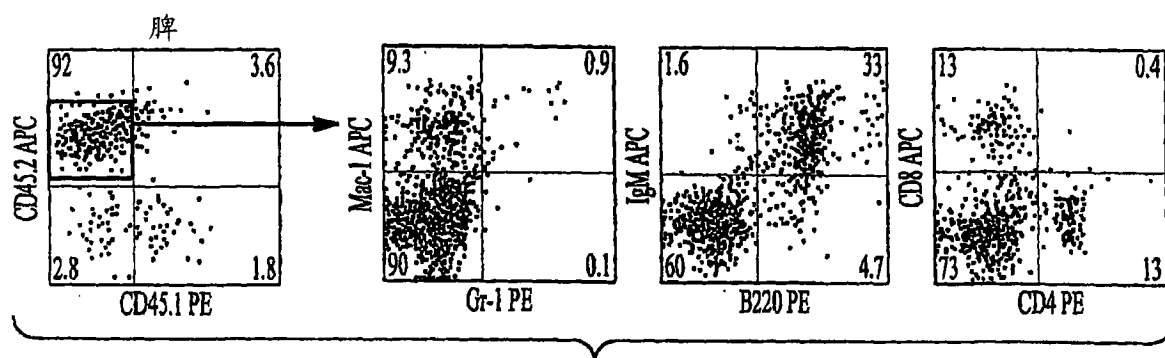


图 10B

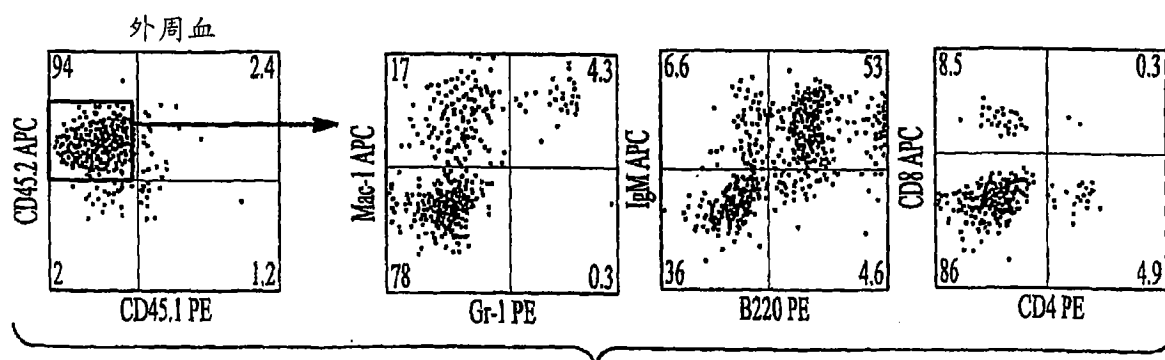


图 10C

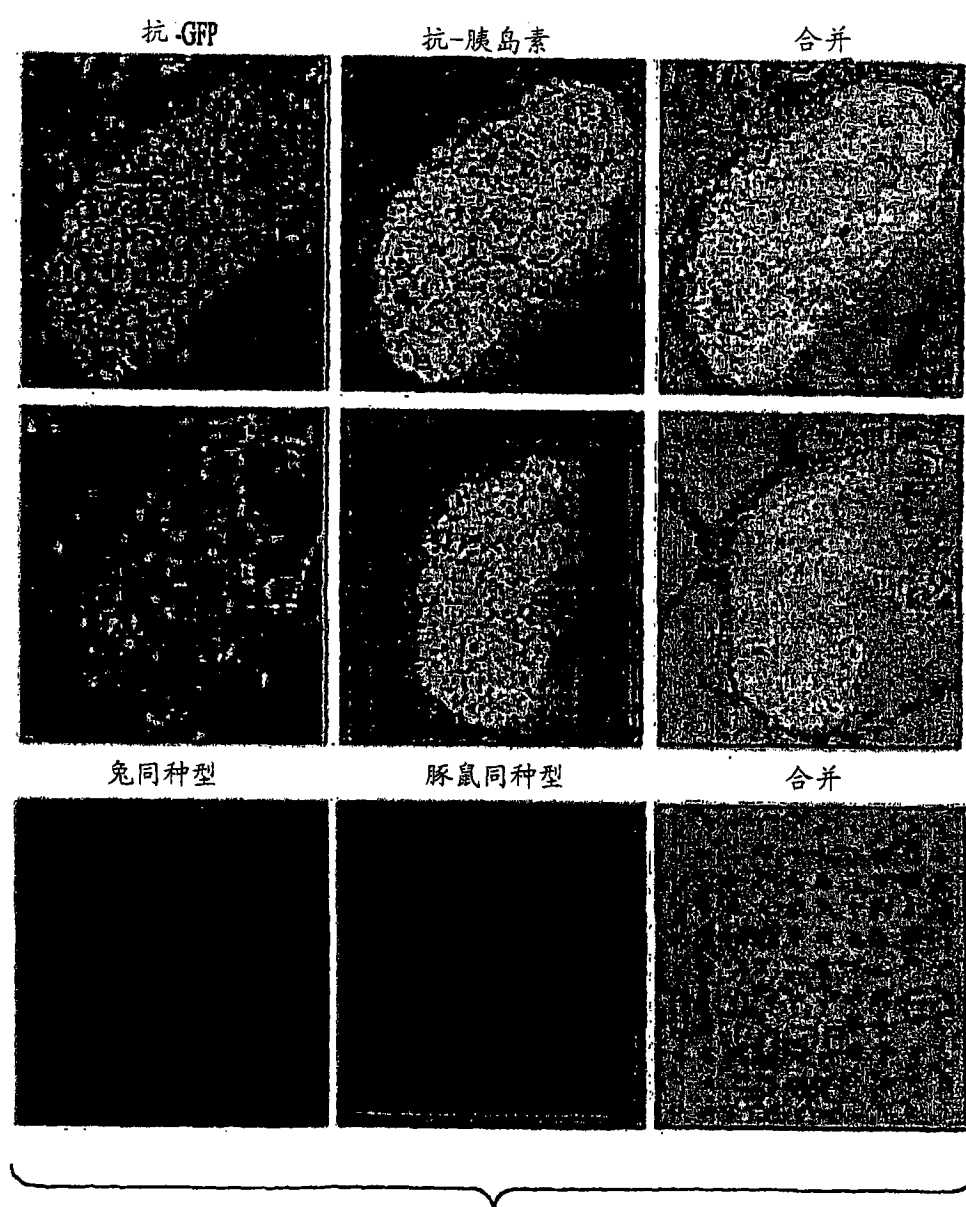


图 11