



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105579577 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201480045183. 7

代理人 杨青 缙正煜

(22) 申请日 2014. 06. 11

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 5/071(2006. 01)

61/833, 898 2013. 06. 11 US

61/972, 212 2014. 03. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 02. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/041992 2014. 06. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/201167 EN 2014. 12. 18

(71) 申请人 哈佛学院校长同事会

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 奎因·P·彼得森

费利西娅·J·帕柳卡

道格拉斯·A·梅尔顿

杰弗里·R·米尔曼

迈克尔·萨里斯·西格尔

马德斯·居特勒

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

权利要求书1页 说明书113页 附图17页

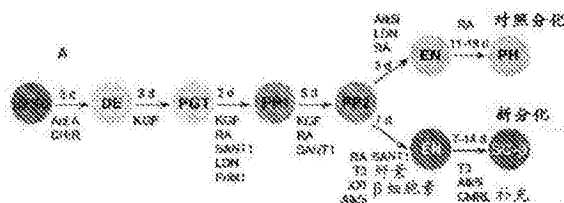
按照条约第19条修改的权利要求书18页

(54) 发明名称

SC-β 细胞以及用于产生其的组合物和方法

(57) 摘要

本文公开了适用于诱导 β 细胞成熟的方法、组合物、试剂盒和试剂,以及用于例如细胞疗法等各种应用中的分离的 SC-β 细胞群体。



1. 一种产生SC-β细胞的方法,所述方法包括:使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)转化生长因子β(TGF-β)信号传导通路抑制剂,ii)甲状腺激素信号传导通路活化剂,和任选地iii)蛋白激酶抑制剂,以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC-β细胞,其中所述SC-β细胞展现体外和/或体内GSIS反应。

SC-β细胞以及用于产生其的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年6月11日提交的美国临时申请No.61/833,898和2014年3月28日提交的美国临时申请No.61/972,212的权益,所述临时申请的内容以引用的方式整体并入本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 迄今为止,研究仅仅产生了功能异常的表达胰岛素的细胞,其不对连续变化的葡萄糖水平反应来分泌适当量的胰岛素;或在移植至小鼠主体3个月后产生只能够成熟成表达胰岛素的功能细胞的胰腺祖细胞(Cheng等人,2012;D'Amour等人,2005;D'Amour等人,2006;Kroon等人,2008;Nostro等人,2011;Rezania等人,2012;Schulz等人,2012;Xie等人,2013)。与在“葡萄糖刺激的胰岛素分泌”(GSIS)分析中对高水平的葡萄糖反应,释放高水平的胰岛素且可以重复如此进行的正常胰岛或分散的成年β细胞对比,通过现有方法产生的hPSC衍生的表达胰岛素的细胞无法对各种浓度的葡萄糖的添加反应来适当地分泌胰岛素。因此,需要一种从hPSC获得展现正常胰岛的表型的细胞或成熟成体β细胞的方法。

发明概要

[0005] 在一些方面中,本公开提供一种干细胞衍生β细胞(SC-β)。

[0006] 在一些实施方案中,所述细胞为成熟的。在一些实施方案中,所述细胞展现体外葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)反应。在一些实施方案中,所述细胞展现体内GSIS反应。在一些实施方案中,所述细胞展现体外及体内葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)反应。在一些实施方案中,所述细胞展现对至少一次葡萄糖激发的GSIS反应。在一些实施方案中,所述细胞展现对至少两次连续葡萄糖激发的GSIS反应。在一些实施方案中,所述细胞展现对至少三次连续葡萄糖激发的GSIS反应。在一些实施方案中,所述GSIS反应在所述细胞移植至人类或动物后很快观测到。在一些实施方案中,所述GSIS反应在所述细胞移植至人类或动物大约24小时内观测到。在一些实施方案中,所述GSIS反应在所述细胞移植至人类或动物大约2周内观测到。在一些实施方案中,表征为对高葡萄糖浓度起反应所分泌的胰岛素相比于低葡萄糖浓度时的比率的细胞刺激指数类似于内源性成熟胰腺β细胞的刺激指数。在一些实施方案中,所述刺激指数大于或等于1,或大于或等于1.1,或大于或等于1.3,或大于或等于2,或大于或等于2.3,或大于或等于2.6。在一些实施方案中,所述细胞对细胞因子起反应而展现细胞因子诱发的细胞凋亡。在一些实施方案中,所述细胞因子选自由以下组成的组:白细胞介素-1β(IL-1β)、干扰素-γ(INF-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和其组合。在一些实施方案中,对抗糖尿病剂起反应,胰岛素从所述细胞的分泌得到增强。在一些实施方案中,所述抗糖尿病剂包含选自由以下组成的组的促分泌素:胰岛素模拟物、磺酰脲、氯茴苯酸和其组合。在一些实施方案中,所述细胞为单激素的。在一些实施方案中,所述细胞展现类似于内源性成熟胰腺β细胞的形态。在一些实施方案中,所述细胞展现囊封结晶胰岛素颗粒在电子显微镜下类似于内源性成熟胰腺β细胞的胰岛素颗粒。在一些实施方案中,所述细胞展现低复制速率。在一些实施方案中,所述细胞展现类似于内源性成熟胰腺β细胞的葡萄

糖刺激的 Ca^{2+} 通量(GSCF)的GSCF。在一些实施方案中,所述细胞展现对至少一次葡萄糖激发的GSCF反应。在一些实施方案中,所述细胞展现对至少两次葡萄糖激发的GSCF反应。在一些实施方案中,所述细胞展现对至少三次葡萄糖激发的GSCF反应。在一些实施方案中,所述细胞展现增加的钙通量。在一些实施方案中,所述增加的钙通量包含增加的流入量或低浓度相对于高葡萄糖浓度的流入比率。在一些实施方案中,所述细胞表达至少一种选自自由以下组成的组的表征内源性成熟胰腺 β 细胞的标记物:胰岛素、C-肽、PDX1、MAFA、NKX6-1、PAX6、NEUROD1、葡萄糖激酶(GCK)、SLC2A1、PCSK1、KCNJ11、ABCC8、SLC30A8、SNAP25、RAB3A、GAD2、PTPRN、NKX2-2、Pax4。在一些实施方案中,所述细胞不表达至少一种选自自由以下组成的组的标记物:a)由以下组成的组的激素:i)胰高血糖素(GCG),和ii)生长激素抑制素(SST);或b)选自自由以下组成的腺泡细胞标记物:i)淀粉酶,和ii)羧肽酶A(CPA1);c)选自自由以下组成的 α 细胞标记物:i)GCG,ii)Arx,iii)Irx1,和Irx2;和d)选自自由以下组成的组的导管细胞标记物:i)CFTR,和ii)Sox9。在一些实施方案中,所述细胞从胰岛素阳性内分泌细胞或选自自由以下组成的组的其前驱细胞体外分化:Nkx6-1阳性胰腺祖细胞、Pdx1阳性胰腺祖细胞和多潜能干细胞。在一些实施方案中,所述多潜能干细胞选自自由以下组成的组:胚胎干细胞及诱导性多潜能干细胞。在一些实施方案中,所述细胞为人类。在一些实施方案中,所述细胞未进行基因修饰。在一些实施方案中,所述细胞进行基因修饰。在一些实施方案中,在高葡萄糖浓度下每1000个细胞每孵育30分钟,每个细胞产生的胰岛素为0.5与 $10\mu\text{IU}$ 之间。在一些实施方案中,在高葡萄糖浓度下每1000个细胞每孵育30分钟,每个细胞产生的胰岛素为大约 $2.5\mu\text{IU}$ 。在一些实施方案中,所述孵育离体进行。

[0007] 在一些方面中,本公开提供一种包含SC- β 细胞的细胞系。在一些实施方案中,所述细胞系稳定表达胰岛素。在一些实施方案中,所述细胞可冷冻,解冻,且扩增约24小时与44小时之间的倍增时间,无显著形态改变,直至至少30次继代。

[0008] 在一些方面中,本公开提供一种从胰岛素阳性内分泌细胞产生SC- β 细胞的方法,所述方法包括使包含胰岛素阳性内分泌细胞的细胞群体与包含以下的至少两种 β 细胞成熟因子在促进细胞簇集的条件下接触:a)转化生长因子 β (TGF- β)信号传导通路抑制剂和b)甲状腺激素信号传导通路活化剂,以诱导所述群体中的至少一种胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞。

[0009] 在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现对至少一次葡萄糖激发的反应。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现对至少两次连续葡萄糖激发的反应。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现对至少三次连续葡萄糖激发的反应。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞的形态类似于内源性成熟 β 细胞的形态。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现体外和/或体内葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)反应。在一些实施方案中,所述GSIS反应在所述SC- β 细胞移植至受试者后立即观测到。在一些实施方案中,所述GSIS反应在所述SC- β 细胞移植至受试者后大约24小时内观测到。在一些实施方案中,所述GSIS反应在所述SC- β 细胞移植至受试者大约两周内观测到。在一些实施方案中,使所述细胞群体与100nM-100 μM 的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与10 μM 的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,所述TGF- β 信号传导通路包含TGF- β 受体I型激酶信号传导。在一些实施方案中,所述TGF- β 信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II。在一些实施方案中,所述TGF- β 信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II的类似物或衍生

物。在一些实施方案中,使所述细胞群体与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与1 μ M的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,所述甲状腺激素信号传导通路活化剂包含三碘甲状腺原氨酸(T3)。在一些实施方案中,所述细胞群体任选地与蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,所述细胞群体不与所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与10nM-1 μ M之间的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与100nM的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,所述蛋白激酶抑制剂包含十字孢碱。在一些实施方案中,所述方法包括使所述细胞群体与至少一种其它 β 细胞成熟因子接触。在一些实施方案中,所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含囊肿性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)抑制剂。在一些实施方案中,使所述细胞群体与100nM-100 μ M之间的浓度的所述CFTR抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与10nM-10 μ M之间的浓度的所述CFTR抑制剂接触。在一些实施方案中,所述CFTR抑制剂包含Gly-H101。在一些实施方案中,所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含O-GlcNAc酶抑制剂。在一些实施方案中,使所述细胞群体与100nM-100 μ M之间的浓度的所述O-GlcNAc酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与10nM-10 μ M的浓度的所述O-GlcNAc酶抑制剂接触。在一些实施方案中,所述O-GlcNAc酶抑制剂包含Thiamet G。在一些实施方案中,所述细胞群体在适合培养基中培养。在一些实施方案中,所述适合培养基包含Connought Medical Research Laboratories 1066补充胰岛培养基(CMRLS)或CMRLS的组分。在一些实施方案中,所述CMRLS补充有血清。在一些实施方案中,所述CMRLS补充有10%胎牛血清。在一些实施方案中,所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。在一些实施方案中,所述细胞群体维持在悬浮培养物中达足以诱导所述细胞群体中至少一种所述胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成至少一种SC- β 细胞的时间段。在一些实施方案中,所述时间段包含至少7天。在一些实施方案中,所述时间段包含7天与21天之间。在一些实施方案中,所述时间段包含7天与14天之间。在一些实施方案中,所述时间段包含10天与14天之间。在一些实施方案中,所述时间段包含14天。在一些实施方案中,每隔一天补充所述 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,所述细胞群体中至少1%的所述胰岛素阳性内分泌细胞被诱导成熟成SC- β 细胞。在一些实施方案中,所述群体中至少99%的所述胰岛素阳性内分泌细胞被诱导成熟成SC- β 细胞。在一些实施方案中,所述群体中至少30%的所产生的细胞包含SC- β 细胞。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞表达C-肽、胰岛素、NKX6-1、Pdx1,且共表达NKX6-1和C-肽。在一些实施方案中,所述胰岛素阳性内分泌细胞还表达Pdx1和NKX6-1。在一些实施方案中,所述胰岛素阳性内分泌细胞由选自由胚胎干细胞及诱导性多潜能干细胞组成的组的多潜能干细胞群体产生。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞包含人类细胞。在一些实施方案中,SC- β 细胞在体外的产生是可量的。

[0010] 在一些方面中,本公开提供一种分离的SC- β 细胞群体,其根据本文所述的方法产生。

[0011] 在一些方面中,本公开提供一种微胶囊,其包含囊封在其中的分离的SC- β 细胞群体。

[0012] 在一些方面中,本公开提供一种组合物,其包含根据本文所述的方法产生的SC- β 细胞群体。

[0013] 在一些方面中,本公开提供一种分析,其包含根据本文所述的方法产生的分离的SC-β细胞群体。

[0014] 在一些实施方案中,所述分析用于鉴别一种或多种促进或抑制选自以下组成的组的β细胞命运的候选试剂:β细胞增殖、β细胞复制、β细胞死亡、β细胞功能、β细胞对免疫攻击的敏感性或β细胞对去分化或分化的敏感性。在一些实施方案中,所述分析用于鉴别一种或多种促进至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化成至少一种SC-β细胞的候选试剂。

[0015] 在一些方面中,本公开提供一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用包含根据本文所述的方法产生的分离的SC-β细胞群体的组合物。在一些实施方案中,所述SC-β细胞被囊封于微胶囊中。在一些实施方案中,所述SC-β细胞由从所述SC-β细胞所施用的同一受试者获得的多潜能干细胞群体产生。在一些实施方案中,所述SC-β细胞由iPS细胞群体产生,其中所述iPS细胞衍生自从所述SC-β细胞所施用的同一受试者获得的细胞。在一些实施方案中,所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。在一些实施方案中,所述糖尿病选自以下各糖尿病组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。在一些实施方案中,所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

[0016] 在一些方面中,本公开涉及一种通过根据如权利要求41至102中任一项所述的方法产生的分离的SC-β细胞群体的用途,其用于施用于有需要的受试者。

[0017] 在一些实施方案中,所述分离的SC-β细胞群体囊封于微胶囊中施用于所述受试者。在一些实施方案中,所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。在一些实施方案中,所述糖尿病选自以下各糖尿病组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。在一些实施方案中,所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

[0018] 在一些方面中,本公开提供一种培养基,其包含a)Alk5抑制剂,b)三碘甲状腺原氨酸(T3),任选地c)十字孢碱,和任选地d)CMRLS或CMRLS的组分。

[0019] 在一些方面中,本公开涉及培养基诱导胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC-β细胞的用途,其中所述SC-β细胞展现体外和/或体内GSIS反应。

[0020] 在一些方面中,本公开提供一种从Pdx1阳性胰腺祖细胞产生NKX6-1阳性胰腺祖细胞的方法,其包括使包含Pdx1阳性胰腺祖细胞的细胞群体在促进细胞簇集的条件下与包含以下的至少两种β细胞成熟因子接触:a)至少一种来自成纤维细胞生长因子(FGF)家族的生长因子,b)索尼克刺猬通路抑制剂,和任选地c)低浓度视黄酸(RA)信号传导通路活化剂,历时至少五天时间,从而诱导所述群体中的至少一种Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达NKX6-1。

[0021] 在一些实施方案中,使所述细胞群体与1ng/mL-100ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与50ng/mL的浓度的所述至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,所述至少一种来自FGF家族的生长因子包含角化细胞生长因子(KGF)。在一些实施方案中,所述至少一种来自FGF家族的生长因子选自以下组成的组:FGF2、FGF8B、FGF10和FGF21。在一些实施方案中,所述细胞群体不与所述RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与

0.01 μ M-1.0 μ M之间的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与0.1 μ M的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,所述RA信号传导通路活化剂包含RA。在一些实施方案中,使所述细胞群体与0.1 μ M与0.5 μ M之间的浓度的所述SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与0.25 μ M的浓度的所述SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,所述SHH通路抑制剂包含Sant1。在一些实施方案中,所述方法包括将所述细胞群体暴露于至少一种其它 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含至少一种来自EGF家族的生长因子。在一些实施方案中,将所述细胞群体暴露于2ng/mL-200ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子。在一些实施方案中,将所述细胞群体暴露于20ng/mL的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子。在一些实施方案中,至少一种来自EGF家族的生长因子选自由以下组成的组: β 细胞素和EGF。在一些实施方案中,在适合培养基中培养所述细胞群体。在一些实施方案中,所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。在一些实施方案中,每隔一天补充所述 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,蛋白激酶C活化剂在所述5天期间未加入所述悬浮培养物中。在一些实施方案中,蛋白激酶C活化剂在所述5天前从所述悬浮培养物去除。在一些实施方案中,所述蛋白激酶C活化剂包含PdbU。在一些实施方案中,BMP信号传导通路抑制剂在所述5天期间未加入所述悬浮培养物中。在一些实施方案中,BMP信号传导通路抑制剂在所述5天前从所述悬浮培养物去除。在一些实施方案中,所述BMP信号传导通路抑制剂包含LDN193189。在一些实施方案中,所述群体中至少10%的所述Pdx1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞。在一些实施例中,所述群体中至少95%的所述Pdx1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞。在一些实施方案中,所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1、NKX6-1和FoxA2。在一些实施方案中,所述Pdx1阳性胰腺祖细胞由选自由胚胎干细胞及诱导性多潜能干细胞组成的组的多潜能干细胞群体产生。

[0022] 在一些方面中,本公开提供一种分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体,其通过本文所述的方法获得。

[0023] 在一些方面中,本公开提供一种微胶囊,其包含囊封在其中的所述分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体。

[0024] 在一些方面中,本公开提供一种组合物,其包含根据本文所述的方法产生的分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体。

[0025] 在一些方面中,本公开提供一种分析,其包含根据本文所述的方法产生的分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体。

[0026] 在一些实施方案中,所述分析用于鉴别一种或多种促进至少一种Pdx1阳性胰腺祖细胞或其前驱细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞的候选试剂。

[0027] 在一些方面中,本公开提供一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用一种组合物,其包含根据本文所述的方法产生的分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体。

[0028] 在一些实施方案中,所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞由从所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞所施用的同一受试者获得的多潜能干细胞群体产生。在一些实施方案中,所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞被囊封于微胶囊中。在一些实施方案中,所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。在一些实施方案中,所述糖尿病选自由以下各糖尿病组成的组:I型糖

尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。在一些实施方案中,所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

[0029] 在一些方面中,本公开涉及通过根据权利要求113至142中任一项所述的方法产生的分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体的用途,其用于分化成SC- β 细胞。

[0030] 在一些方面中,本公开涉及通过本文所述的方法产生的分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体的用途,其用于施用于需要其的受试者。

[0031] 在一些实施方案中,所述分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞的群体囊封于微胶囊中施用于所述受试者。在一些实施方案中,所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。在一些实施方案中,所述糖尿病选自由以下各糖尿病组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。在一些实施方案中,所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

[0032] 在一些方面中,本公开提供一种培养基,其包含a)KGF,b)SANT1),和任选地c)RA,其中所述培养基基本上不含PdbU和LDN193189。在一些实施方案中,本公开涉及如权利要求160所述的培养基的用途,其诱导Pdx1阳性胰腺祖细胞体外分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞。

[0033] 在一些方面中,本公开提供一种由NKX6-1阳性胰腺祖细胞产生胰岛素阳性内分泌细胞的方法,其包括使包含NKX6-1阳性胰腺祖细胞的细胞群体在促进细胞簇集的条件下与包含以下的至少两种 β 细胞成熟因子接触:a)TGF- β 信号传导通路抑制剂,和b)甲状腺激素信号传导通路活化剂,以诱导所述群体中的至少一种NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成至少一种胰岛素阳性内分泌细胞,其中所述胰岛素阳性胰腺祖细胞表达胰岛素。在一些实施方案中,使所述细胞群体与100nM-100 μ M的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与10 μ M的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,所述TGF- β 信号传导通路包含TGF- β 受体I型激酶信号传导。在一些实施方案中,所述TGF- β 信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II。在一些实施方案中,使所述细胞群体与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与1 μ M的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,所述甲状腺激素信号传导通路活化剂包含三碘甲状腺原氨酸(T3)。在一些实施方案中,所述方法包括使所述细胞群体与至少一种其它 β 细胞成熟因子接触。在一些实施方案中,所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含 γ -分泌酶抑制剂。在一些实施方案中,使所述细胞群体与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的所述 γ -分泌酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与1 μ M的浓度的所述 γ -分泌酶抑制剂接触。在一些实施方案中,所述 γ -分泌酶抑制剂包含XXI。在一些实施方案中,所述 γ -分泌酶抑制剂包含DAPT。在一些实施方案中,所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含至少一种来自EGF家族的生长因子。在一些实施方案中,使所述细胞群体与2ng/mL-200ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与20ng/mL的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含 β 细胞素。在一些实施方案中,所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含EGF。在一些实施方案中,所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含低浓度的视黄酸(RA)信号传导通路活化剂。在一些实施方案中,使所述细胞群体与0.01 μ M-1.0 μ M之间的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与0.1 μ M的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。在

一些实施方案中,所述RA信号传导通路活化剂包含RA。在一些实施方案中,所述至少一种其它β细胞成熟因子包含索尼克刺猬(SHH)通路抑制剂。在一些实施方案中,使所述细胞群体与0.1μM与0.5μM之间的浓度的所述SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与0.25μM的浓度的所述SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,所述SHH通路抑制剂包含Sant1。在一些实施方案中,所述细胞群体任选地与蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,所述细胞群体不与所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与10nM-1μM之间的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述细胞群体与100nM的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,所述蛋白激酶抑制剂包含十字孢碱。在一些实施方案中,所述方法包括将所述细胞群体暴露于葡萄糖。在一些实施方案中,将所述细胞群体暴露于1mM-50mM之间的浓度的葡萄糖。在一些实施方案中,将所述细胞群体暴露于25mM的浓度的葡萄糖。在一些实施例中,所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。在一些实施方案中,所述细胞群体维持于悬浮培养物中达足以诱导的时间段群体中的至少一种所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞。在一些实施方案中,所述时间段至少7天。在一些实施方案中,在所述悬浮培养物中每隔一天补充所述β细胞成熟因子。在一些实施方案中,所述群体中至少15%的所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成胰岛素阳性内分泌细胞。在一些实施方案中,所述群体中至少99%的所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成胰岛素阳性内分泌细胞。在一些实施方案中,所述胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素。在一些实施方案中,所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞由选自由胚胎干细胞及诱导性多潜能干细胞组成的组的多潜能干细胞群体产生。

[0034] 在一些方面中,本公开提供一种分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体,其根据本文所述的方法产生。

[0035] 在一些方面中,本公开提供一种微胶囊,其包含囊封在其中的所述分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体。在一些实施方案中,本公开提供一种组合物,其包含根据本文所述的方法产生的胰岛素阳性内分泌细胞群体。

[0036] 在一些方面中,本公开提供一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用包含根据本文所述的方法产生的分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体的组合物。

[0037] 在一些实施方案中,所述胰岛素阳性内分泌细胞由从所述胰岛素阳性内分泌细胞所施用的同一受试者获得的多潜能干细胞群体产生。在一些实施方案中,所述胰岛素阳性内分泌细胞被囊封于微胶囊中。在一些实施方案中,所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。在一些实施方案中,所述糖尿病选自由以下各糖尿病组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。在一些实施方案中,所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

[0038] 在一些方面中,本公开涉及通过本文所述的方法产生的分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体的用途,其用于分化成SC-β细胞。

[0039] 在一些方面中,本公开涉及通过本文所述的方法产生的分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体的用途,其用于施用于需要其的受试者。

[0040] 在一些实施方案中,所述分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体囊封于微胶囊中施用

于所述受试者。在一些实施方案中,所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。在一些实施方案中,所述糖尿病选自由以下各糖尿病组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。在一些实施方案中,所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

[0041] 在一些方面中,本公开提供一种培养基,其包含a)TGF- β 信号传导通路抑制剂,b)TH通路活化剂,和至少一种选自由以下组成的组的其它 β 细胞成熟因子:i)XXI,ii) β 细胞素,iii)低浓度的RA信号传导通路活化剂,和iv)SHH通路抑制剂。

[0042] 在一些方面中,本公开涉及如权利要求221的培养基的用途,其用于诱导NKX6-1阳性胰腺祖细胞体外分化成胰岛素阳性内分泌细胞。

[0043] 在一些方面中,本公开提供一种产生SC- β 细胞的方法,所述方法包括:使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)转化生长因子 β (TGF- β)信号传导通路抑制剂,ii)甲状腺激素信号传导通路活化剂,和任选地iii)蛋白激酶抑制剂,以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞,其中所述SC- β 细胞展现体外和/或体内GSIS反应。

[0044] 在一些实施方案中,所述GSIS反应(i)在所述SC- β 细胞移植至受试者后立即;(ii)在移植至受试者大约24小时内;或(iii)在移植至受试者大约两周内观测到。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现对以下各者的反应:(i)至少一次葡萄糖激发;(ii)至少两次连续葡萄糖激发;或(iii)至少三次连续葡萄糖激发。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞的形态类似于内源性 β 细胞的形态。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与100nM-100 μ M的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与10 μ M的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,所述TGF- β 信号传导通路包含TGF- β 受体I型激酶信号传导。在一些实施方案中,所述TGF- β 信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与1 μ M的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,所述甲状腺激素信号传导通路活化剂包含三碘甲状腺原氨酸(T3)。在一些实施方案中,所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞不与所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与10nM-1 μ M之间的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与100nM的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,所述蛋白激酶抑制剂包含十字孢碱。在一些实施方案中,所述方法包括使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与100nM与100 μ M之间的浓度的所述CFTR抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与10nM与10 μ M的浓度的所述CFTR抑制剂接触。在一些实施方案中,所述CFTR抑制剂包含Gly-H101。在一些实施方案中,所述方法包括使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与O-GlcNAc酶抑制剂接触。

在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与100nM与100μM之间的浓度的所述O-GlcNAc酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与10nM与10μM之间的浓度的所述O-GlcNAc酶抑制剂接触。在一些实施方案中,所述O-GlcNAc酶抑制剂包含Thiamet G。在一些实施方案中,所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在适合培养基中培养。在一些实施方案中,所述适合培养基包含Connought Medical Research Laboratories 1066补充胰岛培养基(CMRLS)或CMRLS的组分。在一些实施方案中,所述CMRLS补充有血清。在一些实施方案中,所述CMRLS补充有10%胎牛血清。在一些实施方案中,所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。在一些实施方案中,所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞维持于悬浮培养物中达足以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC-β细胞的时间段。在一些实施方案中,所述时间段包含至少7天。在一些实施方案中,所述时间段包含7天与21天之间。在一些实施方案中,所述时间段包含7天与14天之间。在一些实施方案中,所述时间段包含14天。在一些实施方案中,每隔一天补充悬浮培养物。在一些实施方案中,至少30%的所产生的所述细胞包含SC-β细胞。在一些实施方案中,所述SC-β细胞表达C-肽、胰岛素、NKX6-1、Pdx1,且共表达NKX6-1和C-肽。在一些实施方案中,所述SC-β细胞包含人类细胞。在一些实施方案中,所述SC-β细胞体外产生为可量的。

[0045] 在一些实施方案中,所述胰岛素阳性内分泌细胞通过以下获得:使Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)TGF-β信号传导通路抑制剂,和ii)甲状腺激素信号传导通路活化剂,以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞,其中所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Surl、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素。

[0046] 在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与100nM-100μM的浓度的所述TGF-β信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与10μM的浓度的所述TGF-β信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,所述TGF-β信号传导通路包含TGF-β受体I型激酶信号传导。在一些实施方案中,所述TGF-β信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1μM-10μM之间的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与1μM的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,所述甲状腺激素信号传导通路活化剂包含三碘甲状腺原氨酸(T3)。在一些实施方案中,所述方法包括使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与以下中的至少一者接触:i)SHH通路抑制剂,ii)RA信号传导通路活化剂,iii)γ-分泌酶抑制剂,iv)至少一种来自所述表皮生长因子(EGF)家族的生长因子,和任选地v)蛋白激酶抑制剂。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1μM与0.5μM之间的浓度的所述SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.25μM的浓度的SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,所述SHH通路抑制剂包含Sant1。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.01μM-1.0μM之间的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1μM的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方

案中,所述RA信号传导通路活化剂包含RA。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的所述 γ -分泌酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与1 μ M的浓度的所述 γ -分泌酶抑制剂接触。在一些实施方案中,所述 γ -分泌酶抑制剂包含XXI。在一些实施方案中,所述 γ -分泌酶抑制剂包含DAPT。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与2ng/mL-200ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与20ng/mL的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含 β 细胞素。在一些实施方案中,所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含EGF。在一些实施方案中,所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞不与所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与10nM-1 μ M之间的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与100nM的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,所述蛋白激酶抑制剂包含十字孢碱。在一些实施方案中,所述方法包括将所述细胞群体暴露于葡萄糖。在一些实施方案中,将所述细胞群体暴露于1mM-50mM之间的浓度的葡萄糖。在一些实施方案中,将所述细胞群体暴露于25mM的浓度的葡萄糖。在一些实施方案中,所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。在一些实施方案中,所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞维持于悬浮培养物中达足以诱导的时间段至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞。在一些实施方案中,所述时间段至少7天。在一些实施方案中,每隔一天补充悬浮培养物。在一些实施方案中,至少15%的所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞。在一些实施方案中,至少99%的所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞。

[0047] 在一些实施方案中,所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞通过以下获得:使Pdx1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)至少一种来自FGF家族的生长因子,ii)至少一种SHH通路抑制剂,和任选地iii)低浓度的RA信号传导通路活化剂,历时五天的时间,以诱导至少一些所述Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1。

[0048] 在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与1ng/mL-100ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与50ng/mL的浓度的所述至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,所述至少一种来自FGF家族的生长因子包含角化细胞生长因子(KGF)。在一些实施方案中,所述至少一种来自FGF家族的生长因子选自由以下组成的组:FGF2、FGF8B、FGF10和FGF21。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M与0.5 μ M之间的浓度的所述至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.25 μ M的浓度的所述至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,所述至少一种SHH通路抑制剂包含Sant1。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.01 μ M-1.0 μ M之间的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M的浓

度的所述RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,所述RA信号传导通路活化剂包含RA。在一些实施方案中,所述方法包括使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与2ng/mL-200ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与20ng/mL的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含β细胞素。在一些实施方案中,所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含EGF。在一些实施方案中,所述Pdx1阳性胰腺祖细胞在适合培养基中培养。在一些实施方案中,所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。在一些实施方案中,每隔一天补充悬浮培养物。在一些实施方案中,蛋白激酶C活化剂在所述5天期间未加入所述悬浮培养物中。在一些实施方案中,蛋白激酶C活化剂在所述5天前从所述悬浮培养物去除。在一些实施方案中,所述蛋白激酶C活化剂包含PdbU。在一些实施方案中,BMP信号传导通路抑制剂在所述5天期间未加入所述悬浮培养物中。在一些实施方案中,BMP信号传导通路抑制剂在所述5天前从所述悬浮培养物去除。在一些实施方案中,所述BMP信号传导通路抑制剂包含LDN193189。在一些实施方案中,所述群体中至少10%的所述Pdx1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞。在一些实施方案中,至少95%的所述Pdx1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞。

[0049] 在一些方面中,本公开提供一种从多潜能细胞产生SC-β细胞的方法,所述方法包括:a)使群体中的多潜能干细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞;b)通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞:每隔一天使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)至少一种来自FGF家族的生长因子,ii)至少一种SHH通路抑制剂,和任选地iii)RA信号传导通路活化剂,历时五天的时间,以诱导至少一些所述Pdx1阳性胰腺祖细胞所述群体中分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1;c)通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞:每隔一天使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)TGF-β信号传导通路抑制剂,b)TH信号传导通路活化剂,和任选地c)至少一种SHH通路抑制剂,ii)RA信号传导通路活化剂,iii)γ-分泌酶抑制剂,和vi)至少一种来自所述表皮生长因子(EGF)家族的生长因子,历时五天与七天之间的时间,以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞,其中所述Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素;和d)通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC-β细胞:每隔一天使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)转化生长因子β(TGF-β)信号传导通路抑制剂,ii)甲状腺激素信号传导通路活化剂,和任选地iii)蛋白激酶抑制剂,历时七天与14天之间的时间,以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC-β细胞,其中所述SC-β细胞展现体外和/或体内GSIS反应。

[0050] 在一些实施方案中,本公开提供一种从多潜能细胞产生SC-β细胞的方法,所述方法包括:a)使群体中的至少一些多潜能细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞;b)通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞:每隔一天

使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)KGF,ii)Sant1,和任选地iii)低浓度的RA,历时五天的时间,以诱导所述群体中的至少一种Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1;c)通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞:每隔一天使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与以下接触:i)Alk5抑制剂II,ii)T3,和任选地iii)Sant1,iv)RA,v)XXI,和vi)β细胞素,历时五天与七天之间的时间,以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞,其中所述Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素;和d)通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC-β细胞:每隔一天使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)Alk5抑制剂II,ii)T3,和任选地iii)十字孢碱,历时七天与14天之间的时间,以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰岛素产生内分泌细胞体外成熟成SC-β细胞,其中所述SC-β细胞展现体外和/或体内GSIS反应。

[0051] 在一些方面中,本公开提供一种人工胰岛,其包含从多潜能干细胞体外分化的SC-β细胞。

[0052] 在一些方面中,本公开提供一种人工胰腺,其包含从多潜能干细胞体外分化的SC-β细胞。

[0053] 除非另外指明,否则本发明的实施将通常采用本领域技能范围内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组核酸(例如DNA)技术、免疫学和RNA干扰(RNAi)的常规技术。某些这些技术的非限制性描述可见于以下公布中:Ausubel,F.等人(编辑),Current Protocols in Molecular Biology,Current Protocols in Immunology,Current Protocols in Protein Science,和Current Protocols in Cell Biology,均为John Wiley&Sons,N.Y.,截至2008年12月的版本;Sambrook,Russell,和Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,2001;Harlow,E.和Lane,D.,Antibodies-A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,1988;Freshney,R.I.,“Culture of Animal Cells,A Manual of Basic Technique”,第5版,John Wiley&Sons,Hoboken,NJ,2005。关于治疗剂和人类疾病的非限制性信息可见于以下中:Goodman和Gilman的The Pharmacological Basis of Therapeutics,第11版,McGraw Hill,2005,Katzung,B.(编辑)Basic and Clinical Pharmacology,McGraw-Hill/Appleton&Lange;第10版(2006)或第11版(2009年7月)。关于基因和遗传病症的非限制性信息可见于以下中:McKusick,V.A.:Mendelian Inheritance in Man.A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders.Baltimore:Johns Hopkins University Press,1998(第12版)或更近期网上数据库:Online Mendelian Inheritance in Man,OMIM™.McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine,Johns Hopkins University(Baltimore,MD) and National Center for Biotechnology Information,National Library of Medicine(Bethesda,MD),截至2010年5月1日,World Wide Web URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>和Online Mendelian Inheritance in Animals(OMIA)(动

物物种(除人类和小鼠以外)中基因、遗传病症和特性的数据库),<http://omia.angis.org.au/contact.shtml>。本文中提及的所有专利、专利申请和其它公布(例如科学论文、书籍、网址和数据库)以引用的方式整体并入本文中。在说明书与任何并入的参考之间存在矛盾的情况下,说明书(包括可能基于并入的参考的其任何修正)应为准。除非另外指示,否则本文中术语的标准技术上公认的含义。本文中各种术语的标准缩写。

[0054] 附图简述

[0055] 专利或申请文件含有至少一个以颜色制作的图式。具有颜色图式的此专利或专利申请公布的拷贝将由管理处按要求和支付必要费用后提供。

[0056] 图1A和1B展示先前公布的对照分化方法与新的定向分化方法之间的比较。图1A展示比较从hPSC产生INS⁺细胞的本公开的示例性定向分化方法与先前公布的对照分化方法的比较示意图。图1B示出使用先前公布的对照分化方法,未分化(顶图)、分化成DE(中图)和分化成PP1(底图)并分别用OCT4、SOX17和PDX1染色的HUES8的组织切片。比例尺=100 μ m。

[0057] 图2A、2B和2C证明体外产生的干细胞衍生 β (SC- β)细胞如原代人类 β 细胞一般,对多次连续高葡萄糖激发起反应而分泌胰岛素。图2A、2B和2C为展示从用2mM、20mM、2mM、20mM、2mM和20mM葡萄糖连续激发的SC- β (图2A)、原代 β 细胞(图2B)和PH细胞(图2C)分泌的人类胰岛素的ELISA测量结果的图。连续低/高葡萄糖激发后,将细胞用30mM KCl去极化。

[0058] 图3A、3B和3C证明如原代人类 β 细胞一般,对多次连续高葡萄糖激发起反应而分泌胰岛素的体外衍生的SC- β 细胞的其它生物复制品。左图与图2中相同。用2mM、20mM、2mM、20mM、2mM和20mM葡萄糖和30mM KCl连续激发细胞,SC- β 细胞(SC- β ;图3A)、原代 β 细胞(1 $^{\circ}$ β ;图3B)和PH细胞(图3C)且用ELISA测量人类胰岛素。

[0059] 图4A、4B、4C、4D和4E证明SC- β 细胞如原代 β 细胞一般,对多次连续高葡萄糖激发起反应而流出胞质Ca²⁺。图4A为使用Fluo-4AM染色,胞质Ca²⁺的群体含量和单细胞含量检测的示意图。在个别整簇(示意图中由大的红色圆形标记)上进行群体含量测量,且分析完整簇内个别细胞(由小的红色圆形标记)以进行单细胞分析。图4B为展示用2mM、20mM、2mM、20mM、2mM和20mM葡萄糖和30mM KCl连续激发的SC- β 细胞、原代 β 细胞和PH细胞的动力学标准化的Fluo-4荧光强度的群体测量结果的图。图4C展示用于单细胞分析的Fluo-4AM染色的荧光影像。图4D展示指示对3(黄色)、2(橙色)、1(蓝色)和0(红色)次葡萄糖激发起反应的单细胞的位置的代表性影像。图4E展示对20mM葡萄糖起反应的SC- β 细胞(n=156)、原代 β 细胞(n=114)和PH细胞(n=138)的频率的图示定量。比例尺=100 μ m。

[0060] 图5A、5B、5C、5D、5E和5F证明SC- β 在蛋白质和基因表达水平下表达人类 β 细胞标记物。图5A展示针对C-肽(绿色)、NKX6-1(红色)和生长抑素(灰色)染色的细胞的免疫组织化学影像。图5B展示针对C-肽(绿色)和PDX1(红色)染色的细胞的免疫组织化学影像。图5C展示针对C-肽(绿色)和胰高血糖素(红色),用对应DAPI染色剂(蓝色)染色的细胞的免疫组织化学影像。图5D展示针对C-肽和NKX6-1染色的细胞的代表性流动式细胞测量术点图和群体百分比。图5E展示基于通过针对INS分类的未分化的HUES8、PH细胞、胎儿 β 细胞和成体原代 β 细胞(数据来自Hrvatin等人(Hrvatin等人,2014))和针对INS和NKX6-1分类的SC- β 细胞(SC- β)的微阵列测量的所有基因的分层聚类分析。图5F展示在所有样品中具有最大变异的100个基因的热图。CP=C-肽,SST=生长抑素,GCG=胰高血糖素。比例尺=100 μ m。

[0061] 图6示出针对DAPI(蓝色)、胰岛素(绿色)、C-肽(红色)染色的SC-β细胞簇的组织学。比例尺=100μm。

[0062] 图7A、7B和7C示范SC-β细胞的其它组织学染色。图7A示出针对C-肽(绿色)和ISL1(红色)染色。图7B图示针对C-肽(绿色)和MAFA(红色)染色。图7C示出针对C-肽(绿色)和MAFB(红色)染色。比例尺=100μm。

[0063] 图8A、8B和8C展示针对C-肽和SST(图8A)、C-肽和GCG(图8B)以及SST和GCG(图8C)染色的SC-β细胞和PH细胞的代表性流动式细胞测量术点图和群体百分比。

[0064] 图9A、9B和9C证明SC-β细胞颗粒结构类似于原代人类β细胞颗粒。图9A展示突出显示代表性结晶胰岛素颗粒(红色)、早期胰岛素颗粒(黄色)和混合内分泌颗粒(蓝色)的颗粒的电子显微镜影像。比例尺=500nm。图9B展示(图9A)中突出显示的颗粒的更高放大倍数影像。比例尺=500nm。图9C展示用免疫金染色剂标记的细胞的电子显微镜检查影像,展示含有胰岛素(小于5nm黑点)和/或胰高血糖素(大于15nm黑点)的颗粒。代表性免疫金粒子用红色箭头(胰岛素)和蓝色箭头(胰高血糖素)突出显示。比例尺=100nm。

[0065] 图10A和10B证明从hiPSC产生的干细胞衍生β(SC-β)细胞如原代β细胞一般,对多次连续高葡萄糖激发起反应而体外分泌胰岛素。图10A和10B为展示从用2mM、20mM、2mM、20mM、2mM和20mM葡萄糖连续激发的非糖尿病细胞(图10A)和1型糖尿病细胞(图10B)产生的SC-β分泌的人类胰岛素的ELISA测量结果的图。

[0066] 图11A、11B、11C、11D、11E和11F展示来自多个hiPSC谱系的针对C-肽和NKX6-1染色的细胞的代表性流动式细胞测量术点图和群体百分比。图11A、11B和11C展示来自非糖尿病hiPSC谱系的针对C-肽和NKX6-1染色的细胞的代表性流动式细胞测量术点图和群体百分比。图11D、11E和11F展示来自1型糖尿病hiPSC谱系的针对C-肽和NKX6-1染色的细胞的代表性流动式细胞测量术点图和群体百分比。

[0067] 图12A、12B、12C和12D证明移植的SC-β细胞在体内迅速地起作用。图12A为展示来自移植SC-β细胞(在最终体外步骤中培养1周)、原代人类β细胞(1°β)或PH细胞的个别小鼠的血清的人类胰岛素的ELISA测量结果的图。在移植两周后向小鼠注射葡萄糖前(白色棒)和注射30分钟后(黑色棒)进行测量。图12B展示针对C-肽(绿色)和PDX1(红色)染色的(图12A)中移植的细胞的免疫组织化学影像以证实移植物的存在。图12C为展示来自移植胰腺祖细胞的个别小鼠的血清的人类胰岛素的ELISA测量结果的图。在移植两周后向小鼠注射葡萄糖前(白色棒)和注射30分钟后(黑色棒)进行测量。图12D为展示来自移植在最终体外步骤期间培养2周的SC-β细胞的个别小鼠的血清的人类胰岛素的ELISA测量结果的图。在移植两周后向小鼠注射葡萄糖30分钟后(黑色棒)进行测量。nd=未测定。比例尺=100μm。

[0068] 图13A和13B示出2周前移植至小鼠中的SC-β细胞和PH细胞的其它组织切片。图13A展示针对DAPI(蓝色)、C-肽(绿色)和GCG(红色)染色的移植物的低放大倍数影像。比例尺=200μm。图13B展示针对C-肽(绿色)和GCG(红色)染色的移植物的更高放大倍数影像。比例尺=100μm。

[0069] 图14A、14B和14C证明在最后分化步骤时使用允许SC-β细胞体内分泌更多胰岛素的培养基。图14A展示说明分化过程的各个步骤中各种培养基的使用的示意图。图14B展示如通过低与高葡萄糖激发之间的刺激指数所测量,在最后分化步骤时例如Sant1、XXI和SSP等其它因子至CMRL培养基使SC-β细胞产生更好的葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)反应。图

14C展示如通过释放的胰岛素的量所测量,在最后分化步骤时例如Sant1、XXI和SSP等其它因子至CMRL培养基使SC-β细胞产生更好的葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)反应。

[0070] 图15A、15B、15C、15D、15E、15F、15G、15H和15I示范可增强产生的SC-β细胞的存活和质量的方案的修改。图15A为该方案的示意图。图15B展示如何使用修改的方案产生更纯的NKX6.1+内分泌簇(图15B)。图15C示范在步骤3-5使用Rock抑制剂可如何增加细胞存活。图15D示范活化素A与烟酰胺一起使用可如何下调SOX2且增加细胞存活。图15E展示SOX2和NKX6-1为互斥的。图15F示范在步骤6使用十字孢碱如何产生近乎纯的内分泌群体,且图15G示范在步骤6使用十字孢碱如何产生较高百分比的NKX6-1/C-肽+细胞。图15I示范当与仅仅使用Alk5i和T3相比时在步骤5-6使用XXI以及Alk5i和T3如何增加NeuroD+群体(图15H)。

[0071] 图16A、16B、16C、16D、16E、16F、16G、16H和16I证明SC-β细胞作为糖尿病疗法或药物发现平台的临床效用。图16A为SC-β细胞用于治疗糖尿病或筛选药物以增加功能或复制的效用的示意图。图16B为列出所研究的糖尿病药物和其一般治疗类别的表格。图16C为展示从用2和20mM葡萄糖中指示药物处理的涂铺的SC-β细胞分泌的人类胰岛素的ELISA测量结果的图。所指示的p值比较20mM葡萄糖中药物与对照之间的胰岛素值。图16D为在无处理下用DAPI(蓝色)、C-肽(绿色)和Ki67(红色)染色的分散和涂铺的SC-β细胞的免疫荧光影像。图16E为在用催乳激素处理48小时下用DAPI(蓝色)、C-肽(绿色)和Ki67(红色)染色的分散和涂铺的SC-β细胞的免疫荧光影像。图16F展示共同表达C-肽和Ki67的细胞的分数的图示定量。 $*p<0.05$ 。图16G为示出移植SC-β细胞($n=6$)或PH细胞($n=6$)的秋田小鼠(Akita mice)的空腹血糖测量结果的图。 $*p<0.05$ 比较同一天的两个细胞组。图16H为示出来自移植SC-β细胞或PH细胞的进展性糖尿病秋田小鼠的血糖测量结果的图。对向2周前移植的小鼠注射葡萄糖前(白色棒)和注射20分钟后(黑色棒)进行测量。葡萄糖测量在550mg/dL下饱和。 $*p<0.05$ 比较注射葡萄糖后相同时间的两个细胞组。图16I为展示注射葡萄糖后20分钟来自秋田小鼠的血清的人类胰岛素的ELISA测量结果的图。移植后2周小鼠用葡萄糖激发。 $*p<0.05$ 比较两个细胞组。比例尺=50μm。

[0072] 图17为示出移植SC-β细胞($n=6$)或PH细胞($n=6$)的秋田小鼠的体重的图。 $*p<0.05$ 比较18和28d时间点的两个细胞组。

[0073] 发明详述

[0074] 本公开的方面涉及用于从至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞(例如iPS细胞、hESC、定形内胚层细胞、原肠管细胞、Pdx1阳性胰腺祖细胞、Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞、Ngn3阳性内分泌祖细胞等)产生干细胞衍生β(SC-β)细胞(例如成熟胰腺β细胞)的组合物、方法、试剂盒和试剂,以及通过那些组合物、方法、试剂盒和试剂产生的SC-β细胞以用于细胞疗法、分析(例如药物筛选)和各种治疗方法。

[0075] 另外,本公开的方面涉及在无需采用可选择标记物下,基于形态准则以及例如能够表达胰岛素、对一次或多次葡萄糖激发起反应而分泌胰岛素、展现成熟GSIS反应且在体内胰腺中胰岛中组织并通常具有约9-15μm直径的小纺锤体样细胞等功能特点可检测的SC-β细胞的鉴别方法。

[0076] 另外,本公开的方面涉及鉴别β细胞成熟因子的方法。本领域技术人员将知道或将容易能够使用本领域中已知的分析确定特定β细胞成熟因子是否为功能性的。举例来说,可以使用如本文公开的分析,评估β细胞成熟因子将至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前

驱细胞转变成SC-β细胞的能力。其它合宜的分析包括测量活化含有可操作地连接于编码例如荧光素酶等可检测标记物的核酸序列的β细胞标记物结合位点的报导构建体的转录的能力。一种分析包括确定候选β细胞成熟因子是否诱发至少一种胰岛素阳性内分泌细胞变成SC-β细胞或表达β细胞的标记物或展现如本文公开的成熟β细胞的功能特点。可以使用任何适合的方法,例如免疫印迹法,进行β细胞标记物的此类表达的测定。此类分析可以容易地适合于鉴别或证实直接将至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞转变成SC-β细胞的试剂的活性。

[0077] 根据本文中描述的本发明方法产生的体外成熟的SC-β细胞(即胰腺β细胞)证明许多优点,举例来说,其进行体外葡萄糖刺激胰岛素分泌,在基因表达和超微结构上类似于人类胰岛β细胞,分泌人类胰岛素并当移植至小鼠中时改善高血糖症,提供细胞疗法的新平台(例如移植至需要额外和/或功能性β细胞的受试者中)、药物筛选(例如用于产生胰岛素/分泌、存活、去分化等)、研究(例如确定正常与糖尿病β细胞之间的功能差异)和组织工程化(例如使用SC-β细胞作为重建胰岛的第一细胞类型)。

[0078] 定义

[0079] 为方便起见,本文、实施例和随附权利要求书中所用的某些术语收集于此。除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属的领域的技术人员通常了解的含义相同的含义。

[0080] 术语“分化细胞”意指在天然形式下非多潜能(该术语在本文中定义)的任何原代细胞。换句话说,术语“分化细胞”是指在细胞分化过程中衍生自较少特异性细胞类型(例如干细胞,例如诱导性多潜能干细胞)的更大特异性细胞类型的细胞。不希望限于理论,在正常个体发育的过程中多潜能干细胞可以首先分化成能够形成胰腺细胞和其它内胚层细胞类型的内胚层细胞。内胚层细胞的进一步分化产生胰腺通路,其中约98%的细胞变成外分泌、导管或基质细胞,且约2%变成内分泌细胞。早期内分泌细胞是胰岛祖细胞,其接着可以进一步分化成胰岛素产生细胞(例如功能性内分泌细胞),所述胰岛素产生细胞分泌胰岛素、胰高血糖素、生长抑素或胰多肽。内胚层细胞也可以分化成内胚层来源的其它细胞,例如肺、肝、肠、胸腺等。

[0081] 如本文所用,术语“体细胞”是指与生殖系细胞相对比,任何形成生物体的身体的细胞。在哺乳动物中,生殖系细胞(又名“配子”)是精子和卵子,它们在受精期间结合,产生称为接合子的细胞,整个哺乳动物胚胎从该细胞发育而来。哺乳动物中除精子和卵子、形成其的细胞(配子母细胞)和未分化干细胞外的所有其它细胞类型都是体细胞:内脏、皮肤、骨骼、血液和结缔组织都是由体细胞组成。在一些实施方案中,体细胞是“非胚胎的体细胞”,此意指胚胎中不存在或从胚胎获得且不会由此类细胞体外增殖产生的体细胞。在一些实施方案中,体细胞是“成人体细胞”,此意指除胚胎或胎儿以外的生物体中存在或从其中获得或由此类细胞体外增殖产生的细胞。除非另外指示,否则用于将至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞转变成产生胰岛素的葡萄糖反应性细胞的方法可以在体内与体外进行(其中当至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞存在于受试者内时实施体内,且其中使用维持于培养物中的分离的至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞实施体外)。

[0082] 如本文所用,术语“成体细胞”是指在胚胎发育后在全身发现的细胞。

[0083] 如本文所用,术语“内胚层细胞”是指来自极早胚胎中三个原代生殖细胞层之一(另两个生殖细胞层是中胚层和外胚层)的细胞。内胚层是三层中的最内层。内胚层细胞分化,首先得到胚胎肠管,接着得到呼吸道和消化道(例如肠)、肝和胰腺的内层。

[0084] 如本文所用,术语“内胚层来源细胞”是指已经从内胚层细胞发育或分化的任何细胞。举例来说,内胚层来源细胞包括肝、肺、胰腺、胸腺、肠、胃和甲状腺的细胞。不希望受理论束缚,肝和胰腺祖细胞(又称为胰腺祖细胞)从胚胎前肠中的内胚层细胞发育而来。在其特化后不久,肝和胰腺祖细胞迅速地获得明显不同的细胞功能和再生能力。这些改变由感应信号和在脊椎动物中高度保守的遗传调节因子引起。在肝功能衰竭和I型糖尿病的治疗性治疗中对肝细胞和胰腺β细胞的强烈需要已经燃起对器官发育和再生的兴趣。在各种模型生物体和人类中的研究已经揭露引起肝和胰腺细胞分化的进化保守的感应信号和转录因子网并提供如何促进从各种干细胞和祖细胞类型进行肝细胞和β细胞分化的指导。

[0085] 如本文所用,术语“定形内胚层”是指从内胚层细胞分化并可以分化成SC-β细胞(例如胰腺β细胞)的细胞。定形内胚层细胞表达标记物Sox17。表征定形内胚层细胞的其它标记物包括(但不限于)MIXL2、GATA4、HNF3b、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CXCR4、Cerberus、OTX2、gooseoid、C-Kit、CD99、CMKOR1和CRIP1。具体地说,本文中定形内胚层细胞表达Sox17,且在一些实施方案中,表达Sox17和HNF3B,且不表达显著水平的GATA4、SPARC、APF或DAB。定形内胚层细胞对标记物Pdx1非阳性(例如其是Pdx1阴性的)。定形内胚层细胞能够分化成包括肝、肺、胰腺、胸腺、肠、胃和甲状腺细胞在内的细胞。Sox17和定形内胚层的其它标记物的表达可以通过技术人员已知的任何方法,例如免疫化学,例如使用抗-Sox17抗体或定量RT-PCR评估。

[0086] 术语“胰腺内胚层”是指能够分化成多个胰腺谱系,包括胰腺β细胞,但不再能够分化成非胰腺谱系的内胚层来源细胞。

[0087] 如本文所用的术语“原肠管细胞”或“肠管细胞”是指从内胚层细胞分化并可以分化成SC-β细胞(例如胰腺β细胞)的细胞。原肠管细胞表达至少一种以下标记物:HNF1-β、HNF3-β或HNF4-α。原肠管细胞能够分化成包括肺、肝、胰腺、胃和肠细胞在内的细胞。HNF1-β和原肠管的其它标记物的表达可以通过技术人员已知的任何方法,例如免疫化学,例如使用抗-HNF1-β抗体评估。

[0088] 术语“胰腺祖细胞”、“胰腺内分泌祖细胞”、“胰腺前驱细胞”或“胰腺内分泌前驱细胞”在本文中可互换使用且是指能够变成能够形成胰腺内分泌细胞、胰腺外分泌细胞或胰管细胞的表达胰岛素的细胞的干细胞。这些细胞用于分化成至少一种类型胰腺细胞,例如产生胰岛素的β细胞;产生胰高血糖素的α细胞;产生生长抑素的δ细胞(或D细胞);和/或产生胰多肽的F细胞。此类细胞可以表达至少一种以下标记物:NGN3、NKX2.2、NeuroD、ISL-1、Pax4、Pax6或ARX。

[0089] 如本文所用,术语“pdx1阳性胰腺祖细胞”是指作为胰腺内胚层(PE)细胞,能够分化成例如胰腺β细胞等SC-β细胞的细胞。Pdx1阳性胰腺祖细胞表达标记物Pdx1。其它标记物包括(但不限于)Cdcp1或Ptfla或HNF6或NRX2.2。Pdx1的表达可以通过技术人员已知的任何方法,例如免疫化学,例如使用抗-Pdx1抗体或定量RT-PCR评估。

[0090] 如本文所用,术语“pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞”是指作为胰腺内胚层(PE)细胞,能够分化成例如胰腺β细胞等产生胰岛素的细胞的细胞。pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺

祖细胞表达标记物Pdx1和NKX6-1。其它标记物包括(但不限于)Cdcpl或Ptfla或HNF6或NRx2.2。NKX6-1的表达可以通过技术人员已知的任何方法,例如免疫化学,使用抗-NKX6-1抗体或定量RT-PCR评估。

[0091] 如本文所用,术语“Ngn3阳性内分泌祖细胞”是指表达转录因子神经元素-3(Ngn3)的胰腺内分泌细胞的前驱细胞。祖细胞比多潜能干细胞更加分化且仅仅可以分化成少数细胞类型。具体地说,Ngn3阳性内分泌祖细胞能够分化成五个胰腺内分泌细胞类型(α 、 β 、 δ 、 ϵ 和PP)。Ngn3的表达可以通过技术人员已知的任何方法,例如免疫化学,例如使用抗-Ngn3抗体或定量RT-PCR评估。

[0092] 术语“NeuroD”和“NeuroD1”可互换使用并鉴别在胰腺内分泌祖细胞中表达的蛋白质和其编码基因。

[0093] 术语“胰岛素阳性 β 样细胞”和“胰岛素阳性内分泌细胞”是指显示至少一种指示胰腺 β 细胞的标记物且还表达胰岛素但缺乏内源性 β 细胞的GSIS反应特征的细胞(例如胰腺内分泌细胞)。

[0094] “其前驱细胞”在该术语涉及胰岛素阳性内分泌细胞时是指当在适于前驱细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞的条件下培养时能够分化成胰岛素阳性内分泌细胞的任何细胞,包括例如多潜能干细胞、定形内胚层细胞、原肠管细胞、胰腺祖细胞或内分泌祖细胞。

[0095] 术语“干细胞衍生 β 细胞”、“SC- β 细胞”、“功能 β 细胞”、“功能胰腺 β 细胞”和“成熟SC- β 细胞”是指显示至少一种指示胰腺 β 细胞的标记物(例如PDX-1或NKX6-1),表达胰岛素,并显示表征内源性成熟 β 细胞的GSIS反应的细胞(例如胰腺 β 细胞)。在一些实施方案中,“SC- β 细胞”包含成熟胰腺 β 细胞。应了解所述SC- β 细胞无需衍生自(例如直接)干细胞,因为本公开的方法能够从任何胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞,使用任何细胞作为起始点衍生SC- β 细胞(例如可以使用胚胎干细胞、诱导性多潜能干细胞、祖细胞、部分重新编程体细胞(例如已经部分重新编程为诱导性多潜能干细胞与其来源于的体细胞之间的中间状态的体细胞)、多潜能细胞、全能细胞、任何上述细胞的分化转移型式等,因为本发明不意图以此方式限制)。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现对多次葡萄糖激发(例如至少一次、至少两次或至少三次或更多次连续葡萄糖激发)的反应。在一些实施方案中,反应类似于内源性胰岛(例如人类胰岛)对多次葡萄糖激发的反应。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞的形态类似于内源性 β 细胞的形态。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现类似于内源性 β 细胞的GSIS反应的体外GSIS反应。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现类似于内源性 β 细胞的GSIS反应的体内GSIS反应。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现类似于内源性 β 细胞的GSIS反应的体外与体内GSIS反应。所述SC- β 细胞的GSIS反应可以在SC- β 细胞移植至主体(例如人类或动物)两周内观测到。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞将胰岛素包装成分泌颗粒。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现囊封结晶胰岛素颗粒。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现大于1的刺激指数。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现大于1.1的刺激指数。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展现大于2的刺激指数。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞对细胞因子起反应而展现细胞因子诱发的细胞凋亡。在一些实施方案中,对已知的抗糖尿病药物(例如促分泌素)起反应,胰岛素从SC- β 细胞的分泌得到增强。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞为单激素的。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞不反常地共同表达其它激素,例如胰高血糖素、生长激素抑制素或胰多肽。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞展

现低复制速率。在一些实施方案中,所述SC-β细胞对葡萄糖起反应而增加细胞内Ca²⁺。

[0096] 如本文所用,术语“外分泌细胞”是指外分泌腺,即经由管排出其分泌物的腺体的细胞。在具体的实施方案中,外分泌细胞是指胰腺外分泌细胞,其为产生分泌至小肠中的酶的胰腺细胞。这些酶在食物通过胃肠道时帮助消化食物。胰腺外分泌细胞又名郎格罕氏岛(islets of Langerhans),分泌两种激素-胰岛素和胰高血糖素。胰腺外分泌细胞可以是若干细胞类型之一:α-2细胞(其产生激素胰高血糖素);或β细胞(其制造胰岛素);和α-1细胞(其产生调节因子生长抑素)。如本文所用,不产生胰岛素的外分泌细胞是指α-2细胞或α-1细胞。注意,术语胰腺外分泌细胞涵盖指产生分泌至血流中的激素(例如胰岛素(由β细胞产生)、胰高血糖素(由α-2细胞产生)、生长抑素(由δ细胞产生)和胰多肽(由F细胞产生))的胰腺细胞的“胰腺内分泌细胞”。

[0097] 如本文所用,术语“产生胰岛素的细胞”是指从胰腺祖细胞或其前驱细胞分化的分泌胰岛素的细胞。产生胰岛素的细胞包括胰腺β细胞(如该术语在本文中描述)以及以组成性或诱导性方式合成(即转录胰岛素基因、翻译胰岛素原mRNA和将胰岛素原mRNA修饰成胰岛素蛋白质)、表达(即显现胰岛素基因所携带的表型特性)或分泌(释放胰岛素至细胞间隙中)胰岛素的胰腺β样细胞(即胰岛素阳性内分泌细胞)。例如通过根据本发明的方法,使胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC-β细胞而产生的产生胰岛素的细胞群体可以是具有内源性β细胞特征的胰腺β细胞或β样细胞(例如具有至少一个或至少两个)特征的细胞并展现类似于内源性成年β细胞的GSIS反应。本发明组合物和方法的新颖性不因该群体中天然产生胰岛素的细胞(例如β细胞)的存在而遭到否定。还涵盖,例如通过如本文公开的方法产生的产生胰岛素的细胞群体可以包含成熟胰腺β细胞或SC-β细胞,且也可以含有不产生胰岛素的细胞(即除不产生或分泌胰岛素外,具有β细胞样表型的细胞)。

[0098] 如本文所用,术语“内源性β细胞”、“内源性成熟胰腺β细胞”或“内源性胰腺β细胞”是指胰腺的产生胰岛素的细胞或胰腺β细胞(β细胞)表型的细胞。胰腺β细胞的表型为本领域普通技术人员所熟知,并包括例如对葡萄糖水平的增加起反应而分泌胰岛素,表达例如c-肽、Pdx1多肽和Glut 2等标记物以及不同形态特征,例如在胰腺中的胰岛中体内组织,且通常具有约9-15μm直径的小纺锤体样细胞。

[0099] 如本文所用的术语“SC-β细胞”、“胰腺β样细胞”和“成熟胰腺β样”是指通过如本文所公开的方法产生,表达内源性胰腺β细胞表达的胰岛素的量的至少15%,或至少约20%或至少约30%,或至少约40%,或至少约50%,或至少约60%,或至少约70%,或至少约80%,或至少约90%,或至少约100%或大于100%,例如至少约1.5倍,或至少约2倍,或至少约2.5倍,或至少约3倍,或至少约4倍或至少约5倍或超过约5倍的内源性胰腺β细胞分泌的胰岛素的量,或展现至少一个或至少两个内源性胰腺β细胞的特征,例如(但不限于)对葡萄糖起反应而分泌胰岛素和表达例如c-肽、Pdx1和glut-2等β细胞标记物的细胞。在一个实施方案中,SC-β细胞不是永生化细胞(例如在培养物中无限增殖)。在一个实施方案中,SC-β细胞不是转化细胞,例如展现转化特性,例如在软琼脂中生长或缺乏接触抑制的细胞。

[0100] 术语“β细胞标记物”是指(不限于)在胰腺β细胞中特异性表达或存在的蛋白质、肽、核酸、蛋白质和核酸的多态现象、剪接变异体、蛋白质或核酸的片段、元件和其它分析物。示例性β细胞标记物包括(但不限于)胰腺和十二指肠同源框1(Pdx1)多肽、胰岛素、c-肽、胰淀素、E-钙黏着蛋白、Hnf3β、PC1/3、B2、Nkx2.2、NKX6-1、GLUT2、PC2、ZnT-8、Isl1、

Pax6、Pax4、NeuroD、Hnf1b、Hnf-6、Hnf-3 β 和MafA,以及Zhang等人,Diabetes.50(10):2231-6(2001)中描述的标记物。在一些实施方案中, β 细胞标记物是核3细胞标记物。在一些实施方案中, β 细胞标记物是Pdx1或PH3。

[0101] 术语“胰腺内分泌标记物”是指(不限于)在胰腺内分泌细胞中特异性表达或存在的蛋白质、肽、核酸、蛋白质和核酸的多态现象、剪接变异体、蛋白质或核酸的片段、元件和其它分析物。示例性胰腺内分泌细胞标记物包括(但不限于)Ngn-3、NeuroD和胰岛-1。

[0102] 如本文所用,术语“不产生胰岛素的细胞”意指组成性或通过诱导,非天然地合成、表达或分泌胰岛素的任何内胚层来源细胞。因此,如本文所用,术语“不产生胰岛素的细胞”排除胰腺 β 细胞。可以用于本发明的方法的不产生胰岛素的细胞的实例包括胰腺非 β 细胞,例如产生淀粉酶的细胞、腺泡细胞、导管腺癌细胞系的细胞(例如CD18、CD11和Capan-I细胞(参见Busik等人,1997;Schaffert等人1997))。也可以使用内胚层来源的非胰腺细胞,例如非胰腺干细胞和其它内分泌或外分泌器官的细胞,包括例如肝细胞、胸腺细胞、甲状腺细胞、肠细胞、肺细胞和垂体细胞。在一些实施方案中,非产生胰岛素的内胚层细胞可以是哺乳动物细胞或更确切地说,是人类细胞。本文提供使用哺乳动物胰腺非胰岛、产生胰淀粉酶的细胞、胰腺腺泡细胞的本发明方法的实例。

[0103] 术语“表型”是指在一组具体环境条件和因子下界定细胞或生物体的一种或大量总生物学特性,无论实际基因型如何。

[0104] 如本文所用,术语“多潜能”是指在不同的条件下能够分化成超过一种分化细胞类型,且优选分化成表征所有三个生殖细胞层的细胞类型的细胞。多潜能细胞的主要特征在于使用例如裸小鼠畸胎瘤形成分析,其能够分化成超过一种细胞类型,优选所有三个生殖层。还通过胚胎干细胞(ES)标记物的表达证明多潜能性,不过多潜能性的优选测试是证明分化成三个生殖层每一者的细胞的能力。应注意简单培养此类细胞不会主动地使其多潜能。重新编程多潜能细胞(例如iPS细胞(如该术语在本文中定义))还具有相对于一般仅仅能够在培养物中分裂有限次数的原代细胞母体,能够长期继代而不丧失生长潜能的特征。

[0105] 如本文所用,术语“iPS细胞”和“诱导性多潜能干细胞”可互换使用且是指从非多潜能细胞人工获得的多潜能干细胞(例如诱发或通过完全逆转),通常,成人体细胞,例如通过诱发一种或多种基因的强制性表达。

[0106] 术语“祖细胞”或“前驱细胞”在本文中可互换使用且是指具有相对于通过分化可以产生的细胞,更加原始(即处于发育通路或进展上比完全分化细胞更早的阶段)的细胞表型的细胞。常常,祖细胞还具有显著或很高的增殖潜能。祖细胞可以产生多种不同的分化细胞类型或单一分化细胞类型,取决于发育通路和细胞发育和分化的环境。

[0107] 如本文所用,术语“干细胞”是指能够增殖并产生能够产生大量可以反过来产生分化或可分化子细胞的母细胞的更多祖细胞的未分化细胞。子细胞本身可以被诱发以增殖和产生随后分化成一种或多种成熟细胞类型,同时还保留具有亲本发育潜能的一种或多种细胞的子代。术语“干细胞”是指具有在特定情形下分化成更专门化或分化表型的能力或潜能,并保留在某种情形下增殖而基本上不分化的能力的祖细胞子集。在一个实施方案中,术语干细胞一般是指通过分化,例如通过获得如胚细胞和组织的逐渐多样化中所存在的完全个别特征,后代(子代)常常在不同方向上专门化的天然存在的母细胞。细胞分化是一个通常发生在许多细胞分裂中的复杂过程。分化细胞可以来源于本身来源于多潜能细胞的多潜

能细胞等等。虽然这些多潜能细胞每一者可以视为干细胞,但每一细胞类型的范围可以相当大地改变。一些分化的细胞还具有产生具有更大发育潜能的细胞的能力。此类能力可以是天然的或可以在用各种因子处理时人工诱发。在许多生物情况下,干细胞也是“多潜能的”,因为其可以产生超过一种不同细胞类型的子代,但此非“干性”所需。自我更新是干细胞定义的另一个经典部分,且其如此文献中所用为不可或缺的。理论上,自我更新可以通过两种主要机制任一者发生。干细胞可以不对称地分裂,其中一个子代保留干细胞状态,且另一个子代表达一些不同的其它特定功能和表型。或者,群体中一些干细胞可以对称地分裂成两个干细胞,因此总体上维持群体中的一些干细胞,而群体中的其它细胞仅仅产生分化子代。形式上,开始呈干细胞的细胞可能向分化表型前进,但接着“逆转”和再表达干细胞表型,本领域的技术人员常常称为“去分化”或“重新编程”或“反向分化”的术语。如本文所用,术语“多潜能干细胞”包括胚胎干细胞、诱导性多潜能干细胞、胎盘干细胞等。

[0108] 在细胞个体发育的背景下,形容词“分化(differentiated)”或“分化(differentiating)”是意指“分化细胞”是比其正比较的细胞进展在更下游发育通路上的细胞的相对术语。因此,干细胞可以分化成谱系限制的前驱细胞(例如中胚层干细胞),其反过来可以分化成通路更下游的其它类型前驱细胞(例如心肌细胞前驱细胞),接着分化成末期分化细胞,末期分化细胞在某个组织类型中起特征性作用且可能保留或可能不保留进一步增殖的能力。

[0109] 术语“胚胎干细胞”用以指胚胎胚泡的内细胞群的多潜能干细胞(参见美国专利No.5,843,780、6,200,806)。此类细胞可以类似地从来源于体细胞核移植的胚泡内细胞群中获得(参见例如美国专利No.5,945,577、5,994,619、6,235,970)。胚胎干细胞的显著特征界定胚胎干细胞表型。因此,如果细胞具有胚胎干细胞的一个或多个独特特征,使得该细胞可能不同于其它细胞,那么其具有胚胎干细胞的表型。示例性显著胚胎干细胞特征包括(不限于)基因表达型态、增殖能力、分化能力、核型、对具体培养条件的反应性等等。

[0110] 术语“成年干细胞”或“ASC”用以是指来源于非胚性组织,包括胎儿、幼年和成年组织的任何多潜能干细胞。干细胞已经从多种成年组织分离,包括血液、骨髓、脑、嗅上皮、皮肤、胰腺、骨骼肌和心肌。这些干细胞每一者可以基于基因表达、因子反应性和在培养物中的形态表征。示例性成年干细胞包括神经干细胞、神经脊干细胞、间质干细胞、造血干细胞和胰腺干细胞。如上所指出,已经发现干细胞在实际上每个组织中都存在。因此,本发明了解干细胞群体可以与实际上任何动物组织分离。

[0111] 术语“胰腺”是指分泌消化酶和激素的腺器官。人类中,胰腺是约7英寸(17.8cm)长且1.5英寸(3.8cm)宽的微黄色器官。其位于胃下并连接到从胃下端(幽门)延伸至肛门的胃肠道的小肠肌肉软管样部分。大部分胰腺组织由葡萄样细胞簇组成,这些细胞产生通过共用的导管流入十二指肠的透明流体(胰液)以及来自肝的胆汁。胰液含有三个消化酶:类胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶,这些消化酶与肠酶一起,分别完成蛋白质、碳水化合物和脂肪的消化。散布在胰腺的产生酶的细胞中的是小组内分泌细胞,称为郎格罕氏岛,其分泌两种激素-胰岛素和胰高血糖素。胰岛含有几种类型细胞: α -2细胞,其产生激素胰高血糖素; β 细胞(本文中也称为“胰腺 β 细胞”),其制造胰岛素;和 α -1细胞,其产生调节因子生长抑素。这些激素直接被分泌至血流中,并一起调节血液中葡萄糖的水平。胰岛素降低血糖水平并增加肝中糖原(储存的碳水化合物)的量;胰高血糖素具有相反的作用。分泌胰岛素的细胞无法

正确地起作用会引起糖尿病或糖尿症。

[0112] 如本文所用,术语“重新编程”是指改变或逆转体细胞的分化状态的过程。细胞可以在重新编程前部分或者终末分化。重新编程涵盖体细胞至多潜能细胞的分化状态的完全逆转。分化的此类完全逆转产生诱导性多潜能(iPS)细胞。如本文所用,重新编程也涵盖细胞分化状态部分逆转至例如多潜能状态或至既非多潜能也非多潜能的体细胞,而是已经丧失其来源于的分化细胞的一种或多种特定特征的细胞,例如分化细胞直接重新编程为不同的体细胞类型。重新编程一般包括改变,例如逆转核酸修饰(例如甲基化)、染色质凝聚、表观遗传学改变、基因组印记等等在细胞分化期间当接合子发育成成人时存在的至少一些可遗传模式。

[0113] 如本文所用,术语“试剂”意指例如(但不限于)小分子、核酸、多肽、肽、药物、离子等任何化合物或物质。“试剂”可以是任何化学实体或部分,包括(不限于)合成和天然存在的蛋白质和非蛋白质实体。在一些实施方案中,试剂是核酸、核酸类似物、蛋白质、抗体、肽、适体、核酸寡聚物、氨基酸或碳水化合物,包括(不限于)蛋白质、寡核苷酸、核糖酶、DNA酶、糖蛋白、siRNA、脂蛋白、适体和修饰和其组合等等。在某些实施方案中,试剂是具有化学部分的小分子。举例来说,化学部分包括未经取代或经取代的烷基、芳族或杂环基部分,包括大环内酯、来普霉素和其相关天然产物或类似物。化合物可以已知具有所需活性和/或特性,或可以选自各种化合物的库。

[0114] 如本文所用,术语“接触”(即至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与 β 细胞成熟因子或 β 细胞成熟因子的组合接触)意图包括体外一起孵育 β 细胞成熟因子和细胞(例如添加 β 细胞成熟因子至培养物中的细胞)。在一些实施方案中,术语“接触”不意图包括细胞体内暴露于可能天然存在于受试者中的如本文公开的化合物(即暴露可以作为天然生理过程的结果出现)。如与SC- β 细胞产生相关的实施方案中至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与 β 细胞成熟因子接触的步骤可以用任何适合的方式进行。举例来说,细胞可以在贴壁培养物中或在悬浮培养物中处理。在一些实施方案中,细胞在促进细胞簇集的条件下处理。本公开涵盖促进细胞簇集的任何条件。促进细胞簇集的条件实例包括(不限于)在低贴壁组织培养板、旋转烧瓶、aggrewell板中悬浮培养。在一些实施方案中,本发明人已经注意到簇在含有10%血清的培养基中仍然是稳定的。在一些实施方案中,促进簇集的条件包括低血清培养基。

[0115] 应了解与 β 细胞成熟因子接触的细胞也可以同时或随后与例如生长因子或其它分化试剂或环境等另一试剂接触以稳定化细胞或进一步分化细胞。

[0116] 类似地,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞可以与至少一种 β 细胞成熟因子接触,接着与至少另一种 β 细胞成熟因子接触。在一些实施方案中,细胞与至少一种 β 细胞成熟因子接触,且接触暂时分开,且在一些实施方案中,细胞基本上同时与至少一种 β 细胞成熟因子接触。在一些实施方案中,细胞与至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或至少10种 β 细胞成熟因子接触。

[0117] 如本文中提及的术语“细胞培养基”(本文中又称为“培养基(culture medium/medium)”)为含有维持细胞存活力和支持增殖的养分的用于培养细胞的培养基。细胞培养基可以含有适当组合的以下任一者:盐、缓冲液、氨基酸、葡萄糖或其它糖、抗生素、血清或血清替代品和其它组分,例如肽生长因子等。通常用于特定细胞类型的细胞培养基为本领

域的技术人员已知。

[0118] 术语“细胞系”是指通常来源于单一祖先细胞或来源于祖先细胞的界定和/或基本上一致群体的大体上或基本上一致细胞群体。细胞系可以已经或能够维持于培养物长时间(例如数月、数年、无限时段)。其可以进行自发或诱导的转化过程,赋予这些细胞以无限的培养寿命。因而细胞系包括所有那些在本领域中公认的细胞系。应了解细胞随时间获得突变且可能表现遗传改变,使得细胞系个别细胞的至少一些特性可能彼此不一致。在一些实施方案中,细胞系包含本文中描述的SC-β细胞。

[0119] 术语“外源性”是指除天然来源以外的细胞或生物体中存在的物质。举例来说,术语“外源性核酸”或“外源性蛋白质”是指已经通过涉及人手的过程引入例如细胞或生物体等通常未发现其或发现其含量较低的生物系统中的核酸或蛋白质。如果一种物质引入遗传该物质的细胞或细胞祖先中,那么该物质将视为外源性的。相比之下,术语“内源性”是指生物系统天然物质。

[0120] 术语“表达”是指与产生RNA和蛋白质,且视情况而定,分泌蛋白质有关的细胞过程,包括(适用时)(但不限于)例如转录、翻译、折叠、修饰和加工。“表达产物”包括从基因转录的RNA和通过从基因转录的mRNA的翻译获得的多肽。

[0121] 如本文所用,术语“基因修饰”或“工程化”细胞是指外源性核酸已经通过涉及人手的过程引入的细胞(或已经遗传至少一部分核酸的此类细胞的后代)。核酸可能例如含有对细胞而言为外源性的序列,其可能含有天然序列(即在细胞中天然发现的序列)但排列非天然存在(例如编码区连接于来自不同基因的启动子)或天然序列的改变型式等等。核移植至细胞中的过程可以通过任何适合技术实现。适合技术包括磷酸钙或脂质介导的转染、电穿孔和使用病毒性载体的转导或感染。在一些实施方案中,聚核苷酸或其一部分并入细胞基因组中。随后核酸可以从基因组移除或切除,其条件是相对于未修饰但在其它方面相等的细胞,此类移除或切除在细胞中产生可检测的改变。应了解该术语基因修饰意图包括经修饰的RNA直接引入细胞中(例如合成的经修饰的RNA)。此类合成的经修饰的RNA包括防止被核酸内切酶和核酸外切酶快速降解和避免或减少细胞对RNA的先天免疫或干扰素反应的修饰。修饰包括(但不限于)例如(a)末端修饰,例如5'末端修饰(磷酸化、脱磷酸化、缀合、反向键等)、3'末端修饰(结合、DNA核苷酸、反向键等);(b)碱基修饰,例如被修饰碱基替换、使碱基稳定、使碱基不稳定或与搭配物的扩展谱系进行碱基配对的碱基或缀合碱基;(c)糖修饰(例如在2'位置或4'位置)或替换糖;以及(d)核苷间键修饰,包括修饰或替换磷酸二酯键。在此类修饰干扰翻译的程度上(即在兔网织红细胞体外翻译分析中,相对于缺乏修饰,翻译减少50%或更多),修饰不适于本文中描述的方法和组合物。在一些实施方案中,SC-β细胞经基因修饰以表达神经元素3。在一些实施方案中,SC-β细胞的基因修饰包括引入编码神经元素3的合成的经修饰的mRNA。据信具有编码神经元素3的合成的经修饰的RNA的SC-β细胞的基因修饰增加胰岛素从细胞产生。预计任何产生胰岛素的细胞的此类基因修饰预计增加该细胞中的胰岛素产生。

[0122] 在一些方面,本公开提供一种SC-β细胞,其经基因修饰以在胰岛素基因座包括可检测的标记物。在一些实施方案中,SC-β细胞经修饰以用可检测的标记物替换胰岛素基因座的两个等位基因。在一些实施方案中,SC-β细胞经基因修饰以将可检测的标记物插入胰岛素基因座中,使得在对葡萄糖激发起反应时其在SC-β细胞中与胰岛素一起表达。在一些

实施方案中,SC-β细胞经基因修饰以将可检测的标记物插入胰岛素基因座中代替胰岛素,使得在对葡萄糖激发起反应时其在SC-β细胞中代替胰岛素表达。预期任何可检测的标记物可以插入胰岛素基因座中,包括例如编码荧光蛋白质(例如GFP)的核酸。本领域的技术人员将了解此类基因修饰的SC-β细胞可以用于各种筛选法,例如以通过分析对试剂起反应的可检测的标记物,鉴别刺激胰岛素表达和/或从β细胞分泌的试剂。举例来说,经基因修饰以替换两个等位基因的胰岛素基因(例如用GFP)的SC-β细胞可以与测试试剂接触且由于GFP表达而引起SC-β细胞发荧光的那些试剂视为能够活化β细胞中胰岛素基因表达的候选试剂。换句话说,可检测的标记物可以用作此类基因修饰的SC-β细胞中胰岛素表达的替代标记物。

[0123] 如本文所用,术语“一致性”是指两个或超过两个核酸或多肽的序列相同的程度。在评估窗口上,例如在相关序列的长度上相关序列与第二序列之间的一致性%可以通过比对序列,确定评估窗口内与一致残基相对、允许引入间隙以最大化一致性的残基(核苷酸或氨基酸)数目,除以该窗口内相关或第二序列(哪一个较大)的残基总数并乘以100来计算得到。当计算实现具体一致性%所需的一致残基数目时,分数四舍五入至最接近的整数。一致性%可以借助于本领域中已知的多种计算机程序计算。举例来说,例如BLAST2、BLASTN、BLASTP、Gapped BLAST等计算机程序产生比对并提供相关序列之间的一致性%。如Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877,1993中修改的Karlin和Altschul的演算法(Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA87:22264-22268,1990)并入Altschul等人(Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410,1990)的NBLAST和XBLAST程序。为获得间隙比对以进行比较,利用如Altschul(Altschul等人Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997)等人中所描述的Gapped BLAST。当利用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用相应程序的缺省参数。可以使用PAM250或BLOSUM62矩阵。用于执行BLAST分析的软件可经由国家生物技术资讯中心(the National Center for Biotechnology Information,NCBI)公开获得。这些程序参见具有URL万维网地址的网址:“ncbi.nlm.nih.gov”。在一特定实施方案中,一致性%是使用BLAST2计算,缺省参数如NCBI所提供。

[0124] 如本文所用,术语“分离”或“部分纯化”在核酸或多肽的情况下是指与如在天然来源中发现与该核酸或多肽一起存在和/或当被细胞表达时与该核酸或多肽一起存在或在分泌多肽的情况下分泌的至少一种其它组分(例如核酸或多肽)分离的核酸或多肽。化学上合成的核酸或多肽或使用体外转录/翻译合成的核酸或多肽视为“分离”。

[0125] 如本文所用,术语“分离细胞”是指已经从其中最初发现的生物体去除的细胞或此类细胞的后代。任选地,细胞已经离体培养,例如在其它细胞存在下培养。任选地,细胞随后引入第二生物体中或再引入其(或其后代细胞)分离的生物体中。

[0126] 如本文所用,关于分离的细胞群体的术语“分离的群体”是指已经从细胞的混合或异源群体去除和分离的细胞群体。在一些实施方案中,与细胞分离或富集的异源群体相比,分离群体是基本上纯的细胞群体。

[0127] 关于特定细胞群体,术语“基本上纯”是指关于构成总细胞群体的细胞,至少约75%、优选至少约85%、更优选至少约90%和最优选至少约95%纯的细胞群体。重作,关于SC-β细胞群体,术语“基本上纯”或“实质上纯化”是指含有少于约20%、更优选少于约15%、10%、8%、7%、最优选少于约5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的非SC-β细胞(如本文

中术语所定义)的细胞的细胞群体。在一些实施方案中,本发明涵盖扩展SC- β 细胞群体的方法,其中扩展的SC- β 细胞群体是基本上纯的SC- β 细胞群体。

[0128] 类似地,关于胰岛素阳性内分泌细胞的“基本上纯”或“实质上纯化”群体是指含有少于约20%、更优选地少于约15%、10%、8%、7%、最优选少于约5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的非胰岛素阳性内分泌细胞(如本文中术语所定义)的细胞的细胞群体。在一些实施方案中,本发明涵盖扩展胰岛素阳性内分泌细胞群体的方法,其中扩展的胰岛素阳性内分泌细胞群体是基本上纯的胰岛素阳性内分泌细胞群体。

[0129] 类似地,关于Ngn3阳性内分泌祖细胞的“基本上纯”或“实质上纯化”群体是指含有少于约20%、更优选地少于约15%、10%、8%、7%、最优选少于约5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的非Ngn3阳性内分泌祖细胞或其子代(如本文中术语所定义)的细胞的细胞群体。在一些实施方案中,本发明涵盖扩展Ngn3阳性内分泌祖细胞群体的方法,其中扩展的Ngn3阳性内分泌祖细胞群体是基本上纯的Ngn3阳性内分泌祖细胞群体。

[0130] 类似地,关于Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞的“基本上纯”或“实质上纯化”群体是指含有少于约20%、更优选地少于约15%、10%、8%、7%、最优选少于约5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的非Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞或其子代(如本文中术语所定义)的细胞的细胞群体。在一些实施方案中,本发明涵盖扩展Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体的方法,其中扩展的Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体是基本上纯的Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体。

[0131] 类似地,关于Pdx1阳性胰腺祖细胞的“基本上纯”或“实质上纯化”群体是指含有少于约20%、更优选地少于约15%、10%、8%、7%、最优选少于约5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的非Pdx1阳性胰腺祖细胞或其子代(如本文中术语所定义)的细胞的细胞群体。在一些实施方案中,本发明涵盖扩展Pdx1阳性胰腺祖细胞群体的方法,其中扩展的Pdx1阳性胰腺祖细胞群体是基本上纯的Pdx1阳性胰腺祖细胞群体。

[0132] 类似地,关于原肠管细胞的“基本上纯”或“实质上纯化”群体是指含有少于约20%、更优选地少于约15%、10%、8%、7%、最优选少于约5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的非原肠管细胞或其子代(如本文中术语所定义)的细胞的细胞群体。在一些实施方案中,本发明涵盖扩展原肠管细胞群体的方法,其中扩展的原肠管细胞群体是基本上纯的原肠管细胞群体。

[0133] 类似地,关于定形内胚层细胞的“基本上纯”或“实质上纯化”群体是指含有少于约20%、更优选地少于约15%、10%、8%、7%、最优选少于约5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的非定形内胚层细胞或其子代(如本文中术语所定义)的细胞的细胞群体。在一些实施方案中,本发明涵盖扩展定形内胚层细胞群体的方法,其中扩展的定形内胚层细胞群体是基本上纯的定形内胚层细胞群体。

[0134] 类似地,关于多潜能细胞的“基本上纯”或“实质上纯化”群体是指含有少于约20%、更优选地少于约15%、10%、8%、7%、最优选少于约5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的非多潜能细胞或其子代(如本文中术语所定义)的细胞的细胞群体。在一些实施方案中,本发明涵盖扩展多潜能细胞群体的方法,其中扩展的多潜能细胞群体是基本上纯的多潜能细胞群体。

[0135] 术语“富集(enriching)”或“富集(enriched)”在本文中可互换使用并意指一种类

型细胞的产率(分数)比起始培养物或制剂中该类型细胞的分数增加至少10%。

[0136] 术语“更新”或“自我更新”或“增殖”在本文中可互换使用,用以指长期和/或多个月至多年,干细胞自身通过分裂成相同的非特化细胞类型而更新的能力。在一些情况下,增殖是指通过单细胞重复分裂成两个一致子细胞的细胞扩展。

[0137] 如本文所用,术语“谱系”描述具有共同的祖先的细胞或具有共同的发育命运的细胞。举例来说,在作为内胚层来源或作为“内胚层谱系”的细胞的背景下,此意指该细胞来源于内胚层细胞并可以沿着内胚层谱系限制通路,例如产生定形内胚层细胞,定形内胚层细胞反过来可以分化成肝细胞、胸腺、胰腺、肺和肠的一种或多种发育谱系通路分化。

[0138] 如本文所用,术语“异种”是指来源于不同物种的细胞。

[0139] 如本文所用,“标记物”用以描述细胞的特征和/或表型。标记物可以用于选择包含相关特征的细胞。标记物将随特定细胞而变。标记物是特征,无论是具体细胞类型的细胞的形态、功能或生物化学(酶)特征,还是被细胞类型表达的分子。优选地,此类标记物是蛋白质,且更优选地,具有抗体或本领域中可用的其它结合分子的抗原决定基。然而,标记物可以由在细胞中发现的任何分子组成,包括(但不限于)蛋白质(肽和多肽)、脂质、多糖、核酸和类固醇。形态特征或特性的实例包括(但不限于)形状、尺寸和核细胞质比率。功能特征或特性的实例包括(但不限于)粘附具体基质的能力、并入或排除具体染料的能力、在具体条件下迁移的能力和沿着具体谱系分化的能力。标记物可以通过本领域普通技术人员可用的任何方法检测。标记物也可以是缺乏形态特征或缺乏蛋白质、脂质等等。标记物可以是存在和缺少多肽的一组独特特征与其它形态特征的组合。

[0140] 术语“调节”与其在本领域中的使用一致地使用,即,意指引起或促进相关过程、通路或现象中的定性或定量变化、改变或改性。不限于,此类变化可以是该过程、通路或现象的不同组分或分支的相对强度或活性的增加、减少或变化。“调节剂”是引起或促进相关过程、通路或现象中的定性或定量变化、改变或改性的试剂。

[0141] 如本文所用,术语“DNA”定义为脱氧核糖核酸。

[0142] 术语“聚核苷酸”在本文中可与“核酸”互换使用以指示核苷聚合物。通常,本发明的聚核苷酸由DNA或RNA中天然发现的通过磷酸二酯键接合的核苷(例如腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)构成。然而,术语涵盖包含含有化学上或生物学上修饰碱基、修饰主链等的核苷或核苷类似物的分子,无论在天然存在的核酸中发现与否,且此类分子对于某些应用可能是优选的。在本申请提及聚核苷酸的情况下,应了解提供DNA、RNA和在各情况下单链和双链形式(和各单链分子的组分)。如本文所用,“聚核苷酸序列”可以指聚核苷酸物质本身和/或生物化学上表征特定核酸的序列信息(即用作碱基缩写的字母顺序)。除非另外指明,否则本文中呈现的聚核苷酸序列以5'至3'方向呈现。

[0143] 如本文所用,术语“多肽”是指氨基酸聚合物。术语“蛋白质”与“多肽”在本文中可互换使用。肽是相对较短的多肽,通常长度在约2与60个氨基酸之间。本文使用的多肽通常含有氨基酸,例如最常在蛋白质中发现的20种L-氨基酸。然而,可以使用本领域中已知的其它氨基酸和/或氨基酸类似物。多肽中的一个或多个氨基酸可以例如通过添加化学实体,例如碳水化合物基团、磷酸基、脂肪酸基团、用于缀合的连接子、官能化等等来修饰。具有共价或非共价缔合的非多肽部分的多肽仍然视为“多肽”。示例性修饰包括糖基化和棕榈酰

化。多肽可以从天然来源纯化,使用DNA重组技术产生,经由化学方法,例如常规固相肽合成等等合成。如本文所用,术语“多肽序列”可以指多肽物质本身和/或生物化学上表征多肽的序列信息(即用作氨基酸名称缩写的字母或三字母代码顺序)。除非另外指明,否则本文中呈现的多肽序列以N端至C端方向呈现。

[0144] 在提及多肽时术语“变异体”可以是例如与全长多肽至少80%、85%、90%、95%、98%或99%一致的多肽。变异体可以是全长多肽的片段。变异体可以是天然存在的剪接变异体。变异体可以是与多肽片段至少80%、85%、90%、95%、98%或99%一致的多肽,其中片段为全长野生型多肽或其具有相关活性,例如能够检测SC- β 细胞或SC- β 细胞来源于的胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的存在结构域的至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%长。在一些实施方案中,结构域为至少100、200、300或400个氨基酸长,从序列中的任何氨基酸位置开始并延伸至C端。优选避免本领域中已知消除或基本上减少蛋白质活性的变体。在一些实施方案中,变异体缺乏全长多肽的N和/或C端部分,例如每个末端缺乏多达10、20或50个氨基酸。在一些实施方案中,多肽具有成熟(全长)多肽的序列,此意指多肽在正常细胞内蛋白水解加工期间(例如在共同翻译或翻译后加工期间)去除例如信号肽等一个或多个部分。在其中不同于通过从天然表达其的细胞纯化而产生蛋白质的一些实施方案中,蛋白质是嵌合多肽,此意指其含有来自两个或超过两个不同物种的部分。在其中不同于通过从天然表达其的细胞纯化而产生蛋白质的一些实施方案中,蛋白质是衍生物,此意指蛋白质包含其它不与蛋白质相关的序列,只要那些序列基本上不降低蛋白质的生物活性即可。

[0145] 如本文所用,术语“功能片段”是一种多肽,其氨基酸序列的尺寸小于其作为片段的多肽,但基本上与该多肽同源,且其中功能片段多肽序列为其作为片段的多肽的约至少50%或60%或70%或80%或90%或100%或超过100%,例如1.5倍、2倍、3倍、4倍或超过4倍有效生物作用。功能片段多肽可以具有附加功能,所述附加功能可以包括抗原性减少、DNA结合增加(如转录因子中)或RNA结合改变(如调节RNA稳定性或降解作用中)。

[0146] 术语“载体”是指DNA序列可以插入以引入宿主细胞中的运载DNA分子。优选载体是能够自主复制和/或表达其连接的核酸的载体。能够指导其可操作地连接的基因的表达的载体在本文中称为“表达载体”。因此,“表达载体”是含有相关基因在宿主细胞中表达所需的必要调节区域的专门载体。在一些实施方案中,相关基因可操作地连接于载体中的另一序列。载体可以是病毒性载体或非病毒性载体。应使用病毒性载体,优选病毒性载体是有复制缺陷的,其可以例如通过去除编码复制的所有病毒核酸来实现。有复制缺陷的病毒性载体将仍然保留其感染特性并以与复制腺病毒载体类似的方式进入细胞,然而一旦进入细胞,则有复制缺陷的病毒性载体不复制或繁殖。载体还涵盖脂质体和纳米粒子和其它传递DNA分子至细胞的方式。

[0147] 术语“可操作地连接”意指表达编码序列所需的调节序列放于DNA分子中相对于编码序列适当的位置,以便实现编码序列的表达。此相同定义有时应用于表达载体中编码序列和转录控制元件(例如启动子、强化子和终止元件)的排列。术语“可操作地连接”包括在有待表达的聚核苷酸序列的前面具有适当的起始信号(例如ATG),和维持正确的阅读框架以允许在表达控制序列的控制下表达聚核苷酸序列,和产生聚核苷酸序列所编码的所需多肽。

[0148] 术语“病毒性载体”是指使用病毒或病毒相关载体作为核酸构建体至细胞中的运载体。构建体可以整合和包装至非复制有缺陷的病毒性基因组中,如腺病毒、腺病毒相关病毒(AAV)或单纯疱疹病毒(HSV)或其它用于感染或转导至细胞中的载体,包括逆转录病毒和慢病毒载体。载体可以并入或不并入细胞的基因组中。必要时,构建体可以包括用于转染的病毒序列。或者,构建体可以并入能够游离复制的载体,例如EPV和EBV载体中。

[0149] 术语“调节序列”和“启动子”在本文中可互换使用,且是指诱发或控制其可操作地连接的蛋白质编码序列的转录的核酸序列,例如起始信号、强化子和启动子。在一些实例中,重组基因的转录在控制重组基因在意图表达的细胞类型中表达的启动子序列(或其它转录调节序列)的控制下。还了解重组基因可以在与控制蛋白质的天然存在的形式的转录的那些序列相同或不同的转录调节序列的控制下。在一些情况下,启动子序列由引发特定基因转录所需要的细胞的合成机构,或引入的合成机构识别。

[0150] 如本文所用,术语“转录因子”是指使用DNA结合域结合于DNA特定部分并作为控制遗传信息从DNA转移(或转录)至RNA的系统一部分的蛋白质。如本文所用,“增殖(proliferating)”和“增殖(proliferation)”是指借助于细胞分裂,群体中非细胞数目增加(生长)。一般了解细胞增殖由对包括生长因子和其它有丝分裂原在内的环境起反应,多重信号转导通路的协调活化引起。细胞增殖也可以通过从细胞内或细胞外信号和阻断或负面影响细胞增殖的机制的作用释放来促进。

[0151] 术语“可选择标记物”是指当表达时,赋予细胞以可选择的表型,例如细胞毒性或细胞生长抑制剂的抗性(例如抗生素抗性)、营养原养型或可以用作区别表达蛋白质的细胞与不表达蛋白质的细胞的基础的具体蛋白质的表达的基因、RNA或蛋白质。表达可以容易地检测到的蛋白质,例如作用于底物以产生有色、荧光或发光物质的荧光或发光蛋白质或酶(“可检测标记物”)构成可选择标记物的子集。连接于通常在多潜能细胞中选择性或专门表达的基因天然的表达控制元件的可选择标记物的存在可鉴别并选择已经重新编程为多潜能状态的体细胞。可以使用多种可选择标记物基因,例如新霉素抗性基因(neo)、嘌呤霉素抗性基因(puro)、鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(gpt)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、腺苷脱氨酶(ada)、嘌呤霉素-N-转乙酰酶(PAC)、潮霉素抗性基因(hyg)、多药物抗性基因(mdr)、胸苷激酶(TK)、次黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HPRT)和hisD基因。可检测标记物包括绿色荧光蛋白质(GFP)、蓝色、青色、黄色、红色、橙色和青色荧光蛋白质和这些任一者的变异体。例如荧光素酶(例如萤火虫或海肾荧光素酶)等发光蛋白质也有用。如本领域技术人员显而易见,如本文所用,术语“可选择标记物”可指基因或基因表达产物,例如编码蛋白质。

[0152] 在一些实施方案中,相对于不表达可选择标记物或其表达水平显著较低的细胞,可选择标记物赋予表达其的细胞以增殖和/或存活优点。此类增殖和/或存活优点通常在细胞维持在一定条件,即“选择性条件”下时存在。为确保有效选择,细胞群体可以维持在使得细胞不表达标记物,不增殖和/或不存活并从群体消除,或其数目减少至仅仅群体的极少部分的条件下和历时足够如此的时段。通过维持细胞群体在选择性条件下选择表达赋予增殖和/或存活优点的标记物的细胞以便基本上或完全消除不表达标记物的细胞的方法在本文中称为“正向选择”,且标记物称为“适用于正向选择”。负向选择和适用于负向选择的标记物也是本文中描述的某些方法中相关的。相对于不表达标记物或以显著较低的水平表达标记物的细胞(或用另一方式考虑,不表达标记物的细胞相对于表达标记物的细胞具有增殖

和/或存活优点),此类标记物的表达赋予表达标记物的细胞以增殖和/或存活优点。因此当维持于选择性条件下足够时段时可以基本上或完全从细胞群体消除表达标记物的细胞。

[0153] 如本文所用,“报导基因”涵盖以遗传方式引入增加干细胞表型的细胞中的任何基因。如本发明中公开的报导基因意图涵盖荧光、发光、酶和抗性基因,而且也涵盖本领域的技术人员可以容易地检测的其它基因。在本发明的一些实施方案中,报导基因用作鉴别具体干细胞、心血管干细胞和其分化子代的标记物。报导基因一般可操作地连接于以取决于一个或多个通过测量报导基因的表达监测的条件的方式调节其表达的序列。在一些情况下,可以在活细胞中测定报导基因的表达。在使用活细胞报导基因分析的情况下,报导基因表达可以在多个时间点,例如2、3、4、5、6、8或10个或更多时间点监测。在一些情况下,在使用活细胞报导分析的情况下,以至少约10分钟至约24小时,例如20分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、18小时的频率或约10分钟至约24小时之间的任何整数的另一频率,监测报导基因表达。

[0154] 术语“受试者”和“个体”在本文中可互换使用,且是指动物,例如可以获得细胞和/或用如本文中描述的细胞治疗(包括预防性治疗)的人类。为治疗特定动物(例如人类受试者)特有的那些感染、病状或疾病病况,术语受试者是指该特定动物。如本文中可互换使用的“非人类动物”和“非人类哺乳动物”包括哺乳动物,例如大鼠、小鼠、兔、绵羊、猫、犬、牛、猪和非人类灵长类动物。术语“受试者”也涵盖任何脊椎动物,包括(但不限于)哺乳动物、爬行动物类、两栖动物和鱼。然而,有利地,受试者是哺乳动物,例如人类,或其它哺乳动物,例如家养哺乳动物,例如犬、猫、马等等,或生产哺乳动物,例如牛、绵羊、猪等等

[0155] 术语“糖尿病”与“糖尿症”在本文中可互换使用。世界卫生组织定义糖尿症的空腹血糖浓度的诊断值为7.0mmol/L(126mg/dl)和更高(全血6.1mmol/L或110mg/dl)、或11.1mmol/L或更高(200mg/dL或更高)的2小时葡萄糖水平。表明或指示糖尿症高风险的其它值包括140/90mm Hg或更高的升高动脉压;升高血浆甘油三酯(1.7mmol/L;150mg/dL)和/或低HDL-胆固醇(男性少于0.9mmol/L、35mg/dl;女性少于1.0mmol/L、39mg/dL);中心肥胖症(男性:腰臀比高于0.90;女性:腰臀比高于0.85)和/或体重指数超过30kg/m²;微白蛋白尿,其中尿白蛋白排泄率20μg/min或更高,或白蛋白:肌酐比率30mg/g或更高)。术语糖尿病涵盖所有形式糖尿病,例如I型、II型和1.5型。

[0156] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等等如应用于分离细胞时,包括使细胞经受任一种过程或条件或对细胞进行任一种操纵或程序。如应用于受试者,此类术语是指向个体提供医学或外科维护、护理或管理。个体通常生病或受伤,或患病风险相对于群体的平均成员增加,且需要此类维护、护理或管理。

[0157] 如本文所用,术语“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指向受试者施用有效量组合物,使得受试者减轻疾病的至少一种症状或改善疾病,例如有益或所需临床结果。为达成本发明的目的,有益或所需临床结果包括(但不限于)减轻一种或多种症状、降低疾病程度、稳定化(即不加重)疾病状态、延迟或减慢疾病进展、改善或缓和疾病病况和症状缓解(无论部分还是全部),无论可检测还是不可检测。治疗可指与未接收治疗下所预期的存活相比延长存活。因此,本领域技术人员认识到治疗可以改善疾病病状,但可能不完全治愈疾病。如本文所用,术语“治疗”包括预防。或者,如果疾病的进展减弱或停止,那么治疗是“有效的”。“治疗”也可以意指与未接收治疗下所预期之存活相比延长存活。需要治疗者包

括已经诊断患有心脏病的人,以及由于遗传感病性或例如体重、饮食和健康等其它因素可能出现心脏病状。

[0158] 如本文所用,术语“施用”、“引入”和“移植”在通过将引入的细胞至少部分定位在所需位点的方法或途径放置本发明的细胞(例如SC- β 细胞)至受试者中的背景下可互换使用。例如SC- β 细胞(例如胰腺 β 细胞或胰腺 β 样细胞)等细胞可以直接植入胰腺,或者通过传递至受试者中所需位置的任何适当途径施用,其中植入细胞或细胞组分的至少一部分仍然是活的。施用受试者后细胞的存活期可以短至数小时,例如二十四小时,至几天,至长达数年之久。在一些情况下,细胞也可以施用在非胰腺位置,例如肝中,或皮下施用,例如胶囊(例如微胶囊)中以维持植入细胞在植入位置并避免植入细胞迁移。

[0159] 如本文所用,短语“胃肠外施用(parenteral administration)”和“胃肠外施用(administered parenterally)”意指不同于肠和表面施用的施用模式,通常通过注射且包括(不限于)静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、荚膜下、蛛网膜下、脊柱内、脑脊髓内和胸骨内注射和输注。如本文所用,短语“全身性施用”、“全身施用”、“周围性施用”和“周围施用”意指施用心血管干细胞和/或其子代和/或除直接至中枢神经系统中以外的化合物和/或其它物质,使得其进入动物的系统并因此进行代谢和其它类似过程,例如皮下施用。

[0160] 术语“组织”是指一起执行某些特殊功能的特化细胞组或层。术语“组织特异性”是指来自特定组织的细胞来源。

[0161] 术语“降低”、“减少(reduced)”、“减少(reduction)”、“减少”或“抑制”在本文中一般都用以意指降低统计显著量。然而,为避免疑义,“减少(reduced)”、“减少(reduction)”或“降低(decrease)”或“抑制”意指与参考水平相比,降低至少10%,例如降低至少约20%,或至少约30%或至少约40%,或至少约50%,或至少约60%,或至少约70%,或至少约80%,或至少约90%多达且包括100%降低(即与参考样品相比缺乏水平)或与参考水平相比10-100%之间的任何降低。

[0162] 术语“增加(increased)”、“增加(increase)”或“增强”或“活化”在本文中都用以一般意指增加统计显著量;为避免任何疑义,术语“增加(increased)”、“增加(increase)”或“增强”或“活化”意指与参考水平相比,增加至少10%,例如增加至少约20%,或至少约30%或至少约40%,或至少约50%,或至少约60%,或至少约70%,或至少约80%,或至少约90%多达且包括100%增加或与参考水平相比10-100%之间的任何增加,或至少约2倍,或至少约3倍,或至少约4倍,或至少约5倍或至少约10倍增加,或与参考水平相比2倍与10倍之间或更大的任何增加。

[0163] 术语“统计显著”或“显著”是指统计显著性且一般意指低于标记物标准浓度的两个标准偏差(2SD)或更低。该术语是指存在差异的统计证据。其定义为当零假设实际上真实时拒绝虚无假设的决定的机率。该决定常常使用p值进行。

[0164] 如本文所用,术语“包含(comprising)”或“包含(comprises)”在提及对本发明来说必要的组合物、方法和其相应组分时使用,然而开放地包括未指明的要素,无论必要与否。

[0165] 如本文所用,术语“实质上由……组成”是指既定实施方案所需的那些要素。该术语允许存在本质上不影响本发明的该实施方案的基本和新颖或功能特性的额外要素。

[0166] 术语“由……组成”是指如本文中描述的组合物、方法和其相应组分,排除实施方案的描述中未叙述的任何要素。

[0167] 除非上下文另外清楚地规定,否则如本说明书和随附权利要求书中所用,单数“(a/an)”和“所述”包括复数个提及物。因此,举例而言,提及“所述方法”包括本文中描述和/或本领域的技术人员在阅读本公开后将显而易见的类型的一个或多个方法和/或步骤等等。

[0168] 干细胞

[0169] 干细胞是保留通过有丝分裂细胞分裂更新本身的能力并可以分化成各种特化细胞类型的细胞。两类广泛哺乳动物干细胞是:在胚泡中发现的胚胎干细胞(ES)和在成人组织中发现的成体干细胞。在发育胚胎中,干细胞可以分化成所有专门化胚胎组织。在成年生物体中,干细胞和祖细胞充当身体的修复系统,补充专门化细胞,而且还维持例如血液、皮肤或肠组织等再生器官的正常周转。多潜能干细胞可以分化成来源于三个生殖层中的任一者的细胞。

[0170] 虽然下文在提及干细胞产生SC- β 细胞(例如成熟胰腺 β 细胞或 β 样细胞)或其前驱细胞的用途时描述某些实施方案,但生殖细胞可以代替干细胞或用干细胞代替,以使用与本文中描述的例示性方案类似的方案,提供至少一种SC- β 细胞。适合的生殖细胞可以例如由最后一次经期后约8-11周获取的人类胎儿物质中存在的原始生殖细胞制备。例示性生殖细胞制备方法描述于例如Shamblott等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:13726,1998和美国专利No.6,090,622中。

[0171] 具有实际上无尽复制能力和分化成大部分细胞类型的潜能的ES细胞,例如人类胚胎干细胞(hESC)或小鼠胚胎干细胞(mESC)原则上呈现无限的起始物质来产生用于临床疗法的分化细胞(<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2006report.htm>,2006)。ES细胞的一种可能应用是产生新的胰腺 β 细胞用于I型糖尿病的细胞代替治疗,通过首先由例如hESC产生内胚层,例如定形内胚层,接着定形内胚层进一步分化成至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞,接着至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞进一步分化成SC- β 细胞。

[0172] hESC细胞例如由Cowan等人(N Engl.J.Med.350:1353,2004)和Thomson等人(Science 282:1145,1998)描述;来自其它灵长类动物的胚胎干细胞,恒河猴干细胞(Thomson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA92:7844,1995)、狨猴干细胞(Thomson等人,Biol.Reprod.55:254,1996)和人类胚胎生殖(hEG)细胞(Shamblott等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA95:13726,1998)也可以用于本文公开的方法中。mESC例如由Tremml等人描述(Curr Protoc Stem Cell Biol.Chapter 1:Unit 1C.4,2008)。干细胞可以是例如单潜能、全能、多重潜能或多潜能。在一些实例中,能够产生作为至少一个胚层或所有三个胚层的衍生物的子代的任何灵长类动物来源的细胞都可以用于本文公开的方法中。

[0173] 在某些实例中,ES细胞可以例如如Cowan等人(N Engl.J.Med.350:1353,2004)和美国专利No.5,843,780和Thomson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:7844,1995中所描述分离。举例来说,hESC细胞可以从人类胚泡细胞使用Thomson等人(美国专利No.6,200,806; Science282:1145,1998;Curr.Top.Dev.Biol.38:133ff.,1998)和Reubinoff等人,Nature

Biotech.18:399,2000描述的技术制备。与hESC同等的细胞类型包括其多潜能衍生物,例如原始外胚层样(EPL)细胞,如例如W001/51610(Bresagen)中概述。hESC也可以从人类植入前胚胎获得。或者,可以使用体外受精(IVF)胚胎,或单细胞人类胚胎可以扩展至胚泡阶段(Bongso等人,Hum Reprod 4:706,1989)。胚胎在G1.2和G2.2培养基中培养胚泡阶段(Gardner等人,Fertil.Steril.69:84,1998)。通过短暂暴露于链霉蛋白酶(Sigma)从发育胚泡去除透明带。内细胞块可以通过免疫外科分离,其中胚泡暴露于兔抗人类脾细胞抗血清的1:50稀释液30分钟,接着在DMEM中洗涤3次,历时5分钟,并暴露于天竺鼠补体(Gibco)的1:5稀释液3分钟(Solter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72:5099,1975)。在DMEM中进一步洗涤两次后,通过缓缓吸移,从完整内细胞群(ICM)去除溶解滋养外胚层细胞,并将ICM涂铺在mEF滋养层上。9至15天后,通过暴露于具有1mM EDTA的无钙和镁的磷酸盐缓冲盐水(PBS),通过暴露于分散酶或胰蛋白酶,或通过用微量吸液管机械解离,内细胞群衍生的产物可以解离成凝块;接着重新涂铺在mEF上新鲜培养基中。具有未分化形态的生长群落可以通过微量吸液管个别地选择,机械解离成凝块并重新涂铺。ES样形态特征在于具有表观高核质比率和突出核的致密群落。接着所得hESC可以按常规例如通过短暂胰酶消化、暴露于达伯克氏PBS(含有2mM EDTA)、暴露于IV型胶原酶(约200U/mL;Gibco)或通过利用微量吸液管选择个体群落每1-2周分裂。在一些实例中,约50至100个细胞的凝块尺寸最佳。mESC细胞可以使用例如Conner等人(Curr.Prot.in Mol.Biol.Unit 23.4,2003)描述的技术制备。

[0174] 胚胎干细胞可以与灵长类动物物种的成员的胚泡分离(美国专利No.5,843,780;Thomson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:7844,1995)。人类胚胎干细胞(hES)可以从人类胚泡细胞使用Thomson等人(美国专利No.6,200,806;Science 282:1145,1998;Curr.Top.Dev.Biol.38:133ff.,1998)和Reubinoff等人,Nature Biotech.18:399,2000描述的技术制备。与hES细胞同等的细胞类型包括其多潜能衍生物,例如原始外胚层样(EPL)细胞,如例如WO 01/51610(Bresagen)中概述。

[0175] 或者,在一些实施方案中,hES细胞可以从人类植入前胚胎获得。或者,可以使用体外受精(IVF)胚胎,或单细胞人类胚胎可以扩展至胚泡阶段(Bongso等人,Hum Reprod 4:706,1989)。胚胎在G1.2和G2.2培养基中培养胚泡阶段(Gardner等人,Fertil.Steril.69:84,1998)。通过短暂暴露于链霉蛋白酶(Sigma)从发育胚泡去除透明带。内细胞块可以通过免疫外科分离,其中胚泡暴露于兔抗人类脾细胞抗血清的1:50稀释液30分钟,接着在DMEM中洗涤3次,历时5分钟,并暴露于天竺鼠补体(Gibco)的1:5稀释液3分钟(Solter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72:5099,1975)。在DMEM中进一步洗涤两次后,通过缓缓吸移,从完整内细胞群(ICM)去除溶解滋养外胚层细胞,并将ICM涂铺在mEF滋养层上。

[0176] 9至15天后,通过暴露于具有1mM EDTA的无钙和镁的磷酸盐缓冲盐水(PBS),通过暴露于分散酶或胰蛋白酶,或通过用微量吸液管机械解离,内细胞群衍生的产物可以解离成凝块;接着重新涂铺在mEF上新鲜培养基中。具有未分化形态的生长群落可以通过微量吸液管个别地选择,机械解离成凝块并重新涂铺。ES样形态特征在于具有表观高核质比率和突出核的致密群落。所得ES细胞接着按常规例如通过短暂胰酶消化、暴露于达伯克氏PBS(含有2mM EDTA)、暴露于IV型胶原酶(约200U/mL;Gibco)或通过利用微量吸液管选择个体群落每1-2周分裂。约50至100个细胞的凝块尺寸最佳。

[0177] 在一些实施方案中,人类胚胎生殖(hEG)细胞是可以用于如本文公开的方法以分

化成原始内胚层细胞的多潜能干细胞。可以使用由在最后一次经期后约8-11周获取的人类胎儿物质中存在的原始生殖细胞制备的hEG细胞。适合的制备方法描述于例如Shamblott等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726, 1998和美国专利No. 6,090,622(其以引用的方式整体并入本文中)中。

[0178] 简单地说,生殖嵴加工形成解聚细胞。EG生长培养基是DMEM、4500mg/L D-葡萄糖、2200mg/L mM NaHCO₃; 15% ES合格胎牛血清(BRL); 2mM 麸酰胺酸(BRL); 1mM 丙酮酸钠(BRL); 1000-2000U/mL 人类重组白血病抑制因子(LIF, Genzyme); 1-2ng/mL 人类重组bFGF(Genzyme); 和10μM 毛喉素(forskolin)(10% DMSO中)。九十六孔组织培养板用在不含LIF、bFGF或毛喉素的用5000拉德γ照射失活的改性EG生长培养基中培养3天的亚汇合的喂养细胞层(例如STO细胞, ATCC No. CRL 1503)制备, 添加约0.2mL 原代生殖细胞(PGC)悬浮液至每一孔。第一继代在7-10天后在EG生长培养基中进行, 每一孔转移至预先用照射的STO小鼠成纤维细胞的制备的24孔培养皿的一个孔。每日替换培养基来培养细胞, 直至观测到与EG细胞一致的细胞形态, 通常在7-30天或1-4次继代后。

[0179] 在某些实例中, 在根据如本文公开的方法暴露于至少一种β细胞成熟因子之前干细胞可以未分化(例如不定型成特定谱系的细胞), 而在其它实例中, 可能需要在本文中描述的至少一种β细胞成熟因子暴露之前干细胞分化成一种或多种中间细胞类型。举例来说, 干细胞可以显示未分化细胞的形态、生物或物理特性, 这些特性可以用于将其与胚胎或成人来源的分化细胞区别。在一些实例中, 未分化细胞可能出现在具有高核/胞质比率和突出核仁的细胞群落中的微观二维空间中。干细胞可以是本身(例如基本上不存在任何未分化细胞)或可以在分化细胞存在下使用。在某些实例中, 干细胞可以在适合营养剂和任选其它细胞存在下培养, 使得干细胞可以生长和任选分化。举例来说, 胚胎成纤维细胞或成纤维细胞样细胞可以是存在于培养物中以帮助干细胞生长。成纤维细胞可以在干细胞生长一个阶段期间存在, 而非整个阶段都需存在。举例来说, 成纤维细胞可以在第一培养阶段添加至干细胞培养物中, 而非在一个或多个随后培养阶段中添加至干细胞培养物。

[0180] 用于本发明所有方面的干细胞可以是来源于任何种类组织(例如胚胎组织, 例如胎儿或前胎儿组织, 或成人组织)的细胞, 所述干细胞具有能够在适当条件下产生不同细胞类型子代, 例如所有3个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)至少一者的衍生物的特征。这些细胞类型可以呈确立细胞系形式提供, 或其可以直接从初级胚胎组织获得并立刻用于分化。包括NIH Human Embryonic Stem Cell Registry中列出的细胞, 例如hESBGN-01、hESBGN-02、hESBGN-03、hESBGN-04(BresaGen, Inc.); HES-1、HES-2、HES-3、HES-4、HES-5、HES-6(ES Cell International); Miz-hES1(MizMedi Hospital-Seoul National University); HSF-1、HSF-6(University of California, San Francisco); 和H1、H7、H9、H13、H14(Wisconsin Alumni Research Foundation(WiCell Research Institute))。在一些实施方案中, 用于化学上诱发分化成成熟、胰岛素阳性细胞的人类干细胞或多潜能干细胞的来源不涉及破坏人类胚胎。

[0181] 在另一个实施方案中, 干细胞可以与包括固体组织在内的组织分离。在一些实施方案中, 组织是皮肤、脂肪组织(例如脂肪组织)、肌肉组织、心脏或心脏组织。在其它实施方案中, 组织为例如(但不限于)脐带血、胎盘、骨髓或软骨。

[0182] 相关干细胞也包括各种类型的胚细胞, 例如Thomson等人(1998) *Science* 282:

1145描述的人类胚胎干(hES)细胞;来自其它灵长类动物的胚胎干细胞,例如恒河猴干细胞(Thomson等人(1995)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:7844);狨猴干细胞(Thomson等人(1996)Biol.Reprod.55:254);和人类胚胎生殖(hEG)细胞(Shambloft等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:13726,1998)。还相关的是谱系定向干细胞,例如中胚层干细胞和其它早期心脏发生细胞(参见Reyes等人(2001)Blood98:2615-2625;Eisenberg和Bader(1996)Circ Res.78(2):205-16等)。干细胞可以从任何哺乳动物物种,例如人类、马类、牛类、猪类、犬类、猫类、啮齿动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠)、灵长类动物等等获得。在一些实施方案中,对用于如本文公开的方法和组合物的多潜能细胞的来源,不破坏人类胚胎。

[0183] 当ES细胞未定型成特定分化谱系时,其视为未分化。此类细胞显示将其与胚胎或成人来源的分化细胞区别的形态特征。未分化的ES细胞容易由本领域的技术人员识别,且通常出现在具有高核/质比率和突出核仁的细胞群落中的微观二维空间中。未分化的ES细胞表达可以用作检测未分化细胞的存在标记物且多肽产物可以用作负向选择的标记物的基因。例如参见美国申请序列号2003/0224411A1;Bhattacharya(2004)Blood 103(8):2956-64;和Thomson(1998),上文,各以引用的方式并入本文中。人类ES细胞系表达表征未分化的非人类灵长类动物ES和人类EC细胞的细胞表面标记物,包括阶段特异性胚胎抗原(SSEA)-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81和碱性磷酸酶。载运SSEA-4抗原决定基的globo系列糖脂GL7通过添加唾液酸至载运SSEA-3抗原决定基的globo系列糖脂GbS形成。因此,GL7与SSEA-3和SSEA-4的抗体反应。未分化的人类ES细胞系不针对SSEA-1染色,但分化的细胞针对SSEA-1强烈染色。用于增殖未分化形式的hES细胞的方法描述于WO 99/20741、WO 01/51616和WO 03/020920中。

[0184] 来自内皮、肌肉和/或神经干细胞的适合来源的细胞混合物可以从哺乳动物供体通过本领域中已知的方法收获。一种适合的来源是造血微环境。举例来说,循环外周血,优选地,动员(即补充),可以从受试者去除。或者,骨髓可以从进行自体同源移植的哺乳动物,例如人类患者获得。在一些实施方案中,干细胞可以从受试者脂肪组织例如使用来自Cytori的CELUTION™ SYSTEM获得,如以引用的方式整体并入本文中的美国专利No.7,390,484和7,429,488中公开。

[0185] 在一些实施方案中,人类脐带血细胞(HUCBC)适用于如本文公开的方法中。人类UBC细胞被认为是造血和间质祖细胞的丰富来源(Broxmeyer等人,1992Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4109-4113)。先前,脐带和胎盘血视为在婴儿出生时通常抛弃的废弃物。脐带血细胞用作可移植干细胞和祖细胞的来源和用于治疗恶性疾病(即急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、脊髓发育不良综合征和成神经细胞瘤)和例如范康尼氏贫血症(Fanconi's anemia)和再生障碍性贫血等非恶性疾病的骨髓种植细胞的来源(Kohli-Kumar等人,1993Br.J.Haematol.85:419-422;Wagner等人,1992Blood 79:1874-1881;Lu等人,1996Crit.Rev.Oncol.Hematol 22:61-78;Lu等人,1995Cell Transplantation 4:493-503)。HUCBC的一个不同优点是这些细胞非常类似于胎儿细胞的未成熟免疫性,此显著降低主体排斥反应的风险(Taylor和Bryson,1985J.Immunol.134:1493-1497)。人类脐带血含有间质和造血祖细胞以及可以在组织培养物中扩展的内皮细胞前驱细胞(Broxmeyer等人,1992Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4109-4113;Kohli-Kumar等人,1993Br.J.Haematol.85:419-422;Wagner等人,1992Blood 79;

1874-1881;Lu等人,1996*Crit.Rev.Oncol.Hematol* 22:61-78;Lu等人,1995*Cell Transplantation* 4:493-503;Taylor&Bryson,1985*J.Immunol.*134:1493-1497Broxmeyer,1995*Transfusion* 35:694-702;Chen等人,2001*Stroke* 32:2682-2688;Nieda等人,1997*Br.J.Haematology*98:775-777;Erices等人,2000*Br.J.Haematology* 109:235-242)。脐带血中造血祖细胞的总含量等于或超过骨髓,且另外,HUCBC中高度增殖造血细胞是骨髓中的八倍且表达例如CD14、CD34和CD45等造血标记物(Sanchez-Ramos等人,2001*Exp.Neur.*171:109-115;Bicknese等人,2002*Cell Transplantation* 11:261-264;Lu等人,1993*J.Exp Med.*178:2089-2096)。

[0186] 在另一个实施方案中,多潜能细胞是例如循环外周血,优选来自外周血的单核部分、脐带血、骨髓、胎儿肝或哺乳动物卵黄囊的造血微环境中的细胞。干细胞,尤其神经干细胞,也可以来源于中枢神经系统,包括脑膜。

[0187] 在另一个实施方案中,多潜能细胞存在于胚状体中,通过用短暂蛋白酶消化并允许未分化人类ESC的小凝块在悬浮培养物中生长来收获ES细胞而形成。通过撤回条件培养基诱发分化。将所得胚状体涂铺至半固体基质上。可以在约7天至大概约4周后观测到分化细胞的形成。通过部分解离胚状体或类似结构以提供细胞团块,来选择来自干细胞体外培养的活分化细胞。使用基本上维持团块中细胞与细胞接触的方法,针对表型特征,选择包含相关细胞的团块。

[0188] 在一个替代实施方案中,干细胞可以是重新编程的干细胞,例如来源于体细胞或分化细胞的干细胞。在此类实施方案中,去分化的干细胞可以是例如(但不限于)赘生性细胞、肿瘤细胞和癌细胞或者选择性诱发的重新编程细胞,例如诱导性多潜能干细胞或iPS细胞。

[0189] 克隆和细胞培养

[0190] 可以用于本文中描述的技术的分子遗传学和基因工程的例示性方法可见于例如最新版*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, (Sambrook等人,Cold Spring Harbor);*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*(Miller&Calos编辑);及*Current Protocols in Molecular Biology*(F.M.Ausubel等人编辑,Wiley&Sons)。细胞生物学、蛋白质化学和抗体技术可见于例如*Current Protocols in Protein Science*(J.E.Colligan等人编辑,Wiley&Sons);*Current Protocols in Cell Biology*(J.S.Bonifacino等人,Wiley&Sons)和*Current protocols in Immunology*(J.E.Colligan等人编辑,Wiley&Sons.)中。例示性试剂、克隆载体和用于遗传操纵的试剂盒可以从例如BioRad、Stratagene、Invitrogen、ClonTech和Sigma-Aldrich Co.购得。

[0191] 适合细胞培养方法可见于例如一般描述于以下中的细胞培养方法:最新版*Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique*(R.I.Freshney编辑,Wiley&Sons);*General Techniques of Cell Culture*(M.A.Harrison及I.F.Rae,Cambridge Univ.Press)及*Embryonic Stem Cells:Methods and Protocols*(K.Turksen编辑,Humana Press)。适合组织培养供应品和试剂可以例如从Gibco/BRL、Nalgene-Nunc International、Sigma Chemical Co.和ICN Biomedicals.购得。

[0192] 多潜能干细胞可以由本领域技术人员并连续培养,使用促进增殖而不促进分化的培养条件繁殖。示例性含血清ES培养基用80%DMEM(例如Knock-Out DMEM,Gibco)、20%限

定胎牛血清(FBS,Hyclone)或者血清替代品(WO 98/30679)、1%非必需氨基酸、1mM L-谷氨酸盐和0.1mMβ-巯基乙醇制成。临用前,人类bFGF添加至4ng/mL(WO99/20741,Geron Corp.)。传统上,ES细胞在喂养细胞层上培养,通常来源于胚胎或胎儿组织的成纤维细胞。

[0193] Geron的科学家已经发现即使没有喂养细胞,多潜能SC也可以维持在未分化状态。无喂养细胞的培养物的环境包括适合培养基质,特别是细胞外基质,例如Matrigel®或层粘连蛋白。通常,在细胞变得完全分散前停止酶消化(即用静脉内胶原酶5分钟)。约10至2,000个细胞的凝块接着直接涂铺至基质上,不进一步分散。

[0194] 无喂养细胞的培养物由含有支持细胞增殖而非分化的因子的培养基支持。此类因子可以通过培养培养基与分泌此类因子的细胞(例如照射(约4,000拉德)初级小鼠胚胎成纤维细胞、端粒化小鼠成纤维细胞或来源于pPS细胞的成纤维细胞样细胞)来引入培养基中。培养基可以通过将喂养细胞以约 $5-6 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ 的密度涂铺在无血清培养基中例如补充有20%血清替代品和4ng/mL bFGF的KO DMEM来调节。已经调节1-2天的培养基补充以进一步的bFGF,并用于支持多潜能SC培养1-2天。无喂养细胞的培养法的特征进一步论述在国际专利公布WO 01/51616;和Xu等人,Nat.Biotechnol.19:971,2001。

[0195] 在显微镜下,ES细胞出现高核/质比率、突出核和致密群落形成,且不易辨别细胞连接。灵长类动物ES细胞表达阶段特异性的胚胎抗原(SSEA)3和4,且使用抗体可检测的标记物称为Tra-1-60和Tra-1-81(Thomson等人,Science 282:1145,1998)。小鼠ES细胞可以用作SSEA-1的阳性对照,并作为SSEA-4、Tra-1-60和Tra-1-81的阴性对照。SSEA-4一致存在于人类胚胎癌(hEC)细胞中。多潜能SC体外分化导致SSEA-4、Tra-1-60和Tra-1-81表达的丧失,并增加SSEA-1的表达(此也在未分化的hEG细胞上发现)。

[0196] 干细胞衍生β细胞(SC-β)

[0197] 在一些方面中,本公开提供一种干细胞衍生β细胞(SC-β)。本文所公开的SC-β细胞共享天然β细胞的许多显著特征,但在某些方面是不同的(例如基因表达概况)。在一些实施方案中,所述SC-β细胞非天然的。如本文所用,“非天然”意谓所述SC-β细胞与天然存在的β细胞,即天然β细胞在某些方面显著不同。然而,应了解这些显著不同通常与可能导致SC-β细胞展现某些功能不同的结构特征相关,例如虽然SC-β细胞的基因表达模式不同于天然β细胞,但SC-β细胞行为方式类似于天然β细胞,但与天然β细胞相比,某些功能可能改变(例如改善)。举例来说,如图2E中所示,与天然β细胞的频率相比,更高频率的SC-β细胞对20mM葡萄糖起反应。对于本领域技术人员来说,基于本文所公开的数据,将显而易见SC-β细胞与天然β细胞之间的其它不同。

[0198] 本公开的SC-β细胞共享许多对正常β细胞功能来说重要的β细胞的特征性特征。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现体外葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)反应。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现体内GSIS反应。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现体外和体内GSIS反应。在一些实施方案中,所述GSIS反应类似于内源性成熟胰腺β细胞的GSIS反应。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现对至少一次葡萄糖激发的GSIS反应。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现对至少两次连续葡萄糖激发的GSIS反应。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现对至少三次连续葡萄糖激发的GSIS反应。在一些实施方案中,所述GSIS反应类似于内源性人类胰岛对多次葡萄糖激发的GSIS反应。在一些实施方案中,所述GSIS反应在所述细胞移植至人类或动物后很快观测到。在一些实施方案中,所述GSIS反应在所述

细胞移植至人类或动物大约24小时内观测到。在一些实施方案中,所述GSIS反应在所述细胞移植至人类或动物大约一周内观测到。在一些实施方案中,所述GSIS反应在所述细胞移植至人类或动物大约2周内观测到。在一些实施方案中,表征为对高葡萄糖浓度起反应所分泌的胰岛素相比于低葡萄糖浓度时的比率的所述细胞的刺激指数类似于内源性成熟胰腺β细胞的刺激指数。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现大于1的刺激指数。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现大于或等于1的刺激指数。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现大于1.1的刺激指数。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现大于或等于1.1的刺激指数。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现大于2的刺激指数。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现大于或等于2的刺激指数。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现至少2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0或更大的刺激指数。

[0199] 在一些实施方案中,所述SC-β细胞对细胞因子起反应而展现细胞因子诱发的细胞凋亡。在一些实施方案中,所述SC-β细胞对选自以下组成的组的细胞因子起反应而展现细胞因子诱发的细胞凋亡:白细胞介素-1β(IL-β)、干扰素-γ(INF-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和其组合。

[0200] 在一些实施方案中,对已知的抗糖尿病药物(例如离体或体外作用于β细胞的抗糖尿病药物,和/或一般体内抗糖尿病药物)起反应,胰岛素从SC-β细胞的分泌得到增强。本公开涵盖任何已知的抗糖尿病药物。在一些实施方案中,对促分泌素起反应,胰岛素从SC-β细胞的分泌得到增强。在一些实施方案中,促分泌素选自以下组成的组:胰岛素模拟物、磺酰脲、氯茴苯酸和其组合。

[0201] 在一些实施方案中,所述SC-β细胞为单激素的。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现类似于内源性成熟胰腺β细胞的形态的形态。在一些实施方案中,所述SC-β细胞囊封结晶胰岛素颗粒。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现囊封的结晶胰岛素颗粒在电子显微镜下类似于内源性成熟胰腺β细胞的胰岛素颗粒。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现低复制速率。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现低复制速率。在一些实施方案中,对用催乳素处理起反应,所述SC-β细胞展现如通过针对C-肽和Ki67染色所测量的低但增加的复制速率。

[0202] 在一些实施方案中,所述SC-β细胞对葡萄糖起反应而增加细胞内Ca²⁺。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现类似于内源性成熟胰腺β细胞的葡萄糖刺激的Ca²⁺通量(GSCF)的GSCF。在一些实施方案中,所述SC-β细胞展现以类似于内源性成熟胰腺β细胞对多次葡萄糖激发的GSCF反应的方式的对至少三次连续葡萄糖激发的GSCF反应。

[0203] 在一些实施方案中,所述SC-β细胞表达至少一种选自以下组成的组的表征内源性成熟胰腺β细胞的标记物:胰岛素、C-肽、PDX1、MAFA、NKX6-1、PAX6、NEUROD1、葡萄糖激酶(GCK)、SLC2A1、PCSK1、KCNJ11、ABCC8、SLC30A8、SNAP25、RAB3A、GAD2和PTPRN。

[0204] 在一些实施方案中,所述SC-β细胞不表达至少一种选自以下组成的组的标记物(例如未由内源性成熟胰腺β细胞表达的标记物):a)由以下组成的组的激素:i)胰高血糖素(GCG),和ii)生长激素抑制素(SST);b)选自以下组成的腺泡细胞标记物:i)淀粉酶,和ii)羧肽酶A(CPA1);c)选自以下组成的组的α细胞标记物:i)GCG、Arx、Irx1和Irx2;d)选自以下组成的组的导管细胞标记物:i)CFTR和ii)Sox9。

[0205] 因为本发明不意图受SC-β细胞所来源于的起始细胞限制,所以SC-β细胞从任何起始细胞体外分化。示例性起始细胞包含(不限于)胰岛素阳性内分泌细胞或其任何前驱细胞,例如Nkx6-1阳性胰腺祖细胞、Pdx1阳性胰腺祖细胞和多潜能干细胞、胚胎干细胞和诱导性多潜能干细胞。在一些实施方案中,SC-β细胞从重新编程的细胞、部分重新编程的细胞(即体细胞,例如已经部分重新编程,使得其以介于诱导多潜能细胞与其所来源于的体细胞之间的中间态存在的成纤维细胞)、分化转移的细胞体外分化。在一些实施方案中,本文公开的SC-β细胞可以从胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞体外分化。在一些实施方案中,SC-β细胞从选自以下组成的组的前驱细胞体外分化:Nkx6-1阳性胰腺祖细胞、Pdx1阳性胰腺祖细胞和多潜能干细胞。在一些实施方案中,多潜能干细胞选自以下组成的组:胚胎干细胞及诱导性多潜能干细胞。在一些实施方案中,SC-β细胞或SC-β细胞所来源于的多潜能干细胞为人类的。在一些实施方案中,SC-β细胞为人类的。

[0206] 在一些实施方案中,SC-β细胞未进行基因修饰。在一些实施方案中,SC-β细胞获得其与在缺乏细胞基因修饰下天然β细胞共享的特征。在一些实施方案中,SC-β细胞进行基因修饰。

[0207] 在一些实施方案中,每个SC-β细胞产生的胰岛素为在高葡萄糖浓度下每1000个细胞每孵育30分钟(例如离体)至少0.5μIU。

[0208] 在一些实施方案中,每个SC-β细胞产生的胰岛素为在高葡萄糖浓度下每1000个细胞每孵育30分钟至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8或至少9μIU。在一些实施方案中,每个SC-β细胞产生的胰岛素为在高葡萄糖浓度下每1000个细胞每孵育30分钟0.5与10μIU之间。在一些实施方案中,每个SC-β细胞产生的胰岛素为在高葡萄糖浓度下每1000个细胞每孵育30分钟大约2.5μIU。

[0209] 在一些方面中,本公开提供包含本文所述的SC-β细胞的细胞系。在一些实施方案中,所述SC-β细胞稳定表达胰岛素。在一些实施方案中,所述SC-β细胞可冷冻,解冻,且扩增24小时至44小时的倍增时间,无显著形态改变直至至少30个继代。

[0210] 产生SC-β细胞

[0211] 本公开的方面涉及产生SC-β细胞(例如胰腺β细胞)。一般来说,至少一种SC-β细胞或其前驱细胞,例如根据本文公开的方法产生的胰腺祖细胞,可以包含不同细胞的混合物或组合,例如细胞的混合物,例如Pdx1阳性胰腺祖细胞、共表达Pdx1和NKX6-1的胰腺祖细胞、Ngn3阳性内分泌祖细胞、胰岛素阳性内分泌细胞(例如β样细胞)和胰岛素阳性内分泌细胞,和/或其它多潜能或干细胞。

[0212] 至少一种SC-β细胞或其前驱细胞可以根据使干细胞或多潜能细胞分化成所需分化阶段的任何适合培养方案产生。在一些实施方案中,至少一种SC-β细胞或其前驱细胞产生通过在适合至少一种多潜能细胞分化成至少一种SC-β细胞或其前驱细胞的条件下培养适合至少一种多潜能细胞达至少一种多潜能细胞分化成至少一种SC-β细胞或其前驱细胞的时间段。

[0213] 在一些实施方案中,至少一种SC-β细胞或其前驱细胞为基本上纯的SC-β细胞或其前驱细胞群体。在一些实施方案中,SC-β细胞或其前驱细胞群体包含多潜能细胞或分化细胞的混合物。在一些实施方案中,SC-β细胞或其前驱细胞群体基本上不含或缺乏胚胎干细胞或多潜能细胞或iPS细胞。

[0214] 在一些实施方案中,体细胞,例如成纤维细胞可以例如呈组织活检,例如皮肤活检从受试者分离,并重新编程成诱导性多潜能干细胞供进一步分化以产生至少一种SC-β细胞或其前驱细胞用于本文所述的组合物和方法中。在一些实施方案中,体细胞,例如成纤维细胞通过本领域技术人员已知的方法维持于培养物中,且在一些实施方案中,在通过如本文所公开的方法转变成SC-β细胞前繁殖。

[0215] 在一些实施方案中,至少一种SC-β细胞或其前驱细胞通过本领域技术人员已知的方法维持于培养物中,且在一些实施方案中,在通过如本文所公开的方法转变成SC-β细胞前繁殖。

[0216] 此外,至少一种SC-β细胞或其前驱细胞,例如胰腺祖细胞可来自任何哺乳动物物种,其中非限制性实例包括鼠类、牛类、猿类、猪类、马类、羊类或人类细胞。为求清楚和简单,本文中方法的描述指哺乳动物至少一种SC-β细胞或其前驱细胞,但应了解所有本文所述的方法容易应用于至少一种SC-β细胞或其前驱细胞的其它细胞类型。在一些实施方案中,至少一种SC-β细胞或其前驱细胞来源于人类个体。

[0217] 诱导多潜能干细胞分化成定形内胚层细胞

[0218] 本公开的方面涉及定形内胚层细胞。本文使用的定形内胚层细胞可以来源于任何来源或根据任何适合的方案产生。在一些方面中,多潜能干细胞,例如iPSC或hESC,分化成内胚层细胞。在一些方面中,内胚层细胞进一步分化成例如原肠管细胞、Pdx1阳性胰腺祖细胞、NKX6-1阳性胰腺祖细胞、Ngn3阳性内分泌祖细胞或胰岛素阳性内分泌细胞,接着诱导或成熟成SC-β细胞。

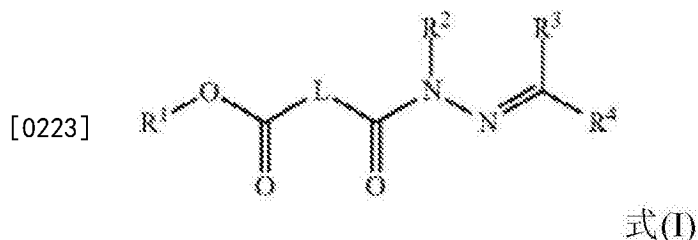
[0219] 在一些实施方案中,干细胞可以涂铺至新基质上或培养基可以交换以去除抑制分化的细胞外基质或可溶性因子。此有时被称为“定向分化法”,且笼统地描述于国际专利公布WO 01/51616和美国专利公布2002/0019046中,这些公布以引用的方式整体并入本文中。在定向分化法中常常优选以干细胞的无饲养层培养物开始,以避免由残余饲养层细胞引起的分化过程中的可能复杂化。另一个方法是将未分化的干细胞放在悬浮培养物中,此通常将引起干细胞形成分化与未分化细胞的聚集体。举例来说,干细胞可以通过简单胶原酶消化收获,解离成簇,并在非粘附细胞培养板中继代。聚集体可以每几天饲养,然后在适合时间,通常4-8天后收获。取决于所述条件,聚集体一般通过形成细胞类型的异质群体开始,包括相当大频率的内胚层细胞。聚集体接着可以分散并重新涂铺在例如层粘连蛋白或粘连蛋白等基质上用于分化过程中的下一个阶段;或在悬浮培养物中使用例如非粘附板和适合培养基继代。

[0220] 可以使用适合标记物,例如美国专利No.7,326,572中所列的标记物监测定向分化或在聚集体中分化的内胚层细胞存在情况。在一些优选实施方案中,可以使用例如Sox17等标记物监测分化的内胚层细胞存在情况。一旦获得足够内胚层群体,那么细胞就可以重新涂铺或以其它方式操作以开始另一个分化阶段。在某些情况下,如果细胞以微团簇保持(例如50至5,000细胞),那么可以增强分化或细胞维持。本公开所涵盖的其它分化阶段展示在图1中。

[0221] 在一些实施方案中,定形内胚层细胞通过使多潜能干细胞与如以引用的方式并入本文中的美国专利No.8,507,274(“274专利”)中所述的式(I)化合物接触(例如培养)来产生。如‘274专利中所述的式(I)化合物是可透过细胞的小分子,并可以通过调控信号转导通

路、基因表达或代谢来控制细胞过程,且已经有效地用于干细胞分化方案中。小分子可以大量且高纯度地合成,以及便利地供应或去除,使得其极有可能用于治疗学应用。已经执行高通量筛选以鉴别可以支持ES细胞自我更新(Chen等人,2006;Desbordes等人,2008)、小鼠ES细胞(Wu等人,2004)或神经祖细胞(Diamandis等人,2007)的心源性规定以及诱导特定细胞类型,特别是神经元和肌细胞(Ding和Schultz,2004评述)的新颖小分子。预期来自‘274专利的式(I)化合物可以用于使多潜能干细胞分化定形内胚层细胞。

[0222] 在一些实施方案中,来自‘274专利的式(I)化合物包含:



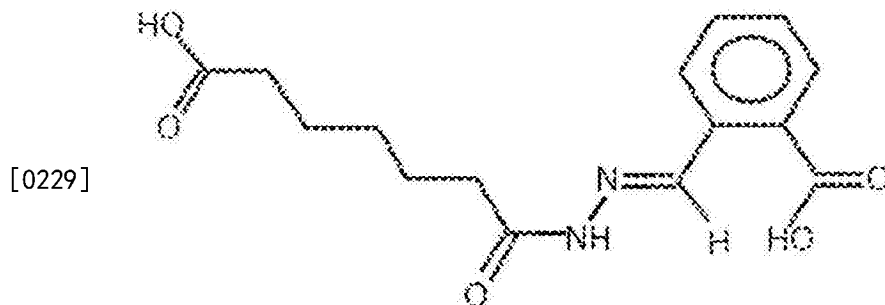
[0224] 其中:

[0225] R¹和R²独立地为H、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、环基或环基,其各自可以任选地经取代和/或可以在主链中被O、N、S、S(O)和C(O)中的一者或多者中断;

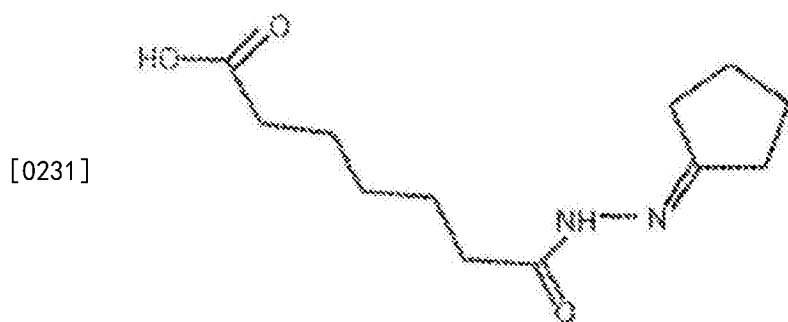
[0226] R³和R⁴独立地为H、卤素、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、杂芳基、环基或环基,其各自可以任选地经取代,或R³和R⁴连同其附接的碳一起形成杂环基的任选地取代的环基;和

[0227] L为C₁-C₁₀亚烷基、C₂-C₁₀亚烯基或C₂-C₁₀亚炔基,其各自可以任选地经取代和/或可以在主链中被O、N、S、S(O)和C(O)中的一者或多者中断。

[0228] 在一些实施方案中,来自‘274专利的式(I)化合物包含以下IDE1:



[0230] 在一些实施方案中,来自‘274专利的式(I)化合物包含以下IDE2:



[0232] ‘274专利描述了证实由此获得的定形内胚层细胞的身份的方法,以及用于分离、储存、扩大和进一步分化定形内胚层的方法,其都可以用于本文所述的组合物和方法,如本领域技术人员所了解。

[0233] 在一些实施方案中,定形内胚层细胞可以通过使群体中的至少一些多潜能细胞分化成定形内胚层细胞,例如通过使多潜能细胞群体与以下接触来获得:i)来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子,和ii)WNT信号传导通路活化剂,以诱导至少一些多潜能细胞分化成定形内胚层细胞,其中定形内胚层细胞表达表征定形内胚层的至少一种标记物。

[0234] 本公开涵盖来自TGF- β 超家族的任何生长因子的用途,其诱导多潜能干细胞分化成定形内胚层细胞(例如单独,或与WNT信号传导通路活化剂组合)。在一些实施方案中,来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子包含活化素A。在一些实施方案中,来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子包含生长分化因子8(GDF8)。

[0235] 本公开涵盖任何WNT信号传导通路活化剂的用途,其诱导多潜能干细胞分化成定形内胚层细胞(例如单独,或与来自TGF- β 超家族的生长因子组合)。在一些实施方案中,WNT信号传导通路活化剂包含CHIR99021。在一些实施方案中,WNT信号传导通路活化剂包含Wnt3a重组蛋白。

[0236] 本领域技术人员将了解所用试剂(例如生长因子)浓度可以变化。在一些实施方案中,使多潜能细胞与10ng/mL-1000ng/mL的浓度的来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子接触。在一些实施方案中,使多潜能细胞与100ng/mL的浓度的来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子接触。在一些实施方案中,使多潜能细胞与20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL或90ng/mL的浓度的来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子接触。在一些实施方案中,使多潜能细胞与91ng/mL、92ng/mL、93ng/mL、94ng/mL、95ng/mL、96ng/mL、97ng/mL、98ng/mL或99ng/mL的浓度的来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子接触。在一些实施方案中,使多潜能细胞与110ng/mL、120ng/mL、130ng/mL、140ng/mL、150ng/mL、160ng/mL、170ng/mL、180ng/mL或190ng/mL的浓度的来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子接触。在一些实施方案中,使多潜能细胞与101ng/mL、102ng/mL、103ng/mL、104ng/mL、105ng/mL、106ng/mL、107ng/mL、108ng/mL或109ng/mL的浓度的来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子接触。

[0237] 在一些实施方案中,使多潜能细胞与1.4 μ g/mL-140 μ g/mL之间的浓度的WNT信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使多潜能细胞与14 μ g/mL的浓度的WNT信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使多潜能细胞与2 μ g/mL、3 μ g/mL、4 μ g/mL、5 μ g/mL、6 μ g/mL、7 μ g/mL、8 μ g/mL、9 μ g/mL、10 μ g/mL、11 μ g/mL、12 μ g/mL或13 μ g/mL的浓度的WNT信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使多潜能细胞与15 μ g/mL、16 μ g/mL、17 μ g/mL、18 μ g/mL、19 μ g/mL、20 μ g/mL、21 μ g/mL、22 μ g/mL、23 μ g/mL、24 μ g/mL、25 μ g/mL、26 μ g/mL、27 μ g/mL、28 μ g/mL、29 μ g/mL或30 μ g/mL的浓度的WNT信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使多潜能细胞与13.1 μ g/mL、13.2 μ g/mL、13.3 μ g/mL、13.4 μ g/mL、13.5 μ g/mL、13.6 μ g/mL、13.7 μ g/mL、13.8 μ g/mL或13.9 μ g/mL的浓度的WNT信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使多潜能细胞与14.1 μ g/mL、14.2 μ g/mL、14.3 μ g/mL、14.4 μ g/mL、14.5 μ g/mL、14.6 μ g/mL、14.7 μ g/mL、14.8 μ g/mL或14.9 μ g/mL的浓度的WNT信号传导通路活化剂接触。

[0238] 一般来说,多潜能细胞维持于适合培养基(例如悬浮培养物)中达足以诱导至少一些多潜能细胞分化成定形内胚层细胞的时间段。示例性适合培养基展示在下表1中。

[0239] 表1

[0240]

试剂	量
MCDB131	1L
葡萄糖	0.44
NaHCO ₃	2.46g
FAF-BSA	20g
ITS-X	20uL
Glutamax	10mL
维生素C	0.044g
肝素	0g
P/S	10mL

[0241] 在一些实施方案中,用于使多潜能细胞分化成定形内胚层细胞的适合培养基包含S1培养基。

[0242] 在一些实施方案中,接触多潜能细胞在悬浮培养物中实现。在一些实施方案中,悬浮培养物维持于旋转瓶中。在一些实施方案中,所述时间段为3天。在一些实施方案中,在第一天将来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子和WNT信号传导通路活化剂加入所述悬浮培养物。在一些实施方案中,在第二天在悬浮培养物补充来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子。在一些实施方案中,在第二天不在悬浮培养物中补充WNT信号传导通路活化剂。在一些实施方案中,在第二天从悬浮培养物去除WNT信号传导通路活化剂。在一些实施方案中,在第二天在悬浮培养物中补充来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子,并在第二天从悬浮培养物去除或不在悬浮培养物中补充WNT信号传导通路活化剂。在一些实施方案中,在第三天在悬浮培养物中都不补充来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子或WNT信号传导通路活化剂。在一些实施方案中,在第三天从悬浮培养物去除来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子和WNT信号传导通路活化剂。

[0243] 所述方法能够诱导细胞群体中至少一种多潜能细胞分化成定形内胚层细胞。一般来说,使用本文所述的方法任何多潜能细胞都可以分化成定形内胚层细胞。在一些实施方案中,多潜能细胞包含诱导性多潜能干细胞。在一些实施方案中,多潜能细胞包含胚胎干细胞。在一些实施方案中,多潜能细胞包含人类细胞。

[0244] 在一些实施方案中,群体中的至少一些多潜能细胞分化成定形内胚层细胞通过以下过程获得:使多潜能细胞群体与以下接触:i)活化素A,和ii)CHIR99021,以诱导群体中至少一些多潜能细胞分化成定形内胚层细胞,其中定形内胚层细胞表达至少一种表征定形内胚层的标记物。

[0245] 用于产生定形内胚层细胞的其它方法为本领域中已知,包括例如G.Keller等人的美国申请公布US2006/0003446、K.D'Amour等人的US2006/0003313、K.D'Amour等人的US2005/0158853和Jon Odorico等人的US2005/0260749中所产生的方法,相关部分以引用的方式并入本文中。

[0246] 在一些实施方案中,通过如本文所公开的方法产生的定形内胚层细胞表达至少一种选自由以下组成的标记物:Nodal、Tmprss2、Tmem30b、St14、Spink3、Sh3gl2、Ripk4、Rab15、Npnt、Clic6、Cldn8、Cacna1b、Bnip1、Anxa4、Emb、FoxA1、Sox17和Rbm35a,其中在定形

内胚层细胞中,相对于其来源于的多潜能干细胞,至少一种标记物的表达上调达统计显著的量。在一些实施方案中,相对于其来源于的多潜能干细胞,通过如本文所公开的方法产生的定形内胚层细胞不表达统计显著的量的至少一种选自以下各者组成的组的标记物:Gata4、SPARC、AFP和Dab2。在一些实施方案中,相对于其来源于的多潜能干细胞,通过如本文所公开的方法产生的定形内胚层细胞不表达统计显著的量至少一种选自以下各者组成的组的标记物:Zic1、Pax6、Flk1和CD31。

[0247] 在一些实施方案中,通过如本文所公开的方法产生的定形内胚层细胞具有高水平的Smad2磷酸化,相对于其来源于的多潜能干细胞,达统计显著的量。在一些实施方案中,通过如本文所公开的方法产生的定形内胚层细胞能够在体内形成肠管。在一些实施方案中,通过如本文所公开的方法产生的定形内胚层细胞可以分化成具有表征肠细胞特征的形态的细胞,且其中具有表征肠细胞特征的形态的细胞表达FoxA2和/或Claudin6。在一些实施方案中,通过如本文所公开的方法产生的定形内胚层细胞可以进一步分化成内胚层来源的细胞。

[0248] 在一些实施方案中,在任何分化前或在分化第一阶段期间将多潜能干细胞群体在至少一种β细胞成熟因子存在下培养。可以使用任何多潜能干细胞,例如人类多潜能干细胞或人类iPS细胞或如本文所论述的任何多潜能干细胞或其它适合多潜能干细胞。在一些实施方案中,如本文所述的β细胞成熟因子可以存在于多潜能干细胞群体的培养基中或可以在多潜能干细胞群体生长(例如复制或繁殖)期间团块或定期加入。在某些实例中,多潜能干细胞群体可以在任何分化前暴露于至少一种β细胞成熟因子。在其它实例中,多潜能干细胞群体可以在分化第一阶段期间暴露于至少一种β细胞成熟因子。

[0249] 诱导定形内胚层细胞分化原肠管细胞

[0250] 本公开的方面涉及原肠管细胞。本文使用的原肠管细胞可以来源于任何来源或根据任何适合的方案产生。在一些方面中,定形内胚层细胞分化成原肠管细胞。在一些方面中,原肠管细胞进一步分化成例如Pdx1阳性胰腺祖细胞、NKX6-1阳性胰腺祖细胞、Ngn3阳性内分泌祖细胞、胰岛素阳性内分泌细胞,接着诱导或成熟成SC-β细胞。

[0251] 在一些实施方案中,原肠管细胞可以通过以下获得:使群体中至少一些定形内胚层细胞分化成原肠管细胞,例如通过使定形内胚层细胞与至少一种来自成纤维细胞生长因子(FGF)家族的生长因子接触,以诱导至少一些定形内胚层细胞分化成原肠管细胞,其中原肠管细胞表达至少一种表征原肠管细胞的标记物。

[0252] 本公开涵盖任何来自FGF家族的生长因子的用途,其诱导定形内胚层细胞分化成原肠管细胞(例如单独,或与其它因子组合)。在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含角化细胞生长因子(KGF)。在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含FGF2。在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含FGF8B。在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含FGF10。在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含FGF21。

[0253] 本领域技术人员将了解所用生长因子的浓度可以变化。在一些实施方案中,使定形内胚层细胞与5ng/mL-500ng/mL之间的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使定形内胚层细胞与10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL或40ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使

定形内胚层细胞与60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL或100ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使定形内胚层细胞与41ng/mL、42ng/mL、43ng/mL、44ng/mL、45ng/mL、46ng/mL、47ng/mL、48ng/mL或49ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使定形内胚层细胞与51ng/mL、52ng/mL、53ng/mL、54ng/mL、55ng/mL、56ng/mL、57ng/mL、58ng/mL或59ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使定形内胚层细胞与50ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。

[0254] 在一些实施方案中,在适合培养基中培养定形内胚层细胞。

[0255] 一般来说,定形内胚层细胞维持于适合培养基(例如悬浮培养物)中达足以诱导使至少一些定形内胚层细胞分化成原肠管细胞的时间段。示例性适合培养基展示在下表2中。

[0256] 表2

[0257]	试剂	量
	MCDB131	1L
	葡萄糖	0.44g
	NaHCO ₃	1.23g
	FAF-BSA	20g
	ITS-X	20uL
	Glutamax	10mL
	维生素 C	0.044g
	肝素	0g
	P/S	10mL

[0258] 在一些实施方案中,用于使定形内胚层细胞分化成原肠管细胞的适合培养基包含S2培养基。

[0259] 在一些实施方案中,接触定形内胚层细胞在悬浮培养物中实现。在一些实施方案中,悬浮培养物维持于旋转瓶中。在一些实施方案中,所述时间段在2天与5天之间。在一些实施方案中,所述时间段为3天。在一些实施方案中,每隔一天补充悬浮培养物。

[0260] 在一些实施方案中,定形内胚层细胞可以通过以下获得:使群体中至少一些定形内胚层细胞分化成原肠管细胞,例如通过使定形内胚层细胞与KGF接触,以诱导至少一些定形内胚层细胞分化成原肠管细胞,其中原肠管细胞表达至少一种表征定形内胚层的标记物。

[0261] 诱导原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞

[0262] 本公开的方面涉及Pdx1阳性胰腺祖细胞。本文中使用的Pdx1阳性胰腺祖细胞可以来源于任何来源或根据任何适合的方案产生。在一些方面中,原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞。在一些方面中,Pdx1阳性胰腺祖细胞进一步分化,例如NKX6-1阳性胰腺祖细胞、Ngn3阳性内分泌祖细胞、胰岛素阳性内分泌细胞,接着诱导或成熟成SC-β细胞。

[0263] 在一些方面中,Pdx1阳性胰腺祖细胞可以通过以下获得:群体中至少一些原肠管

细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞,例如通过使原肠管细胞与以下接触:i)至少一种骨形态生成蛋白(BMP)信号传导通路抑制剂,ii)至少一种来自FGF家族的生长因子,iii)至少一种SHH通路抑制剂,iv)至少一种视黄酸(RA)信号传导通路活化剂;和v)至少一种蛋白激酶C活化因子,以诱导至少一些原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞,其中Pdx1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1。

[0264] 本公开涵盖任何BMP信号传导通路抑制剂的用途,其诱导原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞(例如单独,或与至少一种来自FGF家族的生长因子、至少一种SHH通路抑制剂、至少一种视黄酸信号传导通路活化剂和至少一种蛋白激酶C活化因子中的任一者组合)。在一些实施方案中,BMP信号传导通路抑制剂包含LDN193189。

[0265] 本公开涵盖来自FGF家族的任何生长因子的用途,其诱导原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞(例如单独,或与至少一种BMP信号传导通路抑制剂、至少一种SHH通路抑制剂、至少一种视黄酸信号传导通路活化剂和至少一种蛋白激酶C活化剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含角化细胞生长因子(KGF)。在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子选自由以下组成的组:FGF2、FGF8B、FGF10和FGF21。

[0266] 本公开涵盖任何SHH通路抑制剂的用途,其诱导原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞(例如单独,或与至少一种BMP信号传导通路抑制剂、至少一种来自FGF家族的生长因子、至少一种视黄酸信号传导通路活化剂和至少一种蛋白激酶C活化剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,SHH通路抑制剂包含Sant1。

[0267] 本公开涵盖任何RA信号传导通路活化剂的用途,其诱导原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞(例如单独,或与至少一种BMP信号传导通路抑制剂、至少一种来自FGF家族的生长因子、至少一种SHH通路抑制剂和至少一种蛋白激酶C活化剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,RA信号传导通路活化剂包含视黄酸。

[0268] 本公开涵盖任何PKC活化剂的用途,其诱导原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞(例如单独,或与至少一种BMP信号传导通路抑制剂、至少一种来自FGF家族的生长因子、至少一种SHH通路抑制剂和至少一种RA信号传导通路活化剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,PKC活化剂包含PdbU。在一些实施方案中,PKC活化剂包含TPB。

[0269] 本领域技术人员将了解所用试剂(例如生长因子)的浓度可以变化。在一些实施方案中,使原肠管细胞与20nM-2000nM的浓度的BMP信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与3040nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM、100nM、110nM、120nM、130nM、140nM、150nM、160nM、170nM、180nM或190nM的浓度的BMP信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与191nM、192nM、193nM、194nM、195nM、196nM、197nM、198nM或199nM的浓度的BMP信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM、900nM、1000nM、1100nM、1200nM、1300nM、1400nM、1500nM、1600nM、1700nM、1800nM或1900nM的浓度的BMP信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与210nM、220nM、230nM、240nM、250nM、260nM、270nM、280nM或290nM的浓度的BMP信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与200nM的浓度的BMP信号传导通路抑制剂接触。

[0270] 在一些实施方案中,使原肠管细胞与5ng/mL-500ng/mL之间的浓度的至少一种来

自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL或40ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL或100ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与41ng/mL、42ng/mL、43ng/mL、44ng/mL、45ng/mL、46ng/mL、47ng/mL、48ng/mL或49ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与51ng/mL、52ng/mL、53ng/mL、54ng/mL、55ng/mL、56ng/mL、57ng/mL、58ng/mL或59ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与50ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。

[0271] 在一些实施方案中,使原肠管细胞与0.1 μ M与0.5 μ M之间的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与0.11 μ M、0.12 μ M、0.13 μ M、0.14 μ M、0.15 μ M、0.16 μ M、0.17 μ M、0.18 μ M、0.19 μ M、0.2 μ M、0.21 μ M、0.22 μ M、0.23 μ M或0.24 μ M的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与0.26 μ M、0.27 μ M、0.28 μ M、0.29 μ M、0.30 μ M、0.31 μ M、0.32 μ M、0.33 μ M、0.34 μ M、0.35 μ M、0.36 μ M、0.37 μ M、0.38 μ M、0.39 μ M、0.40 μ M、0.41 μ M、0.42 μ M、0.43 μ M、0.44 μ M、0.45 μ M、0.46 μ M、0.47 μ M、0.48 μ M、0.49 μ M的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与0.25 μ M的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。

[0272] 在一些实施方案中,使原肠管细胞与0.01 μ M–1.0 μ M之间的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与0.02 μ M、0.03 μ M、0.04 μ M、0.05 μ M、0.06 μ M、0.07 μ M、0.08 μ M或0.09 μ M的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与0.20 μ M、0.30 μ M、0.40 μ M、0.05 μ M、0.60 μ M、0.70 μ M、0.80 μ M或0.90 μ M的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与0.1 μ M的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。

[0273] 在一些实施方案中,使原肠管细胞与50nM–5000nM之间的浓度的PKC活化剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与100nM、150nM、200nM、250nM、300nM、350nM、400nM、450nM、460nM、470nM、480nM或490nM的浓度的PKC活化剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与491nM、492nM、493nM、494nM、495nM、496nM、497nM、498nM或499nM的浓度的PKC活化剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与600nM、700nM、800nM、900nM、1000nM、1100nM、1200nM、1300nM、1400nM、1500nM、1600nM、1700nM、1800nM、1900nM或2000nM的浓度的PKC活化剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与501nM、502nM、503nM、504nM、505nM、506nM、507nM、508nM或509nM、510nM、520nM、530nM、540nM、550nM、560nM、570nM、580nM或590nM的浓度的PKC活化剂接触。在一些实施方案中,使原肠管细胞与500nM的浓度的PKC活化剂接触。

[0274] 一般来说,原肠管细胞维持于适合培养基(例如悬浮培养物)中达足以诱导至少一些原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞的时间段。示例性适合培养基展示在下表3中。

[0275] 表3

[0276]

试剂	量
MCDB131	1L
葡萄糖	0.44g

NaHCO ₃	1.23
FAF-BSA	20g
ITS-X	5mL
Glutamax	10mL
维生素C	0.044g
肝素	0g
P/S	10mL

[0277] 在一些实施方案中,S3培养基可以用作原肠管细胞分化成胰腺祖细胞的适合培养基。

[0278] 在一些实施方案中,接触原肠管细胞在悬浮培养物中实现。在一些实施方案中,悬浮培养物维持于旋转瓶中。在一些实施方案中,所述时间段为至少2天。在一些实施方案中,每天补充悬浮培养物。

[0279] 在一些实施方案中,原肠管细胞可以通过以下获得:群体中至少一些原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞,例如通过使原肠管细胞与以下接触:i)LDN193189,ii)KGF,iii)Sant1,iv)RA,和iv)PdbU,以诱导至少一些原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞,其中Pdx1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1。

[0280] 诱导Pdx1阳性胰腺祖细胞分化NKX6-1+胰腺祖细胞

[0281] 本公开的方面涉及NKX6-1阳性胰腺祖细胞。本文中使用的NKX6-1阳性胰腺祖细胞可以来源于任何来源或根据任何适合的方案产生。在一些方面中,Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞。在一些方面中,NKX6-1阳性胰腺祖细胞进一步分化成例如Ngn3阳性内分泌祖细胞或胰岛素阳性内分泌细胞,接着诱导或成熟成SC-β细胞。

[0282] 在一些方面中,一种从Pdx1阳性胰腺祖细胞产生Nkx6-1阳性胰腺祖细胞的方法包括使包含Pdx1阳性胰腺祖细胞的细胞群体(例如在促进细胞簇集的条件下)与包含以下的至少两种β细胞成熟因子接触:a)至少一种来自成纤维细胞生长因子(FGF)家族的生长因子,b)索尼克刺猬通路抑制剂,和任选地c)低浓度视黄酸(RA)信号传导通路活化剂,历时至少五天时间,以诱导群体中的至少一种Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达NKX6-1。

[0283] 在一些实施方案中,Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞通过以下获得:使Pdx1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)至少一种来自FGF家族的生长因子,ii)至少一种SHH通路抑制剂,和任选地iii)低浓度的RA信号传导通路活化剂,历时五天的时间,以诱导至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1。

[0284] 在一些实施方案中,Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞通过以下获得:使Pdx1阳性胰腺祖细胞与以下接触:i)至少一种来自FGF家族的生长因子,ii)至少一种SHH通路抑制剂,和iii)RA信号传导通路活化剂,以诱导至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1。

[0285] 在一些实施方案中,Pdx1阳性胰腺祖细胞由多潜能细胞群体产生。在一些实施方案中,Pdx1阳性胰腺祖细胞由iPS细胞群体产生。在一些实施方案中,Pdx1阳性胰腺祖细胞由ESC细胞群体产生。在一些实施方案中,Pdx1阳性胰腺祖细胞由定形内胚层细胞群体产

生。在一些实施方案中，Pdx1阳性胰腺祖细胞由原肠管细胞群体产生。

[0286] 本公开涵盖来自FGF家族的任何生长因子的用途，其诱导Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞（例如单独，或与至少一种SHH通路抑制剂或任选地至少一种视黄酸信号传导通路活化剂中的任一者组合）。在一些实施方案中，至少一种来自FGF家族的生长因子包含角化细胞生长因子(KGF)。在一些实施方案中，至少一种来自FGF家族的生长因子选自由以下组成的组：FGF2、FGF8B、FGF10和FGF21。

[0287] 本公开涵盖任何SHH通路抑制剂的用途，其诱导Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞（例如单独，或与至少一种来自FGF家族的生长因子或至少一种视黄酸信号传导通路活化剂中的任一者组合）。在一些实施方案中，SHH通路抑制剂包含Sant1。

[0288] 本公开涵盖任何RA信号传导通路活化剂的用途，其诱导Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞（例如单独，或与至少一种来自FGF家族的生长因子和至少一种SHH通路抑制剂中的任一者组合）。在一些实施方案中，RA信号传导通路活化剂包含视黄酸。

[0289] 在一些实施方案中，所述方法包括使细胞群体（例如Pdx1阳性胰腺祖细胞）与至少一种其它β细胞成熟因子接触。在一些实施方案中，至少一种其它β细胞成熟因子包含至少一种来自EGF家族的生长因子。在一些实施方案中，所述方法包括使Pdx1阳性胰腺祖细胞与至少一种来自EGF家族的生长因子接触。本公开涵盖任何来自EGF家族的生长因子的用途，其促进Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞（例如与至少一种来自FGF家族的生长因子、至少一种SHH通路抑制剂和任选地至少一种RA信号传导通路活化剂中的任一者组合）。在一些实施方案中，至少一种来自EGF家族的生长因子包含β细胞素。在一些实施方案中，至少一种来自EGF家族的生长因子包含EGF。

[0290] 本领域技术人员将了解所用试剂（例如生长因子）的浓度可以变化。在一些实施方案中，使Pdx1阳性胰腺祖细胞与1ng/mL-100ng/mL之间的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中，使Pdx1阳性胰腺祖细胞与5ng/mL、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL或40ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中，使Pdx1阳性胰腺祖细胞与60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL或100ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中，使Pdx1阳性胰腺祖细胞与41ng/mL、42ng/mL、43ng/mL、44ng/mL、45ng/mL、46ng/mL、47ng/mL、48ng/mL或49ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中，使Pdx1阳性胰腺祖细胞与51ng/mL、52ng/mL、53ng/mL、54ng/mL、55ng/mL、56ng/mL、57ng/mL、58ng/mL或59ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中，使Pdx1阳性胰腺祖细胞与50ng/mL的浓度的至少一种来自FGF家族的生长因子接触。

[0291] 在一些实施方案中，使p Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.1μM与0.5μM之间的浓度的所述至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中，使Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.11μM、0.12μM、0.13μM、0.14μM、0.15μM、0.16μM、0.17μM、0.18μM、0.19μM、0.2μM、0.21μM、0.22μM、0.23μM或0.24μM的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中，使Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.26μM、0.27μM、0.28μM、0.29μM、0.30μM、0.31μM、0.32μM、0.33μM、0.34μM、0.35μM、0.36μM、0.37μM、0.38μM、0.39μM、0.40μM、0.41μM、0.42μM、0.43μM、0.44μM、0.45μM、0.46μM、0.47μM、0.48μM、0.49μM的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中，使Pdx1

阳性胰腺祖细胞与0.25 μ M的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。

[0292] 在一些实施方案中,使Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.01 μ M-1.0 μ M之间的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.02 μ M、0.03 μ M、0.04 μ M、0.05 μ M、0.06 μ M、0.07 μ M、0.08 μ M或0.09 μ M的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.20 μ M、0.30 μ M、0.40 μ M、0.05 μ M、0.60 μ M、0.70 μ M、0.80 μ M或0.90 μ M的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。

[0293] 在一些实施方案中,使Pdx1阳性胰腺祖细胞与2ng/mL-200ng/mL之间的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使Pdx1阳性胰腺祖细胞与3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、11ng/mL、12ng/mL、13ng/mL、14ng/mL、16ng/mL、17ng/mL、18ng/mL或19ng/mL的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使Pdx1阳性胰腺祖细胞与30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、45ng/mL、50ng/mL、55ng/mL、60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL或100ng/mL的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使Pdx1阳性胰腺祖细胞与21ng/mL、22ng/mL、23ng/mL、24ng/mL、25ng/mL、26ng/mL、27ng/mL、28ng/mL或29ng/mL的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使Pdx1阳性胰腺祖细胞与20ng/mL的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。

[0294] 一般来说,Pdx1阳性胰腺祖细胞维持于适合培养基中达足以诱导群体中至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞的时间段。示例性适合培养基展示在上表3中。在一些实施方案中,促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。在一些实施方案中,悬浮培养物维持于旋转瓶中。在一些实施方案中,所述时间段至少5天。在一些实施方案中,每隔一天补充悬浮培养物。在一些实施方案中,每隔一天补充 β 细胞成熟因子。

[0295] 在一些实施方案中,在所述5天期间蛋白激酶C活化剂未加入悬浮培养物中。在一些实施方案中,在所述5天前从所述悬浮培养物去除蛋白激酶C活化剂。在一些实施方案中,蛋白激酶C活化剂包含PdbU。在一些实施方案中,在所述5天期间BMP信号传导通路抑制剂未加入悬浮培养物中。在一些实施方案中,在所述5天前从所述悬浮培养物去除BMP信号传导通路抑制剂。在一些实施方案中,BMP信号传导通路抑制剂包含LDN193189。

[0296] 在一些实施方案中,所述群体中至少10%的Pdx1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞。在一些实施方案中,至少95%的Pdx1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞。

[0297] 一般来说,任何Pdx1阳性胰腺祖细胞可以分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞。在一些实施方案中,NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1、NKX6-1和/或FoxA2。

[0298] 在一些实施方案中,Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞通过以下获得:使Pdx1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)至少一种来自FGF家族的生长因子,ii)至少一种SHH通路抑制剂,和任选地iii)低浓度的RA信号传导通路活化剂,历时五天的时间,以诱导至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1。

[0299] 在一些实施方案中,NKX6-1阳性胰腺祖细胞可以通过以下获得:通过以下过程使至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞:每隔一天使Pdx1

阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触：i)至少一种来自FGF家族的生长因子，ii)至少一种SHH通路抑制剂，和任选地iii)RA信号传导通路活化剂，历时五天的时间，以诱导群体中至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞，其中NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1。

[0300] 在一些实施方案中，NKX6-1阳性胰腺祖细胞可以通过以下获得：使群体中至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞，例如通过使Pdx1阳性胰腺祖细胞与以下接触：i)至少一种来自FGF家族的生长因子，ii)至少一种SHH通路抑制剂，和任选地iii)RA信号传导通路活化剂，以诱导群体中至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞，其中NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1。

[0301] 诱导NKX6-1+胰腺祖细胞分化胰岛素+内分泌细胞

[0302] 本公开的方面涉及胰岛素阳性内分泌细胞。本文中使用的胰岛素阳性内分泌细胞可以来源于任何来源或根据任何适合的方案产生。在一些方面中，NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞。在一些方面中，胰岛素阳性内分泌细胞例如通过诱导或突变成SC- β 细胞而进一步分化。

[0303] 在一些方面中，一种由NKX6-1阳性胰腺祖细胞产生胰岛素阳性内分泌细胞的方法包括使包含NKX6-1阳性胰腺祖细胞的细胞群体(例如在促进细胞簇集的条件下)与包含以下的至少两种 β 细胞成熟因子接触：a)TGF- β 信号传导通路抑制剂，和b)甲状腺激素信号传导通路活化剂，以诱导群体中的至少一种NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞，其中胰岛素阳性胰腺祖细胞表达胰岛素。

[0304] 本公开涵盖任何TGF- β 信号传导通路抑制剂的用途，其诱导NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞(例如单独，或与其它 β 细胞成熟因子，例如甲状腺激素信号传导通路活化剂组合)。在一些实施方案中，TGF- β 信号传导通路包含TGF- β 受体I型激酶信号传导。在一些实施方案中，TGF- β 信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II。

[0305] 本公开涵盖任何甲状腺激素信号传导通路活化剂的用途，其诱导NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞(例如单独，或与其它 β 细胞成熟因子，例如TGF- β 信号传导通路抑制剂组合)。在一些实施方案中，甲状腺激素信号传导通路活化剂包含三碘甲状腺原氨酸(T3)。

[0306] 在一些实施方案中，所述方法包括使细胞群体(例如NKX6-1阳性胰腺祖细胞)与至少一种其它 β 细胞成熟因子接触。在一些实施方案中，所述方法包括使Pdx1阳性NKX6-1阳性胰腺祖细胞与以下中的至少一者接触：i)SHH通路抑制剂，ii)RA信号传导通路活化剂，iii) γ -分泌酶抑制剂，iv)至少一种来自表皮生长因子(EGF)家族的生长因子，和任选地v)蛋白激酶抑制剂。

[0307] 在一些实施方案中，至少一种其它 β 细胞成熟因子包含 γ -分泌酶抑制剂。本公开涵盖任何 γ -分泌酶抑制剂的用途，其能够诱导群体中NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞(例如单独，或与TGF- β 信号传导通路抑制剂和/或甲状腺激素信号传导通路活化剂中的任一者组合)。在一些实施方案中， γ -分泌酶抑制剂包含XXI。在一些实施方案中， γ -分泌酶抑制剂包含DAPT。

[0308] 在一些实施方案中，至少一种其它 β 细胞成熟因子包含至少一种来自EGF家族的生长因子。本公开涵盖任何来自EGF家族的生长因子的用途，其能够诱导群体中NKX6-1阳性胰

腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞(例如单独,或与TGF- β 信号传导通路抑制剂和/或甲状腺激素信号传导通路活化剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,至少一种来自EGF家族的生长因子包含 β 细胞素。在一些实施方案中,至少一种来自EGF家族的生长因子包含EGF。

[0309] 在一些实施方案中,至少一种其它 β 细胞成熟因子包含低浓度的视黄酸(RA)信号传导通路活化剂。本公开涵盖任何RA信号传导通路活化剂的用途,其诱导NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞(例如单独,或与TGF- β 信号传导通路抑制剂和/或甲状腺激素信号传导通路活化剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,RA信号传导通路活化剂包含RA。

[0310] 在一些实施方案中,至少一种其它 β 细胞成熟因子包含索尼克刺猬(SHH)通路抑制剂。本公开涵盖任何SHH通路抑制剂的用途,其诱导NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞(例如单独,或与TGF- β 信号传导通路抑制剂和/或甲状腺激素信号传导通路活化剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,SHH通路抑制剂包含Sant1。

[0311] 在一些实施方案中,将细胞群体(例如NKX6-1阳性胰腺祖细胞)暴露于葡萄糖。

[0312] 在一些实施方案中,细胞群体任选地与蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,细胞群体不与蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使细胞群体与蛋白激酶抑制剂接触。本公开涵盖任何蛋白激酶抑制剂的用途,其能够诱导群体中NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞(例如单独,或与TGF- β 信号传导通路抑制剂和/或甲状腺激素信号传导通路活化剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,蛋白激酶抑制剂包含十字孢碱。

[0313] 在一些实施方案中,胰岛素阳性内分泌细胞通过以下获得:使Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与以下接触:i)至少一种SHH通路抑制剂,ii)RA信号传导通路活化剂,iii) γ -分泌酶抑制剂,iv)TGF- β 信号传导通路抑制剂,v)TH信号传导通路活化剂,和vi)至少一种来自表皮生长因子(EGF)家族的生长因子,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞,其中Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素。

[0314] 本领域技术人员将了解所用试剂(例如生长因子)的浓度可以变化。

[0315] 在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与100nM-100 μ M之间的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与10 μ M的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与100nM、200nM、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM或900nM的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M或9 μ M的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与9.1 μ M、9.2 μ M、9.3 μ M、9.4 μ M、9.5 μ M、9.6 μ M、9.7 μ M、9.8 μ M或9.9 μ M的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与11 μ M、12 μ M、13 μ M、14 μ M、15 μ M、16 μ M、17 μ M、18 μ M或19 μ M的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与10.1 μ M、10.2 μ M、10.3 μ M、10.4 μ M、10.5 μ M、10.6 μ M、10.7 μ M、10.8 μ M或10.9 μ M的浓度的至少一

种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。

[0316] 在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与1 μ M的浓度的甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.2 μ M、0.3 μ M、0.4 μ M、0.5 μ M、0.6 μ M、0.7 μ M、0.8 μ M或0.9 μ M的浓度的甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M或1.9 μ M的浓度的 γ 甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M或9 μ M的浓度的甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。

[0317] 在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的 γ -分泌酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与1 μ M的浓度的 γ -分泌酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.2 μ M、0.3 μ M、0.4 μ M、0.5 μ M、0.6 μ M、0.7 μ M、0.8 μ M或0.9 μ M的浓度的 γ -分泌酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M或1.9 μ M的浓度的 γ -分泌酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M或9 μ M的浓度的 γ -分泌酶抑制剂接触。

[0318] 在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与2ng/mL-200ng/mL之间的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、11ng/mL、12ng/mL、13ng/mL、14ng/mL、16ng/mL、17ng/mL、18ng/mL或19ng/mL的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、45ng/mL、50ng/mL、55ng/mL、60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL或100ng/mL的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与21ng/mL、22ng/mL、23ng/mL、24ng/mL、25ng/mL、26ng/mL、27ng/mL、28ng/mL或29ng/mL的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与20ng/mL的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。

[0319] 在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.01 μ M-1.0 μ M之间的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.02 μ M、0.03 μ M、0.04 μ M、0.05 μ M、0.06 μ M、0.07 μ M、0.08 μ M或0.09 μ M的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.20 μ M、0.30 μ M、0.40 μ M、0.50 μ M、0.60 μ M、0.70 μ M、0.80 μ M或0.90 μ M的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M的浓度的RA信号传导通路活化剂接触。

[0320] 在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.01 μ M-1.0 μ M之间的浓度的低浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.02 μ M、0.03 μ M、0.04 μ M、0.05 μ M、0.06 μ M、0.07 μ M、0.08 μ M或0.09 μ M的浓度的低浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.20 μ M、0.30 μ M、0.40 μ M、0.50 μ M、0.60 μ M、0.70 μ M、0.80 μ M或0.90 μ M的浓度的低浓度的RA信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M的浓度的低浓度的RA信号传导通路

活化剂接触。

[0321] 在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M与0.5 μ M之间的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.11 μ M、0.12 μ M、0.13 μ M、0.14 μ M、0.15 μ M、0.16 μ M、0.17 μ M、0.18 μ M、0.19 μ M、0.2 μ M、0.21 μ M、0.22 μ M、0.23 μ M或0.24 μ M的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.26 μ M、0.27 μ M、0.28 μ M、0.29 μ M、0.30 μ M、0.31 μ M、0.32 μ M、0.33 μ M、0.34 μ M、0.35 μ M、0.36 μ M、0.37 μ M、0.38 μ M、0.39 μ M、0.40 μ M、0.41 μ M、0.42 μ M、0.43 μ M、0.44 μ M、0.45 μ M、0.46 μ M、0.47 μ M、0.48 μ M、0.49 μ M的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.25 μ M的浓度的至少一种SHH通路抑制剂接触。

[0322] 在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与10nM-1 μ M之间的浓度的蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与100nM的浓度的蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM或90nM的浓度的蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与110nM、120nM、130nM、140nM、150nM、160nM、170nM、180nM或190nM的浓度的蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与200nM、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM或900nM的浓度的蛋白激酶抑制剂接触。

[0323] 在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与1mM-50mM之间的浓度的葡萄糖接触。在一些实施方案中,使NKX6-1阳性胰腺祖细胞与25mM之间的浓度的葡萄糖接触。

[0324] 在一些实施方案中,胰岛素阳性内分泌细胞可以通过以下获得:通过以下过程使至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞:每隔一天使Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)TGF- β 信号传导通路抑制剂,b)TH信号传导通路活化剂,和任选地c)至少一种SHH通路抑制剂,ii)RA信号传导通路活化剂,iii) γ -分泌酶抑制剂,和vi)至少一种来自所述表皮生长因子(EGF)家族的生长因子,历时五天与七天之间的时间,以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞,其中Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafb、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素。

[0325] 在一些实施方案中,胰岛素阳性内分泌细胞可以通过以下获得:使群体中至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞,例如通过使Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与以下接触:i)至少一种SHH通路抑制剂,ii)RA信号传导通路活化剂,iii) γ -分泌酶抑制剂,iv)TGF- β 信号传导通路抑制剂,v)TH信号传导通路活化剂,和vi)至少一种来自所述表皮生长因子(EGF)家族的生长因子,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞,其中Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafb、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素。

[0326] 一般来说,细胞群体维持于适合培养基中达足以诱导群体中的至少一种NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞的时间段。示例性培养基展示在表4中。

[0327] 表4

[0328]

试剂	浓度
MCDB13	
1	1L
葡萄糖	3.6g
NaHCO ₃	1.754g
FAF-BSA	20g
ITS-X	5mL
Glutamax	10mL
维生素 C	0.044g
肝素	10mg
P/S	10mL

[0329] 在一些实施方案中, BE5培养基可以用作NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞的适合培养基。在一些实施方案中, 适合培养基展示在表5中。

[0330] 在一些实施方案中, 促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。在一些实施方案中, 所述时间段包含足以使共表达C-肽和Nkx6-1的细胞的数目达到最大的时间段。在一些实施方案中, 所述时间段至少5天。在一些实施方案中, 所述时间段在5天与7天之间。在一些实施方案中, 所述时间段至少7天。在一些实施方案中, 每天补充悬浮培养物(例如β细胞成熟因子)。在一些实施方案中, 5天与7天之间的时间段使共表达C-肽和Nkx6-1的细胞的数目达到最大。

[0331] 在一些实施方案中, 群体中至少15%的NKX6-1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成胰岛素阳性内分泌细胞。

[0332] 在一些实施方案中, 所述群体中至少99%的NKX6-1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成胰岛素阳性内分泌细胞。

[0333] 诱导胰岛素+内分泌细胞成熟成SC-β细胞

[0334] 本公开的方面涉及SC-β细胞。本文中使用的SC-β细胞可以来源于任何来源或根据任何适合的方案产生。在一些方面中, 胰岛素阳性内分泌细胞被诱导成熟成SC-β细胞。

[0335] 在一些方面中, 本公开提供一种从胰岛素阳性内分泌细胞产生成熟、葡萄糖反应性的β细胞的方法, 所述方法包括使包含胰岛素阳性内分泌细胞的细胞群体(例如在促进细胞簇集的条件下)与包含以下的至少两种β细胞成熟因子接触: a) 转化生长因子-β(TGF-β)信号传导通路抑制剂, b) 甲状腺激素(TH)信号传导通路活化剂, 以诱导所述群体中的至少一种胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC-β细胞。

[0336] 本公开的方面涉及产生在形式和功能上类似于内源性成熟β细胞, 但不同于天然β细胞的SC-β细胞。SC-β细胞可展现对至少一次葡萄糖激发的反应。在一些实施方案中, SC-β细胞展现对至少两次连续葡萄糖激发的反应。在一些实施方案中, SC-β细胞展现对至少三

次连续葡萄糖激发的反应。在一些实施方案中,SC-β细胞展现对多次(例如连续)葡萄糖激发的反应,类似于内源性人类胰岛对多次葡萄糖激发的反应。在一些实施方案中,SC-β细胞对两次连续葡萄糖激发起反应而能够释放或分泌胰岛素。在一些实施方案中,SC-β细胞对三次连续葡萄糖激发起反应而能够释放或分泌胰岛素。在一些实施方案中,SC-β细胞对四次连续葡萄糖激发起反应而能够释放或分泌胰岛素。在一些实施方案中,SC-β细胞对五次连续葡萄糖激发起反应而能够释放或分泌胰岛素。在一些实施方案中,SC-β细胞对不停的连续葡萄糖激发起反应而释放或分泌胰岛素。在一些实施方案中,如本文实施例中所述,可以分析细胞以通过确定其是否重复增加细胞内 Ca^{2+} ,来确定其是否对连续葡萄糖激发起反应。

[0337] 在一些实施方案中,SC-β细胞的形态类似于内源性β细胞的形态。在一些实施方案中,SC-β细胞展现体外葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)反应。在一些实施方案中,SC-β细胞展现体内GSIS反应。在一些实施方案中,SC-β细胞展现体外和体内GSIS反应。在一些实施方案中,体外和/或体外GSIS反应类似于内源性成熟β细胞的GSIS反应。在一些实施方案中,SC-β细胞展现类似于内源性β细胞的GSIS反应的体外(GSIS)反应。在一些实施方案中,SC-β细胞展现类似于内源性β细胞的GSIS反应的体内GSIS反应。在移植至人类或动物受试者后立即观测到GSIS反应。在一些实施方案中,在SC-β细胞移植至人类或动物受试者两周内观测到GSIS反应。在一些实施方案中,所述GSIS反应在SC-β细胞移植至人类或动物受试者两周内观测到。在一些实施方案中,在SC-β细胞移植至人类或动物受试者后3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或长达1年或更长时间观测到SC-β细胞的GSIS反应。

[0338] 在一些实施方案中,SC-β细胞显示成熟内源性胰腺β细胞的至少一种标记物。示例性标记物包含(不限于)Pdx1、HNF6、Ptf1a、Sox9、FoxA2、Nkx2.2、Ngn3和NKX6-1。在一些实施方案中,SC-β细胞中选自由HNF6、Ptf1a、Sox9、FoxA2、Nkx2.2、Ngn3,和NKX6-1组成的标记物的表达相对于SC-β细胞来源于的多潜能干细胞(例如胚胎干细胞或诱导多潜能细胞)以统计显著的量上调。

[0339] 本公开涵盖任何TGF-β信号传导通路抑制剂的用途,其诱导胰岛素阳性内分泌细胞分化和/或成熟成SC-β细胞(例如单独,或与至少一种甲状腺激素(TH)信号传导通路活化剂或任选地蛋白激酶抑制剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,TGF-β信号传导通路包含TGF-β受体I型激酶信号传导。在一些实施方案中,TGF-β信号传导通路抑制剂包含A1k5抑制剂II。

[0340] 本公开涵盖任何甲状腺激素信号传导通路活化剂的用途,其诱导胰岛素阳性内分泌细胞分化和/或成熟成SC-β细胞(例如单独,或与至少一种TGF-β信号传导通路抑制剂或任选地蛋白激酶抑制剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,甲状腺激素信号传导通路活化剂包含T3。

[0341] 在一些实施方案中,Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性细胞任选地与蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞不与蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与蛋白激酶抑制剂接触。本公开涵盖任何蛋白激酶抑制剂的用途,其诱导胰岛素阳性内分泌细胞分化和/或成熟成SC-β细胞(例如单独,或与至少一种TGF-β信号传导通路抑制剂,和/或

甲状腺激素信号传导通路活化剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,蛋白激酶抑制剂包含十字孢碱。

[0342] 在一些实施方案中,所述方法包括使细胞群体(例如胰岛素阳性内分泌细胞)与至少一种其它 β 细胞成熟因子接触。

[0343] 在一些实施方案中,至少一种其它 β 细胞成熟因子包含囊肿性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)抑制剂。在一些实施方案中,方法包括使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与CFTR抑制剂接触。本公开涵盖任何CFTR抑制剂的用途,其诱导胰岛素阳性内分泌细胞分化和/或成熟成SC- β 细胞(例如单独,或与至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂,和/或甲状腺激素信号传导通路活化剂,和任选地蛋白激酶抑制剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,CFTR抑制剂包含Gly-H101。

[0344] 在一些实施方案中,至少一种其它 β 细胞成熟因子包含O-GlcNAc酶抑制剂。在一些实施方案中,所述方法包括使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与O-GlcNAc酶抑制剂接触。本公开涵盖任何O-GlcNAc酶抑制剂的用途,其诱导胰岛素阳性内分泌细胞分化和/或成熟成SC- β 细胞(例如单独,或与至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂,和/或甲状腺激素信号传导通路活化剂,和任选地蛋白激酶抑制剂中的任一者组合)。在一些实施方案中,O-GlcNAc酶抑制剂包含Thiamet G。

[0345] 本领域技术人员将了解所用试剂(例如生长因子)的浓度可以变化。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与100nM-100 μ M之间的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与10 μ M的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与200nM、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM或900nM的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M或9 μ M的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与9.1 μ M、9.2 μ M、9.3 μ M、9.4 μ M、9.5 μ M、9.6 μ M、9.7 μ M、9.8 μ M或9.9 μ M的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与11 μ M、12 μ M、13 μ M、14 μ M、15 μ M、16 μ M、17 μ M、18 μ M或19 μ M的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与10.1 μ M、10.2 μ M、10.3 μ M、10.4 μ M、10.5 μ M、10.6 μ M、10.7 μ M、10.8 μ M或10.9 μ M的浓度的至少一种TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。

[0346] 在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与1 μ M的浓度的甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与0.2 μ M、0.3 μ M、0.4 μ M、0.5 μ M、0.6 μ M、0.7 μ M、0.8 μ M或0.9 μ M的浓度的甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M或1.9 μ M的浓度的 γ 甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M或9 μ M的浓度的甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。

[0347] 在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与10nM-1 μ M之间的浓度的蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与100nM的浓度的蛋白激酶抑制

剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM或90nM的浓度的蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与110nM、120nM、130nM、140nM、150nM、160nM、170nM、180nM或190nM的浓度的蛋白激酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使胰岛素阳性内分泌细胞与200nM、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM或900nM的浓度的蛋白激酶抑制剂接触。

[0348] 在一些实施方案中,使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与100nM-100 μ M之间的浓度的CFTR抑制剂接触。在一些实施方案中,使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与10nM-10 μ M之间的浓度的CFTR抑制剂接触。

[0349] 在一些实施方案中,使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与100nM-100 μ M的浓度的O-GlcNAc酶抑制剂接触。在一些实施方案中,使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与10nM-10 μ M的浓度的O-GlcNAc酶抑制剂接触。

[0350] 在一些实施方案中,SC- β 细胞可以通过以下获得:通过以下过程使至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC- β 细胞:每隔一天使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)转化生长因子 β (TGF- β)信号传导通路抑制剂,ii)甲状腺激素信号传导通路活化剂,和任选地iii)蛋白激酶抑制剂,历时七天与14天之间的时间,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞,其中SC- β 细胞展现体外和/或体内GSIS反应。在一些实施方案中,GSIS反应类似于内源性 β 细胞的GSIS反应。

[0351] 在一些实施方案中,SC- β 细胞可以通过以下获得:例如通过使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与以下接触,使群体中至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC- β 细胞:i)转化生长因子 β (TGF- β)信号传导通路抑制剂,ii)甲状腺激素信号传导通路活化剂,和任选地iii)蛋白激酶抑制剂,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性产生胰岛素的内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞,其中SC- β 细胞展现类似于内源性 β 细胞的GSIS反应的体外和/或体内GSIS反应。

[0352] 在一些方面中,本公开提供一种产生SC- β 细胞的方法,所述方法包括:使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)转化生长因子 β (TGF- β)信号传导通路抑制剂,ii)甲状腺激素信号传导通路活化剂,和任选地iii)蛋白激酶抑制剂,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞,其中SC- β 细胞展现体外和/或体内GSIS反应。在一些实施方案中,GSIS反应类似于内源性 β 细胞的GSIS反应。

[0353] 在一些方面中,本公开提供一种从多潜能细胞产生SC- β 细胞的方法,所述方法包括:a)使群体中的多潜能干细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞;b)通过以下过程使至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞:每隔一天使Pdx1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)至少一种来自FGF家族的生长因子,ii)至少一种SHH通路抑制剂,和任选地iii)RA信号传导通路活化剂,历时五天的时间,以诱导至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞所述群体中分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1;c)通过以下过程使至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞:每隔一天使Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)TGF- β 信号传导通路抑制剂,b)TH信

号传导通路活化剂,和任选地c)至少一种SHH通路抑制剂,ii)RA信号传导通路活化剂,iii) γ -分泌酶抑制剂,和vi)至少一种来自所述表皮生长因子(EGF)家族的生长因子,历时五天与七天之间的时间,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞,其中Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素;和d)通过以下过程使至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC- β 细胞:每隔一天使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)转化生长因子 β (TGF- β)信号传导通路抑制剂,ii)甲状腺激素信号传导通路活化剂,和任选地iii)蛋白激酶抑制剂,历时七天与14天之间的时间,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞,其中SC- β 细胞展现体外和/或体内GSIS反应。在一些实施方案中,所述GSIS反应类似于内源性成熟 β 细胞的GSIS反应。

[0354] 在一些方面中,本公开提供一种从多潜能细胞产生SC- β 细胞的方法,所述方法包括:a)使群体中的至少一些多潜能细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞;b)通过以下过程使至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞:每隔一天使Pdx1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)KGF,ii)Sant1,和任选地iii)低浓度的RA,历时五天的时间,以诱导所述群体中的至少一种Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1;c)通过以下过程使至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞:每隔一天使Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与以下接触:i)Alk5抑制剂II,ii)T3,和任选地iii)Sant1,iv)RA,v)XXI,和vi) β 细胞素,历时五天与七天之间的时间,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞,其中Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素;和d)通过以下过程使至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC- β 细胞:每隔一天使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)Alk5抑制剂II,ii)T3,和任选地iii)十字孢碱,历时七天与14天之间的时间,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰岛素产生内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞,其中所述SC- β 细胞展现类似于内源性 β 细胞的GSIS反应的体外和体内GSIS反应。

[0355] 一般来说,Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞维持于适合培养基中达足以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞的时间段。示例性适合培养基展示于以上表4和以下表5中。

[0356] 表5

[0357]

CMRL 胰 岛 培 养 基
("CMRLS")

CMRL 1066 补充
目录号 99-603-CV
Mediatech
补充 10% Hyclone
FBS

[0358] 在一些实施方案中,所述适合培养基包含Connought Medical Research Laboratories 1066补充的胰岛培养基(CMRLS)。在一些实施方案中,所述适合培养基包含CMRLS的组分(例如补充锌)。在一些实施方案中,所述适合培养基展示于表3中。在一些实施方案中,所述CMRLS补充有血清(例如人类)。在一些实施方案中,所述CMRLS补充有血清替代物(例如KOSR)。在一些实施方案中,所述CMRLS补充有胎牛血清。在一些实施方案中,所述CMRLS补充有10%胎牛血清。在一些实施方案中,用于胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC- β 细胞的适合培养基包含S3培养基。在一些实施方案中,促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。在一些实施方案中,所述时间段包含至少7天。在一些实施方案中,所述时间段包含7天与21天之间。在一些实施方案中,所述时间段包含7天与14天之间。在一些实施方案中,所述时间段包含10天与14天之间。在一些实施方案中,所述时间段包含14天。在一些实施方案中,每隔一天补充悬浮培养物(例如 β 细胞成熟因子)。

[0359] 在一些实施方案中,至少1%、至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%的Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞被诱导成熟成SC- β 细胞。在一些实施方案中,至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少99%的Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞被诱导成熟成SC- β 细胞。在一些实施方案中,至少30%的所产生的所述细胞包含SC- β 细胞。在一些实施方案中,所述SC- β 细胞表达C-肽、胰岛素、NKX6-1、Pdx1,且共表达NKX6-1和C-肽。

[0360] 在一些实施方案中,所述SC- β 细胞包含人类细胞。在一些实施方案中,SC- β 细胞的体外产生是可量的。

[0361] 分离的细胞群体

[0362] 本公开的方面涉及根据本文所述的方法产生的分离的细胞群体。在一些实施方案中,SC- β 细胞群体通过使至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与至少一种本文所述的 β 细胞成熟因子接触来产生。在一些实施方案中,SC- β 细胞群体通过使至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与至少两种本文所述的 β 细胞成熟因子接触来产生。在一些实施方案中,SC- β 细胞群体通过使至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与至少三种本文所述的 β 细胞成熟因子接触来产生。在一些实施方案中,SC- β 细胞群体通过使至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与至少四种本文所述的 β 细胞成熟因子接触来产生。在一些实施方案中,SC- β 细胞群体通过使至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细

胞与至少五种本文所述的 β 细胞成熟因子接触来产生。在一些实施方案中,SC- β 细胞群体通过使至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或至少十种本文所述的 β 细胞成熟因子接触来产生。

[0363] 在一些方面中,本公开提供一种分离的定形内胚层细胞群体。分离的定形内胚层细胞群体可以通过例如通过以下过程使群体中的至少一些多潜能细胞分化成定形内胚层细胞来获得:使多潜能细胞群体与以下接触:i)来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子,和ii)Wnt信号传导通路活化剂,以诱导群体中至少一些多潜能细胞分化成定形内胚层细胞,其中定形内胚层细胞表达表征定形内胚层的至少一种标记物。

[0364] 在一些方面中,本公开提供分离的群体原肠管细胞。分离的群体原肠管细胞可以通过以下获得:例如通过以下过程使群体中至少一些定形内胚层细胞分化原肠管细胞:使定形内胚层细胞与至少一种来自成纤维细胞生长因子(FGF)家族的生长因子接触,以诱导至少一些定形内胚层细胞分化成原肠管细胞,其中原肠管细胞表达至少一种标记物表征定形内胚层。

[0365] 在一些方面中,本公开提供分离的Pdx1阳性胰腺祖细胞群体。分离的Pdx1阳性胰腺祖细胞群体可以通过以下获得:例如通过以下过程使群体中至少一些原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞:使原肠管细胞与以下接触:i)至少一种骨形态生成蛋白(BMP)信号传导通路抑制剂,ii)至少一种来自FGF家族的生长因子,iii)至少一种SHH通路抑制剂,iv)至少一种视黄酸(RA)信号传导通路活化剂;和v)至少一种蛋白激酶C活化剂,以诱导至少一些原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞,其中Pdx1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1。

[0366] 在一些方面中,本公开提供一种分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体。分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体可以通过以下获得:例如通过以下过程使群体中至少一些Pdx1阳性胰腺祖细胞分化Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞:使Pdx1阳性胰腺祖细胞与以下接触:i)至少一种来自FGF家族的生长因子,ii)至少一种SHH通路抑制剂,和任选地iii)RA信号传导通路活化剂,以诱导群体中的至少一种Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1。

[0367] 在一些方面中,本公开提供一种分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体。分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体可以通过以下获得:例如通过以下过程使群体中至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞:使Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与以下接触:i)TGF- β)信号传导通路抑制剂,ii)TH信号传导通路活化剂,和任选地至少一种选自由以下组成的组的其它 β 细胞成熟因子:i)至少一种SHH通路抑制剂,ii)RA信号传导通路活化剂,iii) γ -分泌酶抑制剂,iv)和vi)至少一种来自表皮生长因子(EGF)家族的生长因子,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞,其中Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素。

[0368] 在一些方面中,本公开提供一种分离的SC- β 细胞群体。分离的SC- β 细胞群体可以通过以下获得:例如通过以下过程使群体至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC- β 细胞:使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与以下接触:i)转化生长因子 β (TGF- β)信号传导通路抑制剂,ii)甲状腺激素信号传导通路活化剂,和任选

地iii)蛋白激酶抑制剂,以诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞,其中SC- β 细胞展现体外和/或体内GSIS反应。在一些实施方案中,GSIS反应类似于内源性 β 细胞的GSIS反应。

[0369] 本公开的方面涉及包含本文中描述的分离的细胞(例如SC- β 细胞)群体的微胶囊。微胶囊为是本领域众所周知的。微胶囊的适合实例描述在文献中(例如Jahansouz等人,“Evolution of β -Cell Replacement Therapy in Diabetes Mellitus:Islet Cell Transplantation”Journal of Transplantation 2011;第2011卷,Article ID 247959;Orive等人,“Application of cell encapsulation for controlled delivery of biological therapeutics”,Advanced Drug Delivery Reviews(2013),<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.009>;Hernandez等人,“Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery”,Advanced Drug Delivery Reviews 2010; 62:711-730;Murua等人,“Cell microencapsulation technology:Towards clinical application”,Journal of Controlled Release 2008;132:76-83;以及Zanin等人,“The development of encapsulated cell technologies as therapies for neurological and sensory diseases”,Journal of Controlled Release 2012;160:3-13)。微胶囊可以用多种方式调配。示例性微胶囊包含由被外部海藻酸盐膜覆盖的聚阳离子层围绕的海藻酸盐核心。聚阳离子膜形成半透薄膜,其给予稳定性和生物相容性。聚阳离子的实例包括(不限于)聚-L-赖氨酸、聚-L-鸟氨酸、壳聚糖、乳糖改性壳聚糖和光聚合生物材料。在一些实施方案中,海藻酸盐核心被修饰,例如产生包含具有共价缀合的具有RGD序列(精氨酸、甘氨酸、天冬氨酸)的寡肽的海藻酸盐核心的骨架。在一些实施方案中,海藻酸盐核心被修饰,例如产生具有稳定性增强的化学酶性工程化海藻酸盐的共价增强的微胶囊。在一些实施方案中,海藻酸盐核心被修饰,例如产生通过丙烯酸酯官能化磷脂的就地聚合装配的膜模拟膜。在一些实施方案中,微胶囊由使用差向酶酶性修饰的海藻酸盐构成。在一些实施方案中,微胶囊包含微胶囊膜的相邻层之间的共价连接。在一些实施方案中,微胶囊包含含有与苯酚部分偶合的海藻酸盐的亚筛粒度胶囊。在一些实施方案中,微胶囊包含含有海藻酸盐-琼脂糖的骨架。在一些实施方案中,SC- β 细胞在囊封于海藻酸盐内前用PEG改性。在一些实施方案中,分离的细胞(例如SC- β 细胞)群体囊封在光反应性脂质体和海藻酸盐中。应了解用于微胶囊中的海藻酸盐可以用其它适合的生物材料置换,包括(不限于)PEG、壳聚糖、PES空心纤维、胶原蛋白、透明质酸、具有RGD的葡聚糖、EHD和PEGDA、PMBV和PVA、PGSAS、琼脂糖、具有明胶的琼脂糖、PLGA和这些材料的多层实施方案。

[0370] 在一些实施方案中,包含根据本文中描述的方法产生的细胞的群体的组合物也可以用作设计成能产生胰岛细胞的一种或多种内分泌多肽的机械装置中的功能组分。以其最简单形式,装置在防止细胞群体通过,将它们保留在装置中,但允许细胞群体分泌的胰岛素、胰高血糖素或生长抑素通过的半透薄膜后面含有胰腺 β -细胞群体(例如由胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的群体产生)。此包括微囊封的胰腺 β -细胞的群体,通常呈细胞簇形式以允许抑制去分化的细胞相互作用。举例来说,美国专利No.4,391,909描述囊封在球状半透薄膜中的胰岛细胞,所述半透薄膜由多糖聚合物 $>3,000\text{mol}$.重量构成,所述聚合物交联使得其能渗透胰岛素尺寸的蛋白质,但不能渗透超过 $100,000\text{mol}$.重量的分子。美国专利No.6,023,009描述囊封在由琼脂糖和琼脂胶制成的半透薄膜中的胰岛细胞。此性质的微

胶囊适宜施用至糖尿病患者的体腔中,且认为具有减少组织相容性问题或对细菌的敏感性的某些优点。

[0371] 还涵盖更精密的装置供使用,以包含根据本文中描述的方法由胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞产生的胰腺 β -细胞的群体,用于植入糖尿病患者或用于身体外疗法。美国专利No.4,378,016描述含有身体外区段、皮下区段和含有产生激素的细胞的可替换包膜的人工内分泌腺。美国专利No.5,674,289描述一种生物人工胰腺,其具有胰岛腔室,由半透薄膜与对周围组织敞开的的一个或多个血管化腔室分开。适用装置通常具有适合于含有胰岛细胞的腔室,和由半透薄膜与胰岛细胞分开的收集从胰岛细胞分泌的蛋白质且也可以允许例如循环葡萄糖水平的信号传导回胰岛细胞的腔室。

[0372] 本公开的方面涉及包含本文中描述的细胞(例如SC- β 细胞)的分离群体的分析。在一些实施方案中,分析可以使用鉴别一种或多种促进或抑制选自以下组成的群的 β 细胞命运的候选试剂: β 细胞增殖、 β 细胞复制和 β 细胞死亡、 β 细胞功能、 β 细胞对免疫攻击的敏感性或 β 细胞对去分化或分化的敏感性。在一些实施方案中,分析可以用于鉴别一种或多种促进至少一种或其前驱细胞分化成SC- β 细胞的候选试剂。在一些实施方案中,分析可以用于鉴别一种或多种刺激 β 细胞产生胰岛素或增加胰岛素产生或分泌的候选试剂。

[0373] 本公开涵盖方法,其中SC- β 细胞根据本文中描述的方法从来源于从罹患疾病(例如糖尿病、肥胖症或 β 细胞相关病症)的个体提取或分离的细胞的iPS细胞产生且那些SC- β 细胞与来自未患疾病的健康个体的正常 β 细胞比较以鉴别适用作疾病的标记物(例如表观遗传和/或遗传)的SC- β 细胞与正常 β 细胞之间的差异。在一些实施方案中, β 细胞从糖尿病个体获得且与正常 β 细胞比较,接着 β 细胞重新编程成iPS细胞,且分析iPS细胞的遗传和/或表观遗传标记物,这些标记物存在于从糖尿病个体中获得的 β 细胞中,而不存在于正常 β 细胞中,从而鉴别标记物(例如前驱糖尿病)。在一些实施方案中,来源于糖尿病患者的iPS细胞和/或SC- β 用以筛选试剂(例如能够调节促进糖尿病表型的基因的试剂)。

[0374] 胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC- β 细胞的方法

[0375] 通过使用本公开的方法转变至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞产生SC- β 细胞具有大量优点。首先,本公开的方法允许产生自体同源SC- β 细胞,这些细胞是个体特异性并与个体遗传匹配的细胞。一般说来,自体同源细胞不如非自体同源细胞那样进行免疫排斥。细胞来源于至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞,例如通过来自个体的体细胞(例如成纤维细胞)程序重排成诱发多潜能状态,接着培养多潜能细胞以分化至少一些多潜能细胞成至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞,接着至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞移植至个体中使得至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞体内成熟成SC- β 细胞或诱发至少一种胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞而获得的胰腺祖细胞。

[0376] 在一些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞所获自的受试者是哺乳动物受试者,例如人类受试者。在一些实施方案中,受试者罹患 β 细胞病症。在一些实施方案中,受试者罹患糖尿病。在一些实施方案中,受试者罹患前驱糖尿病。在此类实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞可以通过如本文中描述的方法离体分化成SC- β 细胞,接着在治疗受试者的 β 细胞病症(例如糖尿病)的方法中施用于细胞收获自的受试者。

[0377] 在一些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞位于受试者内(体内)并通过如本文公开的方法体内转变成SC-β细胞。在一些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞体内转变成SC-β细胞可以通过向受试者施用包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或至少六种或更多种如本文中描述的β细胞成熟因子的组合物实现。在一些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞体内转变成SC-β细胞可以通过向受试者施用包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或至少六种如本文中描述的β细胞成熟因子的组合物实现。

[0378] 在一些实施方案中,可以通过维持至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞于包含一种或多种β细胞成熟因子的培养基中进行接触。在一些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞可以进行基因工程化。在一些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞可经基因工程化,以表达一种或多种如本文公开的β细胞标记物,例如表达至少一种选自以下的多肽:胰腺和十二指肠同源框1(PDX-1)多肽、胰岛素、c-肽、胰淀素、E-钙黏着蛋白、Hnf3β、PC1/3、B2、Nkx2.2、NKX6-1、GLUT2、PC2、ZnT-8或其基本上同源的氨基酸序列或其功能性片段或功能性变异体。

[0379] 在至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞维持在体外条件下的情况下,可以使用常规组织培养条件和方法且为本领域技术人员已知。各种细胞的分离和培养法为本领域技术人员所掌握。

[0380] 在本公开的方法中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞一般可以在温度、pH值和其它环境条件的标准条件下培养,例如如粘附细胞在组织培养板中在37℃下在含有5-10%CO₂的氛围中。细胞和/或培养基经适当修改,以实现如本文中描述的转变成SC-β细胞。在某些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞,例如胰腺祖细胞可以在模拟细胞外基质的特征或包含一种或多种细胞外基质或基底膜组分的物质上或存在下培养。在一些实施方案中,使用Matrigel™。其它物质包括蛋白质或其混合物,例如明胶、胶原蛋白、纤维结合蛋白等等。在本发明的某些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞可以在细胞滋养层存在下培养。此类细胞可以例如具有鼠类或人类来源。其也可以照射,通过用例如丝裂霉素c等化学灭活剂处理而化学失活,或必要时以其它方式处理以抑制其增殖。在其它实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞在无喂养细胞下培养。在一些实施方案中,胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞在促进细胞簇集的条件下培养。如本文所用,“促进细胞簇集的条件”是指在细胞分化成SC-β细胞期间刺激细胞簇集的任何条件。在一些实施方案中,促进细胞簇集的条件包含悬浮液培养物。Borette和Gooch(Tissue Eng. 2006年4月;12(4):939-48)报导在最低粘附条件(血清培养基、低粘附基质)中培养刺激成人胰腺导管上皮细胞体外分化转移成β-细胞中的细胞簇集。因此,不希望受理论束缚,在一些实施方案中,促进细胞簇集的条件包含最低粘附条件,例如低血清培养基、低粘附基质。

[0381] 在某些实例中,β细胞成熟因子可以通过暴露或接触至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与有效量的本文中描述的β细胞成熟因子,用于诱发至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的分化,以使至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化成至少一种SC-β细胞(例如成熟胰腺β细胞)。

[0382] 因此,本文中包括通过本文中描述的方法制备的细胞和组合物。β细胞成熟因子确

切的量和类型可以取决于胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的数目、所需分化阶段和已经进行的先前分化阶段数目而改变。

[0383] 在某些实例中,β细胞成熟因子以有效量存在。如本文所用,“有效量”是指使胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的群体中至少10%或至少20%或至少30%的细胞分化成SC-β细胞应存在的化合物的量。

[0384] 在其它实例中,β细胞成熟因子可以存在于至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的培养基中,或者β细胞成熟因子可以在一些生长期期间添加至至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞。

[0385] 细胞SC-β细胞的存在证实和鉴别

[0386] 可以使用任何本领域技术人员共用的方式证实通过暴露于如本文中描述的至少一种β细胞成熟因子,诱导至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化所产生的SC-β细胞,例如成熟胰腺β细胞的存在。

[0387] 在一些实施方案中,β细胞标记物,例如化学诱发的SC-β细胞的存在可以通过检测指示内源性β细胞的一种或多种标记物的存在或缺乏来进行。在一些实施方案中,所述方法可以包括检测成熟β细胞的标记物的阳性表达(例如存在)。在一些实施方案中,标记物可以使用试剂,例如用于检测NKX6-1和C-肽的试剂检测。具体地说,本文中的SC-β细胞表达NKX6-1和C-肽,且不表达显著水平的将指示不成熟β细胞的其它标记物(例如MafB)。标记物的试剂可以是例如针对标记物的抗体或用于RT-PCR或PCR反应,例如半定量或定量RT-PCR或PCR反应的引物。此类标记物可以用于评估是否已经产生SC-β细胞。抗体或其它检测试剂可以连接于标记,例如用于检测的放射性、荧光(例如GFP)或比色标记。如果检测试剂是引物,那么可以供应于干燥制剂中,例如冻干或溶液中。

[0388] 至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞进展至SC-β细胞可以通过测定表征成熟β细胞的标记物的表达来监测。在一些过程中,某些标记物的表达通过检测标记物的存在或缺乏来测定。或者,某些标记物的表达可以通过测量标记物存在于细胞培养物或细胞群体的细胞中的水平来测定。在某些过程中,测定表征SC-β细胞的标记物的表达以及表征胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞,例如其来源于的多潜能干细胞或胰腺祖细胞的标记物的显著表达的缺乏。

[0389] 如结合监测SC-β细胞(例如成熟胰腺β细胞)从胰岛素阳性内分泌细胞的产生所描述,定性或半定量技术,例如点迹转移法和免疫细胞化学,可以使用本领域技术人员通常已知的方法用于测量标记物表达。或者,标记物表达可以通过使用例如定量PCR等技术,通过本领域中通常已知的方法来精确地定量。另外,应了解在多肽水平下,表达胰岛素的细胞的许多标记物是分泌的蛋白质。因而,可以利用用于测量细胞外标记物含量的技术,例如ELISA。

[0390] SC-β细胞特征也可以为表征SC-β细胞诱发自的多潜能干细胞的标记物的下调。举例来说,来源于多潜能干细胞的SC-β细胞可以通过相对于其来源于的多潜能干细胞中的表达,成熟中统计显著的如下多潜能干细胞标记物下调来表征:碱性磷酸酶(AP)、NANOG、OCT-4、SOX-2、SSEA4、TRA-1-60或TRA-1-81。多潜能细胞标记物表达的其它标记物包括(但不限于)碱性磷酸酶(AP);ABCG2;阶段特异性胚胎抗原-1(SSEA-1);SSEA-3;SSEA-4;TRA-1-60;TRA-1-81;Tra-2-49/6E;ERas/ECATS、E-钙黏着蛋白;βIII-微管蛋白;α-平滑肌肌动蛋白

(α -SMA);成纤维细胞生长因子4(Fgf4)、Cripto、Dax1;锌指蛋白质296(Zfp296);N-转乙酰酶-1(Nat1);(ES细胞相关转录本1(ECAT1);ESG1/DPPAS/ECAT2;ECAT3;ECAT6;ECAT7;ECAT8;ECAT9;ECAT10;ECAT15-1;ECAT15-2;Fth117;Sa114;未分化胚细胞转录因子(Utf1);Rex1;p53;G3PDH;端粒酶,包括TERT;沉默X染色体基因;Dnmt3a;Dnmt3b;TRIM28;含有F盒之蛋白质15(Fbx15);Nanog/ECAT4;Oct3/4;Sox2;Klf4;c-Myc;Esrrb;TDGF1;GABRB3;Zfp42,FoxD3;GDF3;CYP25A1;发育多潜能性相关2(DPPA2);T细胞淋巴瘤断点1(Tc11);DPPA3/Stella;DPPA4;Dnmt3L;Sox15;Stat3;Grb2;SV40大T抗原;HPV16E6;HPV16E7、 β -联蛋白和Bmi1和多潜能性的其它一般标记物等等,和在成熟中这些中的至少一种或多种与其来源于的多潜能干细胞相比下调统计显著量。

[0391] 应了解本发明不限于列为本文中成熟 β 细胞标记物的那些标记物,且本发明还涵盖例如细胞表面标记物、抗原和包括EST、RNA(包括微RNA和反义RNA)、DNA(包括基因和cDNA)和其部分在内的其它基因产物等标记物。

[0392] SC- β 细胞的富集、分离和纯化

[0393] 本发明的另一方面涉及SC- β 细胞的群体从细胞的异源群体分离,此类细胞混合群体包含SC- β 细胞和SC- β 细胞来源于的胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞。通过任何上述过程产生的SC- β 细胞的群体可以通过使用SC- β 细胞上存在而不存在于其来源于的胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的任何细胞表面标记物富集、分离和/或纯化。此类细胞表面标记物又称为对SC- β 细胞具有特异性的亲和力标签。对SC- β 细胞具有特异性的亲和力标签的实例是对存在于SC- β 细胞的细胞表面上,但基本上不存在于其它细胞类型(例如胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞)上的标记物分子,例如多肽具有特异性的抗体、配体或其它结合剂。在一些过程中,结合于SC- β 细胞(例如人类SC- β 细胞)上的细胞表面抗原的抗体用作通过本文中描述的方法产生的化学诱发(例如通过与如本文中描述的至少一种 β 细胞成熟因子接触)的SC- β 细胞富集、分离或纯化的亲和力标签。

[0394] 熟练技术人员将容易了解使用抗体富集、分离和/或纯化SC- β 细胞的方法。举例来说,在一些实施方案中,例如抗体等试剂与包含SC- β 细胞的细胞群体一起孵育,其中细胞群体已经处理以减少细胞间和基质粘附。接着洗涤细胞群体,离心和再悬浮。在一些实施方案中,如果抗体尚未经标记进行标记,那么细胞悬浮液与二级抗体,例如能够结合于初级抗体的FITC结合的抗体一起孵育。接着洗涤SC- β 细胞,离心且在缓冲液中再悬浮。接着使用荧光活化细胞分离器(FACS)分析和分类SC- β 细胞悬浮液。抗体结合的荧光重新编程的细胞与未结合的非荧光细胞(例如不成熟的产生胰岛素的细胞)分开收集,由此SC- β 细胞与细胞悬浮液中存在的其它细胞,例如胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞或不成熟的产生胰岛素的细胞(例如其它分化细胞类型)分离。

[0395] 在本文中描述的方法的另一个实施方案中,包含SC- β 细胞的分离的细胞组合物可以通过使用基于亲和力的替代性方法或通过其它轮的分类,使用相同或不同的对SC- β 细胞具有特异性的标记物进一步纯化。举例来说,在一些实施方案中,FACS分类用以首先将单独或与C-肽表达一起,或者与本文公开的 β 细胞标记物一起,表达NKX6-1的SC- β 细胞与细胞群体中不表达那些标记物之一的细胞(例如阴性细胞)分离。第二FAC分类,例如再次使用FACS分离对不同于第一分类的标记物呈阳性的细胞将阳性细胞分类富集细胞群体的重新编程细胞。

[0396] 在一个替代实施方案中,FACS分类用以通过针对存在于大部分胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞上但不存在于SC-β细胞上的标记物负向分类来分离细胞。

[0397] 在本文中描述的方法的一些实施方案中,SC-β细胞被荧光标记而不使用抗体,接着通过使用荧光活化细胞分离器(FACS)与未标记细胞分离。在此类实施方案中,编码GFP、YFP的核酸或编码可以表达的荧光标记物基因,例如编码荧光素酶的基因的另一核酸用以使用上述方法标记重新编程的细胞。举例来说,在一些实施方案中,将编码GFP的核酸的至少一个拷贝或其生物学上活性片段引入至少一个胰岛素阳性内分泌细胞中,首先化学上诱导其成SC-β细胞,其中例如胰岛素启动子等启动子的下游在SC-β细胞中表达,使得GFP基因产物或其生物学上活性片段的表达在胰岛素启动子的控制下。

[0398] 除仅仅描述的程序之外,化学诱导的SC-β细胞也可以通过其它用于分离细胞的技术分离。另外,SC-β细胞也可以通过在促进SC-β细胞的选择性存活或选择性扩展的生长条件中连续继代培养的方法富集或分离。此类方法为本领域的技术人员已知,并可以包括使用尤其如下试剂:胰岛素、TGF-β家族成员(包括活化素A、TGF-β1、2和3)、骨形态形成性蛋白质(BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-11、BMP-12和BMP-13)、成纤维细胞生长因子-1和成纤维细胞生长因子-2、血小板衍生生长因子-AA和血小板衍生生长因子-BB、富含血小板的血浆、胰岛素样生长因子(IGF-I、IGF-II)、生长分化因子(GDF-5、GDF-6、GDF-7、GDF-8、GDF-10、GDF-11、GDF-15)、血管内皮细胞衍生生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子(HGF)、多效生长因子、内皮素、表皮生长因子(EGF)、β-动物纤维素。其它医药化合物可以包括例如烟酰胺、胰高血糖素样肽-I(GLP-1)和II、GLP-1和GLP-2模拟体、唾液素-4、视黄酸、甲状旁腺激素。

[0399] 使用本文中描述的方法,SC-β细胞的富集、分离和/或纯化群体可以从胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞(其通过本文中描述的方法从多潜能干细胞分化)体外产生。在一些实施方案中,优选的富集、分离和/或纯化法涉及人类SC-β细胞从由人类多潜能干细胞或由人类诱导性多潜能干(iPS)细胞分化的人类胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的体外产生。在此类实施方案中,在SC-β细胞从预先来源于定形内胚层细胞、预先来源于iPS细胞的胰岛素阳性内分泌细胞分化的情况下,SC-β细胞可以是获得细胞以产生iPS细胞的受试者自体同源的。

[0400] 使用本文中描述的方法,SC-β细胞的分离细胞群体与化学诱导胰岛素阳性内分泌细胞或前驱细胞群体前的细胞群体相比,SC-β细胞含量富集至少约2至约1000倍。在一些实施方案中,与化学诱导胰岛素阳性内分泌细胞或前驱细胞群体前的群体相比,SC-β细胞可以富集至少约5至约500倍。在其它实施方案中,与化学诱导胰岛素阳性内分泌细胞或前驱细胞群体前的群体相比,SC-β细胞可以富集至少约10至约200倍。在其它实施方案中,与化学诱导胰岛素阳性内分泌细胞或前驱细胞群体前的群体相比,SC-β细胞可以富集至少约20至约100倍。在其它实施方案中,与化学诱导胰岛素阳性内分泌细胞或前驱细胞群体前的群体相比,SC-β细胞可以富集至少约40至约80倍。在某些实施方案中,与化学诱导胰岛素阳性内分泌细胞或前驱细胞群体前的群体相比,SC-β细胞可以富集至少约2至约20倍。

[0401] 包含SC-β细胞的组合物

[0402] 本发明的一些实施方案涉及包含SC-β细胞的细胞组合物,例如细胞培养物或细胞群体,其中所述SC-β细胞已衍生自至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞。在一些

实施方案中,细胞组合物包含胰岛素阳性内分泌细胞。在一些实施方案中,细胞组合物包含NKX6-1-胰腺祖细胞。在一些实施方案中,细胞组合物包含Pdx1-胰腺祖细胞。在一些实施方案中,细胞组合物包含原肠管细胞。在一些实施方案中,细胞组合物包含定形内胚层细胞。

[0403] 根据某些实施方案,化学诱导的SC-β细胞是哺乳动物细胞,且在一个优选的实施方案中,此类SC-β细胞是人类SC-β细胞。在一些实施方案中,胰岛素阳性内分泌细胞已衍生自定形内胚层细胞,例如人类定形内胚层干细胞。根据某些实施方案,化学诱导的Pdx1阳性胰腺祖细胞是哺乳动物细胞,且在一个优选的实施方案中,此类Pdx1阳性胰腺祖细胞是人类Pdx1阳性胰腺祖细胞。

[0404] 本发明的其它实施方案涉及包含通过如本文公开的方法产生的SC-β细胞的组合物,例如分离细胞群体或细胞培养物。本发明的一些实施方案涉及包含通过如本文公开的方法产生的化学诱导的SC-β细胞的组合物,例如分离细胞群体或细胞培养物。在此类实施方案中,SC-β细胞占SC-β细胞群体中总细胞的不足约90%、不足约85%、不足约80%、不足约75%、不足约70%、不足约65%、不足约60%、不足约55%、不足约50%、不足约45%、不足约40%、不足约35%、不足约30%、不足约25%、不足约20%、不足约15%、不足约12%、不足约10%、不足约8%、不足约6%、不足约5%、不足约4%、不足约3%、不足约2%或不足约1%。在一些实施方案中,组合物包含SC-β细胞群体,SC-β细胞占细胞群体中总细胞的超过约90%,例如细胞群体中总细胞的约至少95%或至少96%或至少97%或至少98%或至少约99%或约至少100%。

[0405] 本发明的某些其它实施方案涉及组合物,例如分离细胞群体或细胞培养物,其包含SC-β细胞与SC-β细胞来源于的胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的组合。在一些实施方案中,SC-β细胞来源于的胰岛素阳性内分泌细胞占分离细胞群体或培养物中总细胞的不足约25%、不足约20%、不足约15%、不足约10%、不足约5%、不足约4%、不足约3%、不足约2%或不足约1%。

[0406] 本发明的其它实施方案涉及通过本文中描述的方法产生且包含化学诱导的SC-β细胞作为大多数的细胞类型的组合物,例如分离细胞群体或细胞培养物。在一些实施方案中,本文中描述的方法和工艺产生包含至少约99%、至少约98%、至少约97%、至少约96%、至少约95%、至少约94%、至少约93%、至少约92%、至少约91%、至少约90%、至少约89%、至少约88%、至少约87%、至少约86%、至少约85%、至少约84%、至少约83%、至少约82%、至少约81%、至少约80%、至少约79%、至少约78%、至少约77%、至少约76%、至少约75%、至少约74%、至少约73%、至少约72%、至少约71%、至少约70%、至少约69%、至少约68%、至少约67%、至少约66%、至少约65%、至少约64%、至少约63%、至少约62%、至少约61%、至少约60%、至少约59%、至少约58%、至少约57%、至少约56%、至少约55%、至少约54%、至少约53%、至少约52%、至少约51%或至少约50%SC-β细胞的分离细胞培养物和/或细胞群体。

[0407] 在另一个实施方案中,细胞的分离细胞群体或组合物(或细胞培养物)包含人类SC-β细胞。在其它实施方案中,如本文中描述的方法和工艺可以产生包含至少约50%、至少约45%、至少约40%、至少约35%、至少约30%、至少约25%、至少约24%、至少约23%、至少约22%、至少约21%、至少约20%、至少约19%、至少约18%、至少约17%、至少约16%、至少约15%、至少约14%、至少约13%、至少约12%、至少约11%、至少约10%、至少约9%、至少

约8%、至少约7%、至少约6%、至少约5%、至少约4%、至少约3%、至少约2%或至少约1% SC-β细胞的分离细胞群体。在优选的实施方案中,分离细胞群体可以包含人类SC-β细胞。在一些实施方案中,不考虑保持在培养物中的喂养细胞,计算细胞培养物或群体中SC-β细胞的百分比。

[0408] 本发明的其它实施方案涉及包含SC-β细胞与其分化自的胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的组合物,例如分离细胞群体或细胞培养物。举例来说,可以产生约每95个胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞至少约5个SC-β细胞的细胞培养物或细胞群体。在其它实施方案中,可以产生约每5个胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞包含至少约95个SC-β细胞的细胞培养物或细胞群体。另外,涵盖包含SC-β细胞与胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的其它比率的细胞培养物或细胞群体。举例来说,可以产生约每1,000,000个或至少100,000个细胞或至少10,000个细胞或至少1000个细胞或500或至少250或至少100或至少10个胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞包含至少约1个SC-β细胞的组合物。

[0409] 本发明的其它实施方案涉及包含人类细胞,包括显示内源性β细胞的至少一个特征的人类SC-β细胞的组合物,例如细胞培养物或细胞群体。

[0410] 在本发明的优选的实施方案中,SC-β细胞的细胞培养物和/或细胞群体包含非重组细胞的人类SC-β细胞。在此类实施方案中,细胞培养物和/或细胞群体缺乏或基本上不含重组人类SC-β细胞。

[0411] β细胞成熟因子

[0412] 本公开的方面涉及使胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与β细胞成熟因子接触,例如以诱导胰岛素阳性内分泌细胞成熟或其前驱细胞分化成SC-β细胞(例如成熟胰腺β细胞)。术语“β细胞成熟因子”是指促进或有助于至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞转变成SC-β细胞的试剂。在一些实施方案中,β细胞成熟因子例如根据本文中描述的方法诱导多潜能细胞(例如iPSC或hESC)分化成定形内胚层细胞。在一些实施方案中,β细胞成熟因子例如根据本文中描述的方法诱导定形内胚层细胞分化成原肠管细胞。在一些实施方案中,β细胞成熟因子例如根据本文中描述的方法诱导原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞。在一些实施方案中,β细胞成熟因子例如根据本文中描述的方法诱导Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞。在一些实施方案中,β细胞成熟因子例如根据本文中描述的方法诱导NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞。在一些实施方案中,β细胞成熟因子例如根据本文中描述的方法诱导胰岛素阳性内分泌细胞成熟成SC-β细胞。

[0413] 一般来说,本文中描述的至少一种β细胞成熟因子可以单独使用,或其它β细胞成熟因子组合使用,以根据如本文公开的方法产生SC-β细胞。在一些实施方案中,至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或至少十种本文中描述的β细胞成熟因子用于产生SC-β细胞的方法中。

[0414] 转型生长因子-β(TGF-β)超家族

[0415] 本公开的方面涉及使用来自转型生长因子-β(TGF-β)超家族的生长因子作为β细胞成熟因子。“TGF-β超家族”意指具有已知TGFβ家族成员的结构和功能特征的蛋白质。蛋白质的TGFβ家族从结构与功能方面良好表征。其包括TGFβ系列蛋白质、抑制素(包括抑制素A和抑制素B)、活化素(包括活化素A、活化素B和活化素AB)、MIS(穆氏抑制物质(Müllerian inhibiting substance))、BMP(骨形态生成蛋白)、dpp(十五蛋白(decapentaplegic))、Vg-

1、MNSF(单克隆非特异性抑制因子)等等。此蛋白质家族的活性基于与各种细胞类型上某些受体的特异性结合。此家族成员共享与其功能相关的序列一致区,特别是在C端。TGFβ家族包括超过一百种不同蛋白质,都共享氨基酸序列一致的至少一个区域。家庭成员包括(但不限于)以下蛋白质,如通过其GenBank登记号鉴别:P07995、P18331、P08476、Q04998、P03970、P43032、P55102、P27092、P42917、P09529、P27093、P04088、Q04999、P17491、P55104、Q9WUK5、P55103、O88959、O08717、P58166、O61643、P35621、P09534、P48970、Q9NR23、P25703、P30884、P12643、P49001、P21274、O46564、O19006、P22004、P20722、Q04906、Q07104、P30886、P18075、P23359、P22003、P34821、P49003、Q90751、P21275、Q06826、P30885、P34820、Q29607、P12644、Q90752、O46576、P27539、P48969、Q26974、P07713、P91706、P91699、P27091、O42222、Q24735、P20863、O18828、P55106、Q9PTQ2、O14793、O08689、O42221、O18830、O18831、O18836、O35312、O42220、P43026、P43027、P43029、O95390、Q9R229、O93449、Q9Z1W4、Q9BDW8、P43028、Q7Z4P5、P50414、P17246、P54831、P04202、P01137、P09533、P18341、O19011、Q9Z1Y6、P07200、Q9Z217、O95393、P55105、P30371、Q9MZE2、Q07258、Q96S42、P97737、AAA97415.1、NP-776788.1、NP-058824.1、EAL24001.1、1S4Y、NP-001009856.1、NP-032406.1、NP-999193.1、XP-519063.1、AAG17260.1、CAA40806.1、NP-001009458.1、AAQ55808.1、AAK40341.1、AAP33019.1、AAK21265.1、AAC59738.1、CAI46003.1、B40905、AAQ55811.1、AAK40342.1、XP-540364.1、P55102、AAQ55810.1、NP-990727.1、CAA51163.1、AAD50448.1、JC4862、PN0504、BAB17600.1、AAH56742.1、BAB17596.1、CAG06183.1、CAG05339.1、BAB17601.1、CAB43091.1、A36192、AAA49162.1、AAT42200.1、NP-789822.1、AAA59451.1、AAA59169.1、XP-541000.1、NP-990537.1、NP-002184.1、AAC14187.1、AAP83319.1、AAA59170.1、BAB16973.1、AAM66766.1、WFPGBB、1201278C、AAH30029.1、CAA49326.1、XP-344131.1、AAH48845.1、XP-148966.3、I48235、B41398、AAH77857.1、AAB26863.1、1706327A、BAA83804.1、NP-571143.1、CAG00858.1、BAB17599.1、BAB17602.1、AAB61468.1、PN0505、PN0506、CAB43092.1、BAB17598.1、BAA22570.1、BAB16972.1、BAC81672.1、BAA12694.1、BAA08494.1、B36192、C36192、BAB16971.1、NP-034695.1、AAA49160.1、CAA62347.1、AAA49161.1、AAD30132.1、CAA58290.1、NP-005529.1、XP-522443.1、AAM27448.1、XP-538247.1、AAD30133.1、AAC36741.1、AAH10404.1、NP-032408.1、AAN03682.1、XP-509161.1、AAC32311.1、NP-651942.2、AAL51005.1、AAC39083.1、AAH85547.1、NP-571023.1、CAF94113.1、EAL29247.1、AAW30007.1、AAH90232.1、A29619、NP-001007905.1、AAH73508.1、AAD02201.1、NP-999793.1、NP-990542.1、AAF19841.1、AAC97488.1、AAC60038.1、NP 989197.1、NP-571434.1、EAL41229.1、AAT07302.1、CAI19472.1、NP-031582.1、AAA40548.1、XP-535880.1、NP-037239.1、AAT72007.1、XP-418956.1、CAA41634.1、BAC30864.1、CAA38850.1、CAB81657.2、CAA45018.1、CAA45019.1、BAC28247.1、NP-031581.1、NP-990479.1、NP-999820.1、AAB27335.1、S45355、CAB82007.1、XP-534351.1、NP-058874.1、NP-031579.1、1REW、AAB96785.1、AAB46367.1、CAA05033.1、BAA89012.1、1ES7、AAP20870.1、BAC24087.1、AAG09784.1、BAC06352.1、AAQ89234.1、AAM27000.1、AAH30959.1、CAG01491.1、NP-571435.1、1REU、AAC60286.1、BAA24406.1、A36193、AAH55959.1、AAH54647.1、AAH90689.1、CAG09422.1、BAD16743.1、NP-032134.1、XP-532179.1、AAB24876.1、AAH57702.1、AAA82616.1、CAA40222.1、CAB90273.2、XP-342592.1、XP-534896.1、XP-534462.1、1LXI、XP-

417496.1、AAF34179.1、AAL73188.1、CAF96266.1、AAB34226.1、AAB33846.1、AAT12415.1、AAO33819.1、AAT72008.1、AAD38402.1、BAB68396.1、CAA45021.1、AAB27337.1、AAP69917.1、AAT 12416.1、NP-571396.1、CAA53513.1、AAO33820.1、AAA48568.1、BAC02605.1、BAC02604.1、BAC02603.1、BAC02602.1、BAC02601.1、BAC02599.1、BAC02598.1、BAC02597.1、BAC02595.1、BAC02593.1、BAC02592.1、BAC02590.1、AAD28039.1、AAP74560.1、AAB94786.1、NP-001483.2、XP-528195.1、NP-571417.1、NP-001001557.1、AAH43222.1、AAM33143.1、CAG10381.1、BAA31132.1、EAL39680.1、EAA12482.2、P34820、AAP88972.1、AAP74559.1、CAI16418.1、AAD30538.1、XP-345502.1、NP-038554.1、CAG04089.1、CAD60936.2、NP-031584.1、B55452、AAC60285.1、BAA06410.1、AAH52846.1、NP-031580.1、NP-036959.1、CAA45836.1、CAA45020.1、Q29607、AAB27336.1、XP-547817.1、AAT12414.1、AAM54049.1、AAH78901.1、AAO25745.1、NP-570912.1、XP-392194.1、AAD20829.1、AAC97113.1、AAC61694.1、AAH60340.1、AAR97906.1、BAA32227.1、BAB68395.1、BAC02895.1、AAW51451.1、AAF82188.1、XP-544189.1、NP-990568.1、BAC80211.1、AAW82620.1、AAF99597.1、NP-571062.1、CAC44179.1、AAB97467.1、AAT99303.1、AAD28038.1、AAH52168.1、NP-001004122.1、CAA72733.1、NP-032133.2、XP-394252.1、XP-224733.2、JH0801、AAP97721.1、NP-989669.1、S43296、P43029、A55452、AAH32495.1、XP-542974.1、NP-032135.1、AAK30842.1、AAK27794.1、BAC30847.1、EAA12064.2、AAP97720.1、XP-525704.1、AAT07301.1、BAD07014.1、CAF94356.1、AAR27581.1、AAG13400.1、AAC60127.1、CAF92055.1、XP-540103.1、AAO20895.1、CAF97447.1、AAS01764.1、BAD08319.1、CAA10268.1、NP-998140.1、AAR03824.1、AAS48405.1、AAS48403.1、AAK53545.1、AAK84666.1、XP-395420.1、AAK56941.1、AAC47555.1、AAR88255.1、EAL33036.1、AAW47740.1、AAW29442.1、NP-722813.1、AAR08901.1、AAO15420.2、CAC59700.1、AAL26886.1、AAK71708.1、AAK71707.1、CAC51427.2、AAK67984.1、AAK67983.1、AAK28706.1、P07713、P91706、P91699、CAG02450.1、AAC47552.1、NP-005802.1、XP-343149.1、AW34055.1、XP-538221.1、AAR27580.1、XP-125935.3、AAF21633.1、AAF21630.1、AAD05267.1、Q9Z 1W4、NP-031585.2、NP-571094.1、CAD43439.1、CAF99217.1、CAB63584.1、NP-722840.1、CAE46407.1、XP-417667.1、BAC53989.1、BAB 19659.1、AAM46922.1、AAA81169.1、AAK28707.1、AAL05943.1、AAB17573.1、CAH25443.1、CAG10269.1、BAD16731.1、EAA00276.2、AAT07320.1、AAT07300.1、AAN15037.1、CAH25442.1、AAK08152.2、2009388A、AAR12161.1、CAG01961.1、CAB63656.1、CAD67714.1、CAF94162.1、NP-477340.1、EAL24792.1、NP-001009428.1、AAB86686.1、AAT40572.1、AAT40571.1、AAT40569.1、NP-033886.1、AAB49985.1、AAG39266.1、Q26974、AAC77461.1、AAC47262.1、BAC05509.1、NP-055297.1、XP-546146.1、XP-525772.1、NP-060525.2、AAH33585.1、AAH69080.1、CAG12751.1、AAH74757.2、NP-034964.1、NP-038639.1、042221、AAF02773.1、NP-062024.1、AAR18244.1、AAR14343.1、XP-228285.2、AAT40573.1、AAT94456.1、AAL35278.1、AAL35277.1、AAL17640.1、AAC08035.1、AAB86692.1、CAB40844.1、BAC38637.1、BAB16046.1、AAN63522.1、NP-571041.1、AAB04986.2、AAC26791.1、AAB95254.1、BAA11835.1、AAR18246.1、XP-538528.1、BAA31853.1、AAK18000.1、XP-420540.1、AAL35276.1、AAQ98602.1、CAE71944.1、AAW50585.1、AAV63982.1、AAW29941.1、AAN87890.1、AAT40568.1、CAD57730.1、AAB81508.1、AAS00534.1、AAC59736.1、BAB79498.1、

AAA97392.1、AAP85526.1、NP-999600.2、NP-878293.1、BAC82629.1、CAC60268.1、CAG04919.1、AAN10123.1、CAA07707.1、AAK20912.1、AAR88254.1、CAC34629.1、AAL35275.1、AAD46997.1、AAN03842.1、NP-571951.2、CAC50881.1、AAL99367.1、AAL49502.1、AAB71839.1、AAB65415.1、NP-624359.1、NP-990153.1、AAF78069.1、AAK49790.1、NP-919367.2、NP-001192.1、XP-544948.1、AAQ18013.1、AAV38739.1、NP-851298.1、CAA67685.1、AAT67171.1、AAT37502.1、AAD27804.1、AAN76665.1、BAC11909.1、XP-421648.1、CAB63704.1、NP-037306.1、A55706、AAF02780.1、CAG09623.1、NP-067589.1、NP-035707.1、AAV30547.1、AAP49817.1、BAC77407.1、AAL87199.1、CAG07172.1、B36193、CAA33024.1、NP-001009400.1、AAP36538.1、XP-512687.1、XP-510080.1、AAH05513.1、1KTZ、AAH14690.1、AAA31526.1。

[0416] 预期来自TGF- β 超家族的单独或与一种或多种其它 β 细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC- β 细胞的任何生长因子可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。

[0417] 来自TGF- β 的生长因子可以天然获得或重组。在一些实施方案中,来自TGF- β 超家族的生长因子包含活化素A。术语“活化素A”包括活化素A的片段和衍生物。示例性活化素A的序列在美国公布No.2009/0155218(‘218公布’)中公开为SEQ ID NO:1。活化素A的其它非限制性实例提供于‘218公布的SEQ ID NO:2-16中,且编码活化素A的核酸的非限制性实例提供于‘218公布的SEQ ID NO:33-34中。在一些实施方案中,来自TGF- β 超家族的生长因子包含氨基酸序列与‘218公布的SEQ ID NO:1至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%或更多一致的多肽。

[0418] 在一些实施方案中,来自TGF- β 超家族的生长因子包含生长分化因子8(GDF8)。术语“GDF8”包括GDF8的片段和衍生物。本领域技术人员可获得GDF8多肽的序列。在一些实施方案中,来自TGF- β 超家族的生长因子包含氨基酸序列与人类GDF8多肽序列(GenBank登记号EAX10880)至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%或更多一致的多肽。

[0419] 在一些实施方案中,来自TGF- β 超家族的生长因子包含与GDF8密切相关的生长因子,例如生长分化因子11(GDF11)。本领域技术人员可获得GDF11的多肽序列。在一些实施方案中,来自TGF- β 超家族的生长因子包含氨基酸序列与人类GDF11多肽序列(GenBank登记号AAF21630)至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%或更多一致的多肽。

[0420] 在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒不包括来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子。

[0421] 在一些实施方案中,来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子可以经模拟来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子的试剂置换。模拟来自TGF- β 超家族的至少一种生长因子的示例性试剂包括(不限于)IDE1和IDE2。

[0422] TGF- β 信号传导通路抑制剂

[0423] 本公开的方面涉及TGF- β 信号传导通路抑制剂作为 β 细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它 β 细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC- β 细胞的任何TGF- β 信号传导通路抑制剂可以用于本文中描述的方法。

法、组合物和试剂盒。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除TGF- β 信号传导通路抑制剂。

[0424] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路包含TGF- β 受体I型激酶(TGF- β RI)信号传导。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂包含ALK5抑制剂II(CAS 446859-33-2, TGF- β RI激酶的ATP竞争性抑制剂,又称为RepSox, IUPAC名称:2-[5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]-1,5-萘啶。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为ALK5抑制剂II的类似物或衍生物。

[0425] 在一些实施方案中,ALK5抑制剂II的类似物或衍生物是如以引用的方式整体并入本文中的美国专利公布No.2012/0021519中所述的式I化合物。

[0426] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为美国专利公布No.2010/0267731中所述的TGF- β 受体抑制剂。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂包含美国专利公布No.2009/0186076和2007/0142376中所述的ALK5抑制剂。

[0427] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为A 83-01。在一些实施方案中,所述TGF- β 信号传导通路抑制剂非A 83-01。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除A 83-01。

[0428] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为SB 431542。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂非SB 431542。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除SB 431542。

[0429] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为D 4476。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂非D 4476。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除D 4476。

[0430] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为GW 788388。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂非GW 788388。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除GW 788388。

[0431] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为LY 364947。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂非LY 364947。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除LY 364947。

[0432] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为LY 580276。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂非LY 580276。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除LY 580276。

[0433] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为SB 525334。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂非SB 525334。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除SB 525334。

[0434] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为SB 505124。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂非SB 505124。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除SB 505124。

[0435] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为SD 208。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂非SD 208。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除SD 208。

[0436] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为GW 6604。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂非GW 6604。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除GW 6604。

[0437] 在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂为GW 788388。在一些实施方案中,TGF- β 信号传导通路抑制剂非GW 788388。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法排除GW 788388。

[0438] 从上述化合物群,以下可以从各种来源获得:LY-364947、SB-525334、SD-208和SB-505124可得自Sigma,P.O.Box 14508,St.Louis,Mo.,63178-9916;616452和616453可得自Calbiochem(EMD Chemicals,Inc.),480S.Democrat Road,Gibbstown,N.J.,08027;GW788388和GW6604可得自GlaxoSmithKline,980Great West Road,Brentford,Middlesex,TW8 9GS,United Kingdom;LY580276可得自Lilly Research,Indianapolis,Ind.46285;且SM16可得自Biogen Idec,P.O.Box 14627,5000Davis Drive,Research Triangle Park,N.C.,27709-4627。

[0439] WNT信号传导通路

[0440] 本公开的方面涉及WNT信号传导通路活化剂作为 β 细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它 β 细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC- β 细胞的任何WNT信号传导通路活化剂可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。

[0441] 在一些实施方案中,WNT信号传导通路活化因子包含CHIR99021。在一些实施方案中,WNT信号传导通路活化因子包含CHIR99021的衍生物,例如CHIR99021的盐,例如CHIR99021的三盐酸化物(盐酸盐)。在一些实施方案中,WNT信号传导通路活化因子包含Wnt3a重组蛋白。在一些实施方案中,WNT信号传导通路活化因子包含糖原合酶激酶3(GSK3)抑制剂。示例性GSK3抑制剂包含(不限于)3F8、A 1070722、AR-A 014418、BIO、BIO-丙酮肟、FRATide、10Z-Hymenialdisine、靛红-3'肟、可尼泡酮(kenpaulone)、L803、L803-mts、碳酸锂、NSC 693868、SB 216763、SB 415286、TC-G 24、TCS 2002、TCS 21311、TWS 119和这些中的任一者的类似物或衍生物。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除WNT信号传导通路活化剂。

[0442] 成纤维细胞生长因子(FGF)家族

[0443] 本公开的方面涉及来自FGF家族的生长因子作为 β 细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它 β 细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC- β 细胞的任何来自FGF家族的生长因子可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除来自FGF家族的生长因子。

[0444] 在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含角化细胞生长因子(KGF)。本领域技术人员可获得KGF的多肽序列。在一些实施方案中,来自FGF家族的生长因子包含氨基酸序列与人类KGF多肽序列(GenBank登记AAB21431)至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%或更多一致的多肽。

[0445] 在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含FGF2。本领域技术人员可获得FGF2的多肽序列。在一些实施方案中,来自FGF家族的生长因子包含氨基酸序列与人

类FGF2多肽序列(GenBank登记NP_001997)至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%或更多一致的多肽。

[0446] 在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含FGF8B。本领域技术人员可获得FGF8B的多肽序列。在一些实施方案中,来自FGF家族的生长因子包含氨基酸序列与人类FGF8B多肽序列(GenBank登记AAB40954)至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%或更多一致的多肽。

[0447] 在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含FGF10。本领域技术人员可获得FGF10的多肽序列。在一些实施方案中,来自FGF家族的生长因子进一步包含氨基酸序列与人类FGF10多肽序列(GenBank登记CAG46489)至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%或更多一致的多肽。

[0448] 在一些实施方案中,至少一种来自FGF家族的生长因子包含FGF21。本领域技术人员可获得FGF21的多肽序列。在一些实施方案中,来自FGF家族的生长因子包含氨基酸序列与人类FGF21多肽序列(GenBank登记AAQ89444.1)至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%或更多一致的多肽。

[0449] 骨形态形成性蛋白质(BMP)信号传导通路抑制剂

[0450] 本公开的方面涉及BMP信号传导通路抑制剂作为 β 细胞成熟因子的用途。BMP信号传导家族是TGF- β 超家族的各种子集(Sebald等人Biol.Chem.385:697-710,2004)。超过二十种的已知BMP配体由三种不同II型(BMPRII、ActRIIa和ActRIIb)和至少三种I型(ALK2、ALK3和ALK6)受体识别。二聚配体促进受体异聚体的组装,允许组成性活性II型受体丝氨酸/苏氨酸激酶磷酸化I型受体丝氨酸/苏氨酸激酶。活化I型受体磷酸化BMP反应性(BR-)SMAD效应子(SMAD 1、5和8)以促进与SMAD4(一种也促进TGF信号传导的共SMAD)复合时的核移位。另外,BMP信号可以用非SMAD依赖性方式活化细胞内效应子,例如MAPK p38(Nohe等人Cell Signal 16:291-299,2004)。例如诺根(noggin)、克洛丁(chordin)、格姆林(gremlin)和卵泡抑素(follistatin)等可溶BMP拮抗剂通过配体整合限制BMP信号传导。

[0451] 预期单独或与一种或多种其它 β 细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC- β 细胞的任何BMP信号传导通路抑制剂可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。在本文中描述的任何方面的某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除BMP信号传导通路抑制剂。

[0452] 在一些实施方案中,BMP信号传导通路抑制剂包含LDN 193189(又名LDN193189、1062368-24-4、LDN-193189、DM 3189、DM-3189,IUPAC名称:4-[6-(4-哌嗪-1-基苯基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基]喹诺酮)。

[0453] 在一些实施方案中,BMP信号传导通路抑制剂包含LDN 193189的类似物或衍生物,例如LDN 193189的盐、水合物、溶剂、酯或前药。在一些实施方案中,LDN 193189的衍生物(例如盐)包含LDN193189盐酸盐。

[0454] 在一些实施方案中,BMP信号传导通路抑制剂包含来自美国专利公布No.2011/0053930的式I化合物。

[0455] 索尼克刺猬(SHH)信号传导通路

[0456] 本公开的方面涉及SHH信号传导通路抑制剂作为 β 细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它 β 细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或

其前驱细胞分化成SC- β 细胞的任何SHH信号传导通路抑制剂可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。

[0457] 在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含Sant1。在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含SANT2。在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含SANT3。在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含SANT4。在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含Cur61414。在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含毛喉素。在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含番茄碱。在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含AY9944。在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含三苯乙醇。在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含化合物A或化合物B(如美国公布No.2004/0060568中公开)。在一些实施方案中,SHH信号传导通路抑制剂包含如美国公布No.2006/0276391中公开的拮抗刺猬信号传导的类固醇生物碱(例如环杷明或其衍生物)。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除SHH信号传导通路抑制剂。

[0458] 视黄酸信号传导通路

[0459] 本公开的方面涉及视黄酸信号传导调节剂作为 β 细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它 β 细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC- β 细胞的任何视黄酸信号传导调节剂可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。

[0460] 在一些实施方案中,视黄酸信号传导的调节剂包含视黄酸信号传导的活化剂。在一些实施方案中,RA信号传导通路活化剂包含视黄酸。在一些实施方案中,RA信号传导通路活化剂包含视黄酸受体激动剂。示例性视黄酸受体激动剂包括(不限于)CD 1530、AM 580、TTNPB、CD 437、Ch 55、BMS 961、AC 261066、AC 55649、AM 80、BMS 753、他佐罗汀(tazarotene)、阿达帕林(adapalene)和CD 2314。

[0461] 在一些实施方案中,视黄酸信号传导的调节剂包含视黄酸信号传导的抑制剂。在一些实施方案中,视黄酸信号传导通路抑制剂包含DEAB(IUPAC名称:2-[2-(二乙基氨基)乙氧基]-3-丙-2-烯基苯甲醛)。在一些实施方案中,视黄酸信号传导通路抑制剂包含DEAB的类似物或衍生物。

[0462] 在一些实施方案中,视黄酸信号传导通路抑制剂包含视黄酸受体拮抗剂。在一些实施方案中,视黄酸受体拮抗剂包含(E)-4-[2-(5,6-二氢-5,5-二甲基-8-苯基-2-萘基)乙烯基]苯甲酸、(E)-4-[[5,6-二氢-5,5-二甲基-8-苯基乙炔基)-2-萘基]乙烯基]苯甲酸、(E)-4-[2-[5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(2-萘基)-2-萘基]乙烯基]-苯甲酸和(E)-4-[2-[5,6-二氢-5,5-二甲基-8-(4-甲氧基苯基)-2-萘基]乙烯基]苯甲酸。在一些实施方案中,视黄酸受体拮抗剂包含BMS 195614(CAS#253310-42-8)、ER 50891(CAS#187400-85-7)、BMS 493(CAS#170355-78-9)、CD 2665(CAS#170355-78-9)、LE 135(CAS#155877-83-1)、BMS 453(CAS#166977-43-1)或MM 11253(CAS#345952-44-5)。

[0463] 在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除视黄酸信号传导的调节剂。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除视黄酸信号传导通路活化剂。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除视黄酸信号传导通路抑制剂。

[0464] 蛋白激酶C

[0465] 本公开的方面涉及蛋白激酶C活化剂作为β细胞成熟因子的用途。蛋白激酶C是蛋白激酶蛋白激酶最大家族之一,且由多种同工型构成。常规同工型包括α、βI、βII、γ;新颖同工型包括δ、ε、η、θ;且非典型同工型包括ξ和ι/λ。PKC酶主要在胞质,但当活化时会移位至膜。在细胞质中,PKC由其它激酶磷酸化或自体磷酸化。为活化,一些PKC同工型(例如PKC-ε)需要结合于甘油二酯(“DAG”)结合位点或磷脂酰丝氨酸(“PS”)结合位点的分子。其它能够在没有任何二级结合信使下活化。结合于DAG位点的PKC活化剂包括(但不限于)苔藓抑素、皮克类似物(picologues)、佛波醇酯、海兔毒素和格尼迪木灵(gnidimacrin)。结合于PS位点的PKC活化剂包括(但不限于)多不饱和脂肪酸和其衍生物。预期单独或与一种或多种其它β细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC-β细胞的任何蛋白激酶C活化剂可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。

[0466] 在一些实施方案中,PKC活化剂包含PdbU。在一些实施方案中,PKC活化剂包含TPB。在一些实施方案中,PKC活化剂包含环丙烷基化多不饱和脂肪酸、环丙烷基化单不饱和脂肪酸、环丙烷基化多不饱和脂肪醇、环丙烷基化单不饱和脂肪醇、环丙烷基化多不饱和脂肪酸酯、环丙烷基化单不饱和脂肪酸酯、环丙烷基化多不饱和脂肪酸硫酸酯、环丙烷基化单不饱和脂肪酸硫酸酯、环丙烷基化多不饱和脂肪酸磷酸酯、环丙烷基化单不饱和脂肪酸磷酸酯、大环内酯、DAG衍生物、类异戊二烯、辛基吡啶内酰胺V、格尼迪木灵、伊帕达尔(iripallidal)、巨大戟醇(ingenol)、萘磺酰胺、甘油二酯激酶抑制剂、成纤维细胞生长因子18(FGF-18)、胰岛素生长因子、激素和生长因子活化剂、如WIPO公布No.WO/2013/071282中所描述。在一些实施方案中,苔藓抑素包含苔藓抑素-1、苔藓抑素-2、苔藓抑素-3、苔藓抑素-4、苔藓抑素-5、苔藓抑素-6、苔藓抑素-7、苔藓抑素-8、苔藓抑素-9、苔藓抑素-10、苔藓抑素-11、苔藓抑素-12、苔藓抑素-13、苔藓抑素-14、苔藓抑素-15、苔藓抑素-16、苔藓抑素-17或苔藓抑素-18。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除蛋白激酶C活化剂。

[0467] γ-分泌酶抑制剂

[0468] 本公开的方面涉及γ-分泌酶抑制剂作为β细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它β细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC-β细胞的任何γ-分泌酶抑制剂可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。已知许多γ-分泌酶抑制剂。在一些实施方案中,γ-分泌酶抑制剂包含XXI。在一些实施方案中,γ-分泌酶抑制剂包含DAPT。其它示例性γ-分泌酶抑制剂包括(不限于)美国专利No.7,049,296、8,481,499、8,501,813和WIPO公布No.WO/2013/052700中描述的γ-分泌酶抑制剂。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除γ-分泌酶抑制剂。

[0469] 甲状腺激素信号传导通路活化剂

[0470] 本公开的方面涉及甲状腺激素信号传导通路活化剂作为β细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它β细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC-β细胞的任何甲状腺激素信号传导通路活化剂可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。在本文中描述的任何方面的某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除甲状腺激素信号传导通路活化剂。在本文中描述的任何方面的某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除本文中描述的T3或T3类似物。

[0471] 在一些实施方案中,甲状腺激素信号传导通路活化剂包含三碘甲腺原氨酸(T3)。

在一些实施方案中,甲状腺激素信号传导通路活化剂包含T3的类似物或衍化物。示例性T3类似物包括(但不限于)选择性和非选择性甲状腺模拟物、TR β 选择性激动剂-GC-1、GC-24, 4-羟基-PCB106、MB07811、MB07344, 3,5-二碘甲状腺丙酸(DITPA);选择性TR- β 激动剂GC-1; 3-碘化甲状腺氨酸(T(1)AM)和3,3',5-三碘甲腺乙酸(Triac)(激素甲状腺素的生物活性代谢物(T(4)));KB-2115和KB-141;甲碘安;SKF L-94901;DIBIT;3'-AC-T2;四碘甲腺乙酸(Tetrac)和三碘甲腺乙酸(Triac)(经由甲状腺素[T4]和三碘甲腺原氨酸[T3]丙氨酸链的氧化脱氨和脱羧基)、3,3',5'-三碘甲腺原氨酸(rT3)(经由T4和T3脱碘)、3,3'-二碘甲腺原氨酸(3,3'-T2)和3,5-二碘甲腺原氨酸(T2)(经由T4、T3和rT3脱碘)和3-碘甲腺原氨酸(T1AM)和甲状腺氨酸(T0AM)(经由T4和T3脱碘和氨基酸脱羧基),以及TH结构类似物,例如3,5,3'-三碘甲状腺丙酸(Triprop), 3,5-二溴-3-吡嗪酮-1-甲状腺原氨酸(L-940901)、N-[3,5-二甲基-4-(4'-羟基-3'-异丙基苯氧基)-苯基]-草氨酸(CGS 23425)、3,5-二甲基-4-[(4'-羟基-3'-异丙基苯甲基)-苯氧基]乙酸(GC-1)、3,5-二氯-4-[(4-羟基-3-异丙基苯氧基)苯基]乙酸(KB-141)和3,5-二碘甲状腺丙酸(DITPA)。

[0472] 在一些实施方案中,甲状腺激素信号传导通路活化剂包含T3的前药或激素原,例如T4甲状腺激素(例如甲状腺素或L-3,5,3',5'-甲状腺素)。

[0473] 在一些实施方案中,甲状腺激素信号传导通路活化剂是美国专利No.7,163,918中描述的碘化甲状腺氨酸组合物。

[0474] 表皮生长因子(EGF)家族

[0475] 本公开的方面涉及来自EGF家族的生长因子作为 β 细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它 β 细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC- β 细胞的任何来自EGF家族的生长因子可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。在一些实施方案中,至少一种来自EGF家族的生长因子包含 β 细胞素。在一些实施方案中,至少一种来自EGF家族的生长因子包含EGF。表皮生长因子(EGF)是从大的膜内在蛋白质前驱细胞蛋白裂解的53氨基酸细胞因子。在一些实施方案中,来自EGF家族的生长因子包含变异EGF多肽,例如与人类野生型EGF多肽序列具有至少90%氨基酸一致性的分离表皮生长因子多肽,如美国专利No.7,084,246中所公开。在一些实施方案中,来自EGF家族的生长因子包含结合于EGF受体且激动EGF受体的工程化EGF突变体,如美国专利No.8,247,531中所公开。在一些实施方案中,来自EGF家族的至少一种生长因子经EGF家族中活化信号传导通路的试剂置换。在一些实施方案中,来自EGF家族的生长因子包含模拟EGF的化合物。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除来自EGF家族的生长因子。

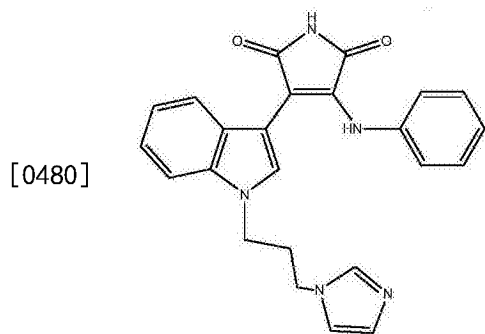
[0476] 蛋白激酶抑制剂

[0477] 本公开的方面涉及蛋白激酶抑制剂作为 β 细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它 β 细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC- β 细胞的任何蛋白激酶抑制剂可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。

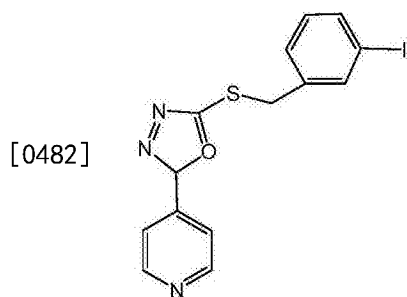
[0478] 在一些实施方案中,蛋白激酶抑制剂包含星孢菌素。在一些实施方案中,蛋白激酶抑制剂包含星孢菌素类似物。星孢菌素的示例性类似物包括(不限于)Ro-31-8220、双吡啶基顺丁烯二酰亚胺(Bis)化合物、10'-{5''-[(甲氧羰基)氨基]-2''-甲基}-苯基氨基羰基星孢菌素(星孢菌素类似物)(参见例如Lopez等人,“Staurosporine-derived inhibitors

broaden the scope of analog-sensitive kinase technology”, J. Am. Chem. Soc. 2013; 135(48):18153-18159) 和 cgp41251。

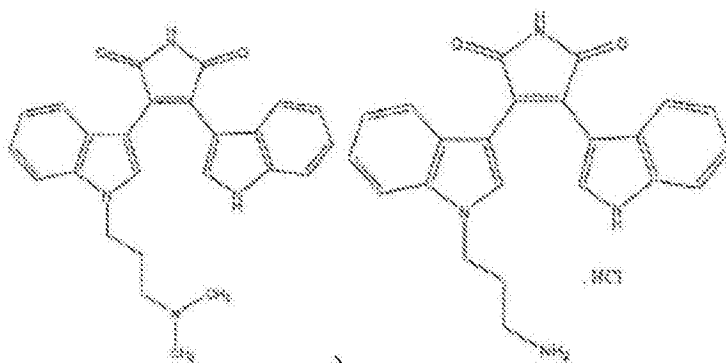
[0479] 在一些实施方案中,蛋白激酶抑制剂是PKCB抑制剂。在一些实施方案中,蛋白激酶抑制剂是具有以下结构或如下化合物的衍生物、类似物或变异体的PKCB抑制剂:



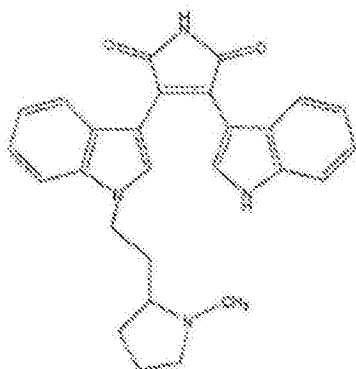
[0481] 在一些实施方案中,PKCB抑制剂是具有以下结构或如下化合物的衍生物、类似物或变异体的GSK-2化合物:



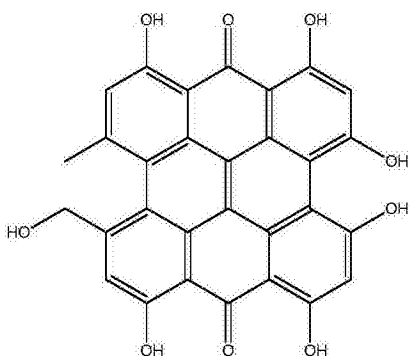
[0483] 在一些实施方案中,PKC抑制剂是双吡啶基顺丁烯二酰亚胺。示例性双吡啶基顺丁烯二酰亚胺包括(不限于)双吡啶基顺丁烯二酰亚胺I、双吡啶基顺丁烯二酰亚胺II、双吡啶基顺丁烯二酰亚胺III、盐酸盐或衍生物、类似物或变异体。在一些实施方案中,其衍生物或变异体或类似物选自由选自以下的化合物中选出的化合物的衍生物或变异体或类似物:



[0484]

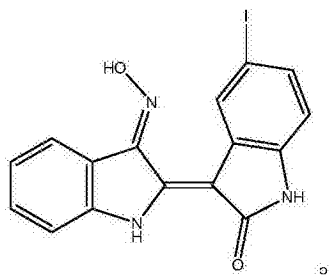


[0485] 在一些实施方案中,PKC抑制剂是假金丝桃素或如下化合物的衍生物、类似物或变异体:



[0486]

[0487] 在一些实施方案中,PKC抑制剂是吲哚素-3-单肟、5-碘基或以下化合物的衍生物、类似物或变异体:



[0488]

[0489] 在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除蛋白激酶抑制剂。

[0490] 囊性纤维化跨膜传导性调节因子(CFTR)抑制剂

[0491] 本公开的方面涉及CFTR抑制剂作为β细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它β细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC-β细胞的任何CFTR抑制剂可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。

[0492] 本领域技术人员可以获得适用于本文中的许多CFTR抑制剂。示例性CFTR抑制剂包括(不限于)美国公布No.2007/0078111中公开的CFTR的LPA2受体激动剂抑制剂、美国专利No.7,888,332中公开的含有酰肼的CFTR抑制剂和WIPO公布No.WO/2008/121877中公开的CFTR抑制剂、美国公布No.2008/0269206中公开的CFTR抑制剂化合物。在一些实施方案中,CFTR抑制剂包含甘氨酸酰肼毛孔闭塞CFTR抑制剂。在一些实施方案中,CFTR抑制剂包含Gly-H101。在一些实施方案中,CFTR抑制剂包含Gly-H101衍生物或类似物(参见例如Muanprasat等人,“Discovery of Glycine Hydrazide Pore-occluding CFTR Inhibitors”,J.Gen.Physiol 2004;124(2):125-137)。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除CFTR抑制剂。

[0493] O-GlcNAc酶抑制剂

[0494] 本公开的方面涉及O-GlcNAc酶抑制剂作为β细胞成熟因子的用途。预期单独或与一种或多种其它β细胞成熟因子组合,能够诱导至少一种产生胰岛素的内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC-β细胞的任何O-GlcNAc酶抑制剂可以用于本文中描述的方法、组合物和试剂盒。本领域技术人员可以获得适用于本文中的许多O-GlcNAc酶抑制剂。示例性O-GlcNAc酶抑制剂包括(不限于)可渗透的糖苷酶抑制剂(参见例如WIPO Pub.No.WO/2013/169576和WO/2013/166654)和选择性糖苷酶抑制剂(参见例如WIPO公布No.WO/2013/000084和WO/2013/000085)。在一些实施方案中,O-GlcNAc酶抑制剂包含Thiamet G。在某些实施方案中,本文公开的方法、组合物和试剂盒排除O-GlcNAc酶抑制剂。

[0495] 混合物组合物

[0496] 本发明的另一方面涉及胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与至少一种β细胞成熟因子的混合物,其例如用于诱导至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化变成SC-β细胞。

[0497] 在本发明的另一个方面中,涉及包含至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞(例如用于分化成SC-β细胞的胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的群体)和至少一种β细胞成熟因子的组合物,例如反应混合物。或者,本公开涉及包含(i)通过化学诱导胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的群体分化成SC-β细胞所产生的SC-β细胞的群体和(ii)至少一种β细胞成熟因子的反应混合物。

[0498] 在一些实施方案中,添加至反应混合物中的至少一种β细胞成熟因子的浓度是足够诱导至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化成如本文中描述的SC-β细胞的剂量。

[0499] 在一些实施方案中,组合物包含约25nM至10μM,或约25nM至50nM,或约50nM至100nM,或约100nM至200nM,或约200nM至约500nM或约500nM至约1μM,或约1μM至2μM,或约2μM至5μM,或约5μM至10μM的至少一种β细胞成熟因子的浓度。

[0500] 在一些实施方案中,组合物或混合物包含至少约5nM,至少约7nM,至少约10nM,至少约12nM,至少约15nM,至少约17nM,至少约20nM,至少约25nM,至少约30nM,至少约35nM,至少约40nM,至少约45nM,至少约50nM,至少约100nM或至少约200nM,或至少约300nM或至少约400nM或至少约500nM或超过500nM,或10-500nM之间的任何整数或5-50nM之间的任何整数,或50-100nM之间的任何整数,或100nM-200nM之间的任何整数或200nM-500nM之间的任何整数的至少一种β细胞成熟因子的浓度。在一些实施方案中,组合物或混合物包含至少约0.1μ

M,或至少约0.2 μ M,或至少约0.3 μ M,或至少约0.4 μ M,或至少约0.5 μ M,或至少约1 μ M,至少约1.5 μ M,至少约2 μ M,至少约2.5 μ M,至少约3 μ M,至少约3.5 μ M,至少约4 μ M,至少约4.5 μ M,至少约5 μ M,至少约6 μ M,至少约7 μ M,至少约8 μ M,至少约9 μ M,或至少约10 μ M,或超过10 μ M,或0.1–0.5 μ M之间的任何整数或约0.5–10 μ M之间的任何整数或0.1–10 μ M之间的任何整数,或0.5–5 μ M之间的任何整数,或5 μ M–10 μ M之间的任何整数的至少一种 β 细胞成熟因子的浓度。

[0501] 组合物和试剂盒

[0502] 本文中描述包含本文中描述的细胞(例如SC- β 细胞或成熟胰腺 β 细胞)的组合物。在一些实施方案中,组合物也包括本文中描述的 β 细胞成熟因子和/或细胞培养基。本文中描述包含本文中描述的化合物的组合物(例如包含一种或多种本文中描述的化合物的细胞培养基)。本文中描述试剂盒。

[0503] 本发明的另一方面涉及用于实施本文公开的方法和制造本文公开的SC- β 细胞或成熟胰腺 β 细胞的试剂盒。在一个方面,试剂盒包括至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞和至少一种如本文中描述的 β 细胞成熟因子,且任选地,试剂盒可以进一步包含用于使用本文中描述的方法将至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞转变成SC- β 细胞的群体的说明书。在一些实施方案中,试剂盒包含至少两种 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含至少三种 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含至少四种 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含至少五种 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含至少六种 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含至少七种 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含至少八种 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含至少九种 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含至少十种 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含用于多潜能细胞分化成定形内胚层细胞的 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含用于定形内胚层细胞分化成原肠管细胞的 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含用于原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞的 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含用于NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞的 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,试剂盒包含用于胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC- β 细胞的 β 细胞成熟因子。

[0504] 在一些实施方案中,试剂盒包含例如用于多潜能细胞分化成定形内胚层细胞、定形内胚层细胞分化成原肠管细胞、原肠管细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞,和胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC- β 细胞的 β 细胞成熟因子的任何组合。

[0505] 在一个实施方案中,试剂盒可以包含用作阳性对照的多潜能干细胞,例如以评估或监测式(I)化合物化学诱导多潜能干细胞分化成至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞并随后分化成SC- β 细胞的有效性或能力。因此,试剂盒可以包含足够量的至少一种 β 细胞成熟因子用于诱导对照多潜能干细胞群体(阳性对照)分化以及诱导相关多潜能干细胞的群体(例如使用者优选的多潜能干细胞,例如iPS细胞)分化成至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞或分化成SC- β 细胞。

[0506] 在一些实施方案中,试剂盒中的化合物可以提供于不漏水或气密性容器中,其在一些实施方案中,基本上不含试剂盒的其它组分。化合物可以供应于超过一个容器中,例如其可以供应于具有足够用于诱导性多潜能干细胞至定形内胚层细胞且随后至胰岛素阳性

内分泌细胞或其前驱细胞且随后至SC- β 细胞的预定数目的反应,例如1、2、3或更大数目的分开反应的试剂的容器中。 β 细胞成熟因子可以呈任何形式提供,例如液体、干燥或冻干形式。优选地,本文中描述的化合物(例如 β 细胞成熟因子)基本上是纯的和/或无菌的。当本文中描述的化合物提供于液体溶液中时,液体溶液优选是水溶液,其中无菌水溶液优选。当本文中描述的化合物呈干燥形式提供时,复原一般是通过添加适合溶剂。溶剂,例如无菌水或缓冲液,可以任选地提供于试剂盒中。

[0507] 在一些实施方案中,试剂盒进一步任选地包含信息材料。信息材料可以是涉及本文中描述的方法和/或本文中描述的化合物用于本文中描述的方法的用途的描述、指导、销售或其它材料。

[0508] 试剂盒的信息材料在其说明书或信息材料方面不受限制。在一个实施方案中,信息材料可以包括有关化合物产生、化合物分子量、浓度、截止日期、批料或生产地点信息等的信息。在一个实施方案中,信息材料涉及用于施用化合物的方法。另外,试剂盒的信息材料在其形式方面不受限制。多数情况下,例如说明书等信息材料提供于印刷品中,例如印刷文件、图式和/或照片,例如标记或印张。然而,信息材料也可以呈其它格式提供,例如盲文、计算机可读材料、录像或录音。在另一个实施方案中,试剂盒的信息材料是联络信息,例如实际地址、电子邮件地址、网址或电话号码,其中试剂盒的使用者可以获得大量有关本文中描述的化合物和/或其在本文中描述的方法中的使用的信息。当然,信息材料也可以呈格式的任何组合提供。

[0509] 在一个实施方案中,信息材料可以包括以适合方式施用如本文中描述的化合物(例如 β 细胞成熟因子)以进行本文中描述的方法的说明书,例如适合剂量、剂型或施用模式(例如本文中描述的剂量、剂型或施用模式)(例如对于体外细胞或体内细胞)。在另一个实施方案中,信息材料可以包括向适合受试者,例如人类,例如患有本文中描述的病症或处于该病症危险中的人类或向体外细胞施用本文中描述的化合物的说明书。

[0510] 除本文中描述的化合物之外,试剂盒的组合物可以包括其它成分,例如溶剂或缓冲剂、稳定剂、防腐剂、调味剂(例如抗苦剂或甜味剂)、香料或其它化妆品成分和/或其它例如用于诱导性多潜能干细胞(例如体外)或用于治疗本文中描述的病状或病症的试剂。或者,其它成分可以包括在试剂盒中,但在不同于本文中描述的化合物的组合物或容器中。在此类实施方案中,试剂盒可以包括用于混合本文中描述的化合物与其它成分或与其它成分一起使用本文中描述的化合物的说明书,例如关于在施用前组合两种试剂的说明书。

[0511] 本文中描述的 β 细胞成熟因子可以呈任何形式提供,例如液体、干燥或冻干形式。优选地,本文中描述的化合物基本上是纯的和/或无菌的。当本文中描述的化合物提供于液体溶液中时,液体溶液优选是水溶液,其中无菌水溶液优选。当本文中描述的化合物呈干燥形式提供时,复原一般通过添加适合溶剂。溶剂,例如无菌水或缓冲液,可以任选地提供于试剂盒中。

[0512] 试剂盒可以包括一个或多个用于含有如本文中描述的至少一种 β 细胞成熟因子的组合物的容器。在一些实施方案中,试剂盒含有分开容器(例如用于两种试剂的两个分开容器)、用于组合物的分配器或隔室和信息材料。举例来说,组合物可以含于瓶子、小瓶或注射器中,且信息材料可以含于塑料套筒或包装中。在其它实施方案中,试剂盒的分开要素含于单个未分的容器内。举例来说,组合物含于衔接呈标签形式的信息材料的瓶子、小瓶或注射

器中。在一些实施方案中,试剂盒包括多个(例如一包)个别容器,各自含有本文中描述的化合物的一个或多个单位剂型(例如本文中描述的剂型)。举例来说,试剂盒包括多个注射器、安瓿、箔包装或泡壳包装,各自含有本文中描述的化合物的单一单位剂量。试剂盒的容器可以是气密、防水(例如水分变化或蒸发不渗透的)和/或不透光的。

[0513] 试剂盒任选地包括适于施用组合物的装置,例如注射器、吸入剂、吸移管、钳子、测量匙、滴管(例如滴眼管)、拭子(例如药棉拭子或木制拭子)或任何此类传送装置。在一个优选的实施方案中,装置是例如包装用于外科介入的医学植入装置。

[0514] 试剂盒也可以包括用于检测SC-β细胞的标记物,例如本文中描述的标记物的组分,例如检测阳性SC-β细胞的试剂。或在一些实施方案中,试剂盒也可以包含用于检测负向选择SC-β细胞的SC-β细胞的阴性标记物或鉴别不表达这些阴性标记物的细胞(例如SC-β细胞)的试剂。试剂可以是例如针对标记物的抗体或用于RT-PCR或PCR反应,例如半定量或定量RT-PCR或PCR反应的引物。此类标记物可以用于评估iPS细胞是否已经产生。如果检测试剂是抗体,那么可以供应于干燥制剂中,例如冻干或溶液中。抗体或其它检测试剂可以连接于标记,例如用于检测的放射性、荧光(例如GFP)或比色标记。如果检测试剂是引物,那么可以供应于干燥制剂中,例如冻干或溶液中。

[0515] 可能需要进行SC-β细胞的核型分析。因此,试剂盒可以包括用于核型分析的组分,例如探针、染料、底物、酶、抗体或用于从细胞制备核型的其它适用试剂。

[0516] 试剂盒可以包括衍生自相同类型的胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的SC-β细胞,例如成熟胰腺β细胞,例如用作阳性细胞类型对照。

[0517] 试剂盒也可以包括关于包括在试剂盒内的两种或超过两种组分的使用的信息材料,例如说明书。

[0518] 信息材料可以是涉及本文中描述的方法和/或本文中描述的化合物用于根据本文中描述的方法分化多潜能干细胞的用途的描述、指导、销售或其它材料。在一个实施方案中,信息材料可以包括有关化合物产生、化合物分子量、浓度、截止日期、批料或生产地点信息等的信息。在一个实施方案中,信息材料涉及用于在本文中描述的至少一种β细胞成熟因子的存在下培养胰岛素阳性内分泌细胞群体的方法。

[0519] 施用细胞的方法

[0520] 在一个实施方案中,本文中描述的细胞,例如SC-β细胞群体是可移植的,例如SC-β细胞的群体可以施用于受试者。在一些实施方案中,施用SC-β细胞群体的受试者是与用于分化成SC-β细胞的多潜能干细胞(例如用于自体同源细胞疗法)所获自的相同受试者。在一些实施方案中,受试者是不同的受试者。在一些实施方案中,受试者罹患糖尿病,例如I型糖尿病,或是正常受试者。举例来说,用于移植的细胞(例如包含SC-β细胞群体的组合物)可以是适于移植,例如器官移植的形式。

[0521] 方法可以进一步包括向有需要的受试者,例如哺乳动物受试者,例如人类受试者施用细胞。细胞来源可以是哺乳动物,优选是人类。细胞来源或接受者也可以是非人类受试者,例如动物模型。术语“哺乳动物”包括生物体,其包括小鼠、大鼠、牛、绵羊、猪、兔、山羊、马、猴、犬、猫,且优选人类。同样地,可移植细胞可以从这些生物体中的任一者中获得,包括非人类转基因生物体。在一个实施方案中,可移植细胞基因工程化,例如细胞包括外源性基因或已经基因工程化而使内源性基因失活或改变内源性基因。

[0522] 包含SC-β细胞群体的组合物可以使用可植入装置施用于受试者。本领域中已知可植入装置和相关技术且适用作其中需要本文中描绘的化合物或组合物的连续或随时间释放的传递的传递系统。另外,可植入装置传递系统可用于靶向化合物或组合物传递的靶向特定点(例如局部部位、器官)。Negrin等人,Biomaterials,22(6):563(2001)。涉及替代传递方法的随时间释放的技术也可以用于本发明。举例来说,基于聚合物技术、持久释放技术和囊封技术(例如聚合物、脂质体)的随时间释放的调配物也可以用于传递本文中描绘的化合物和组合物。

[0523] 包含产生胰岛素的葡萄糖反应性细胞的群体的药物组合物

[0524] 为施用于受试者,通过如本文公开的方法产生的细胞群体,SC-β细胞群体(通过至少一种胰岛素阳性内分泌细胞与至少一种β细胞成熟因子(例如本文中描述的β细胞成熟因子中的任一者、两者、三者、四者、五者或更多者)接触所产生)可以例如于药学上可接受的组合物中施用于受试者。药学上可接受的组合物包含治疗有效量的上述SC-β细胞群体,与一种或多种药学上可接受的载剂(添加剂)和/或稀释剂一起调配。

[0525] 如下文中所详述,本发明的药物组合物可以针对以固体或液体形式施用特别调配,包括适合于以下的药物组合物:(1)经口施用,例如浸液(水性或非性水溶液或悬浮液)、口含锭、糖衣丸、胶囊、丸剂、片剂(例如目标是经颊、舌下和全身性吸收者)、药团、散剂、颗粒、施加于舌的糊剂;(2)胃肠外施用,例如呈例如无菌溶液或悬浮液或持久释放调配物通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射;(3)局部施加,例如呈施加于皮肤乳膏、软膏或控制释放贴片或喷雾;(4)阴道内或直肠内,例如呈子宫托、乳膏或泡沫;(5)舌下;(6)眼;(7)经皮;(8)经粘膜;(9)经鼻。另外,化合物可以植入患者中或使用药物传递系统注射。参见例如Urquhart等人,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.24:199-236(1984);Lewis编辑,“Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals”(Plenum Press,New York,1981);美国专利No.3,773,919;和美国专利No.353,270,960。

[0526] 如本文所用,术语“药学上可接受”是指在合理医学判断的范围内,适于与人类和动物的组织接触而无过度毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症,与合理益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0527] 如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”意指药学上可接受的参与携带或输送本发明化合物从一个器官或身体部分至另一器官或身体部分的物质、组合物或媒介物,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如润滑剂、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或位阻酸)或溶剂囊封材料。各载剂必须与调配物其它成分相容且对患者无害的意义上是“可接受的”。可以作药学上可接受的载剂的物质的一些实例包括:(1)糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素和其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和醋酸纤维素;(4)粉末状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,例如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石;(8)赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;(9)油类,例如花生油、棉籽油、红花子油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;(10)二醇,例如丙二醇;(11)多元醇,例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇(PEG);(12)酯,例如油酸乙酯和十二烷酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH值缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;(22)膨胀剂,例如多肽和氨基酸;(23)血清组分,例如血清白蛋白、

HDL和LDL;(22)C₂-C₁₂醇,例如乙醇;和(23)其它用于医药调配物的无毒相容的物质。润湿剂、着色剂、隔离剂、包衣剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、防腐剂 and 抗氧化剂也可以存在于调配物中。例如“赋形剂”、“载剂”、“药学上可接受的载剂”等等术语在本文中可互换使用。

[0528] 如本文所用,关于细胞群体的短语“治疗有效量”意指例如SC-β细胞或成熟胰腺β细胞等细胞群体或包含本发明SC-β细胞的组合物中相关细胞在动物中的至少细胞子群中以任何医疗可应用的合理益处/风险比有效产生一些所需治疗作用的量。举例来说,施用于受试者的SC-β群体的量足以产生例如糖基化血红蛋白水平、空腹血糖水平、低胰岛素血症等1型、1.5型或2型糖尿病的至少一种症状的统计显著的可测量的变化。治疗有效量的确定完全在本领域的技术人员的能力范围内。一般来说,治疗有效量可以随受试者的历史、年龄、情况、性别以及受试者的医学病状的严重程度和类型以及其它医药活性剂的施用而变。

[0529] 如本文所用,术语“施用”是指通过使组合物至少部分定位在所期望部位,从而产生所期望作用的方法或途径将组合物放置于受试者中。本文中描述的化合物或组合物可以通过本领域中已知的任何适当途径施用,包括(但不限于)经口或胃肠外途径,包括静脉内、肌肉内、皮下、经皮、气道(气溶胶)、肺、鼻、直肠和局部(包括经颊和舌下)施用。

[0530] 示例性施用模式包括(但不限于)注射、输注、滴注、吸入或咽下。“注射”包括(不限于)静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、脑脊髓内和胸骨内注射和输注。在优选的实施方案中,组合物通过静脉内输注或注射来施用。

[0531] 疾病或病症的“治疗”、“预防”或“改善”意指延迟或防止此类疾病或病症发作、逆转、减轻、改善、抑制、减缓或停止进展、加重或老化、与此类疾病或病症相关联的病状的进展或严重程度。在一个实施方案中,疾病或病症的症状减轻至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。

[0532] 通过标准医方法确定糖尿病的治疗。糖尿病治疗的目标是尽可能安全地使水平低至接近于正常。通常设定的目标是饭前80-120毫克/分升(mg/dl)和睡觉时100-140mg/dl。具体医师可以设定所述专利的不同目标,取决于例如患者具有低血糖反应的频率等其它因素。适用医学测试包括在患者的血液和尿上测定血糖水平的测试、糖基化血红蛋白水平的测试(HbA_{1c};在过去的2-3个月中平均血糖水平的量度,正常范围是4-6%)、胆固醇和脂肪水平的测试和尿蛋白水平的测试。此类测试是本领域技术人员已知的标准测试(参见例如American Diabetes Association,1998)。成功的治疗计划也可以通过计划中更少的患者具有例如眼病、肾病或神经疾病等糖尿病并发症来确定。

[0533] 延迟受试者中糖尿病发作是指延迟例如高血糖症、低胰岛素血症、糖尿病性视网膜病、糖尿病性肾病、失明、记忆丧失、肾衰竭、心血管疾病(包括冠状动脉病、外周动脉疾病、脑血管疾病、动脉粥样硬化和高血压)、神经病、自主功能异常、高血糖性高渗性昏迷或其组合等至少一种糖尿病症状发作至少1周、至少2周、至少1个月、至少2个月、至少6个月、至少1年、至少2年、至少5年、至少10年、至少20年、至少30年、至少40年或更多年,且可以包括所述受试者一生。

[0534] 在某些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物,例如人类。术语“患者”与“受试者”在本文中可互换使用。优选地,受试者为哺乳动物。哺乳动物可以是人类、非人类灵长类动物、小鼠、大鼠、犬、猫、马或奶牛,(但不限于)这些实例。除人类以外的哺乳动物

宜用作表示1型糖尿病、2型糖尿病或前糖尿病病状的动物模型的受试者。另外,本文中描述的方法可以用于治疗家养动物和/或宠物。受试者可以是男性或女性。受试者可以是已经预先诊断患有或确定为罹患或患有糖尿病(例如1型或2型)、一种或多种与糖尿病相关的并发症或预糖尿病病状并任选地但不必已经治疗糖尿病、一种或多种与糖尿病相关的并发症或预糖尿病病状者。受试者也可以是未罹患糖尿病或预糖尿病病状者。受试者也可以是已经预先诊断患有或确定为罹患糖尿病、一种或多种与糖尿病相关的并发症或前驱糖尿病病状但展示由于接收糖尿病、一种或多种与糖尿病相关的并发症或前驱糖尿病病状的一种或多种治疗而改善已知糖尿病风险因子者。或者,受试者也可以是预先未诊断为患有糖尿病、一种或多种与糖尿病相关的并发症或前驱糖尿病病状者。举例来说,受试者可以是展现糖尿病、一种或多种与糖尿病相关的并发症或前驱糖尿病病状的一个或多个风险因素者,或未展现糖尿病风险因素的受试者,或无糖尿病、一种或多种糖尿病相关并发症或前驱糖尿病病状的症状的受试者。受试者也可以是罹患糖尿病或前驱糖尿病病状或处于其危险中者。受试者也可以是已经诊断患有如本文中定义的一种或多种与糖尿病相关的并发症或前驱糖尿病病状者,或者受试者可以是先前尚未诊断患有或确定为患有一种或多种与糖尿病相关的并发症或前驱糖尿病病状者。

[0535] 如本文所用,短语“需要SC- β 细胞的受试者”是指经诊断患有或确定为罹患、患有发展性糖尿病(例如1型、1.5型或2型)、一种或多种与糖尿病相关的并发症或前驱糖尿病病状或处于其危险之中的受试者。

[0536] 可以使用任何用于诊断糖尿病的方法鉴别需要SC- β 细胞群体的受试者。举例来说,1型糖尿病可以使用糖基化血红蛋白(A1C)测试、随机血糖测试和/或空腹血糖测试诊断。本领域中已知用于诊断糖尿病的参数且熟练技术人员不费太多力气即可使用。

[0537] 在一些实施方案中,本发明的方法进一步包括选择确定为需要额外SC- β 细胞的受试者。可以基于所呈现的症状,例如1型、1.5型或2型糖尿病的症状选择需要SC- β 细胞群体的受试者。示例性糖尿病症状包括(但不限于)过渴(烦渴)、频繁排尿(多尿)、极度饥饿(贪食)、极度疲劳、重量减轻、高血糖症、低水平胰岛素、高血糖(例如、糖水平超过250mg、超过300mg)、存在于尿中的酮的存在、疲劳、皮肤干燥和/或瘙痒、视力模糊、切口或伤口恢复缓慢、比往常更多感染、脚麻木且感到麻刺、糖尿病性视网膜病、糖尿病性肾病、失明、记忆丧失、肾衰竭、心血管疾病(包括冠状动脉病、外周动脉疾病、脑血管疾病、动脉粥样硬化和高血压)、神经病、自主功能异常、高血糖性高渗性昏迷和其组合。

[0538] 在一些实施方案中,用于施用于受试者的包含SC- β 细胞群体的组合物可以进一步包含医药活性剂,例如本领域中已知用于治疗糖尿病和或具有抗高血糖活性的那些药剂,例如二肽基肽酶4(DPP-4)的抑制剂(例如阿格列汀(Alogliptin)、利拉利汀(Linagliptin)、沙格列汀(Saxagliptin)、西他列汀(Sitagliptin)、维他列汀(Vildagliptin)和黄连素)、双胍(例如二甲双胍(Metformin)、丁双胍(Buformin)和苯乙基二胍(Phenformin));过氧化物酶体增殖子活化受体(PPAR)调节剂,例如噻唑烷二酮(TZD)(例如匹格列酮(Pioglitazone)、瑞格列酮(Rivoglitazone)、罗西格列酮(Rosiglitazone)和曲格列酮(Troglitazone))、双重PPAR激动剂(例如阿格列扎(Aleglitazar)、穆格列扎(Muraglitazar)和特格列扎(Tesaglitazar))、磺酰脲(例如醋磺环己脲(Acetohexamide)、磺胺丁脲(Carbutamide)、氯磺丙脲(Chlorpropamide)、格列齐特(Gliclazide)、甲磺丁脲

(Tolbutamide)、妥拉磺脲(Tolazamide)、优降糖(Glibenclamide)(优降糖(Glyburide))、格列甲嗪(Glipizide)、格列喹酮(Gliquidone)、格列吡脲(Glyclopamide)和格列美脲(Glimepiride))、氯茴苯酸类(“格列奈类”)(例如那格列奈(Nateglinide)、瑞格列奈(Repaglinide)和米格列奈(Mitiglinide))、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和类似物(例如唾液素-4、艾塞那肽(Exenatide)、利拉鲁肽(Liraglutide)、阿必鲁肽(Albiglutide))、胰岛素和胰岛素类似物(例如赖脯胰岛素(Insulin lispro)、天冬胰岛素(Insulin aspart)、赖谷胰岛素(Insulin glulisine)、甘精胰岛素(Insulin glargine)、地特胰岛素(Insulin detemir)、艾倍拉(Exubera)和NPH胰岛素)、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(例如阿卡波糖(Acarbose)、米格列醇(Miglitol)和伏格列波糖(Voglibose))、胰淀素类似物(例如普兰林肽(Pramlintide))、钠依赖性葡萄糖共转运T2(SGLT T2)抑制剂(例如达格列净(Dapgliflozin)、瑞格列净(Remogliflozin)和赛格列净(Sergliflozin))等等(例如苯氟雷司(Benfluorex)和托瑞司他(Tolrestat))。

[0539] 在1型糖尿病中, β 细胞通过持续自身免疫反应被不良地破坏。因此,此自身免疫反应可以通过使用抑制或阻断此类自身免疫反应的化合物减弱。在一些实施方案中,用于施用于受试者的包含SC- β 细胞群体的组合物可以进一步包含作为免疫反应调节剂的医药活性剂。如本文所用,术语“免疫反应调节剂”是指抑制受试者中自身免疫反应的化合物(例如小分子、抗体、肽、核酸或基因疗法试剂)。不希望受理论束缚,免疫反应调节剂通过抑制发炎细胞因子(例如IL-12、IL-23或IL-27)或STAT-4的活性、活化或表达来抑制自身免疫反应。示例性免疫反应调节剂包括(但不限于)由美国专利第6,774,130号(内容以引用的方式整体并入本文中)中描述的利索茶碱(Lisofylline)(LSF)和LSF类似物和衍生物组成的组的成员。

[0540] 包含SC- β 的组合物可以在与医药活性剂或包含其的组合物施用在相同时间或不同时间施用于受试者。当在不同时间施用,用于施用于受试者的包含SC- β 细胞群体和/或医药活性剂的组合物可以在另一者施用5分钟、10分钟、20分钟、60分钟、2小时、3小时、4小时、8小时、12小时、24小时内施用。当包含SC- β 细胞群体的组合物和包含医药活性剂的组合物在不同的药物组合物中施用时,施用途径可以是不同的。在一些实施方案中,受试者施用包含SC- β 细胞的组合物。在其它实施方案中,受试者施用包含医药活性剂的组合物。在另一个实施方案中,受试者施用包含SC- β 细胞群体与医药活性剂的组合物。在另一个实施方案中,受试者施用包含SC- β 细胞群体的组合物和包含医药活性剂的组合物,其中施用基本上是同时的或在彼此之后。

[0541] 施用包含SC- β 细胞群体的组合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中例如测定LD50(群体50%致死剂量)和ED50(50%群体治疗有效剂量)的标准医药程序确定。优选展现大治疗指数的包含SC- β 细胞群体的组合物。

[0542] 可以使用若干大家公认的动物模型测试包含SC- β 细胞群体的组合物的量。

[0543] 非肥胖性糖尿病(NOD)小鼠载有引起在几周龄显示胰岛炎的遗传缺陷(Yoshida等人,Rev. Immunogenet. 2:140,2000)。60-90%女性到20-30周出现显性糖尿病。免疫相关病理似乎类似于人类I型糖尿病中的病理。I型糖尿病的其它模型是具有转基因和剔除突变的小鼠(Wong等人,Immunol. Rev. 169:93,1999)。自发I型糖尿病的大鼠模型近来由Lenzen等人(Diabetologia 44:1189,2001)报导。高血糖症也可以在小鼠中通过单次腹膜内注射链

脲佐菌素(Soria等人,Diabetes 49:157,2000)或通过连续低剂量的链脲佐菌素(Ito等人,Environ.Toxicol.Pharmacol.9:71,2001)诱发(>500mg葡萄糖/dL)。为测试植入的胰岛细胞的功效,监测小鼠葡萄糖返回至正常水平(<200mg/dL)的情况。

[0544] 较大型动物提供了慢性高血糖症后遗症的优良模型。可以通过去除胰腺(J.Endocrinol.158:49,2001)或通过喂食半乳糖(Kador等人,Arch.Ophthalmol.113:352,1995)使犬依赖于胰岛素。荷兰卷尾狮毛狗中也存在I型糖尿病的遗传模型(Am.J.Pathol.105:194,1981)。犬模型的早期工作(Banting等人,Can.Med.Assoc.J.22:141,1922)使得几个加拿大人在1925年2月进行了一次去斯德哥尔摩的长途航海旅行。

[0545] 通过说明,可以通过将SC-β细胞群体植入以下动物中来进行初步研究:a)非糖尿病裸(缺乏T细胞)小鼠;b)通过链脲佐菌素处理患上糖尿病的裸小鼠;和c)在胰部分切除术后胰岛再生的过程中的裸小鼠。移植的细胞数目相当于植入肾囊、肝或胰腺中约1000-2000个正常人类β细胞。关于非糖尿病小鼠,终点可以是评估移植物存活率(组织学检查)和通过生化分析、RIA、ELISA和免疫组织化学确定胰岛素产生。也可以评估链脲佐菌素处理和部分胰腺切除动物的存活率、代谢控制(血糖)和重量增加。

[0546] 在一些实施方案中,从细胞培养分析和动物研究中中获得的数据可以用于调配用于人类的剂量范围。此类化合物的剂量优选在包括几乎没有毒性的ED50的循环浓度范围内。剂量可以在此范围内改变,取决于采用的剂型和利用的施用途径。

[0547] 也可以最初从细胞培养分析估计包含SC-β细胞群体的组合物的治疗有效剂量。剂量可以在动物模型中体内调配以分泌对血浆中循环葡萄糖起反应的适当浓度的胰岛素。或者,任何具体剂量的作用可以通过适合的生物学分析监测。

[0548] 关于治疗持续时间和频率,熟练的临床医师通常监测受试者以确定治疗何时提供治疗益处,并确定是否增加或降低剂量、增加或减少施用频率、停止治疗、重新开始治疗或对治疗方案进行其它改变。给药时程可以在每周一次至每日一次变化,取决于大量临床因素,例如受试者对多肽的敏感性。所需剂量可以一次或分成亚剂量,例如2-4个亚剂量施用,并在一段期间内,例如在一天以适当间隔,或其它适当时程施用。此类亚剂量可以呈单位剂型施用。在一些实施方案中,施用是慢性的,例如一个或多个剂量在数周或数月的时间内每日施用。给药时程的实例是在1周、2周、3周、4周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月或更长时间内每日一次、每日两次、每日三次或每日四次或更多次施用。

[0549] 在本发明的另一方面,所述方法提供如本文公开的SC-β细胞的分离群体。在本发明的一个实施方案中,如本文公开的SC-β细胞的分离群体可以用于产生药物组合物、用于移植至需要治疗的受试者,例如患有或处于出现糖尿病的风险中的受试者,例如(但不限于)具有先天性和获得性糖尿病的受试者。在一个实施方案中,SC-β细胞的分离群体可以进行基因修饰。在另一方面,受试者可以患有或处于糖尿病和/或代谢失调的风险下。在一些实施方案中,如本文公开的SC-β细胞的分离群体可以是自体同源和/或异源的。在一些实施方案中,哺乳动物为哺乳动物,且在其它实施方案中,哺乳动物为人类。

[0550] 如本文公开的SC-β细胞的分离群体的使用提供优于现有方法的优点,因为SC-β细胞群体可以从衍生自干细胞、例如从施用SC-β细胞的分离群体的受试者获得或收获的iPS细胞的胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化。此是高度有利的,因为其提供了可以通过本领域技术人员通常已知的方法从干细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞,接着进一步通

过本文中描述的方法分化成胰腺β样细胞或具有胰腺β细胞特征的细胞,具体地说,不具有衍生自其它系统的细胞的风险和限制的成熟胰腺β样细胞的基本上纯的群体以移植至受试者的SC-β细胞的可再生来源。

[0551] 在另一个实施方案中,SC-β细胞(例如成熟胰腺β细胞或β样细胞)的分离群体可以用作研究分化成产生胰岛素的细胞,例如分化成胰腺β细胞或胰腺β样细胞的特性或内胚层来源细胞发育从胰腺β细胞的通路的模型。

[0552] 在一些实施方案中,胰岛素阳性内分泌细胞或SC-β细胞可以进行基因工程化以包含可操作地连接于当表达或分泌标记物时表达的启动子的标记物,例如标记物可操作地连接于胰岛素启动子,使得当胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化成表达和分泌胰岛素的SC-β细胞时表达标记物。在一些实施方案中,SC-β细胞群体可以用作研究分化成胰岛β细胞或胰腺β样细胞的细胞的分化通路的模型。

[0553] 在其它实施方案中,产生胰岛素的葡萄糖反应性细胞可以用作研究胰岛β细胞在胰腺中和在出现糖尿病和代谢病症的过程中的作用的模型。在一些实施方案中,SC-β细胞可以来自于正常受试者,或来自于载有突变和/或多态现象的受试者,例如引起早期发作型胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)以及青年4型成熟发作糖尿病(MODY4)的基因Pdx1,其可以用于鉴别可以用于治疗患有具有Pdx1突变或多态现象的糖尿病的受试者的小分子和其它治疗剂。在一些实施方案中,SC-β细胞可以进行基因工程化以在治疗性治疗患有糖尿病的受试者中施用于受试者之前校正Pdx1基因中的多态现象。在一些实施方案中,SC-β细胞可以进行基因工程化以携带突变和/或多态现象。

[0554] 在本发明的一个实施方案中,涉及一种治疗受试者的糖尿病或代谢病症的方法,其包括向患有糖尿病和/或代谢病症的受试者施用有效量的包含如本文公开的SC-β细胞群体的组合物。在另一个实施方案中,本公开提供一种治疗糖尿病的方法,其包括向患有糖尿病或出现糖尿病的风险增加的受试者施用对增加的血糖水平起反应而足够产生胰岛素的有效量的包含如本文公开的SC-β细胞群体的组合物。

[0555] 在以上方法的一个实施方案中,受试者是人类且如本文公开的SC-β细胞的群体是人类细胞。在一些实施方案中,本发明涵盖如本文公开的SC-β细胞群体直接施用于受试者胰腺,或全身施用。在一些实施方案中,如本文公开的SC-β细胞群体可以施用于受试者中的任何适合位置,例如血管或肝中的荚膜中,或其中施用的SC-β细胞群体可以对受试者中葡萄糖水平增加起反应而分泌胰岛素的任何适合部位。

[0556] 本发明还针对一种治疗患有因遗传缺陷、身体伤害、环境危害或条件、身体欠佳、肥胖症和本领域的技术人员通常已知的其它糖尿病风险因素而发生的糖尿病或代谢病症的受试者的方法。施用包含SC-β细胞群体的组合物的受试者的治疗功效可以通过临床上公认的准则和测试监测,其包括例如(i)糖基化血红蛋白(A1C)测试,其通过测量附接于血红蛋白(血细胞中携氧蛋白)的血糖的百分比指示受试者过去两个至三个月的平均血糖水平。血糖水平越高,糖附接的血红蛋白越多。两个分开测试上6.5%或更高的A1C水平指示受试者患有糖尿病。6-6.5%的测试值表明受试者患有前驱糖尿病。(ii)随机血糖测试。在随机时间从受试者获取血液样品,且200毫克/分升(mg/dL)-11.1毫摩尔/升(mmol/L)或更高的随机血糖水平指示受试者患有糖尿病。(iii)空腹血糖测试。在空腹过夜后从受试者获取血液样品。70与99mg/dL(3.9与5.5mmol/L)之间的空腹血糖水平是正常的。如果在两个分开测

试上受试者空腹血糖水平是126mg/dL(7mmol/L)或更高,那么受试者患有糖尿病。100至125mg/dL(5.6至6.9mmol/L)的血糖水平指示受试者患有前驱糖尿病。(iv)口服葡萄糖耐量测试。在受试者空腹至少八小时或过夜并接着摄取含糖溶液后获取血液样品,并在两小时后测量血糖水平。血糖水平少于140mg/dL(7.8mmol/L)是正常的。140至199mg/dL(7.8至11mmol/L)的血糖水平视为前驱糖尿病。此有时称为减弱葡萄糖耐量(IGT)。200mg/dL(11.1mmol/L)或更高的血糖水平可以指示糖尿病。

[0557] 在一些实施方案中,施用于有需要的受试者如本文公开的SC-β细胞群体的作用增加运动耐受性或其它生活质量量度并降低死亡率。使用SC-β细胞群体的细胞疗法的作用可以在程序后数天至数周的过程期间明显。然而,可以早在程序后几小时观测到有益作用,且可能持续几年。在一些实施方案中,使用SC-β细胞群体的细胞疗法的作用在程序后两周内出现。

[0558] 在一些实施方案中,如本文公开的SC-β细胞群体可以用于人类患者或需要此类治疗的其它受试者中组织复原或再生。在一些实施方案中,SC-β细胞群体的组合物可以用允许其移植或迁移至预期组织部位并复原或再生功能缺乏区域的方式施用。可以利用适合于施用能够在胰腺或在替代所需位置复原β细胞群体的细胞的特定装置。因此,SC-β细胞可以通过注射施用于接受受试者的胰腺,或通过肌肉内注射施用。

[0559] 在一些实施方案中,包含如本文公开的SC-β细胞群体的组合物在临床疗法、研究、研发和商业目的中具有多种用途。出于治疗的目的,举例来说,出于任何所察觉的需要,例如代谢功能先天性障碍、疾病病状(例如糖尿病)的作用或重大外伤(即胰腺的破坏或胰岛β细胞的丧失或破坏)的结果,可以施用如本文公开的SC-β细胞群体以增强对血糖水平增加起反应而产生胰岛素。在一些实施方案中,如本文公开的SC-β细胞群体施用于受试者,不仅帮助恢复已破坏或在其它方面不健康的组织的功能,而且还促进破坏组织的重塑。

[0560] 为确定细胞组合物用于治疗学施用的适合性,可以首先在适合的动物模型中测试SC-β细胞群体。在一个水平下,评估细胞在体内存活和维持其表型的能力。包含SC-β细胞的细胞组合物可以施用于免疫缺乏动物(例如化学上或通过照射而免疫缺陷的裸小鼠或动物)。在再生长一段时期后收获组织,并评估所施用的细胞或其子代是否仍然存在。

[0561] 此可以通过施用表达可检测的标记(例如绿色荧光蛋白质或β-半乳糖苷酶)的细胞、已经预先标记(例如BrdU或[3H]胸苷)的细胞或随后检测组成性细胞标记物(例如使用人类特异性抗体)进行。施用的SC-β细胞群体的存在和表型可以通过免疫组织化学或ELISA,使用人类特异性抗体,或通过RT-PCR分析,使用引起人类聚核苷酸特异性扩增的引物和杂交条件,根据公布的序列数据来评估。

[0562] 大量用于测试糖尿病的动物模型可用于此类测试,并在本领域中通常已知,例如如以引用的方式并入本文中的美国专利No.6,187,991中公开,以及啮齿动物模型;NOD(非肥胖小鼠)、BB_{DB}小鼠、KDP大鼠和TCR小鼠和如以下中所描述的其它糖尿病动物模型:Rees等人,Diabet Med.2005年4月;22(4):359-70;Srinivasan K等人,Indian J Med.Res.2007年3月;125(3):451-7;Chatzigeorgiou A等人,In Vivo.20093月-4月;23(2):245-58,其以引用的方式并入本文中。

[0563] 在一些实施方案中,如本文公开的SC-β细胞群体可以在任何生理学上可接受的赋形剂中施用,其中SC-β细胞可以找到复制、增殖和/或移植的适当部位。在一些实施方案中,

如本文公开的SC-β细胞群体可以通过注射、导管等等引入。在一些实施方案中,如本文公开的SC-β细胞群体可以冷冻在液氮温度下且储存长时间,能够在解冻后使用。如果冷冻,那么SC-β细胞群体将通常储存在10%DMSO、50%FCS、40%RPMI 1640培养基中。一旦解冻,细胞可以通过使用与培养如本文公开的SC-β细胞相关联的生长因子和/或喂养细胞扩展。

[0564] 在一些实施方案中,如本文公开的SC-β细胞群体可以呈包含在足够无菌条件下制备用于人类施用的等张赋形剂的药物组合物形式供应。关于医学调配物的一般原则,读者参考Cell Therapy:Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn & W. Sheridan 编辑, Cambridge University Press, 1996; 和 Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000。选择包含如本文公开的SC-β细胞群体的组合物的细胞赋形剂和任何相伴组分将根据用于施用的途径和装置修改。在一些实施方案中,包含SC-β细胞群体的组合物也可以包含或伴有一种或多种促进SC-β细胞移植或功能性动员的其它成分。适合成分包括支持或促进SC-β细胞或补充细胞类型、尤其内皮细胞粘附的基质蛋白质。在另一个实施方案中,组合物可以包含可再吸收或生物可降解的基质骨架。

[0565] 在一些实施方案中,如本文公开的SC-β细胞群体可以进行基因改变以引入适用于产生胰岛素的细胞(例如胰腺β细胞)中,例如修复个体的遗传缺陷的基因,可选择标记物等等,或适用于选择从至少一种胰岛素阳性内分泌或其前驱细胞分化的不产生胰岛素的细胞或植入SC-β细胞选择性自杀的基因。在一些实施方案中,SC-β细胞群体也可以进行基因修饰,以增强存活、控制增殖等等。在一些实施方案中,如本文公开的SC-β细胞群体可以通过用适合载体、同源重组或其它适当技术转染或转导来基因改变,使得其表达相关基因。在一个实施方案中,通常在增加端粒酶表达超过在内源性启动子下出现的端粒酶表达的异源启动子下,SC-β细胞群体用编码端粒酶催化组分(TERT)的基因转染(参见国际专利申请WO 98/14592,其以引用的方式并入本文中)。在其它实施方案中,引入可选择标记物,以提供更大纯度的SC-β细胞群体。在一些实施方案中,SC-β细胞群体可以使用含有载体的上清液在8-16h时间期间进行基因改变,接着交换成生长培养基1-2天。基因改变的SC-β细胞可以使用药物选择试剂,例如嘌呤霉素、G418或杀稻瘟菌素选择,接着再培养。

[0566] 基因疗法可以用于修饰细胞以替换基因产物,促进组织再生,治疗疾病或增加细胞在植入受试者后的存活(即防止排斥反应)。

[0567] 在一个替代实施方案中,如本文公开的SC-β细胞群体也可以进行基因改变以增强其参与组织再生或传递治疗基因至施用部位的能力。使用所需基因的已知编码序列设计载体,该基因可操作地连接于广泛特异性或确切地说在分化细胞类型中具有活性的启动子。特别关注进行基因改变以表达例如生长抑素、胰高血糖素和其它因子等一种或多种不同类型的生长因子的细胞。

[0568] 可以利用许多适用于转移外源性基因至如本文公开的目标SC-β细胞中的载体。载体可以是游离型的,例如质粒、病毒源性载体,例如巨细胞病毒、腺病毒等等,或可以经由同源重组或随机整合,整合至目标细胞基因组中,例如逆转录病毒源性载体,例如MLLV、HIV-1、ALV等等。在一些实施方案中,也可以使用逆转录病毒与适当包装细胞系的组合,其中衣壳蛋白质将具有感染如本文公开的SC-β细胞的功能。通常,SC-β细胞和病毒将在培养基中孵育至少约24小时。在一些实施方案中,在分析前,在一些应用中接着使SC-β细胞在培养基

中生长短时间,例如24-73小时或至少两周,且可以使其生长五周或更长时间。常用的逆转录病毒载体是“有缺陷的”,即不会产生有效感染需要的病毒蛋白质。所述载体的复制需要在包装细胞系中生长。

[0569] 逆转录病毒的宿主细胞特异性通过包膜蛋白质env(p120)确定。包膜蛋白质通过包装细胞系提供。包膜蛋白质具有至少三种类型、亲嗜性、双嗜性和异嗜性。包装亲嗜性包膜蛋白质,例如MMLV的逆转录病毒能够感染大部分鼠类和大鼠细胞类型。亲嗜性包装细胞系包括BOSC23(Pear等人(1993)P.N.A.S.90:8392-8396)。载有双嗜性包膜蛋白质的逆转录病毒,例如4070A(Danos等人,上文)能够感染大部分哺乳动物细胞类型,包括人类、犬和小鼠。双嗜性包装细胞系包括PA12(Miller等人(1985)Mol.Cell.Biol.5:431-437);PA317(Miller等人(1986)Mol.Cell.Biol.6:2895-2902);GRIP(Danos等人(1988)PNAS85:6460-6464)。包装异嗜性包膜蛋白质,例如AKR env的逆转录病毒能够感染除鼠类细胞外的大部分哺乳动物细胞类型。在一些实施方案中,载体可以包括后面必须例如使用例如Cre/Lox等重组酶系统细胞去除的基因,或例如通过包括允许选择毒性的基因,例如疱疹病毒TK、Bcl-Xs等等,破坏表达其的细胞。

[0570] 适合的诱导性启动子在所需靶细胞类型,转染细胞或其子代中活化。转录活化意图转录将增至超过靶细胞中基线水平至少约100倍、更通常至少约1000倍。已知在不同细胞类型中诱导的各种启动子。

[0571] 在本发明的一个方面中,如本文公开的SC-β细胞群体适合于全身施用或施用至目标解剖部位。举例来说,SC-β细胞群体可以移植至受试者胰腺或附近,或可以全身施用,例如(但不限于)动脉内或静脉内施用。在替代实施方案中,本发明的SC-β细胞群体可以用适合于胰腺或分泌系统中植入物的多种方式施用,包括(但不限于)胃肠外,包括静脉内和动脉内施用、鞘内施用、心室内施用、实质内、颅内、脑池内、纹状体内和黑质内施用。任选地,SC-β细胞群体与免疫抑制剂结合施用。

[0572] 在一些实施方案中,SC-β细胞群体可以根据优良医疗实践,考虑个别患者的临床病状、施用部位和方法、施用时程、患者年龄、性别、体重和开业医生已知的其它因素来施用和给与。因此达成本文中目的的医学“有效量”由本领域中已知的此类因素决定。所述量必须有效实现改善,包括(但不限于)增加存活率或更快恢复,或改善或消除症状和由本领域的技术人员选择为适当量度的其它指示物。SC-β细胞群体可以在以下场所施用于受试者:门诊、门诊办公室、急诊部、医院病房、加护病房、手术室、导管插入术房和放射房。

[0573] 在其它实施方案中,SC-β细胞群体储存用于后面植入/输注。SC-β细胞群体可以分成超过一个等分试样或单元,使得一部分SC-β细胞群体保留用于后面应用,而其它部分立刻应用于受试者。所有或部分细胞在细胞银行中中等至长期储存也在本发明的范围内,如美国专利申请序号20030054331和专利申请No.W003024215中公开,并以引用的方式整体并入。在处理结束时,浓缩细胞可以负载于例如注射器等传递装置中,以通过本领域技术人员已知的任何方式放置于接受者中。

[0574] 在一些实施方案中,SC-β细胞群体可以单独或其它细胞、组织、组织片段、生长因子(例如VEGF和其它已知的血管生成或动脉生成生长因子)、生物学活性或惰性的化合物、可再吸收塑料骨架或其它意图增强群体传递、功效、可耐受性或功能的添加剂组合应用。在一些实施方案中,SC-β细胞群体也可以通过插入DNA或通过以改变、增强或补充细胞

的功能以达成结构或治疗学目的的方式,放入细胞培养物中来修饰。举例来说,用于干细胞的基因转移技术为本领域的技术人员已知,如(Morizono等人,2003;Mosca等人,2000)公开,且可以包括病毒转染技术,且更确切地说,腺病毒相关病毒基因转移技术,如(Walther和Stein,2000)和(Athanasopoulos等人,2000)中公开。基于非病毒的技术也可以如(Muramatsu等人,1998)中公开进行。

[0575] 在另一方面,在一些实施方案中,SC- β 细胞群体可以与编码促血管生成生长因子的基因组合。也可以应用编码抗细胞凋亡因子或试剂的基因。添加基因(或基因的组合)可以通过本领域中已知的任何技术,包括(但不限于)腺病毒转导、“基因枪”、脂质体介导的转导和逆转录病毒或慢病毒介导的转导、质粒腺病毒相关病毒。细胞可以与载有能够随着时间推移释放和/或呈现基因至细胞,使得转导可以继续或被引发的基因传递媒介物的运载物质一起植入。尤其当细胞和/或含有细胞的组织施用于除细胞和/或组织所获自的患者以外的患者时,一种或多种免疫抑制剂可以施用于接收细胞和/或组织的患者以减少且优选防止移植排斥反应。如本文所用,术语“免疫抑制药物或试剂”意图包括抑制或干扰正常免疫功能的药剂。适合本文公开的方法的免疫抑制剂的实例包括抑制T细胞/B细胞共刺激通路的药剂,例如干扰T细胞和B细胞经由CTLA4和B7通路偶合的药剂,如以引用的方式并入本文中的美国专利公布No. 2002/0182211中公开。在一个实施方案中,免疫抑制剂是环孢素A。其它实例包括霉酚酸酯(myophenylate mofetil)、雷帕霉素(rapamycin)和抗胸腺细胞球蛋白。在一个实施方案中,免疫抑制药物与至少一种其它治疗剂一起施用。免疫抑制药物在与施用途径相容的调配物中施用且以足够实现所需治疗作用的剂量施用于受试者。在另一个实施方案中,免疫抑制药物短暂施用足以诱发对本发明的心血管干细胞的耐受性的时间。

[0576] 本发明还涵盖包含有效量的SC- β 细胞群体的药物组合物。这些组合物包含有效数目的SC- β 细胞,任选地与药学上可接受的载剂、添加剂或赋形剂组合。在本发明的某些方面,SC- β 细胞群体在无菌生理食盐水中施用于需要移植的受试者。在本发明的其它方面,SC- β 细胞群体在汉克平衡盐液(Hanks Balanced Salt Solution, HBSS)或Isolyte S, pH7.4中施用。也可以使用其它方法,包括使用无血清细胞培养基。在一个实施方案中,SC- β 细胞群体在血浆或胎牛血清和DMSO中施用。在某些适应症中SC- β 细胞群体全身性施用至受试者可能是优选的,而在患病和/或破坏组织部位或其附近处施用在其它适应症中可能是优选的。

[0577] 在一些实施方案中,SC- β 细胞群体可以任选地包装在具有书面说明书的适合容器中,该容器用于达成所需目的,例如在施用于受试者之前复原或解冻(如果冷冻)SC- β 细胞群体。

[0578] 在一个实施方案中,如本文公开的SC- β 细胞的分离群体与分化试剂一起施用。在一个实施方案中,SC- β 细胞与分化试剂组合施用于受试者。在另一个实施方案中,细胞与分化试剂分开施用于受试者。任选地,如果细胞与分化试剂分开施用,那么细胞与分化试剂的施用在时间上分开。分开时间可以在约少于一分钟至约数小时或数天范围内。本领域技术人员容易且按常规来确定施用的最佳时间安排和次序的确定。

[0579] 糖尿病的诊断

[0580] 1型糖尿病是破坏胰腺的产生胰岛素的 β 细胞的自体免疫疾病。缺乏胰岛素引起空

腹血糖(非糖尿病者中约70-120mg/dL)增加,其开始出现在尿中超过肾阈(大多数人中约190-200mg/dl)。世界卫生组织定义糖尿症的空腹血糖浓度的诊断值为7.0mmol/l(126mg/dl)和更高(全血6.1mmol/l或110mg/dl)或11.1mmol/l或更高(200mg/dl或更高)的2小时葡萄糖水平。

[0581] 1型糖尿病可以使用包括(但不限于)以下的多种诊断测试诊断:(1)糖化血红蛋白(A1C)测试、(2)随机血糖测试和/或(3)空腹血糖测试。

[0582] 糖化血红蛋白(A1C)测试是反映在前两个至三个月期间受试者的平均血糖水平的血液测试。测试测量附接于血红蛋白的血糖的百分比,其与血糖水平相关(例如血糖水平越高,血红蛋白糖基化越多)。两个分开测试上6.5%或更高的A1C水平指示糖尿病。6%与6.5%之间的结果视为前驱糖尿病,其指示出现糖尿病的高风险。

[0583] 随机血糖测试包含在随机时间点从怀疑患有糖尿病的受试者获得血液样品。血糖值可以用毫克/分升(mg/dL)或毫摩尔/公升(mmol/L)表达。200mg/dL(11.1mmol/L)或更高的随机血糖水平指示受试者可能患有糖尿病,尤其当结合例如频繁排尿和极渴等任何糖尿病征象和症状时。

[0584] 对于空腹血糖测试,在空腹过夜后获得血液样品。空腹血糖水平少于100mg/dL(5.6mmol/L)视为正常的。100至125mg/dL(5.6至6.9mmol/L)的空腹血糖水平视为前驱糖尿病,而两个分开测试上126mg/dL(7mmol/L)或更高的水平指示糖尿病。

[0585] 也可以使用C-肽分析(其为内源性胰岛素产生的量度)区分1型糖尿病与2型糖尿病。通过葡萄糖耐量测试确定的存在抗胰岛抗体(谷氨酸脱羧酶、胰岛瘤相关肽-2或胰岛素)或缺乏胰岛素抗性也指示1型,因为许多2型糖尿病继续内部产生胰岛素,且所有都具有一定程度的胰岛素抗性。

[0586] 已提出测试GAD 65抗体作为区分1型和2型糖尿病的改良测试,因为似乎免疫系统与1型糖尿病病源相关。

[0587] 在一些实施方案中,本公开提供施用通过如本文公开的方法产生的SC-β细胞群体恢复需要此类疗法的受试者中的胰岛功能的组合物。与胰腺内分泌物(胰岛素、胰高血糖素或生长抑素)产生不充分有关的任何病状或不能适当调节分泌可以考虑用依据本发明制备的细胞(例如SC-β细胞群体)治疗,视情况而定。特别关注I型(胰岛素依赖性)糖尿症的治疗。

[0588] 可以基于证实长期依赖于施用外源性胰岛素和可接受的风险型态,选择有需要的受试者用于治疗。受试者大概每公斤体重接收10,000个SC-β细胞或细胞同等物。如果细胞不是自体同源,那么为克服异型错配,受试者可以在手术前用例如FK506和雷帕霉素(经口)和达珠单抗(daclizumab)(静脉内)等免疫抑制剂治疗。包含SC-β细胞群体的组合物可以经由导管注入门静脉中。接着受试者可以进行腹部超声波和血液测试以确定肝功能。追踪每日胰岛素需求,且需要时,给与受试者第二次移植。追踪监测包括频繁的药物水平血液测试、免疫功能、整体健康状态和患者是否仍然是胰岛素非依赖性的。

[0589] 管理糖尿病患者的通用方法提供于标准教科书,例如the Textbook of Internal Medicine,第3版,W.N.Kelley编辑,Lippincott-Raven,1997;和专业参考书,例如Diabetes Mellitus:A Fundamental and Clinical Text第2版,D.Leroith编辑,Lippincott Williams&Wilkins 2000;Diabetes(Atlas of Clinical Endocrinology第2卷)C.R.Kahn

等人编辑,Blackwell Science 1999;和Medical Management of Type 1 Diabetes第3版, McGraw Hill 1998。胰岛细胞用于治疗I型糖尿病的用途最后论述于Cellular Inter-Relationships in the Pancreas:Implications for Islet Transplantation, L.Rosenberg等人,Chapman&Hall 1999;和Fetal Islet Transplantation,C.M.Peterson等人编辑,Kluwer 1995。

[0590] 一如既往,受试者选择、施用模式和SC-β细胞群体的剂量的最终责任是管理临床医师的责任。出于商业分销的目的,如本文公开的SC-β细胞群体通常呈包含在用于人类施用的足够无菌条件下制备的等张赋形剂的药物组合物形式供应。本发明还包括在制造、分销或使用期间随时存在的SC-β细胞群体组。SC-β细胞群体组包含本公开中描述的两种或超过两种细胞群体的任何组合,例如(但不限于)定形内胚层细胞分化成pdx1阳性胰腺祖细胞,和其随后分化成例如产生胰岛素的细胞,例如成熟胰腺β细胞或成熟胰腺β样细胞(术语如本文中定义)。在一些实施方案中,包含SC-β细胞群体的细胞组合物可以与有时共享相同基因组的其它细胞类型,例如其它分化细胞类型组合施用(例如植入受试者)。此组中各细胞类型可以包装在一起,或包装在相同设施中分开容器内,或在不同的位置,在相同实体或共享事务联系的不同实体的控制下。

[0591] 关于细胞组合物的医学调配的一般原则,读者参考Cell Therapy:Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G.Morstyn&W.Sheridan编辑,Cambridge University Press,1996。组合物任选地包装在用于达成所需目的,例如治疗糖尿病的具有书面说明书的适合容器中。

[0592] 在一些实施方案中,包含根据SC-β细胞群体的组合物也可以用作设计成能产生胰岛细胞的一种或多种内分泌多肽的机械装置中的功能组分。以其最简单形式,装置在防止细胞群体通过、将它们保留在装置中、但允许细胞群体分泌的胰岛素、胰高血糖素或生长抑素通过的半透薄膜后面含有SC-β细胞群体。此包括微囊封的SC-β细胞群体,通常呈细胞簇形式以允许抑制去分化的细胞相互作用。举例来说,美国专利No.4,391,909描述囊封在球状半透薄膜中的胰岛细胞,所述半透薄膜由多糖聚合物 $>3,000\text{mol}$ 重量构成,所述聚合物交联使得其能渗透胰岛素尺寸的蛋白质,但不能渗透超过 $100,000\text{mol}$ 重量的分子。美国专利No.6,023,009描述囊封在由琼脂糖和琼脂胶制成的半透薄膜中的胰岛细胞。此性质的微胶囊适宜施用至糖尿病患者的体腔中,且认为具有减少组织相容性问题或对细菌的敏感性的某些优点。

[0593] 还涵盖更精密的装置供使用,以包含SC-β细胞群体,每一者用于植入糖尿病患者或用于身体外疗法。美国专利No.4,378,016描述含有身体外区段、皮下区段和含有产生激素的细胞的可替换包膜的人工内分泌腺。美国专利No.5,674,289描述一种生物人工胰腺,其具有胰岛腔室,由半透薄膜与对周围组织敞开的一个或多个血管化腔室分开。适用装置通常具有适合于含有胰岛细胞的腔室,和由半透薄膜与胰岛细胞分开的收集从胰岛细胞分泌的蛋白质且也可以允许例如循环葡萄糖水平的信号传导回胰岛细胞的腔室。

[0594] 鉴别增加SC-β细胞或胰腺β细胞产生的β细胞成熟因子的方法

[0595] 本文中描述一种鉴别增加SC-β细胞(例如成熟胰腺β细胞)产生的β细胞成熟因子或试剂的方法。在某些实例中,提供一种高内含物和/或高通量筛选法。所述方法包括将至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞暴露于至少一种化合物(例如文库化合物或本

文中描述的化合物)并确定化合物是否增加例如成熟胰腺β细胞等SC-β细胞从至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞产生。细胞可以使用一种或多种本文中描述的标记物鉴别为SC-β细胞(例如成熟胰腺β细胞)。在一些实例中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞可以在暴露于文库之前分化。在其它实例中,两种或超过两种化合物可以个别或一起用于筛选分析中。在其它实例中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞可以放入多孔板中,且通过将文库的各种成员放入多孔板的不同孔来筛选化合物文库。此类文库筛选可以迅速地鉴别能够从至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞产生SC-β细胞,例如成熟胰腺β细胞的化合物。

[0596] 在一些实施方案中,所述方法进一步包含分离SC-β细胞群体,例如胰腺β细胞(例如受试者细胞类型的至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、50%、75%或更多)。

[0597] 在一些实施方案中,所述方法进一步包含将通过如本文公开的方法产生的SC-β细胞植入受试者(例如患有糖尿病,例如I型、II型或1.5型糖尿病的受试者)。在一些实施方案中,SC-β细胞来源于从受试者中获得的干细胞。在一些实施方案中,SC-β细胞衍生自来自不同于受试者,例如受试者亲属的供体的干细胞。

[0598] 在一个方面,本发明提供通过本文中描述的方法制备的SC-β细胞,例如成熟胰腺β细胞。在另一方面,本发明提供包含通过本文中描述的方法制备的SC-β细胞的组合物。

[0599] 在另一方面,本公开提供一种试剂盒,其包含:胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞;本文中描述的至少一种β细胞成熟因子;和关于使用胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞和至少一种β细胞成熟因子产生SC-β细胞(例如成熟胰腺β细胞)的说明书。在一些实施方案中,试剂盒进一步包含:用于检测成熟β细胞的标记物,例如本文中描述的标记物的组分,例如用于检测β细胞成熟的标记物的试剂,例如针对标记物的抗体;和例如用作对照的成熟胰腺β细胞。

[0600] 在一些实施方案中,试剂盒进一步包含:使例如定形内胚层细胞等内胚层细胞分化成第二细胞类型细胞,例如至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的组分;和使用本文中描述的内胚层细胞(例如定形内胚层细胞)和该组分产生第二类型细胞,例如至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞的说明书。在一些实施方案中,试剂盒进一步包含:用于检测第二细胞类型的细胞的标记物,例如本文中描述的标记物的组分,例如用于检测Pdx1的试剂,例如针对标记物的抗体;和例如用作对照的细胞或第二细胞类型,例如至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞。

[0601] 在一个方面,本公开提供一种促进胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC-β细胞的方法,其包括提供至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞,并提供至少一种β细胞成熟因子(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种本文中描述的β细胞成熟因子),以在干细胞暴露于至少一种β细胞成熟因子后使至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化成SC-β细胞(例如成熟胰腺β细胞)。在一些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞来自于哺乳动物。在一些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞来自于小鼠或人类。在一些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞衍生自培养胚胎干细胞(例如哺乳动物胚胎干细胞,例如小鼠或人类胚胎干细胞)。在一些实施方案中,至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞衍生自培养诱导性多潜能干细胞(例如哺乳动物iPs细胞,例如小鼠或人类iPs细胞)。

[0602] 在一些实施方案中,例如通过多个胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞与至少一种、至少两种、至少三种或更多种如本文中描述的 β 细胞成熟因子接触,使所述多个胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化成多个成熟胰腺 β 细胞或SC- β 细胞。

[0603] 在一些实施方案中,多个胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞暴露于 β 细胞成熟因子约1、2、4、6、8、10、12、14、16或更多天。在一些实施方案中,多个胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞暴露于约25nM、50nM、100nM、150nM、200nM、250nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M或10 μ M的浓度的 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,多个胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞暴露于约250nM、400nM、500nM、600nM、700nM或800nM的浓度的 β 细胞成熟因子。在一些实施方案中,超过约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化成成熟胰腺 β 细胞或SC- β 细胞。

[0604] 在一些方面,本公开提供使用本文中描述的SC- β 细胞构建的人工胰岛。在一些方面,人工胰岛包含一个或多个例如根据本文中描述的方法从多潜能干细胞体外分化的SC- β 细胞。

[0605] 在一些方面,本公开提供一种包含从多潜能干细胞体外分化的SC- β 细胞的人工胰腺。

[0606] 应了解上述详细描述及其后实例仅仅是例示性的且不应视为限制本发明的范围。可以在不脱离本公开的精神和范围下对所公开的实施方案进行本领域技术人员显而易见的各种改变和修改。此外,鉴别的所有专利、专利申请和公布都以引用的方式明确并入本文中以描述并公开例如此类公布中描述的方法可以是与本公开结合施用的方法。这些公布在本申请的编档日期前完全提供其公开内容。在这方面,不应看作是认可由于先前发明或任何其它原因,本发明人无权先于此类公开。所有关于日期的声明或关于这些文献的内容的表述是基于申请者可以获得的信息且不构成关于校正这些文献的日期或内容的任何认可。

实施例

[0607] 实施例1-体外产生功能性胰腺 β 细胞

[0608] 概述

[0609] 产生胰岛素的胰腺 β 细胞从干细胞体外产生将为糖尿病的药物发现和细胞移植疗法提供空前的细胞来源。然而,以前从人类多潜能干细胞(hPSC)产生的产生胰岛素的细胞缺乏许多真实 β 细胞的特征,包括体外和/或体内功能。本文中描述的工作证明了一种从hPSC体外产生SC- β 细胞的示例性可量的分化方案。意外地且出人意料地,这些SC- β 细胞对多次连续葡萄糖激发起反应而分泌大量比得上成人 β 细胞的胰岛素,流出Ca²⁺,表达在 β 细胞中发现的标记物并将胰岛素包装成分泌颗粒。作为概念证明,体外SC- β 细胞还对已知的糖尿病药物和增殖标志起反应。此外,SC- β 细胞在移植后立刻在小鼠血清中分泌高水平的人类胰岛素,且这些细胞的移植立刻改善糖尿病小鼠的高血糖症。本文中描述的工作代表了使用干细胞衍生 β 细胞(即SC- β 细胞)用于治疗糖尿病和体外 β 细胞研究和药物筛选的主要发展。

[0610] 以下工作证实了根据本文中描述的方法产生的SC- β 细胞的几个优点,举例来说,SC- β 细胞在体外进行葡萄糖刺激的胰岛素分泌,在基因表达和超微结构上类似于人类胰岛

β 细胞,分泌人类胰岛素并在移植至小鼠中时改善高血糖症,提供细胞疗法的新平台(例如移植至需要额外和/或功能性 β 细胞的受试者中)、药物筛选(例如用于胰岛素产生/分泌、存活、去分化等等)、研究工作(例如确定正常与糖尿病 β 细胞之间的功能差异)和组织工程化(例如使用SC- β 细胞作为重建胰岛的第一细胞类型)。

[0611] 引言

[0612] 人类多潜能干细胞(hPSC)的发现使得替换细胞和组织有一天可以针对疾病治疗或药物筛选而产生。过去十年间的研究已经通过产生如神经元或心肌细胞等以其它方式很难获得的细胞的策略的发展,使此领域至更接近所述目标(Kriks等人,2011;Shiba等人,2012)。这些细胞还移植至动物模型中并能够移植至宿主中,在一些情况下,具有有益的作用,如用干细胞衍生心肌细胞抑制心律不整(Shiba等人,2012)、用少突神经胶质细胞祖细胞恢复脊椎损伤后的运动能力(Keirstead等人,2005)或在视网膜上皮细胞移植至失明啮齿动物模型中后视力增加(Lu等人,2009)。

[0613] 可以通过干细胞衍生组织治疗的最迅速增长疾病之一是糖尿病,根据国际糖尿病联合会,其影响全世界超过3亿人。1型糖尿病由胰岛中 β 细胞的自体免疫破坏引起,而更常见的2型糖尿病由外周组织胰岛素抗性和 β 细胞功能异常引起。这些患者,尤其是那些罹患1型糖尿病的患者,可以通过移植新的功能性 β 细胞来治愈。尸体人类胰岛的移植已经证实经由此策略,患者可以不依赖于胰岛素五年或更长时间,但此方法由于缺乏供体人类胰岛而非常有限(Bellin等人,2012)。人类 β 细胞从干细胞无限供应的产生可以延伸此疗法至数百万的新患者。 β 细胞是再生药品的理想测试例子,因为仅仅需要产生单一细胞类型且那些细胞可以在可进入维管结构的免疫保护装置(例如如本文中描述的微胶囊)或材料内放在体内任何地方。

[0614] 鉴别可以增加 β 细胞功能或增殖的新药的医药筛选还被有限的尸体胰岛供应和由于其死亡原因、供体遗传背景和其分离的其它因素变化而引起的高度可变性阻碍。因此,SC- β 细胞的一致、均一供应提供了糖尿病的独特且有用的药物发现平台。

[0615] 迄今为止的研究已经向从hPSC体外产生 β 细胞谱系取得相当大的进展。定形内胚层和随后胰腺祖细胞现在可以高效率分化(Kroon等人,2008;D'Amour等人,2006;D'Amour等人,2005;Rezania等人,2012)。重要地,这些细胞可以在移植至啮齿动物中后三至四个月内进一步分化成功能性 β 细胞(Kroon等人,2008;Rezania等人,2012),指示在提供足够适当标志下其含有发育成为 β 细胞的发育潜能。不幸地,细胞在体内进行的长达数月的过程仍然是一个黑盒子,且不清楚此过程是否在人类患者中有效。其它工作已经集中在产生胰岛素的细胞从人类胰腺祖细胞体外产生。然而,迄今为止产生的细胞不是真实的 β 细胞。这些细胞或未能进行体外葡萄糖刺激的胰岛素分泌,未能表达适当 β 细胞标记物,如NKX6-1或PDX1,异常共表达其它激素,如胰高血糖素,未能在体内移植后起作用,或显示这些异常特征的组合(D'Amour等人,2006;Cheng等人,2012;Narayanan等人,2013;Xie等人,2013;Nostro等人,2011)。

[0616] 本文中描述的工作提供了一个实际上无限的体外从hPSC大规模生产功能性人类 β 细胞的策略。通过在三维细胞培养系统中组合使用信号传导通路的连续调节,可以产生单激素产生胰岛素的细胞(SC- β 细胞),其共表达关键的 β 细胞标记物并显示 β 细胞超微结构特征。此外,这些细胞在体外与体内模拟人类胰岛的功能。最后,细胞证实其用于糖尿病的体

外药物筛选和体内移植疗法的双重目标的效用的概念证明。

[0617] 结果

[0618] 体外从hPSC产生感知葡萄糖的分泌胰岛素的β细胞

[0619] 图1A中概述体外从hPSC产生功能性β细胞的一种示例性方法。为产生大量β细胞，利用可量的基于悬浮液的培养系统，其可以产生 $>10^8$ hPSC和后面分化的细胞类型(Schulz等人,2012)。使用由先前公布改编而来的方案(图1B)(Schulz等人,2012;Rezania等人,2012)，将直径大概100–200μm的HUES8人类胚胎干细胞簇诱导成高度纯的定形内胚层($>95\%$ Sox17+)和随后早期胰腺祖细胞($>90\%$ PDX1+)。接着，鉴别一种使用长时间与FGF家族成员KGF、刺猬抑制剂Sant1和低浓度视黄酸一起培养，产生高水平的共表达NKX6-1+/PDX1+的胰腺祖细胞簇($>60\%$ NKX6-1+/PDX1+细胞)的方法(图1A)。已经报导这些胰腺祖细胞移植至小鼠中在3–4个月后体内产生功能性β细胞(Rezania等人,2012)。此用作发展所述方案的起点，概括功能性β细胞的此体外产生。

[0620] 接着使用以前公布的方案(对照分化)或者新发展的方案(新分化)使NKX6-1+/PDX1+胰腺祖细胞分化成表达C-肽的内分泌细胞。对照分化方案在几个月内产生作为单激素INS+和INS+/GCG+或INS+/SST+多激素(PH)细胞的细胞。名称PH用以指此细胞群体。另一方面，所述新的分化方案涉及2–3周的一系列独特培养步骤，刺猬信号传导抑制、视黄酸信号传导、 γ -分泌酶抑制、TGFβ信号传导抑制、EGF信号传导、甲状腺激素信号传导和胰岛培养基CMRL 1066(Nostro等人,2011;Rezania等人,2012;Thowfeequ等人,2007;Aguayo-Mazzucato等人,2013;D'Amour等人,2006)。假定以此新的分化方案产生的C-肽+细胞类似于初级成人β(1°β)细胞，因而称为干细胞-β(SC-β)细胞(即SC-β细胞)。

[0621] β细胞的关键功能特征是其能够重复进行葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)。几乎所有存在的定向分化方案都从无法体外进行GSIS的hPSC产生表达胰岛素的细胞(D'Amour等人,2006)。已经报导一种使用内胚层祖细胞谱系作为开始群体的方案，其可以制造可以对单次葡萄糖激发起反应而分泌一些胰岛素的细胞(Cheng等人,2012)。相反地，利用本文中描述的方法产生的SC-β细胞可以对至少三次连续高葡萄糖激发起反应。这些细胞以类似于初级成人β细胞的模式分泌高水平的胰岛素，而来自控制方案的PH细胞未能对葡萄糖起反应(图2A–2C和图3A–2C)。SC-β细胞与初级成人β细胞相比，如通过高葡萄糖(20mM)相对于低葡萄糖(2mM)下所分泌的胰岛素的比率计算的刺激指数类似，分别为 2.3 ± 0.9 和 2.3 ± 1.4 。另外，存在SC-β细胞与初级成人β细胞均不起反应的小百分比的高葡萄糖激发。此外，SC-β细胞对20mM葡萄糖起反应，每细胞分泌的胰岛素的量与初级成人β细胞分泌的量无法区别，分别是每 10^3 个细胞 2.6 ± 1.6 和 2.5 ± 1.2 μIU。总之，此数据表明使用新的分化方案产生的SC-β细胞的体外功能非常类似于其真实的初级成人β细胞对应物。

[0622] 后面通过测量细胞内 Ca^{2+} 的变化，证实使用分化方案产生的SC-β细胞的体外功能性。β细胞通过钙信号传导感知葡萄糖水平改变；葡萄糖水平增加引起膜去极化，造成钙离子流入，触发胰岛素释放(Mohammed等人,2009)。因此，使用荧光显微术实时监测用Fluo-4AM(一种荧光钙指示物染料)染色的细胞簇中钙流入(图4A)。此方法允许在群体与单细胞水平上分析钙通量，并展示SC-β细胞与初级成人β细胞通过与正常GSIS一致，以相同的方式重复增加细胞内 Ca^{2+} ，均对连续葡萄糖激发起反应，而以对照分化方案产生的PH细胞显示异常钙反应，与其异常GSIS一致(图4B)。当进行单细胞分析时，大部分的个别SC-β细胞和初级

成人 β 细胞通过流出钙,对2-3次连续葡萄糖激发起反应,而大部分的PH细胞对0次激发起反应(图4C-4E)。不同于啮齿动物 β 细胞,已知人类 β 细胞显示对高葡萄糖起反应的不同程度(Rutter和Hodson,2013)。这些数据说明SC- β 细胞簇内的整个群体和个别细胞类似于分离胰岛内的 β 细胞起作用,且进一步支持使用新的分化方案产生的SC- β 细胞在体外起作用的结论。

[0623] 来自hPSC的干细胞衍生 β 细胞类似于原代人类 β 细胞

[0624] 在注意到SC- β 细胞像初级成人 β 细胞在体外起作用后,接着两个细胞群体通过蛋白质表达、基因表达和超微结构分析。不同于大部分的以前报导的hPSC衍生的产生胰岛素的细胞,这些SC- β 细胞表达正常 β 细胞标记物PDX1和NKX6-1两者(图5A和5B)。观测到罕有的非 β 细胞激素,但不与NKX6-1/C-肽共同阳性细胞共同定位(图5C)。针对胰岛素与C-肽(胰岛素原加工的化学计量副产物),SC- β 细胞染色呈阳性,指示胰岛素染色来自细胞内源性的胰岛素产生(图6)且针对ISL1、MAFA和MAFB染色(图7A-7C)。流动式细胞测量术定量揭露本文中描述的方法可以产生40%NKX6-1/C-肽,类似于尸体人类胰岛中发现的百分比(图5D)。此外,仅仅8%的总C-肽+细胞共表达胰高血糖素且4%共表达生长抑素(图8A-8C)。虽然以前已经在一个研究中报导基本上单激素细胞,但那些细胞未显示表达关键的 β 细胞身份标记物NKX6-1或在体内起作用(Cheng 2012)。近来的工作已经展示产生较高水平的NKX6-1的指导分化方案引起胰腺祖细胞移植更好的移植结果(Rezania等人,2013)。另外,条件性基因敲除研究已经展示NKX6-1表达是成人小鼠胰岛中 β 细胞功能所必需的,表明这些因子在细胞中的共同表达可以帮助解释其功能性(Taylor等人,2013)。

[0625] 几个关键的 β 细胞标记物的增加的蛋白质表达指示这些细胞的转录网络与人类胰岛 β 细胞最佳匹配。近来的工作已经证实通过先前的方案产生的INS+PH细胞不类似于成人胰岛INS+ β 细胞(Hrvatin等人,2014;Xie等人,2013)。通过以前公布的方案产生的分类INS+细胞的微阵列分析展示其与胎儿 β 细胞一起簇集,而非与经由相同的方法分类的功能性成人人类 β 细胞一起簇集。

[0626] 为比较本公开的SC- β 细胞与成年人类胰岛,使用相同的方法将INS+/NKX6-1+细胞分类并通过微阵列进行总基因表达分析。不同于以前公布的干细胞衍生的INS+PH细胞,与胎儿 β 细胞或INS+PH细胞相比,本文中描述的SC- β 细胞更紧密地与人类成年 β 细胞一起簇集(图5E)。另外,这些数据表明与先前的INS+PH细胞相比,像PDX1、MX1和NKX2-2等规范 β 细胞基因的表达在SC- β 细胞与成年人类 β 细胞之间更类似。数据集中前100个最区别表达的基因的分析还表明与先前的PH或胎儿 β 细胞相比,SC- β 细胞和成年人类 β 细胞彼此更类似(图5F)。SC- β 细胞与人类成年 β 细胞之间仍然有差异,这些差异可以随着分化晚期期间培养基组合物的其它微小变化而增加。

[0627] 因为SC- β 细胞的基因和蛋白质表达模式类似于原代人类 β 细胞,所以假定SC- β 细胞还应像真实 β 细胞那样,将其胰岛素蛋白质包装成适当分泌颗粒。 β 细胞将胰岛素包装成分泌颗粒,这些颗粒最初为浅灰色,带有晕环,且进一步成熟成具有光晕的深色结晶的多角颗粒(图9A)。从干细胞产生的INS+细胞的先前研究揭露这些细胞仅仅具有多激素和 α 样颗粒,其为具有深色晕环的不同圆形颗粒(D'Amour等人,2006;Kroon等人,2008)。这些结果在产生仅仅具有异常多激素和 α 样颗粒和少数(即使有) β 细胞颗粒的INS+细胞的控制方案下概括(图9A)。另一方面,本文中描述的方法产生将胰岛素蛋白质包装和结晶成原型 β 细胞颗

粒的SC-β细胞(图9A)。在原代人类β细胞与SC-β细胞中均观测到发育胰岛素颗粒和成熟结晶的胰岛素颗粒(图9B)。为证实这些颗粒的蛋白含量,用针对胰岛素和胰高血糖素的粒子进行免疫金标记。尽管PH细胞颗粒异常含有胰岛素与胰高血糖素蛋白质,但原代人类β细胞和SC-β细胞颗粒仅仅含有胰岛素(图9C)。因此,SC-β细胞的超微结构映出成年人类β细胞的超微结构。

[0628] 从hiPSC体外产生感知葡萄糖的分泌胰岛素的β细胞

[0629] 进一步使用如以上所讨论,用于从hPSC发育功能β细胞的新的分化方案,从hiPSC谱系体外产生功能β细胞。在Harvard iPSC Core,用从非糖尿病或1型糖尿病患者长出的皮肤成纤维细胞产生hiPSC谱系。与从胚胎产生的hPSC谱系相比,所述hiPSC谱系从人类组织产生,展示功能β细胞可以直接从患病患者,即1型糖尿病患者发育。

[0630] 所产生的β细胞进行葡萄糖激发,确定其重复进行葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)的能力。发现利用本文中描述的方法产生的多个β细胞可以对至少三次连续高葡萄糖激发起反应(图10A-10B)。在此具体实验中,衍生自非糖尿病细胞系(1013-3FA)的hiPSC-β细胞与衍生自1型糖尿病细胞系(1031SeVA)的hiPSC-β细胞相比。衍生自非糖尿病细胞系的β细胞与衍生自1型糖尿病细胞系的β细胞相比,如通过高葡萄糖(20mM)相对于低葡萄糖(2mM)下所分泌的胰岛素的比率计算的刺激指数更大。此外,衍生自1型糖尿病细胞系的β细胞与衍生自非糖尿病细胞系的β细胞相比,对2mM或20mM葡萄糖激发起反应,每细胞分泌的胰岛素的量更大。总之,这些数据表明衍生自1型糖尿病细胞系的hiPSC-β细胞的体外功能类似于非糖尿病细胞对应物。

[0631] 注意到hiPSC-β细胞在体外对葡萄糖起反应后,接着本发明人通过蛋白质表达、基因表达和超微结构分析非糖尿病与1型糖尿病细胞群体如何类似。三种不同的非糖尿病细胞系和三种不同的1型糖尿病细胞系用以确定NKX6-1/C-肽的表达。如同hPSC下的情况,这些hiPSC-β细胞表达正常β细胞标记物PDX1和NKX6-1(图11A-11F)。流动式细胞测量术定量揭露本文中描述的方法可以产生约40%NKX6-1/C-肽,类似于尸体人类胰岛中发现的百分比(图5D)。

[0632] 移植后体内干细胞衍生的β细胞功能

[0633] 迄今描述的数据与功能人类β细胞体外的产生一致。为进一步测试其在体内起作用的能力,这些细胞移植在免疫受损小鼠的肾囊下(图12A-12D和表S1)。

[0634] 表S1. 来自移植SC-β细胞、原代β细胞和PH细胞的小鼠的血清的人类胰岛素的EUSA测量

[0635]

细胞类型	mouse	人类胰岛素 (pU/ml)		细胞类型	mouse	人类胰岛素 (pU/ml)		细胞类型	mouse	人类胰岛素 (pU/ml)	
		0	20			0	20			0	20
SC-β细胞	1	2.2	1.1	PH细胞	1	1.1	2.8	PH细胞	1	0.0	0.4
	2	8.1	2.5		2	1.4	2.0		2	0.0	0.1
	3	1.8	4.0		3	0.0	2.4		3	0.0	0.1
	4	1.5	3.2		4	0.7	1.4		4	0.0	0.4
	5	2.1	2.4		5	1.1	1.7		5	0.0	0.4
	6	0.0	0.5		6	0.4	0.1		6	0.1	0.3
	7	0.0	7.5		7	1.4	3.5		7	0.2	0.2
	8	0.0	5.9		8	0.0	0.1 *		8	0.0	0.3
	9	0.0	3.9		9	0.0	13.0 *		9	0.0	0.2
	10	0.0	2.9		10	0.0	0.3 *		10	0.0	1.2
	11	1.4	0.0		11	0.0	1.5 *		11	0.0	0.7
	12	1.7	2.6		12	0.0	4.4		12	0.0	1.0
	13	2.3	4.2		13	0.0	7.0		13	0.0	1.0
	14	0.0	1.4		14	0.0	2.2		14	0.0	1.1
	15	0.3	0.0		15	0.0	3.2		15	0.3	0.8
	16	0.0	0.0		16	0.0	3.0		16	0.1	0.2
	17	0.0	4.3		17	1.0	0.0		17	2.0	0.1
	18	0.0	3.2		18	0.0	1.7				
	19	0.0	43.0 *		19	0.0	0.8				
	20	0.0	0.1 *		20	1.0	2.3				
	21	0.0	14.0 *		21	1.0	1.7				
	22	0.0	07.5 *								
	23	0.0	02.7 *								
	24	0.0	0.0								
	25	0.0	2.0								
	26	0.0	0.0								
	27	0.0	7.5								
	28	0.0	7.0								
	29	0.0	0.4								
	30	0.0	1.4								
	31	4.3	0.1								
	32	3.0	2.0								

[0636] [K]^a未测定

[0637] # 在最后步骤期间体外培养2周;所有其它SC-β细胞培养1周

[0638] 当移植成年人类胰岛时,在两周内在这些小鼠的血清中可检测人类胰岛素。相反地,当以前公布的胰腺祖细胞移植至小鼠中时,在移植两周后未检测到胰岛素(Kroon等人,2008;Schulz等人,2012;Rezania等人,2012)。而所述细胞需要长达3-4个月之久的缺乏了解的体内成熟期。另一方面,SC-β细胞像人类胰岛一样,在移植两周内对葡萄糖激发起反应而分泌高水平的胰岛素至主体血流中(图12A)。作为对照,还移植使用以前公布的方案产生的PH细胞并发现这些细胞在体内不对葡萄糖起反应而分泌显著水平的胰岛素(图12A)。此外,还证实所产生的胰腺祖细胞未能在两周内在体内产生可观的胰岛素,如以前所公布(图12C)。

[0639] 非真实β细胞的一些产生胰岛素的细胞可以用未调节的方式分泌胰岛素至动物血流中,像胰岛素团粒起作用,而非反应性β细胞。为测试SC-β细胞是否不仅分泌高水平的胰岛素,而且也以功能反应方式这样做,测量急性葡萄糖激发前后小鼠血流中人类胰岛素的量。对于人类胰岛移植与SC-β细胞移植,测试的12只小鼠中的9只展示移植两周后体内功能性葡萄糖刺激的胰岛素分泌(图12A)。

[0640] 进行终末体内GSIS激发后,这些动物被处死并移出移植肾进行分析。这些肾的组织切片揭露在肾囊下存在大的人类细胞移植植物。这些移植植物的免疫荧光染色展示SC-β细胞与人类胰岛移植植物都含有高水平的表达胰岛素的细胞(图12B)。那些INS+细胞还共同表达规范β细胞转录因子PDX1,如对功能β细胞所期望那样。胰岛素和胰高血糖素染色的分析进一步揭露SC-β细胞在移植后仍然是单激素的(图13A-13B)。此方案中还产生少量GCG+α细胞群体,如通过免疫荧光和流动式细胞测量术分析观测到(图7和图10),且还在移植后在体内观测到那些细胞(图13)。

[0641] 进一步注意到,当培养基,尤其含有A1k5抑制剂和T3激素的补充CMRL培养基用于

刚刚分化步骤时,体外胰岛素分泌随时间推移而增加。因此,SC-β细胞再离体培养一周(在刚刚步骤培养基中两周代替一周)并观测是否其还将体内分泌更多胰岛素。移植这些成年细胞后,出人意料地观测到胰岛素水平比相同数目的移植的较年轻SC-β细胞高十倍(图12D)。因此,用人类SC-β细胞在体内可实现的胰岛素功能水平类似于通过移植人类胰岛所实现的胰岛素功能水平。总之,这些移植数据表明SC-β细胞可以为细胞移植提供替代的临床选择,其不依赖于捐献尸体胰岛的可变和有限供应,或对移植的干细胞衍生的胰腺祖细胞的缺乏了解且缺乏控制的体内成熟期。

[0642] 培养基

[0643] 为诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC-β细胞,Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞维持在适合培养基中足够时段。在本发明中,如上所提及,发现使用含有A1k5抑制剂和T3激素的CMRL培养基允许离体培养的SC-β细胞体内分泌更多胰岛素。然而,如通过低与高葡萄糖激发之间的刺激指数或者通过释放的胰岛素的量所测量,还发现在分化最后步骤(阶段6)添加额外因子至CMRL培养基(图14A)使SC-β细胞对葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)反应更佳。此类额外因子可以包括(但不限于)Sant1、XXI和SSP。维持在含有A1k5抑制剂、T3激素和Sant1、XXI或SSP的CMRL培养基中的SC-β细胞与仅仅维持在CMRL培养基、含有A1k5抑制剂的CMRL培养基和T3激素或者含有A1k5抑制剂和T3激素的S3培养基中的那些SC-β细胞(图14B)相比,如通过高葡萄糖(15mM)相对于低葡萄糖(2.5mM)下所分泌的胰岛素的比率计算的刺激指数更大。此外,维持在含有A1k5抑制剂、T3激素和Sant1、XXI或SSP的CMRL培养基中的SC-β细胞分泌的胰岛素的量比仅仅维持在CMRL培养基、含有A1k5抑制剂的CMRL培养基和T3激素或者含有A1k5抑制剂和T3激素的S3培养基中的那些SC-β细胞更大(图14C)。总之,这些数据表明不仅在最后分化步骤中SC-β细胞维持在CMRL培养基中对诱导至少一些Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞成熟成SC-β细胞是重要的,而且进一步添加例如Sant1、XXI或SSP等某些因子至CMRL培养基将增强细胞的葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)。

[0644] 增强细胞的存活与功能

[0645] 干细胞领域的一个挑战是产生足够量的可用于药物筛选、疾病模型化或治疗使用的SC-β细胞。举例来说,hES细胞在学术上难以培养,在细胞分离和解离时易于细胞凋亡,尤其在完全解离后进行大规模细胞死亡,且具有低克隆效率(Watanabe, K. 等人, Nature Biotechnology 25, 681-686 (2007))。因此,所产生的活SC-β细胞的数量可能是低的。通过以图15A中所示的方式修改步骤3与6之间的方案,可以产生更纯的NKX6.1+内分泌簇(图15B),得到治疗学上适用的更多SC-β细胞。

[0646] 在步骤3-5中,例如,细胞存活可以通过添加p相关蛋白激酶抑制剂或Rock抑制剂来提高。据信添加Rock抑制剂通过防止解离诱发的细胞凋亡而增强ES细胞存活,因此增加其克隆效率(Watanabe 等人)。Rock抑制剂的实例包括(但不限于)Y-27632、法舒地尔(Fasudil)/HA1077和H-1152。在本发明中,用Rock抑制剂处理细胞已展示提高细胞存活(图15C)。

[0647] 除用Rocki抑制剂处理细胞外,步骤3-4中的细胞可以用单独或与烟酰胺组合的活化素A处理。活化素A和烟酰胺均展示提高细胞存活。其提高细胞存活的一种方式是通过将SOX2(多潜能干细胞的标记物)从约81%下调至约47%(图15D)。因为SOX2和NKX6-1互斥(图

15E),所以SOX2的下调引起NKX6-1(成熟胰腺β细胞的标记物)的上调。

[0648] 在步骤5-6中,细胞存活可以进一步通过用星孢菌素处理细胞来增强。已知星孢菌素是神经元、神经胶质和干细胞样神经球分化的活化剂且也认为其诱发细胞凋亡(Schumacher等人,Mol.Cell.Neurosci.2003;23(4):669-680)。本发明中,星孢菌素的添加通过增加嗜铬粒蛋白A(胰腺内分泌细胞标记物)的百分比(图15F)和增加NKX6-1.C-肽+细胞的百分比(图15G),产生近乎纯的内分泌群体。

[0649] 最后,细胞存活可以通过用含有Alk5i、T3以及XXI(提高β细胞成熟的γ-分泌酶抑制剂)的培养基处理细胞进一步增强。如图15H和15I中所示,在步骤5和6XXI添加至培养基可以增加NeuroD1+群体。

[0650] 总之,这些数据表明在过程的各个阶段添加某些化合物至细胞对提高细胞存活以及富集可以分化成治疗学上适用的SC-β细胞的细胞群体来说是重要的。

[0651] SC-β细胞用于翻译生物学的效用

[0652] 干细胞领域的一大挑战是产生足够接近其通常发育对应物的分化细胞类型以用于药物筛选、疾病模型化或治疗学使用。使用如本文中论述的新的分化方案产生的SC-β细胞似乎在体外与体内以类似于原代人类β细胞的方式起作用。因此假定这些细胞可用于翻译医学(图16A)。

[0653] 用于治疗2型糖尿病的一个最常用治疗策略是施用口服抗糖尿病药物。许多这些药剂直接作用于β细胞以增加胰岛素分泌。举例来说,磺酰脲药物通过阻断钾通道增加内源性胰岛素的分泌(Modi,2007)。当前β细胞上的药物筛选被限制于啮齿动物胰岛、转化细胞系或尸体人类胰岛的高度可变且有限的供应。假定啮齿动物代谢仅仅部分模拟人类代谢,那么用于分析的人类β细胞的可靠一致供应将很有价值。这里本发明人检查SC-β细胞是否可以用于体外治疗筛选。

[0654] 本发明人首先测试SC-β细胞是否可以对现存在的来自几个不同类别的抗糖尿病药物起反应(图16B)。LY2608204是临床试验中的葡萄糖激酶活化剂,而利拉鲁肽、甲磺丁脲和那格列奈分别是已经在临床上使用的GLP-1激动剂和促分泌剂(磺酰脲和氯茴苯酸)的实例(Matschinsky,2009;Modi,2007;Vetere等人,2014)。实际上,SC-β细胞通过在葡萄糖激发后,增加体外胰岛素分泌,展示趋向于对用这些药物治疗起反应(图16C)。这些数据提供SC-β细胞可以提供将来药物筛选的新颖平台的初始概念证明。

[0655] 接着本发明人测试SC-β细胞是否可以模拟β细胞复制。增加患者β细胞团块可以通过总体上产生更多胰岛素,不需要增加每个β细胞产生的胰岛素的量,来提高血糖控制。迄今为止,即使有也是极少数在啮齿动物或细胞系模型中促进β细胞复制的药物已转变成人类β细胞。已经通过研究人类妊娠中胰岛质量的研究和使用催乳激素处理的啮齿动物研究,表明β细胞复制的激素控制(Parsons等人,1992;Labriola等人,2007;Brelje等人,2004)。本发明人测试用催乳激素处理是否可以增加SC-β细胞群体中的β细胞复制。SC-β细胞与催乳激素一起培养后,细胞针对C-肽和增殖标记物Ki67染色且固定(图16D和16E)。像原代人类β细胞,Ki67+增殖SC-β细胞的基线数目极低($0.20 \pm 0.08\%$ Ki67+/C-肽+)(图16F)。未处理和催乳激素处理的细胞的定量揭露增加催乳激素下游的增殖的趋向($0.39 \pm 0.08\%$ Ki67+/C-肽+),表明SC-β细胞能够对复制筛选中的增殖标志起反应(图16F)。

[0656] 最后,本发明人检查SC-β细胞是否可以直接适用作治疗糖尿病的细胞疗法。不同

于2型糖尿病,经由新的医药增加 β 细胞功能或 β 细胞复制很可能对其中胰腺 β 细胞被自体免疫攻击破坏的1型糖尿病患者的治疗益处很小。这些患者可以通过利用Edmonton移植方案(Shapiro等人,2006)用供体异源胰岛替换丧失的 β 细胞而有效治疗。

[0657] 这种严重糖尿病的一个适用模型是秋田小鼠。秋田小鼠在胰岛素基因中具有突变,引起蛋白质错误折叠、完全和不可逆的 β 细胞衰竭和渐进更严重的高血糖症。秋田小鼠可以经由小鼠或人类胰岛移植至肾囊中而恢复至血糖量正常(Pearson等人,2008)。因此,测试根据本文中描述的方法产生的SC- β 细胞,看看其是否也可以用以控制糖尿病高血糖症。结果展示SC- β 细胞而非先前方案的PH INS+细胞移植至幼年秋田小鼠中迅速逆转在这些动物中观测到的逐渐恶化的高血糖症(图16G)。移植SC- β 细胞的小鼠的空腹血糖测量值平均小于200mg/dl,而移植对照PH细胞的那些小鼠展示超过400mg/dl的渐高血糖水平,如针对非移植秋田小鼠所观测到(图16G)(Pearson等人,2008)。正如所料,人类胰岛素水平在移植SC- β 细胞的动物是高的,且在移植PH细胞的对照动物中几乎不可检测(图16H)。移植SC- β 细胞的小鼠还展示体重维持比对照小鼠好,指示胰岛素功能正常化(图17)。因此,SC- β 细胞能够在糖尿病小鼠模型中在移植后几乎立刻分泌胰岛素并停止和逆转进展性高血糖症。

[0658] 讨论

[0659] 本文中描述的工作证实功能性人类 β 细胞可以直接从hPSC和hiPSC体外产生。总起来说,本文中描述的数据证实这些细胞(即SC- β 细胞)在移植后在体外和体内类似于原代人类 β 细胞起作用。根据本文中描述的方法产生的SC- β 细胞为 β 细胞研究和疗法呈现几个新的机会。迄今为止,捐献尸体胰岛的有限供应、由于患者特征或分离引起的样品之间的高度可变性和很少量的体外人类 β 细胞复制已经严重限制人类 β 细胞供应。此限制已经限制患者的移植选择以及高通量药物筛选和疾病模型化。单一68kg(150lb)患者需要约略340-748百万个移植胰岛细胞以经由胰岛移植有效消除1型糖尿病(McCall和Shapiro,2012)。本文中描述的策略有效且高度可量,使得单个实验室每次生长上亿至几十亿个SC- β 细胞切实可行。与以前描述的糖尿病干细胞衍生疗法比较,SC- β 细胞的一大临床优点是这些细胞第一次提供了细胞疗法不需要在体内进一步分化的可能不可预知的“黑盒子”期的机会。

[0660] 不同于原代人类 β 细胞,SC- β 细胞也可以从任何所需遗传背景的细胞产生。来自患有糖尿病或其它代谢综合症的患者的iPS细胞现在可以衍生并分化成SC- β 细胞用于疾病模型化和研究 β 细胞功能或对应激或免疫攻击的敏感性。如TALEN和CRISPR等技术能够对ES或iPS细胞进行基因组编辑以并入和测试通过如基因组宽筛合研究(GWAS)等遗传分析鉴别的变异体。类似地,现在可以在突变与非突变 β 细胞的遗传配对之间比较 β 细胞药物反应(Ding等人,2013)。通过这些技术的组合还能够鉴别和测试 β 细胞功能或药物遗传学的新颖的生物标记物。因此,SC- β 细胞提供了一种用于代谢和糖尿病中体外药物发现和表征的新颖的人类特异性平台。

[0661] SC- β 细胞的产生也代表了一个未来产生胰岛和胰腺器官的可能适用的步骤。将如间质或内皮细胞等胰腺肺泡细胞并入干细胞衍生胰腺细胞的培养物中可能是有益的(Sneddon等人,2012;Lammert等人,2001)。其它证据表明 α 和 δ 细胞的存在可能对正常 β 细胞功能的准确调整来说是重要的(Rodriguez-Diaz等人,2011)。此外,胰腺器官的组织工程化将需要并入可能呈小心指定的结构的功能性外分泌和导管组织。SC- β 细胞的产生代表了一

个通过利用干细胞生物学进行临床影响的步骤。

[0662] 实验程序

[0663] 细胞培养

[0664] hPSC谱系在500ml搅拌烧瓶(Corning, VWR; 89089-814)中mTESR1(StemCell Technologies Inc.; 05850)中维持未分化,所述搅拌烧瓶放在设定在70rpm转速下37℃孵育箱、5%CO₂和100%湿度下的9位置搅拌板上。谱系HUES8是利用的初级谱系。细胞用Accutase分散并在具有10μM Y27632(Abcam; ab120129)的mTESR中以 0.5×10^6 /ml接种为单细胞。48小时后mTESR1培养基改变(无Y27632)。在培养基改变后培养物分裂24小时以保持簇直径大小<300μm。定期测试培养物的病原体、核型和多潜能性标记物的维持情况。

[0665] 用于指导分化的示例性培养基如下:

[0666] S1培养基:MCDB131(Cellgro; 15-100-CV)+8mM D-(+)-葡萄糖(Sigma; G7528)+2.46g/L NaHCO₃(Sigma; S3817)+2%FAF-BSA(Proliant; 68700)+ITS-X(Invitrogen; 51500056)1:50.000+2mM Glutamax(Invitrogen; 35050079)+0.25mM维生素C(Sigma Aldrich; A4544)+1%青霉素/链霉素(Cellgro; 30-002-CI)。

[0667] S2培养基:MCDB131+8mM D-葡萄糖+1.23g/L NaHCO₃+2%FAF-BSA+ITS-X 1:50.000+2mM Glutamax+0.25mM维生素C+1%青霉素/链霉素。

[0668] S3培养基:MCDB131+8mM D-葡萄糖+1.23g/L NaHCO₃+2%FAF-BSA+ITS-X 1:200+2mM Glutamax+0.25mM维生素C+1%青霉素/链霉素

[0669] BE5培养基:MCDB131+20mM D-葡萄糖+1.754g/L NaHCO₃+2%FAF-BSA+ITS-X 1:200+2mM Glutamax+0.25mM维生素C+1%青霉素/链霉素+肝素10μg/ml(Sigma; H3149)。

[0670] CMRLS:CMRL 1066补充(Mediatech; 99-603-CV)+10%FBS(HyClone™, VWR; 16777)+1%青霉素/链霉素。

[0671] 所有培养基通过0.22μm瓶顶滤器(Corning)过滤法消毒。对于所有以下培养基改变,在培养基变化前在低照度通风柜中立刻将小分子和生长因子添加至基本培养基中。

[0672] 为开始SC-β细胞分化,细胞以 0.5×10^6 /ml接种且在48小时后开始分化。培养基改变如下-

[0673] 第1天:S1+100ng/ml活化素A(R&D Systems; 338-AC)+3μM Chir99021(Stemgent; 04-0004-10))。

[0674] 第2天:S1+100ng/ml活化素A。第4、6天:S2+50ng/ml KGF(Peprotech; AF-100-19))。

[0675] 第7、8天:S3+50ng/ml KGF+0.25μM Sant1(Sigma; S4572)+2μM视黄酸(RA)(Sigma; R2625)+200nM LDN193189(仅仅第7天)(Sigma; SML0559)+500nM PdBU(EMD Millipore; 524390))。

[0676] 第9、11、13天:S3+50ng/ml KGF+0.25μM Sant1+100nM RA。

[0677] 第14、16天:BE5+0.25μM Sant1+50nM RA+1μM XXI(EMD Millipore; 565790)+10μM Alk5i II(Axxora; ALX-270-445)+1μM L-3,3',5-三碘甲状腺原氨酸(T3)(EMD Millipore; 64245)+20ng/mlβ细胞素(Thermo Fisher Scientific; 50932345))。

[0678] 第18、20天:BE5+25nM RA+1μM XXI+10μM Alk5i II+1μM T3+20ng/mlβ细胞素。

[0679] 第21-35天(每个第二天改变培养基):CMRLS+10μM Alk5i II+1μM T3。在第28天与

32天之间通过体外分析测试细胞。除非另作说明,否则细胞在第28天移植。

[0680] 或者,第21-35天:CMRLS+10 μ M Alk5i II+1 μ M T3+Sant1。

[0681] 或者,第21-35天:CMRLS+10 μ M Alk5i II+1 μ M T3+XXI。

[0682] 或者,第21-35天:CMRLS+10 μ M Alk5i II+1 μ M T3+SSP。

[0683] 为产生PH方案细胞以模拟先前公布,使用相同分化方案直至第14天。在第14天和第16天,细胞喂以S3+1 μ M Alk5i II、200nM LDN193189和100nM RA(Rezania等人,2012)。在第18天和之后,细胞每隔一天喂以S3+100nM RA。细胞维持在此培养基中直至实验分析。细胞维持于培养物中并在分化培养基中与SC- β 细胞相同的天数后测试以控制时间的影响。

[0684] 流动式细胞测量术

[0685] 细胞通过在15ml falcon管中在TrypLE Express中在37 $^{\circ}$ C下孵育10-30分钟,分散至单细胞悬浮液中。在第5阶段开始,簇花费更长时间解离成单细胞。簇应与TrypLE Express一起孵育直至其在通过用P1000轻轻上下吸移来混合后解离成单细胞。TrypLE Express用3-4倍培养基淬灭且细胞以1000rpm离心5分钟。细胞在PBS中洗涤两次并转移至1.7ml安全的密封微离心管(Bioscience Inc.;11510)。确保具有1-10mio个细胞/管并在下面使用0.5-1ml体积。细胞再悬浮于4%三聚甲醛(PFA)(Electron Microscopy Scienc Nm; 15710)并在冰上孵育30分钟。接着细胞在PBS中洗涤3次,接着在阻断缓冲液(PBS+0.1% TritonX100(VWR;EM-9400)+5%驴血清(Jackson ImmunoResearch;017-000-121))中在冰上孵育1小时。固定后,细胞对离心更具抵抗性,因此固定后,所有离心都以3000g进行3分钟。接着细胞再悬浮于具有初级抗体的阻断缓冲液中且在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。

[0686] 除非另作说明,否则使用初级抗体1:300:山羊抗人类PDX-1/IPF1(R&D Systems; AF2419)、小鼠抗-NKX6-1(University of Iowa,Developmental Hybridoma Bank;F55A12-上清液)(1:100)、兔抗-嗜铬粒蛋白A(Abcam;ab15160)、大鼠抗胰岛素(pro-)/C-肽(Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa;GN-ID4)(需要添加胰高血糖素和生长抑素)。细胞在阻断缓冲液中洗涤2次,接着在具有二级抗体的阻断缓冲液中在冰上孵育2小时(避光保存)。结合于Alexa Fluor 488、647(Life Technologies)或PE(Thermo Fisher Scientific;NC9774252)的二级抗体用以目测初级抗体。接着细胞在分选缓冲液(PBS+0.5%BSA(Sigma;A8412))中洗涤3次并最后再悬浮于500-700 μ l分选缓冲液中,经40 μ m尼龙筛过滤至FACS管(BD Falcon;352235),并使用LSR-II FACS机(BD Biosciences)分析,记录至少30,000个事件。使用FlowJo软件分析结果。

[0687] 免疫荧光

[0688] 将细胞分散并涂铺至96孔板上。培养一天后,细胞在PBS中洗涤并在室温下固定在4%PFA中20分钟。用PBS洗涤3次后,细胞在室温下在PBS+0.1%Triton X-100+5%驴血清中阻断1小时。所有初级抗体孵育都在4 $^{\circ}$ C下在阻断溶液中以1:500稀释进行过夜:山羊抗人类PDX-1/IPF1、小鼠抗-NKX6-1、兔抗嗜铬粒蛋白A、大鼠抗胰岛素(pro-)/C-肽、Ki67。第二天细胞在PBS中洗涤2次,接着在室温下以1:500稀释,二级抗体孵育1小时(避光保存)。结合于Alexa Fluor 488、594或647(Life Technologies)的二级抗体用以目测初级抗体。用PBS洗涤3次后,所有核通过用DAPI(Invitrogen;D1306)染色来目测。使用Olympus IX51显微镜或Zeiss LSC 700共焦显微镜拍摄代表性影像。使用Array Scan Cellomics高含量筛分系统,定量标靶细胞类型百分比。这里每孔获得30个影像并定量。定量通过抗体染色标记的细胞

和总细胞数(基于DAPI核染色)以获得标靶细胞类型百分比。

[0689] 免疫组织化学

[0690] 细胞簇或胰岛通过在室温下浸入4%PFA中1小时固定。接着样品用PBS洗涤3次,内埋于Histogel™中,并切片用于组织分析。接着使用HistoClear(Thermoscientific;C78-2-G)使10μm切片经受脱石蜡化并再水合。对于抗原修复,滑片出现在0.1M EDTA(Ambion;AM9261)中并放入压力锅(Proteogenix;2100Retriever)中两小时。接着滑片在室温下用PBS+0.1%Triton X-100+5%驴血清阻断1小时,接着在4℃下在阻断溶液中与初级抗体一起孵育过夜。除非另作说明,否则1:100使用以下初级抗体:山羊抗人类PDX-1/IPF1、小鼠抗-NKX6-1、兔抗嗜铬粒蛋白A、大鼠抗胰岛素(pro-)/C-肽、胰高血糖素、生长抑素。第二天细胞在PBS中洗涤2次,接着在室温下二级抗体孵育2小时(避光保存)。结合于Alexa Fluor 488或594的二级抗体用以目测初级抗体。用PBS洗涤后,组织滑片安装在具有DAPI的Vectashield固定介质(Vector Laboratories;H-1200)中,用盖玻片覆盖并用指甲油密封。使用Olympus IX51显微镜或Zeiss LSM 510或710共焦显微镜拍摄代表性影像。

[0691] 葡萄糖刺激的胰岛素分泌

[0692] Krebs缓冲液(Krb):Di H₂O,具有128mM NaCl、5mM KCl、2.7mM CaCl₂、1.2mM MgCl₂、1mM Na₂HPO₄、1.2mM KH₂PO₄、5mM NaHCO₃、10mM HEPES(Life Technologies;15630080)、0.1%BSA(Proliant;68700)。溶液在孵育箱中平衡至37℃且1ml体积用于以下方案。将大概 0.5×10^6 个簇状细胞转移至高压灭菌的1.7ml安全密封微离心管中并在Krb中洗涤2次。接着簇在孵育箱中在Krb中与2mM葡萄糖一起预孵育2小时以去除残余胰岛素。值得注意的是,所有孵育管的盖子都打开并被允许换气的盖子覆盖。簇在Krb中洗涤2次,并接着在含有2mM葡萄糖的Krb中孵育正好30分钟,并在孵育后收集200ul上清液(低葡萄糖样品)。簇在Krb中洗涤2次,并接着在具有20mM葡萄糖的Krb中孵育正好30分钟,并在孵育后收集200ul上清液(高葡萄糖样品)。用低和高葡萄糖激发再重复两次(总计3对激发)。最后,簇在Krb中洗涤2次,并接着在具有2mM葡萄糖+30mM KCl的Krb中孵育正好30分钟,并在孵育后收集200ul上清液(KCl极化激发样品)。KCl激发后,使用Tryple分散簇并通过Viacell(制造商)计数以通过细胞数校正胰岛素分泌量。

[0693] 接着使用人类超灵敏胰岛素ELISA(ALPCO Diagnostics;80-INSHUU-E01.1)处理含有分泌胰岛素的上清液样品并通过FLUOstar optima分光光度计(BMG lantech)在450nm下测量样品。如果ELISA不在同一天进行,那么样品在-80℃下储存。为得到在ELISA范围内的胰岛素浓度,在PBS中在1:100与1:200之间稀释样品通常足够。

[0694] 电子显微镜检查

[0695] 将细胞簇在室温下用含有1.25%PFA、2.5%戊二醛和0.03%苦味酸于0.1M二甲胂酸钠缓冲液(pH 7.4)中的混合物固定至少2小时。接着细胞簇在0.1M二甲胂酸钠缓冲液中洗涤并在室温下用1%四氧化锇(OsO₄)与1.5%亚铁氰化钾(K₃Fe(CN)₆)的混合物后固定至少2小时,在0.1M二甲胂酸钠缓冲液中洗涤并用1%四氧化锇(OsO₄)/1.5%亚铁氰化钾(K₃Fe(CN)₆)后固定1小时,在水中洗涤3次并在1%乙酸双氧铀水溶液中染色剂1小时,接着在水中洗涤2次,且随后在以下等级醇中脱水(各10分钟;50%、70%、90%、2×10分钟100%)。接着样品在环氧丙烷中孵育1小时并在环氧丙烷与TAAB Epon(Marivac Canada Inc.St.Laurent, Canada)的1:1混合物中浸润过夜。第二天,样品内埋于TAAB Epon中并在60℃下聚合48小

时。在Reichert Ultracut-S切片机上切割超薄切片(约60nm),放至铜网,用0.2%柠檬酸铅染色并在JEOL 1200EX透射电子显微镜或TecnaiG²Spirit BioTWIN中检查。影像用AMT 2k CCD摄像机记录并使用ImageJ软件分析。

[0696] SCID-Beige移植研究

[0697] 五百万个hPSC衍生细胞呈簇状再悬浮于RPMI1640培养基(Life technologies; 11875-093)中,等分至体积为200uL的PCR管中,并保持在冰上5至10分钟,接着负载于导管中。为制备细胞负载将连接至1mL注射器中各导管输注组23G x3/4”(Terumo; SB*S23BL)用1ml 5%FBS血清(Corning; 35-011-CV)清洗,添加RPMI培养基,接着负载0.6ml未添加血清的RPMI培养基。簇通过导管针的尖端负载并垂直放置以停留在导管桶的底部上并通过在室温中受重力5分钟,接近针的顶端。在细胞制备步骤期间,用1.25%(250mg/kg; 0.5ml/25g 1.25%阿佛丁/体重)麻醉免疫缺乏(SCID/Beige)小鼠(年龄?),并给左心室手术部位剃毛且用betadine和醇消毒。制造约1cm的切口以暴露肾,并通过导管针插入肾囊下并注射含有五百万个同等簇细胞的约100uL体积将簇注射在肾囊下。腹腔用PDS吸收缝线(POLY-DOX; 2016-06))和皮肤用手术夹子(Kent Scientific Corp; INS750346-2)闭合。在手术/恢复时间期间小鼠位于微小温度循环泵和毯子(约37℃)上以帮助小鼠在麻醉后快速恢复并在手术后立刻和初始给药后24小时给与5mg/mkg剂量的卡洛芬(carprofen)。移植平均时间大概每只小鼠3分钟。手术后14天去除创缘夹并每周监测小鼠两次。

[0698] 从手术恢复两周后,通过执行葡萄糖耐量测试(GTT)评估人类胰岛素的存在和移植细胞的葡萄糖反应性。小鼠禁食16小时过夜后,通过腹膜内注射2g D-(+)-葡萄糖/1kg体重并使用柳叶刀通过面静脉刺穿在注射前和/或注射后收集血液,进行GTT(Feather; 2017-01)。随后使用人类胰岛素ELISA试剂盒(ALPCO Diagnostics; 80-INSHUU-E01.1)定量人类胰岛素。从SCID小鼠解剖移植体,固定在4%PFA(Electron Microscopy Science; 15710)中,内埋在石蜡中,并切片用于组织分析。

[0699] 钙成像

[0700] 将约10至20个hPSC衍生簇涂铺在涂有基质胶的96孔板上并允许在37℃孵育箱、5%CO₂和100%湿度中粘附24小时。簇用预温热(37℃)的添加2.5mM葡萄糖的Krebs缓冲液洗涤,接着在37℃孵育箱中在2.5mM葡萄糖Krb缓冲液中与50μM Ca²⁺-敏感性荧光探针Fluo4-AM(Life Technologies; F14217)一起孵育45分钟。将簇用2.5mM葡萄糖Krb缓冲液洗涤,接着进一步在37℃孵育箱中再孵育15分钟。接着簇立刻在AxioZoom V16显微镜(Carl Zeiss)中分期,以获得不同孔中多批簇的高分辨率时序成像。Fluo-4在488nm下激发且在490nm与560nm之间记录其发射。每17秒,在80x放大倍数的单细胞分辨率下获得时序成像,且一次成像时多达10个孔成像。在成像期间葡萄糖激发的进展和刺激时间如下。成像从Krb中2mM葡萄糖刺激5分钟开始,接着Krb缓冲液中20mM葡萄糖刺激5分钟。这些先低后高的葡萄糖刺激再重复两次,接着成像以Krb缓冲液中30mM KCl刺激5分钟结束,且总成像时间为35分钟。在刺激之间,停止成像且将簇用2mM葡萄糖Krb缓冲液洗涤,接着添加下一个葡萄糖Krb缓冲液。使用ImageJ/Fiji,通过应用StackReg校正簇在成像期间的移动和ROI管理器测量整个成像期间细胞荧光强度,以单细胞分辨率,分析35分钟成像期间的荧光强度改变。使用VirtualDub将所有7次5分钟刺激的剪辑制成一个电影并公布在youtube上共享数据。

[0701] 细胞内流动式细胞测量术和基因表达分析

[0702] MARIS如Hrvatín等人,2014中所描述进行。细胞在单细胞悬浮液中收获,固定在4%PFA中冰上,与初级抗体,接着二级抗体,在含有RNasin的缓冲液中一起孵育。接着通过FACS将细胞分类以每个样品获得至少100,000个细胞。随后样品在消化缓冲液中在50℃下孵育3小时,接着分离RNA。使用Nanodrop 1000定量RNA浓度。双链cDNA通过从至少100ng总RNA反转录产生。接着通过用生物素标记的核苷酸体外转录过夜,产生扩增mRNA(cRNA),并通过在30℃下真空离心浓缩。使用全基因组表达指导杂交试剂盒(Illumina)将每个样品至少750ng cRNA与人类HT-12表达珠粒芯片(Illumina)杂交。在Illumina Beadstation 500上扫描芯片。通过减去背景和等级恒定标准化来调整原始数据。在计算改变倍数前,添加20的偏移量至所有探针组平均值以消除负信号。在GenomeStudio中,通过t检验计算平均信号之间的差异的p值,并通过本杰明-赫希贝格法(Benjamini-Hochberg method)与Illumina常规假发现率(FDR)模型组合进行多个假设检验来校正。

[0703] 参考文献

[0704] Aguayo-Mazzucato,C.,Zavacki,A.M.,Marinelarena,A.,Hollister-Lock,J.,Khattabi,I.E.,Marsili,A.,Weir,G.C.,Sharma,A.,Larsen,P.R.,and Bonner-Weir,S.(2013).Thyroid Hormone Promotes Postnatal Rat Pancreatic β -Cell Development and Glucose-Responsive Insulin Secretion Through MAFA.Diabetes 62,1569-580.

[0705] Bellin,M.D.,Barton,F.B.,Heitman,A.,Harmon,J.,Balamurugan,A.N.,Kandaswamy,R.,Sutherland,D.E.,Alejandro,R.,and Hering,B.J.(2012).Potent Induction Immunotherapy Promotes Long-Term Insulin Independence After Islet Transplantation in Type 1 Diabetes.American Journal of Transplantation 12, 1576-583.

[0706] Brelje,T.C.,Stout,L.E.,Bhagroo,N.V.,and Sorenson,R.L.(2004).Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of langerhans.Endocrinology 145,4162-175.

[0707] Cheng,X.,Ying,L.,Lu,L.,Galvão,A.M.,Mills,J.A.,Lin,H.C.,Kotton,D.N.,Shen,S.S.,Nostro,M.C.,et al.(2012).Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells.Cell Stem Cell 10,371-384.

[0708] D'Amour,K.A.,Agulnick,A.D.,Eliazer,S.,Kelly,O.G.,Kroon,E.,and Baetge,E.E.(2005).Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm.Nat Biotechnol 23,1534-541.

[0709] D'Amour,K.A.,Bang,A.G.,Eliazer,S.,Kelly,O.G.,Agulnick,A.D.,Smart,N.G.,Moorman,M.A.,Kroon,E.,Carpenter,M.K.,and Baetge,E.E.(2006).Production of pancreatic hormone--expressing endocrine cells from human embryonic stem cells.Nat Biotechnol 24,1392-1401.

[0710] Ding,Q.,Lee,Y.-K.,Schaefer,E.K.,Peters,D.,Veres,A.,Kim,K.,Kuperwasser,N.,Motola,D.,Meissner,T.,et al.(2013).A TALEN Genome-Editing System for Generating Human Stem Cell-Based Disease Models.Cell Stem Cell 12, 238-251.

- [0711] Hrvatin, S., O'Donnell, C.W., Deng, F., Millman, J.R., Pagliuca, F.W., Dilorio, P., Rezania, A., Gifford, D.K., and Melton, D.A. (2014). Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, β cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 201400709.
- [0712] Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience* 25, 4694–4705.
- [0713] Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., and Buch, A. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480, 547–551.
- [0714] Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., et al. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26, 443–452.
- [0715] Labriola, L., Montor, W.R., Krogh, K., Lojudice, F.H., Genzini, T., Goldberg, A.C., Eliaschewitz, F.G., and Sogayar, M.C. (2007). Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 263, 120–133.
- [0716] Lammert, E., Cleaver, O., and Melton, D. (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294, 564–67.
- [0717] Lu, B., Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., Lanza, R., and Lund, R. (2009). Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 27, 2126–135.
- [0718] Matschinsky, F.M. (2009). Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 399–416.
- [0719] McCall, M., and Shapiro, A.M.J. (2012). Update on Islet Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a007823.
- [0720] Modi, P. (2007). Diabetes beyond insulin: review of new drugs for treatment of diabetes mellitus. *Curr Drug Discov Technol* 4, 39–47.
- [0721] Mohammed, J.S., Wang, Y., Harvat, T.A., Oberholzer, J., and Eddington, D.T. (2009). Microfluidic device for multimodal characterization of pancreatic islets. *Lab Chip* 9, 97–106.
- [0722] Narayanan, K., Lim, V.Y., Shah, J., Tan, Z.W., Rajendran, D., Luo, S.C., Gao, S., Wan, C.A., and Ying, J. (2013). Extracellular matrix-mediated differentiation of human embryonic stem cells: Differentiation to insulin-secreting beta cells. *Tissue Eng Part A* 20, 424–433.
- [0723] Nostro, M.C., Sarangi, F., Ogawa, S., Holtzinger, A., Corneo, B., Li, X., Micallef, S.J., Park, I.H., Basford, C., et al. (2011). Stage-specific signaling

through TGF β family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells. *Development* 138,861–871.

[0724] Parsons, J.A., Brelje, T.C., and Sorenson, R.L. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130,1459–466.

[0725] Pearson, T., Greiner, D.L., and Shultz, L.D. (2008). Creation of “humanized” mice to study human immunity. *Curr Protoc Immunol* Chapter 15, Unit 15.21.

[0726] Rezania, A., Bruin, J.E., Riedel, M.J., Mojibian, M., Asadi, A., Xu, J., Gauvin, R., Narayan, K., Karanu, F., et al. (2012). Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitors Into Functional Islets Capable of Treating Pre-existing Diabetes in Mice. *Diabetes* 61,2016–029.

[0727] Rezania, A., Bruin, J.E., Xu, J., Narayan, K., Fox, J.K., O’Neil, J.J., and Kieffer, T.J. (2013). Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6-1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells in vivo. *Stem Cells* 31,2432–442.

[0728] Rodriguez-Diaz, R., Dando, R., Jacques-Silva, M.C., Fachado, A., Molina, J., Abdulreda, M.H., Ricordi, C., Roper, S.D., Berggren, P.O., and Caicedo, A. (2011). Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat Med* 17,888–892.

[0729] Rutter, G.A., and Hodson, D.J. (2013). Minireview: Intra-islet Regulation of Insulin Secretion in Humans. *Molecular Endocrinology* 27,1984–995.

[0730] Schulz, T.C., Lynn, F.C., Young, H.Y., Agulnick, A.D., Babin, M.J., Baetge, E.E., Bang, A.G., Bhoumik, A., Cepa, I., et al. (2012). A Scalable System for Production of Functional Pancreatic Progenitors from Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* 7,e37004.

[0731] Shapiro, A.M., Ricordi, C., Hering, B.J., Auchincloss, H., Lindblad, R., Robertson, R.P., Secchi, A., Brendel, M.D., Berney, T., et al. (2006). International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 355,1318–330.

[0732] Shiba, Y., Fernandes, S., Zhu, W.Z., Filice, D., Muskheli, V., Kim, J., Palpant, N.J., Gantz, J., Moyes, K.W., and Reinecke, H. (2012). Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 489,322–25.

[0733] Sneddon, J.B., Borowiak, M., and Melton, D.A. (2012). Self-renewal of embryonic-stem-cell-derived progenitors by organ-matched mesenchyme. *Nature* 491,765–68.

[0734] Taylor, B.L., Liu, F.F., and Sander, M. (2013). NKX6-1 Is Essential for Maintaining the Functional State of Pancreatic Beta Cells. *Cell Rep* 4,1262–

275.

[0735] Thowfeequ, S., Ralphs, K.L., Yu, W.-, Slack, J.M.W., and Tosh, D. (2007) .Betacellulin inhibits amylase and glucagon production and promotes beta cell differentiation in mouse embryonic pancreas. *Diabetologia* 50,1688-697.

[0736] Vetere, A., Choudhary, A., Burns, S.M., and Wagner, B.K. (2014). Targeting the pancreatic β -cell to treat diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*

[0737] Xie, R., Everett, L.J., Lim, H.W., Patel, N.A., Schug, J., Kroon, E., Kelly, O.G., Wang, A., D'Amour, K.A., et al. (2013). Dynamic Chromatin Remodeling Mediated by Polycomb Proteins Orchestrates Pancreatic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12,224-237.

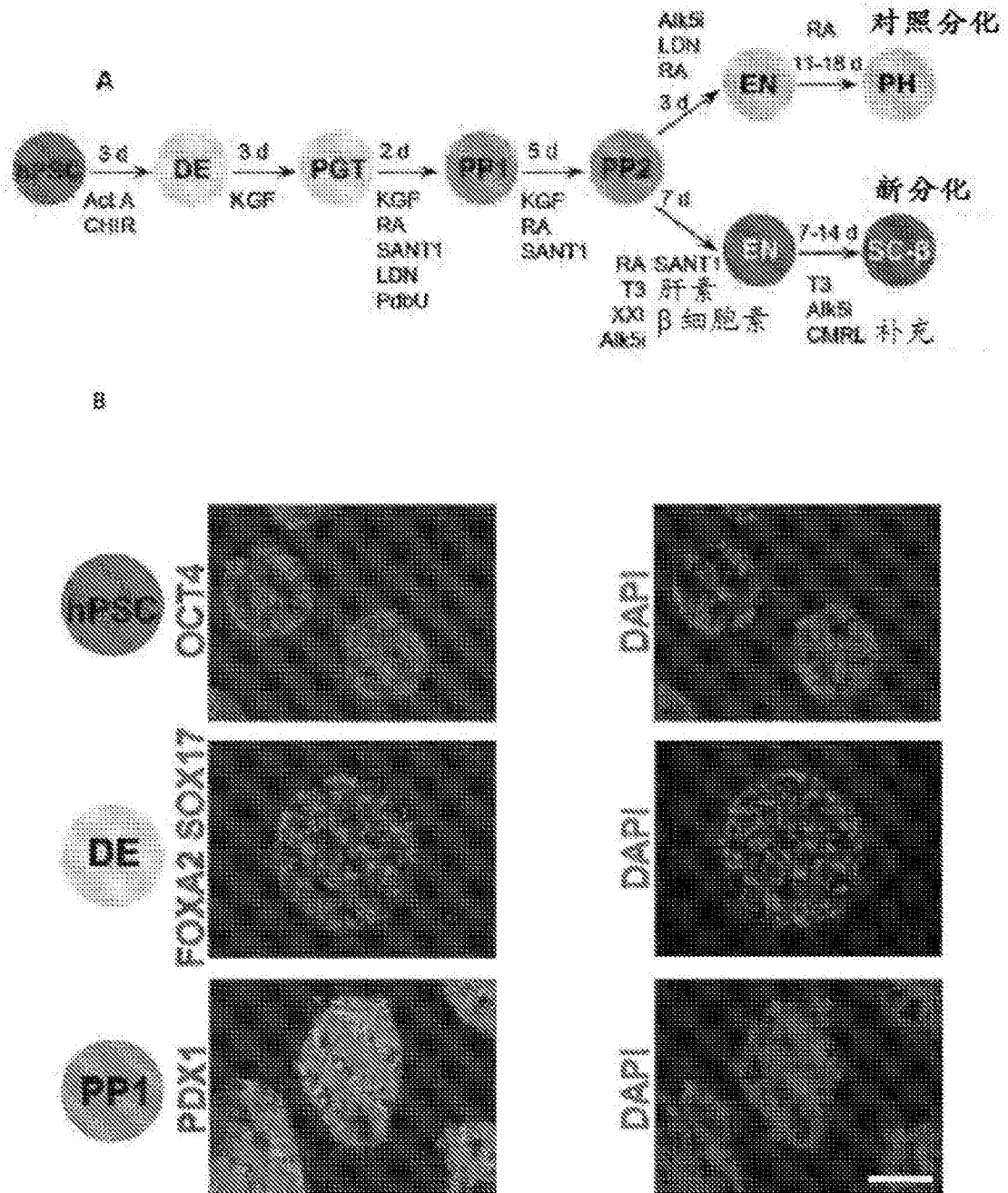


图1A-1B

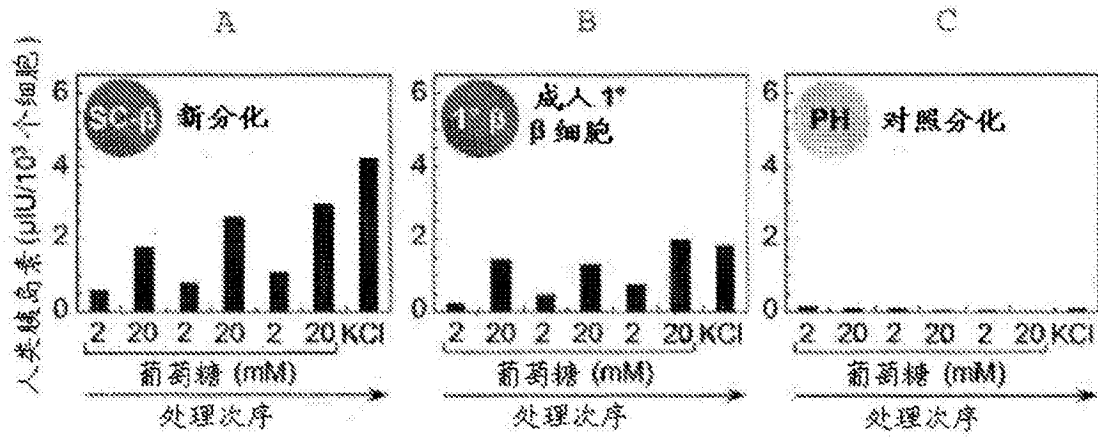


图2A-2C

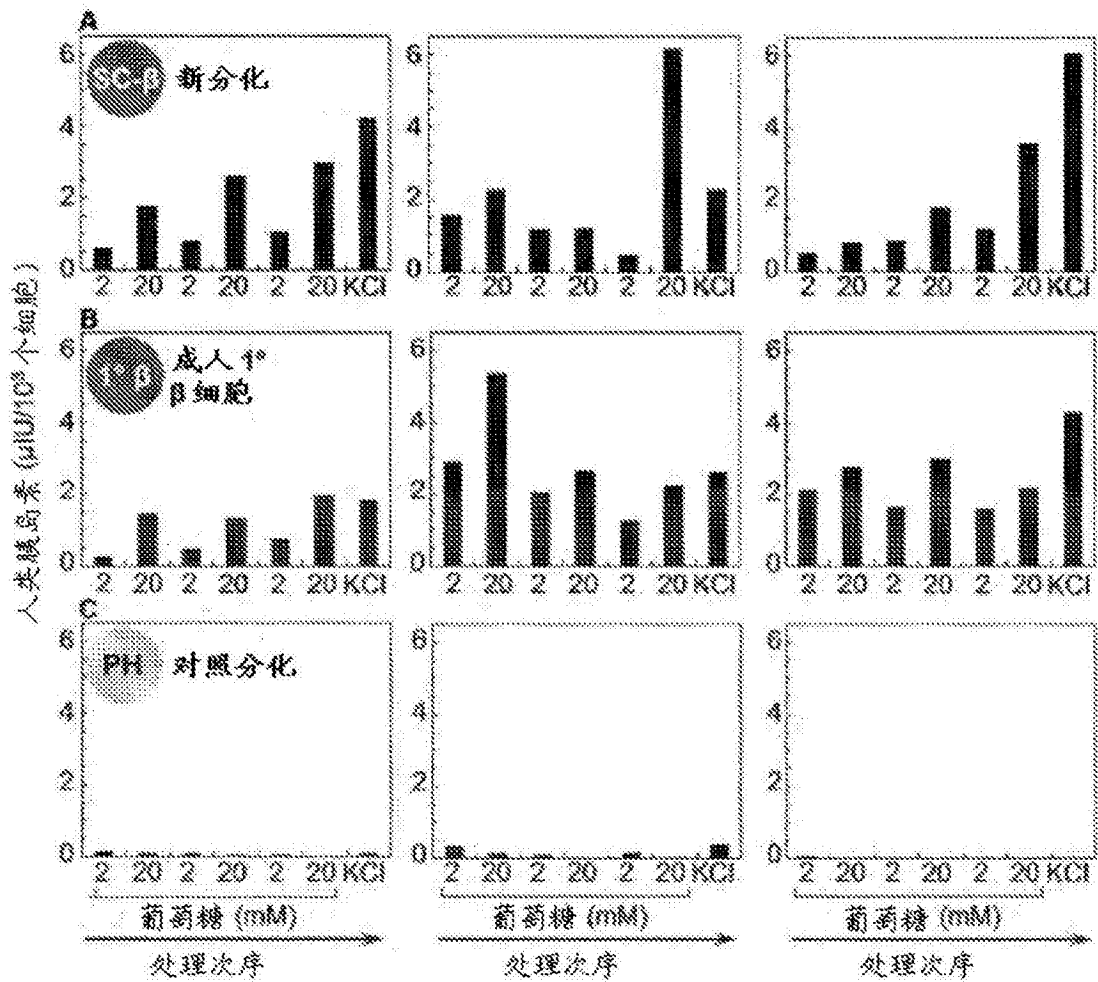


图3A-3C

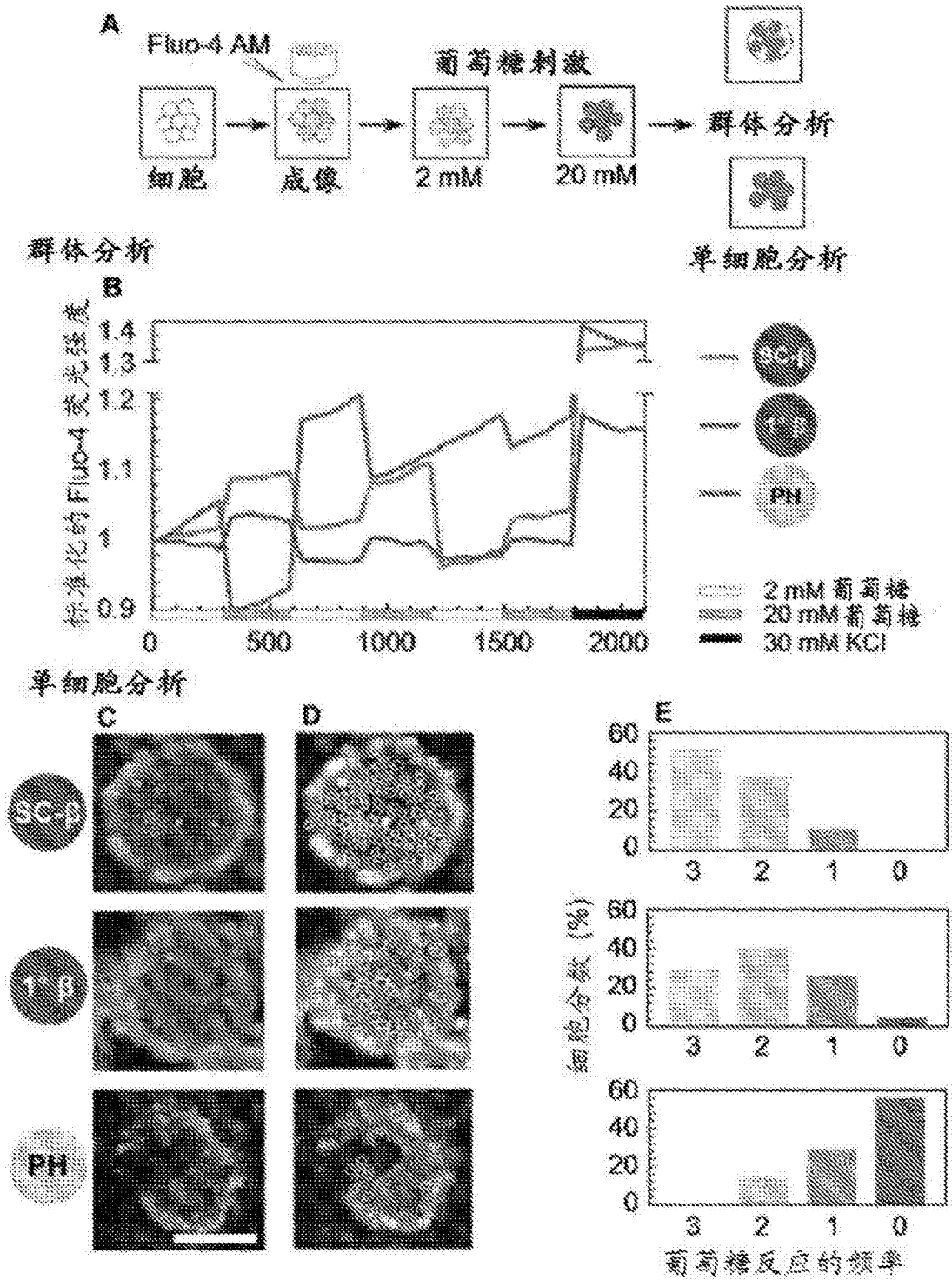


图4A-4E

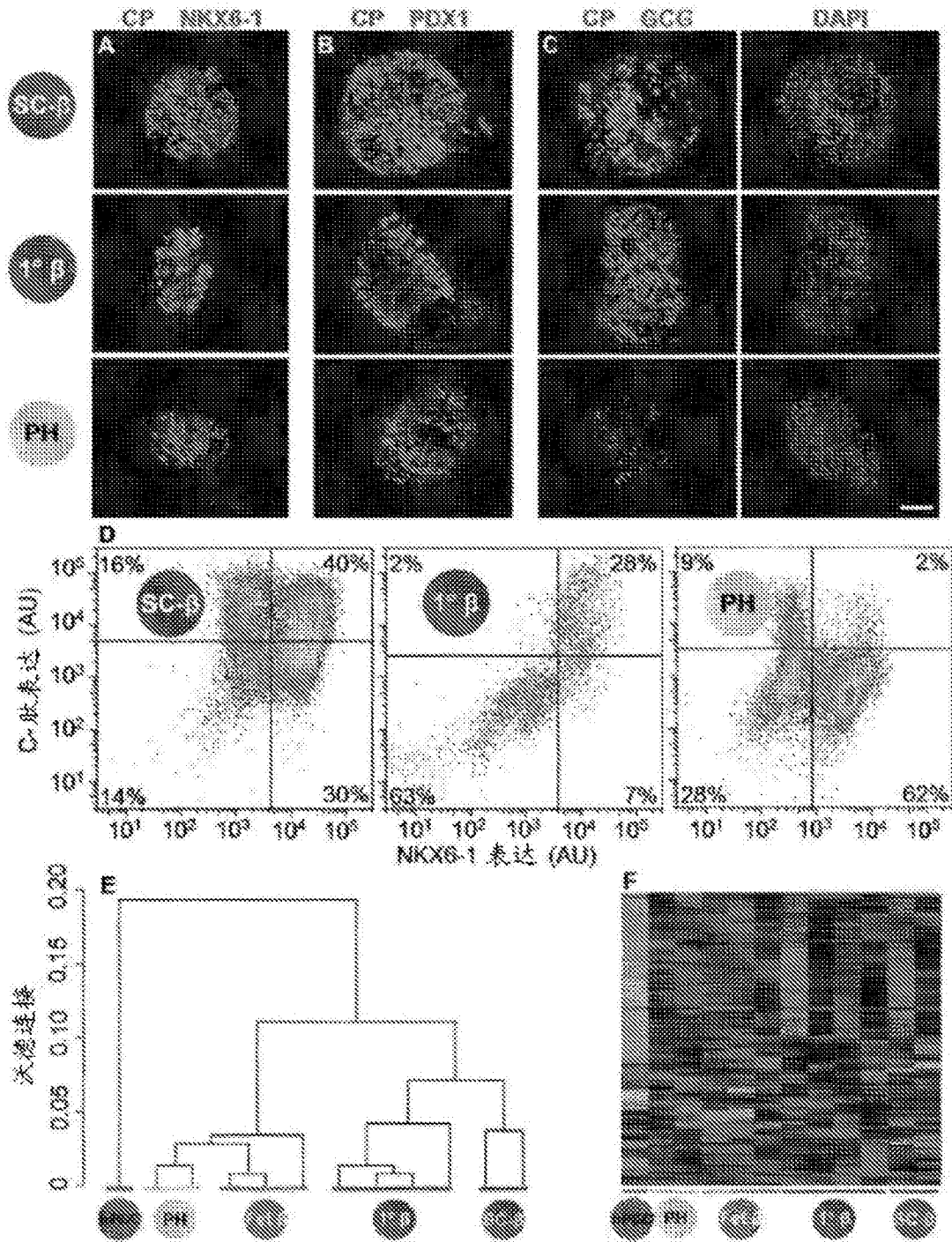


图5A-5F

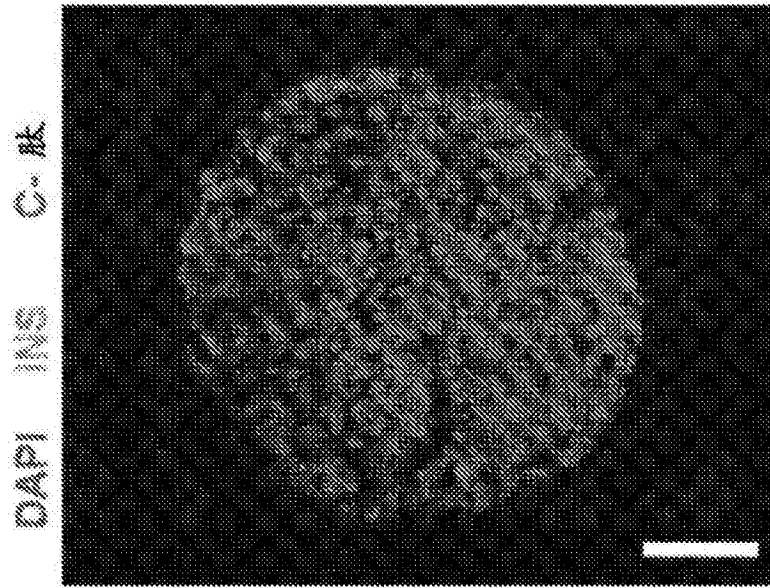


图6

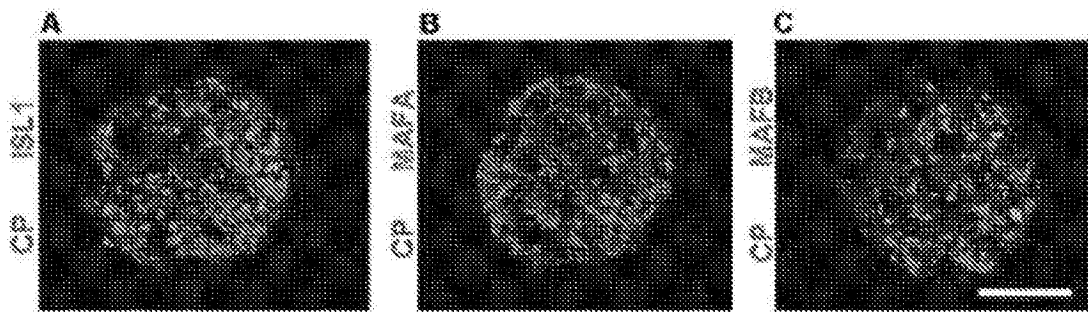


图7A-7C

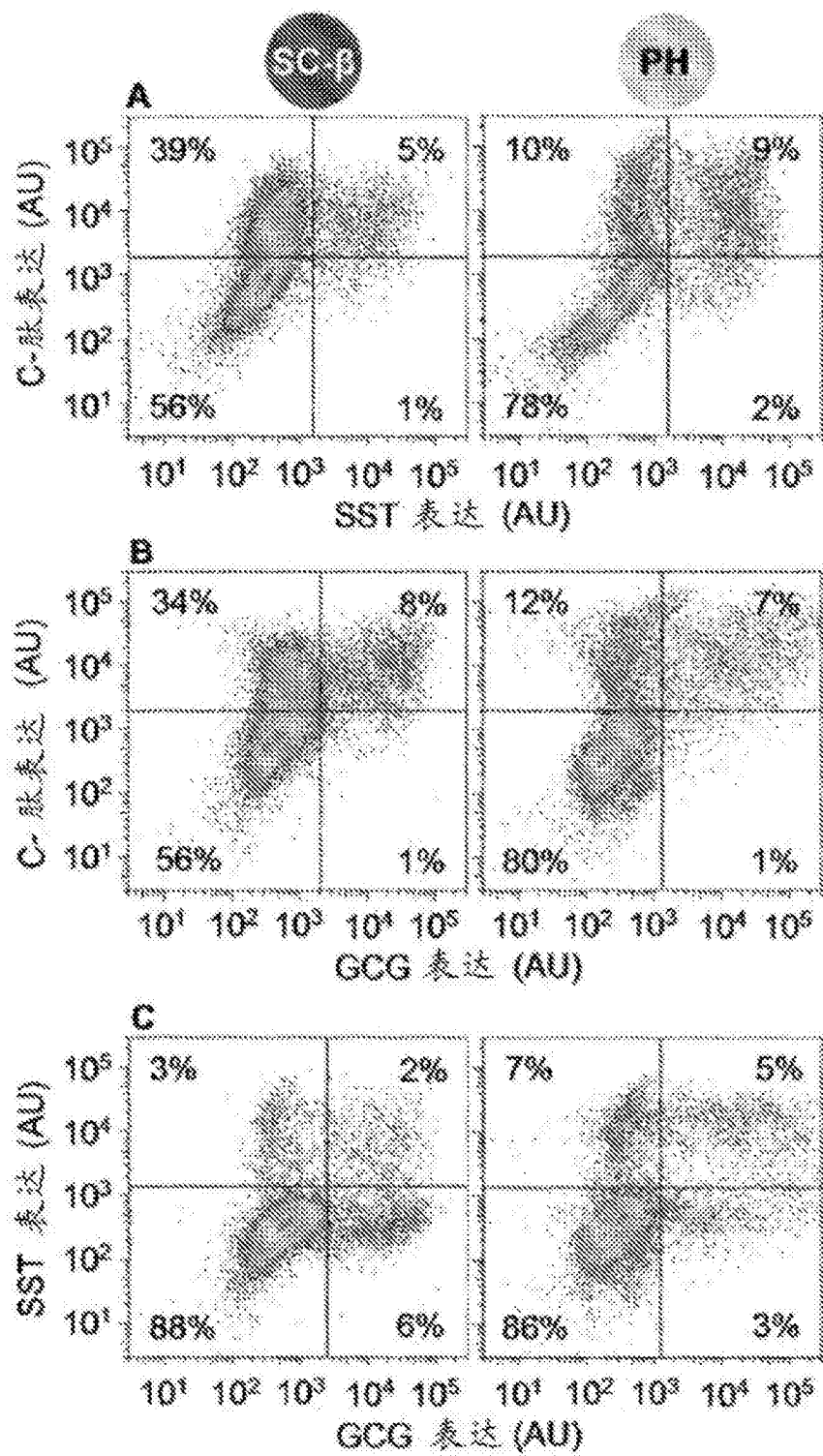


图8A-8C

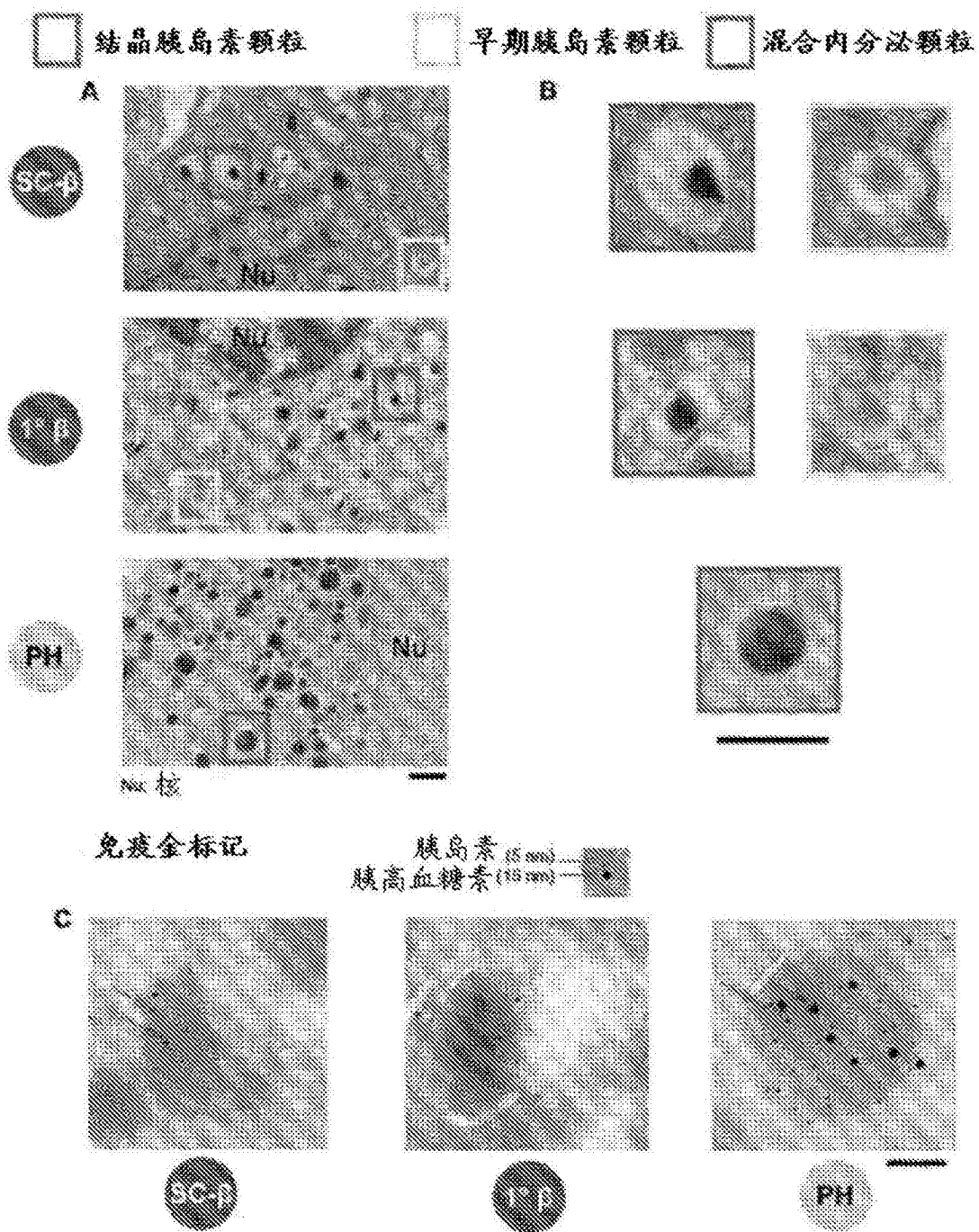


图9A-9C

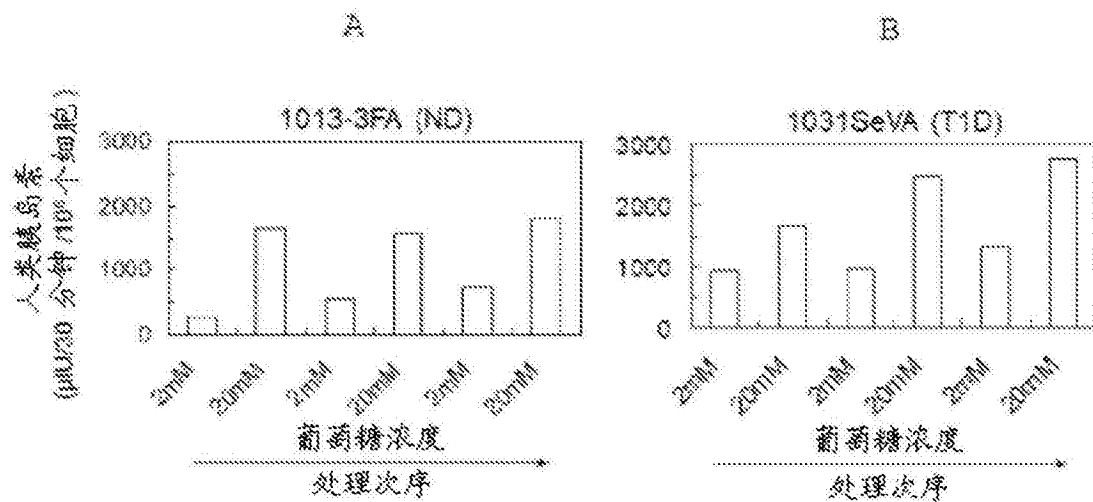


图10A-10B

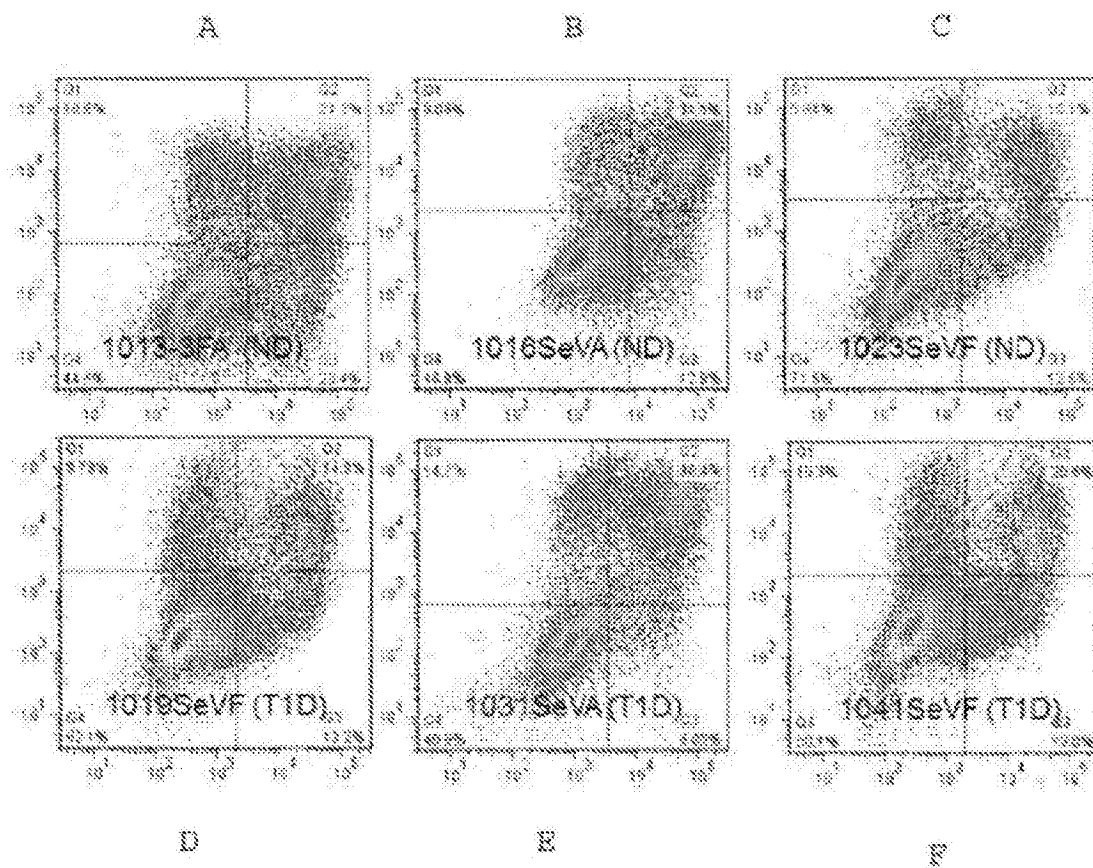


图11A-11F

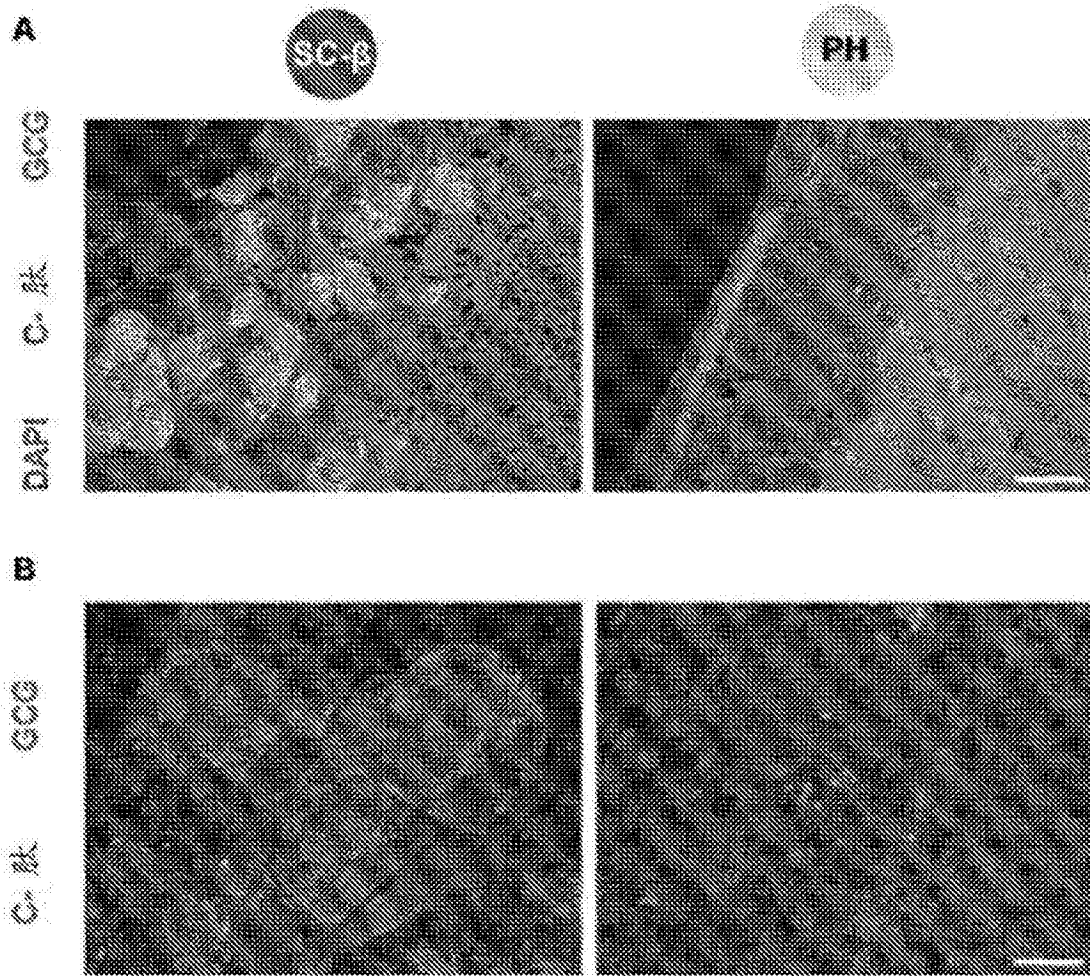


图13A-13B

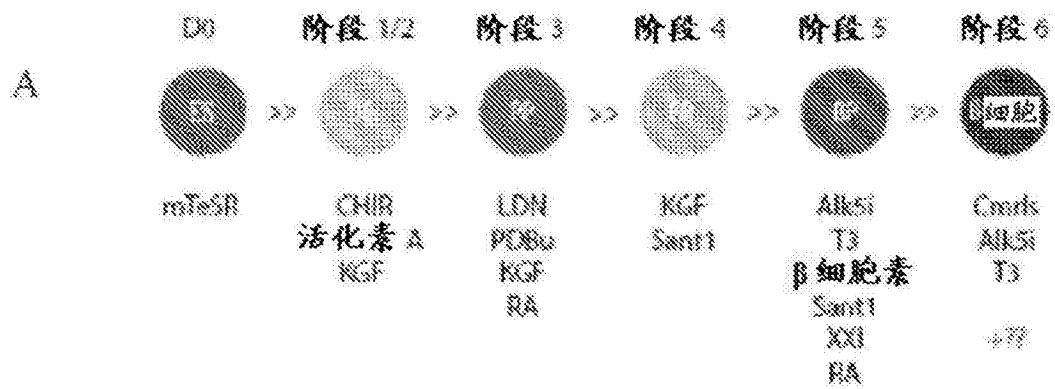


图14A

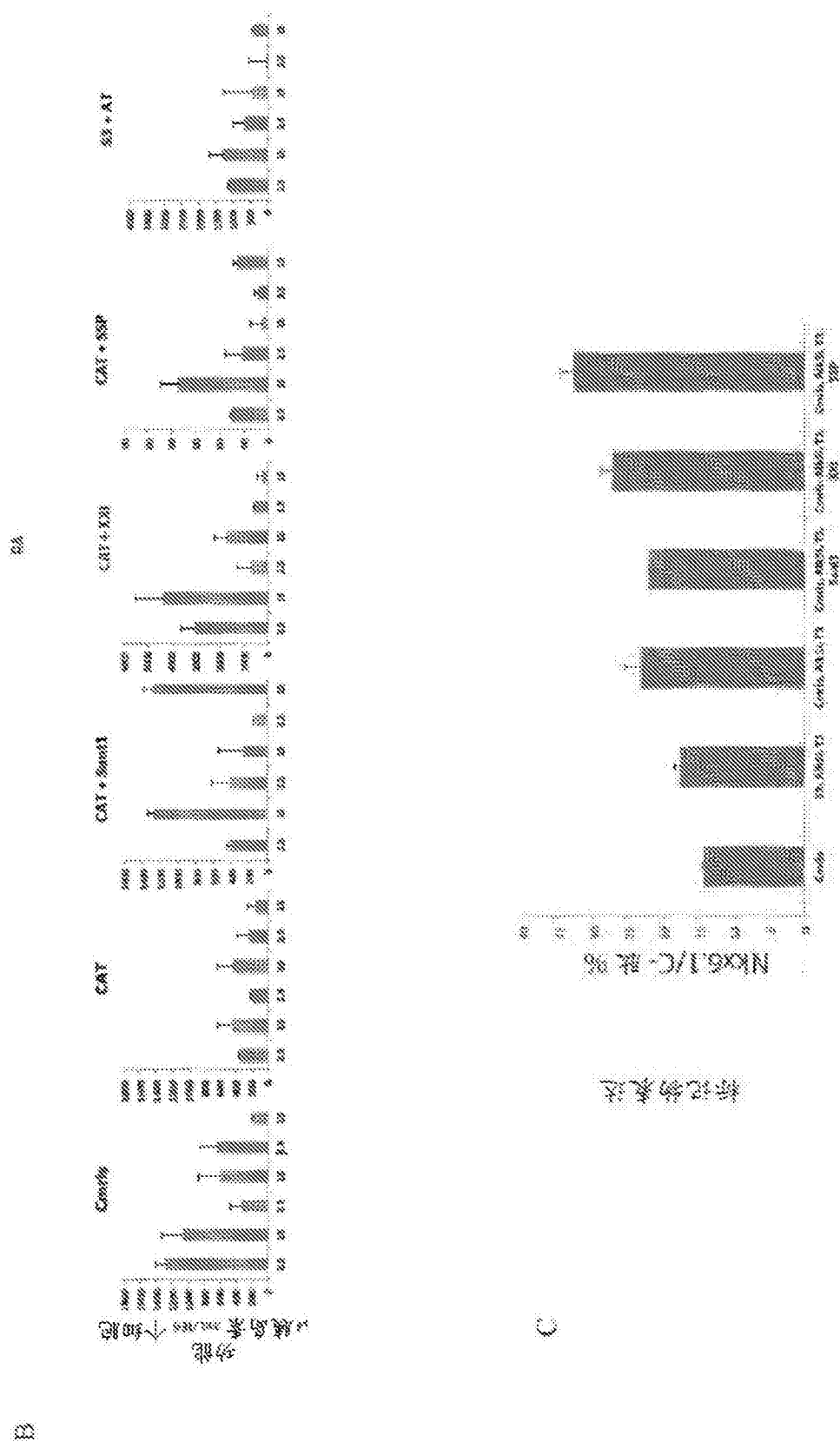


图14B-14C

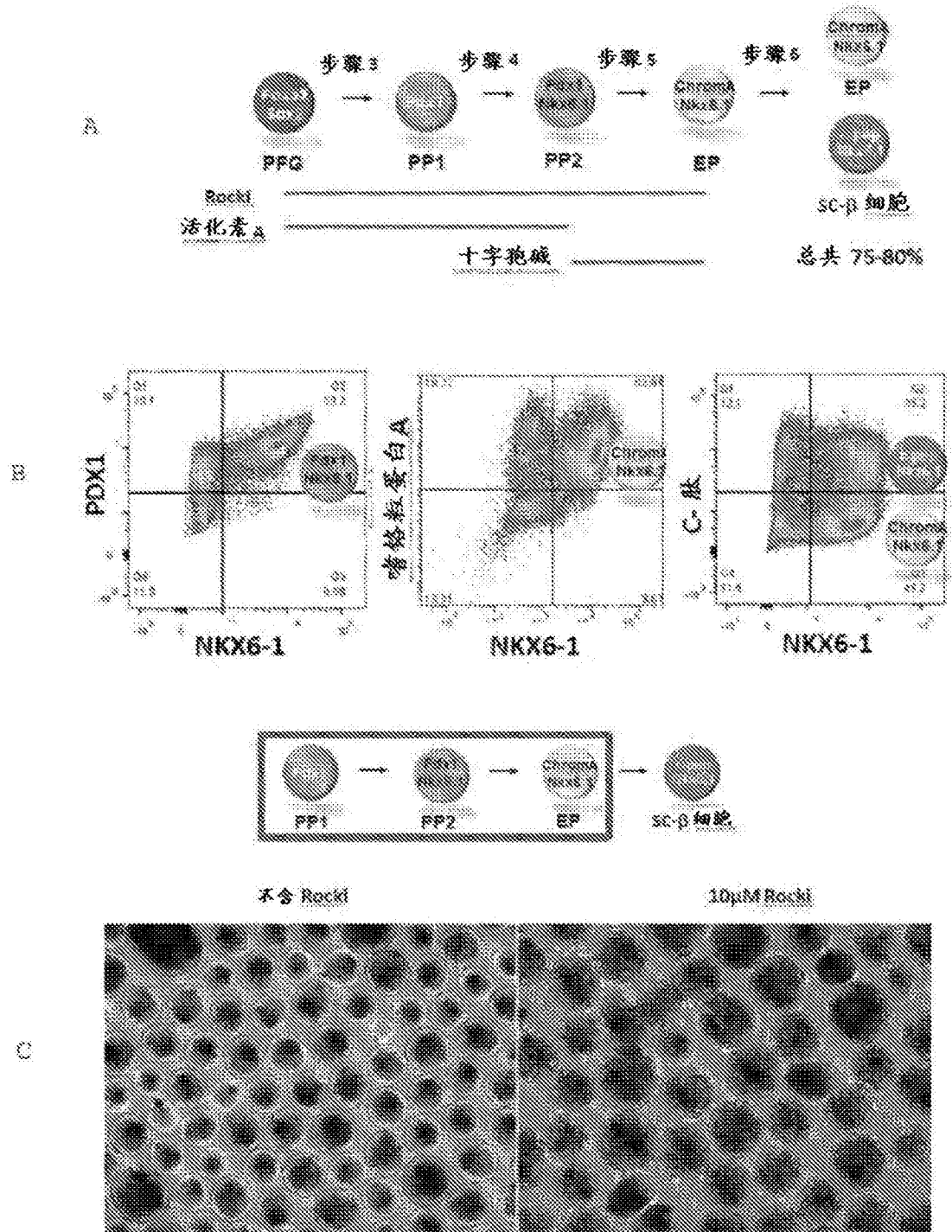


图15A-15C

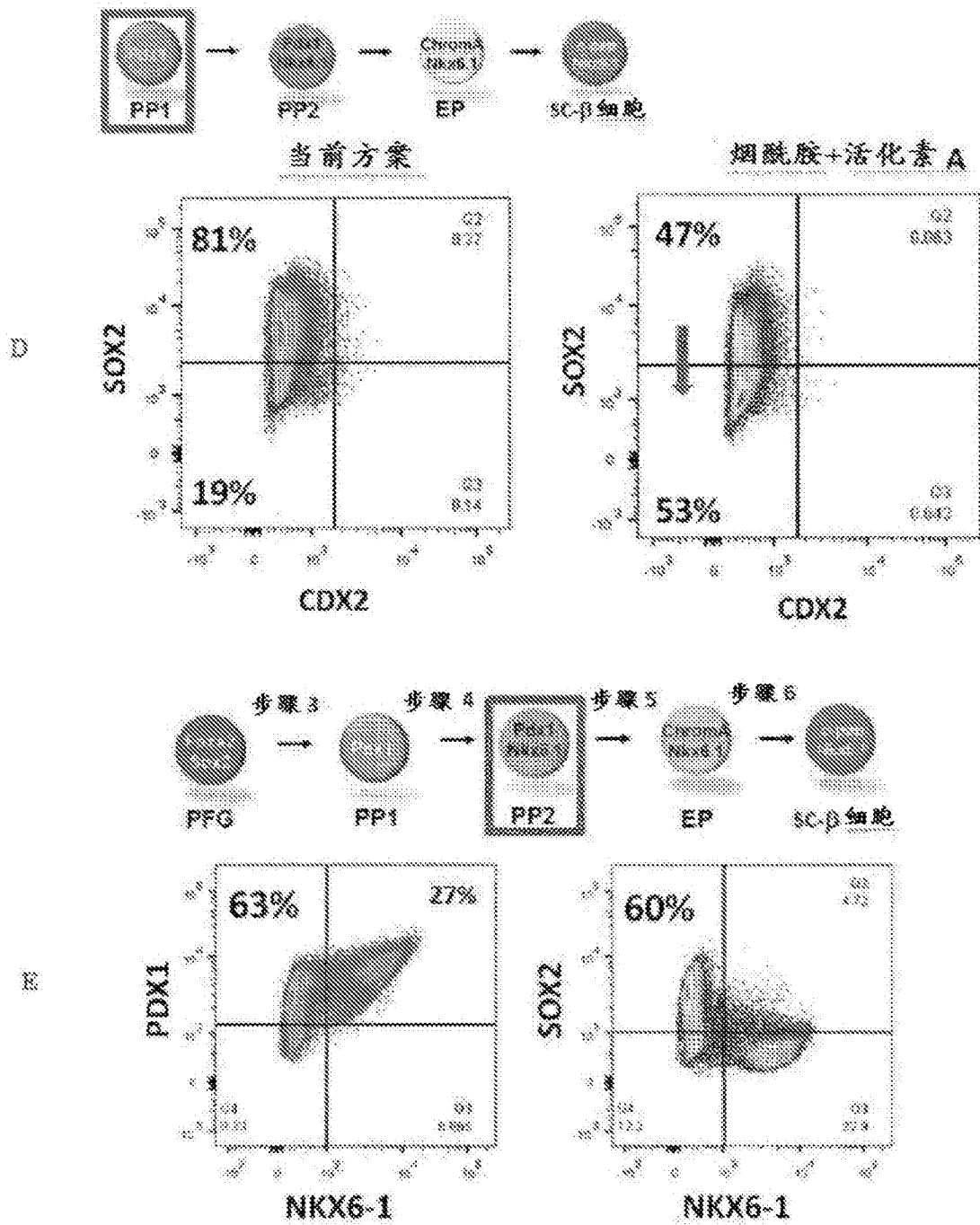


图15D-15E

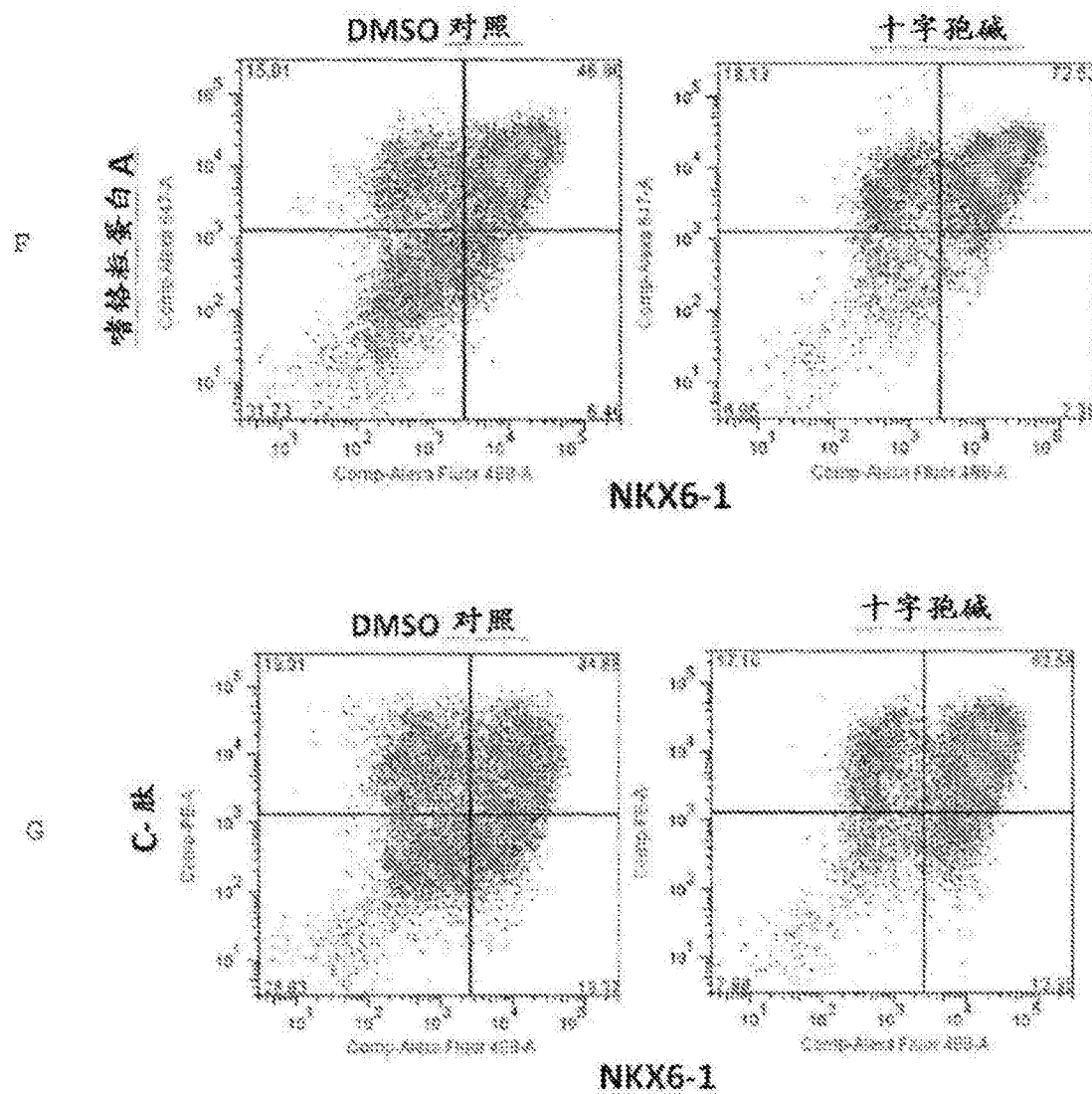


图15F-15G

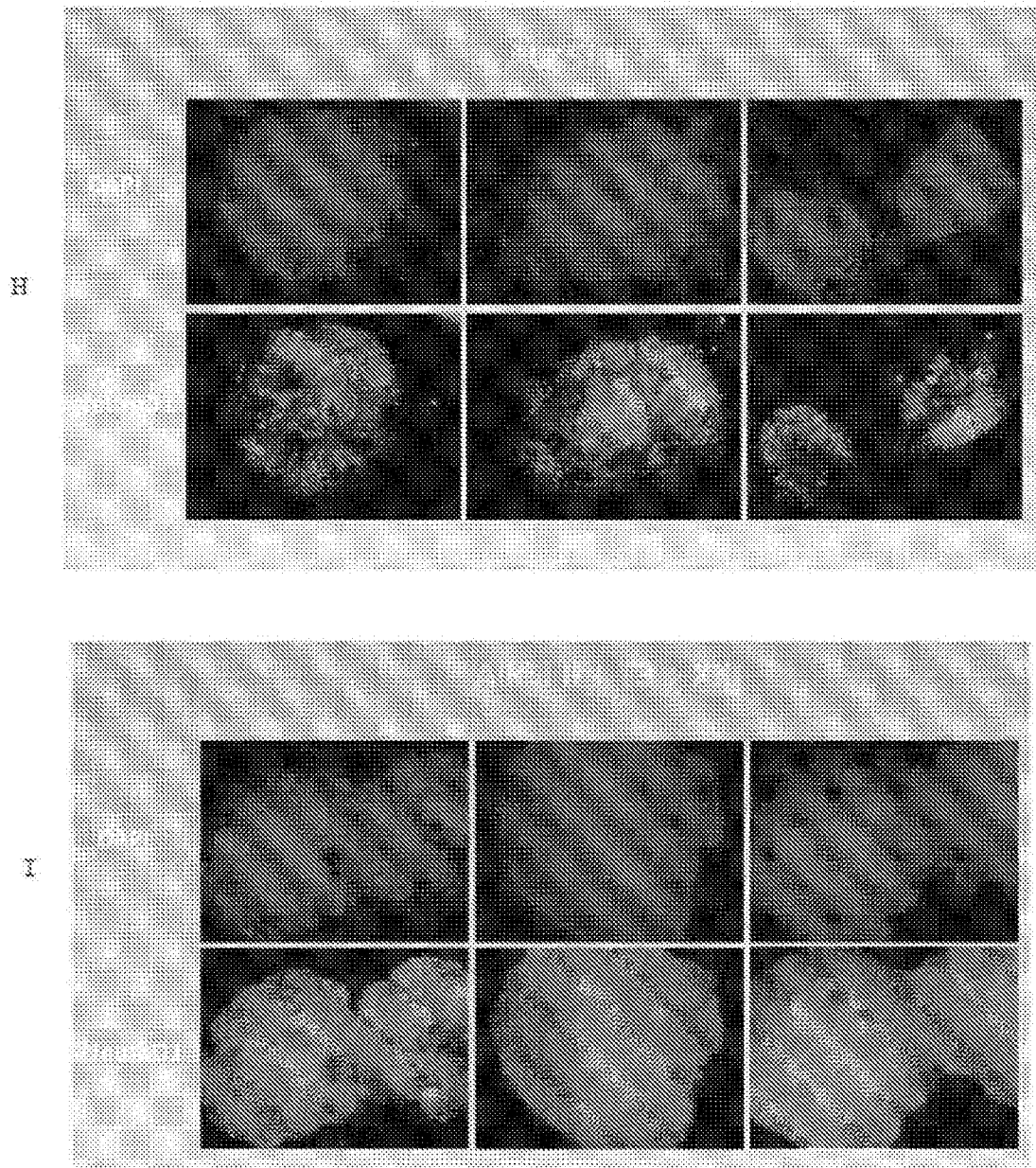


图15H-15I

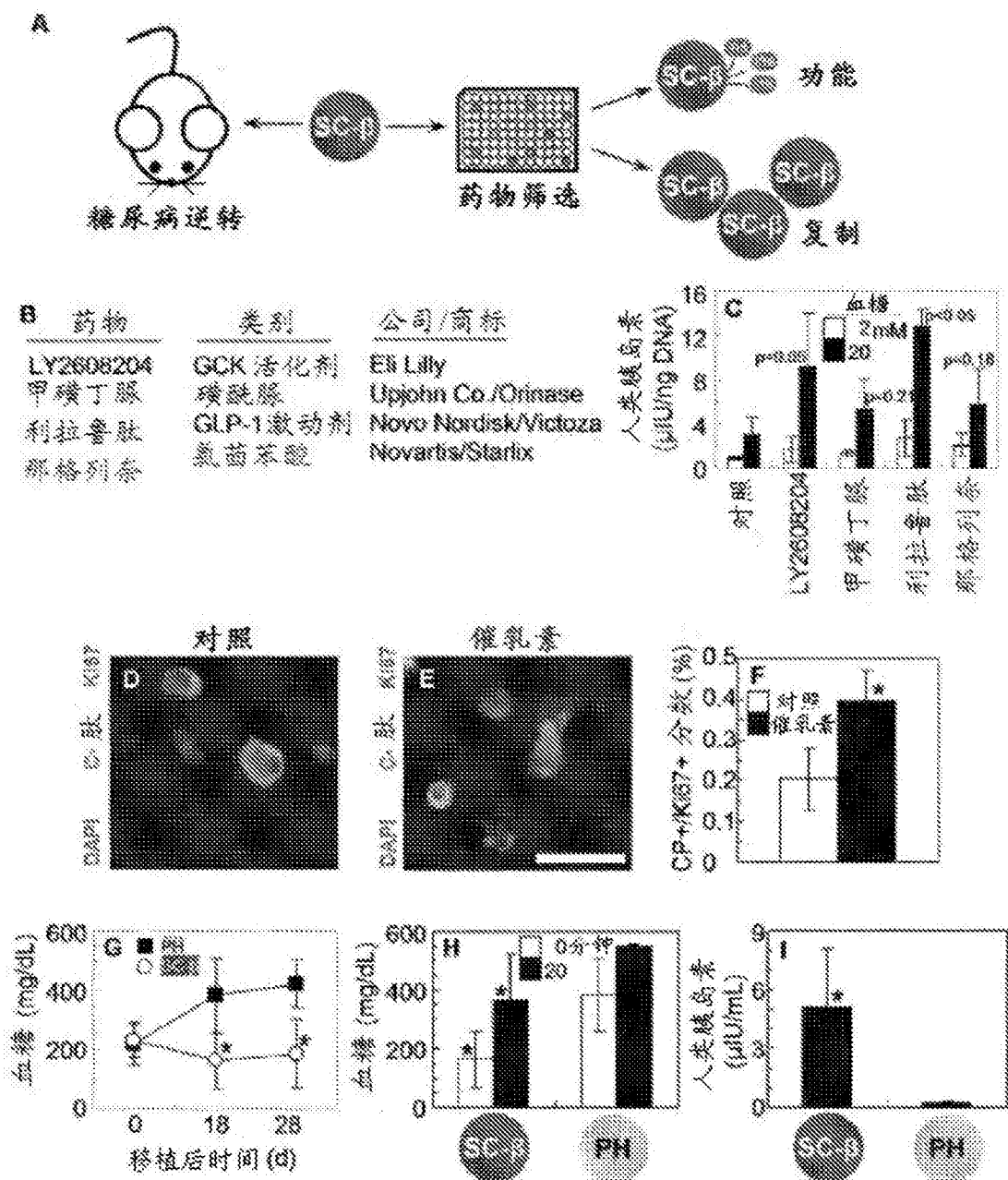


图16A-16I

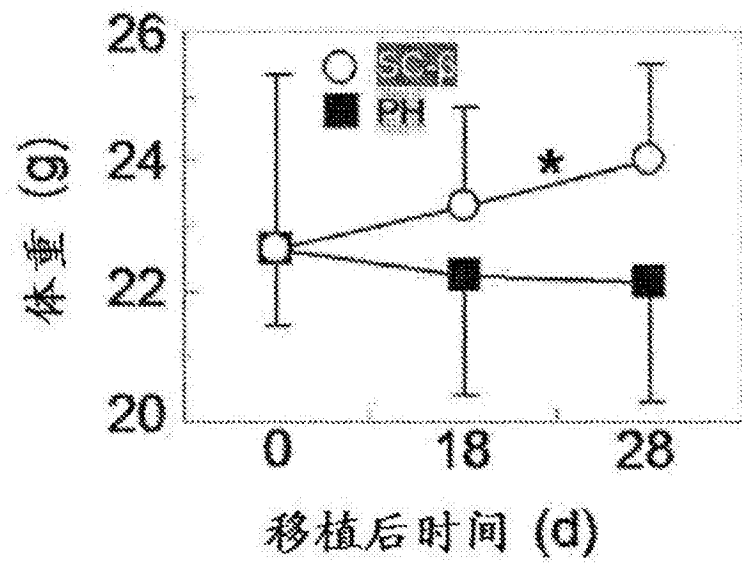


图17

1. 一种干细胞衍生 β 细胞(SC- β),其中所述SC- β 细胞展现体外葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)反应。
2. 根据权利要求1所述的细胞,其中所述SC- β 细胞为成熟的。
3. 根据权利要求1至2中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞展现体内GSIS反应。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞展现对至少一次葡萄糖激发的GSIS反应。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞展现对至少两次连续葡萄糖激发的GSIS反应。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞展现对至少三次连续葡萄糖激发的GSIS反应。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的细胞,其中GSIS反应在所述细胞移植至人类或动物后很快观测到。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的细胞,其中所述GSIS反应在所述细胞移植至人类或动物大约24小时内观测到。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的细胞,其中所述GSIS反应在所述细胞移植至人类或动物大约2周内观测到。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的细胞,其中表征为对高葡萄糖浓度起反应所分泌的胰岛素相比于低葡萄糖浓度时的比率的所述细胞的刺激指数类似于内源性成熟胰腺 β 细胞的刺激指数。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的细胞,其中所述刺激指数大于或等于1,或大于或等于1.1,或大于或等于1.3,或大于或等于2,或大于或等于2.3,或大于或等于2.6。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞对细胞因子起反应而展现细胞因子诱发的细胞凋亡。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的细胞,其中所述细胞因子选自由以下组成的组:白细胞介素- 1β (IL- β)、干扰素- γ (INF- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和其组合。
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的细胞,其中对抗糖尿病剂起反应,胰岛素从所述SC- β 细胞的分泌得到增强。
15. 根据权利要求14所述的细胞,其中所述抗糖尿病剂包含选自由以下组成的组的促分泌素:胰岛素模拟物、磺酰脲、氯茴苯酸和其组合。
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞为单激素的。
17. 根据权利要求1至16中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞展现类似于内源性成熟胰腺 β 细胞的形态的形态。
18. 根据权利要求1至17中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞展现在电子显微镜下类似于内源性成熟胰腺 β 细胞的胰岛素颗粒的囊封结晶胰岛素颗粒。
19. 根据权利要求1至18中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞展现低复制速率。
20. 根据权利要求1至19中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞展现类似于内源性成熟胰腺 β 细胞的葡萄糖刺激的 Ca^{2+} 通量(GSCF)的GSCF。
21. 根据权利要求1至20中任一项所述的细胞,其中所述SC- β 细胞展现对至少一次葡萄糖激发的GSCF反应。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的细胞, 其中所述SC- β 细胞展现对至少两次葡萄糖激发的GSCF反应。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的细胞, 其中所述SC- β 细胞展现对至少三次葡萄糖激发的GSCF反应。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的细胞, 其中所述SC- β 细胞展现增加的钙通量。

25. 如权利要求24所述的方法, 其中所述增加的钙通量包含增加的流入量或低葡萄糖浓度相对于高葡萄糖浓度的流入比率。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的细胞, 其中所述SC- β 细胞表达至少一种选自由以下组成的组的表征内源性成熟胰腺 β 细胞的标记物: 胰岛素、C-肽、PDX1、MAFA、NKX6-1、PAX6、NEUROD1、葡萄糖激酶(GCK)、SLC2A1、PCSK1、KCNJ11、ABCC8、SLC30A8、SNAP25、RAB3A、GAD2、PTPRN、NKX2-2、Pax4。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的细胞, 其中所述SC- β 细胞不表达至少一种选自由以下组成的组的标记物:

a) 选自由以下组成的组的激素:

i) 胰高血糖素(GCG), 和

ii) 生长激素抑制素(SST); 或

b) 选自由以下组成的组的腺泡细胞标记物:

i) 淀粉酶, 和

ii) 羧肽酶A(CPA1);

c) 选自由以下组成的组的 α 细胞标记物

i) GCG,

ii) Arx,

iii) Irx1, 和

IR; 以及

d) 选自由以下组成的组的导管细胞标记物:

i) CFTR, 和

ii) Sox9。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的细胞, 其中所述SC- β 细胞从胰岛素阳性内分泌细胞或选自由以下组成的组的其前驱细胞体外分化: Nkx6-1阳性胰腺祖细胞、Pdx1阳性胰腺祖细胞和多潜能干细胞。

29. 根据权利要求28所述的细胞, 其中所述多潜能干细胞选自由以下组成的组: 胚胎干细胞及诱导性多潜能干细胞。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的细胞, 其中所述SC- β 细胞为人类的。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的细胞, 其中所述SC- β 细胞未进行基因修饰。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的细胞, 其中所述SC- β 细胞进行基因修饰。

33. 根据权利要求1至32中任一项所述的细胞, 其中每个SC- β 细胞产生的胰岛素为在高葡萄糖浓度下每1000个细胞每孵育30分钟在0.5与10 μ IU之间。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的细胞, 其中每个SC- β 细胞产生的胰岛素为在高葡萄糖浓度下每1000个细胞每孵育30分钟大约2.5 μ IU。

35. 根据权利要求33或34所述的细胞,其中所述孵育离体进行。
36. 一种细胞系,其包含根据权利要求1至35中任一项所述的细胞。
37. 根据权利要求36所述的细胞系,其中所述细胞系稳定表达胰岛素。
38. 根据权利要求36或37所述的细胞系,其中所述细胞可以冷冻,解冻,并扩增约24小时与44小时之间的倍增时间,无显著形态改变,直至至少30次继代。
39. 一种从胰岛素阳性内分泌细胞产生SC- β 细胞的方法,所述方法包括使包含胰岛素阳性内分泌细胞的细胞群体与至少两种包含以下的 β 细胞成熟因子在促进细胞簇集的条件下接触:a)转化生长因子 β (TGF- β)信号传导通路抑制剂和b)甲状腺激素信号传导通路活化剂,以诱导所述群体中的至少一种胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞,其中所述SC- β 细胞展现体外GSIS反应。
40. 如权利要求39所述的方法,其中所述SC- β 细胞展现对至少一次葡萄糖激发的反应。
41. 如权利要求39或40所述的方法,其中所述SC- β 细胞展现对至少两次连续葡萄糖激发的反应。
42. 如权利要求39至41中任一项所述的方法,其中所述SC- β 细胞展现对至少三次连续葡萄糖激发的反应。
43. 如权利要求39至42中任一项所述的方法,其中所述SC- β 细胞的形态类似于内源性成熟 β 细胞的形态。
44. 如权利要求39至43中任一项所述的方法,其中所述SC- β 细胞展现体内葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)反应。
45. 如权利要求39至44中任一项所述的方法,其中所述GSIS反应在所述SC- β 细胞移植至受试者后立即观测到。
46. 如权利要求39至45中任一项所述的方法,其中所述GSIS反应在所述SC- β 细胞移植至受试者后大约24小时内观测到。
47. 如权利要求39至46中任一项所述的方法,其中所述GSIS反应在所述SC- β 细胞移植至受试者大约两周内观测到。
48. 如权利要求39至47中任一项所述的方法,其中使所述细胞群体与100nM-100 μ M的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。
49. 如权利要求39至48中任一项所述的方法,其中使所述细胞群体与10 μ M的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。
50. 如权利要求39至49中任一项所述的方法,其中所述TGF- β 信号传导通路包含TGF- β 受体I型激酶信号传导。
51. 如权利要求39至50中任一项所述的方法,其中所述TGF- β 信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II。
52. 如权利要求39至51中任一项所述的方法,其中所述TGF- β 信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II的类似物或衍生物。
53. 如权利要求39至52中任一项所述的方法,其中使所述细胞群体与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。
54. 如权利要求39至53中任一项所述的方法,其中使所述细胞群体与1 μ M的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。

55. 如权利要求39至54中任一项所述的方法, 其中所述甲状腺激素信号传导通路活化剂包含三碘甲状腺原氨酸(T3)。

56. 如权利要求39至55中任一项所述的方法, 其中所述细胞群体任选地与蛋白激酶抑制剂接触。

57. 如权利要求56所述的方法, 其中所述细胞群体不与所述蛋白激酶抑制剂接触。

58. 如权利要求56所述的方法, 其中所述细胞群体与所述蛋白激酶抑制剂接触。

59. 如权利要求57所述的方法, 其中使所述细胞群体与10nM-1 μ M之间的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。

60. 如权利要求58或59所述的方法, 其中使所述细胞群体与100nM的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。

61. 如权利要求58至60中任一项所述的方法, 其中所述蛋白激酶抑制剂包含十字孢碱。

62. 如权利要求39至61中任一项所述的方法, 其进一步包括使所述细胞群体与至少一种其它 β 细胞成熟因子接触。

63. 如权利要求62所述的方法, 其中所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含囊肿性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)抑制剂。

64. 如权利要求62或63所述的方法, 其中使所述细胞群体与100nM-100 μ M之间的浓度的所述CFTR抑制剂接触。

65. 如权利要求62至64中任一项所述的方法, 其中使所述细胞群体与10nm-10 μ M的浓度的所述CFTR抑制剂接触。

66. 如权利要求62至65中任一项所述的方法, 其中所述CFTR抑制剂包含Gly-H101。

67. 如权利要求62至66中任一项所述的方法, 其中所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含O-GlcNAc酶抑制剂。

68. 如权利要求67所述的方法, 其中使所述细胞群体与100nM-100 μ M之间的浓度的所述O-GlcNAc酶抑制剂接触。

69. 如权利要求67或68所述的方法, 其中使所述细胞群体与10nM-10 μ M之间的浓度的所述O-GlcNAc酶抑制剂接触。

70. 如权利要求39至69中任一项所述的方法, 其中所述O-GlcNAc酶抑制剂包含Thiamet G。

71. 如权利要求39至70中任一项所述的方法, 其中所述细胞群体在适合培养基中培养。

72. 如权利要求71所述的方法, 其中所述适合培养基包含Connought Medical Research Laboratories 1066补充胰岛培养基(CMRLS)或CMRLS的组分。

73. 如权利要求72所述的方法, 其中所述CMRLS补充有血清。

74. 如权利要求72或73所述的方法, 其中所述CMRLS补充有10%胎牛血清。

75. 如权利要求39至74中任一项所述的方法, 其中所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。

76. 如权利要求39至75中任一项所述的方法, 其中所述细胞群体维持在悬浮培养物中达足以诱导所述细胞群体中至少一种所述胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成至少一种SC- β 细胞的时间段。

77. 如权利要求76所述的方法, 其中所述时间段包含至少7天。

78. 如权利要求76或77所述的方法,其中所述时间段包含7天与21天之间。
79. 如权利要求76至78中任一项所述的方法,其中所述时间段包含7天与14天之间。
80. 如权利要求76至79中任一项所述的方法,其中所述时间段包含10天与14天之间。
81. 如权利要求76至80中任一项所述的方法,其中所述时间段包含14天。
82. 如权利要求77至81中任一项所述的方法,其中每隔一天补充所述 β 细胞成熟因子。
83. 如权利要求39至82中任一项所述的方法,其中所述细胞群体中至少1%所述胰岛素阳性内分泌细胞被诱导成熟成SC- β 细胞。
84. 如权利要求39至83中任一项所述的方法,其中所述群体中至少99%所述胰岛素阳性内分泌细胞被诱导成熟成SC- β 细胞。
85. 如权利要求39至84中任一项所述的方法,其中所述群体中至少30%所产生的细胞包含SC- β 细胞。
86. 如权利要求39至85中任一项所述的方法,其中所述SC- β 细胞表达C-肽、胰岛素、NKX6-1、Pdx1,并共表达NKX6-1和C-肽。
87. 如权利要求39至86中任一项所述的方法,其中所述胰岛素阳性内分泌细胞还表达Pdx1和NKX6-1。
88. 如权利要求39至87中任一项所述的方法,其中所述胰岛素阳性内分泌细胞是由选自自由胚胎干细胞和诱导性多潜能干细胞组成的组的多潜能干细胞群体产生。
89. 如权利要求39至88中任一项所述的方法,其中所述SC- β 细胞包含人类细胞。
90. 如权利要求39至89中任一项所述的方法,其中SC- β 细胞在体外的产生是可量的。
91. 一种分离的SC- β 细胞群体,其根据如权利要求39至90中任一项所述的方法产生。
92. 一种微胶囊,其包含囊封在其中的根据权利要求91所述的分离的SC- β 细胞群体。
93. 一种组合物,其包含根据如权利要求39至90中任一项所述的方法产生的SC- β 细胞群体。
94. 一种分析,其包含根据如权利要求39至90中任一项所述的方法产生的分离的SC- β 细胞群体。
95. 如权利要求94所述的分析,其用于鉴别一种或多种促进或抑制选自以下组成的组的 β 细胞命运的候选试剂: β 细胞增殖、 β 细胞复制、 β 细胞死亡、 β 细胞功能、 β 细胞对免疫攻击的敏感性或 β 细胞对去分化或分化的敏感性。
96. 如权利要求94所述的分析,其用于鉴别一种或多种促进至少一种胰岛素阳性内分泌细胞或其前驱细胞分化成至少一种SC- β 细胞的候选试剂。
97. 一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用包含分离的SC- β 细胞群体的组合物,其根据如权利要求39至90中任一项所述的方法产生。
98. 如权利要求97所述的方法,其中所述SC- β 细胞被囊封于微胶囊中。
99. 如权利要求97或98所述的方法,其中所述SC- β 细胞由从所述SC- β 细胞所施用的同一受试者获得的多潜能干细胞群体产生。
100. 如权利要求97至99中任一项所述的方法,其中所述SC- β 细胞由iPS细胞群体产生,其中所述iPS细胞衍生自从所述SC- β 细胞所施用的同一受试者获得的细胞。
101. 如权利要求97至100中任一项所述的方法,其中所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。

102. 如权利要求101所述的方法,其中所述糖尿病选自由以下各糖尿病组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。

103. 如权利要求97至100中任一项所述的方法,其中所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

104. 一种分离的SC- β 细胞群体的用途,其通过根据权利要求39至100中任一项所述的方法产生以施用于需要其的受试者。

105. 如权利要求104所述的用途,其中所述分离的SC- β 细胞群体囊封于微胶囊中施用于所述受试者。

106. 如权利要求104或105所述的用途,其中所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。

107. 如权利要求104至106中任一项所述的用途,其中所述糖尿病选自由以下各糖尿病组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。

108. 如权利要求104或105所述的用途,其中所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

109. 一种培养基的用途,所述培养基包含a)Alk5抑制剂,b)三碘甲状腺原氨酸(T3),任选地c)十字孢碱,和任选地d)CMRLS,其用于诱导胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞,其中所述SC- β 细胞展现体外和/或体内GSIS反应。

110. 一种从Pdx1阳性胰腺祖细胞产生NKX6-1阳性胰腺祖细胞的方法,其包括使包含Pdx1阳性胰腺祖细胞的细胞群体在促进细胞簇集的条件下与包含以下的至少两种 β 细胞成熟因子接触:a)至少一种来自成纤维细胞生长因子(FGF)家族的生长因子,b)索尼克刺猬通路抑制剂,和任选地c)低浓度视黄酸(RA)信号传导通路活化剂,历时至少五天时间,从而诱导所述群体中的至少一种Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达NKX6-1。

111. 如权利要求110所述的方法,其中使所述细胞群体与1ng/mL-100ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自FGF家族的生长因子接触。

112. 如权利要求110或111所述的方法,其中使所述细胞群体与50ng/mL的浓度的所述至少一种来自FGF家族的生长因子接触。

113. 如权利要求110至112中任一项所述的方法,其中所述至少一种来自FGF家族的生长因子包含角化细胞生长因子(KGF)。

114. 如权利要求110至113中任一项所述的方法,其中所述至少一种来自FGF家族的生长因子选自由以下组成的组:FGF2、FGF8B、FGF10和FGF21。

115. 如权利要求110至114中任一项所述的方法,其中所述细胞群体不与所述RA信号传导通路活化剂接触。

116. 如权利要求110至115中任一项所述的方法,其中使所述细胞群体与0.01 μ M-1.0 μ M之间的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。

117. 如权利要求110至116中任一项所述的方法,其中使所述细胞群体与0.1 μ M的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。

118. 如权利要求110至117中任一项所述的方法,其中所述RA信号传导通路活化剂包含RA。

119. 如权利要求110至118中任一项所述的方法, 其中使所述细胞群体与0.1 μ M与0.5 μ M之间的浓度的所述SHH通路抑制剂接触。

120. 如权利要求110至119中任一项所述的方法, 其中使所述细胞群体与0.25 μ M的浓度的所述SHH通路抑制剂接触。

121. 如权利要求110至120中任一项所述的方法, 其中所述SHH通路抑制剂包含Sant1。

122. 如权利要求110至121中任一项所述的方法, 其进一步包括将所述细胞群体暴露于至少一种其它 β 细胞成熟因子。

123. 如权利要求122所述的方法, 其中所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含至少一种来自EGF家族的生长因子。

124. 如权利要求123所述的方法, 其中将所述细胞群体暴露于2ng/mL-200ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子。

125. 如权利要求123或124所述的方法, 其中将所述细胞群体暴露于20ng/mL的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子。

126. 如权利要求123至125中任一项所述的方法, 其中至少一种来自EGF家族的生长因子选自自由以下组成的组: β 细胞素和EGF。

127. 如权利要求110至126中任一项所述的方法, 其中所述细胞群体在适合培养基中培养。

128. 如权利要求110至127中任一项所述的方法, 其中所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。

129. 如权利要求110至128中任一项所述的方法, 其中每隔一天补充所述 β 细胞成熟因子。

130. 如权利要求110至129中任一项所述的方法, 其中蛋白激酶C活化剂在所述5天期间未加入所述悬浮培养物中。

131. 如权利要求110至129中任一项所述的方法, 其中蛋白激酶C活化剂在所述5天前从所述悬浮培养物去除。

132. 如权利要求110或131所述的方法, 其中所述蛋白激酶C活化剂包含PdbU。

133. 如权利要求110至132中任一项所述的方法, 其中BMP信号传导通路抑制剂在所述5天期间未加入所述悬浮培养物中。

134. 如权利要求110至132中任一项所述的方法, 其中BMP信号传导通路抑制剂在所述5天前从所述悬浮培养物去除。

135. 如权利要求133或134所述的方法, 其中所述BMP信号传导通路抑制剂包含LDN193189。

136. 如权利要求110至135中任一项所述的方法, 其中所述群体中至少10%的所述Pdx1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞。

137. 如权利要求110至136中任一项所述的方法, 其中所述群体中至少95%的所述Pdx1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞。

138. 如权利要求110至137中任一项所述的方法, 其中所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1、NKX6-1和FoxA2。

139. 如权利要求110至138中任一项所述的方法, 其中所述Pdx1阳性胰腺祖细胞由选自

由胚胎干细胞及诱导性多潜能干细胞组成的组的多潜能干细胞群体产生。

140. 一种分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体,其通过如权利要求110至139中任一项所述的方法获得。

141. 一种微胶囊,其包含囊封在其中的根据权利要求140所述的分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体。

142. 一种组合物,其包含根据如权利要求110至139中任一项所述的方法产生的分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体。

143. 一种分析,其包含根据如权利要求110至139中任一项所述的方法产生的分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体。

144. 如权利要求143所述的分析,其用于鉴别一种或多种促进至少一种Pdx1阳性胰腺祖细胞或其前驱细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞的候选试剂。

145. 一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用包含根据如权利要求110至139中任一项所述的方法产生的分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体的组合物。

146. 如权利要求145所述的方法,其中所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞由从所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞所施用的同一受试者获得的多潜能干细胞群体产生。

147. 如权利要求145或146所述的方法,其中所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞被囊封于微胶囊中。

148. 如权利要求145至147中任一项所述的方法,其中所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。

149. 如权利要求148所述的方法,其中所述糖尿病选自由以下各糖尿病组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。

150. 如权利要求145至147中任一项所述的方法,其中所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

151. 一种分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体的用途,其通过根据权利要求110至139中任一项所述的方法产生以分化成SC- β 细胞。

152. 一种分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体的用途,其通过根据权利要求110至139中任一项所述的方法产生以施用于需要其的受试者。

153. 如权利要求152所述的用途,其中所述分离的NKX6-1阳性胰腺祖细胞群体囊封于微胶囊中施用于所述受试者。

154. 如权利要求152或153所述的用途,其中所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。

155. 如权利要求154所述的用途,其中所述糖尿病选自由以下各糖尿病组成的组:I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。

156. 如权利要求152或153所述的用途,其中所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

157. 一种由NKX6-1阳性胰腺祖细胞产生胰岛素阳性内分泌细胞的方法,其包括使包含NKX6-1阳性胰腺祖细胞的细胞群体在促进细胞簇集的条件下与包含以下的至少两种 β 细胞成熟因子接触:a)TGF- β 信号传导通路抑制剂,和b)甲状腺激素信号传导通路活化剂,以诱导所述群体中的至少一种NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成至少一种胰岛素阳性内分泌细胞,

其中所述胰岛素阳性胰腺祖细胞表达胰岛素。

158. 如权利要求157所述的方法, 其中使所述细胞群体与 $1\mu\text{M}$ – $100\mu\text{M}$ 之间的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。

159. 如权利要求157或158所述的方法, 其中使所述细胞群体与 $10\mu\text{M}$ 的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。

160. 如权利要求157至159中任一项所述的方法, 其中所述TGF- β 信号传导通路包含TGF- β 受体I型激酶信号传导。

161. 如权利要求157至160中任一项所述的方法, 其中所述TGF- β 信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II。

162. 如权利要求157至161中任一项所述的方法, 其中使所述细胞群体与 $0.1\mu\text{M}$ – $10\mu\text{M}$ 之间的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。

163. 如权利要求157至162中任一项所述的方法, 其中使所述细胞群体与 $1\mu\text{M}$ 的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。

164. 如权利要求157至163中任一项所述的方法, 其中所述甲状腺激素信号传导通路活化剂包含三碘甲状腺原氨酸(T3)。

165. 如权利要求157至164中任一项所述的方法, 其进一步包括使所述细胞群体与至少一种其它 β 细胞成熟因子接触。

166. 如权利要求165所述的方法, 其中所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含 γ -分泌酶抑制剂。

167. 如权利要求166所述的方法, 其中使所述细胞群体与 $0.1\mu\text{M}$ – $10\mu\text{M}$ 之间的浓度的所述 γ -分泌酶抑制剂接触。

168. 如权利要求166或167所述的方法, 其中使所述细胞群体与 $1\mu\text{M}$ 的浓度的所述 γ -分泌酶抑制剂接触。

169. 如权利要求166至168中任一项所述的方法, 其中所述 γ -分泌酶抑制剂包含XXI。

170. 如权利要求166至169中任一项所述的方法, 其中所述 γ -分泌酶抑制剂包含DAPT。

171. 如权利要求165至170中任一项所述的方法, 其中所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含至少一种来自EGF家族的生长因子。

172. 如权利要求171所述的方法, 其中使所述细胞群体与 2ng/mL – 200ng/mL 之间的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子接触。

173. 如权利要求171或172所述的方法, 其中使所述细胞群体与 20ng/mL 的浓度的至少一种来自EGF家族的生长因子接触。

174. 如权利要求171至173中任一项所述的方法, 其中所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含 β 细胞素。

175. 如权利要求171至173中任一项所述的方法, 其中所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含EGF。

176. 如权利要求165至175中任一项所述的方法, 其中所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含低浓度的视黄酸(RA)信号传导通路活化剂。

177. 如权利要求176所述的方法, 其中使所述细胞群体与 $0.01\mu\text{M}$ – $1.0\mu\text{M}$ 之间的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。

178. 如权利要求176或177所述的方法, 其中使所述细胞群体与0.1 μ M的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。

179. 如权利要求176至178中任一项所述的方法, 其中所述RA信号传导通路活化剂包含RA。

180. 如权利要求165至179中任一项所述的方法, 其中所述至少一种其它 β 细胞成熟因子包含索尼克刺猬(SHH)通路抑制剂。

181. 如权利要求180所述的方法, 其中使所述细胞群体与0.1 μ M与0.5 μ M之间的浓度的所述SHH通路抑制剂接触。

182. 如权利要求180或181所述的方法, 其中使所述细胞群体与0.25 μ M的浓度的所述SHH通路抑制剂接触。

183. 如权利要求180至182中任一项所述的方法, 其中所述SHH通路抑制剂包含Sant1。

184. 如权利要求158至183中任一项所述的方法, 其中所述细胞群体任选地与蛋白激酶抑制剂接触。

185. 如权利要求184所述的方法, 其中所述细胞群体不与所述蛋白激酶抑制剂接触。

186. 如权利要求184所述的方法, 其中使所述细胞群体与所述蛋白激酶抑制剂接触。

187. 如权利要求186所述的方法, 其中使所述细胞群体与10nM-1 μ M之间的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。

188. 如权利要求186或187所述的方法, 其中使所述细胞群体与100nM的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。

189. 如权利要求186至188中任一项所述的方法, 其中所述蛋白激酶抑制剂包含十字孢碱。

190. 如权利要求157至189中任一项所述的方法, 其进一步包括将所述细胞群体暴露于葡萄糖。

191. 如权利要求190所述的方法, 其中将所述细胞群体暴露于1mM-50mM之间的浓度的葡萄糖。

192. 如权利要求190或191所述的方法, 其中将所述细胞群体暴露于25mM浓度的葡萄糖。

193. 如权利要求187至192中任一项所述的方法, 其中所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。

194. 如权利要求187至193中任一项所述的方法, 其中所述细胞群体维持于悬浮培养物中达足以诱导群体中的至少一种所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成胰岛素阳性内分泌细胞的时间段。

195. 如权利要求194所述的方法, 其中所述时间段为至少7天。

196. 如权利要求194或195所述的方法, 其中所述悬浮培养物中每隔一天补充所述 β 细胞成熟因子。

197. 如权利要求157至196中任一项所述的方法, 其中所述群体中至少15%所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成胰岛素阳性内分泌细胞。

198. 如权利要求157至197中任一项所述的方法, 其中所述群体中至少99%所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成胰岛素阳性内分泌细胞。

199. 如权利要求157至198中任一项所述的方法, 其中所述胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafb、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素。

200. 如权利要求157至199中任一项所述的方法, 其中所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞由选自胚胎干细胞及诱导性多潜能干细胞组成的组的多潜能干细胞群体产生。

201. 一种分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体, 其根据如权利要求157至200中任一项所述的方法产生。

202. 一种微胶囊, 其包含囊封在其中的根据权利要求201所述的分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体。

203. 一种组合物, 其包含根据如权利要求157至200中任一项所述的方法产生的胰岛素阳性内分泌细胞群体。

204. 一种治疗有需要的受试者的方法, 所述方法包括向受试者施用包含根据如权利要求157至200中任一项所述的方法产生的分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体的组合物。

205. 如权利要求204所述的方法, 其中所述胰岛素阳性内分泌细胞由从所述胰岛素阳性内分泌细胞所施用的同一受试者获得的多潜能干细胞群体产生。

206. 如权利要求204或205所述的方法, 其中所述胰岛素阳性内分泌细胞被囊封于微胶囊中。

207. 如权利要求204至206中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。

208. 如权利要求207所述的方法, 其中所述糖尿病选自由以下各糖尿病组成的组: I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。

209. 如权利要求204至206中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

210. 一种通过根据权利要求157至200中任一项所述的方法产生的分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体的用途, 其用于分化成SC- β 细胞。

211. 一种通过根据权利要求157至200中任一项所述的方法产生的分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体的用途, 其用于施用于需要其的受试者。

212. 如权利要求211所述的用途, 其中所述分离的胰岛素阳性内分泌细胞群体囊封于微胶囊中施用于所述受试者。

213. 如权利要求211或212所述的用途, 其中所述受试者患有糖尿病或具有增加的出现糖尿病的风险。

214. 如权利要求213所述的用途, 其中所述糖尿病选自由以下各糖尿病组成的组: I型糖尿病、II型糖尿病、1.5型糖尿病和前驱糖尿病。

215. 如权利要求211或212所述的用途, 其中所述受试者患有代谢病症或具有增加的出现代谢病症的风险。

216. 一种培养基的用途, 所述培养基包含a) TGF- β 信号传导通路抑制剂, b) TH通路活化剂, 和至少一种选自由以下组成的组的其它 β 细胞成熟因子: i) XXI, ii) β 细胞素, iii) 低浓度的RA信号传导通路活化剂, 和iv) SHH通路抑制剂, 其用于诱导NKX6-1阳性胰腺祖细胞体外分化成胰岛素阳性内分泌细胞。

217. 一种产生SC- β 细胞的方法, 所述方法包括: 使Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性

内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触：i)转化生长因子 β (TGF- β)信号传导通路抑制剂，ii)甲状腺激素信号传导通路活化剂，和任选地iii)蛋白激酶抑制剂，以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞，其中所述SC- β 细胞展现体外GSIS反应。

218.如权利要求217所述的方法，其中所述SC- β 细胞展现体内GSIS反应。

219.如权利要求217或218所述的方法，其中所述GSIS反应(i)在所述SC- β 细胞移植至受试者后立即；(ii)在移植至受试者大约24小时内；或(iii)在移植至受试者大约两周内观测到。

220.如权利要求217至219中任一项所述的方法，其中所述SC- β 细胞展现对以下各者的反应：(i)至少一次葡萄糖激发；(ii)至少两次连续葡萄糖激发；或(iii)至少三次连续葡萄糖激发。

221.如权利要求217至220中任一项所述的方法，其中所述SC- β 细胞的形态类似于内源性 β 细胞的形态。

222.如权利要求217至221中任一项所述的方法，其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与100nM-100 μ M的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。

223.如权利要求217至222中任一项所述的方法，其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与10 μ M的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。

224.如权利要求217至223中任一项所述的方法，其中所述TGF- β 信号传导通路包含TGF- β 受体I型激酶信号传导。

225.如权利要求217至224中任一项所述的方法，其中所述TGF- β 信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II。

226.如权利要求217至225中任一项所述的方法，其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。

227.如权利要求217至226中任一项所述的方法，其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与1 μ M的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。

228.如权利要求217至227中任一项所述的方法，其中所述甲状腺激素信号传导通路活化剂包含三碘甲状腺原氨酸(T3)。

229.如权利要求217至228中任一项所述的方法，其中所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞不与所述蛋白激酶抑制剂接触。

230.如权利要求217至229中任一项所述的方法，其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与所述蛋白激酶抑制剂接触。

231.如权利要求230所述的方法，其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与10nM-1 μ M之间的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。

232.如权利要求230或231所述的方法，其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与100nM的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。

233.如权利要求230至232中任一项所述的方法，其中所述蛋白激酶抑制剂包含十字孢碱。

234.如权利要求217至233中任一项所述的方法，其进一步包括使所述Pdx1阳性、NKX6-

1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与囊肿性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)抑制剂接触。

235. 如权利要求234所述的方法,其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与100nM与100 μ M之间的浓度的所述CFTR抑制剂接触。

236. 如权利要求234或235所述的方法,其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与10nM与10 μ M之间的浓度的所述CFTR抑制剂接触。

237. 如权利要求234至236中任一项所述的方法,其中所述CFTR抑制剂包含Gly-H101。

238. 如权利要求217至237中任一项所述的方法,其进一步包括使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与O-GlcNAc酶抑制剂接触。

239. 如权利要求238所述的方法,其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与100nM与100 μ M之间的浓度的所述O-GlcNAc酶抑制剂接触。

240. 如权利要求238或239所述的方法,其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞与10nM与10 μ M之间的浓度的所述O-GlcNAc酶抑制剂接触。

241. 如权利要求239至240所述的方法,其中所述O-GlcNAc酶抑制剂包含Thiamet G。

242. 如权利要求217至241中任一项所述的方法,其中所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在适合培养基中培养。

243. 如权利要求242所述的方法,其中所述适合培养基包含Connought Medical Research Laboratories 1066补充胰岛培养基(CMRLS)或CMRLS的组分。

244. 如权利要求243所述的方法,其中所述CMRLS补充有血清。

245. 如权利要求217或219中任一项所述的方法,其中所述CMRLS补充有10%胎牛血清。

246. 如权利要求72至74及243至245中任一项所述的方法,其进一步包含Sant1。

247. 如权利要求72至74及243至246中任一项所述的方法,其进一步包含XXI。

248. 如权利要求72至74及243至247中任一项所述的方法,其进一步包含SSP。

249. 如权利要求217至248中任一项所述的方法,其中所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。

250. 如权利要求217至249中任一项所述的方法,其中所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞维持于悬浮培养物中达足以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞的时间段。

251. 如权利要求250所述的方法,其中所述时间段包含至少7天。

252. 如权利要求250或251所述的方法,其中所述时间段包含7天与21天之间。

253. 如权利要求250至252中任一项所述的方法,其中所述时间段包含7天与14天之间。

254. 如权利要求250至253中任一项所述的方法,其中所述时间段包含14天。

255. 如权利要求250至254中任一项所述的方法,其中每隔一天补充所述悬浮培养物。

256. 如权利要求217至255中任一项所述的方法,其中至少30%的所产生的所述细胞包含SC- β 细胞。

257. 如权利要求217至256中任一项所述的方法,其中所述SC- β 细胞表达C-肽、胰岛素、NKX6-1、Pdx1,且共表达NKX6-1和C-肽。

258. 如权利要求217至257中任一项所述的方法,其中所述SC- β 细胞包含人类细胞。

259. 如权利要求217至258中任一项所述的方法,其中所述SC- β 细胞体外的产生为可量的。

260. 如权利要求217至259中任一项所述的方法, 其中所述胰岛素阳性内分泌细胞通过以下来获得: 使Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触: i) TGF- β 信号传导通路抑制剂, 和ii) 甲状腺激素信号传导通路活化剂, 以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞, 其中所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafb、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素。

261. 如权利要求260所述的方法, 其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与100nM-100 μ M的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。

262. 如权利要求260或261所述的方法, 其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与10 μ M的浓度的所述TGF- β 信号传导通路抑制剂接触。

263. 如权利要求260至262中任一项所述的方法, 其中所述TGF- β 信号传导通路包含TGF- β 受体I型激酶信号传导。

264. 如权利要求260至263中任一项所述的方法, 其中所述TGF- β 信号传导通路抑制剂包含Alk5抑制剂II。

265. 如权利要求260至264中任一项所述的方法, 其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。

266. 如权利要求260至265中任一项所述的方法, 其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与1 μ M的浓度的所述甲状腺激素信号传导通路活化剂接触。

267. 如权利要求260至266中任一项所述的方法, 其中所述甲状腺激素信号传导通路活化剂包含三碘甲状腺原氨酸(T3)。

268. 如权利要求260至267中任一项所述的方法, 其进一步包括使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与以下中的至少一者接触: i) SHH通路抑制剂, ii) RA信号传导通路活化剂, iii) γ -分泌酶抑制剂, iv) 至少一种来自所述表皮生长因子(EGF)家族的生长因子, 和任选地v) 蛋白激酶抑制剂。

269. 如权利要求268所述的方法, 其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M与0.5 μ M之间的浓度的所述SHH通路抑制剂接触。

270. 如权利要求268或269所述的方法, 其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.25 μ M的浓度的SHH通路抑制剂接触。

271. 如权利要求268至270中任一项所述的方法, 其中所述SHH通路抑制剂包含Sant1。

272. 如权利要求268至271中任一项所述的方法, 其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.01 μ M-1.0 μ M之间的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。

273. 如权利要求268至272中任一项所述的方法, 其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。

274. 如权利要求268至273中任一项所述的方法, 其中所述RA信号传导通路活化剂包含RA。

275. 如权利要求268至274中任一项所述的方法, 其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M-10 μ M之间的浓度的所述 γ -分泌酶抑制剂接触。

276. 如权利要求268至275中任一项所述的方法, 其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与1 μ M的浓度的所述 γ -分泌酶抑制剂接触。

277. 如权利要求268至276中任一项所述的方法,其中所述 γ -分泌酶抑制剂包含XXI。
278. 如权利要求268至277中任一项所述的方法,其中所述 γ -分泌酶抑制剂包含DAPT。
279. 如权利要求268至278中任一项所述的方法,其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与2ng/mL-200ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子接触。
280. 如权利要求268至279中任一项所述的方法,其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与20ng/mL的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子接触。
281. 如权利要求268至280中任一项所述的方法,其中所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含 β 细胞素。
282. 如权利要求268至281中任一项所述的方法,其中所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含EGF。
283. 如权利要求268至282中任一项所述的方法,其中所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞不与所述蛋白激酶抑制剂接触。
284. 如权利要求268至283中任一项所述的方法,其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与所述蛋白激酶抑制剂接触。
285. 如权利要求284所述的方法,其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与10nM-1 μ M之间的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。
286. 如权利要求284或285所述的方法,其中使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与100nM的浓度的所述蛋白激酶抑制剂接触。
287. 如权利要求284至286中任一项所述的方法,其中所述蛋白激酶抑制剂包含十字孢碱。
288. 如权利要求260至287中任一项所述的方法,其进一步包括将所述细胞群体暴露于葡萄糖。
289. 如权利要求288所述的方法,其中将所述细胞群体暴露于1mM-50mM之间的浓度的葡萄糖。
290. 如权利要求288或289所述的方法,其中将所述细胞群体暴露于25mM的浓度的葡萄糖。
291. 如权利要求260至290中任一项所述的方法,其中所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。
292. 如权利要求260至291中任一项所述的方法,其中所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞维持于悬浮培养物中达足以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞的时间段。
293. 根据权利要求292所述的方法,其中所述时间段为至少7天。
294. 根据权利要求292或293所述的方法,其中每隔一天补充所述悬浮培养物。
295. 如权利要求260至294中任一项所述的方法,其中至少15%的所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞。
296. 如权利要求260至295中任一项所述的方法,其中至少99%的所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞。
297. 如权利要求260至296中任一项所述的方法,其中所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞通过以下来获得:使Pdx1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i)

至少一种来自FGF家族的生长因子, ii)至少一种SHH通路抑制剂,和任选地iii)低浓度的RA信号传导通路活化剂,历时五天的时间,以诱导至少一些所述Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞,其中所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1。

298.如权利要求297所述的方法,其中使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与1ng/mL-100ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自FGF家族的生长因子接触。

299.如权利要求297或298所述的方法,其中使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与50ng/mL的浓度的所述至少一种来自FGF家族的生长因子接触。

300.如权利要求297至299中任一项所述的方法,其中所述至少一种来自FGF家族的生长因子包含角化细胞生长因子(KGF)。

301.如权利要求297至300中任一项所述的方法,其中所述至少一种来自FGF家族的生长因子选自由以下组成的组:FGF2、FGF8B、FGF10和FGF21。

302.如权利要求297至301中任一项所述的方法,其中使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M与0.5 μ M之间的浓度的所述至少一种SHH通路抑制剂接触。

303.如权利要求297至302中任一项所述的方法,其中使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.25 μ M的浓度的所述至少一种SHH通路抑制剂接触。

304.如权利要求297至303中任一项所述的方法,其中所述至少一种SHH通路抑制剂包含Sant1。

305.如权利要求297至304中任一项所述的方法,其中使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.01 μ M-1.0 μ M之间的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。

306.如权利要求297至305中任一项所述的方法,其中使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与0.1 μ M的浓度的所述RA信号传导通路活化剂接触。

307.如权利要求297至306中任一项所述的方法,其中所述RA信号传导通路活化剂包含RA。

308.如权利要求297至307中任一项所述的方法,其进一步包括使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与至少一种来自EGF家族的生长因子接触。

309.如权利要求308所述的方法,其中使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与2ng/mL-200ng/mL之间的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子接触。

310.如权利要求308或309所述的方法,其中使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞与20ng/mL的浓度的所述至少一种来自EGF家族的生长因子接触。

311.如权利要求308至310中任一项所述的方法,其中所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含 β 细胞素。

312.如权利要求308至311中任一项所述的方法,其中所述至少一种来自EGF家族的生长因子包含EGF。

313.如权利要求297至312中任一项所述的方法,其中所述Pdx1阳性胰腺祖细胞在适合培养基中培养。

314.如权利要求297至313中任一项所述的方法,其中所述促进细胞簇集的条件包含悬浮培养物。

315.根据权利要求314所述的方法,其中每隔一天补充所述悬浮培养物。

316. 如权利要求297至315中任一项所述的方法, 其中蛋白激酶C活化剂在所述5天期间未加入所述悬浮培养物中。

317. 如权利要求297至316中任一项所述的方法, 其中蛋白激酶C活化剂在所述5天前从所述悬浮培养物去除。

318. 如权利要求316或317所述的方法, 其中所述蛋白激酶C活化剂包含PdbU。

319. 如权利要求297至318中任一项所述的方法, 其中BMP信号传导通路抑制剂在所述5天期间未加入所述悬浮培养物中。

320. 如权利要求297至319中任一项所述的方法, 其中BMP信号传导通路抑制剂在所述5天前从所述悬浮培养物去除。

321. 如权利要求319或320所述的方法, 其中所述BMP信号传导通路抑制剂包含LDN193189。

322. 如权利要求297至320中任一项所述的方法, 其中所述群体中至少10%的所述Pdx1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞。

323. 如权利要求297至322中任一项所述的方法, 其中至少95%的所述Pdx1阳性胰腺祖细胞被诱导分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞。

324. 一种从多潜能细胞产生SC-β细胞的方法, 所述方法包括:

a) 使群体中的多潜能干细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞;

b) 通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞: 每隔一天使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触: i) 至少一种来自FGF家族的生长因子, ii) 至少一种SHH通路抑制剂, 和任选地iii) RA信号传导通路活化剂, 历时五天的时间, 以诱导所述群体中至少一些所述Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞, 其中所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1;

c) 通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞: 每隔一天使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触: i) TGF-β信号传导通路抑制剂, b) TH信号传导通路活化剂, 和任选地c) 至少一种SHH通路抑制剂, ii) RA信号传导通路活化剂, iii) γ-分泌酶抑制剂, 和vi) 至少一种来自表皮生长因子(EGF)家族的生长因子, 历时五天与七天之间的时间, 以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞, 其中所述Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素; 以及

d) 通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC-β细胞: 每隔一天使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触: i) 转化生长因子β(TGF-β)信号传导通路抑制剂, ii) 甲状腺激素信号传导通路活化剂, 和任选地iii) 蛋白激酶抑制剂, 历时七天与14天之间的时间, 以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞体外成熟成SC-β细胞, 其中所述SC-β细胞展现体外GSIS反应。

325. 一种从多潜能细胞产生SC-β细胞的方法, 所述方法包括:

a) 使群体中的至少一些多潜能细胞分化成Pdx1阳性胰腺祖细胞;

b) 通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰

腺祖细胞:每隔一天使所述Pdx1阳性胰腺祖细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i) KGF, ii) Sant1, 和任选地 iii) 低浓度的RA, 历时五天的时间, 以诱导所述群体中的至少一种Pdx1阳性胰腺祖细胞分化成NKX6-1阳性胰腺祖细胞, 其中所述NKX6-1阳性胰腺祖细胞表达Pdx1和NKX6-1;

c) 通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞:每隔一天使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞与以下接触:i) Alk5抑制剂II, ii) T3, 和任选地 iii) Sant1, iv) RA, v) XXI, 和vi) β 细胞素, 历时五天与七天之间的时间, 以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰腺祖细胞分化成Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞, 其中所述Pdx1阳性、NKX6-1、胰岛素阳性内分泌细胞表达Pdx1、NKX6-1、NKX2-2、Mafk、glis3、Sur1、Kir6.2、Znt8、SLC2A1、SLC2A3和/或胰岛素; 以及

d) 通过以下过程使至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞分化成SC- β 细胞:每隔一天使所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性、胰岛素阳性内分泌细胞在促进细胞簇集的条件下与以下接触:i) Alk5抑制剂II, ii) T3, 和任选地 iii) 十字孢碱, 历时七天与14天之间的时间, 以诱导至少一些所述Pdx1阳性、NKX6-1阳性胰岛素产生内分泌细胞体外成熟成SC- β 细胞, 其中所述SC- β 细胞展现体外GSIS反应。

326. 如权利要求324或325所述的方法, 其中所述SC- β 细胞展现体内GSIS反应。

327. 如权利要求324至326中任一项所述的方法, 其进一步包括在Rock抑制剂存在下培养干细胞, 其中所述培养提高所述细胞的存活率和/或分化效率。

328. 如权利要求324至327中任一项所述的方法, 其进一步包括在活化素A存在下培养干细胞, 其中所述培养提高所述细胞的存活率和/或分化效率。

329. 如权利要求324至328中任一项所述的方法, 其进一步包括在烟酰胺存在下培养干细胞, 其中所述培养提高所述细胞的存活率、分化效率, 和/或下调SOX2表达。

330. 如权利要求324至329中任一项所述的方法, 其进一步包括在十字孢碱存在下培养干细胞, 其中所述培养产生近乎纯的内分泌群体和/或增加NKX6-1/C-肽+细胞。

331. 如权利要求324至330中任一项所述的方法, 其进一步包括在XXI与Alk5i和T3组合存在下培养干细胞, 其中所述培养增加NKX6-1+内分泌细胞。

332. 如权利要求324至331中任一项所述的方法, 其进一步包括在 γ -分泌酶抑制剂与Alk5i和T3组合存在下培养干细胞, 其中所述培养增加NKX6-1+内分泌细胞。

333. 一种人工胰岛, 其包含从多潜能干细胞体外分化的SC- β 细胞, 其中所述SC- β 细胞展现体外GSIS反应。

334. 一种人工胰腺, 其包含从多潜能干细胞体外分化的SC- β 细胞, 其中所述SC- β 细胞展现体外GSIS反应。