

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12Q 1/00

G01N 33/53 C12N 5/02

A61K 48/00



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02823192.9

[43] 公开日 2005 年 3 月 2 日

[11] 公开号 CN 1589330A

[22] 申请日 2002.9.26 [21] 申请号 02823192.9

[30] 优先权

[32] 2001. 9.26 [33] US [31] 09/963,875

[32] 2002. 4.11 [33] US [31] 10/120,687

[32] 2002. 5. 2 [33] US [31] 10/136,891

[86] 国际申请 PCT/US2002/030700 2002.9.26

[87] 国际公布 WO2003/026584 英 2003.4.3

[85] 进入国家阶段日期 2004.5.21

[71] 申请人 通用医疗公司

地址 美国麻萨诸塞州

[72] 发明人 乔·F·哈本娜

亨德里克·祖里乌斯基

梅利莎·K·托马斯

伊利莎白·J·亚伯拉罕

马里奥·瓦立乔 考里·A·里奇

安娜·路易斯·璁兰 安缀丝·里娜

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 王学强

权利要求书 8 页 说明书 51 页 序列表 46 页  
附图 30 页

[54] 发明名称 胰岛干细胞及其在治疗糖尿病中的用途

[57] 摘要

治疗 I 型胰岛素依赖型糖尿病及其他疾病的方法及组合物，它使用新发现的能够分化为不同的胰岛细胞，包括产生胰岛素的  $\beta$  细胞以及肝细胞的干细胞。巢素和 ABCG2 被鉴别为胰腺干细胞的一个分子标记，而细胞角蛋白 19 作为胰导管细胞的一个明确标记。本发明同样也描述了巢素和/或 ABCG2 阳性干细胞可分离自胰岛且培养以获得干细胞或假胰岛类似结构的方法。同样也描述了胰腺干细胞的体外分化的方法。描述了分离、扩增及移植胰腺干细胞进入患者以同种异体移植、同种移植或者异种异体移植以取代丢失或损坏胰岛素分泌细胞或其它细胞的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种治疗糖尿病患者的方法，包括以下步骤：
  - (a) 从供体的胰岛中分离出巢素阳性胰腺干细胞;和
  - (b) 将该干细胞转移进患者中，其中所述的干细胞分化形成产生胰岛素的细胞。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的巢素阳性胰腺干细胞也是 ABCG2 阳性的。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的巢素阳性胰腺干细胞还对下述的至少一种标记呈现阳性：Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的巢素阳性胰腺干细胞不表达下述的至少一种标记：CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。
5. 一种治疗糖尿病患者的方法，包括以下步骤：
  - (a) 从供体的胰岛中分离出 ABCG2 阳性胰腺干细胞;和
  - (b) 将该干细胞转移进患者中，其中所述的干细胞分化形成产生胰岛素的细胞。
6. 如权利要求 1 或 5 所述的方法，其中所述的患者作为步骤 (a) 中所述的干细胞的供体。
7. 如权利要求 1 或 5 所述的方法，其中在转移步骤之前，在体外用一种下述试剂或其组合物处理干细胞：EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4 (肠促胰岛素类似物)、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素和 TGF- $\beta$ 。
8. 如权利要求 1 或 5 所述的方法，其中所述的转移步骤是通过内窥镜逆注射实现。
9. 如权利要求 1 或 5 所述的方法，还含有下述步骤：
  - (c) 免疫抑制剂治疗患者的步骤。
10. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述的免疫抑制剂从由 FK-506、环孢子菌素和 GAD65 抗体组成的组中选择。
11. 一种治疗糖尿病患者的方法，包括以下步骤：
  - (a) 从供体的胰岛中分离出巢素阳性胰腺干细胞;
  - (b) 体外扩增该干细胞以产生祖细胞; 和
  - (c) 将该祖细胞转移进患者中，其中祖细胞分化形成产生胰岛素的  $\beta$  细胞。
12. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述的巢素阳性胰腺干细胞也是 ABCG2

阳性的。

13. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述的巢素阳性胰腺干细胞还对下述的至少一种标记呈现阳性：Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

14. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述的巢素阳性胰腺干细胞不表达下述的至少一种标记：CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

15. 一种治疗糖尿病患者的方法，包括以下步骤：

- (a) 从供体的胰岛中分离出 ABCG2 阳性胰腺干细胞；
- (b) 体外扩增该干细胞以产生祖细胞；和
- (c) 将该祖细胞转移进患者中，其中祖细胞分化形成产生胰岛素的细胞。

16. 如权利要求 11 或 15 所述的方法，其中所述的患者作为步骤 (a) 中所述的干细胞的供体。

17. 如权利要求 11 或 15 所述的方法，其中所述的扩增是在存在下述的一种试剂或其组合物的条件下实现的：EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4 (肠促胰岛素类似物)、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素和 TGF- $\beta$ 。

18. 如权利要求 11 或 15 所述的方法，其中所述的转移步骤是通过内窥镜逆注射实现。

19. 如权利要求 11 或 15 所述的方法，还含有下述步骤：

- (d) 免疫抑制剂治疗患者的步骤。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中所述的免疫抑制剂从由 FK-506、环孢子菌素和 GAD65 抗体组成的组中选择。

21. 一种治疗糖尿病患者的方法，包括以下步骤：

- (a) 从供体的胰岛中分离出巢素阳性胰腺干细胞；
- (b) 体外扩增该干细胞以产生祖细胞；
- (c) 在培养基中分化该干细胞，形成假胰岛样的聚集体；和
- (d) 将该假胰岛样的聚集体转移进患者中。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其中所述的巢素阳性胰腺干细胞也是 ABCG2 阳性的。

23. 如权利要求 21 所述的方法，其中所述的巢素阳性胰腺干细胞还对下述的至少一种标记呈现阳性：Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合

素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

24. 如权利要求 21 所述的方法，其中所述的巢素阳性胰腺干细胞不表达下述的至少一种标记：CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

25. 一种治疗糖尿病患者的方法，包括以下步骤：

- (a) 从供体的胰岛中分离出 ABCG2 阳性胰腺干细胞；
- (b) 体外扩增该干细胞以产生祖细胞；
- (c) 在培养基中分化该干细胞，形成假胰岛样的聚集体；和
- (d) 将该假胰岛样的聚集体转移进患者中。

26. 如权利要求 21 或 25 所述的方法，其中所述的患者作为步骤 (a) 中所述的干细胞的供体。

27. 如权利要求 21 或 25 所述的方法，其中所述的扩增是在存在下述的一种试剂或其组合物的条件下实现的：EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4（肠促胰岛素类似物）、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素和 TGF- $\beta$ 。

28. 如权利要求 21 或 25 所述的方法，其中所述的转移步骤是通过内窥镜逆注射实现。

29. 如权利要求 21 或 25 所述的方法，还含有下述步骤：

- (e) 免疫抑制剂治疗患者的步骤。

30. 如权利要求 29 所述的方法，其中所述的免疫抑制剂从由 FK-506、环孢子菌素和 GAD65 抗体组成的组中选择。

31. 一种从胰岛分离干细胞的方法，包括以下步骤：

- (a) 从供体分离出胰岛；
- (b) 培养胰岛细胞；和
- (c) 在培养物中选择巢素阳性克隆。

32. 如权利要求 31 所述的方法，其中所述的巢素阳性克隆也是 ABCG2 阳性的。

33. 如权利要求 31 所述的方法，其中所述的巢素阳性克隆还对下述的至少一种标记呈现阳性：Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

34. 如权利要求 31 所述的方法，其中所述的巢素阳性克隆不表达下述的至少一种标记：CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

35. 一种从胰岛分离干细胞的方法，包括以下步骤：

(a) 从供体分离出胰岛;

(b) 培养胰岛细胞; 和

(c) 在培养物中选择 ABCG2 阳性克隆。

36. 如权利要求 31 或 35 所述的方法, 其中所述培养首先在以伴刀豆球蛋白 A 涂层的培养皿中进行, 然后在没有伴刀豆球蛋白 A 涂层的培养皿中进行。

37. 如权利要求 31 所述的方法, 还包括下述步骤:

(d) 扩增巢素阳性克隆是在以下述的一种试剂或其组合物处理的条件下实现的: EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4 (肠促胰岛素类似物)、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素和 TGF- $\beta$ 。

38. 如权利要求 35 所述的方法, 还包括下述步骤:

(d) 扩增 ABCG2 阳性克隆是在以下述的一种试剂或其组合物处理的条件下实现的: EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4 (肠促胰岛素类似物)、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素和 TGF- $\beta$ 。

39. 一种诱导巢素阳性胰腺干细胞分化成胰腺祖细胞的方法, 它包括下述步骤:

以下述的一种试剂或其组合物处理巢素阳性胰腺干细胞: EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、GLP-1、exendin-4 (肠促胰岛素类似物)、betacellulin、活化素和 TGF- $\beta$ , 该巢素阳性胰腺干细胞由此分化成胰腺祖细胞。

40. 如权利要求 39 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞也是 ABCG2 阳性的。

41. 如权利要求 39 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞还对下述的至少一种标记呈现阳性: Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

42. 如权利要求 39 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞不表达下述的至少一种标记: CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

43. 一种诱导 ABCG2 阳性胰腺干细胞分化成胰腺祖细胞的方法, 它包括下述步骤:

以下述的一种试剂或其组合物处理 ABCG2 阳性胰腺干细胞: EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、GLP-1、exendin-4 (肠促胰岛素类似物)、betacellulin、活化素和 TGF- $\beta$ , 该 ABCG2 阳性胰腺干细胞由此分化成胰腺祖细胞。

44. 如权利要求 39 或 43 所述的方法，其中所述的胰腺祖细胞又形成假胰岛样的聚集体。

45. 一种分离的巢素阳性人胰腺或肝的干细胞，它不是神经干细胞。

46. 如权利要求 45 所述的干细胞，其中所述的干细胞也是 ABCG2 阳性的。

47. 如权利要求 45 所述的干细胞，其中所述的干细胞还对下述的至少一种标记呈现阳性：Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

48. 如权利要求 45 所述的干细胞，其中所述的干细胞不表达下述的至少一种标记：CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

49. 一种分离的 ABCG2 阳性人胰腺或肝的干细胞，它不是神经干细胞。

50. 如权利要求 49 所述的干细胞，其中所述的干细胞还对下述的至少一种标记呈现阳性：Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

51. 如权利要求 49 所述的细胞，其中所述的干细胞不表达下述的至少一种标记：CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

52. 如权利要求 49 所述的干细胞，其中所述的干细胞不表达下述的至少一种标记：CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

53. 如权利要求 45 或 49 所述的干细胞，它分化形成产生胰岛素的  $\beta$  细胞。

54. 如权利要求 45 或 49 所述的干细胞，它分化形成产生高血糖素的  $\alpha$  细胞。

55. 如权利要求 45 或 49 所述的干细胞，它分化形成假胰岛样聚集体。

56. 如权利要求 45 或 49 所述的干细胞，它分化形成肝细胞。

57. 一种鉴别胰腺细胞为干细胞的方法，包括下述步骤：将胰腺细胞与一种标记的巢素特异抗体接触，如果该细胞被该抗体标记，那么该细胞就被鉴别为干细胞。

58. 如权利要求 57 所述的方法，还含有下述步骤：将胰腺细胞与一种标记的能够与下述的一种标记相结合的抗体接触，如果该细胞被该抗体标记，那么该细胞就被鉴别为干细胞：

ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

59. 如权利要求 30 所述的方法，还含有下述步骤：将该细胞与一种标记的细胞角蛋白-19 特异抗体接触，如果该细胞未被该抗体标记，那么该细胞就被鉴别为干细胞。

60. 如权利要求 57 所述的方法, 还含有下述步骤: 将该细胞与一种标记的胶原 IV 特异抗体接触, 如果该细胞未被该抗体标记, 那么该细胞就被鉴别为干细胞。

61. 如权利要求 57 所述的方法, 还含有下述步骤: 将该细胞与一种标记的能够与下述的一种标记相结合的抗体接触, 如果该细胞未被该抗体标记, 那么该细胞就被鉴别为干细胞:

CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

62. 一种诱导巢素阳性胰腺干细胞分化成肝细胞的方法, 它包括下述步骤:

以有效量的能够诱导干细胞分化成肝细胞或能够分化成肝细胞的祖细胞的试剂处理巢素阳性胰腺干细胞。

63. 如权利要求 62 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞也是 ABCG2 阳性的。

64. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞也对下述的至少一种标记呈现阳性: Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

65. 如权利要求 62 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞不表达下述的至少一种标记: CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

66. 一种诱导 ABCG2 阳性胰腺干细胞分化成肝细胞的方法, 它包括下述步骤:

以有效量的能够诱导干细胞分化成肝细胞或能够分化成肝细胞的祖细胞的试剂处理 ABCG2 阳性胰腺干细胞。

67. 如权利要求 62 或 66 所述的方法, 其中所述的试剂是环杷明。

68. 一种治疗肝病患者的方法, 包括以下步骤:

(a) 从供体的胰岛中分离出巢素阳性胰腺干细胞; 和

(b) 将该干细胞转移进患者中, 其中所述的干细胞分化形成肝细胞。

69. 如权利要求 68 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞也是 ABCG2 阳性的。

70. 如权利要求 68 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞也对下述的至少一种标记呈现阳性: Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

71. 如权利要求 68 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞不表达下述的至少一种标记: CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

72. 一种治疗肝病患者的方法, 包括以下步骤:

- (a) 从供体的胰岛中分离出 ABCG2 阳性胰腺干细胞;和
- (b) 将该干细胞转移进患者中, 其中所述的干细胞分化形成肝细胞。

69. 如权利要求 68 所述的方法, 其中所述的 ABCG2 阳性胰腺干细胞也是 ABCG2 阳性的。

73. 如权利要求 68 或 72 所述的方法, 其中所述的患者作为步骤 (a) 中所述干细胞的供体。

74. 一种治疗肝病患者的方法, 包括以下步骤:

- (a) 从供体的胰岛中分离出巢素阳性胰腺干细胞;
- (b) 体外扩增该干细胞以产生祖细胞; 和
- (c) 将该祖细胞转移进患者中, 其中祖细胞分化形成肝细胞。

75. 如权利要求 74 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞也是 ABCG2 阳性的。

76. 如权利要求 74 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞还对下述的至少一种标记呈现阳性: Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

77. 如权利要求 74 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞不表达下述的至少一种标记: CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

78. 一种治疗肝病患者的方法, 包括以下步骤:

- (a) 从供体的胰岛中分离出 ABCG2 阳性胰腺干细胞;
- (b) 体外扩增该干细胞以产生祖细胞; 和
- (c) 将该祖细胞转移进患者中, 其中祖细胞分化形成肝细胞。

79. 如权利要求 74 或 78 所述的方法, 其中所述的患者作为步骤 (a) 中所述干细胞的供体。

80. 一种治疗肝病患者的方法, 包括以下步骤:

- (a) 从供体的胰岛中分离出巢素阳性胰腺干细胞;
- (b) 使该干细胞体外分化成肝细胞; 和
- (c) 将该肝细胞转移进患者。

81. 如权利要求 80 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞也是 ABCG2 阳性的。

82. 如权利要求 80 所述的方法, 其中所述的巢素阳性胰腺干细胞还对下述的至少一种标记呈现阳性: Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合



素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2。

83. 如权利要求 80 所述的方法，其中所述的巢素阳性胰腺干细胞不表达下述的至少一种标记：CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。

84. 一种治疗肝病患者的方法，包括以下步骤：

- (a) 从供体的胰岛中分离出 ABCG2 阳性胰腺干细胞；
- (b) 使该干细胞体外分化成肝细胞；和
- (c) 将该肝细胞转移进患者。

85. 如权利要求 80 或 84 所述的方法，其中所述的患者作为步骤 (a) 中所述干细胞的供体。

86. 一种药物组合物，它含有权利要求 45 的干细胞，其与生理上可以相容的载体相混合。

87. 一种药物组合物，它含有权利要求 46 的干细胞，其与生理上可以相容的载体相混合。

88. 一种药物组合物，它含有权利要求 49 的干细胞，其与生理上可以相容的载体相混合。

89. 一种在哺乳动物器官移植之前预诱导免疫耐受状态的方法，它包括下述步骤：

- (a) 从供体的胰岛中分离出巢素阳性胰腺干细胞；
- (b) 将所述的巢素阳性胰腺干细胞移植到受体中；
- (c) 诱导供体干细胞在受体中的免疫耐受状态；和
- (d) 在不使用免疫抑制剂的条件下，从所述供体移植器官到所述受体中。

### 胰岛干细胞及其在治疗糖尿病中的用途

本发明要求下列优先权：2001 年 9 月 26 日提交的美国专利申请 09/963,875, 2002 年 4 月 11 日提交的美国专利申请 10/120,687, 2002 年 5 月 2 日提交的美国专利申请 10/136,891。

#### 技术领域

本发明涉及到干细胞及其分化领域，尤其是涉及到胰腺胰岛  $\beta$  细胞及巢素（nestin）阳性肝干细胞及其从干细胞及祖细胞的分化，以及胰腺干细胞，祖细胞，及已分化的  $\beta$  细胞或巢素（nestin）阳性肝干细胞或祖细胞在器官移植中的用途。

#### 10 背景技术

本发明是在得到至少部分美国政府基金的资助下完成的，其得到国立卫生研究所 DK30457、DK30834、DK55365、DK60125 的支持，因此，美国政府享有本发明的一定权利。

胰岛细胞的起源，包括其在胚胎发育还是在成熟哺乳动物细胞阶段，尽管已作了许多研究，但依然不确定。一些导管上皮细胞能够分化或者反分化以形成在成熟胰岛中的  $\beta$  细胞及其他类型的细胞(Bouwens, 1998)。来自分离胰岛的导管细胞可以在培养物中增殖且如果移植进入动物体内，可以分化成功能性  $\beta$  细胞(Cornelius et al., 1997)。

已经可以证明 exendin-4，一个长期作用的 GLP-1 拮抗剂，当给予鼠类时激发了来自导管祖细胞的(新生)的  $\beta$  细胞的分化及  $\beta$  细胞的增殖。在一个 2 型糖尿病鼠模型的部分胰切手术中胰切后 10 天每天给予 exendin-4 可以减缓糖尿病的发展。已经可以证明 exendin-4 刺激了胰腺的再生及新生的  $\beta$  细胞群体的扩增及  $\beta$  细胞的增殖(Xu et al., 1999, Diabetes, 48: 2270-2276)。

Ramiya 等，已经证明分离自成人前驱糖尿病非肥胖糖尿病(NOD)鼠的胰腺导管的多能性干细胞的体外产生的胰岛分化形成葡萄糖响应性胰岛其可以在不管是以囊装是否进入糖尿病 NOD 鼠类(Ramiya et al., 2000, Nature Med., 6: 278-282)移植后反转胰岛素依赖型糖尿病。

促胰岛激素，肠生高血糖素相似性多肽(GLP)-1 可以提高有助于胰腺发育的同源区转录因子 IDX-1 的胰腺表达及胰岛素基因的转录调控。与此同时，GLP-1 被给予糖尿病小鼠刺激胰岛素的分泌且可以有效地降低其血糖水平。GLP-1 同样可以提高  $\beta$  细胞的再生及胰岛的大小(Stoffers et al., 2000, Diabetes, 49: 741-748)。

Ferber 等, 已经证明了腺病毒介导的体外 PDX-1 (同样也为 IDX-1) 转移基因转移进入小鼠肝细胞结果使得肝细胞数量向  $\beta$  细胞显型反转。其表明使用 PDX-1 腺病毒载体静脉内输入小鼠后有超过 60% 的肝细胞合成 PDX-1。处理小鼠的血清及肝中免疫反应性胰岛素浓度大量增加。使用 PDX-1 处理的小鼠存活于链脲霉素诱导的糖尿病且可以调节血糖过高症(Ferber et al., 2000, Nature Med., 6: 568-572)。

获自分离胰岛的导管细胞培养物明显含有可以提高胰岛素分泌的细胞量, 其还不清楚是否这些细胞是真正的干细胞或仅仅是导管上皮细胞所经历的反分化状态。即使这些物质中含有真正的干细胞, 尚不清楚哪一部分代表干细胞及可以被描述的细胞类型。因此需要从胰腺组织中分离出特定的细胞类型, 使用分子标记证明哪一部分是干细胞的细胞类型且证明其是多能性的且可以长期增殖。

在大脑中已发现能够分化成为神经元及神经胶质组织的多能性干细胞。神经干细胞特定表达巢素(nestin), 一个中间丝状体蛋白(Lendahl et al., 1990; Dahlstrand et al., 1992)。在第 E11 天巢素表达于发育小鼠胚胎神经管中, 其在第 E16 天在大脑皮层达到表达量的最高水平, 然后在成人脑皮层降低, 局限于室管膜细胞群体(Lendahl et al., 1990)。发育中的神经系统及胰腺胰岛细胞显示出其与普通细胞特征相似的表型。

本发明涉及到胰腺胰岛干细胞/祖细胞(IPCs)群体其与神经元及肝干细胞相似且分化成胰岛  $\alpha$  - 细胞(高血糖素)及  $\beta$  细胞(胰岛素)。本发明同样涉及巢素阳性肝细胞。按照本发明的 IPCs 是免疫耐受性型还是免疫优势型通过其自身作为移植受体来证实。按照本发明的 IPCs 可以被用于同种异基因或经过异源基因载体移植。

本领域需要通过同种异基因或经过异源基因载体的方法移植干细胞。

本领域同样需要治疗 I 型糖尿病的方法其中胰岛, 巢素阳性胰腺干细胞或者巢素阳性肝干细胞通过同种异基因或异种基因的载体方法被转移进入受体细胞且并未发生移植排斥反应。

本领域同样需要移植进入一个哺乳动物细胞的方法其中胰岛, 巢素阳性胰腺干细胞或者巢素阳性肝干细胞通过同种异基因或异种基因的载体方法被转移进入受体细胞且并未发生移植排斥反应。

## 发明内容

本发明的目的是提供一个哺乳动物胰腺或肝干细胞用于治疗糖尿病及其他病症。提供鉴别, 定位及分离胰腺干细胞的方法也是本发明的目的, 同样为本发明目的的还有提供一个分化胰腺干细胞以获得可产生胰岛素及其他激素的细胞的方法。本发明的

另外一个目的是提供可使用哺乳动物胰腺或肝干细胞移植进入哺乳动物的方法。这些及其他的本发明的目的可通过下述一个或多个具体的实施例来体现。

该发明的实施例之一提供一种治疗糖尿病病人的方法。一种巢素阳性胰腺干细胞从供体的胰岛中被分离出来。在另一个实施例中，一种至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性，和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或其全部不表达的胰腺干细胞，被从供体的胰岛中分离出来。在另一个实施例中，一种对 SST-R2、SST-R3 和/或 SST-R4 阳性的胰腺干细胞被从供体的胰岛中分离出来。干细胞被移植到病人身上，并在病人体内分化成能分泌胰岛素的细胞。

另一个实施例提供另一种治疗糖尿病病人的方法。一种巢素阳性胰岛干细胞从供体的胰岛中被分离出来，并在体外增殖，以生成一种始祖细胞 (progenitor cell)。在另一个实施例中，一种至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性，和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或其全部不表达的胰腺干细胞，被从供体的胰岛中分离出来，并在体外增殖，以生成一种始祖细胞。始祖细胞被移植入病人体内，在那里分化成能分泌胰岛素的细胞。另一个实施例仍还提供另一种治疗糖尿病病人的方法。一种巢素阳性胰腺干细胞从供体的胰岛中被分离出来，并在体外增殖，以生成一种始祖细胞。在另一个实施例中，一种至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性，和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或其全部不表达的胰腺干细胞，被从供体的胰岛中分离出来，并生长成一种始祖细胞。始祖细胞在培养基中分化，形成假胰岛样的、被移植入病人体内的聚集体。

另一个实施例提供另一种治疗糖尿病病人的方法。一种巢素阳性胰岛干细胞被从供体的胰岛中分离出来，并在体外培养，以生成一种始祖细胞。在另一个实施例中，一种至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性，和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或其全部不表达的胰腺干细胞，被从供体的胰岛中分离出来，并在体外培养，以生成一种始祖细胞。始祖细胞被移植到病人身上，并在病人体内分化成能分泌胰岛素的  $\beta$  细胞。

在这些实施例中，病人也可作为胰岛组织的供体，提供一种细胞的或分化组织的同基因移植体（isograft）。

在另一个优选的实施例中，干细胞在移植步骤前，在体外用一种从以下及其组合物组成的组中选择的试剂处理：EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4  
5 （肠促胰岛素类似物）、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素和 TGF- $\beta$ 。

在另一个优选的实施例中，移植通过内窥镜逆注射实现，或通过注射入胰动脉中。

在另一个优选的实施例中，治疗糖尿病病人的方法还附加包括免疫抑制剂治疗步骤。

10 在另一个优选的实施例中，免疫抑制剂从由 FK-506、环孢子菌素和 GAD65 抗体组成的组中选择。

另一个实施例提供一种从胰岛分离干细胞的方法。一个胰岛从供体身上被取下，从之培养细胞。从培养物中选择一种巢素阳性干细胞克隆。在另一个实施例中，一种至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin（2 型）、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha$  6、整合素亚单元  $\beta$  1、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性，和/或不表达  
15 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或其全部不表达的胰腺干细胞的克隆，从培养物中选择出来。作为一项可选择性的步骤，可通过在以伴刀豆球蛋白 A（concanavalin A）涂层的培养皿中培养，首先洗净该胰岛的非胰岛细胞。伴刀豆球蛋白 A 能与非胰岛细胞结合。

20 在一个优选的实施例中，分离干细胞的方法更进一步包括通过应用一种试剂处理扩增克隆的附加步骤，这种试剂是从由 EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4（肠促胰岛素类似物）、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素、TGF- $\beta$  及其组合物组成的组中选择的。

另一个实施例提供一种诱导巢素阳性胰腺干细胞分化成胰始祖细胞的方法。另一个实施例提供诱导一种胰腺干细胞分化的方法，这种胰腺干细胞至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin（2 型）、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha$  6、整合素亚单元  $\beta$  1、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性，和/或对 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一不表达或其全部不表达。正如这儿所使用到的，“分化”指那种过程，细胞赖其经历变化，变成某一特别的细胞类型，例如变成一种专门的细胞类型。该干细胞用一种由 EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4  
25 （肠促胰岛素类似物）、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素、  
30 （肠促胰岛素类似物）、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素、

TGF- $\beta$  及其组合物组成的组中选择的试剂处理。该干细胞随后分化成一种胰始祖细胞。

在一个优选实施例中，胰始祖细胞随后形成假胰岛样的聚集体。

然而，另一个实施例提供一种分离的巢素阳性人体胰或肝的干细胞。另一个实施例也还提供一种至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性，和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或其全部不表达的分离胰腺干细胞。在这个实施例的各种形式中，该干细胞或者分化成  $\beta$  细胞、或者  $\alpha$  细胞、或者假胰岛样聚集体或肝细胞。在这个实施例的各种形式中，该干细胞受免疫豁免待遇。在这个实施例的多种形式中，该干细胞不表达 MHC II 型抗原。在这个实施例的多种形式中，该干细胞不表达 MHC I 型或 II 型抗原。

另一个实施例还提供一种鉴别一种胰腺细胞为干细胞的方法。一种细胞与一种标记巢素特异抗体接触，如果该细胞因为抗体而变成标记，那么该细胞就被鉴别为是一种干细胞。在另一个实施例中，胰腺干细胞通过与一种对任何 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SST-R2、SST-R3、SST-R4、SUR-1 或 Kir6.2 特异的抗体接触，就可鉴别为干细胞——以一种细胞因为一种抗体而变为标记就被鉴别为干细胞的方式。可选择的附加步骤包括，将该细胞与细胞角蛋白 19 (cytokeratin 19) 抗体和胶原 IV 抗体接触；如果该细胞不因变细胞角蛋白 19 或胶原 IV 抗体变为标记，那么该细胞就被鉴别为一种干细胞。

在另一个实施例中，通过将胰腺干细胞与一种对任何 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型特异的抗体接触而将其鉴别。在此情种情况，如果细胞不因以上任何抗体而变为标记就可将其鉴别为干细胞。

另一个实施例提供一种诱导巢素阳性胰腺干细胞分化成肝细胞的方法。巢素阳性胰腺干细胞用一种有效剂量的、能诱导干细胞分化成肝细胞或肝细胞始祖细胞的试剂处理。在一个优选的实施例中，该试剂为环杷明 (cyclopamine)。另一个实施例通过应用一种有效剂量的、能诱导干细胞分化成肝细胞或能分化成肝细胞的始祖细胞的试剂处理，提供诱导一种胰腺干细胞分化成肝细胞的方法，这种胰腺干细胞至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性，和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或其全部不表达。

然而，另一个实施例提供一种治疗肝病病人的方法。一种巢素阳性胰腺干细胞从供体的胰岛中分离出来，并移植入病人的体内，在病人体内该干细胞分化成肝细胞。在另一个实施例中，一种至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha$  6、整合素亚单元  $\beta$  1、C-kit、MDR-1、SUR-1、

5 Kir6.2 之一显阳性，和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或其全部不表达的胰腺干细胞，被从供体的胰岛中分离出来，并移植入病人的体内，在病人体内干细胞分化成肝细胞。

在一相关实施例中，干细胞在体外生长成始祖细胞，而后始祖细胞被移植入病人体内并在病人体内进一步分化成肝细胞。

10 在另一相关实施例中，干细胞在体外分化成始祖细胞，而后将始祖细胞移植入病人体内并进一步分化成肝细胞。在另一相关实施例中，干细胞在体外分化成随后植入病人体内的肝细胞。

在这些实施例中，该病人也可作为胰岛组织的供体，提供细胞或分化组织的同基因移植物。

15 然而，另一个实施例提供一种分离的、巢素阳性人体肝干细胞。在这个实施例的各种形式中，干细胞是免疫特异的。在这个实施例的多种形式中，干细胞不表达 MHC I 型抗原。在这个实施例的多种形式中，该干细胞不表达 MHC II 型抗原。在这个实施例的多种形式中，该干细胞不表达 MHC I 型或 MHC II 型抗原。

然而，另一个实施例提供一种分离的、非神经系统的巢素阳性人体干细胞，可被

20 移植入动物而不引起宿主对移植物的排斥。在这个实施例的多种形式中，该干细胞不是主要组织相容性复合体 I 型或有限 I 型。然而，另一实施例提供一种分离的，至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha$  6、整合素亚单元  $\beta$  1、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性，和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或其全部不表达的非神经系统人体干细胞，

25 能被移植入动物而不引起宿主对移植物的排斥。

这儿所使用的“干细胞”意指未分化细胞其可以在体内外无限制性地繁殖并能够分化成为其他细胞类型。其可以是某种分化细胞，定向型细胞，不成熟细胞，祖细胞或成熟细胞类型，例如红血球及淋巴细胞其来源于相同的祖细胞，甚至是组织发育各阶段的细胞类型其完全不同于干细胞时的组织。例如，血液干细胞可以变为脑细胞

30 或肝细胞，神经细胞可以变为肝细胞，如此干细胞是多功能性的，假如从周围环境中获得一定的信号，其可以分化成为机体的任何组织。

在一个实施例中，本发明所述的“干细胞”是免疫盲或免疫豁免的。正如这儿所使用的“免疫盲或免疫豁免”指的是细胞并不诱发免疫反应。正如这儿所使用的，“免疫反应”指的是由免疫系统针对外源物质所发生的反应。正如这儿所使用的，包括但不限于移植排斥，抗体产生，感染及抗原特异性淋巴细胞针对抗原的反应。按照本领域的已知技术如果移植物志被成功移植或排斥都可以检测到免疫反应，正如在移植排斥反应分析的部分进行定义那样。在一个实施例中，按照本发明一个“免疫盲的干细胞”或者一个“免疫豁免的干细胞”可以被同种异体移植或者异种移植而不发生移植排斥反应在移植受体或宿主中可以被识别为自身。

如果宿主对移植物质不是免疫耐受性的或者并未使用免疫抑制试剂以防排斥，移植物质可能要遭受到移植受体或者宿主的排斥。

正如这儿所使用的，按照本发明，一个宿主如果是免疫耐受性的，正如这儿所定义的那样，其不会马上发生免疫反应。在一个实施例中，免疫耐受性宿主并不排斥或破坏移植物质。在一个实施例中，免疫耐受性宿主对抗原并不发生通过产生抗体结合在抗原上的反应。

正如这儿所使用的，“排斥”指的是由宿主免疫系统排斥抑制物质。在一个实施例中，“排斥意指针对宿主免疫反应的结果移植物有超过 90%的细胞或组织坏死现象发生”。在另一个实施例中，“排斥”意指生存能力的降低而且移植物针对宿主免疫反应的结果其生存能力与移植前相比降低 90%甚至更多。生存能力的降低可由本领域的普通技术来确定其包括但不限于 trypan 蓝色排斥染色。在另一个实施例中，“排斥”意指移植物不能增殖。增殖可以通过本领域的已知技术其包括但不限于苏木精 / 曙红染色来测量。移植排斥的发生和 / 或移植后排斥发生的速度将依赖于各种因素，其包括但不限于移植物质(也就是说，细胞类型，细胞数量)或宿主(也就是说，不管宿主是否免疫耐受性的和 / 或已经使用免疫抑制剂处理过)。正如这儿所使用的，“移植物对宿主的排斥”或“移植物对宿主的反应”指的是移植物与宿主抗原发生的 T 细胞介导的反应。

正如这儿所使用到的，“宿主对移植排斥”或“宿主对移植物反应”指的是宿主免疫系统抵抗外来移植物的细胞介导的免疫反应。

在另一个实施例中，特异性抗体的产生发生免疫反应(例如特异性连接在移植物抗原上的抗体或特异性连接在外源物质或外源物质产品上的抗体)通过本领域已知的免疫方法检测，包括但不限于 ELISA，免疫染色，免疫沉降反应及蛋白质印迹分析。



干细胞在细胞表面表达形态发生或生长因子受体,且可以感觉到,例如,受伤相关因子然后定位于组织受伤位点,或感受到其周围的微环境及分化成为合适的细胞类型。

5 "基本无限制性增殖"可以被确定,例如,通过分离干细胞在细胞培养系统中通过至少 50,最好是 100,甚至 200 或者更多的细胞分化进行增殖的能力。干细胞可以是"全能的"意指其可以成为所有的有机体细胞例如细菌细胞。干细胞也可以是"多能性的"意指其可以成为不同类型的细胞但并不是所有的有机体细胞,当一个干细胞分化时,其一般成为一个更加成熟的细胞类型,其可以成为部分分化的细胞例如祖细胞,一个分化的细胞或者一个终止分化的细胞。干细胞可以是高度活动性的。

10 "巢素"指的是中间纤维蛋白,其序列已在 Genbank 上登记,号为 X65964 (图 7)。

"ABCG2"指 ATP 结合盒多药抵抗(或耐药)转运体 G2,它带有 XM-032424 号基因库编号揭示的序列(图 18)。编码 ABCG2 的 DNA 序列可能有变化,但编码氨基酸序列保持不变,此种情况该技术将能辨认有同类物的存在。

15 "Oct3/4"指一种 POU/同源结构域(Homeodomain)转录因子,带有基因库编号 NM013633 号显示的序列。

"GLP-1R"指由图 21 显示的核酸序列(基因库编号 U01156 号)编码的高血糖素样肽-1 受体,并带有图 17 显示的氨基酸序列(基因库编号 U01156 号)。编码 GLP-1R 的 DNA 序列可能有变化,但编码氨基酸序列保持不变,此种情况该技术将能辨认有同类物的存在。

20 "Latrophilin (2 型)"指一种 G 蛋白偶联受体,其带有基因库编号 AJ131481 号显示的序列。

"Hes-1"指一种 bHLH 转录因子,其带有基因库编号 NM-005524 号显示的序列。

25 整合素是整合(组合)的细胞表面蛋白质,由一条  $\alpha$  链和一条  $\beta$  链组成。一条指定的链可以跟多种配对结合组成不同的整合素。例如, $\alpha 6$  可以跟  $\beta 4$  结合形成被称为 TSP180 的整合素,与  $\beta 1$  形成 VLA-6 整合素。

整合素亚单元" $\alpha 6$ "指带有基因库编号 NM-000210 号显示序列的人体  $\alpha 6$  cDNA。

整合素亚单元" $\beta 1$ "指带有基因库编号 X07979 号显示序列的人体  $\beta 1$  cDNA。

"c-Kit"指一种细胞表面受体酪氨酸激酶,带有基因库编号 X06182 号显示的一个序列。

30 "MDR-1"指那种带有基因库编号 NM-000927 号显示的一个序列的多药抵抗转运体 1。

“SST-R2”、“SST-R3”和“SST-R4”指带有基因库编号 XM-085745 号 (SST-R2)、NM-001051 号 (SST-R3) 或 XM-009594 号 (SST-R4) 显示序列的生长激素抑制素受体。

5 “SUR-1”指一种带有基因库编号 XM-042740 号显示的一个序列的人磺酰脲类受体。

“Kir 6.2”指一种人体内向整流钾通道，带有基因库编号 AF021139 号显示的一个序列。

“CD34”指一种跨膜糖蛋白，带有基因库编号 NM-001773 号显示的一个序列。

“CD45”指那种带有基因库编号 Y00638 号显示的一个序列的白细胞共同抗原。

10 “CD133”指一种五膜造血干细胞抗原，带有基因库编号 NM-006017 号显示的一个序列。

一个“胰腺干细胞”意指一个已从胰组织分离出来的干细胞和/或一个具备所有以下特点的细胞：巢素阳性染色、巢素基因表达、细胞角蛋白-19 阴性染色、长期在培养基中增殖并具备在培养基中能分化成假岛（胰岛）的能力。

15 一个“胰腺干细胞”也指一种至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性，和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或其全部不表达的干细胞。

20 在一个实施例中，一个“胰腺干细胞”还指一种对 SST-R2、SST-R3 和/或 SST-R4 显阳性的干细胞。

一个“肝”干细胞指的是分离自肝组织的干细胞和或巢素阳性染色特征的细胞，巢素基因表达，及其在培养物中的长期增殖。

一个“祖细胞”指的是一个通过分化获自干细胞的细胞其能够进一步分化成为更加成熟的细胞类型。

25 正如这儿所使用的，词组“产生胰岛素的  $\beta$  细胞”指的是能够产生分泌与人类胰脏胰岛细胞  $\beta$  细胞分泌的相同数量的胰岛素的所有细胞。优选的，产生胰岛素的  $\beta$  细胞胰岛素的分泌同样以人类  $\beta$  细胞原位胰岛素的分泌调控相似的方式进行调控；例如，胰岛素的分泌同样可为在产生胰岛素的  $\beta$  细胞周围葡萄糖浓度的提高而刺激。

30 “假胰岛相似性”聚集体是一个胰岛素分泌细胞的人工聚集体其在形态与功能上与胰岛细胞相似。假胰岛相似性聚集体在细胞培养条件下体外产生。其直径大约为 50-150  $\mu\text{m}$  (与胰岛平均直径 100 $\mu\text{m}$  相比较) 且形状为球形。

"分离"一个干细胞指的是从组织样品中移出干细胞且与另外的非组织干细胞分开。一个分离的干细胞可以从其他类型的细胞中自由分出且具有增殖能力而分化成为组织中的成熟细胞。然而,当处理干细胞的收集时,例如干细胞的培养,已经得知其有部分可能性获得 100%纯度的干细胞。因此,一个分离的干细胞可以存在于其他类型的细胞仅有一部分时且并不与干细胞的分析或生产其它分化种类的细胞类型使用相冲突时,分离的干细胞一般至少为 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 或 99% 纯度。最好是,按照本发明分离干细胞至少有 98%或 99%的纯度。

一个干细胞是"扩增的"当其在培养物中增值时且通过细胞分化变为其他类型的干细胞和 / 或祖细胞。干细胞的扩增可以在干细胞的增殖的同时进行其也可能需要某种特定的生长环境,例如最小的细胞浓度,容器表面的细胞汇集度或者加入化学因子例如生长因子,分化因子或信号因子。

一个干细胞,祖细胞或分化细胞被移植或者引入一个哺乳动物细胞,当其从一个培养器中转移至一个患者时。这儿所使用到的移植可以包括按照本发明所述的干细胞分离步骤及将干细胞转移进入哺乳动物或患者体内。移植可能涉及到通过注射细胞悬液进入哺乳动物或者患者,外科手术将细胞移植进入哺乳动物或患者体内的组织或器官,使用细胞悬浮灌注组织或器官等将干细胞转移进入哺乳动物或患者体内。转移干细胞或移植的路径将通过细胞在特定组织或器官中的定位的需要及细胞为靶定组织或器官所发现或获得的能力来确定。在一个案例中移植细胞定位于特定的位点,其可以被外科转移进入组织或器官或者简单地注射进入血流如果该细胞在靶定细胞中有移植的能力。

正如这儿所使用的,移植可以包括按照本发明分离干细胞,培养和转移干细胞进入哺乳动物或者患者体内去的步骤。正如这儿所使用的,移植可以包括按照本发明分离干细胞,分化干细胞,转移干细胞进入哺乳动物或者患者体内去的步骤。正如这儿所使用的,移植可以包括按照本发明分离干细胞,分化和扩增干细胞,转移干细胞进入哺乳动物或者患者体内去的步骤。

通过给予患者人以试剂其可以预防延缓如移植细胞组织器官的排斥等免疫反应的发生或已发生免疫反应强度的降低的免疫抑制剂。

正如这儿所使用到的,"免疫抑制反应"指的是防止免疫反应(例如如这儿所定义的给予免疫抑制剂)以至于免疫反应并不能检测到。正如这儿所使用到的,免疫反应的预防指的是免疫反应检测不到。一个免疫反应(例如移植排斥或抗体产生)按照本

领域已知技术检测到。

按照本发明"免疫抑制"同样意指与任一并未受到免疫抑制试剂的移植受体或者不是"免疫盲的"或"免疫豁免"的如这儿所定义的那样的移植物质移植的受体相比较免疫反应发生的延缓。免疫反应的延缓发生可以是短期延缓,例如1小时至10天  
5 例如1小时,2,5或10天。免疫反应发生的延缓也可以是长期延缓例如10天至10年(例如30天,60天,90天,180天,1,2,5,10年)。

按照本发明"免疫抑制反应"同样意指免疫反应强度的减少,按照本发明免疫反应强度可以减少例如5—100%,最好是25—100%及最好是75—100%任一并未受到免疫抑制试剂的移植受体或者不是"免疫盲的"或"免疫豁免"的如这儿所定义的那样的  
10 的移植物质移植的受体的免疫反应强度。免疫反应强度的减少通过确定移植物质被排斥的时间点来测量。例如一个含有移植物质在移植后1天被排斥的免疫反应比较在移植后30天被排斥的免疫反应强度要大。免疫反应的强度同样可以通过定量可特异性结合至移植物质上的抗体的数量来测量其中所产生抗体的水平与免疫强度正相关。此外,免疫反应强度可以通过确定检测到的特异性抗体可特异性结合至移植物质上的  
15 时间点来确定。

不同的方法和试剂可被用于免疫抑制。例如淋巴细胞的增殖和活化一般可通过使用这样的试剂例如FK-506,环孢霉素或其他免疫抑制剂进行抑制。另外的可能的方法是给予抗体例如抗GAD65单抗或其他化合物其可以掩盖移植细胞表面上的抗原并因此使得部分细胞为宿主免疫系统所看不到。

20 一个"免疫抑制试剂"是这样的一个试剂其可以预防延缓宿主中外源细胞尤其是移植细胞的免疫反应强度。最好是这样的免疫抑制试剂其可以抑制细胞介导为其免疫系统鉴别为非自身的免疫反应,免疫抑制试剂例如包括但不限于环孢霉素,环磷酰胺,强的松,地塞米松,甲氨喋呤,咪唑硫嘌呤,mycophenolate,镇静剂,FK506,系统类固醇,及其他的大范围内的抗体,受体拮抗剂,及其他本领域已知的试剂。

25 一个"促有丝分裂剂"可以是任一试剂其可以刺激细胞的有丝分裂及增殖。

一个"分化因子"指的是可以导致干细胞或祖细胞分化为另外细胞类型的试剂。分化一般通过改变干细胞或祖细胞一个或多个基因的表达来实现其结果在于细胞改变了结构及功能。

正如这儿所使用到的一个"信号因子"为一个细胞所分泌的试剂其可以作用于相同或不同的细胞。例如一个信号因子其可以抑制或诱导生长,增殖或其本身的分化,  
30 机体中的相邻细胞或距离较远的细胞。信号因子可以例如在组织中传递位置信息,调

控结构形成,或影响各种解剖学构造的大小,形状及功能。

正如这儿所使用到的,哺乳动物指的是任一哺乳动物包括但不限于人类,鼠,羊,猴,山羊,兔子,硕鼠,马,牛或猪。

一个"非人哺乳动物",正如这儿所使用到的,意指非人的任一哺乳动物。

5 正如这儿所使用到的,"同种异源基因"指的是同种遗传性不同的成员。

正如这儿所使用到的,"同基因"指的是同样的遗传构造。

正如这儿所使用到的,"异基因"指的是不同种的成员。

正如这儿所使用到的,"培养"指的是增殖或营养一个细胞,细胞聚集体,组织或器官的收集通过在一定环境下培养一段时间并在此条件下支持细胞的增殖或存活。

10 培养包括一个或多个扩增或增殖细胞,按照本发明收集细胞组织或器官的步骤。

正如这儿所使用到的,"前诱导或诱导一种免疫耐受状态"指应用来自移植供体的干细胞对移植可能接受者(受体)进行治疗,以便从供体移植器官、组织或细胞时,接受者的免疫系统能认同供体的组织,因此不启动"宿主对移植物"的反应。在一个优选的实施例中,该干细胞为巢素阳性干细胞。

15 正如这儿所使用到的,"耐受"指免疫系统的一种状态,在该状态下,某些外来抗原被免疫系统细胞作为自我认同。

正如这儿所使用到的,"接受者"指从供体接受器官、组织或细胞的哺乳动物。

正如这儿所使用到的,"供体"指从其身上取下器官、组织或细胞向接受者移植的哺乳动物。

20 本发明还提供了—个药物组合物其包括本发明的分离干细胞以及药理学上合适的载体。

#### 附图说明

图 1A 及 1B 显示了鼠胰岛在胚胎 16 天双重荧光免疫细胞化学染色(图 1 A)及在出生后 60 天(图 1 B)。巢素的抗体免疫染色以白色显示(一开始是红色,使用 Cy3 作为荧光团)且抗胰岛素抗体是以灰色显示(一开始是绿色,使用 Cy2 作为荧光团)。

25 图 2 显示了使用获自 50 个鼠胰岛 mRNA 进行的 RT-PCR 结果,前后引物都被标明。834 bp 的单链被测序且被标明为巢素序列。

图 3 显示了巢素阳性细胞其已从培养的鼠胰岛中增殖。

图 4 显示了鼠胰岛类似物在培养物中的发育。

30 图 5 显示了培养物中产生的胰岛类似结构的 RT-PCR 的分析结果。NCAM 及 cytokeratin-19 (CK19)的表达都被检测到。

图 6 显示了高葡萄糖刺激巢素 mRNA 的表达。APRT 作为对照进行鉴定。

图 7 是巢素的氨基酸及核苷酸序列。

图 8 描述了在胰岛中独特的细胞群体的神经干细胞特异性标记巢素的表达如免疫细胞化学或 RT-PCR 所确定的那样。

5 图 9 描述的是通过免疫细胞化学或 RT-PCR 从胰腺中分离的干细胞巢素。

图 10 描述的是获自巢素阳性胰岛祖细胞(NIPs)的人类胰岛类似性聚集体中的同族区域蛋白 IDX-1 及 proglucagon 的表达。

图 11 证明了巢素阳性细胞在鼠胰腺管区域定位。

图 12 描述其为胰岛内分泌细胞祖先的胰管细胞的起源的替代模型。

10 图 13A 及 B 描述了巢素阳性肝干细胞的免疫荧光染色。

图 14 描述了在鼠内分泌胰腺发育期间转录因子的序列。

图 15 描述了在含有干细胞的人类 NIP 培养物中神经内分泌, 外分泌胰腺及肝标记。

15 图 16 描述由逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和胰岛素分泌确定的高血糖素原和胰岛素 mRNA 的表达。

图 17 描述 NIP 标记物。

图 18 描述人 ABCG2 的核酸 (a) 和氨基酸 (b) 序列。

图 19a 描述由逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 DNA 印迹杂交的 ATP 结合盒转运体 ABCG2 的表达。

20 图 19b 显示, 由 Hoechst 33342 染色证明, 巢素阳性胰岛衍生的祖细胞 (NIPs) 包括较多数量的 SP 细胞。

图 19c 证明从 SP 细胞染料外流在异搏定存在情况下被抑制。在 B 中, SP 门细胞占总被分析细胞数量的 2.1%, 而在 C 中为 0.1%。

图 20 显示由 FACS 分离的 SP 细胞共同表达高水平的 ABCG2、MDR1 和巢素。

25 图 20A 描述 SP 细胞和非 SP 对照细胞在 Hoechst 33342 染色后被 FACS 分离 (分别为 R1 和 R2)。图 20B 显示该些细胞由逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)对表达 ABCG2、MDR1、巢素和 GAPDH RNA 进行分析。对 ABCG2 和 MDR1 的 PCR 反应产物的身份被由 DNA 印迹杂交证实。

图 21 显示人 GLP-1R 的核酸 (21A) 和氨基酸 (21B) 序列。

30 图 22 显示 GLP-1R 在胰岛衍生的干细胞/祖细胞上表达。A 块显示 GLP-1R(Cy-3) 的免疫细胞化学鉴定 (immunocytochemical detection), 以及被 DAPI 染色的细胞核。

B 块显示对 RNA 的 RT-PCR, RNA 从 NIPS 制备, 且带有对 GLP-1R 特异的引物。

图 23 显示 GLP-1 (7-36) 酰胺和甲苯磺丁脲在巢素阳性 NIPs 中刺激 Ca 离子内流。

图 24 显示证明 GLP-1 诱导分化的 NIPs 免疫组织化学染色。A 块显示免疫组织化学鉴别巢素和胰岛素。B 块显示细胞用 GLP-1 激发后, 巢素和胰岛素的免疫组织化学染色。

图 25 显示从受 GLP-1 激发的 NIP 培养物中的胰岛素分泌水平。

图 26 显示在受人 Idx-1 转染的 NIP 培养物中胰岛素表达的免疫组织化学分析。

### 具体实施方式

10 当前的发明人已从哺乳动物胰腺的郎格罕氏岛鉴别并分离出了一种特别的亚组  
导管细胞, 这种细胞具有干细胞的功能性和分子性特点。此外特别是, 这种新发现的  
胰腺干细胞还被以下一种或多种(更好的是所有)方法所鉴别: 巢素阳性染色、巢素  
基因表达、GLP-1R 阳性染色、GLP-1R 基因表达、ABCG2 阳性染色、ABCG2 基因  
表达、Oct3/4 阳性染色、Oct3/4 基因表达、latrophilin (2 型) 阳性染色、latrophilin  
15 (2 型) 基因表达、Hes-1 阳性染色、Hes-1 基因表达、整合素亚单元  $\alpha 6$  和  $\beta 1$  阳性  
染色、基因表达、整合素亚单元  $\alpha 6$  和  $\beta 1$ 、C-kit 阳性染色、C-kit 基因表达、MDR-1  
阳性染色、MDR-1 基因表达、SST-R2、3、4 阳性染色、SST-R2、3、4 基因表达、  
SUR-1 阳性染色、SUR-1 基因表达、Kir6.2 阳性染色、Kir6.2 基因表达、CD34 阴性  
染色、CD45 阴性染色、CD133 阴性染色、MHC I 型阴性染色、MHC II 型阴性染色、  
20 细胞角蛋白-19 阴性染色、在培养基中长期增殖, 以及具有在培养基中分化成假胰岛  
的能力。当前的发明人也已经鉴别了显现巢素阳性染色的肝细胞。

在一个实施例中, 该发明提供的干细胞可供各种应用, 包括但不限于用于 1  
型胰岛素依赖糖尿病和各种形式的糖尿病的细胞替代疗法, 以及用于各种糖尿病、激  
素异常、基因疾病或缺陷——如多态性与独特的生理或病理状态的关系——的发生和  
25 发展研究的研究工具的开发。在同基因移植物、异基因移植物和异种移植物移植中,  
该发明的干细胞还可用于进行内分泌胰腺或其他组织的基因治疗。再者, 本处描述的  
干细胞可用于在培养基中生产重组细胞、人造组织和替代器官。它们还可用于在体外  
生产胰岛素及其他激素。发明人发现的胰腺干细胞分子特性, 如巢素阳性、GLP-1R  
阳性、ABCG2 阳性染色、Oct3/4 阳性、latrophilin (2 型) 阳性、Hes-1 阳性、整合素

亚单元  $\alpha 6$  和  $\beta 1$  阳性、C-kit 阳性、MDR-1 阳性、SST-R2、3、4 阳性、SUR-1 阳性、Kir6.2 阳性、细胞角蛋白阳性、CD34 阴性、CD45 阴性、CD133 阴性、MHC I 型和 II 型阴性染色，或肝干细胞特性如巢素阳性染色，可用于各种各样的诊断、病理或研究方法，用于鉴别、定位和定量来自病人或实验动物组织中的干细胞。

5

### **胰岛干细胞的鉴别**

以前的研究都聚焦于胰岛管上皮细胞或者外分泌组织作为干细胞可能的来源以用于胰岛外分泌细胞的再生。巢素是一个中间纤维蛋白其通过从一个 E 15 鼠胚胎使用一个单克隆抗体 R. 401 (Hockfield & McKay, 1985; Lendahl et al., 1990) 筛选一个 cDNA 文库进行克隆。巢素最初发现于神经上皮干细胞且其在发育中的中枢神经系统中表达。在鼠胚胎 E16 中达到最高水平后，巢素表达量在成人脑皮层降低至几乎不可检测的水平，其正好与早期巢素表达祖细胞的终止分化相一致 (Lendahl et al., 1990)。巢素起初仅发现于胚胎发育的脑及骨骼肌中的干细胞中 (Lendahl et al., 1990)。最近的研究表明在成人哺乳动物前脑中室管膜下层巢素阳性神经干细胞 (Morshead et al., 1994)。巢素阳性干细胞已被证明其是一个多能性的甚至当其分离出成熟小鼠大脑中。例如，巢素阳性干细胞可以产生所有三种主要类型神经细胞：神经元，星形胶质细胞及少突细胞 (Reynolds & Weiss, 1996)。巢素阳性神经干细胞反应脊髓的损伤是通过可以分化成为星形胶质细胞的迁移细胞的增殖及降解，其也参与疤的形成 (Johansson et al., 1999) 且在输入照射鼠后储存骨髓造血细胞 (Bjornson et al., 1999)。

15  
20

### **干细胞的特征**

依据该发明，干细胞可通过它们表达巢素和/或 GLP-1R、ABCG2、Oct3/4、latrophilin (2 型)、Hes-1、整合素亚单元  $\alpha 6$  和  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SST-R2、3、4、SUR-1 和 Kir6.2 鉴别，通过如 FACS、免疫细胞化学染色、RT-PCR、DNA RNA 和免疫印迹分析以及其他技术人员熟知的细胞鉴别技术鉴别。

25

免疫细胞化学染色，例如，按照下述方法进行：准备自胰腺或肝的 Cryosections (6  $\mu$ m) 以及细胞在磷酸溶液的 4% 的多聚甲醛中固定。细胞首先使用 3 % 正常的驴血清室温下凝固 30 分钟且与最初的抗相关蛋白的抗血清在 4℃ 下过夜培养培养。抗血清使用 PBS 洗涤且在合适的荧光标记的第二抗体下室温下培养 1 小时。然后使用 PBS 再次洗涤斜面且使用荧光封固剂涂附斜面 (Kirkegaard and Perry Labs, Gaithersburg, MD)。使用装有界面上有一个 PowerMac 7100 装有 IP 实验光谱分析软件 (Signal

30



Analytics Corp, Vienna, VA)的光学 TEC-470 CCD 照相机(Optronics Engineering, Goleta, CA)的 Zeiss Epifluorescence 显微镜获取荧光图片。

依据该发明, 可用的抗血清包括以下: 对细胞角蛋白 19 的鼠单克隆抗体 (克隆 K4.62, Sigma, 圣路易斯, 密苏里州)、对鼠巢素和 IDX-1 的兔多克隆抗血清 (分  
5 别用纯化 GST 巢素融合蛋白质或鼠 IDX-1 的最后 12 个氨基酸免疫兔子制备) (McManus 等, 1999 年, J. Neurosci., 19: 9004-9015)、对 GLP-1R 的兔多克隆抗血清 (Heller 等, 1997 年, Diabetes 46: 7851)、ABCG2 抗血清 (MAB4146, Chemicon 公司 (Temecula, 加州))、整合素  $\alpha$  G 抗血清 (SC-6597, 圣克鲁斯)、整合素  $\beta$  1 抗血清 (SC-6622, 圣克鲁斯)、HES1 抗血清 (AB5702, Chemicon 公司)、CD45 抗血  
10 清 (31252X, BD Pharmigen (圣地亚哥, 加州))、CD34 抗血清 (MS-363-PO, NeoMarkers (Freemont, 加州))、MHC I 抗血清 (MS-557-

PO, NeoMarkers)、MHC II 抗血清 (MS-162-PO, NeoMarkers)、MDR-1 抗血清 (p170) (MS-660-PO, NeoMarkers)、Oct3/4 抗血清 (SC-5279, 圣克鲁斯, 加州)、SUR-1 抗血清 (SC-5789, 圣克鲁斯)、KIR6.2 抗血清 (SC-11227, 圣克鲁斯)、ABCG2  
15 抗血清 (SC-18841, 圣克鲁斯)、c-kit 抗血清 (SC-1493, 圣克鲁斯)、SSTR2 抗血清 (SC-11606, 圣克鲁斯)、SSTR3 抗血清 (SC-11610, 圣克鲁斯)、SSTR4 抗血清 (SC-11619, 圣克鲁斯)、豚鼠抗胰岛素和抗胰多肽抗血清 (购自 Linco 公司, 圣查尔斯, 密苏里)、鼠抗高血糖素抗血清和兔抗生长激素抑制素抗血清 (分别购自 Sigma 公司 (圣路易斯, 密苏里州)和 DAKO 公司 (Carpinteria, 加州))、鼠抗人甘丙肽 (galanin)  
20 (半岛实验室公司, Belmont, 加州)、胶原质 IV 抗血清 (Caltag 实验室公司, 旧金山, 加州)、鼠抗鼠 MHC I 型血清 (Serotek) 和抗鼠 MHC II 型血清。发明人相信, 其他直接针对这些标记物的抗血清现可获得或将被开发。这样的其他抗血清被认为是在该发明的范围之内。

RT-PCR 及 DNA 印迹法按照下述方法进行。获自鼠或人胰岛的总的细胞 RNA  
25 被反转录且通过 PCR 扩增按照扩增的预期程度大约 35 个循环, 正如前所述 (Daniel, et al., 1998, Endocrinology, 139: 3721-3729)。用作 PCR 引物或扩增引物以及 RNA 印迹杂交的探针的寡聚核苷酸可以为:

鼠巢素: 正向, 5'gcgggcggtgcgtgactac3' ;

反向, 5'aggcaaggggaagagaaggatgt3' ;

30 杂交, 5'aagctgaagccgaatttccttgggataccagagga3'。

鼠角蛋白 19: 正向, 5'acagccagtacttcaagacc3' ;

- 反向, 5'ctgtgtcagcacgcacgtta3' ;  
 杂交, 5'tggattccacaccaggcattgaccatgcca3'.
- Rat NCAM : 正向, 5'cagcgttgagagtgccaaat3' ;  
 反向, 5'taaactcctgtggggttg3' ;  
 5 杂交, 5'aaaccagcagcgatctcagtgggtggaacgatgat3'.
- Rat IDX-1 正向, 5'atcactggagcaggaagt3'  
 反向, 5'gctactacgtttcttatct3'  
 杂交, 5'gcgtggaaaagccagtggg3'
- 人类 巢素: 正向, 5'agagggaattcctggag3' ;  
 10 反向, 5'ctgaggaccaggactctcta3' ;  
 杂交, 5'tatgaacgggctggagcagtctgaggaaagt3'.
- 人类角蛋白: 正向, 5'cttttcgcgcgccagcatt3' ;  
 反向, 5'gatcttctgtccctcgagc3' ;  
 杂交 5'aaccatgaggaggaaatcagtacgtgagg3'.
- 15 人类高血糖素: 正向, 5'atctggactccaggcgtgcc3' ;  
 反向, 5'agcaatgaattccttggcag3' ;  
 杂交, 5'cacgatgaatttgagagacatgctgaagg3' ;
- 人 E-Cadherin 正向, 5'agaacagcacgtacacagcc 3'  
 反向, 5'cctccgaagaacagcaaga 3'  
 20 杂交, 5'tctcccttcacagcagaactaacacacggg 3'
- 人 transthyretin 正向, 5'gcagtcctgccatcaatgtg 3'  
 反向, 5'gttggtgtgaataccacct 3'  
 杂交, 5'ctggagagctgcatgggctcacaactgagg 3'
- 人胰淀粉酶 正向, 5'gactttccagcagtcaccata 3'  
 25 反向, 5'gtttacttctgcagggaac 3'  
 杂交, 5'ttgactggagaaggattacgtggcgttcta 3'
- 人羧肽酶原正向, 5'tgaaggcgagaaggtgtcc 3'  
 反向, 5'ttcgagatacaggcagatat 3'  
 杂交, 5'agttagactttatgtcctgcctgtgctca 3'
- 30 人 Synaptophysin 正向, 5'cttcaggctgcaccaagtgt 3'  
 反向, 5'gttgaccatagtcaggctgg 3'

- 杂交, 5'gtcagatgtgaagatggccacagacccaga 3'
- 人类肝细胞生长因子 (HGF)
- 正向, 5'gcataaatgtcagccctgg 3'
- 反向, 5'caacgctgacatggaattcc 3'
- 5 杂交, 5'tcgaggtctcatggatcatacagaatcagg 3'
- 人 cMET (HGF-receptor) 正向, 5'caatgtgagatgtctccagc 3'
- 反向, 5'cctttagattgcaggcaga 3'
- 杂交, 5'ggactcccatccagtgtctccagaagtgat 3'
- 人 XBP-1 正向, 5'gagtagcagctcagactgcc 3'
- 10 反向, 5'gtagacctctgggagctcct 3'
- 杂交, 5'cgagcactcagactacgtgcacctctgca 3'
- 人 Glut-2 正向, 5'gcagctgctcaactaatcac 3'
- 反向, 5'tcagcagcacaagtcccaact 3'
- 杂交, 5'acgggcattcttattagtcagattattggt 3'
- 15 人胰岛素 正向, 5'aggcttcttctacaca3'
- 反向, 5'caggctgcctgcacca 3'
- 杂交, 5'aggcagaggacctgca 3'

其他这样的序列是可能的, 且这样的序列被认为是在该技术的范围之内。该发明包括低聚核苷酸, 用作 PCR 引物或扩增引物, 以及用作从以下组成的组中选择的任何标记物的 DNA (Southern) 分析探针: ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$  和  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SST-R2、3、4、SUR-1、Kir6.2、CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型。作为一种普通导子 (guide), 引物从两种不同的外显子中选择, 且至少包括一个内含子序列。此外, 一种 RT 减控制在大多数样品中运行。PCR 在 94°C 一分钟下完成扩大, 然后 94°C 10 秒, 25 58/56°C 10 秒, 72°C 一分钟, 35 个周期, 以及 72°C 二分钟。对鼠巢素退火 (annealing) 温度是 58°C, 而对其余引物对为 56°C。

对于分离自非鼠或人的哺乳动物的 mRNA 的 RT-PCR, 特异于来自要准备分析的哺乳动物种的扩增核酸的寡聚核苷酸。这些引物的选择及使用为本领域技术人员所共知。

30 对于 DNA 杂交寡聚核苷酸探针使用合适的放射性核素来进行标记, 例如  $\gamma$   $^{32}\text{P}$  ATP, 其使用传统的技术。放射性标记探针在 37°C 下杂交于转移进入尼龙膜的 PCR 产品一

小时，然后在  $1 \times \text{SSC} + 0.5\% \text{SDS}$  在  $55^\circ\text{C}$  下洗涤 10-20 分钟或在  $0.5 \times \text{SCC} + 0.5\% \text{SDS}$  在  $42^\circ\text{C}$  下对于人类的 PCR 产品。

#### 巢素作为胰腺干细胞的标记

发明家已经出乎意料地发现成人哺乳动物包括人类的胰脏含有表达巢素的细胞。

5 重要的是，巢素阳性细胞在胰脏中的分布并不相应于产生激素的细胞。例如特异性反应与胰岛素或高血糖素的荧光标记抗体分别标记有胰岛的  $\beta$  及  $\alpha$  细胞，其中发明者已经发现在老鼠及人类中荧光标记的巢素抗体仅位于管上皮的某些细胞中且并不是  $\alpha$ ， $\beta$ ， $\delta$ ，及产生于胰岛的胰脏多肽 (图 1)。发明者同样发现特异于胶原质 IV 的抗体，动脉管内皮细胞 *galanin*，神经末梢的一个标记及细胞角蛋白 19，管细胞的一个标记，其并不共位于巢素抗体。此外，发明家已经发现巢素阳性胰岛细胞并不与抗胰岛素，高血糖素，生长激素抑制素或者胰多肽共标记(图 1)。这表明这些巢素包含细胞并非内分泌细胞，管细胞，神经细胞或者动脉内皮细胞，但是其却代表一个先前并未描述的胰岛中的真正独特的细胞类型。发明者已经发现胰岛中的巢素阳性细胞正如胰脏导管中的其他区域一样且位于外分泌胰脏的 *centroacinar* 区域。

15 巢素 mRNA 在胰岛中的表达通过使用 RT-PCR 使用分离自鼠胰岛的 RNA (图 2) 进行检测。巢素阳性胰脏细胞的功能性特点使用通过从胰岛中分离出巢素阳性细胞且细胞培养技术进行检测，这些下面进一步描述。

发明家同样发现了鼠肝含有可以表达巢素的细胞 (图 13)。

20 **ATP 结合盒 (ABC) 多药抗性转运体 (ABCG2 (Bcrp1) 和 MDR-) 作为胰腺干细胞的标记物**

人胰岛衍生的 NIPs 含有大量的一种亚族 SP 细胞，共同表达 ABCG2、MDR1 和巢素：依赖排除 Hoechst 33342 染料，ABCG2 表达定义骨髓多能干细胞的边族 (side population, SP) 表型。MDR-1 提供 SP 细胞复制的能力。SP 细胞 (CD34 低/阴性) 不能增殖，因此在试管内不能增殖。在 CD34 低/阴性 SP 细胞中 MDR-1 的强迫表达引起它们增殖 (Bunting 等，2000 年，Blood 96: 902)。NIPs 也是 CD34 低/阴性。因此，由于它们表达 ABCG2，NIPs 现在被定义为 SP 细胞；且不像骨髓衍生的 SP 细胞，NIPs 表达 MDR-1，因此可以增殖，使旨在移植的体外扩增 NIP SP 细胞成为可能。

#### Oct3/4 作为一种胰腺干细胞的标记物

30 NIPs 表达 Oct3/4。Oct3/4 是一种属于 Pou 同源结构域 (homeodomain) 蛋白家族的转录因子 (Niwa 等，2002，Mol. Cell. Biol., 22: 1526; Niwa 等，2000 年，Nat. Genet., 24: 328; Niwa 等，2001 年，Cell Struct. Funct., 26: 137; Shimazaki 等，1993 年，

EMBO, 12: 4489; Wang 等, 1996 年, Biochem. Cell. Biol. , 74: 579; Nichols 等, 1998 年, Cell 95: 379; )。这是一项重要的发现, 因为 Oct3/4 的表达严格限制于干/祖细胞 (Niwa 等, 2002 年, supra; Niwa 等, 2000 年, supra; Niwa 等, 2001 年, supra)。NIPs 强烈表达 Oct3/4, 因此自我定义是干/祖细胞。那就是, 如果 Oct3/4 表达绝对限制于干/祖细胞, 且 Oct3/4 在 NIPs 中表达, 那么 NIPs 是干/祖细胞。

#### 整合素亚单元 $\alpha 6$ 和 $\beta 1$ 作为一种胰腺干细胞标记物

NIPs 表达整合素亚单元  $\alpha 6$  和  $\beta 1$ 。  $\alpha 6/\beta 1$  整合素是层粘蛋白 (laminin) 受体 (Giancotti 和 Ruoslahti, 1999 年, Science 285: 1028)。最近证明 ES 细胞能在层粘蛋白包衣的培养皿中增值, 且其生长无需依赖喂养细胞层 (Xu 等, Nature Biotechnology, 2001 年 10 月, 19: 971)。细胞表面的表达整合素为维持细胞生长和发育所必需 (参见 Giancotti 等, supra)。  $\alpha 6/\beta 1$  受体对层粘蛋白特异认知。层粘蛋白是一种在胚泡中表达的必需蛋白质。因此  $\alpha 6/\beta 1$  是 ES 细胞的一个标记物 (干/祖细胞)。NIPs 表达整合素亚单元  $\alpha 6$  和  $\beta 1$ 。因此, 在此方面, NIPs 与 ES 细胞相似。

#### Hes-1 作为一种胰腺干细胞的标记物

侧抑制 (lateral inhibition) 的  $\delta$  /凹口信息通路对胚胎发育至关重要。关于凹口信息传递的重要性已有很多文章表述。在 NIPs 中, 凹口信息传递也很重要。凹口信息传递为胰腺发育所绝对需要 (Apelquist 等, 1999 年, Nature 400: 6747; Lammert 等, 2000 年, Mech Dev. 94: ; Jensen 等, 2000 年, Nat. Genet. , 24: 36; Jansen 等, Diabetes 2000, 49: 163)。Ngn-3 是 bHLH 转录因子的关键的决定因子, 为内分泌胰腺家系 (lineage) 的发育所需。Hes-1 是 Ngn-3 表达的一个强大的抑制剂。NIPs 强烈表达 Hes-1。因此, NIPs 是阻止分化成内分泌细胞的祖细胞。因此, 阻止 Hes-1 在 NIPs 表达的方法将使它们分化成内分泌细胞 ( $\beta$  细胞)。这种阻止 Hes-1 表达的方法可能是应用转染反义 RNA, 要么通过应用小段干预 RNA 寡核苷酸, 要么通过应用一种表达反义 Hes-1RNA 的表达质粒。

#### GLP-1R 作为胰腺干细胞的一种标记物

发明人进一步发现, 成年哺乳动物包括人类的胰腺, 包含表达高血糖素样的肽-1 受体 (GLP-1R) 的细胞。GLP-1R 阳性细胞可以跟巢素阳性细胞共存于同一位置, 这个发现为该发明进一步提供了基础。该发明也基于相反的发现, 即巢素阳性胰腺干细胞可以跟 GLP-1R 阳性细胞共存于同一的位置。高血糖素基因编码一种多功能的高血糖素原, 高血糖素和胰高血糖样肽 (GLP) 是通过依赖胰腺和肠道中的前激素转化酶的分化过程产生。GLP-1 已被证明与一种在胰  $\beta$  细胞中发现的 G-蛋白偶联受体特异

结合, 通过一种 cAMP 依赖通路刺激胰岛素的分泌 (Kiefer 和 Habener, 1999 年, *Endocri. Rev.* 20: 876; Drucker, 1998 年, *Diabetes*, 47: 159)。当前的发现部分基于这个发现, 即如上所述, 在胰岛和胰管中发现的巢素阳性干细胞, 也是 GLP-1R 阳性。

- 5 巢素阳性胰岛祖细胞 (NIPs) 从人体胰岛组织中分离, 遵循以上概述的普通免疫细胞化学过程, 与兔的 GLP-1R 多克隆抗血清反应 (Heller 等, *supra*)。在超过 60% 的受检 NIPs 中发现有受体免疫活性 (图 22A)。为进一步在 NIPs 中证实 GLP-1R 的免疫细胞化学检测, 对从 NIP 细胞中制备的 mRNA 进行 RT-PCR 检查。NIP mRNA 以及随之的 5' gtgtggcggccaattactac 3' (正向)、5' gtgtggcggccaattactac 3' (反向) 引物  
10 物的扩增, 产生期望的 346bp 产品 (图 22B), 提示除表达 GLP-1R 蛋白质外, NIPs 还有合成 GLP-1R 的生物合成能力。因此, 除巢素外, GLP-1R 作为胰腺干细胞的一个标记物, 在本发明中有其应用。

#### 细胞角蛋白-19 作为导管上皮细胞一明显族群的一个标记物

- 细胞角蛋白-19 (CK-19) 是另一种中间纤维蛋白质。CK-19 以及相关的角蛋白最初发现在胰导管细胞中表达 (Bouwens 等, 1994 年)。然而, 本发明者发现, 尽管  
15 CK-19 表达确实被限制在导管内, 但对 CK-19 特异的荧光抗体从那些被巢素特异抗体标记的细胞中标记出分离的导管细胞。这就提示, 胰岛中的巢素阳性细胞可能是一种明显区别于 CK-19 阳性细胞的细胞类型。

#### NIPs 是 CD34 低/阴性:

- 20 NIPs 的 SP 部分 (图 19B 的左下口) 表达低至零水平的 CD34。这个发现很重要, 因为与 CD34 阳性 SP 细胞相反, 骨髓衍生的 CD34 低阴性 SP 细胞极具多能 (参见 Goodell, 1999 年, *Blood*, 94: 12545)。骨髓衍生的 CD34 低/阴性 SP 细胞具备有限的增殖能力——如果有的话 (Goodell 等, 1996 年, *J. Exp. Med.*, 183: 1797; Goodell 等, 1997 年 *Nat Med*, 3: 1337)。CD34 低/阴性 NIPs 确能在试管内增殖, 因为它们  
25 表达 Mdr-1。

#### 胰腺干细胞的其他标记物

- 该发明也为胰腺干细胞提供至少对从由 latrophilin (2 型) (Sudhof, 2001 年, *Annu. Rev. Neurosci* 24: 933)、C-kit (CD117) (Gibson 等, 2002 年, *Adv. Anat. Pathol.* 9: 65), SSTR-2、3、4 (生长激素抑制素受体) (Schulz 等, 2000 年 *J Physiol Paris* 94: 259), SUR-1 (sulfonylurea 受体) (Winarto 等, 2001 年, *Arch. Histol. Cytol.* 64: 59; Landgraf, 2000 年, *Drugs Ageing*, 17: 411) 和 Kir6.2 (带有 SUR-1 的内流调节钾  
30

离子通道亚单位) (Winarto 等, *supra*; Landgraf, *supra*) 组成的组中选择出来的标记物之一显阳性。

该发明还为胰腺干细胞提供至少对 CD45 (Sasaki 等, 2001 年, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 1041)、CD133 (Kobari 等, 2001 年, *J Hematother Stem Cell Res.* 10: 273)、  
5 MHC I 型和 MHC II 型之一显阴性。

### 从胰岛中分离干细胞及其应用

干细胞可从胰腺组织标本中分离出来, 例如, 从糖尿病病人活组织检查样本中获得的胰岛。之后, 干细胞在体外增长, 结果得到的细胞作为同基因移植物移植回供体  
10 体内。在供体体内, 它们可分化, 以提供胰岛素分泌细胞, 如提供  $\beta$  细胞以替代因自动免疫攻击——引起糖尿病的原因——而损失的  $\beta$  细胞。这种方法能克服移植组织——譬如来自另一个供体人的胰岛所产生的免疫排斥问题。在该发明的一个实施例中, 同基因移植干细胞的应用使能进行另一项旨在避免免疫排斥的技术, 那就是移植细胞的基因疗法使它们能抵抗免疫攻击, 如出现在 1 型糖尿病患者身上的自动免疫。应用  
15 干细胞比全胰岛更进一步的优势是, 移植的细胞可以在原处分化, 且更能适应宿主的环境, 例如, 提供适宜的微循环以及一种响应宿主生理需要的、不同的辅助胰岛细胞类型。该发明的另一项实施例考虑应用部分分化的干细胞在体外 (比如) 形成祖细胞, 然后将其移植入宿主, 让其进一步的分化在宿主体内随机发生。虽然推荐使用一种干细胞、祖细胞或假胰岛的同基因移植物, 但另一项实施例则考虑应用取自另一个人或  
20 另一种哺乳动物的干细胞、祖细胞或假胰岛的同种异体移植物。

然而, 在该发明的另一项实施例中, 干细胞为免疫盲的或免疫豁免的。在该发明这方面的一个实施例中, 免疫豁免干细胞没有表达足够数量的 I 型和/或 II 型主要组织相容性抗原 (a.k.a.HLA 或人体白细胞抗原) 以诱导宿主的免疫反应。例如, 这些  
25 从同种异基因或异种来源的干细胞, 在有正常免疫能力的移植接受者中不会引起宿主对移植物的反应。

在该发明这方面的另一个实施例中, 免疫豁免干细胞不表达 MHC I 型抗原和/或 MHC II 型抗原。这些从同种异基因或异种异基因来源的干细胞, 在有正常免疫能力的移植接受者中不会引起宿主对移植物的反应。

在该发明的另一个实施例中, 由干细胞组成的人组织移植物表达人特异 MHC I  
30 型和 MHC II 型抗原, 但被有正常免疫活性的鼠认作是自身的产物, 因此没有发生宿主对移植物的排斥。这些从同种异基因或异种来源的干细胞, 在有正常免疫能力的移

植接受者中不会引起宿主对移植物的反应。

该发明还提供从异种供体中分离干细胞,并将结果细胞作为异种移植物移植入另一种类的哺乳动物(比如,鼠干细胞被移植入一位人如一位糖尿病患者中)的方法。

该发明提供进行同基因、同种异基因或异种移植巢素阳性干细胞的方法,在这里  
5 那些干细胞在移植前已培养了一段时间,比如 2-4 小时、4-5 小时、5-10 小时或 1-3 天。该发明还提供进行同基因、同种异基因或异种移植一种干细胞的方法,那种干细胞至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$  和  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性,和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或对其全部不表达,在这里那些干细胞在移植前  
10 已培养了一段时间,比如 2-4 小时、4-5 小时、5-10 小时或 1-3 天。

该发明还提供进行同基因、同种异基因或异种移植巢素阳性干细胞的方法,在此种情况下,为分化生成其他干细胞或祖细胞,干细胞在移植前已生长了一段时间,比如 2-4 小时、4-5 小时、5-10 小时或 1-3 天。

该发明还提供进行同种基因、同种异基因或异种移植一种干细胞的方法,那种干  
15 细胞至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性,和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或对其全部不表达,在这里那些干细胞在移植前已培养了一段时间,比如 2-4 小时、4-5 小时、5-10 小时或 1-3 天。

20 该发明还提供进行同基因、同种异基因或异种移植干细胞的方法,在此种情况,巢素阳性干细胞在移植前被用一种制剂处理一段时间,比如 2-4 小时、4-5 小时、5-10 小时或 1-3 天,以诱导分化生成一种祖细胞,这种处理制剂从以下组成的组中选择:EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4 (肠促胰岛素类似物)、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素和 TGF- $\beta$  及其组合物。

25 假如是胰腺干细胞,该干细胞随后分化成一种胰祖细胞。

该发明还提供进行同基因、同种异基因或异种移植一种干细胞的方法,那种干细胞至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha 6$ 、整合素亚单元  $\beta 1$ 、C-kit、MDR-1、SST-R2、SST-R3、SST-R4、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性,和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一  
30 或对其全部不表达;在该种情境况,该干细胞在移植前被用一种制剂处理一段时间,比如 2-4 小时、4-5 小时、5-10 小时或 1-3 天,以诱导分化生成一种祖细胞,这种处



理制剂从以下组成的组中选择: EGF、bFGF-2、高糖、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4 (肠促胰岛素类似物)、IDX-1、一种编码 IDX-1 的核酸分子、betacellulin、活化素和 TGF- $\beta$  及其组合物。假如是胰腺干细胞的情况, 该干细胞随后分化成一种胰祖细胞。

该发明还提供进行同基因、同种异基因或异种移植的方法, 在此种情况下, 巢素  
5 阳性干细胞在移植前没有培养, 也不增长或分化, 或巢素阳性细胞在移植前已培养和/或增长和/或分化。

该发明还提供进行同基因、同种异基因或异种移植一种干细胞的方法, 这种干细胞至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha$  6、整合素亚单元  $\beta$  1、C-kit、MDR-1、SST-R2、SST-R3、SST-R4、SUR-1、  
10 Kir6.2 之一显阳性, 和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或对其全部不表达, 且在移植前既不培养, 也不增长或分化; 或至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha$  6、整合素亚单元  $\beta$  1、C-kit、MDR-1、SST-R2、SST-R3、SST-R4、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性, 和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或对其全部不表达,  
15 且在移植前已培养和/或增长和/或分化。

巢素阳性细胞可在分离胰岛的培养基中增值, 然后将其分离, 以形成一种基本上具有无限增殖能力的干细胞家族。

在另一个实施例中, 一种至少对 ABCG2、Oct3/4、GLP-1 受体、latrophilin (2 型)、Hes-1、巢素、整合素亚单元  $\alpha$  6、整合素亚单元  $\beta$  1、C-kit、MDR-1、SST-R2、  
20 SST-R3、SST-R4、SUR-1、Kir6.2 之一显阳性, 和/或不表达 CD34、CD45、CD133、MHC I 型和 MHC II 型之一或对其全部不表达的干细胞, 可在分离胰岛的培养基中增值, 然后将其分离, 以形成一种基本上具有无限增殖能力的干细胞家族。

发明人发现, 巢素表达的细胞从培养胰岛中长出来, 并早在四天就可观察到在培养基的胰岛周围生长。这些细胞具有一种神经元样的形态和结构 (图 3), 显示巢素  
25 阳性染色, 并表达 mRNA。通过将胰岛混悬液与伴刀豆球蛋白 A 接触, 包含巢素阳性细胞的胰岛可从其他细胞——如在培养胰岛中增值的成纤维细胞分离出来。例如, 包含巢素阳性干细胞的胰岛将不粘附在伴刀豆球蛋白 A 覆盖的培养皿上, 让这些胰岛简单地被倾泻出来, 而其他细胞类型继续在皿上黏附。然后, 将这些胰岛覆盖在它们能黏附的、不含伴刀豆球蛋白 A 衣层的井内。以下例 1 详细描述了鼠细胞的培养  
30 基组成和分离方法。在人细胞也已获得了类似的结果。

### 培养物中假胰岛和导管结构的形成

该发明的一个实施例通过使干细胞或祖细胞形成能移植入病人体内的假岛样聚集体，提供一种移植干细胞或祖细胞的替代方法，它补充病人胰岛细胞团的不足，以维持生理调节而无需激素疗法。胰岛衍生的干细胞可从以上所述的培养胰岛中制备，  
5 或从祖干细胞家族中获取。干细胞然后通过各种的生长因子接触，被诱导分化。这个过程在例 2 和例 3 中表述。

### 干细胞或祖细胞向胰岛细胞的分化

诱导胰腺干细胞分化的生长因子包括但不限于 EGF-2、碱性 FGF、高糖、KGF、  
10 HGF/SF、GLP-1、exendin-4、 $\beta$  细胞素 (betacellulin)、苯丙酸诺龙 A 和 TGF- $\beta$  以及它们的组合物。GLP-1 指高血糖素样的肽-1。高糖指一种比通常用于培养干细胞浓度较高的葡萄糖浓度。例如，干细胞通常能在大约 5.6 mM 葡萄糖中培养和增殖，高糖指高于 5.6 mM 的浓度。在优选的实施例中，一种 16.7mM 的浓度被认为是可能的。  
例 2 中，描述了一种使用碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和表皮生长因子 (EGF)  
15 的可能的生长因子处理。

除了将生长因子加入细胞培养基外，当干细胞被移植入动物或人体中时，进一步应用生长因子可促进分化。在此种情况下，内分泌细胞可分泌许多已知或未知的生长因子，并在原位与干细胞接触。移植的干细胞可被任何内源性与外源应用的生长因子组合诱导分化；外源应用的生长因子与期望的结果相一致，即与最后分化的细胞类型  
20 和形成的解剖结构（即组织或器官）相一致。

一个实施例提供一种刺激分化的方法，那就是应用生长因子的顺流效应因子，或用一种编码这些效应因子的核酸分子转染干细胞或祖细胞。IDX-1 就是一个例子，它是一种由 GLP-1 或 exendin-4 诱导的转录因子。引入像 IDX-1 那样的效应因子可启动分化，形成内分泌胰岛细胞。

25

### 移植排斥分析

本发明提供了一个体内评估移植物存活的方法。按照本发明通过移植一个干细胞或一个假胰岛类似性聚集体入一个免疫抑制的或非免疫抑制的哺乳动物分析实验性移植排斥反应。

30 例如，非免疫抑制的 C57BL/6 小鼠按照本发明被使用人类干细胞移植（例如在肾囊中），通过牺牲移植受体且对存活移植物染色或在移植物上（例如移植物上的一个

器官或组织)在移植后合适的时间点进行免疫细胞化学染色对移植排斥进行分析。在该时间点对移植物的染色(例如苏木精/曙红或免疫染色)可以变化,例如按照移植哺乳动物平均的存活时间或预期的存活时间。通过染色分析移植位点,移植后1天至10年(例如,1,5,10,30,100或更多天,1,2,5,或10年),最好是10天至1年且更好是10-100天。例如,如果移植物在鼠肾囊中被引入,检查移植鼠的肾。如果移植物被检测到和/或移植物在组织中进行增殖的话说明移植物被成功移植(也就是说没有被排斥)。

移植物的增殖及检测例如通过准备自移植位点的冷冻部分(例如肾)的苏木精/曙红染色及并不起源于移植受体的新生长(例如不是宿主肾获得的)的检测进行。在异种移植的情况下,使用特异于获自移植物起源的种的抗原的抗血清进行的特异性的免疫染色的话移植物被成功移植,按照本领域已知的且这儿所描述的免疫细胞化学染色方法鉴别阳性细胞。此外,在一个实施例中进行的异种移植,如果获自移植种的(从其中移植物物质所获得的种)分子(例如蛋白或抗原)在移植受体的血液中检测到的话移植物被成功移植。

正如这儿所使用到的,“排斥”指的是宿主免疫系统对移植物的排斥。在一个实施例中,“排斥”意指移植物中有超或90%的细胞或组织因为宿主免疫反应坏死的发生。在另一个实施例中,“排斥”意指生存能力的降低也就是说因为宿主的免疫反应移植物中有90%甚至更多与移植前相比较生存能力降低。生存能力的降低可通过本领域已知的技术检测到,包括但并不限于 trypan 蓝专一染色。在另一个实施例中,“排斥”意指移植物增殖的失败。增殖可通过本领域已知的技术包括但并不限于苏木精/曙红染色检测到。移植排斥的发生和/或移植后排斥发生的速度将因各种因素而变化,包括但并不限于移植物物质(例如细胞类型或细胞数量)或宿主(也就是说不管宿主是免疫耐受性的和/或使用免疫抑制剂处理过的)。

## 25 移植方法

本发明提供了移植进入哺乳动物的方法。一个干细胞,祖细胞或分化细胞被“移植”或“引入”进入一个哺乳动物细胞当期从培养器皿中进入患者时。

按照本发明,移植包括按照本发明所述分离干细胞的步骤且转移干细胞进入哺乳动物或患者的步骤。按照本发明,移植还涉及到转移干细胞进入哺乳动物或患者通过注射细胞悬液进入哺乳动物或患者的途径,外科输入哺乳动物或患者的组织或器官的细胞,或使用细胞悬液注入组织或器官。转移干细胞或移植的路径,将按照细胞

在特定组织或器官中的位置需要及细胞发现且滞留在预期目标组织或器官位置的能力确定。当移植细胞停留在特定的位置时，其可以通过外科手术方法进入组织或器官或简单地注入到血浆中去如果细胞具有移动至目标靶器官的能力的话。按照本发明所述的移植包括分离干细胞的步骤以及培养且转移干细胞进入哺乳动物或患者体内去的步骤。在另一个实施例中，这儿所使用的移植还包括分离干细胞，分化干细胞，转移干细胞进入哺乳动物或患者体内去的方法。这儿所使用的移植还包括按照本发明分离干细胞，分化及扩增干细胞且转移干细胞进入哺乳动物或患者体内去的方法。

### 使用胰脏干细胞治疗胰岛素依赖型糖尿病患者的方法

10 干细胞对于取代I型糖尿病患者的丧失的 $\beta$ 细胞或提高II型糖尿病患者的 $\beta$ 细胞的总的数量是非常有用的。糖尿病患者更适宜作为用于产生干细胞，祖细胞或假胰岛类似物聚集体的供体。干细胞存在成人胰岛或胰脏导管。对糖尿病患者进行活组织检查后，从活组织中分离出胰岛且体外准备24小时，干细胞然后使用上述方法在2—3周内分离且增殖。分离后或经过一段时间生长因子诱导的分化干细胞可被直接移回患者。胰岛可通过如实施例2所述的亚培养产生。胰脏外科手术活组织分析的整个过程在大约30天内进行。

在本发明的一个实施例中可用到多功能干细胞。这些细胞是免疫盲的或免疫豁免的例如在异源或异种移植物中，其可以被受体作为自身识别而不是限制于I型或II型抗原的MHC。在本发明该实施例的一方面，这些细胞并不表达MHC型和/或II型抗原。

20 在本发明另一个实施例中，移植物受体可以证明宿主对其它移植细胞的移植排斥其可以通过给予抗体激起反应，例如一个自身抗原如GAD65，通过给予一个或多个这里所述的免疫抑制剂或使用本领域已知的技术以预防或减缓自身免疫排斥反应。

此外，按照本发明分离自非人哺乳动物的干细胞移植进入人糖尿病患者。在移植步骤之前，干细胞可被培养和/或扩增和/或分化。

### 使用胰脏干细胞治疗肝病患者的方法

胰脏干细胞或祖细胞分化形成肝细胞的能力是众所周知的 (Bisgaard & Thorgeirsson, 1991)。本发明的胰脏干细胞可以用于提供肝细胞以治疗肝病患者所遭受的肝病例如 cirrosis, 肝炎, 或肝癌其中功能性肝组织已经被减少。本发明所述的干细胞同样可被经过基因治疗处理遗传缺陷并引入患者恢复肝功能。巢素阳性干

细胞可以在培养物中被分化也可在体内使用一个或多个生长因子或其它的处理例如使用核酸分子转染其结果是干细胞分化形成肝细胞。在一个实施例中，发明设计了使用 cyclopamine 以抑制例如 sonic hedgehog， 结果使得肝细胞形成。在本发明另一个实施例中，干细胞可不经任何体外处理移植且在患者体内使用合适的生长因子。在另一个实施例中，干细胞使用生长因子或其它试剂体外处理结果以部分分化或结果分化的状态移植进入患者。在发明的另一个方面，包括转染干细胞或祖细胞的方法，注射的剂量及途径，药物组合物，供体一同系移植物的方法及免疫抑制方法可用与反分化为肝细胞就像分化为胰脏组织一样。

5 本发明专门设计了移植进入患者的同基因移植，异基因移植或异种异基因移植干细胞或其组合。

### 干细胞转染的方法

有不同的方法基因转移进入胰脏干细胞。磷酸钙沉降 DNA 法已被使用但转化效率很低，尤其是对非粘附性细胞来讲。此外，磷酸钙沉降 DNA 法经常导致多种反复子的插入，增加了内外源 DNA 功能的损害的可能性 (Boggs, 1990)。阳离子脂类例如以脂质体的形态，同样是包装 DNA 以转染真核细胞的有效方法且几种商业阳离子脂类试剂也是可获得的。电穿孔法相比较磷酸钙沉降法提高了转化效率，其具有在基因组单一位点提供单一拷贝插入子的优势。DNA 直接微注射进入细胞核是另外一种基因转移的方法，其已经显示可提供对于短期转染来讲将近 100%的效率且对于稳定的 DNA 整合有 20%的效率。微注射有时避免了外源 DNA 通过细胞质的细胞运输的问题。该方法要求转移物体积小，其还要考虑到在每细胞中引入已知量的 DNA。获取事实上较纯的干细胞的能力将提高微注射途径用于靶定胰脏干细胞基因修饰的可行性。尽管如此，微注射也是一项沉闷的，高度专一的技术。该技术的这一特征限制了在一定时间内注射进入细胞的数量，因此其在大范围内的使用是很受限制的。是用逆转录病毒的方法将基因插入胰脏干细胞是较为理想的方法。逆转录病毒提供了一个任意的，单拷贝的单位点插入子且转染效率很高。其它的一些转染方法对于本领域技术人员来讲是已知的且被认为是在本发明的保护范围之内。

### 胰脏干细胞的逆转录病毒转化

30 胰脏细胞基因转化涉及到逆转录病毒也作“辅助病毒”(也就是说，膜缺陷型病毒基因组其携有相关外源基因但是不能形成完整的病毒颗粒)。例外的载体例如

DNA 介导的转移，腺病毒，SV40，腺病毒相关病毒，及单纯疱疹病毒载体也可被用到。当选择不同的载体用于转染时要考虑到各种因素，有时最好使用一个病毒长末端重复子或者一个强的内源引物以表达外源基因而不是简单依靠拼接的亚基因簇 RNA。

- 5 干细胞转化的两种最基本的方法是共培养或上清感染。上清感染涉及到将干细胞重复暴露于病毒上清液中。共培养涉及到干细胞及一感染的“组装细胞系”（参见下面）混合 24—48 小时，共培养一般要较上清感染对于干细胞转化来讲更为有效。共培养后，感染的干细胞进一步被培养以建立一个长期培养物 (LTC)。

- 10 含有辅助病毒的细胞系指的是包装细胞系，不同的包装细胞系也是可获得的。包装细胞系的一个重要的特点是其并不能产生复制完整的辅助病毒。

在本发明的一个实施例中从中获得干细胞的动物或患者在抽取干细胞前使用 5-fluorouracil (5-FU) 对其进行处理，相比较未处理的细胞来讲，5-FU 处理的干细胞更易于逆转录病毒的转染。然而，5-FU 干细胞很大程度地减少了克隆基因起源的数量。

- 15 在另一个实施例中，收获的干细胞暴露于不同的生长因子条件下，例如那些用于提高胰脏干细胞增殖及分化的生长因子。生长因子在转染之前，其中或之后被引入培养物以提高细胞的复制及转导。研究表明生长因子的使用提高了转化效率从 30 到 80% 不等。

## 20 典型的逆转录病毒转化方案

哺乳动物胰脏干细胞的体外转导及随后移植进入未被切除的受体以充分获得可能的移植及基因表达在含有已显示于小鼠的后裔细胞的不同组织中。靶细胞在输入受体之前在含有相关基因的合适载体的存在下培养 2—4 天。

- 25 更确切地讲，骨髓干细胞获自雄性供体(4-8 周年龄时) BALB/c AnNCr 小鼠 (National Cancer Institute, Division of Cancer Treatment Animal Program, Frederick, MD)。这些细胞被培养在一个密度为  $1-2 \times 10^7$  cells/10 cm 的平皿上且在含有 10% 热失活的牛胎血清，谷氨酸盐，Pen/Strep，100 U/ml 的白细胞介素-6 (IL-6) 及以激活细胞生长的干细胞因子(SCF; Immunex, Seattle, WA) (Schiffmann, et. al., 1995) 的 DMEM 培养基上培养 48 小时，

- 30 与此同时，培养一个病毒包装细胞系 24 小时，该包装细胞系为 Schiffmann，等所使用。其为 GP + E86 且病毒载体为基于逆转录病毒载体 LN 序列的 LG 逆转录病毒

载体。

经过一段合适的培养时间， $1-2 \times 10^7$  干细胞被培养在一个 10 cm 的含有病毒包装细胞的平皿上然后在 8 g/ml polybrene 的存在下共培养 48 小时然后在相同的生长因子刺激的环境下其作为供体干细胞。收获该干细胞，洗涤生长培养基注入受体鼠以  $2 \times 10^7$  细胞 / 注射的剂量并进行多次注射（总共 5 次以每天或每周计）。

干细胞的转导及移植的成功可通过例如 PCR 分析，免疫细胞化学染色，DNA 印迹法或蛋白质印迹法或其它本领域已知技术来进行。

### 哺乳动物

10 本发明所述的哺乳动物可以是任意哺乳动物（例如，人，小鼠，鼠，绵羊，兔子，山羊，猴子，马，东欧鼠，猪或牛）。本发明所述非人哺乳动物可以是任意非人哺乳动物包括但并不限于小鼠，鼠，绵羊，兔子，山羊，猴子，马，东欧鼠，猪或牛。

### 给予的剂量及模式

15 作为一个例子，这儿所述的需要胰脏干细胞的患者可以如下进行处理，本发明的细胞可被给予患者，最好以生物学上适宜的溶液形式或药物学上可接受的输入载体，通过摄取，注射，吸入或其它的一些方法。一个可行的方法是内向倒退注射。另外的方法是注射或取代细胞或假胰岛类似性聚集体进入肾囊中。给予的试剂量可因患者而不同，一个“治疗有效性剂量”可被确定，例如但不限于通过功能性增强的水平(例如，胰岛素产量或血浆葡萄糖水平)。

20 干细胞引入水平的监控，由该转移影响的某些基因的表达水平，和 / 或编码产品的存在及表达，同样也使得本领域技术人员选择及调整给予的剂量。一般来讲一个含有干细胞的药物组合物以  $10^5 - 10^8$ ，最好是  $10^6 - 10^7$  个细胞每公斤体重的范围以单一剂量给予患者。这些剂量可以以每天，每周，每月，每年计或者由治疗医师确定合适的剂量。本发明提供了同样可被移出患者体内的

25 细胞群体或者通过体外扩增，使用含有预期治疗基因的质粒转染，然后再重新输入患者体内。

### 药物组合物

30 本发明提供了包含如本发明所述干细胞混合有生理学上可接受载体的药物组合物。正如这儿所使用的，“生理学上适宜的载体”指的是生理学上可接受的稀释剂例如水，磷酸缓冲盐或盐及进一步包括佐剂，佐剂例如有不完整的傅氏佐剂，正磷酸铝，

氢氧化铝，以及明矾等本领域已知的物质。

本发明同样也提供了药物组合物。除了活性成分以外，这些药物组合物还包括合适的药学载体其可以被药理学上使用。

用于口服的药物组合物可使用本领域已知的适于口服的药物载体一起包装。这些载体使得药物组合物以片剂，药丸，糖衣，胶囊，液体，凝胶体，糖浆，浆液，悬浮液及其类似的形式为患者所摄取。

用于口服的试剂可通过结合活性成分与固体赋形剂，加入合适的辅助剂后，例如为了获得片剂或糖衣核心混合后选择性碾磨，处理混合细粒。相应的赋形剂可为糖类或蛋白类例如糖包括乳糖，蔗糖，甘露糖或山梨糖糖，玉米淀粉，小麦，大米，马铃薯及其他植物；维生素例如甲基纤维素，羟丙基甲基纤维素，或者羧甲基纤维素钠；以及橡胶包括阿拉伯胶及黄芪胶；以及蛋白例如凝胶及胶原质。如果需要，加入溶解剂或分解剂例如交联的乙烯聚合物 pyrrolidone，琼脂，褐藻酸，或其盐例如藻酸钠。

所提供的糖衣核心具有合适的糖衣例如浓缩的糖溶液，其也含有阿拉伯树胶，云母，聚乙烯吡咯烷酮（PVP），carbopol 凝胶，聚乙二醇，和 / 或二氧化钛漆溶液，及合适有机溶液及溶液混合物。染料或色料加入到片剂中或糖衣上用于产品识别或表明活性成分的数量例如剂量。

可被用于口服的药物制剂包括由凝胶制成的推入契合胶囊以及软的由凝胶制成的封闭胶囊一样以及衣被甘油或山梨糖醇。推入契合胶囊包括混有诸如乳糖或淀粉的填充剂，诸如云母或硬脂酸镁的润滑剂以及可选择性的稳定剂的活性成分。在软的胶囊中，活性化合物可被溶解或悬浮在合适的液体中例如油脂，液体石蜡或液体聚乙二醇有或无稳定剂。

肠胃外投药的试剂包括活性成分的液体溶液。对于注射，本发明的药物组合物可以溶液形式，最好在生理学上适宜的缓冲剂例如 Hank's 溶液，Ringer'溶液，或生理缓冲盐的存在下制成。液体注射悬浮液可以包括可提高悬浮液粘度的物质例如羧甲基钠纤维素，山梨糖，或右旋糖酐。此外，活性溶剂或载体的悬浮液包括油脂例如香油，或合成的脂肪酸酯例如乙基油酸盐或甘油三酸酯，或脂质体。可选择地，该悬浮液也包括适宜的稳定剂或可以提高化合物溶解度以形成高浓度溶液的化合物。

对于鼻给药形式，适于特定屏障的渗透剂在制药时考虑使用，该渗透剂对于本领域技术人员来说均为已知。

本发明的药物组合物可以本领域已知技术生产例如通过传统的混合，溶解，粒化，



糖衣制备, 悬浮, 乳化, 形成胶囊, 包载及冻干途径。

药物组合物可以盐的形式提供也可以许多酸的形式形成, 包括但不限于盐酸, 硫酸, 醋酸, 乳酸, 酒石酸, 苹果酸, 琥珀酸等等。适宜在液体情况下更易溶解的盐及其他的质子溶剂其也具有相应自由的碱基。在另外的情况下, 首选的试剂也可以是一冻干的干粉其在 1mM-50 mM 组氨酸, 0.1%-2% 蔗糖, 2%-7% 甘露醇在 PH 值 4.5 至 5.5 其在使用前使用缓冲液混合。

在含有本发明化合物的药物组合物以一合适载体形成完成时, 其可放置于合适的容器标签上给药的条件包括数量, 频率及途径。

上述基本描述了本发明, 其通过下述实施例可以更好地完整理解, 其在这里仅仅是证明本发明而不是限制本发明的范围。

### **实施例 1 从鼠胰脏中分离巢素阳性干细胞**

鼠胰岛分离自 2-3 个月的老的 Sprague-Dawley 鼠使用如 Lacy 及 Kostianovsky 所述的胶原酶溶解的方法。人体胰岛由糖尿病研究所, 迈阿密, FL 提供使用胶原酶溶解法获得。胰岛在 37°C 下在 12 孔平板培养 96 小时 (Falcon 3043 plates, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) 在该平板上涂覆有伴刀豆球蛋白 A。培养基为 RPMI 1640 补充有 10% 牛胎血清, 1mM 丙酮酸钠, 10mM HEPES 缓冲液, 100  $\mu$ g/ml 链霉素, 100 units/ml 青霉素, 0.25  $\mu$ g/ml 两性霉素 B (GIBCO BRL, Life Science Technology, Gaithersburg, MD), 及 71.5 mM  $\beta$  巯基乙醇 (Sigma, St. Louis, MO)。

96 小时后, 纤维原细胞及其他非胰岛细胞粘附在伴刀豆球蛋白 A 涂覆的培养孔表面上而胰岛在漂浮 (并未附在表面)。这时, 含有胰岛的培养基被移走, 离心分离, 将纯化的胰岛重新种植在没有伴刀豆球蛋白 A 涂覆的 12 孔平板上。胰岛然后在上述 RPMI 1640 培养基补充有 20 ng/ml 碱性纤维原细胞生长因子-2 及 20 ng/ml 上皮生长因子下培养。

粘附在平板表面的胰岛及长出且离开胰岛的细胞在一个单层。这些形成单层的细胞使用麻州普通医院的 Dr. Mario Vallejo 所创立的兔抗鼠巢素抗血清免疫染色为巢素阳性。另外的巢素抗体也可能被用到, 例如这儿所述的 R. 401 抗体, 或 MAB533 抗体。特异于鼠胚胎脊髓巢素的单抗, MAB353, ATCC No. 1023889; 描述于神经系统科学杂志 1996; 16: 1901-100; 其同样可获自 Chemicon International, Single Oak Dr., Temecula, CA 92590 USA。培养后两周, 几个 (3-5) 巢素阳性单层细

胞通过毛细管采摘移出(cylinder cloning)且在 12 孔平板上重新种植(其上不再涂覆有伴刀豆球蛋白 A)且培养在 RPMI 1640 培养基进一步补充有 bFGF-2 及 EGF。细胞以很快的速度进行增殖且培养后六天覆盖平板。培养后 12 天细胞单层形成波动其中其开始以 co-linear 型式叠加。培养第 15 天, 细胞波开始浓缩, 移入球形体后在第 17 天形成含有球形体的孔表面 (ca.直径为 100  $\mu\text{m}$ ), 中空, 一部分保留有单层细胞, 重新挑选几个这样的单层细胞且重新克隆, 然后上述途径在相同的时间段再次进行。

### 实施例 2 胰腺干细胞分化形成胰岛

鼠胰岛首先在含有 10%的牛胎血清的 RPMI 培养基上在伴刀豆球蛋白 A 包覆的 12 孔平板上培养, 胰岛在除了牛胎血清外未加入培养因子的情况下培养三天。经过这个期间, 其中胰岛并未粘附, 胰岛被转移至不含伴刀豆球蛋白 A 的新的平板。

干细胞然后通过暴露其于 bFGF-2 (20 ng/ml)及 EGF (20 ng/ml)24 天被刺激从干细胞中增殖形成单层。24 天以后, 单层达到丰度其中围绕着胰岛的是一群细胞, 这些细胞被挑选然后被亚克隆进入新的 12 孔平板并再次在含有 bFGF 及 EGF 的培养基中培养。

亚克隆快速以无性繁殖的形式增殖进入单层, 并从中心向外延扩增。细胞在第 6 天达到丰度并在第 12 天重叠细胞波。在第 17 天细胞几乎被全部移植进入球形结构体及关系型结构体等胰岛类似结构(假胰岛类似聚集体)及管状类似结构(假导管) (图 4)。RT-PCR 分析表明假胰岛类似聚集体表达 NCAM (内分泌细胞的一个标记, 参见图 5), 细胞角蛋白 19 (导管细胞的一个标记, 参见图 5), 以及转录因子 brain-4 (一个贝塔细胞标记)。使用生长因子处理以实现其最终分化成为成熟胰岛细胞的目的。

### 实施例 3 人或鼠胰岛的分离及培养

分离及培养人类胰岛, 人类胰岛组织获自细胞移植中心, 糖尿病研究所, 迈阿密大学医学院哈佛医学院, Boston, MA 的用于胰岛移植的青少年糖尿病基金的胰岛分配程序, 手工挑选彻底洗涤的胰岛, 在修饰的 RPMI 1640 培养基(11.1 mM 葡萄糖)补充有 10%牛胎血清, 10 mM HEPES 缓冲液的, 1 mM 丙酮酸钠, 100 U 每 mL 青霉素 G 钠盐, 100  $\mu\text{g}$  / mL 链霉素硫酸盐, 0.25 ng / mL 两性霉素 B, 及 71.5  $\mu\text{M}$   $\beta$  巯基乙醇, 及加入鹰 3043 且包覆有伴刀豆球蛋白 A(ConA)的 12 孔组织培养平板。胰岛在 37°C 下在有 5% 空气及 5% CO<sub>2</sub> 下培养 96 小时。在这种条件下, 更多的胰岛依然保留在悬浮液中(漂浮), 而纤维原细胞及其他的非胰岛细胞黏附在培

培养基上, 培养后 96 小时, 含有悬浮胰岛的培养基被小心移出, 手工挑选胰岛然后在修饰的 RPMI1640 补充有 20 ng/mL 碱性纤维原细胞生长因子(bFGF)及上皮生长因子(EGF)中重悬浮。胰岛悬浮液(包含有 20-30 个胰岛的平板)被加入到 12 孔并不附有 ConA 的组织培养平板上, 胰岛快速黏附在平板表面。

- 5        在几天内, 发现细胞单层从胰岛中长出。在有些情况下, 人源细胞被培养在含有 2.5 mM 葡萄糖及几种包括 activin-A (2 nM), 肝细胞生长因子(100 pM), 或 betacellulin (500 pM)的生长因子的组合的修饰的 RPMI 培养基中培养。这些实验中细胞使用 10 mM 烟碱处理, 培养基不含有血清及生长因子。

#### 10        实施例 4 葡萄糖及 GLP-1 对胰腺干细胞分化的影响。

可使胰岛尺寸增加的血浆葡萄糖浓度的评估。培养基中葡萄糖的浓度使用含有巢素阳性干细胞的分离的胰岛来调查。鼠胰岛被培养在含有高葡萄糖浓度(16.7 mM) 的培养基或正常的 (5.6 mM) 葡萄糖浓度中。四天后, 使用 RT-PCR 确定巢素 mRNA 的水平。结果表明与正常葡萄糖浓度培养的胰岛相比高浓度葡萄糖浓度培养下的胰岛巢素 mRNA 的水平提高了 3 倍 (图 6)。

类似的, 注入 glucagon 类似的多肽-1 (GLP-1) 进入小鼠发现 48 小时后胰岛数提高了 2 倍。具有编码 GLP-1 受体的分裂的基因的晕的小鼠再次检查其胰岛巢素的表达。

#### 糖尿病动物模型

- 20        给予结果是其症状的减少的糖尿病类型的治疗在一个其可展示糖尿病症状的动物中进行测试。所设计的进行试剂或方法测试的动物有益于人体的糖尿病的治疗。糖尿病的潜在治疗首先在动物模型中测试并观察其效果并比较其与未处理的对照组的区别。

- 25        非肥胖的糖尿病(NOD)小鼠对于 I 型糖尿病或胰岛素依赖的糖尿病来说是重要的 (参见 Kikutano and Makino, 1992, Adv.Immunol. 52: 285 and references cited therein, herein incorporated by reference)。在 NOD 小鼠中 I 型糖尿病的发展不需要外界的任何刺激可以自然发生也可突然发生, 当 NOD 小鼠发展糖尿病时, 其遭到  $\beta$  细胞的程序性破坏其由慢性自身免疫性疾病所致。在 NOD 小鼠中胰岛素依赖型的糖尿病的发展可以被大概分为两个阶段: 自身免疫刺激的诱发 (胰岛中淋巴细胞感染) 及胰岛破坏的加速并爆发糖尿病。糖尿病 NOD 小鼠以 euglycemia 开始其生命, 或正常的血液葡萄糖水平, 但是在大约过了 15 至 16 周时 NOD 小鼠开始变成 hyperglycemic, 表明
- 30

其大部分胰腺  $\beta$  细胞的破坏且胰腺丧失产生足够量的胰岛素的能力。除了胰岛素缺乏及多糖症外，糖尿病 NOD 小鼠也要遭受严重的糖尿，polydipsia，及多尿症，伴随有体重的快速减少。这样，该疾病的发生及进程非常相似于遭受胰岛素依赖型的糖尿病的人体患者。自然康复很少发生于 NOD 小鼠上，且这些糖尿病动物在糖尿病发生后 1—2 个月如果不接受胰岛素治疗的话均死去。

NOD 小鼠被用作动物模型以测试按照本发明给予干细胞治疗糖尿病的不同方法的有效性。同样地，通过给予干细胞治疗在 NOD 小鼠中也进行测试以验证其对 I 型糖尿病的有效性。

干细胞被给予一个 NOD 小鼠，一般是通过腹腔进行，按照下述的剂量。NOD 小鼠被给予大约每个小鼠  $1 \times 10^1$  至  $1 \times 10^4$  个细胞每小鼠。在 NOD 小鼠中在大约 4 周给予小鼠，然后从 8 至 10 周，每周 3 次。用于检测糖尿病的小鼠在大约 13 周时开始，按照下述方法一周两次。治疗效果可比较处理及未处理的 NOD 小鼠得出。

在 NOD 的小鼠中对糖尿病的治疗效果可通过分析 NOD 小鼠中糖尿病进行其使用本领域已知技术，例如，检查 NOD 小鼠是否多渴，多尿，糖尿，多糖症及胰岛素缺乏症或者体重减少。例如，葡萄糖尿的水平（糖尿）可通过 Testape (Eli Lilly, Indianapolis, IN.) 进行检测且血浆葡萄糖水平使用如 Burkly, 1999, U. S. Patent 5, 888, 507, 这儿被引用作为参考等所述的 Glucometer 3 血糖仪 (Miles, Inc., Elkhart, IN.)。通过这些方法检测尿糖及血糖水平，NOD 小鼠被认为是糖尿病患者在经过两个连续的尿阳性测试使用 Testape 值+1 或更高或血浆葡萄糖水平 > 250 mg/dL (Burkly, 1999, supra)。在 NOD 小鼠中另外的检测糖尿病的方法在 NOD 小鼠中检测胰岛素水平，例如胰岛素水平可由免疫测定且在处理及对照组比较后确定 (Yoon, U. S. Patent 5, 470, 873, herein incorporated by reference)。在这种情况下，从鼠胰脏中抽取的胰岛素及其浓度可由免疫活性例如放射性免疫测定来进行确定，使用鼠胰岛素作为一个标准。

除了一般使用 NOD 小鼠检测糖尿病外，治疗方法效果如果干细胞被使用外源基因转化或转染通过基因特异性或基因产品特异性来进行检测，因此，考虑到在外源基因表达及其对糖尿病的效果之间有一定的关联。例如，外源基因产品的存在可以通过产生基因产品及胰岛素的 NOD 小鼠胰脏  $\beta$  细胞的胰岛的免疫组织化学而确定。通过检测 RNA 转录补丁或平滑受体在 NOD 小鼠中进一步测定补丁及平滑基因的表达。反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增是通过已知技术扩增一个鼠补丁或平滑 cDNA 片段来进行的，且按照标准技术进行琼脂糖凝胶电泳。扩增 cDNA 片段的鉴

别通过杂交扩增片段与用于补丁或者平滑基因的荧光标记的内寡聚核苷酸探针,或者通过本领域已知的其它技术进行。

#### **实施例 5 巢素阳性的人或鼠胰腺干细胞的免疫细胞化学鉴别**

- 5 通过分析巢素的表达来分析胰岛。胰岛及干细胞如上进行分离。巢素的表达通过在胚胎第 16 天 (E16) 鼠胰腺中 (图 8A) 及在成人胰腺胰岛中 (出生后 60 天) (图 8B) 发育的胰岛群中明显的免疫细胞化学染色来观察。免疫细胞化学染色如下进行。
- 取自胚胎第 16 天及成人 (60 天) 的鼠胰腺 Cryosections (6 M) 与细胞一样使用 4% 多聚甲醛磷酸溶液固定。
- 10 细胞首先使用 3 % 正常的猴血清在室温下处理 30 分钟且在 4℃ 下使用第一抗体过夜培养。抗血清使用 PBS 洗涤且分别使用 Cy-3 及 Cy-2 标记的第二抗体在室温下培养一小时。再使用 PBS 洗涤斜面 PBS 且使用荧光封固剂 (Kirkegaard and Perry Labs, Gaithersburg, MD) 重新覆盖斜面。组织部分在 4℃ 下使用第一抗体过夜培养。第一抗血清使用 PBS 洗涤, 且斜面使用 3 % 正常猴血清在室温下培养 10 分钟在其使用
- 15 猴抗 Cy3 (indocarbocyanine) 及抗豚鼠猪 (胰岛素), 抗鼠 (高血糖素), 或抗绵羊 (生长激素抑制素) sera DTAF (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA) 在室温下培养 30 分钟。斜面然后再使用 PBS 洗涤并使用荧光封固剂 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) 重新覆盖。使用装有界面上有一个 PowerMac 7100 装有 IP 实验光谱分析软件 (Signal Analytics Corp, Vienna, VA) 的光学
- 20 TEC-470 CCD 照相机 (Optronics Engineering, Goleta, CA) 的 Zeiss Epifluorescence 显微镜获取荧光图片。

- 巢素阳性细胞区别于  $\beta$ -,  $\alpha$ -,  $\delta$ -, 及 PP 细胞因为其并不与抗荷尔蒙胰岛素, 高血糖素, 生长激素抑制素, 或者胰腺多肽的抗血清共染色- (图 8A & B)。巢素阳性细胞同样也并不与抗胶原质 IV, 动脉 内皮细胞标记 (图 8C) 的抗血清共染色, 也
- 25 不与抗 galanin, 神经细胞的一个标记或者细胞角蛋白 19 也即导管细胞的一个单抗 (图 8) 的一个单抗共染色。巢素阳性染色与核共染色所清楚观察到的胰岛的截然不同细胞相关 (图 4D)。

#### **实施例 6 通过 RT-PCR 鉴别巢素阳性人及鼠干细胞**

- 30 为了证实胰岛中巢素表达的免疫细胞化学鉴别, 我们使用准备自新的分离鼠胰岛及人类胰岛组织的总的 RNA 进行的巢素 mRNA 的 RT-PCR。按照下述方法进行

## RT-PCR:

取自鼠及人胰岛的总的细胞 RNA 被反转录且通过 PCR 扩增 35 个循环如前所述 (Daniel 等., 1998, Endocrinology, 139: 3721-3729)。用作 PCR 的引物或扩增引物以及随后 DNA 印迹杂交的探针的寡聚核苷酸如下:

- 5        鼠巢素: 正向, 5'gcgggcggtgcgtgactac3' ;  
               反向, 5'aggcaaggggaagagaaggatgt3' ;  
               杂交, 5'aagctgaagccgaatttccttgggataccagagga3'。
- 鼠角蛋白 19: 正向, 5'acagccagtacttcaagacc3' ;  
                       反向, 5'ctgtgtcagcacgcacgtta3' ;  
 10        杂交, 5'tggattccacaccaggcattgacatgcc3'。
- 鼠 NCAM : 正向 5'cagcgttgagagtgccaaat3' ;  
                       反向 5'ttaactcctgtggggttg3' ;  
                       杂交, 5'aaaccagcagcggatctcagtggtgtggaacgatgat3'。
- 鼠 IDX-1 正向, 5'atcactggagcagggaagt3'  
 15        反向, 5'gctactacgtttcttatct3'  
               杂交, 5'gcgtggaaaagccagtggg3'
- 人类巢素: 正向, 5'agagggaattccttgag3' ;  
                       反向, 5'ctgaggaccaggactctcta3' ;  
                       杂交, 5'tatgaacgggctggagcagctcaggaaagt3'。
- 20        人类角蛋白 正向, 5'cttttcgcgcgccagcatt3' ;  
                       反向, 5'gatcttcctgtccctcgagc3' ;  
                       杂交, 5'aaccatgaggaggaaatcagtagctgagg3'。
- 人类高血糖素: 正向, 5'atctggactccaggcgtgcc3' ;  
                               反向, 5'agcaatgaattccttggcag3' ;  
 25        杂交, 5'cacgatgaattgagagacatgctgaagg3'。

选自两个不同外显子的引物包含至少一个内含子序列。此外, 一个 RT 负的对照也有很多例子。PCR 循环在 94℃下 1 分钟然后再在 94℃下 10 秒, 58/56℃下 10 秒, 72℃下 1 分钟, 35 个循环且在 72℃下 2 分钟。退火温度为 58℃对于鼠巢素来讲且在 56℃下对其它的引物碱基。

- 30        对于 DNA 杂交寡聚核苷酸探针使用荧光标记的 T4 多聚核苷酸激酶及  $\gamma$ -32P ATP。荧光标记探针杂交于 PCR 产品其转移到尼龙膜上在 37℃下 1 小时, 然后使用

1 x SSC + 0.5% SDS 在 55℃ 下洗涤 10-20 分钟或在 0.5 x SSC + 0.5% SDS 在 42℃ 下洗涤对于人类 PCR 产品来讲。

合适预期尺寸的 RT-PCR 产生的产品(图 8E, 上面板)且通过 DNA 印迹法证实(图 8E, 较低面板)且通过产品的 DNA 测序。这些数据证明表达巢素的且可能代表胰岛多功能性干细胞其相似于中枢神经系统的巢素阳性干细胞的胰岛中新的细胞类型的鉴别。

### **实施例 7 ATP 依赖转运体 ABCG2 在胰岛衍生的巢素阳性细胞中被表达**

人胰岛衍生的 NIPs 含有大量的 SP 亚族细胞, 它们共同表达 ABCG2、MDR1 和巢素。巢素是第一个被证明的神经和肌肉干/祖细胞的标记物 (Lendahl 等, 1990 年, Cell 60: 585; Zimmerman 等, 1994 年, Neuron 12: 11)。神经干细胞特别显示一种高度可塑性, 可生成神经细胞和不同类型的神经胶质细胞。神经干细胞/祖细胞也分化成造血细胞, 这使它们成为真正的多能干细胞 (Shih 等, 2001 年, Blood 98: 2412)。到目前为止, 多能成年干细胞的最好例子是那些从骨髓衍生的细胞, 即所谓的边族 (SP) 细胞 (Goodell 等, 1996 年, J. Exp. Med. 183: 1797)。SP 细胞能有效地排除荧光活体染料 Hoechst33342 且包含大多的骨髓族群补充细胞, SP 因此特点而被鉴别。SP 细胞占成年人和鼠的整个骨髓的 0.05%, 除了生成所有的造血细胞家族外, 它们也可以生成骨骼和心肌以及内皮细胞 (Gussoni 等, 1999 年, Nature 401: 390; Jackson 等, 2001 年, J Clin Invest, 107: 1395)。ATP-结合盒转运体 ABCG2 (BCRP1) 已被证明为 SP 表型的主要组分, 因此提供了一种特异鉴别 SP 细胞的分子方法 (Kim 等, 2002 年, Clin. Cancer Res. 8: 22; Schareberg 等, Blood 99: 507; Zhou 等, 2001, Nat Med 7: 1028)。特别要注意的是, 骨髓衍生的 SP 细胞具有有限的——如果有的话——体外增殖能力 (Bunting 等, 2000 年 Blood 96: 902; Storms 等, 2000 年, Blood 96: 2125); 但骨髓细胞内强迫性的 P-糖蛋白泵 (MDR-1) 作用导致体外 SP 干细胞的扩充和体内细胞的重增殖 (Bunting 等, 2002 年, Stem Cell 20: 11)。

NIPs 因表达巢素而与神经细胞干细胞相关, 由于它们在相当多的 NIPs 亚族群中表达 ABCG2——通过 Hoechst33342 排除检验鉴别, 因此, NIPs 也显示骨髓 SP 干细胞的特点。NIPs 的这个边族也表达 MDR-1, 促进其在试管内不断的扩充。因此, NIPs 可能是成年多能干/祖细胞的一个潜在来源, 可用于供移植入糖尿病患者体内的胰岛组织的生产。

人体胰岛取自迈阿密大学医学院糖尿病研究所细胞移植中心 (迈阿密, 佛罗里达

州)和哈佛医学院胰岛移植青少年糖尿病(胰岛素依赖型糖尿病)研究基金中心(波士顿,马塞诸塞州)的“胰岛分配计划”。NIPs 按前所述方法分离(Zulewski 等, 2001 年, *Diabetes* 50: 521)。简单来说,精选人体胰岛,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 下,在含伴刀豆球蛋白 A (ConA) 覆盖的培养皿内培养;培养皿内含 RPMI1640 改良培养基,并附加有 10%牛胎儿血清、10mmol/lHEPES 缓冲剂、1mmol/l 丙酮酸钠、71.5 μmol/l β-巯基乙醇和抗细菌-抗真菌药(Gibco 生命技术公司,盖瑟斯堡,马里兰州)。96 个小时后,悬浮的胰岛转移至新鲜的培养基中,新的培养基进一步附加有 20ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和 20ng/ml 表皮生长因子(EGF)(均来自 Sigma 公司,圣路易斯,密苏里州),且装在一个新的无伴刀豆球蛋白 A 包衣的塑料培养皿中。岛黏附在无包衣的塑料表面,数天之内可见单层细胞生长出来并离开小岛。取自单层周边的细胞——巢素阳性胰岛衍生祖细胞(NIPs),转移至一个新的培养皿中,在以上相同条件下生长至融合。进一步把细胞分至两个培养皿,进行含或不含异搏定——Hoechst33342 转运抑制剂——的 Hoechst33342 染料排除试验(Goodell 等, 1996 年, *supra*)。

RT-PCR 证明 ABCG2 的表达(图 19A)。对 RT-PCR 产生的 DNA 物质进行测序显示,与人 ABCG2 的完全一致(586bps)(基因库编号 XM-132424 号,图 18)(没有显示数据)。与一种克隆 ABCG2 探针的 DNA 印迹杂交证实正确的 cDNA 放大(图 19A)。

使用 Trizol (Gibco),依照生产厂商的规定方法,将 RNA 从培养的 NIPs 以及精选 SP 细胞和非 SP 对照品(分别为 5000 和 10,000 个细胞)中分离出来。单股 cDNA 使用(Invitrogen 公司,卡尔斯巴德,加州)“上标首股系统”(Superscript First-Strand System)制备。cDNAs 应用多酶链反应(PCR)扩大。无逆转录酶(-RT 对照品)对照品进行所有的 PCR 反应。PCR 产品用琼脂糖凝胶电泳分析,产品的真实身份通过测序证实。使模板浓度正常化,以适合于 GAPDH (31 循环)。ABCG2、MDR1 和巢素分别以 34、38 和 36 循环扩大。引物是: GAPDH 为 5' tgaaggtcggagtcaacggatttggt 3' 和 5' catgtgggcatgaggtccaccac 3',

巢素为 5' agaggggaattcctggag 3' 和 5' ctgaggaccaggactctcta 3',

MDR1 为 5' tcctggagcgggttctacgac 3' 和 5' gggcttcttgacaaccttttca 3',

ABCG2 为 5' gctgggggttctcttcttctgacg 3' 和 5' ctaccccagccagtgtcaac 3'。

ABCG2 的 PCR 产品被转移至尼龙膜中(Hybond N+; Amersham Pharmacia, little Chalfont, 英国)。印迹使用快速杂交缓冲剂(Rapid Hyb Buffer)(Amersham),依据生产厂商规定方法,与放射标记、克隆 ABCG2 或 MDR1 探针杂交。人 ABCG2 全开放读



取框的引物是 5' `tattaagctgaaaagataaaaactctcc` 3' 和 5' `atgtgaggataaatcataactgaat3'` (基因库序列 XM-032424 碱基对 174-202 和 2184-2207)。

#### 5 实施例 8 在 Hoechst33342 染料排除试验中, 1.5 到 2% 的培养细胞有一种边族表型

NIPs 因表达巢素而与神经细胞干细胞相关, 由于它们在相当多的 NIPs 亚族群中表达 ABCG2——通过 Hoechst33342 排除检验鉴别, 因此, NIPs 也显示骨髓 SP 干细胞的特点。NIPs 的这个边族也表达 MDR-1, 促使其在试管内的不断扩充。

10 为研究是否 ABCG2 的表达导致一些培养的 NIPs 产生边族 (SP) 表型, 依照已公开发表的方法 (Goodell 等, 1996 年, *supra*), 稍加改进后, 进行 Hoechst33342 染料排除检验。Hoechst33342 染料的排除确定造血干细胞的多能边族 (SP), 它由 ATP 结合盒转运体 ABCG2 介导。维拉帕米 (异搏定) 被用作的 H33342 转运的一种特异抑制剂 (Goodell 等, 1996 年, *supra*)。

15 Hoechst 染料排除试验依照 Goodell 等 1996 年 *supra* 上发表的方法稍加改进, 即当细胞仍黏附在培养皿上时就着色。这种变化使细胞的活性比最初的方法——细胞在悬浮液时着色, 明显较高。将 Hoeschst33342 (Sigma) 加到生长介质中, 使其最后浓度为 5  $\mu$ g/ml, 细胞在 37°C 下培养 90 分钟。在试验开始前 15 分钟, 只要显示需要, 就加入维拉帕米 (Sigma), 直至其最后浓度为 50  $\mu$ mol/l。为分析, 细胞被胰蛋白酶化, 用 40  $\mu$ m 细胞滤器滤过, 将其悬浮在含碘化丙啶 (Sigma) 最后浓度为 2/ml (用于分辨死亡细胞) 的冰冻 Hanks 平衡盐溶液中。使用紫外激光激活 Hoechst33342 和碘化丙啶, 在 Vantage 仪和一台 Moflow 细胞分类器上进行流式细胞计数。在家族模式 (linear mode) 分析中使用 450/20BP (蓝) 和 630/20 (红) 过滤器。

25 荧光激活细胞分类 (FACS) 显示一种清晰可见的边族 (图 19B; 2.1% 门控细胞), 而在抑制剂维拉帕米存在时消失 (图 19C; 0.1% 门控细胞)。在两个独立衍生的 NIP 培养物分析中, SP 阳性细胞的百分比率分别为百分之 1.5 和 2 (数据没有显示)。我们还从 NIPs 扩大了 ABCG2 的全展开阅读框。克隆入表达载体和转染入 INS-1 胰岛瘤细胞导致在转染细胞中 Hoechst33342 的有效排除 (数据未显示)。

#### 30 实施例 9 SP 表型与 ABCG2、MDR1 和巢素的表达相关

SP 细胞和非 SP 对照细胞通过 FACS 被从培养 NIPs 中分离 (图 20A; 分别为门

R1 和 R2)。ABCG2 的表达与 SP 表型紧密相关, 如通过 RT-PCR (图 20B) 以及与一个克隆 ABCG2 探针的 DNA 印迹杂交显示的一样。RT-PCR 和 DNA 印迹杂交显示 MDR1 的表达 (P-糖蛋白), 另一个出现在培养 NIPs 的 SP 部分造血干细胞中的 ATP-结合盒转运体 (Chaudhary 等, 1991 年, Cell 66: 85)。SP 部分也以比非 SP 对照显著较高的水平表达巢素 (图 20B)。

从人胰岛衍生的巢素阳性细胞含有 1.5 到 2% 的 SP 细胞, 与非 SP 对照细胞相比, 这些细胞以较高的水平表达 ABCG2 和巢素。ABCG2 表达和 SP 表型的关系证实了这个发现, 即 ABCG2 的活性是 SP 染料泵出 (dye efflux) 的主要原因 (Kim 等, *supra*; Scharenberg 等, *supra*; Zhou 等, *supra*)。巢素和 ABCG2 的共同表达指明, 巢素作为一种干/祖细胞通用标记物的更广阔的作用。

在不同的哺乳动物种类包括人类的骨髓的 SP 细胞部分, 包含极大多数的多能造血干细胞 (HSCs) (Goodell 等, 1997 年, *supra*)。骨髓衍生 SP 细胞的分化并不仅限于血液家族; 在动物模型中, SP 细胞也分化成骨骼、心肌以及内皮细胞 (Gussoni 等, Nature, 401: 390; Jackson 等 2001 年, J Clin Invest, 107: 1375)。此外, 骨髓衍生的干细胞分化成功能性脑和肝细胞 (Brazelton 等, 2000 年, Science 290: 1775; Lagasse 等, 2000 年, Nat Med 6: 1229)。

NIP 培养物中的 SP 细胞组分 (1.5 至 2%) 至少比骨髓中 (0.05%) 发现的多 20 倍 (Goodell 等, 1996 年, *supra*)。然而, 相当百分比率的 SP 细胞在肌肉卫星细胞中被发现, 而肌肉卫星细胞一般认为是生肌祖 (Jackson 等, 1999 年, Proc Natl Acad Sci, 96: 14482)。除产生分化肌纤维外, SP 细胞已证明能重建致死辐射小鼠的骨髓, 显示了一种未曾预料的可塑程度 (Gussoni 等, 1999 年, *supra*)。一些证据表明, 这些 SP 细胞在肌肉定居前也来自骨髓 (Kawada 等, 2001 年, Blood 98: 2008)。一种 SP 族在鼠胚胎干细胞也被证实 (Zhou 等, 2001 年, *supra*)。在 ABCG2 神经干细胞上的表达已证明, 比在更加分化的神经细胞显著较高 (Geschwind 等, 2001 年, Neuron 29: 325)。

MDR1 (P-糖蛋白, ABCG1) 是另一个在造血干细胞 (包括其他数个细胞类型) 上表达的 ATP 结合盒转运体 (Zhou 等 2001 年, *supra*; Chaudhary 等, 1991 年, *supra*)。MDR1 在骨髓细胞的过度表达导致 SP 组群的扩大以及在培养基中延长生存和移植入小鼠体内后较高的族群重建活性 (Bunting 等, 2000 年, *supra*)。在一些移植动物中, 它最终导致一种骨髓增生综合征, 类似于慢性骨髓性白血病 (Bunting 等, 1998 年, Blood 92: 2269)。因此, MDR-1 表达与造血干细胞的扩充紧密相关, 并被认为是增

殖干细胞的一种特点,与只表达 ABCG2 的休眠细胞(quietescent cells)形成对照(Bunting 等, 2002 年, supra)。MDR1 被在衍生 NIPs 的胰岛的 SP 组分中表达。

### **实施例 10 GLP-1R 阳性人胰岛干细胞的免疫化学鉴别**

- 5 对巢素阳性胰岛干细胞进行 GLP-1R 表达分析。人胰岛组织从哈佛医学院“胰岛移植青少年糖尿病研究中心”获取。NIPs 如前述描述方法分离 (Zulewski 等, 2001 年, Diabetes 50: 521)。简单来说,胰岛在包含血清、11.1mM 葡萄糖、抗生素、丙酮酸钠、 $\beta$ -巯基乙醇和生长因子的 RPMI1640 培养基中清洗和培养。几天内,巢素阳性细胞(按以上描述方法免疫化学鉴别)从胰岛中生长出来。然后这些细胞在含
- 10 20ng/ml 碱性成纤维生长因子和表皮生长因子或 1000 单位重组人白血病抑制因子的培养基中被克隆和增殖。进行在不含血清情况下的与 GLP-1 共同培养,且在不使培养基改变的情况下,每 48 小时加入新鲜肽。

- 如下所示,使用兔多克隆抗血清进行 GLP-1R 的免疫化学检测(Heller 等, supra)。在 Lab-Tek 室载玻片(chamber slides)(Nunc Naperville 公司,伊利诺斯州)或格栅
- 15 盖玻片上培养的细胞,在 PBS 中用 4%的多聚甲醛室温下固定 10 分钟。在 PBS 中清洗数次后,细胞用正常驴血清阻滞 30 分钟,然后在 4℃下与第一个抗血清或免疫前血清培养。第二天,细胞用 PBS 清洗,并在室温下与标签为 Cy-3 或 Cy-2 的第二个抗血清(驴抗兔和驴抗豚鼠血清)培养一小时。几次清洗后,含细胞的盖玻片在含 DAPI(可将细胞核染色)封固剂(Vector 实验室公司,伯明翰,加州)中被装载在
- 20 载玻片上。应用装有一台与 Powermac7100 互相配合的 Optronics TEC-470 CCD 照相机(Optronics 工程公司,戈拉塔,加州)的 Zeiss 周围荧光显微镜获取荧光成像。使用实验室 IP 光谱软件(Signal 分析公司,维也纳,佛吉尼亚州)获取和分析成像。

在大多数被检的 NIPs (至少 60%) 中检测到 GLP-1R 免疫活性(图 22A)

### **实施例 11 用 RT-PCR 鉴别 GLP-1R 阳性人干细胞**

- 为证实在胰岛(NIPs)中 GLP-1R 表达的免疫细胞化学特征,使用从 NIPs 制备的全 RNA 进行 RT-PCR。RT-PCR 按上述实施例 6 描述的方法进行,为了鉴别巢素 mRNA 的区别,以下特别的引物被应用: 5' gtgtggcggccaattactac3' (顺); 5' cttggcaagtctgcatttga3' (逆)。NIP mRNA 的扩增产生期望的 346bp 产物(图 22B)表
- 30 明,除表达 GLP-1R 蛋白质外, NIPs 具有生成 GLP-1R 的生物合成能力。因此,除巢素外, GLP-1R 在当前发明中是一个有用的胰腺干细胞标记物。

### 实施例 12 巢素阳性干细胞在试管中的增殖

巢素阳性干细胞在试管中的增殖能力被确定。

取自于 60 日龄鼠或健康成年人的胰岛，首先铺放在伴刀豆球蛋白 A 包衣的培养皿中，在含 10%牛胎儿血清的改良的 RPMI1640 培养基中培养四天，以清除黏附在 ConA 盘上的胰岛样本中的成纤维细胞和其它非胰岛细胞。在此培养条件下不粘附在盘上的胰岛被收集，并转移至 12 井盘（12-well plates）（无 ConA 包衣）中，井盘包含同样的改良 RPMI1640 培养基，但此外还加有 bFGF 和 EGF（每样 20ng/mL）。之所以选择一同加入生长因子 bFGF 和 EGF，是因为它们能刺激来自脑室管膜的神经干细胞的增殖（Reynolds 和 Weiss, 1996 年, Dev. Bio., 175: 1-13）。胰岛粘附在盘上，且细胞慢慢地从岛中以单层的形式生长出来（对人体细胞，估计增殖一倍的时间为 40-45 小时）。生长出来的细胞单层在表型上同源（图 9A，板 1）并表达巢素（图 9A，板 2）。鼠细胞从这些单层细胞中挑选（每批至少 20-30 个细胞），亚克隆至 12 井盘中，在含 bFGF 和 EGF 的改良 RPMI1640 培养基（11.1mM 葡萄糖）中培养。亚克隆细胞以细胞倍增时间估计为 12-15 个小时（图 9A，板 3）的速度快速生长，六天内融合，到 12 天形成波状的结构。15-17 天培养后，细胞形成岛样的簇（ILCs）（图 9A，板 4）。相似的细胞从人体胰岛中克隆（图 9B）。在接近融合时（图 9B，板 1），人细胞移植在盘中形成大的空泡性结构（图 9B，板 2 和板 3）。然后大空泡衬里细胞改变形态，变圆、集结形成三维 ILCs（图 9B，板 4-6）。

形成 ILCs 的这些巢素阳性胰岛祖细胞（NIPs）的分化指示物，被 RT-PCR 和 DNA 印迹所鉴别，并由此发现它们表达内分泌标记物 NCAM（神经细胞黏附分子）（Cirulli 等，1994 年, J. Cell Sci. 107: 1429-36）（图 9C，右板）和导管细胞标记物 CK19（细胞角蛋白 19）（Bouwens 等，1998 年, J. Pathol. , 184: 234-9; Bouwens 等，1995 年, J. Histochem. Cytochem. 43: 245-53; Bouwens 等，1994 年, Diabetes , 43: 1279-93）（图 C，左板）。在这个研究阶段可得出的结论是，当 NIPs 变成融合和集结形成胰岛样的细胞簇时，它们开始表达胰腺基因（NCAM 和 CK19）；但胰岛基因表达有限，因为缺乏分化成内分泌细胞的必需生长因子。而且还发现，一种祖细胞组族的分化一般首先需要一种增殖阶段，而后是在分化特异成胰岛素生长因子存在下的增殖休眠。因此，在一些情况下，通过用含较少诱导增殖的低葡萄糖（2.5mM）以及含 HGF/分布因子或 betacellulin 和苯丙酸诺龙 A 的培养基，代替含诱导细胞增殖的 11.1mM 葡萄糖以及含 bFGF 和 EGF 的培养基，改进培养基的条件。葡萄糖是一种已知的胰岛  $\beta$

细胞增殖因子 (Swenne, 1992 年, *Diabetologia*, 35: 193-201; Bonner-Weir, 1989 年, *Diabetes*, 38: 49-53), HGF/分布因子和苯丙酸诺龙 A 已被证明将胰腺导管细胞家族 AR42J 分化成一种分泌胰岛素、高血糖素和其他胰内分泌细胞蛋白质的内分泌表型 (Mashima 等, 1996 年, *Endocrinology*, 137: 3969-76; Mashima 等, 1996 年, *J.Clini.Invest*, 97: 1647-54)。

含 ILCs 的培养物通过免疫细胞化学 (图 10A, 上板)、RT-PCR 和 DNA 印迹 (图 10B), 以及通过免疫印迹 (图 10C) 表达胰腺特异同源结构区蛋白质 IDX-1。ILCs 也表达 mRNA 编码的高血糖素原如通过 RT-PCR 发现的一样 (图 10D), 且合成免疫活性高血糖素、高血糖素样肽-1 和胰岛素。放射免疫测定法培养物——在数个井中对岛样簇培养 72-96 小时后获取, 得到的数值是 40-80pg/ml GLP-1、30-70pg/ml 高血糖素、29-44pg/ml 胰岛素。放射免疫测定法按以下方法测量。

胰岛素和高血糖素在培养基中的浓度由紫外敏感放射免疫测定法工具包确定, 工具包分别采自林肯研究公司和 DPC 公司。用在各自工具包中的抗血清分别是豚鼠抗人胰岛素和兔抗人高血糖素。GLP-1 分泌用抗人 GLP-1 (7-36) 酰胺兔多克隆抗血清 (用一种合成肽 CFIWLKGR 酰胺共轭透孔螺血蓝蛋白免疫接种兔获取) 测量。这种抗血清对检测 GLP-1 (7-36) 酰胺高度特异, 而对检测高血糖原不太敏感。这些检测的敏感水平分别是 6pg/ml、13pg/ml 和 10.2pg/ml。

如 Ramiya 等描述的那样 (Ramiya 等, 200 年, *Nat Med*, 6: 278-282), ILCs 在 10mM 尼克酰胺中培养 7 天, 胰岛素分泌增加 2 到 3 倍。

数个另外的胰腺标记物在分化的 NIPs 中表达, 如葡萄糖转运体-2 (Wang 等, 1998 年)、兔抗人突触素 (synaptophysin) 和 HGF (Menke 等, 1999 年), 如图 15 所示。为确定是否分化的 NIPs 具有胰外分泌组织, 我们使用 RT-PCR, 并检测淀粉酶和羧肽酶原的表达。

一些包含 NIPs 的干细胞培养物也表达 mRNA 编码高血糖原和胰岛素, 如通过 RT-PCR 所发现 (图 16A 和 B)。

IDX-1 的表达非常重要, 因为已发现它是胰腺发育的一种主要调控子, 特别是分泌胰岛素的胰岛  $\beta$  细胞成熟和发挥功能所必需 (Stoffers 等, 1997 年, *Trends Endocrinol.Metab.*, 8: 145-151)。

因为新胰岛的再生也已知可通过胰导管细胞的分化而发生, 特别是新生期间 (大鼠和小鼠), 但在某种程度上是整个成年期 (Bonner-weir 等, 1993 年, *Diabetes*, 42: 1715-1720; Rosenberg, 1995 年, *Cell Transplant*, 4: 371-383; Bouwens 等, 1996

年, Virchows Arch., 427: 553-560), 所以, 巢素表达在成年鼠的胰导管中分析。通过应用巢素抗血清和细胞角蛋白抗血清——导管表皮细胞的一种标记物——的双荧光免疫细胞化学, 巢素在大小导管的局部地区以及外分泌腺泡组织内的一些小叶中心导管强烈表达 (图 11A 和 11B)。尤其显著的是, 导管中巢素表达的局部区域大多数不被抗 CK19 抗血清染色。再者, 导管中的巢素阳性细胞显示一种形态, 显著相异于表皮细胞。表皮细胞由一种同源的方形、圆形细胞族组成, 而巢素阳性细胞有核、扁爬形, 似乎只位于表皮细胞的间隙或周围 (图 11C)。

因此, CK19 不在大多数表达巢素的导管细胞表达提示, 这些位于胰导管的巢素表达细胞是一种与导管表皮细胞明显有别的细胞信使族群, 是尚未分化成导管或内分泌表型的干细胞。在成年鼠胰腺的胰导管和胰岛内, 巢素表达细胞局部集聚生长, 这个发现进一步支持了这个观点, 即鼠胰导管包含的细胞是胰岛细胞 (新生) 的祖, 但这些祖细胞本身不是导管表皮细胞的一个亚族。

### **实施例 13 以在糖尿病患者中表达 IDX-1 的基因工程胰腺干细胞的移植**

胰岛从猪或人供体胰腺中分离, 或从最终人移植受体的胰腺活组织检查中获取, 然后体外在刺激干细胞生长的条件下培养。然后将干细胞从胰岛 (克隆的) 中分离, 试管内在含 bFGF-2、EGF 和 11.1mM 葡萄糖的增殖培养基下增殖, 用含 DNA 编码转录因子 IDX-1 的表达载体转染/注射, 最后移植入糖尿病受体。此外, 在移植以启动基因工程干细胞分化成  $\beta$  细胞的程序前, IDX-1 转染干细胞也用 GLP-1 或其他分化成胰岛素或生长因子处理 1-3 天。在一个实施例中, 干细胞在注入受体前既不增殖也不分化。在一个实施例中, 移植期间和移植后数天内应用 GLP-1, 以刺激干细胞的分化和促进嫁接成功。依据这种方法, 进行异种移植物 (猪胰岛) 或同种异体移植物 (来自非受体人供体的人胰岛) 以及同基因移植物 (来自受体的胰岛) 移植。人们推测, 当移植入宿主受体时, 干细胞的所有基因集合重新编程, 以便宿主把这些干细胞认作是自体物, 因此不发生免疫不耐受、移植物排斥和自动免疫破坏 (1 型糖尿病)。

### **实施例 14 培育以刺激在糖尿病患者内表达 IDX-1 的胰腺干细胞的移植**

如以上描述方法分离的胰岛, 在首先刺激胰岛内干细胞扩大 (增殖)、然后刺激转录因子 IDX-1 表达的条件下, 体外培养数天。通过在含 bFGF 和 11.1mM 葡萄糖的培养基中培养胰岛, 获得增殖的干细胞。通过在 GLP-1 和 2mM 葡萄糖存在情况下培养, 诱导 IDX-1 的表达。如此方法预处理后的胰岛被移植入宿主受体中。此外, 宿主

受体在移植期间和移植后数天内可应用 GLP-1, 以进一步增殖和分化干细胞, 使之形成胰岛素分泌细胞, 促使嫁接成功。

依据这种方法, 进行异种移植物(猪胰岛)、同种异体移植物(来自非受体人供体的人胰岛)以及同基因移植物(来自受体自身的胰岛)移植。

5

### **实施例 15 胰腺干细胞异种移植入肾脏**

人巢素阳性胰岛祖细胞(NIPs)如所述方法分离, 然后移植入八只不被免疫抑制的 C57B16 小鼠肾囊中。移植的人体细胞不被鼠受体排斥。目前的认识是, 异种移植物如人组织, 将在 5-10 天内被鼠所排斥。与目前的认识相反, 我们发现, 在所有八只不受免疫抑制的鼠中, 到目前为止所有的移植都成功的嫁接, 且在移植入  $10^5 \sim 10^6$  个细胞后一个月内(30-38 天), 增殖成大群的组织遍及肾脏两端。

杀死一只 C57B16 鼠, 确认在移植部位有大面值新的生长。包含新组织的肾脏切片分成两块: 一块冷冻以进行冷冻切片组织学检查; 另一块在多聚甲醛中固定, 以便进行石蜡切片组织学检查。冷冻部分用苏木精、曙红(H&E)以及对各种胰岛细胞抗原的抗血清处理和染色。

对 H&E 染色肾脏切片的检查证明不是肾脏组成部分的新生长的存在, 显示一种由间叶细胞和上皮细胞混合组织、包括肝、神经、导管、脂肪和造血成分组成的多形性形态。对肾脏切片的纤维照相证明, 新的生长似乎正在侵入肾实质和肾小球。使用人特异(而不是鼠)抗血清的特异免疫染色揭示, 免疫阳性细胞素对人特异角蛋白、vimentin 以及对人造血淋巴细胞特异的 CD45 白细胞抗原染色。第二只 C57B16 鼠的肾脏在 NIP 移植部位也有相似的新生长。

检查一只 C57B16 鼠(第一只杀死的鼠)NIP 嫁接肾脏的石蜡切片。检查的组织块来自肾的上端, 显示外来组织在肾囊下被很好的包容, 没有“侵入”肾实质的迹象。特别值得注意的是, 在多形外表的移植组织之间是类似肾实质的区域。对这种与理论的不符, 一种假说是: 该移植物由试图分化的干细胞组成, 且这些干细胞不是“侵入”, 而只是简单地迁移和增殖, 并寻找小生境, 也就是间叶细胞的指令。它们可能接受来自肾脏的信号, 并可能尝试分化入肾脏。这些移植细胞可能不是恶性的, 但可能只是尝试发挥其功能的干细胞。

### **实施例 16 移植入胰腺的胰腺干细胞异种基因移植**

人巢素阳性胰岛祖细胞(NIPs)如上所述分离, 并移植入未被免疫抑制的鼠的胰

腺，且这种鼠（1）被链脲霉素（产生链脲霉素诱导糖尿病）处理而损伤，或是（2）胰岛正在发炎的 NOD 鼠。

检查移植动物的胰腺，确定是否 NIPs 寻找到了它们正确的小生境、接受来自胰岛区域的指令并分化成胰岛（ $\beta$  细胞）细胞。

5

#### **实施例 17 通过胰腺干细胞异种基因移植治疗糖尿病**

人胰岛如上所述分离，然后在试管内培育数天以扩增干细胞数量。人 HIPs 通过门静脉移植入肝（据移植入肝技术中广为所知的惯常方法）。

作为可选用的一种情况，人 NIPs 族群（如所述方法分离）被引入血液循环。在  
10 某些实施例中，人 NIPs 通过胰动脉直接导入糖尿病者的胰腺。

为了解糖尿病症状的改善情况（如血糖水平、胰岛素水平和胰  $\beta$  细胞数目），分析对照组（非移植动物）和移植动物。

#### **实施例 18 肝巢素阳性干细胞的鉴别**

15 依据熟知的技术及此处描述的方法，鼠肝被分离并制成冷结切片。

用兔多克隆抗巢素血清进行鼠肝冷结切片（ $6\mu\text{M}$ ）的免疫染色。免疫荧光信号通过以荧光团、Cy3（黄澄色）为标示的抗驴 IgG 血清的反应。图 13A 描述的是围绕一尽可能较大胆管的巢素阳性细胞，图 13B 描述的是围绕数条小胆管的巢素阳性细胞簇。

20

#### **实施例 19 NIPs 旨在肝细胞表型的分化**

由于胰腺中肝干细胞（椭圆形细胞）、肝星形细胞和祖细胞之间被报告有明显的族群外观，且观察到，一些损伤以后再生的胰腺进行肝转化（Slack 1995 年；Reddy 等，1991 年；Bisgaard 等，1991 年；Rao 等，1996 年），我们进行了 RT-PCR，以检测  
25 干细胞中的肝表达基因。为肝细胞发育所需的转录因子 XBP-1（Reimold 等，2000 年）和转甲状腺蛋白（transthyretin，一种肝急性期蛋白）获取 PCR 产物。数个其它肝标记物也被表达，如  $\alpha$ -胎蛋白（Dabeva 等，2000 年）、E-钙黏附素（E-Cadherin）（Stamatoglou 等，1992 年）、c-MET（Ikeda 等，1998 年）、HGF（Skrtic 等 1999 年）和突触素（synaptophysin）（Wang 等，1998 年）。胰腺和肝共同蛋白质的表达，如 HGF  
30 和突触素等，可能反应它们来自前肠内胚层的共同来源，并代表向胰腺或肝表现型的分化。



### 实施例 20 GLP-1R 在 NIPs 中的信号传递

对单个、分离的 NIPs 应用 GLP-1R 酰胺提升胞内  $\text{Ca}^{2+}$  离子浓度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )。将细胞铺在隔栅盖玻片上, 随后进行免疫组织化学染色以测试巢素的表达。获取所有细胞的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  读数, 所有细胞都显示表达巢素。与成年  $\beta$  细胞相反, 在碱性葡萄糖 (5.6mM) 中 GLP-1 刺激  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  水平, 但在高葡萄糖 (20mM) 存在时没有效果 (图 23, 板 A)。这种效果可通过毛喉素重现 (图 23, 板 B), 提示, GLP-1 的效果通过  $G_s$  的激活和 cAMP 的生产介导, 即与正常  $\beta$  细胞应用的信号通路相同。应用 GLP-1 的特异拮抗剂肽 Extendin(9-39) 对单个分离的 NIPs 预处理, 阻止 GLP-1 介导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的升高 (图 23, 板 C 和 D)。GLP-1 拮抗剂 Extendin 的效果提示, 相同的 GLP-1R 对碘氧基苯甲醚在 NIPs 中表达, 就如在  $\beta$  细胞中一样。GLP-1 介导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高被胞外的  $\text{La}^{3+}$  所抑制, 提示 GLP-1 刺激  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  内流, 与它已知的  $\beta$  细胞去极化作用一致 (图 23, 板 E)。我们进一步证明, 甲苯磺丁脲 (100  $\mu\text{M}$ ) 在 NIPs 中刺激  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高, 表明它们表达 ATP 敏感性  $\text{K}^{+}$  通道 (图 23, 板 F)。这些数据与 GLP-1 诱导膜去极化和在 NIPs 中激活电位依赖性  $\text{Ca}^{2+}$  通道的作用相一致, 与它在  $\beta$  细胞中的作用机理相一致。

### 实施例 21 GLP-1 诱导 NIPs 分化成分泌胰岛素的细胞

早前的研究已经证明了 GLP-1 的促胰岛素作用及其在部分胰切除鼠中刺激  $\beta$  细胞再生的能力 (Xu 等, 1999 年, Diabetes 48: 2270)。NIPs 从胰岛培养物中挑取, 在包含 bFGF 加 EGF (传代通路 01) 的培养基中增殖 3-10 天 (Zulewski 等, 2001 年, Diabetes 50: 521)。在某些情况中, 增殖 3-5 天的 NIPs 被固定, 并接受对巢素 (Cy-3) 和胰岛素 (Cy-2) 的免疫细胞化学检测, 如图 24A 所示。在此阶段发现, 它们为巢素阳性, 胰岛素阴性。当 NIP 培养增殖 7-10 天, 然后用 GLP-1 或其稳定同类物 extendin-4 处理, 一种细胞亚族变为胰岛素阳性 (Cy-2; 图 24B, 板 3、5 和 6)、Idx-1 阳性 (Cy-3; 图 24B, 板 7) 和巢素阴性 (Cy-3; 图 23B, 板 4)。当培养基应用 GLP-1 处理时, 整个巢素表达下降 (图 24B, 板 2 对板 4)。据此, 应用 extendin-4 处理诱导胰岛素分泌增加 2 至 3 倍 (图 25)。然而, 在一些培养井, 融合本身就足够引起少量的胰岛素分泌。

同源结构域蛋白质 Idx-1 对胰腺发育至关重要, 且胰岛素基因转录调节中起一种主要的作用。Idx-1 的表达导致一种早期发生的 2 型糖尿病形式 (MODY4), 且 Idx-1

的遗传氨基酸改变与 2 型糖尿病的晚期发生相关。Idx-1 在分化的 NIP 细胞族群中表达。

重复传代的人 NIPs 丧失其响应 GLP-1 分泌胰岛素的能力。然而，用一种编码人 Idx-1 cDNA 的表达载体转染这些细胞，将使它们对 GLP-1 响应，诱导胰岛素在 NIPs 亚族的合成（图 26，板 1）。有意思的是，在不使用 GLP-1 的情况下，用 Idx-1 转染 NIPs（传代通路 9）不能诱导胰岛素的生物合成（图 26，下 B 板），但确实能刺激 Idx-1 的表达水平（图 26，上 B 板）。总的来水，这些结果提示，GLP-1 刺激 Idx-1 在 NIP 细胞的表达水平，要使 NIPs 转为胰岛素分泌细胞需要一关键的 Idx-1 阈浓度；因此提示 GLP-1R 在胰岛细胞分化中的一种作用。

10

#### **实施例 22 应用 NIPs 在准备接受组织/器官移植的宿主受体中预先诱导一种免疫耐受状态的一种方法**

NIPs 被用于预先诱导一种对可能器官供体的耐受状态。最近发表的报告指出，从供体移植干细胞到一位移植受者可诱导对来自供体的移植耐受，而不需要任何免疫抑制药（参加 Fandrich 等提供的例子，Nat Med 2002 年 2 月，8: 171; Quaini 等，N. Engl. J. Med., 2002 年 1 月 3 号，346: 5; Korbiling 等，N. Engl. J. Med., 2002 年 5 月 7 号，346: 738）。本处描述的方法证实了这些观察，并示范了在将供体的器官移植到受体之前，NIPs 在预先诱导受体对器官供体的一种免疫耐受状态中的一种新颖应用。

依据这种方法，从一位预期供体的胰腺或肝中取下一块活组织检查切片。如上所述，分离人巢素阳性细胞（NIPs）并在试管内增殖，以便产生 NIPs 或 NIP 相对应的干/祖细胞。然后通过皮下或者通过静脉注射，将这些 NIPs 注射入一位免疫力正常的受者体中。4-8 小时后，通过针吸或钻孔活检（穿刺活检）获取组织样本。基因组 PCR 检查和使用供体特异探针的原位杂交表明，移植的人 NIPs 在受体的多种器官定位繁殖，并创造一种微观/混和嵌合状态，这种状态诱导一种免疫耐受环境。一位受体对人组织移植物的接受被认为起自于移植的干/祖细胞向含抗原的树枝状细胞的分化，因此诱导人免疫系统将移植的组织辨认为是自己组织。受体对供体组织免疫耐受的成功诱导通过以下方式证实：从供体身上提取皮肤活检，移植到受体的皮肤上，受体不显示对供体皮肤移植物的排斥。对供体的一种免疫耐受状态被证实后，NIP 移植物外科除下。然后，来自供体的器官（肾、心、肝、胰）被移植入受体中，此时不会引起对移植器官的排斥。这种器官前移植方法强令受体的免疫系统把移植器官辨认为自身

组织, 因而避免了对强效但毒性较大的免疫抑制药的需求。

### 参考文献

- 5 Bisgaard, H. C. and Thorgeirsson, S. S. 1991. Evidence for a common cell of origin for primitive epithelial cells isolated from rat liver and pancreas. *J. Cell Physiol.* 147: 333-343.
- Bjornson, C. R. et al. 1999. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283: 534-537.
- 10 Boggs, S. S. 1990. Targeted gene modification for gene therapy of stem cells. *Int J. Cell Cloning* 8: 80-96.
- Bouwens, L. et al. 1994. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* 43: 1279-1283.
- Bouwens, L. 1998. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta cells in the pancreas. *Microsc. Res. Tech.* 43: 332-336.
- 15 Cornelius, J. G., et al. 1997. In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm. Metab. Res.* 29: 271-277.
- Dahlstrand, J., et al. 1992. Characterization of the human 巢素 gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J. Cell Sci.* 103: 589-597.
- Dabeva, M. D. et al., 2000. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver. *Am. J. Pathol.* 156: 2017-2031.
- 20 Hockfield, S., and McKay, R. D. 1985. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 5: 3310-3328.
- Ikeda et al., 1998. Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to enhance transforming growth factor beta1 expression and DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 769-775.
- 25 Johansson, C. B. et al. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96: 25-34.
- Karlsson, S. 1991. Treatment of genetic defects in hematopoietic cell function by gene transfer. *Blood* 78 (10): 2481-2492.
- 30 Lendahl, U., et al. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60: 585-595.

- Miller, A. D. 1990. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Therapy* 1: 5.
- Morshead, C. M. et al. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain : a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13: 1071-1082.
- Rao. M. S. et al., 1996. Expression of transcription factors and stem cell factor precedes hepatocyte differentiation in rat pancreas. *Gene Expr* 6: 15-22.
- Reddy, J. K. et al., 1991. Pancreatic Hepatocytes. An in vivo model for cell lineage in pancreas of adult rat. *Dig. Dis. Sci.* 36: 502-509.
- Reimold, A. M. et al., 2000 An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev.* 14: 152-7.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S. 1996. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev. Biol.* 175: 1-13.
- Schiffmann, et. al. 1995. Transfer of the human glucocerebrosidase gene into hematopoietic stem cells of nonablated recipients: successful engraftment and long-term expression of the transgene. *Blood* 86 (3): 1218-1227.
- Skrtic, S., et al., 1999. Hepatocyte-stimulated expression of hepatocyte growth formation (HGF) in cultured rat hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* 30: 115-124.
- Slack, J. M. W., 1995, *Developmental Biology of the pancreas*. Development, 121: 1569-1580.
- Stamatoglou, S. C. et al., 1992. Temporal changes in the expression and distribution of adhesion molecules during liver development and regeneration. *J.Cell. Biol.* 116: 1507-1515.
- Wang, Z. et al., 1998. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47: 5056.
- Williams, D. A. 1990. Expression of introduced genetic sequences in hematopoietic cells following retroviral-mediated gene transfer. *Hum. Gene Therapy* 1: 229.

<110> 通用医疗公司

<120> 胰岛干细胞及其在治疗糖尿病中的用途

<130> IP040309P

<150> US 09/963,875

<151> 2001-09-26

<150> US 10/120,687

<151> 2002-04-01

<150> US 10/136,891

<151> 2002-05-02

<160> 61

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1618

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Gly Cys Met Gly Glu Glu Ser Phe Gln Met Trp Glu Leu Asn  
1 5 10 15

Arg Arg Leu Glu Ala Tyr Leu Gly Arg Val Lys Ala Leu Glu Glu Gln  
20 25 30

Asn Glu Leu Leu Ser Ala Gly Leu Gly Gly Leu Arg Arg Gln Ser Ala  
35 40 45

Asp Thr Ser Trp Arg Ala His Ala Asp Asp Glu Leu Ala Ala Leu Arg  
50 55 60

Ala Leu Val Asp Gln Arg Trp Arg Glu Lys His Ala Ala Glu Val Ala  
65 70 75 80

Arg Asp Asn Leu Ala Glu Glu Leu Glu Gly Val Ala Gly Arg Cys Glu  
85 90 95

Gln Leu Arg Leu Ala Arg Glu Arg Thr Thr Glu Glu Val Ala Arg Asn  
100 105 110

---

Arg Arg Ala Val Glu Ala Glu Lys Cys Ala Arg Ala Trp Leu Ser Ser  
 115 120 125

Gln Gly Ala Glu Leu Glu Arg Glu Leu Glu Ala Leu Arg Val Ala His  
 130 135 140

Glu Glu Glu Arg Val Gly Leu Asn Ala Gln Ala Ala Cys Ala Pro Arg  
 145 150 155 160

Leu Pro Ala Pro Pro Arg Pro Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val Glu Glu  
 165 170 175

Leu Ala Arg Arg Leu Gly Glu Ala Trp Arg Gly Ala Val Arg Gly Tyr  
 180 185 190

Gln Glu Arg Val Ala His Met Glu Thr Ser Leu Asp Gln Thr Arg Glu  
 195 200 205

Arg Leu Ala Arg Ala Val Gln Gly Ala Arg Glu Val Arg Leu Glu Leu  
 210 215 220

Gln Gln Leu Gln Ala Glu Arg Gly Gly Leu Leu Glu Arg Arg Ala Ala  
 225 230 235 240

Leu Glu Gln Arg Leu Glu Gly Arg Trp Gln Glu Arg Leu Arg Ala Thr  
 245 250 255

Glu Lys Phe Gln Leu Ala Val Glu Ala Leu Glu Gln Glu Lys Gln Gly  
 260 265 270

Leu Gln Ser Gln Ile Ala Gln Val Leu Glu Gly Arg Gln Gln Leu Ala  
 275 280 285

His Leu Lys Met Ser Leu Ser Leu Glu Val Ala Thr Tyr Arg Thr Leu  
 290 295 300

Leu Glu Ala Glu Asn Ser Arg Leu Gln Thr Pro Gly Gly Gly Ser Lys  
 305 310 315 320

Thr Ser Leu Ser Phe Gln Asp Pro Lys Leu Glu Leu Gln Phe Pro Arg  
 325 330 335

Thr Pro Glu Gly Arg Arg Leu Gly Ser Leu Leu Pro Val Leu Ser Pro  
 340 345 350

---

Thr Ser Leu Pro Ser Pro Leu Pro Ala Thr Leu Glu Thr Pro Val Pro  
 355 360 365

Ala Phe Leu Lys Asn Gln Glu Phe Leu Gln Ala Arg Thr Pro Thr Leu  
 370 375 380

Ala Ser Thr Pro Ile Pro Pro Thr Pro Gln Ala Pro Ser Pro Ala Val  
 385 390 395 400

Asp Ala Glu Ile Arg Ala Gln Asp Ala Pro Leu Ser Leu Leu Gln Thr  
 405 410 415

Gln Gly Gly Arg Lys Gln Ala Pro Glu Pro Leu Arg Ala Glu Ala Arg  
 420 425 430

Val Ala Ile Pro Ala Ser Val Leu Pro Gly Pro Glu Glu Pro Gly Gly  
 435 440 445

Gln Arg Gln Glu Ala Ser Thr Gly Gln Ser Pro Glu Asp His Ala Ser  
 450 455 460

Leu Ala Pro Pro Leu Ser Pro Asp His Ser Ser Leu Glu Ala Lys Asp  
 465 470 475 480

Gly Glu Ser Gly Gly Ser Arg Val Phe Ser Ile Cys Arg Gly Glu Gly  
 485 490 495

Glu Gly Gln Ile Trp Gly Leu Val Glu Lys Glu Thr Ala Ile Glu Gly  
 500 505 510

Lys Val Val Ser Ser Leu Gln Gln Glu Ile Trp Glu Glu Glu Asp Leu  
 515 520 525

Asn Arg Lys Glu Ile Gln Asp Ser Gln Val Pro Leu Glu Lys Glu Thr  
 530 535 540

Leu Lys Ser Leu Gly Glu Glu Ile Gln Glu Ser Leu Lys Thr Leu Glu  
 545 550 555 560

Asn Gln Ser His Glu Thr Leu Glu Arg Glu Asn Gln Glu Cys Pro Arg  
 565 570 575

Ser Leu Glu Glu Asp Leu Glu Thr Leu Lys Ser Leu Glu Lys Glu Asn

580					585					590					
Lys	Arg	Ala	Ile	Lys	Gly	Cys	Gly	Gly	Ser	Glu	Thr	Ser	Arg	Lys	Arg
		595					600					605			
Gly	Cys	Arg	Gln	Leu	Lys	Pro	Thr	Gly	Lys	Glu	Asp	Thr	Gln	Thr	Leu
	610					615					620				
Gln	Ser	Leu	Gln	Lys	Glu	Asn	Gln	Glu	Leu	Met	Lys	Ser	Leu	Glu	Gly
	625					630					635				640
Asn	Leu	Glu	Thr	Phe	Leu	Phe	Pro	Gly	Thr	Glu	Asn	Gln	Glu	Leu	Val
				645					650					655	
Ser	Ser	Leu	Gln	Glu	Asn	Leu	Glu	Ser	Leu	Thr	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu
			660					665					670		
Asn	Gln	Glu	Pro	Leu	Arg	Ser	Pro	Glu	Val	Gly	Asp	Glu	Glu	Ala	Leu
		675					680					685			
Arg	Pro	Leu	Thr	Lys	Glu	Asn	Gln	Glu	Pro	Leu	Arg	Ser	Leu	Glu	Asp
	690					695					700				
Glu	Asn	Lys	Glu	Ala	Phe	Arg	Ser	Leu	Glu	Lys	Glu	Asn	Gln	Glu	Pro
	705					710					715				720
Leu	Lys	Thr	Leu	Glu	Glu	Glu	Asp	Gln	Ser	Ile	Val	Arg	Pro	Leu	Glu
			725					730						735	
Thr	Glu	Asn	His	Lys	Ser	Leu	Arg	Ser	Leu	Glu	Glu	Gln	Asp	Gln	Glu
			740					745					750		
Thr	Leu	Arg	Thr	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Gln	Gln	Arg	Arg	Arg	Ser	Leu
		755					760					765			
Gly	Glu	Gln	Asp	Gln	Met	Thr	Leu	Arg	Pro	Pro	Glu	Lys	Val	Asp	Leu
	770					775					780				
Glu	Pro	Leu	Lys	Ser	Leu	Asp	Gln	Glu	Ile	Ala	Arg	Pro	Leu	Glu	Asn
	785					790					795				800
Glu	Asn	Gln	Glu	Phe	Leu	Lys	Ser	Leu	Lys	Glu	Glu	Ser	Val	Glu	Ala
				805					810					815	



---

Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Ile Leu Glu Ser Leu Lys Ser Ala Gly  
820 825 830

Gln Glu Asn Leu Glu Thr Leu Lys Ser Pro Glu Thr Gln Ala Pro Leu  
835 840 845

Trp Thr Pro Glu Glu Ile Asn Lys Ser Gly Gly Asn Glu Ser Ser Arg  
850 855 860

Lys Gly Asn Ser Arg Thr Thr Gly Val Cys Gly Ser Glu Pro Arg Asp  
865 870 875 880

Ile Gln Thr Pro Gly Arg Gly Glu Ser Gly Ile Ile Glu Ile Ser Gly  
885 890 895

Ser Met Glu Pro Gly Glu Phe Glu Ile Ser Arg Gly Val Asp Lys Glu  
900 905 910

Ser Gln Arg Asn Leu Glu Glu Glu Glu Asn Leu Gly Lys Gly Glu Tyr  
915 920 925

Gln Glu Ser Leu Arg Ser Leu Glu Glu Glu Gly Gln Glu Leu Pro Gln  
930 935 940

Ser Ala Asp Val Gln Arg Trp Glu Asp Thr Val Glu Lys Asp Gln Glu  
945 950 955 960

Leu Ala Gln Glu Ser Pro Pro Gly Met Ala Gly Val Glu Asn Lys Asp  
965 970 975

Glu Ala Glu Leu Asn Leu Arg Glu Gln Asp Gly Phe Thr Gly Lys Glu  
980 985 990

Glu Val Val Glu Gln Gly Glu Leu Asn Ala Thr Glu Glu Val Trp Phe  
995 1000 1005

Pro Gly Glu Gly His Pro Glu Asn Pro Glu Pro Lys Glu Gln Arg  
1010 1015 1020

Gly Leu Val Glu Gly Ala Ser Val Lys Gly Gly Ala Glu Gly Leu  
1025 1030 1035

Gln Asp Pro Glu Gly Gln Ser Gln Gln Val Gly Thr Pro Gly Leu  
1040 1045 1050

---

Gln Ala	Pro Gln Gly Leu Pro	Glu Ala Ile Glu Pro	Leu Val Glu
1055	1060	1065	
Asp Asp	Val Ala Pro Gly Gly	Asp Gln Ala Ser Pro	Glu Val Met
1070	1075	1080	
Leu Gly	Ser Glu Pro Ala Met	Gly Glu Ser Ala Ala	Gly Ala Glu
1085	1090	1095	
Pro Gly	Leu Gly Gln Gly Val	Gly Gly Leu Gly Asp	Pro Gly His
1100	1105	1110	
Leu Thr	Arg Glu Glu Val Met	Glu Pro Pro Leu Glu	Glu Glu Ser
1115	1120	1125	
Leu Glu	Ala Lys Arg Val Gln	Gly Leu Glu Gly Pro	Arg Lys Asp
1130	1135	1140	
Leu Glu	Glu Ala Gly Gly Leu	Gly Thr Glu Phe Ser	Glu Leu Pro
1145	1150	1155	
Gly Lys	Ser Arg Asp Pro Trp	Glu Pro Pro Arg Glu	Gly Arg Glu
1160	1165	1170	
Glu Ser	Glu Ala Glu Ala Pro	Arg Gly Ala Glu Glu	Ala Phe Pro
1175	1180	1185	
Ala Glu	Thr Leu Gly His Thr	Gly Ser Asp Ala Pro	Ser Pro Trp
1190	1195	1200	
Pro Leu	Gly Ser Glu Glu Ala	Glu Glu Asp Val Pro	Pro Val Leu
1205	1210	1215	
Val Ser	Pro Ser Pro Thr Tyr	Thr Pro Ile Leu Glu	Asp Ala Pro
1220	1225	1230	
Gly Leu	Gln Pro Gln Ala Glu	Gly Ser Gln Glu Ala	Ser Trp Gly
1235	1240	1245	
Val Gln	Gly Arg Ala Glu Ala	Gly Lys Val Glu Ser	Glu Gln Glu
1250	1255	1260	
Glu Leu	Gly Ser Gly Glu Ile	Pro Glu Gly Leu Gln	Glu Glu Gly
1265	1270	1275	

---

Glu Glu Ser Arg Glu Glu Ser	Glu Glu Asp Glu Leu Gly Glu Thr
1280	1285 1290
Leu Pro Asp Ser Thr Pro Leu	Gly Phe Tyr Leu Arg Ser Pro Thr
1295	1300 1305
Ser Pro Arg Trp Thr Pro Leu	Glu Ser Arg Gly His Pro Leu Lys
1310	1315 1320
Glu Thr Gly Lys Glu Gly Trp	Asp Pro Ala Val Leu Ala Ser Glu
1325	1330 1335
Gly Leu Glu Glu Pro Ser Glu	Lys Glu Glu Gly Glu Glu Gly Glu
1340	1345 1350
Glu Glu Cys Gly Arg Asp Ser	Asp Leu Ser Glu Glu Phe Glu Asp
1355	1360 1365
Leu Gly Thr Glu Ala Pro Phe	Leu Pro Gly Val Pro Gly Glu Val
1370	1375 1380
Ala Glu Pro Leu Gly Gln Val	Pro Gln Leu Leu Leu Asp Pro Ala
1385	1390 1395
Ala Trp Asp Arg Asp Gly Glu	Ser Asp Gly Phe Ala Asp Glu Glu
1400	1405 1410
Glu Ser Gly Glu Glu Gly Glu	Glu Asp Gln Glu Glu Gly Arg Glu
1415	1420 1425
Pro Gly Ala Gly Arg Trp Gly	Pro Gly Ser Ser Val Gly Ser Leu
1430	1435 1440
Gln Ala Leu Ser Ser Ser Gln	Arg Gly Glu Phe Leu Glu Ser Asp
1445	1450 1455
Ser Val Ser Val Ser Val Pro	Trp Asp Asp Ser Leu Arg Gly Ala
1460	1465 1470
Val Ala Gly Ala Pro Lys Thr	Ala Leu Glu Thr Glu Ser Gln Asp
1475	1480 1485
Ser Ala Glu Pro Ser Gly Ser	Glu Glu Glu Ser Asp Pro Val Ser

1490	1495	1500
Leu Glu Arg Glu Asp Lys Val	Pro Gly Pro Leu Glu Ile Pro Ser	
1505	1510	1515
Gly Met Glu Asp Ala Gly Pro	Gly Ala Asp Ile Ile Gly Val Asn	
1520	1525	1530
Gly Gln Gly Pro Asn Leu Glu	Gly Lys Ser Gln His Val Asn Gly	
1535	1540	1545
Gly Val Met Asn Gly Leu Glu	Gln Ser Glu Glu Ser Gly Ala Arg	
1550	1555	1560
Asn Ala Leu Val Ser Glu Gly	Asp Arg Gly Ser Pro Phe Gln Glu	
1565	1570	1575
Glu Glu Gly Ser Ala Leu Lys	Arg Ser Ser Ala Gly Ala Pro Val	
1580	1585	1590
His Leu Gly Gln Gly Gln Phe	Leu Lys Phe Thr Gln Arg Glu Gly	
1595	1600	1605
Asp Arg Glu Ser Trp Ser Ser	Gly Glu Asp	
1610	1615	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 4854

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

atggagggct gcatggggga ggagtcgttt cagatgtggg agctcaatcg ggccttggag	60
gcctaccttg gccgggtcaa ggcgctggag gagcagaatg agctgctcag cgccggactc	120
ggggggctcc ggcgacaatc cgcggacacc tcttggcggg cgcattgccg cgacgagctg	180
gcggccctgc gtgcgctcgt tgaccaacgc tggcgggaga agcacgcggc cgaggtggcg	240
cgcgacaacc tggtgaaga gctggagggc gtggcaggcc gatgcgagca gctgcggctg	300
gcccgggagc ggacgacgga ggaggtagcc cgcaaccggc gcgccgtcga ggagagaaaa	360
tgcgccccgg cctggctgag tagccagggg gcagagctgg agcgcgagct agaggctcta	420

cgcgtggcgc	acgaggagga	gcgcgtcggc	ctgaacgcgc	aggctgcctg	tgccccccgc	480
ctgccccgcgc	cgccccggcc	tcccgcgccg	gccccggagg	tagaggagct	ggcaaggcga	540
ctgggcgagg	cgtggcgccg	ggcagtgcgc	ggctaccagg	agcgcgtggc	acacatggag	600
acgtcgcctgg	accagacccg	cgagcgcctg	gccccggcgg	tgcaagggtgc	ccgcgaggtc	660
cgcctggagc	tgcagcagct	ccaggctgag	cgcggaggcc	tcctggagcg	cagggcagcg	720
ttggaacaga	ggttgagggg	ccgctggcag	gagcggctgc	gggctactga	aaagttccag	780
ctggctgtgg	aggccctgga	gcaggagaaa	cagggcctac	agagccagat	cgctcaggtc	840
ctggaaggctc	ggcagcagct	ggcgcacctc	aagatgtccc	tcagcctgga	ggtggccacg	900
tacaggaccc	tcctggaggc	tgagaactcc	cggctgcaaa	cacctggcgg	tggtccaag	960
acttccctca	gctttcagga	ccccaaagctg	gagctgcaat	tcctaggac	cccagagggc	1020
cggcgtcttg	gatctttgct	cccagtcctg	agcccaactt	ccctccctc	acccttgctt	1080
gctacccttg	agacacctgt	gccagccttt	cttaagaacc	aagaattcct	ccaggcccg	1140
accctacct	tggccagcac	ccccatcccc	cccacacctc	aggcacctc	tcctgctgta	1200
gatgcagaga	tcagagccca	ggatgctcct	ctctctctgc	tcagacaca	gggtgggagg	1260
aaacaggctc	cagagcccct	gcgggctgaa	gccagggtgg	ccattcctgc	cagcgtcctg	1320
cctggaccag	aggagcctgg	gggccagcgg	caagaggcca	gtacaggcca	gtccccagag	1380
gaccatgcct	ccttggcacc	accctcagc	cctgaccact	ccagtttaga	ggctaaggat	1440
ggagaatccg	gtgggtctag	agtgttcagc	atatgccgag	gggaagggtga	agggcaaadc	1500
tgggggttg	tagagaaaga	aacagccata	gagggcaaag	tggtaaagcag	cttgcagcag	1560
gaaatatggg	aagaagagga	tctaaacagg	aaggaaatcc	aggactccca	ggttcctttg	1620
gaaaaagaaa	ccctgaagtc	tctgggagag	gagattcaag	agtcactgaa	gactctggaa	1680
aaccagagcc	atgagacact	agaaaggag	aatcaagaat	gtccgaggtc	tttagaagaa	1740
gacttagaaa	cactaaaaag	tctagaaaag	gaaaataaaa	gagctattaa	aggatgtgga	1800
ggtagtgaga	cctctagaaa	aagaggctgt	aggcaactta	agcctacagg	aaaagaggac	1860
acacagacat	tgcaatccct	gcaaaaggag	aatcaagaac	taatgaaatc	tcttgaaggt	1920
aatctagaga	catttttatt	tccaggaacg	gaaaatcaag	aattagtaag	ttctctgcaa	1980
gagaacttag	agtcattgac	agctctggaa	aaggagaatc	aagagccact	gagatctcca	2040
gaagtagggg	atgaggaggc	actgagacct	ctgacaaagg	agaatcagga	accctgagg	2100
tctcttgaag	atgagaacaa	agaggccttt	agatctctag	aaaaagagaa	ccaggagcca	2160

ctgaagactc	tagaagaaga	ggaccagagt	attgtgagac	ctctagaaac	agagaatcac	2220
aaatcactga	ggtctttaga	agaacaggac	caagagacat	tgagaactct	tgaaaaagag	2280
actcaacagc	gacggaggtc	tctaggggaa	caggatcaga	tgacattaag	acccccagaa	2340
aaagtggatc	tagaaccact	gaagtctctt	gaccaggaga	tagctagacc	tcttgaaaat	2400
gagaatcaag	agttcttaaa	gtcactcaaa	gaagagagcg	tagaggcagt	aaaatcttta	2460
gaaacagaga	tcctagaatc	actgaagtct	gcgggacaag	agaacctgga	aacactgaaa	2520
tctccagaaa	ctcaagcacc	actgtggact	ccagaagaaa	taaataaatc	agggggcaat	2580
gaatcctcta	gaaaaggaaa	ttcaagaacc	actggagtct	gtggaagtga	accaagagac	2640
attcagactc	ctggaagagg	agaatcagga	atcattgaga	tctctgggag	catggaacct	2700
ggagaatttg	agatctccag	aggagtagac	aaggaaagtc	aaaggaatct	ggaagaggaa	2760
gagaacctgg	gaaagggaga	gtaccaagag	tactgaggt	ctctggagga	ggagggacag	2820
gagctgccgc	agtctgcaga	tgtgcagagg	tgggaagata	cggtaggaga	ggaccaagaa	2880
ctggctcagg	aaagccctcc	tgggatggct	ggagtggaaa	ataaggatga	ggcagagctg	2940
aatctaaggg	agcaggatgg	cttcactggg	aaggaggagg	tggtagagca	gggagagctg	3000
aatgccacag	aggaggtctg	gttcccaggc	gaggggcacc	cagagaacct	tgagcccaaa	3060
gagcagagag	gcctggttga	gggagccagt	gtgaagggag	gggctgaggg	cctccaggac	3120
cctgaagggc	aatcacaaca	ggtggggacc	ccaggcctcc	aggctcccca	ggggctgcca	3180
gagggcagat	agccccctgt	ggaagatgat	gtggccccag	ggggtgacca	agcctcccca	3240
gaggtcatgt	tggggtcaga	gcctgccatg	ggtgagtctg	ctgcgggagc	tgagccaggc	3300
ctggggcagg	gggtgggagg	gctgggggac	ccaggccatc	tgaccaggga	agaggtgatg	3360
gaaccacccc	tggaagagga	gagtttgag	gcaaagaggg	ttcagggctt	ggaagggcct	3420
agaaaggacc	tagaggaggc	aggtggtctg	gggacagagt	tctccgagct	gcctgggaag	3480
agcagagacc	cttgggagcc	tcccaggag	ggtagggagg	agtacagggc	tgaggccccc	3540
aggggagcag	aggaggcggt	ccctgctgag	accctgggcc	acactggaag	tgatgcccct	3600
tcaccttggc	ctctggggtc	agaggaagct	gaggaggatg	taccaccagt	gctggtctcc	3660
cccagcccaa	cgtacacccc	gatcctggaa	gatgccctg	ggctccagcc	tcaggctgaa	3720
gggagtcagg	aggctagctg	gggggtgcag	gggagggctg	aagctgggaa	agtagagagc	3780
gagcaggagg	agttgggttc	tggggagatc	cccaggggcc	tccaggagga	aggggaggag	3840
agcagagaag	agagcgagga	ggatgagctc	ggggagaccc	ttccagactc	cactcccctg	3900
ggcttctacc	tcagggtccc	cacctcccc	aggtggaccc	cactggagag	cagaggccac	3960

```

ccccctcaagg agactggaaa ggaggggctgg gatcctgctg tcctggcttc cgagggcctt 4020
gaggaaccct cagaaaagga ggagggggag gagggagaag aggagtgtgg ccgtgactct 4080
gacctgtcag aagaatttga ggacctgggg actgaggcac cttttcttcc tggggtcctt 4140
ggggaggtgg cagaacctct gggccaggtg ccccgactgc tactggatcc tgcagcctgg 4200
gatcgagatg gggagtctga tgggtttgca gatgaggaag aaagtgggga ggagggagag 4260
gaggatcagg aggaggggag ggagccagg gctgggcggt gggggccagg gtcttctgtt 4320
ggcagcctcc aggcctgag tagctccag agaggggaat tcctggagtc tgattctgta 4380
agtgtcagcg tcccctggga tgacagcttg aggggtgcag tggctggtgc ccccaagact 4440
gccctggaaa cggagtccca ggacagtgt gagccttctg gctcagagga agagtctgac 4500
cctgtttcct tggagaggga ggacaaagtc cctggccctc tagagatccc cagtgggatg 4560
gaggatgcag gccagggggc agacatcatt ggtgttaatg gccaggggtcc caacttggag 4620
gggaagtcac agcatgtaaa tgggggagta atgaacgggc tggagcagtc tgaggaaagt 4680
ggggcaagga atgcgctagt ctctgaggga gaccgaggga gcccctttca ggaggaggag 4740
gggagtgttc tgaagaggtc ttcggcagg gctcctgttc acctgggcca gggtcagttc 4800
ctgaagttca ctcagaggga aggagataga ggtcctggt cctcagggga ggac 4854

```

<210> 3

<211> 2431

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

atggccggcg cccccggccc gctgcgcctt gcgctgctgc tgctcgggat ggtgggcagg 60
gccggcccc gcccccaggg tgccactgtg tccctctggg agacggtgca gaaatggcga 120
gaataccgac gccagtgcc ggcctccctg actgaggatc cacctcctgc cacagacttg 180
ttctgcaacc ggaccttoga tgaatacgcc tgctggccag atggggagcc aggctcgttc 240
gtgaatgtca gctgcccctg gtacctgccc tgggcccagca gtgtgccgca gggccacgtg 300
taccggttct gcacagctga aggcctctgg ctgcagaagg acaactccag cctgccctgg 360
agggacttgt cggagtgcga ggagtccaag cgaggggaga gaagctcccc ggaggagcag 420
ctcctgttcc tctacatcat ctacacggtg ggctacgcac tctccttctc tgctctggtt 480

```

atcgctctg cgatcctcct cggcttcaga cacctgcact gcaccaggaa ctacatccac	540
ctgaacctgt ttgcatcctt catcctgcga gcattgtccg tcttcatcaa ggacgcagcc	600
ctgaagtgga tgtatagcac agccgcccag cagcaccagt gggatgggct cctctcctac	660
caggactctc tgagctgccg cctgggtgtt ctgctcatgc agtactgtgt ggcggccaat	720
tactactggc tcttgggtgga gggcgtgtac ctgtacacac tgctggcctt ctcgggtcttc	780
tctgagcaat ggatcttcag gctctacgtg agcataggct ggggtgttcc cctgctgttt	840
gttgtccctt ggggcattgt caagtacctc tatgaggacg agggctgctg gaccaggaaac	900
tccaacatga actactggct cattatccgg ctgcccattc tctttggcat tggggtgaaac	960
ttcctcatct ttgttcgggt catctgcac gtggtatcca aactgaaggc caatctcatg	1020
tgcaagacag acatcaaata cagacttgcc aagtccacgc tgacactcat cccctgctg	1080
gggactcatg aggtcatctt tgcctttgtg atggacgagc acgcccgggg gacctgcgc	1140
ttcatcaagc tgtttacaga gctctccttc acctccttcc aggggctgat ggtggccatc	1200
ttatactgct ttgtcaacaa tgagggtccag ctggaatttc ggaagagctg ggagcgctgg	1260
cggcttgagc acttgacat ccagaggac agcagcatga agccctcaa gtgtcccacc	1320
agcagcctga gcagtggagc cacggcgggc agcagcatgt acacagccac ttgccaggcc	1380
tctgcagct gagactccag cgctgccct ccctggggtc cttgctgcag gccgggtggc	1440
caatccagga gaagcagcct cctaatttga tcacagtggc gagaggagag gaaaaacgat	1500
cgctgtgaaa atgaggagga ttgcttcttg tgaaaccaca ggcccttggg gttccccag	1560
acagagccgc aatcaaccc cagactcaaa ctcaaggta acggcttatt agtgaaactg	1620
gggcttgcaa gaggaggtg ttctgaaagt ggctcttcta acctcagcca aacacagagc	1680
gggagtgcg ggagcctcct ctgcttgcat cacttggggt caccaccctc ccctgtcttc	1740
tctcaaaggg aagctgtttg tgtgtctggg ttgcttattt cctcatctt gcccctcat	1800
ctcactgccc agtttctttt tgaggggctt tgtttgggccc actgccagca gctgtttctg	1860
gaaatggctg taggtggtgt tgagaaagaa tgagcattga gacgggtgctc gcttctctc	1920
caggatattg agttgttttg gtgcctgcct ctgccatgcc cagagaatca ggcagggctt	1980
gccaccgggg aaccagccc tggggatatga gctgccaagt ctattttaaa gacgctcaag	2040
aatcctctgg gggtcatcta gggacacgtt aggaatgtcc agactgtggg tgtagattac	2100
ctgccacttc caggagccca gagggccaag agagacattg cctccacctc tccttgaaa	2160
tactttatct gtgaccacac gctgtctctt gagaatttgg atacactctc tagctttagg	2220
ggaccatgaa gagactctct tagggaaacc aatagtcccc atcagcacca tggaggcagg	2280



ctccccctgc ctttgaaatt cccccacttg ggagcttgta tatacttcac tcacttttct 2340  
 ttattgctgt gaatagtctg tgtgcacaat gggcaattct gacttctccc atctagtgga 2400  
 aatgagcgaa atcatgggtg tagtgatggt g 2431

<210> 4

<211> 463

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Gly Ala Pro Gly Pro Leu Arg Leu Ala Leu Leu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Met Val Gly Arg Ala Gly Pro Arg Pro Gln Gly Ala Thr Val Ser Leu  
 20 25 30

Trp Glu Thr Val Gln Lys Trp Arg Glu Tyr Arg Arg Gln Cys Gln Arg  
 35 40 45

Ser Leu Thr Glu Asp Pro Pro Pro Ala Thr Asp Leu Phe Cys Asn Arg  
 50 55 60

Thr Phe Asp Glu Tyr Ala Cys Trp Pro Asp Gly Glu Pro Gly Ser Phe  
 65 70 75 80

Val Asn Val Ser Cys Pro Trp Tyr Leu Pro Trp Ala Ser Ser Val Pro  
 85 90 95

Gln Gly His Val Tyr Arg Phe Cys Thr Ala Glu Gly Leu Trp Leu Gln  
 100 105 110

Lys Asp Asn Ser Ser Leu Pro Trp Arg Asp Leu Ser Glu Cys Glu Glu  
 115 120 125

Ser Lys Arg Gly Glu Arg Ser Ser Pro Glu Glu Gln Leu Leu Phe Leu  
 130 135 140

Tyr Ile Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ala Leu Ser Phe Ser Ala Leu Val  
 145 150 155 160

Ile Ala Ser Ala Ile Leu Leu Gly Phe Arg His Leu His Cys Thr Arg  
165 170 175

Asn Tyr Ile His Leu Asn Leu Phe Ala Ser Phe Ile Leu Arg Ala Leu  
180 185 190

Ser Val Phe Ile Lys Asp Ala Ala Leu Lys Trp Met Tyr Ser Thr Ala  
195 200 205

Ala Gln Gln His Gln Trp Asp Gly Leu Leu Ser Tyr Gln Asp Ser Leu  
210 215 220

Ser Cys Arg Leu Val Phe Leu Leu Met Gln Tyr Cys Val Ala Ala Asn  
225 230 235 240

Tyr Tyr Trp Leu Leu Val Glu Gly Val Tyr Leu Tyr Thr Leu Leu Ala  
245 250 255

Phe Ser Val Phe Ser Glu Gln Trp Ile Phe Arg Leu Tyr Val Ser Ile  
260 265 270

Gly Trp Gly Val Pro Leu Leu Phe Val Val Pro Trp Gly Ile Val Lys  
275 280 285

Tyr Leu Tyr Glu Asp Glu Gly Cys Trp Thr Arg Asn Ser Asn Met Asn  
290 295 300

Tyr Trp Leu Ile Ile Arg Leu Pro Ile Leu Phe Gly Ile Gly Val Asn  
305 310 315 320

Phe Leu Ile Phe Val Arg Val Ile Cys Ile Val Val Ser Lys Leu Lys  
325 330 335

Ala Asn Leu Met Cys Lys Thr Asp Ile Lys Cys Arg Leu Ala Lys Ser  
340 345 350

Thr Leu Thr Leu Ile Pro Leu Leu Gly Thr His Glu Val Ile Phe Ala  
355 360 365

Phe Val Met Asp Glu His Ala Arg Gly Thr Leu Arg Phe Ile Lys Leu  
370 375 380

Phe Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ser Phe Gln Gly Leu Met Val Ala Ile  
385 390 395 400

Leu Tyr Cys Phe Val Asn Asn Glu Val Gln Leu Glu Phe Arg Lys Ser  
405 410 415

Trp Glu Arg Trp Arg Leu Glu His Leu His Ile Gln Arg Asp Ser Ser  
420 425 430

Met Lys Pro Leu Lys Cys Pro Thr Ser Ser Leu Ser Ser Gly Ala Thr  
435 440 445

Ala Gly Ser Ser Met Tyr Thr Ala Thr Cys Gln Ala Ser Cys Ser  
450 455 460

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 5  
gcgggggcggt gcgtgactac

20

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (24)

<223> 合成引物

<400> 6

aggcaagggg gaagagaagg atgt

24

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (35)

<223> 合成引物

<400> 7

aagctgaagc cgaatttcct tgggatacca gagga

35

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 8

acagccagta cttcaagacc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 9

ctgtgtcagc acgcacgtta

20

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (30)

<223> 合成引物

<400> 10

tggattccac accaggcatt gaccatgccca

30

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 合成引物

<400> 11

cagcgttgga gagtccaaat

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 12

ttaaactcct gtggggttgg

20

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(37)

<223> 合成引物

<400> 13

aaaccagcag cggatctcag tgggtgtggaa cgatgat

37

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(19)

<223> 合成引物

<400> 14  
atcactggag caggaagt

19

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(19)

<223> 合成引物

<400> 15  
gctactacgt ttcttatct

19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(19)

<223> 合成引物



---

<400> 16  
gcgtggaaaa gccagtggg

19

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (18)

<223> 合成引物

<400> 17  
agaggggaat tcctggag

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 合成引物

---

<400> 18  
ctgaggacca ggactctcta 20

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(31)

<223> 合成引物

<400> 19  
tatgaacggg ctggagcagt ctgaggaaag t 31

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 20  
cttttcgcgc gccacgatt 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 合成引物

<400> 21

gatcttcctg tccctcgagc

20

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (30)

<223> 合成引物

<400> 22

aaccatgagg aggaaatcag tacgctgagg

30

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 23

atctggactc caggcgtgcc

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 24

agcaatgaat tccttggcag

20

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(30)

<223> 合成引物

<400> 25

cacgatgaat ttgagagaca tgctgaaggg

30

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 26

agaacagcac gtacacagcc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 27

cctccgaaga aacagcaaga

20

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(30)

<223> 合成引物

<400> 28

tctcccttca cagcagaact aacacacggg

30

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 29

gcagtcctgc catcaatgtg

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 30

gttggctgtg aataccacct

20

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(30)

<223> 合成引物

<400> 31

ctggagagct gcatgggctc acaactgagg

30

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 32

gactttccag cagtcccata

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列



<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 33

gtttacttcc tgcaggggaac

20

<210> 34

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(31)

<223> 合成引物

<400> 34

ttgcactgga gaaggattac gtggcgttct a

31

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 35

tgaaggcgag aaggtgttcc

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 36

ttcgagatac aggcatat

20

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (30)

<223> 合成引物

<400> 37

agttagactt ttatgtcctg cctgtgctca

30

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 合成引物

<400> 38

cttcaggctg caccaagtgt

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 39

gttgaccata gtcaggctgg

20

<210> 40

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(30)

<223> 合成引物

<400> 40

gtcagatgtg aagatggcca cagacccaga

30

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 合成引物

<400> 41

gcatcaaattg tcagccctgg

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 合成引物

<400> 42

caacgctgac atggaattcc

20

<210> 43

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (30)

<223> 合成引物

<400> 43  
tcgaggtctc atggatcata cagaatcagg

30

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 44  
caatgtgaga tgtctccagc

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 45  
ccttgtagat tgcaggcaga

20

<210> 46

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(30)

<223> 合成引物

<400> 46  
ggactcccat ccagtgtctc cagaagtgat

30

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

---

<400> 47  
gagtagcagc tcagactgcc 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 合成引物

<400> 48  
gtagacctct gggagctcct 20

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (30)

<223> 合成引物

<400> 49  
cgcagcactc agactacgtg cacctctgca 30



<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 合成引物

<400> 50

gcagctgctc aactaatcac

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (20)

<223> 合成引物

<400> 51

tcagcagcac aagtcccact

20

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(30)

<223> 合成引物

<400> 52

acgggcattc ttattagtca gattattggt

30

<210> 53

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(16)

<223> 合成引物

<400> 53

aggcttccttc tacaca

16

<210> 54

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(16)

<223> 合成引物

<400> 54

caggctgcct gcacca

16

<210> 55

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(16)

<223> 合成引物

<400> 55

aggcagagga cctgca

16

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 56

gtgtggcggc caattactac

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> 合成引物

<400> 57

cttggcaagt ctgcatttga

20

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(30)

<223> 合成引物

<400> 58

ggatcttcag gctctacgtg agcataggct

30

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(24)

<223> 合成引物

<400> 59

gggtggtgag ggttgagggtt tgtg

24

<210> 60

<211> 2718

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 60
tttaggaacg caccgtgcac atgcttggtg gtcttggttaa gtggaaactg ctgctttaga      60

gtttgttttg aagggtccggg tgactcatcc caacatttac atccttaatt gttaaagcgc      120

tgcttccgag cgcacgcac ctgagatcct gagccttttg ttaagaccga gctctattaa      180

gctgaaaaga taaaaactct ccagatgtct tccagtaatg tcgaagtttt tatcccagtg      240

tcacaaggaa acaccaatgg cttccccgcg acagcttcca atgacctgaa ggcatttact      300

gaaggagctg tgttaagttt tcataacatc tgctatcgag taaaactgaa gagtggcttt      360

ctaccttgtc gaaaaccagt tgagaaagaa atattatcga atatcaatgg gatcatgaaa      420

cctgggtctca acgccatcct gggaccacaca ggtggaggca aatcttcgtt attagatgtc      480

ttagctgcaa ggaaagatcc aagtggatta tctggagatg ttctgataaa tggagcaccg      540

cgacctgcca atttcaaag taattcaggt tacgtggtac aagatgatgt tgtgatgggc      600

actctgacgg tgagagaaaa cttacagttc tcagcagctc ttcggttgc aacaactatg      660

acgaatcatg aaaaaaacga acggattaac agggtcattc aagagttagg tctggataaa      720

gtggcagact ccaagggttg aactcagttt atccgtggtg tgtctggagg agaaagaaaa      780

aggactagta taggaatgga gcttatcact gatccttcca tcttgttctt ggatgagcct      840

acaactggct tagactcaag cacagcaaat gctgtccttt tgctcctgaa aaggatgtct      900

aagcagggac gaacaatcat cttctccatt catcagcctc gatattccat cttcaagttg      960

tttgatagcc tcaccttatt ggcctcagga agacttatgt tccacgggcc tgctcaggag     1020

gccttgggat actttgaatc agctggttat cactgtgagg cctataataa ccctgcagac     1080

ttcttcttgg acatcattaa tggagattcc actgctgtgg cattaaacag agaagaagac     1140

tttaaagcca cagagatcat agagccttcc aagcaggata agccactcat agaaaaatta     1200

gcggagatth atgtcaactc ctcttcttac aaagagacaa aagctgaatt acatcaactt     1260

tccgggggtg agaagaagaa gaagatcaca gtcttcaagg agatcagcta caccacctcc     1320

ttctgtcatc aactcagatg gggttccaag cgttcattca aaaacttgct gggtaatccc     1380

caggcctcta tagctcagat cattgtcaca gtcgtactgg gactggttat aggtgccatt     1440

tactttgggc taaaaaatga ttctactgga atccagaaca gagctggggg tctcttcttc     1500

ctgacgacca accagtgttt cagcagtgtt tcagccgtgg aactctttgt ggtagagaag     1560

aagctcttca tacatgaata catcagcgga tactacagag tgctatctta tttccttggg     1620

aaactgttat ctgatttatt acccatgagg atgttaccaa gtattatatt tacctgtata     1680

```

```

gtgtacttca tgtaggatt gaagccaaag gcagatgcct tcttogttat gatgtttacc 1740
cttatgatgg tggcttattc agccagttcc atggcactgg ccatagcagc aggtcagagt 1800
gtgggtttctg tagcaacact tctcatgacc atctgttttg tgtttatgat gattttttca 1860
ggctctgttg tcaatctcac aaccattgca tcttggtgt catggcttca gtacttcagc 1920
attccacgat atggatttac ggctttgcag cataatgaat ttttgggaca aaacttctgc 1980
ccaggactca atgcaacagg aaacaatcct tgtaactatg caacatgtac tggcgaagaa 2040
tatttggtaa agcagggcat cgatctctca ccctggggct tgtggaagaa tcacgtggcc 2100
ttggcttgta tgattgttat tttcctcaca attgcctacc tgaaattgtt atttcttaaa 2160
aaatattctt aaatttcccc ttaattcagt atgatttata ctcacataaa aaagaagcac 2220
tttgattgaa gtattcaatc aagttttttt gttgttttct gttcccttgc catcacactg 2280
ttgcacagca gcaattgttt taaagagata cattttttaga aatcacaaca aactgaatta 2340
aacatgaaag aaccaagac atcatgtatc gcatattagt taatctcttc agacagtaac 2400
catggggaag aaatctggtc taatttatta atctaaaaaa ggagaattga attctggaaa 2460
ctcctgacaa gttattactg tctctggcat ttgtttcctc atctttaaaa tgaataggta 2520
ggttagtagc ccttcagtct taatacttta tgatgctatg gtttgccatt atttaataaa 2580
tgacaaatgt attaatgcta tactggaaat gtaaaattga aaatatgttg gaaaaaagat 2640
tctgtcttat agggtaaaaa aagccaccgt gatagaaaaa aaatcttttt gataagcaca 2700
ttaaagttaa tagaactt 2718

```

<210> 61

<211> 655

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

```

Met Ser Ser Ser Asn Val Glu Val Phe Ile Pro Val Ser Gln Gly Asn
1           5           10           15

```

```

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Thr Ala Ser Asn Asp Leu Lys Ala Phe Thr
20           25           30

```

```

Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe His Asn Ile Cys Tyr Arg Val Lys Leu
35           40           45

```

---

Lys Ser Gly Phe Leu Pro Cys Arg Lys Pro Val Glu Lys Glu Ile Leu  
 50 55 60

Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met Lys Pro Gly Leu Asn Ala Ile Leu Gly  
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Gly Gly Lys Ser Ser Leu Leu Asp Val Leu Ala Ala Arg  
 85 90 95

Lys Asp Pro Ser Gly Leu Ser Gly Asp Val Leu Ile Asn Gly Ala Pro  
 100 105 110

Arg Pro Ala Asn Phe Lys Cys Asn Ser Gly Tyr Val Val Gln Asp Asp  
 115 120 125

Val Val Met Gly Thr Leu Thr Val Arg Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala  
 130 135 140

Ala Leu Arg Leu Ala Thr Thr Met Thr Asn His Glu Lys Asn Glu Arg  
 145 150 155 160

Ile Asn Arg Val Ile Gln Glu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ala Asp Ser  
 165 170 175

Lys Val Gly Thr Gln Phe Ile Arg Gly Val Ser Gly Gly Glu Arg Lys  
 180 185 190

Arg Thr Ser Ile Gly Met Glu Leu Ile Thr Asp Pro Ser Ile Leu Phe  
 195 200 205

Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val  
 210 215 220

Leu Leu Leu Leu Lys Arg Met Ser Lys Gln Gly Arg Thr Ile Ile Phe  
 225 230 235 240

Ser Ile His Gln Pro Arg Tyr Ser Ile Phe Lys Leu Phe Asp Ser Leu  
 245 250 255

Thr Leu Leu Ala Ser Gly Arg Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu  
 260 265 270

Ala Leu Gly Tyr Phe Glu Ser Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn



275					280					285					
Asn	Pro	Ala	Asp	Phe	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Gly	Asp	Ser	Thr	Ala
290			295			300									
Val	Ala	Leu	Asn	Arg	Glu	Glu	Asp	Phe	Lys	Ala	Thr	Glu	Ile	Ile	Glu
305		310			315			320							
Pro	Ser	Lys	Gln	Asp	Lys	Pro	Leu	Ile	Glu	Lys	Leu	Ala	Glu	Ile	Tyr
325			330			335									
Val	Asn	Ser	Ser	Phe	Tyr	Lys	Glu	Thr	Lys	Ala	Glu	Leu	His	Gln	Leu
340			345			350									
Ser	Gly	Gly	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Ile	Thr	Val	Phe	Lys	Glu	Ile	Ser
355		360			365										
Tyr	Thr	Thr	Ser	Phe	Cys	His	Gln	Leu	Arg	Trp	Val	Ser	Lys	Arg	Ser
370		375			380										
Phe	Lys	Asn	Leu	Leu	Gly	Asn	Pro	Gln	Ala	Ser	Ile	Ala	Gln	Ile	Ile
385		390			395			400							
Val	Thr	Val	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Ile	Gly	Ala	Ile	Tyr	Phe	Gly	Leu
405			410			415									
Lys	Asn	Asp	Ser	Thr	Gly	Ile	Gln	Asn	Arg	Ala	Gly	Val	Leu	Phe	Phe
420			425			430									
Leu	Thr	Thr	Asn	Gln	Cys	Phe	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Val	Glu	Leu	Phe
435			440			445									
Val	Val	Glu	Lys	Lys	Leu	Phe	Ile	His	Glu	Tyr	Ile	Ser	Gly	Tyr	Tyr
450		455			460										
Arg	Val	Ser	Ser	Tyr	Phe	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu	Ser	Asp	Leu	Leu	Pro
465		470			475			480							
Met	Arg	Met	Leu	Pro	Ser	Ile	Ile	Phe	Thr	Cys	Ile	Val	Tyr	Phe	Met
485			490			495									
Leu	Gly	Leu	Lys	Pro	Lys	Ala	Asp	Ala	Phe	Phe	Val	Met	Met	Phe	Thr
500			505			510									

Leu Met Met Val Ala Tyr Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala  
515 520 525

Ala Gly Gln Ser Val Val Ser Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys  
530 535 540

Phe Val Phe Met Met Ile Phe Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr  
545 550 555 560

Ile Ala Ser Trp Leu Ser Trp Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg Tyr  
565 570 575

Gly Phe Thr Ala Leu Gln His Asn Glu Phe Leu Gly Gln Asn Phe Cys  
580 585 590

Pro Gly Leu Asn Ala Thr Gly Asn Asn Pro Cys Asn Tyr Ala Thr Cys  
595 600 605

Thr Gly Glu Glu Tyr Leu Val Lys Gln Gly Ile Asp Leu Ser Pro Trp  
610 615 620

Gly Leu Trp Lys Asn His Val Ala Leu Ala Cys Met Ile Val Ile Phe  
625 630 635 640

Leu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Leu Leu Phe Leu Lys Lys Tyr Ser  
645 650 655

1

34

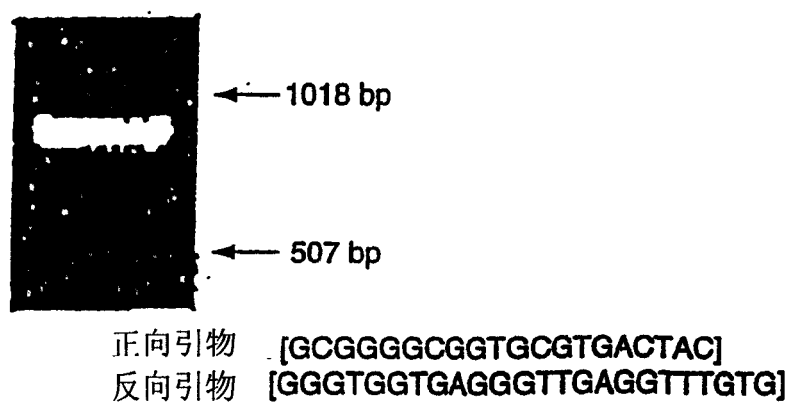
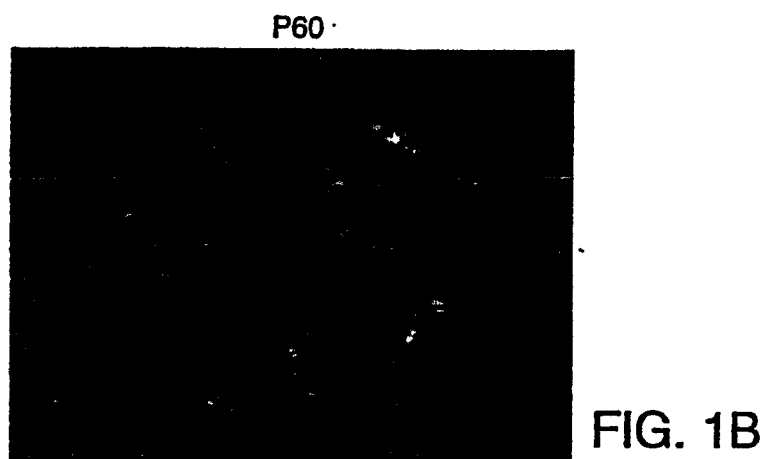
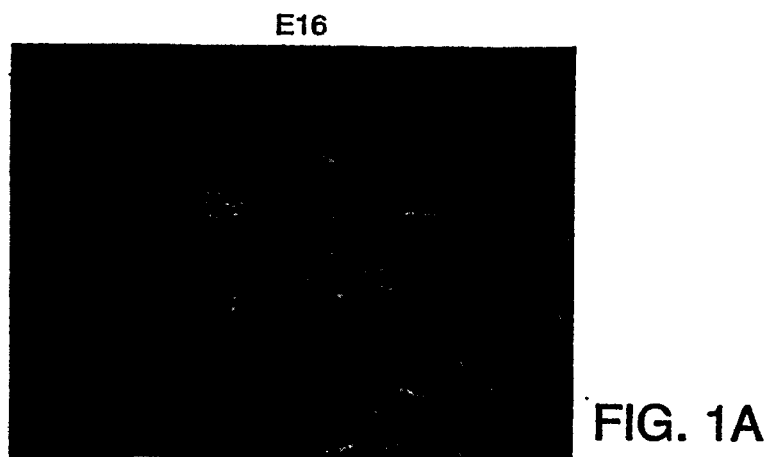


FIG. 2

巢素阳性细胞在体外绕着胰岛扩增



FIG. 3

100x

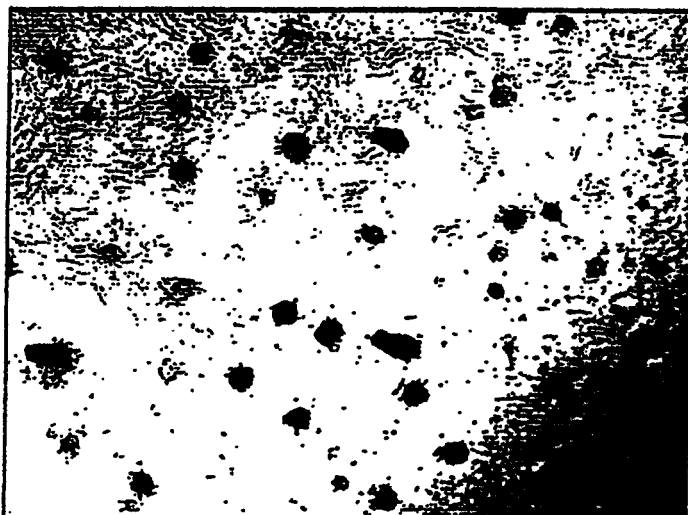


FIG. 4A

200x

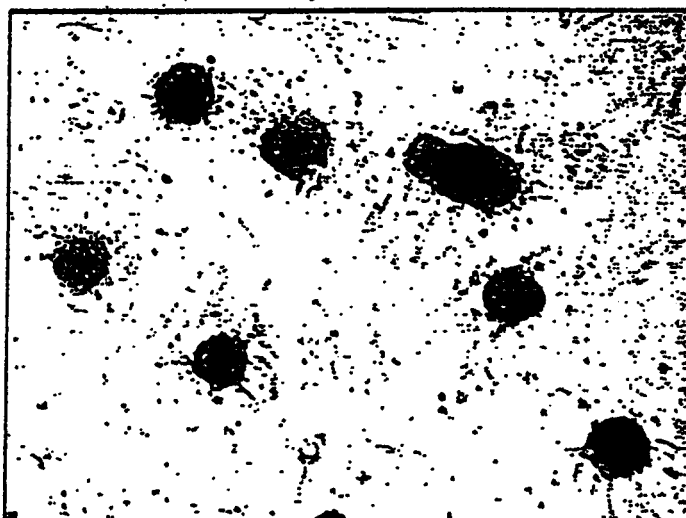


FIG. 4B

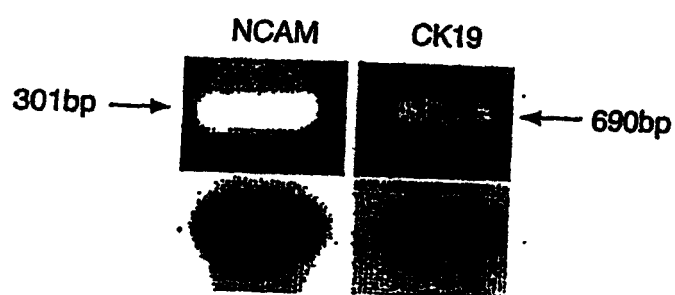


FIG. 5

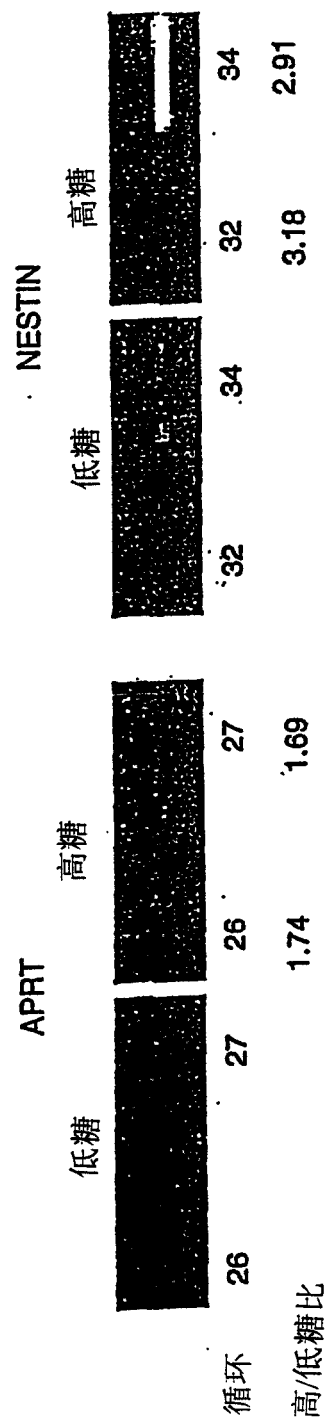


FIG. 6

## Nestin Amino Acid Sequence:

\*MEGCMGEESFQMWELNRRLEAYLGRVKALEEQNELLASAGLGGLR  
 RQSADTSWRAHADDELAALRALVDQRWREKHAAEVARDNLAEELEGVAGRCEQLRL  
 ARERTTEEVARNRRRAVEAEKCARAWLSSQGAELERELEALRVAHEEERVGLNAQAAC  
 APRLPAPPRPPAPAPEVEELARRLGEAWRGAVRGYQERVAHMETS L D Q T R E R L A R A V Q  
 GAR  
 EVRLELQQQAERGGLLERRAALEQRLEGRWQERLRATEKFQLAVEALEQEKQGLQSQ  
 IAQVLEGRQQLAHLKMSLSLEVATYRTLLEAENSRLQTPGGGSKTSLSFQDPKLELQF  
 PRTPEGRRLGSLLPVLSPTSLSPLPATLETVPVPAFLKNQEFLQARTPTLASTPIPT  
 PQAPSPAVIDAEIRAQDAPLSLLQTQGGKQKQAPPLRAEARVAIPASVLPGPPEEPGGQR  
 QEASTQSPEDHASLAPPLSPDHSSLEAKDGESGSRVFSICRGEQEQIWLVEKET  
 AIEGKVVSSLQQEIWEEEDLNRKEIQDSQVPLEKETLKSLGEEIQESLKTLENQSHET  
 LERENQECPRSLEEDLETLSLEKENKRAIKGCGGSETSRKRGCRQLKPTGKEDTQTL  
 QSLQKENQELMKSLEGNLETFLPGTENQELVSSLQENLESLEALEKENQEPLRSPEV  
 GDEEALRPLTKENQEPLRSLEDENKEAFRSLEKENQEPLKTLEEDQSIVRPLETENH  
 KSLRSLEEQDQETLRTLEKETQORRRSLGEQDQMTLRPPEKVDLEPLKSLDQEIARPL  
 ENENQEFLKSLKEESVEAVKSLETEILESLSAGQENLETLSKSPETQAPLWTPPEINK  
 SGGNESSRKGNRRTTGVCSEPRDIQTPGRGESGIIISGSMEPGEFEISRGVDKESQ  
 RNLEEEENLGKGEYQESLRSLEEGLQELPQSAADVQRWEDTVEKDQELAQESPPGMAGV  
 ENKDEAEELNREQDGTGKEEVVEQELNATEEVWFPGEHHPENPEPKEQRLVEGAS  
 VKGGAEGLDQPEGQSQQVGTPLQAPQGLPEAIEPLVEDDVAPGGDQASPEVMLGSEP  
 AMGESAGAEPGLGQGVGGLGDPGHLTREEVMEPPLEESLEAKRVQGLEGRKDLLE  
 AGGLGTEFSELPGKSRDPWEPPREGREESEAEAPRGAEAEAFPAETLGHTGSDAPSPWP  
 LGSEEAEDVPPVLVSPSTYTPILEDAPGLQQAEGSQEASWGVQGRAEAGKVESEQ  
 EELGSGEIPEGLQEEGEESREESEDELGETLPDSTPLGFYLSPTS PRWTPLESRGH  
 PLKETGKEGWDPAVLASEGLEEPSEKEEGEEGEEECGRDSDLSEEFEDLGTEAPFLPG  
 VPGEVAEPLGQVPQLLLDPAAWDRDGEDSGFADEEESGEEGEEDQEEGREPGAGRWGP  
 GSSVGLSLQALSSSQRGFLESDSVSVPWDDSLRGAVAGAPKTALETESQDSAEPG  
 SEESDPVSLEREDKVPGLPSGMEDAGPGADIIGVNGQGNLEGKSQHVNGGVMN  
 GLEQSEESGARNALVSEGDRGSPFQEEEGSALKRSSAGAPVHLGQGGFLKFTQREGDR  
 ESWSSGED"

## Nestin Nucleotide Sequence:

BASE COUNT 1238 a 1176 c 1676 g 764 t ORIGIN 1

atggagggt gcatggggga ggagtggtt cagatgtggg agcicaatg gcgcctggag 61  
 gctacatgg gccgggtcaa ggcgtggag gaggagaatg agctgctag cggcggactc 121  
 ggggggctcc ggcgacaatc cgcggacacc tctggcggg cgcagcga cgacgagctg 181  
 gcggccctgc gtgcgtcgt tgaccaacgc tggcgggaga agcacgggc cgaggtggcg 241  
 cgcgacaacc tggctgaaga gctggaggc gtggcagcc gatcgagca gctgcggctg 301  
 gcccgggagc ggacgacga ggaggtagcc cgcaaccggc gcgcctcga ggcagagaaa  
 361 tgcgcccggg cctggctgag tagccagggg gcagagctgg agcgcgagct agaggctcta  
 421 cgcgtggcgc acgaggagga gcgcgtcgt ctgaacgcgc aggtgctg tgcggggcgc

FIG. 7A



481 ctgcccgcgc cgccccggcc tcccgcgccg gccccggagg tagaggagct ggcaaggcga  
 541 ctggcgagg cgtggcgccg ggagtgccg ggctaccagg agcgcggtgc acacatggag  
 601 acgtcgctgg accagacccg cgagcgccig gcccggcggg lgcagggtgc ccgcgaggtc  
 661 cgcttgagc tgcagcagct ccaggctgag cgcggaggcc tctggagcg cagggcagcg  
 721 ttggaacaga ggttgagggg ccgctggcag gagcggtgc gggctactga aaagtccag  
 781 ctggctgtgg aggccttga gcaggagaaa cagggcctac agagccagat cgctcaggtc  
 841 ctggaaggtc ggagcagct ggcgaccctc aagatgtccc tcagcctgga ggtggccacg  
 901 tacaggaccc tctggaggc tgagaactcc cggctgcaa cacctggcgg tggctccaag  
 961 acttccctca gcttcagga cccaagctg gagctgcaat tccctaggac ccagaggggc  
 1021 cggcgcttgg gatctttgct cccagtcctg agcccaacti ccccccctc acccttgct  
 1081 gctacccttg agacacctgt gccagcctti ctaagaacc aagaattct ccaggcccgt  
 1141 accctaccti.tggccagcac cccatcccc cccacacctc aggcaccctc tctgtctgta  
 1201 gatgcagaga tcagagccca ggaigtctct ctctctctgc tccagacaca ggttgaggg  
 1261 aaacaggctc cagagccctt gcgggctgaa gccagggtgg ccatcctgc cagcgtcctg  
 1321 cctggaccag aggagcctgg ggccagcgg caagaggcca gtacaggcca  
 gtcaccagag 1381 gaccatgctt ccttgccacc accctcagc cctgaccact ccagtttaga  
 ggctaaggat 1441 ggagaatccg gtgggtctag agtggtcagc atatgccag gggaagggtga  
 agggcaaatc 1501 tgggggttgg tagagaaaga aaagccata gagggcaag tggtaagcag  
 ctgcagcag 1561 gaaatatggg aagaagagga tctaaacagg aaggaaatcc aggactccca  
 ggttcccttg 1621 gaaaaagaaa cctgaagtc tctggagag gagattcaag agtactgaa  
 gactctgga 1681 aaccagagcc atgagacact agaaaggag aatcaagaat gtcgagggtc  
 tttagaagaa 1741 gacttagaaa cactaaaaag tctagaaaag gaaaataaaa gagctattaa  
 aggatgtgga 1801 ggtagtgaga cctctagaaa aagaggctgt aggcactta agcctacagg  
 aaaagaggac 1861 acacagacat tgcaatccct gcaaaggag aatcaagaac taatgaatc  
 tcttgaaggt 1921 aatctagaga cattttatt tccaggaacg gaaaalcaag aattagtaag  
 ttctctgcaa 1981 gagaacttag agtcatgac agtcttgaa aaggagaatc aagagccact  
 gagatctcca 2041 gaagttaggg atgaggaggc actgagacct ctgacaaagg agaalcagga  
 acccttgagg 2101 tctctgaag atgagaacaa agaggcctti agatctctag aaaaagagaa  
 ccaggagcca 2161 ctgaagactc tagaagaaga ggaccagagt attgtagac cctagaaac  
 agagaatcac 2221 aaatcactga ggtctttaga agaacaggac caagagacat tgagaactct  
 tgaaaagag 2281 actcaacagc gacggaggtc tctaggggaa caggatcaga tgacattaag  
 acccccagaa 2341 aaagtggatc tagaaccact gaagtctctt gaccaggaga tagctagacc  
 tcttgaaaat 2401 gagaatcaag agttctttaa gicactcaa gaagagagcg tagaggcagt  
 aaaatctta 2461 gaaacagaga tctagaatc actgaagcti gcgggacaag agaacctgga  
 aacactgaaa 2521 tctccagaaa ctcaagcacc actgtggact ccagaagaaa taaataaatc  
 agggggcaat 2581 gaatcctcta gaaaaggaaa ticaagaacc actggagtct gtggaagtga  
 accaagagac 2641 attcagactc ctggaagagg agaatcagga atcattgaga tctctgggag  
 catggaacct 2701 ggagaatttg agatctccag aggagtagac aaggaaagtc aaaggaatct  
 ggaagaggaa 2761 gagaacctgg gaaagggaga gtaccaagag tctagtgggt ctctggagga  
 ggaggagac 2821 gagctgccgc agtctgcaga tgtgcagagg tgggaagata cggtaggaa  
 ggaccaagaa 2881 ctggctcagg aaagccctcc tgggatggct ggagtggaaa ataaggatga  
 ggcagagctg 2941 aatctaaggg agcaggatgg ctctactggg aaggaggagg tggtagagca  
 gggagagctg 3001 aatgccacag aggaggtctg gtcccaggc gaggggcacc

FIG. 7B

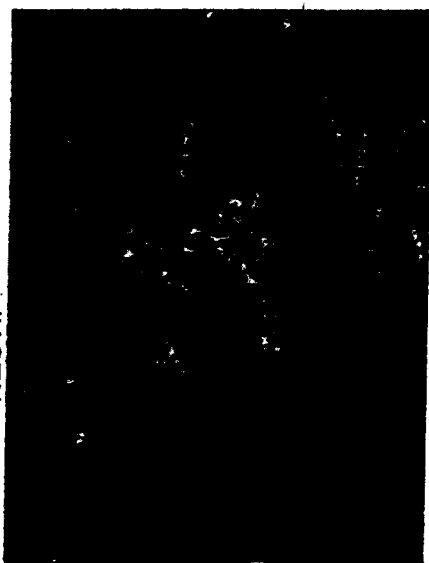
```

cagagaaccc tgagccaaa 3061 gagcagagag gcctgggtga gggagccagt
gtgaaggagg gggctgaggg cctccaggac 3121 cctgaagggc aatcacaaca
ggtaggggacc ccaggccctcc aggcctccca ggggctgcca 3181 gaggcgatag agccctggt
ggaagatgat gtggcccccag ggggtgacca agcctccca 3241 gaggtcatgt tggggtcaga
gcctgccatg ggtgagctcg ctgcgggagc tgagccaggc 3301 ctggggcagg gggtagggagg
gctgggggac ccaggccatc tgaccaggga agaggtgatg 3361 gaaccacccc
tggaagagga gagtttgag gcaagagggg ttcaggggctt ggaagggcct 3421 agaaaggacc
tagaggaggc aggtggctcg gggacagagt tctccagct gcctgggaag 3481 agcagagacc
cttgggagcc tccaggggag ggtaggagg agtcagaggc tgaggccccc 3541
aggggagcag aggagggcgtt cctgctgag accctgggccc acactggaag tgatgcccct 3601
tcacctggc cctggggtc agaggaagct gaggaggatg taccaccagt gctggctccc 3661
cccagcccaa cgtacacccc gatcctggaa gatgcccctg ggctccagcc tcaggctgaa 3721
gggagtcagg aggtagctg gggggtgag gggagggtcg aagctgggaa agtagagagc 3781
gagcaggagg agttgggttc tggggagatc cccgagggcc tccaggagga aggggaggag 3841
agcagagaag agagcgagga ggtagagctc ggggagaccc ttccagact cactcccctg 3901
ggctctacc tcaggctccc cactccccc aggtggaccc cactggagag cagaggccac 3961
cccccaagg agactggaaa ggagggtcg gatcctgctg tctggctc cgagggcctt 4021
gaggaaccct cagaaaagga ggagggggag gaggaggaag aggagtgtg-ccgtgacct
4081 gacctgtcag aagaatttga ggacctgggg actgaggcac ctttctcc tgggtccct
4141 ggggagggtg cagaacctct gggccagggtg cccagctgc tactggatcc tgcagcctg
4201 gatcgatg gggagctga tgggtttgca gatgaggaag aaagtgggga ggagggagag
4261 gaggatcagg aggaggggag ggagccagg gctgggcgtt gggggccagg gtctctgtt
4321 ggcagcctcc aggcctgag tagctcccag agagggaal tctggagtc tgatctgta
4381 agtgcagcg tccctggga tgacagctg aggggtgag tggctggtc cccaagact
4441 gccctggaaa cggagtcga ggacagtgt gagcctctg gtcagagga agagtctgac
4501 cctgtttct tggagaggga ggacaaagtc cctggccctc tagagatccc cagtgggatg
4561 gaggatgcag gccaggggc agacatcatt ggtgttaatg gccagggtcc caactggag
4621 gggaagtcac agcatgtaaa tgggggagta atgaacgggc tggagcagtc tgaggaaagt
4681 ggggcaagga atgcgctagt cctgagga gaccgaggga gccctttca ggaggaggag
4741 gggagtgtc tgaagaggc ttcggcagg gctcctgtc acctgggcca ggttcagtc
4801 ctgaagtica ctgagaggga aggatagaga ggtcctggt cctcaggga ggac //

```

FIG. 7C

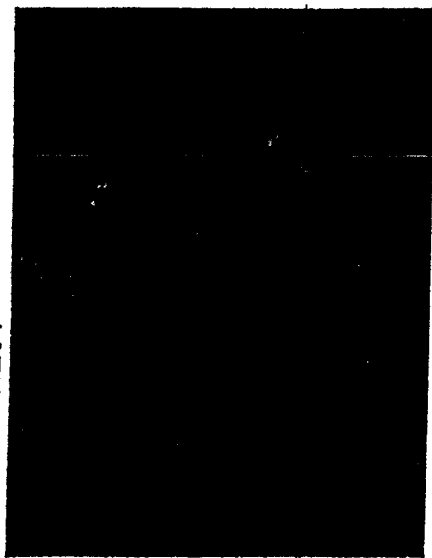
巢素/胰岛素



E16

FIG. 8A

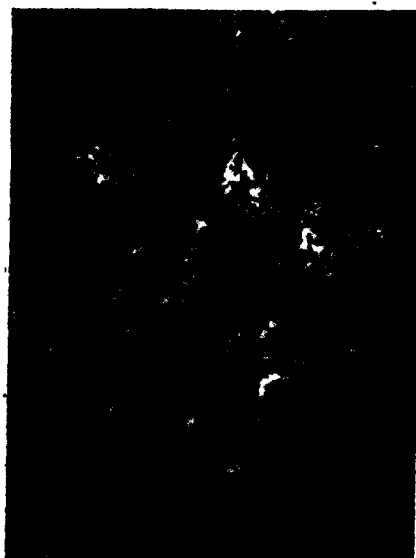
巢素/胰岛素



P60

FIG. 8B

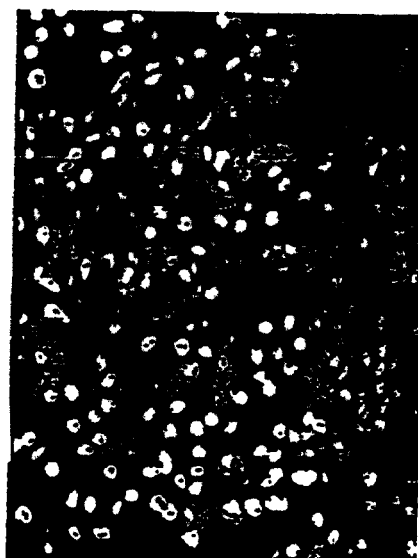
巢素/胶原蛋白 IV



P60

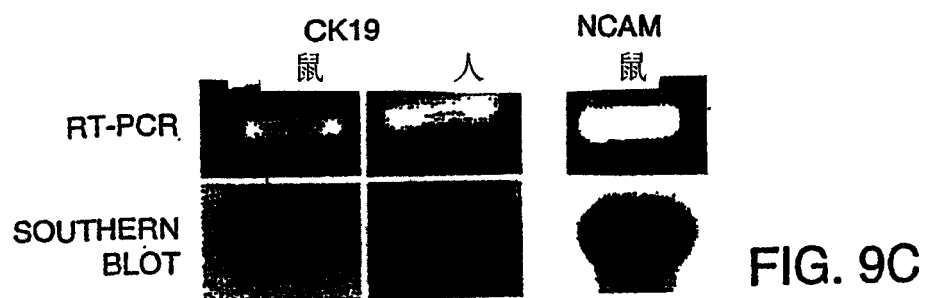
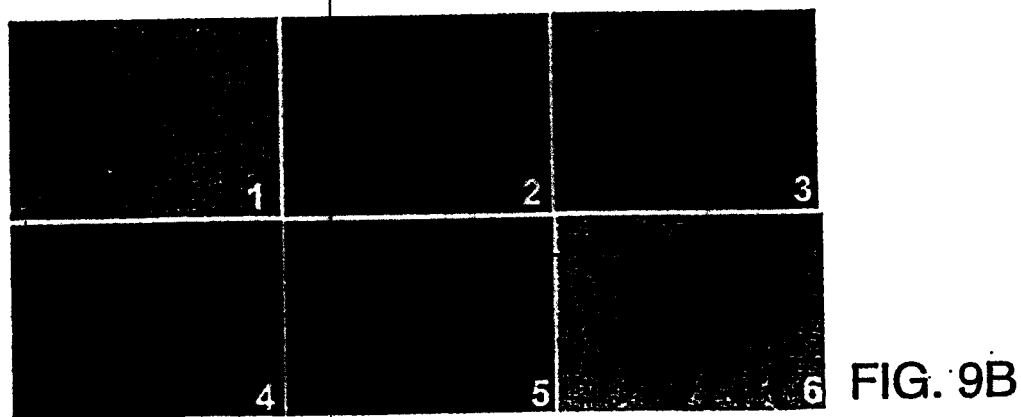
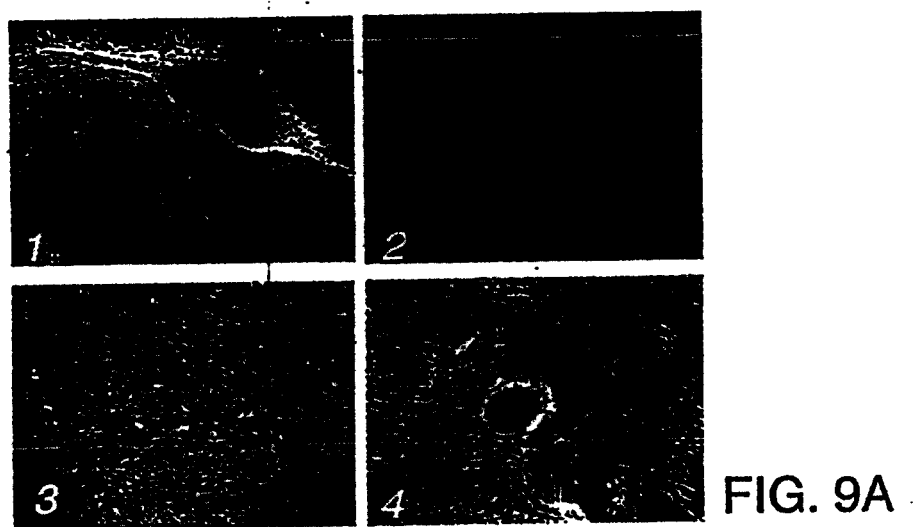
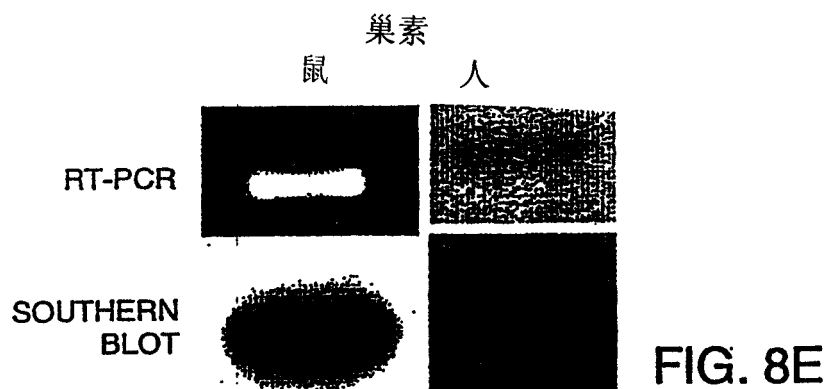
FIG. 8C

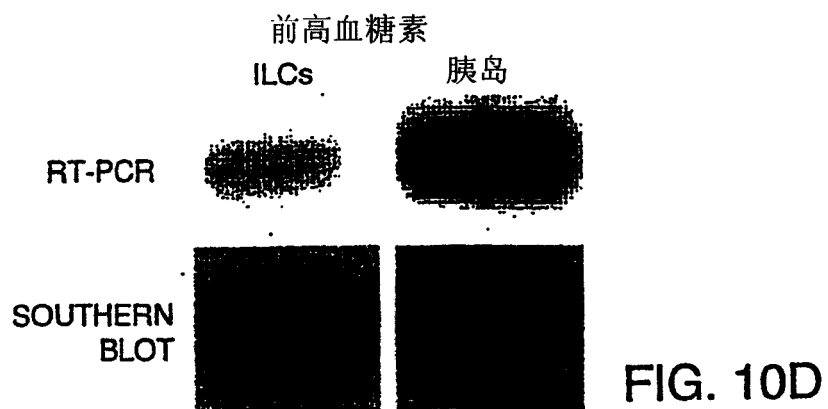
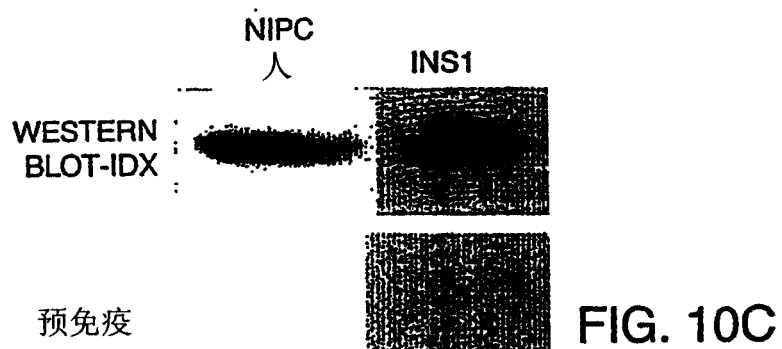
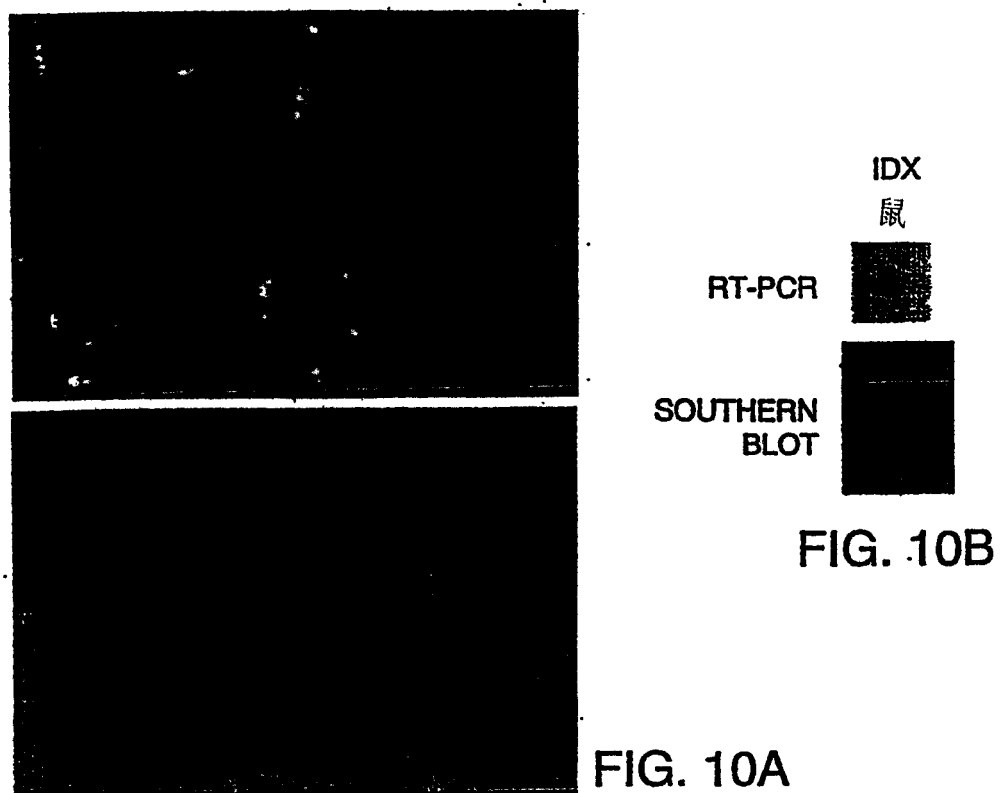
巢素/细胞核

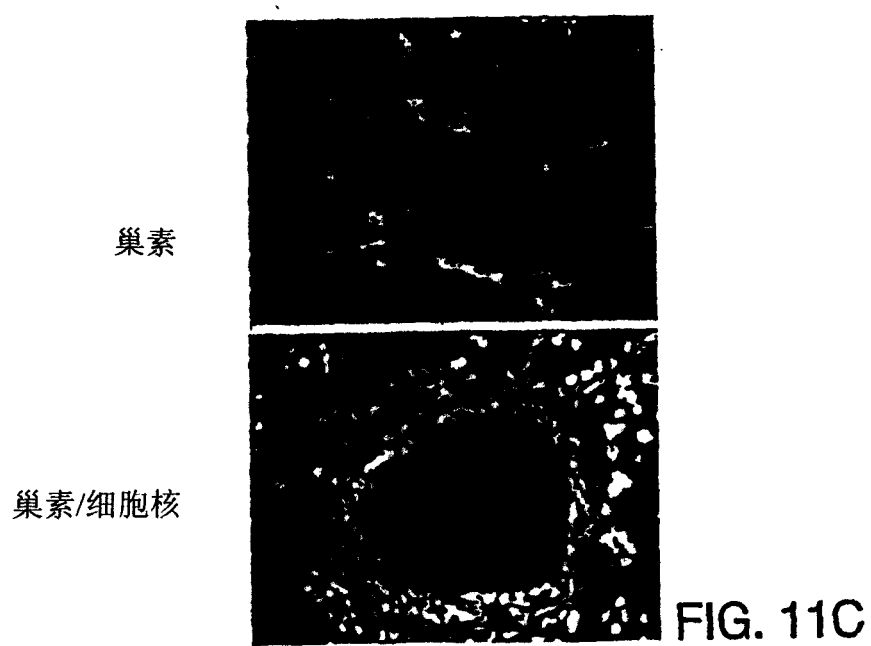
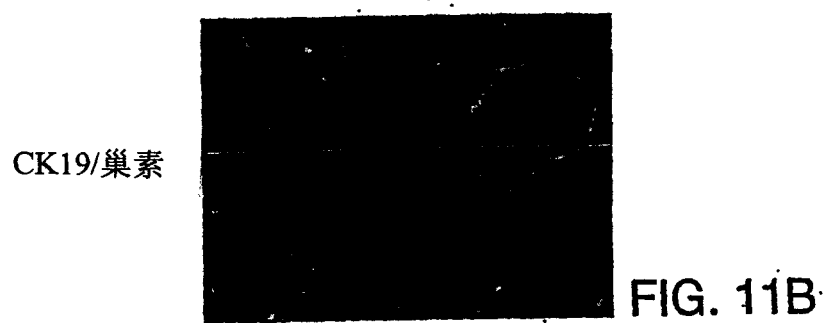
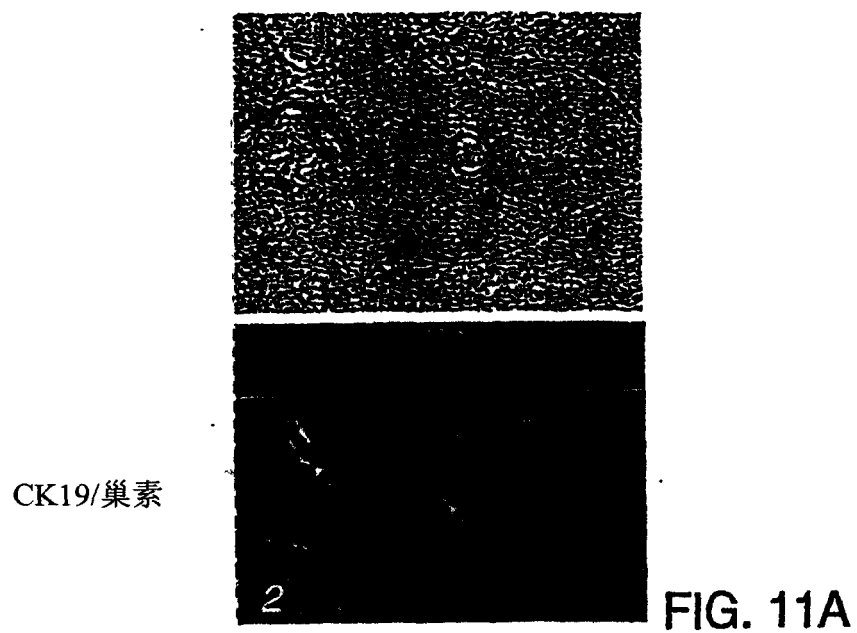


P60

FIG. 8D







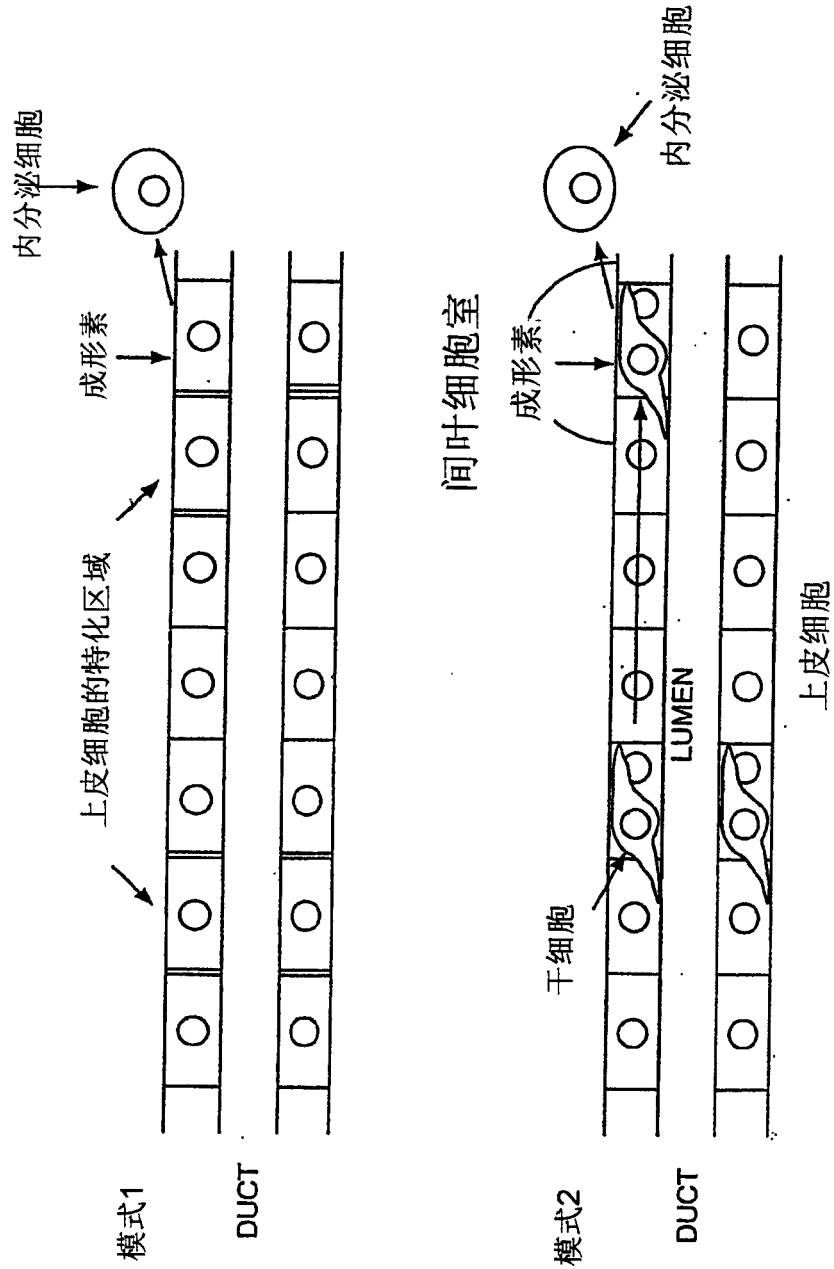


FIG. 12



FIG. 13A



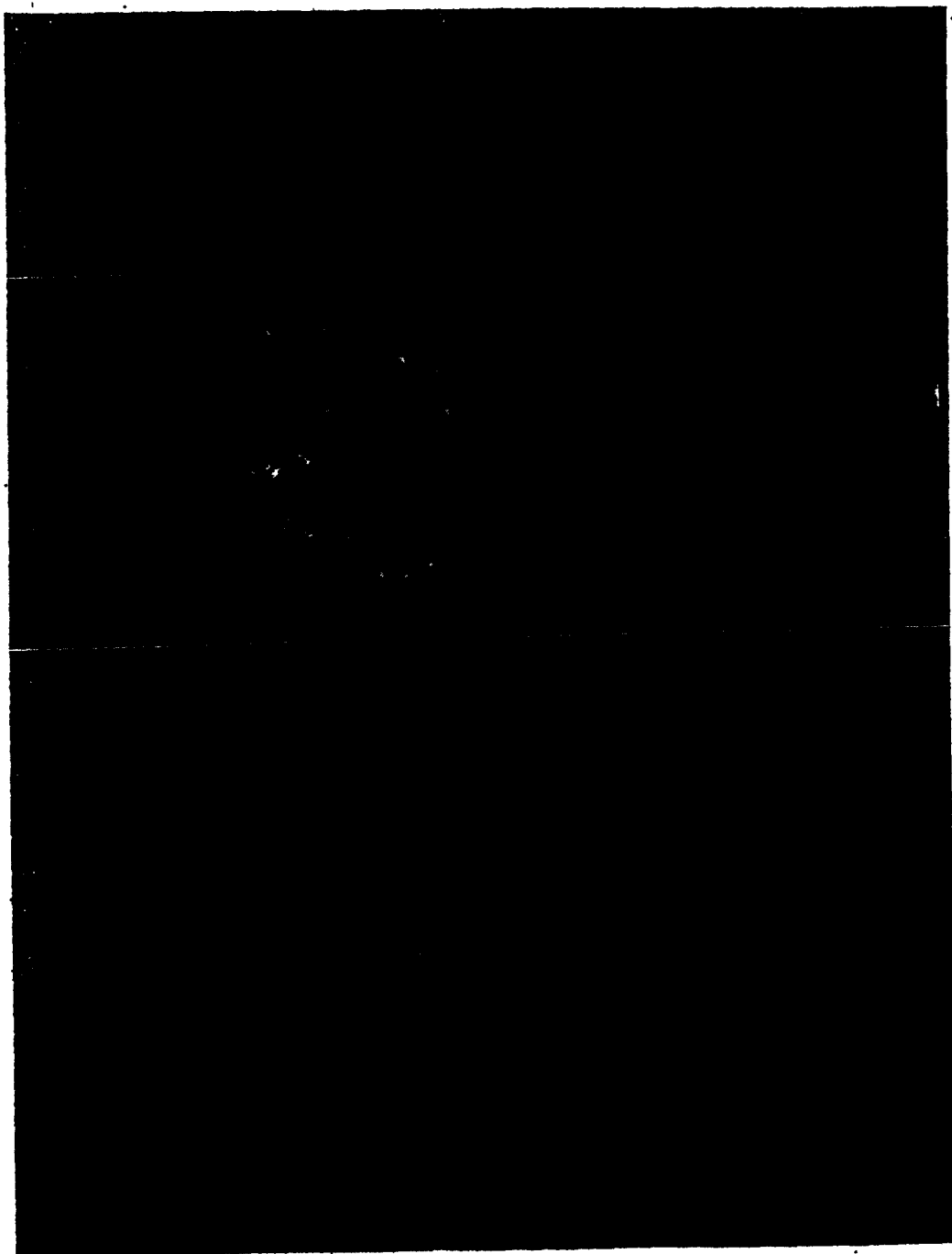


FIG. 13B

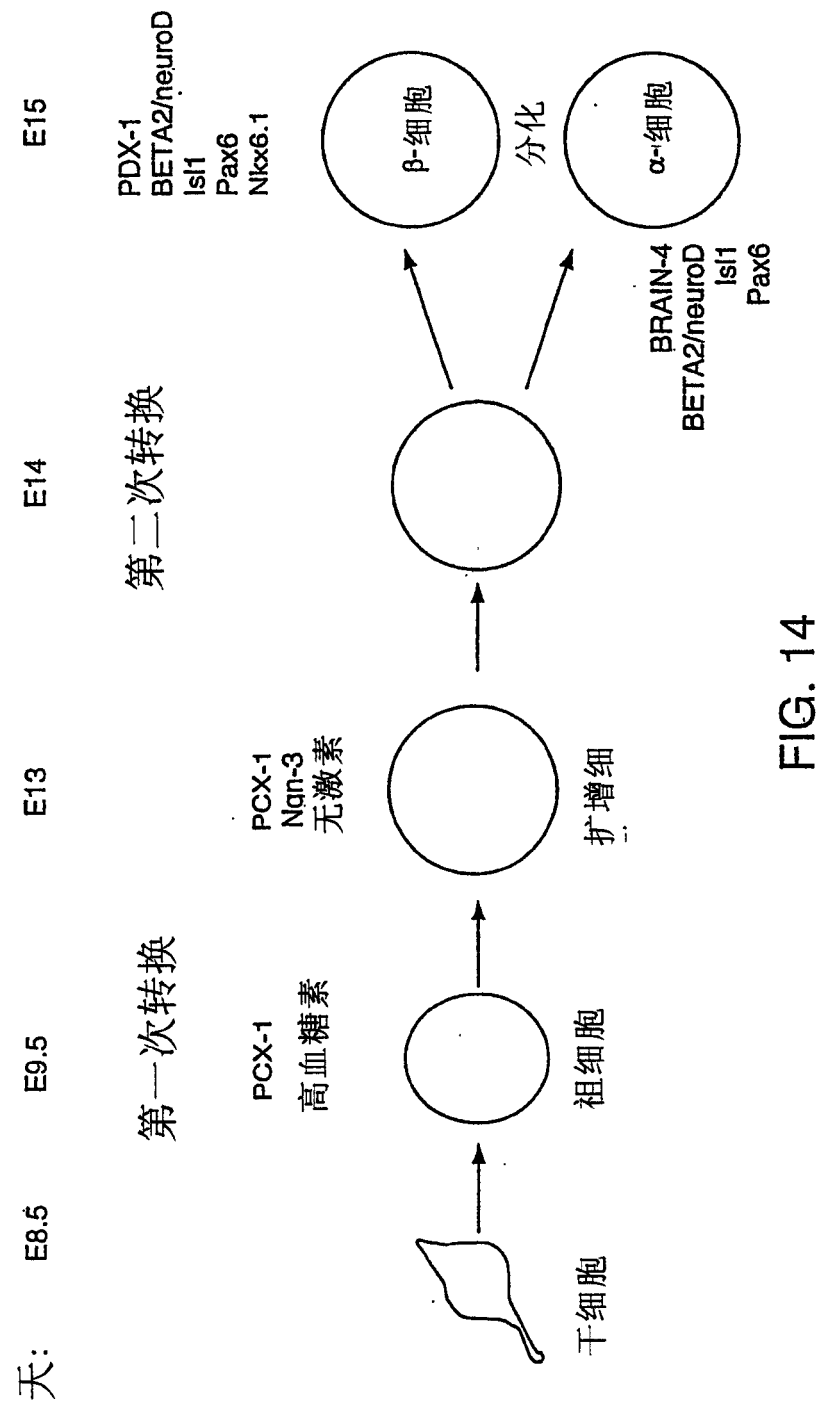
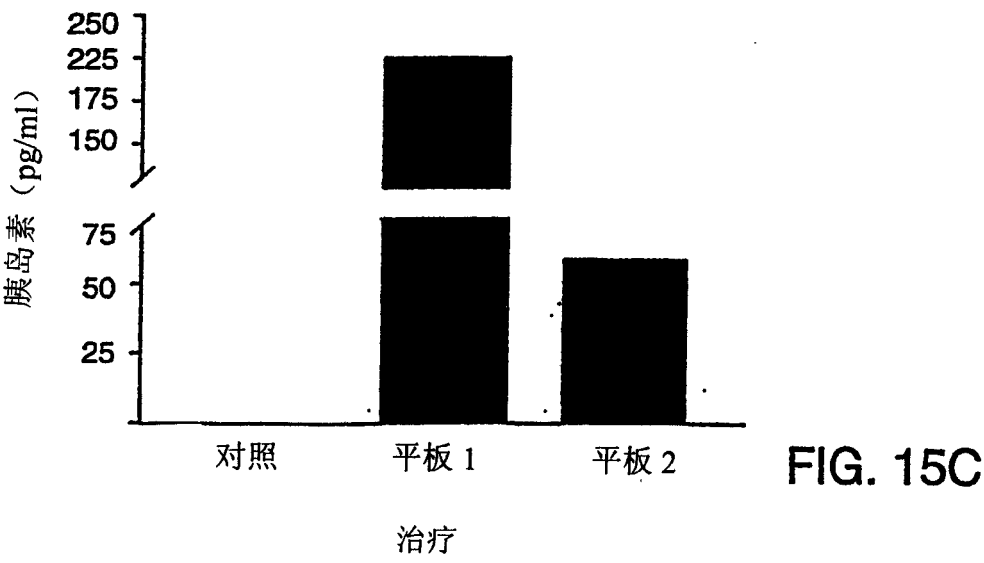
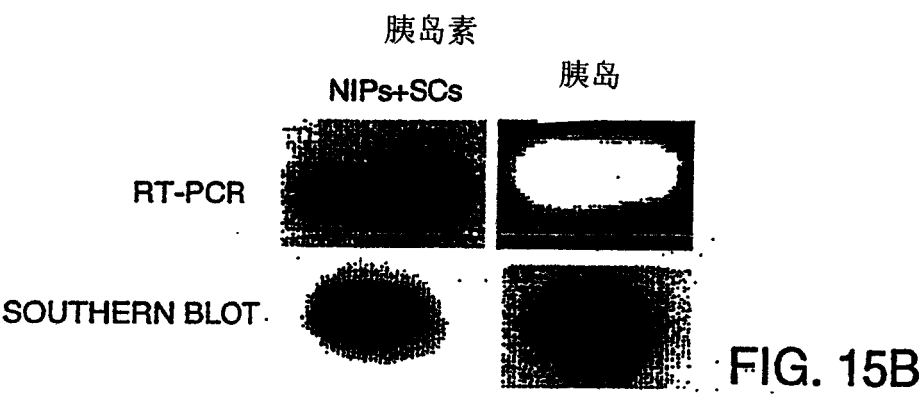
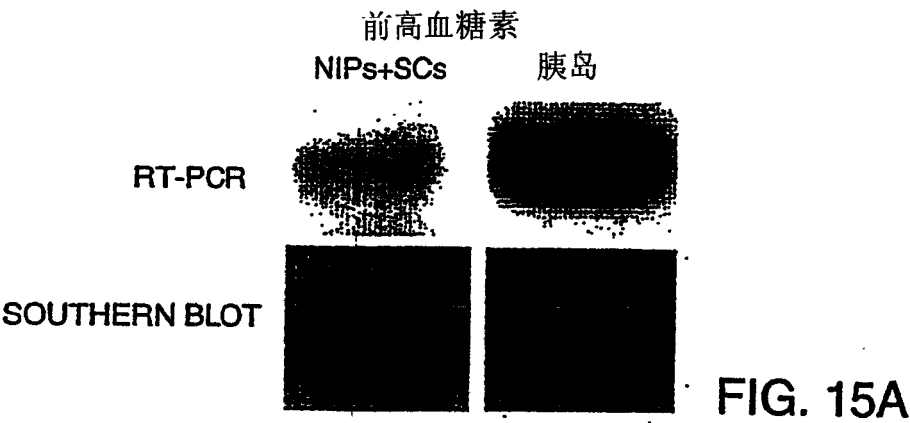


FIG. 14



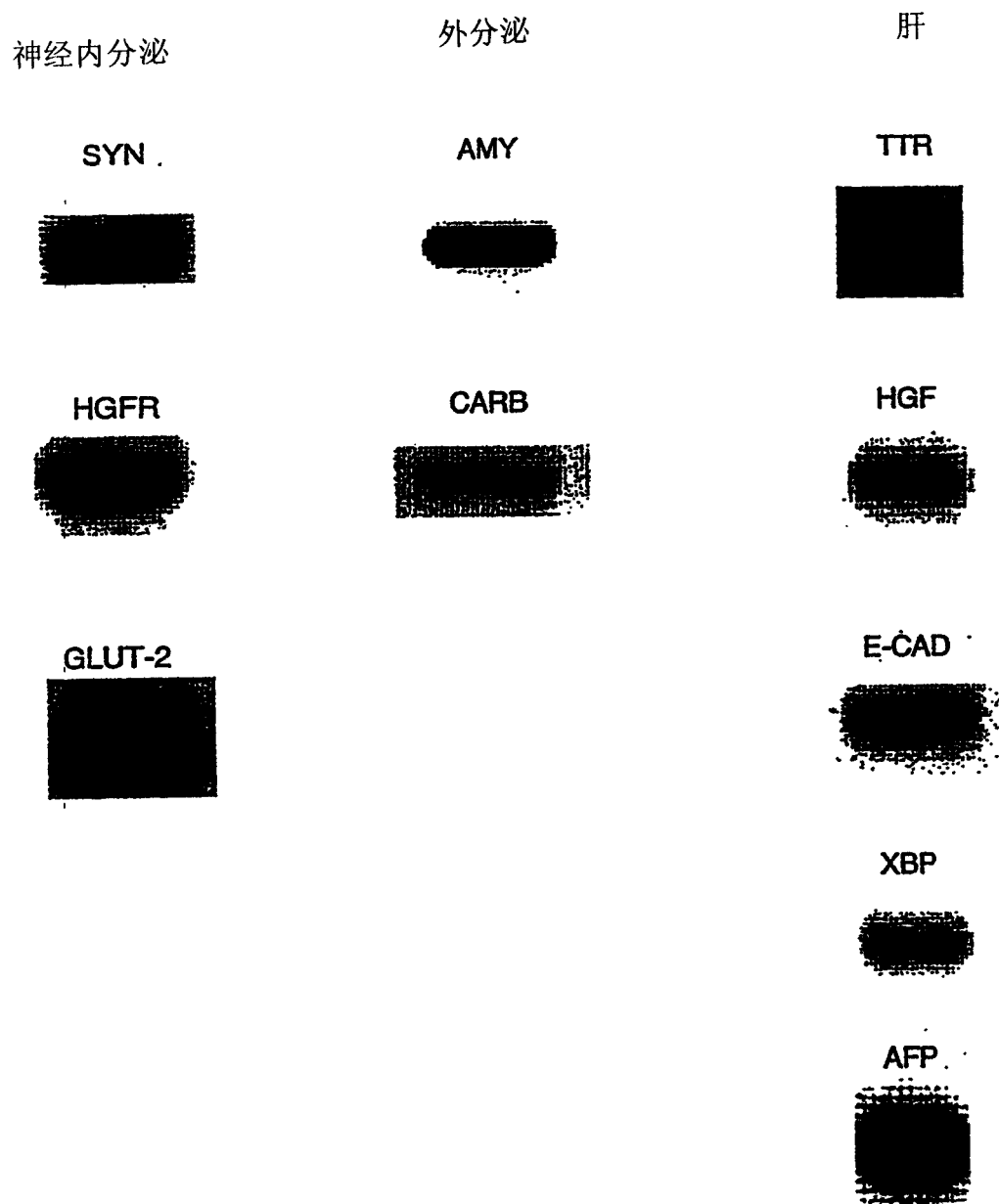


FIG. 16

- ABCG2 (Bcrp1) ATP 结合盒: SP 干细胞标记
- Oct 3/4: pou/同源域转录因子 (ES 细胞标记)
- GLP-1 受体: 7 MS GPCR
- latrophilin (2 型): 7 MS GPCR
- Hes-1: bHLH 转录因子
- 巢素: 中间丝蛋白
- 整联蛋白  $\alpha 6 \beta 1$ : laminen 受体 (CD20)
- C-kit(CD117):干细胞因子受体
- MDR-1: 多药耐受性转运子
- SST-R,2,3,4: 生长抑制素受体
- SUR-1: 磺脲受体
- Kir6.2: 有 SUR-1 的内矫正 K<sup>+</sup>通道亚单元
- 对 CD34, CD45, CD133, MHC I & II 阴性

## A

TTTAGGAACGCACCGTGCACATGCTTGGTGGTCTTGTTAAGTGGAAACTGCTGCTTTAGAGTTTGTTTGG  
AAGGTCCGGGTGACTCATCCCAACATTTACATCCTTAATTGTTAAAGCGCTGCCCTCCGAGCGCACGCATC  
CTGAGATCCTGAGCCTTTGGTTAAGACCGAGCTCTATTAAGCTGAAAAGATAAAAACCTCTCCAGATGTCT  
TCCAGTAATGTCTGAAGTTTTTATCCAGTGTCAACAAGGAAACACCAATGGCTTCCCCGCGACAGCTTCCA  
ATGACCTGAAGGCATTTACTGAAGGAGCTGTGTAAAGTTTTTCATAACATCTGCTATCGAGTAAAAC TGAA  
GAGTGGCTTTCTACCTTGTCGAAAACAGTTGAGAAAAGAAATATTATCGAATATCAATGGGATCATGAAA  
CCTGGTCTCAACGCCATCTCGGACCCACAGGTGGAGGCAAATCTTCGTTATTAGATGTCTTAGCTGCAA  
GGAAAGATCCAAGTGGATTATCTGGAGATGTTCTGATAAATGGAGCACCGCGACCTGCCAATTTCAAATG  
TAATTCAGGTTACGTGGTACAAGATGATGTTGTGATGGGCACTCTGACGGTGAGAGAAAACCTTACAGTTC  
TCAGCAGCTCTTCGGCTTGCAACAACATATGACGAATCATGAAAAAACGAACGGATTACAGGGTCATTC  
AAGAGTTAGGTCTGGATAAAGTGGCAGACTCCAAGGTTGGAACCTCAGTTTATCCGTGGTGTGTCTGGAGG  
AGAAAGAAAAGGACTAGTATAGGAATGGAGCTTACTGATCCTTCCATCTTGTTCTTGGATGAGCCT  
ACAACCTGGCTTAGACTCAAGCACAGCAAATGCTGTCTTTTGTCTCTGAAAAGGATGTCTAAGCAGGGAC  
GAACAAATCATCTTCTCCATTATCAGCCTCGATATTCATCTTCAAGTTGTTTGATAGCTCACCTTATT  
GGCTCAGGAAGACTTATGTTCCACGGGCTGTCTCAGGAGGCTTGGGATACTTTGAATCAGCTGGTTAT  
CACTGTGAGGCCCTATAATAACCCTGCAGACTTCTTCTTGACATCATTAATGGAGATTCCTACTGCTGTGG  
CATTAACAGAGAAGAAGACTTTAAAGCCACAGAGATCATAGAGCCTTCCAAGCAGGATAAGCCACTCAT  
AGAAAAATTAGCGGAGATTTATGTCAACTCCTCCTTCTACAAAGAGACAAAAGCTGAATTACATCAACTT  
TCCGGGGGTGAGAAGAAGAAGATCACAGTCTTCAAGGAGATCAGCTACACCACCTCCTTCTGTCTATC  
AACTCAGATGGGTTTCCAAGCGTTTATTCAAAAACCTGCTGGGTAATCCCAGGCCTCTATAGCTCAGAT  
CATTTGCACAGTCTGACTGGGACTGGTTATAGGTGCCATTTACTTTGGGCTAAAAAATGATTCTACTGGA  
ATCCAGAACAGAGCTGGGGTTCTCTTCTTCTGACGACCAACCAGTGTTTCAGCAGTGTTTCAGCCGTGG  
AACTCTTTGTGGTAGAGAAGAAGCTCTTCATACATGAATACATCAGCGGATACTACAGAGTGTCTATCTTA  
TTTCTTGGAAAAC TGTTATCTGATTTATTACCCATGAGGATGTTACCAAGTATTATATTTACCTGTATA  
GTGTACTTCATGTTAGGATTGAAGCCAAAGGCAGATGCCTTCTTCGTTATGATGTTTACCTTATGATGG  
TGGCTTATTCAGCCAGTTCCATGGCACTGGCCATAGCAGCAGGTGAGAGTGTGGTTTCTGTAGCAACACT  
TCTCATGACCATCTGTTTTGTGTTTATGATGATTTTTTCAGGTCTGTTGGTCAATCTCACAACCATTGCA  
TCTTGGCTGTCTATGGCTTCACTTTCAGCATTCCACGATATGGATTTACGGCTTTCAGCATAATGAAT  
TTTTGGGACAAAACCTCTGCCCAGGACTCAATGCAACAGGAAACAATCCTTGTAACATATGCAACATGTAC  
TGGCGAAGAATATTTGGTAAAGCAGGGCATCGATCTCTACCCTGGGGCTTGTGGAAGAATCACGTGGCC  
TTGGCTTGATGATTGTTATTTTCTCACAATTGCCTACCTGAAATTGTTATTTCTTAAAAAATATTCTT  
AAATTTCCCTTAATTCAGTATGATTTATCTCACAATAAAAAAGAAGCACTTTGATTGAAGTATTCATTC  
AAGTTTTTTTGTGTGTTTCTGTTCCCTTGCCATCACACTGTTGCACAGCAGCAATTGTTTTAAAGAGATA  
CATTTTTAGAAATCACAACAACTGAATTAAACATGAAAGAACCAAGACATCATGTATCGCATATTAGT  
TAATCTCTCAGACAGTAACCATGGGGAAGAAATCTGGTCTAATTTATTAATCTAAAAAAGGAGAATTGA  
ATTCTGGAAACTCCTGACAAGTTATTACTGTCTCTGGCATTGTTTCTCATCTTTAAATGAATAGGTA  
GGTTAGTAGCCCTTCAGTCTTAATACTTTATGATGCTATGGTTTGCCATTATTTAATAAATGACAAATGT  
ATTAATGCTATACTGGAAATGTAAATTTGAAATATGTTGGAAAAAGATTCTGTCTTATAGGGTAAAAA  
AAGCCACCGTGATAGAAAAAAATCTTTTTGATAAGCACATTAAAGTTAATAGAACTT

**B**

MSSSNVEVFIPVSQGNTNGFPATASNDLKAFTEGAVLSFHNICY  
RVKLKSGFLPCRKPVEKEILSNINGIMKPGLNAILGPTGGGKSSLLDVLAARKDPSGL  
SGDVLINGAPRPANFKCNSGYVVQDDVVMGTLTVRENLQFSAALRLATTMTNHEKNER  
INRVIQELGLDKVADSKVGTQFIRGVSGGERKRTSIGMELITDPSILFLDEPTTGLDS  
STANAVLLLLKRMSKQGRTHFSIHQPRYSIFKLFDSTLLASGRLMFHGPAQEALGY  
FESAGYHCEAYNNPADFFLDIINGDSTAVALNREEDFKATEHIEPSKQDKPLIEKLA  
IYVNSSFYKETKAELHQLSGGEKKKKITVFKEISYTTSFCHQLRWVSKRSFKNLLGNP  
QASIAQIIVTVVLGLVIGAIYFGLKNDSTGIQNRAGVLFFLTNQCFSVSAVELFVV  
EKKLFIHEYISGYRVSSYFLGKLLSDLLPMRMLPSIIFTCIVYFMLGLKPKADAFV  
MMFTLMMVAYSASSMALAIAAGQSVVSVATLLMTICFVFMMIFSGLLVNLTIIASWLS  
WLQYFSIPRYGFTALQHNEFLGQNFCPGLNATGNNPCNYATCTGEEYLVKQGIDLSPW  
GLWKNHVALACMIVIFLTIAYLKLLFLKKYS

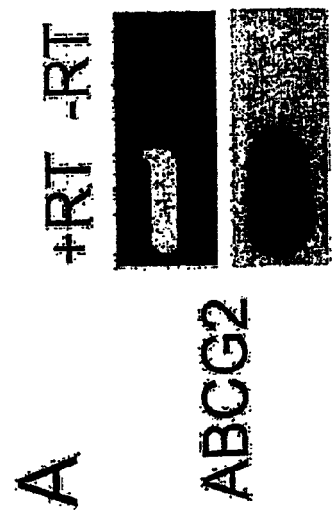
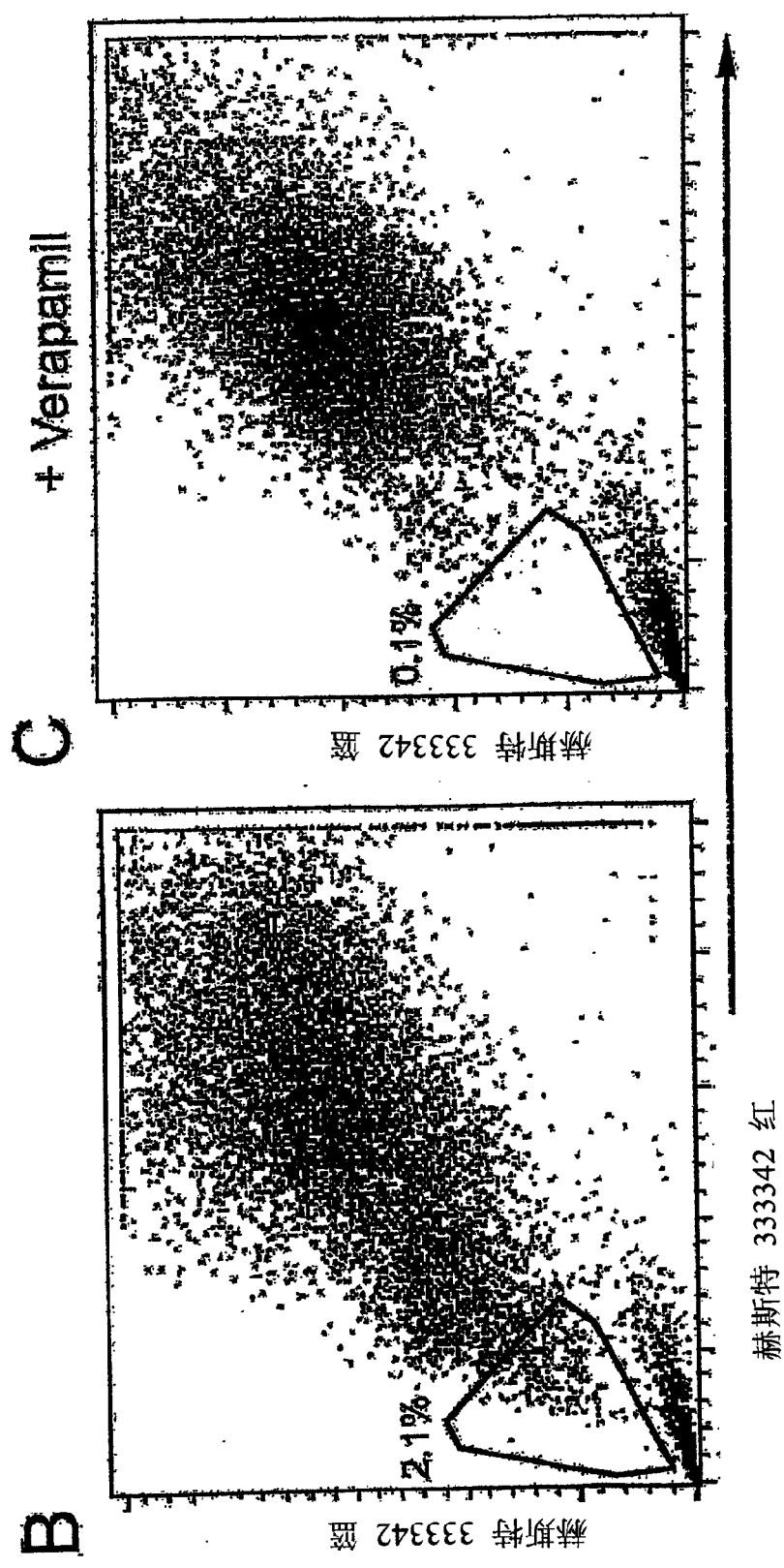


Figure 19





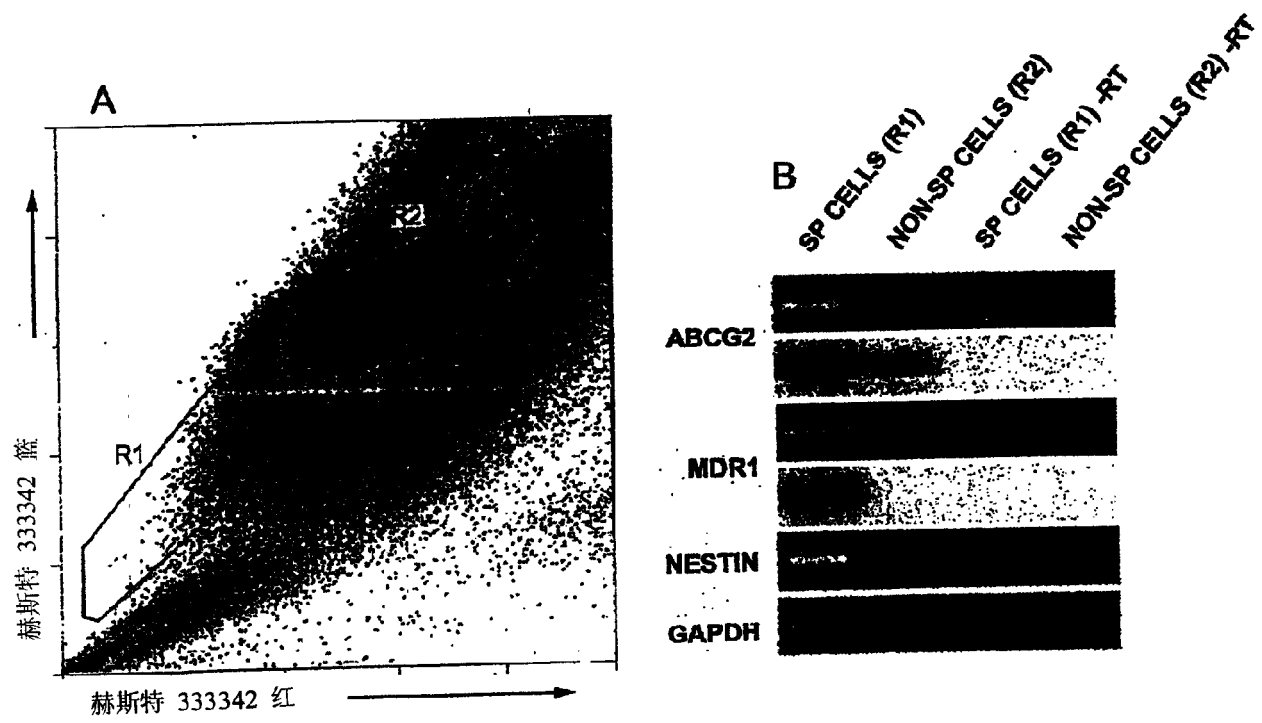


FIG.20

FIG. 21

A.

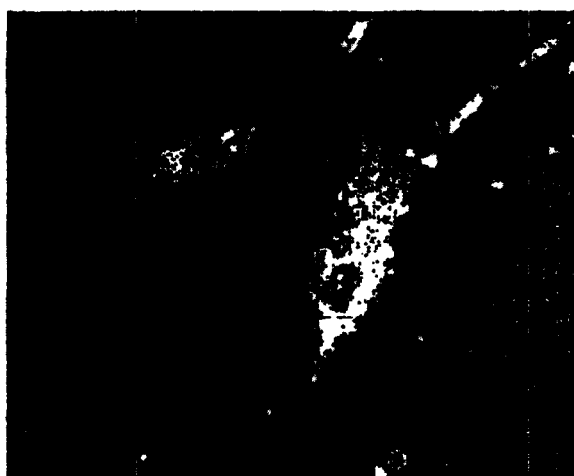
atggccggcgcccccggcccgtgcgccttgcgctgctgctgctcgggatgggtgggcaggcgccggcccccaggggtgccaactg  
 tgtccctctgggagacgggtgcagaaatggcgagaataccgacgccagtgccagcgctccctgactgaggatccacctctgcccacagact  
 tgttctgcaaccggaccttcgatgaatacgcctgctggccagatggggagccaggtcgttcgtgaatgtcagctgcccctggtacctgccc  
 tgggccagcagtggtccgcagggccacgtgtaccggttcgcacagctgaaggcctctggctgcagaaggacaactccagcctgcccctg  
 gagggacttgctcgagtgccgaggagtcgaagcaggggagagaagctccccggaggagcagctcctgttccctacatcatctacacgg  
 tgggctacgcactctccttctctgctctggttatcgcctctgcgatcctcctcggttcagacacctgcactgcaccaggaactacatccact  
 gaacctgtttgcatccttcacctgcgagcatgttcggttcacaaaggacgcagccctgaagtggatgtatagcacagccgccagcagc  
 accagtgggatgggtcctctcctaccaggactctctgagctgccgcctgggtttctgctcatgcagtactgtgtggcgcccaattactactg  
 gctcttggtggaggcggtgtacctgtacacactgtggccttctcggcttctctgagcaatggatcttcaggctctacgtgagcataggctgg  
 ggtgtccctgctgtttgtgtccctggggcattgtcaagtaacctctatgaggacgagggtctgctggaccaggaactccaacatgaactac  
 tggctcattatccggctgcccattctcttggcatgggggtgaacttctcatctttgttcgggtcatctgcatctgtgtatccaaactgaaggcc  
 aatctcatgtgcaagacagacatcaaatgcagacttgccaagtccacgctgacactcatccccctgctggggactcatgaggtcatctttgcc  
 tttgtatggagcagcagcccgggggaccctgcgcttcacaaagctgtttacagagctctccttcacctcctccaggggctgatggtggcc  
 atcttatactgctttgtcaacaatgaggtccagctggaatttcggaagagctgggagcgctggcggttgagcacttgcacatccagaggga  
 cagcagcatgaagcccccaagtgtccaccagcagcctgagcagtgaggccacggcgggcagcagcatgtacacagccacttgcag  
 gcctcctgcagctgagactccagcgctgcccctcctggggtccttgcctgcaggccgggtggccaatccaggagaagcagcctcctaattt  
 gatcacagtggcgagaggagagggaaaaacgatcgtgtgaaaatgaggaggattgcttctgtgaaaccacaggcccttgggggtcccc  
 agacagagccgcaaatcaacccagactcaactcaaggtcaacggcttattagtgaactggggcttgaagaggaggtggttctgaaa  
 gtggctcttctaacctcagccaaacacagagcgggagtgacgggagcctcctctgcttgcatacttggggtcaccacctccccctgtctct  
 ctcaagggaagctgtttgtgtgtctgggtgcttatttccctcatcttgcctcactgcccagttctttttgaggggctttgtttggcc  
 actgccagcagctgtttctggaatggctgtaggtggtgtgagaagaatgagcattgagacggtgctcgtctcctccaggtattttagtt  
 gtttggctgctgctctgcatgccagagaatcagggcaggcttgccaccggggaaccagccctggggtatgagctgccaagtctattt  
 taaagaogctcaagaatcctctgggggtcatctaggacacgttaggaatgtccagactgtgggtgtagattacctgccactccaggagcc  
 cagagggccaagagagacattgctccacctctccttggaaatacttctgtgaccacacgctgtctcttgagaatttgatacactctctag  
 cttaggggacatgaagagactctcttagggaaccaatagtcctccatcagcaccatggaggcaggtccccctgctttgaaattcccc  
 acttgggagcttgatafatactcactcacttttcttattgctgtgaatagctgtgtgcacaaatgggcaattctgacttctcccatctagtggaaatg  
 agcgaaatcatggtgttagttagttg

B

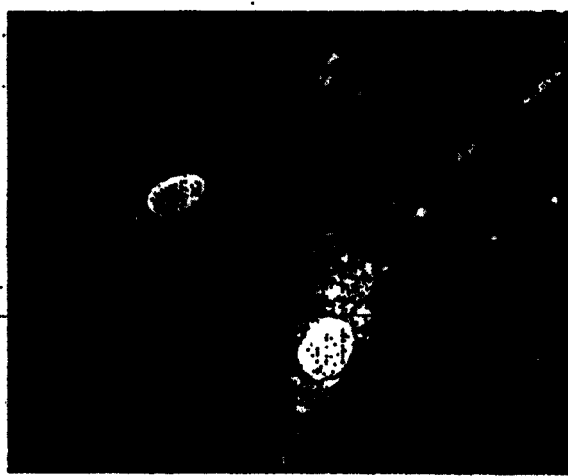
MAGAPGPLRLALLLLGMVGRAGPRPQGATVSLWETVQKWREYRRQCQRSLTEDPPPA  
 TDLFCNRTFDEYACWPDGEPGSFVNVSCLPWASSVPQGHVYRFCTAEGWLQKD  
 NSSLPWRDLSECEESKRGERSSPEEQLLFLYIIYTVGYALSFSALVIASAILLGFRLHCTR  
 NYIHLNLFASFILRALSVFIKDAALKWMYSTAAQQHQWDGLLSYQDSLSCRLVFLLMQ  
 YCVAANYYWLLVEGVLYTLAFAVSFSEQWIFRLYVSIGWGVPLLFVVPWGIVKLYE  
 DEGCWTRNSNMNYWLIIRLPILFGIGVNFLIFVRVICIVVSKLKANLMCKTDIKCRLAKST  
 LTLIPLLGTHEVIFAFVMDHARGTLRFIKLFTLSFTSFQGLMVAILYCFVNNEVQLEFR  
 KSWERWRLEHLHIQRDSSMKPLKPTSSLSSGATAGSSMYTATCQASCS

FIG. 22

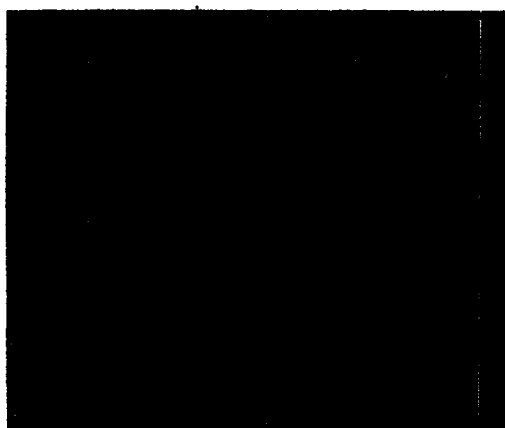
A.



GLP-1R



GLP-1R/NUC



PRE-IMM



NESTIN

**B**



**NIPs**



胰岛

**346bp**

F726.23

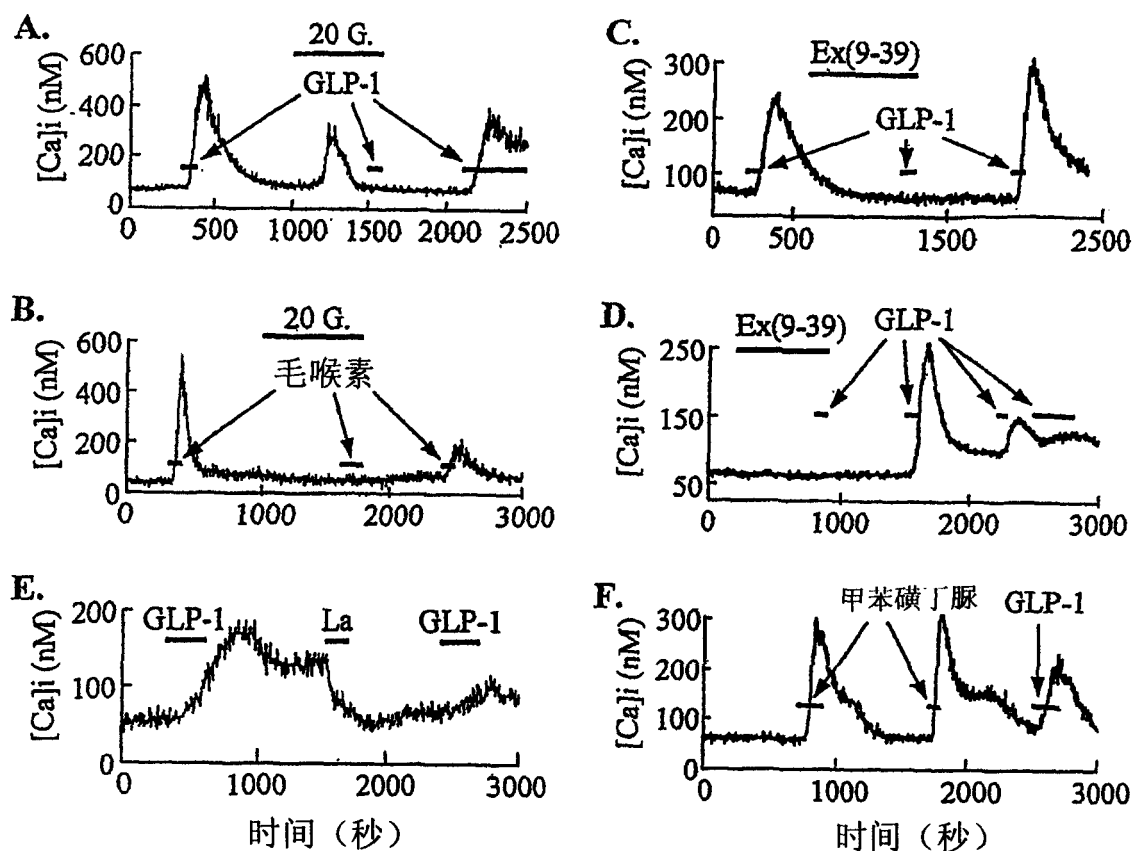


Fig.23 GLP-1 (7-36)胺和甲苯磺丁脲刺激干细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 流

A. 在 5.6mM 葡萄糖中的细胞对 10nM GLP-1 反应, 显示出 $[Ca^{2+}]_i$ 增加; 胞外葡萄糖提高到 20mM(20G)也会引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 但是应用在 20mM 葡萄糖中的 GLP-1 不能引起 $[Ca^{2+}]_i$ 反应。使用恢复到 5.6mM 的葡萄糖中的 GLP-1 能引起 $[Ca^{2+}]_i$ 反应。

B. GLP-1 的葡萄糖依赖性效果通过 10mM 的毛喉素再现, 表明 $[Ca^{2+}]_i$ 的运输由 cAMP 介导。

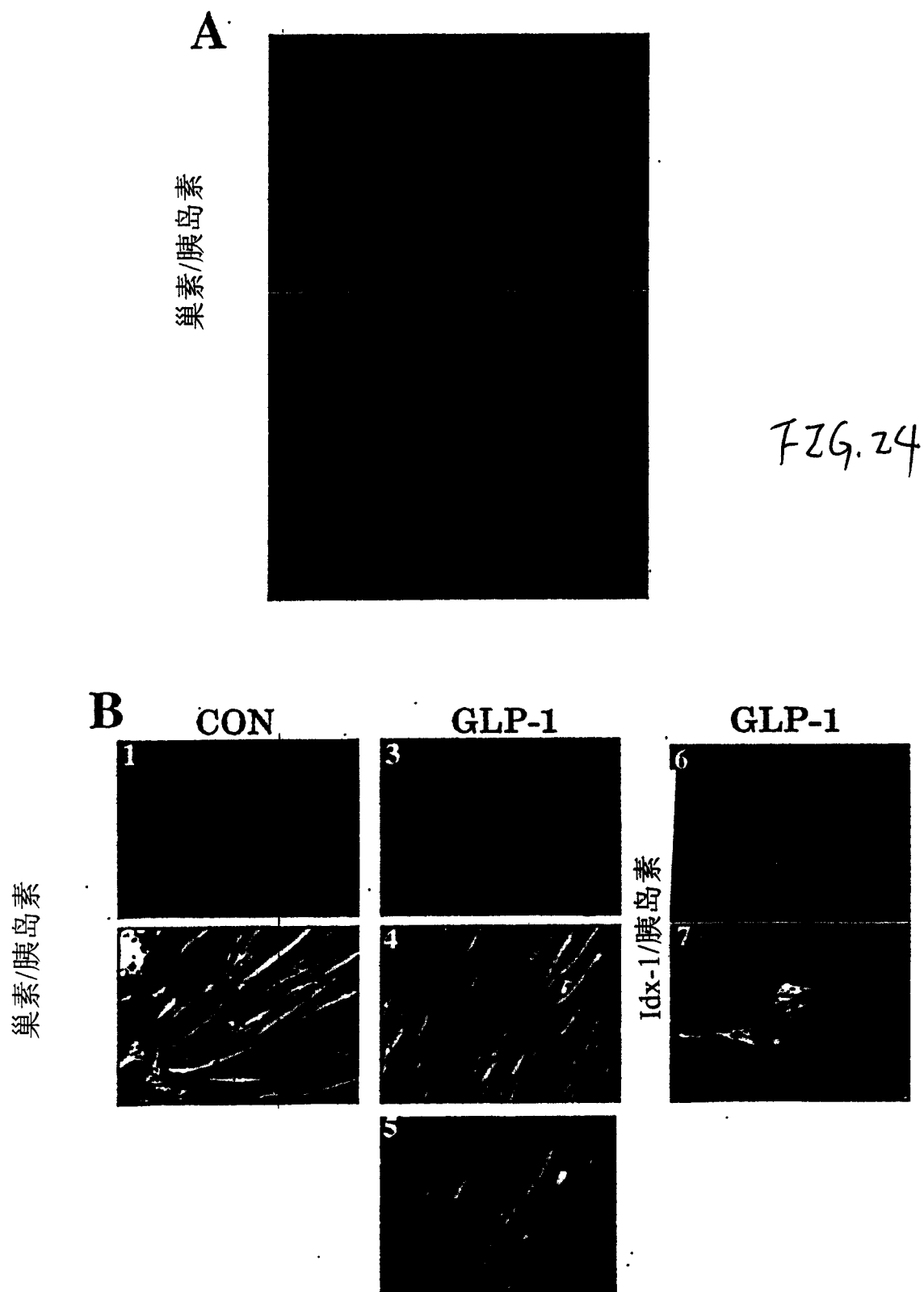
C. GLP-1 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加被 10nM exendin (9-39) 抑制。该效果不是因为受体脱敏。

D. 在存在 exendin (9-39) 时使用 GLP-1 不会引起反应, 但是洗掉 exendin 以后使用 GLP-1 则会引起 $[Ca^{2+}]_i$ 反应。

E. GLP-1 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加被 0.5mM 胞外  $La^{3+}$ 抑制, 表明 GLP-1 刺激 $[Ca^{2+}]_i$ 流。

F. 在 5.6mM 葡萄糖中的干细胞被 100uM GLP-1 甲苯磺丁脲刺激, 显示出 $[Ca^{2+}]_i$ 增加; 应用 10nM GLP-1 也刺激 $[Ca^{2+}]_i$ 流, 表明 GLP-1 通过对细胞去极化起作用。

图 27



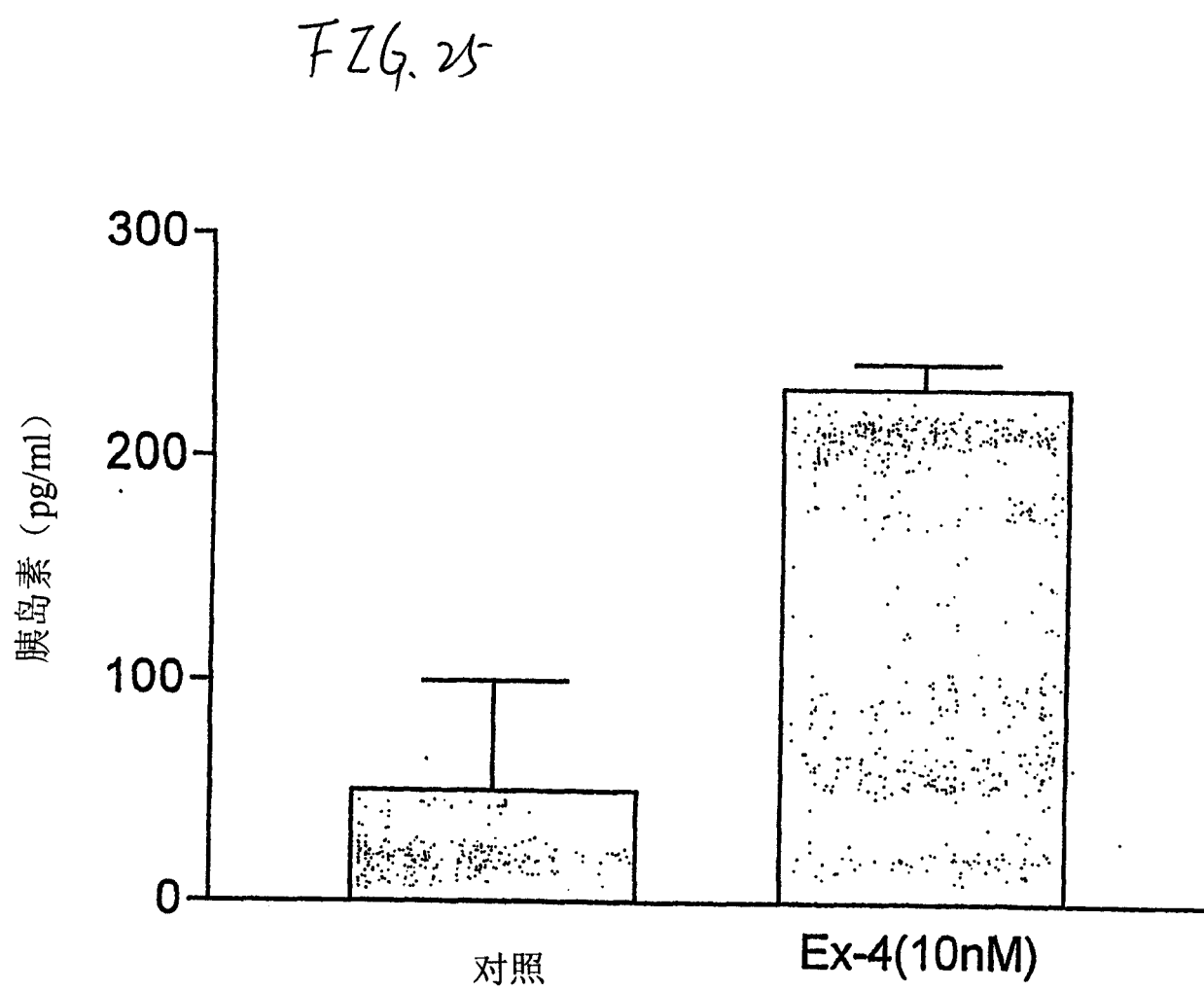
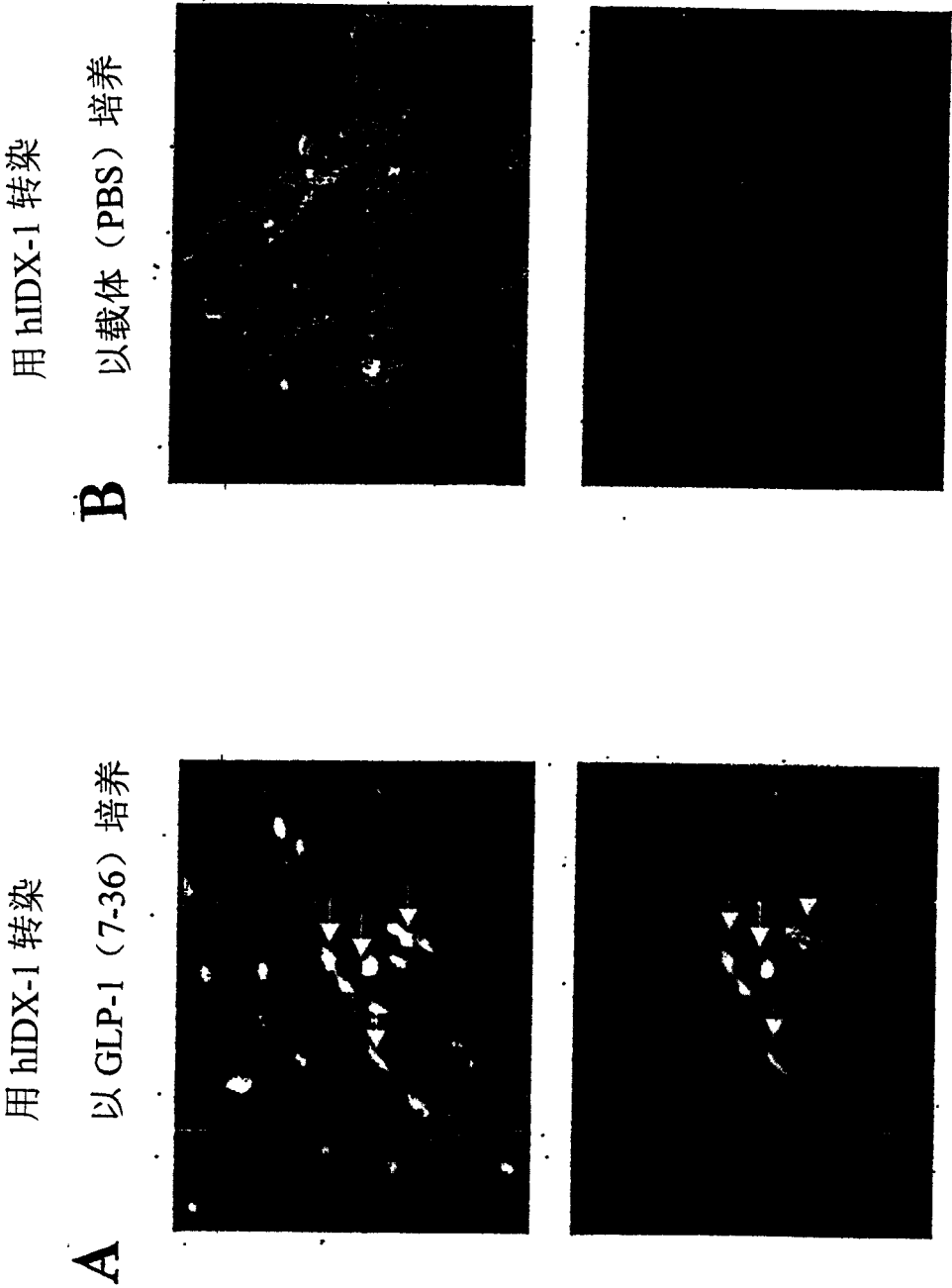


FIG. 26





专利名称(译)	胰岛干细胞及其在治疗糖尿病中的用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN1589330A</a>	公开(公告)日	2005-03-02
申请号	CN02823192.9	申请日	2002-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
当前申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
[标]发明人	乔F哈本娜 亨德里克祖里乌斯基 梅利莎K托马斯 伊利莎白J亚伯拉罕 马里奥瓦立乔 考里A里奇 安娜路易斯璠兰 安缇丝里娜		
发明人	乔·F·哈本娜 亨德里克·祖里乌斯基 梅利莎·K·托马斯 伊利莎白·J·亚伯拉罕 马里奥·瓦立乔 考里·A·里奇 安娜·路易斯·璠兰 安缇丝·里娜		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K A61K31/436 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/39 A61K38/00 A61K38/22 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 C12N C12N5/02 C12N5/074 C12Q1/00 G01N33/53		
CPC分类号	C12N5/0678 C12N2500/34 C12N2501/115 A01K67/0271 C12N2501/11 A61K2035/122 C12N2501/335 A61K35/12 C12N2510/02		
代理人(译)	王学强		
优先权	09/963875 2001-09-26 US 10/120687 2002-04-11 US 10/136891 2002-05-02 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

治疗I型胰岛素依赖型糖尿病及其他疾病的方法及组合物，它使用新发现的能够分化为不同的胰岛细胞，包括产生胰岛素的β细胞以及肝细胞的干细胞。巢素和ABCG2被鉴别为胰腺干细胞的一个分子标记，而细胞角蛋白19作为胰导管细胞的一个明确标记。本发明同样也描述了巢素和/或ABCG2阳性干细胞可分离自胰岛且培养以获得干细胞或假胰岛类似结构的方法。同样也描述了胰腺干细胞的体外分化的方法。描述了分离、扩增及移植胰腺干细胞进入患者以同种异体移植、同种移植或者异种异体移植以取代丢失或损坏胰岛素分泌细胞或其它细胞的方法。

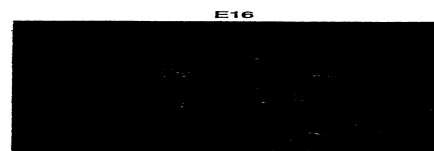


FIG. 1A



FIG. 1B

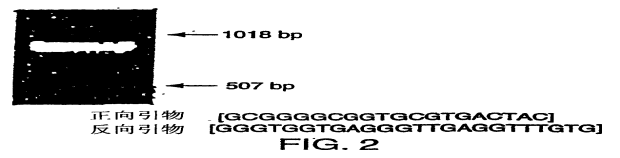


FIG. 2