

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 5/06 (2023.02); A61K 35/12 (2023.02); A61P 3/10 (2023.02); A61P 5/50 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2021110684, 18.09.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.09.2019Дата регистрации:
30.10.2024

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
19.09.2018 JP 2018-175465

(43) Дата публикации заявки: 19.10.2022 Бюл. № 29

(45) Опубликовано: 30.10.2024 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 19.04.2021(86) Заявка РСТ:
JP 2019/037725 (18.09.2019)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2020/059892 (26.03.2020)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ИТО, Рио (JP),
ЯМАДЗОЕ, Норико (JP),
ХИЁСИ, Хидеюки (JP),
МОТИДА, Тайсуке (JP),
УЕНО, Хикару (JP),
САКУМА, Кенсуке (JP),
ЯМАУРА, Дзундзи (JP),
МАЦУМОТО, Хирокадзу (JP),
ТОЙОДА, Таро (JP),
КОНАГАЯ, Суюхэи (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ОРИЗУРУ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: REZANIA A. et al. Reversal of
diabetes with insulin-producing cells derived in
vitro from human pluripotent stem cells/ Nature
Biotechnology, 2014, vol.32, no.11, pp.1121-1133.
PAGLIUCA F.W. et al. Generation of functional
human pancreatic beta cells in vitro, Cell, 2014,
vol.159(2): 428-39. YAMASHITA-SUGAHARA
Y. et al. An inhibitor of fibroblast (см. прод.)

(54) ИНСУЛИНПРОДУЦИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к популяции инсулинпродуцирующих клеток, содержащей: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве от 30 до 50%; инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве от 20 до 32%; и Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%, а также к лекарственному средству, ее содержащему. Также раскрыт способ продуцирования инсулинпродуцирующих клеток, включающий культивирование плюрипотентных

стволовых клеток в присутствии 5-50 нг/мл активина А с получением дефинитивных клеток эндодермы, индукцию дифференцировки дефинитивных клеток эндодермы в эндокринные клетки-предшественники и культивирование эндокринных клеток-предшественников в среде, содержащей ингибитор FGFR1, с получением инсулинпродуцирующих клеток, а также раскрыт способ создания островковоподобных клеток поджелудочной железы, где способ включает трансплантацию инсулинпродуцирующих клеток в живой организм, чтобы вызвать

дифференциацию в островковоподобные клетки поджелудочной железы. Изобретение эффективно для лечения сахарного диабета, для улучшения уровней глюкозы у пациента натошак или после

приема пищи, а также для снижения риска гипогликемии у пациента с сахарным диабетом. 10 н. и 13 з.п. ф-лы, 9 ил., 7 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

growth factor receptor-1 (FGFR1) promotes late-stage terminal differentiation from NGN3+ pancreatic endocrine progenitors, Scientific Reports, 2016, No.6:35908. MINAMI K. et al. Current status of regeneration of pancreatic β -cells, Journal of Diabetes Investigation, 2013, vol.4, No.2, pp.131-141. ШЕРЕМЕТЬЕВА М.Е. и др.

Инсулинпродуцирующие клетки в лечении инсулинозависимого сахарного диабета, Гены&Клетки, 2016, том 11, с.24-34. RU 2663118 C1, 01.08.2018.

RU 2 8 2 9 2 2 0 C 2

RU 2 8 2 9 2 2 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 5/071 (2010.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 5/50 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 5/06 (2023.02); *A61K 35/12* (2023.02); *A61P 3/10* (2023.02); *A61P 5/50* (2023.02)

(21)(22) Application: **2021110684**, **18.09.2019**

(24) Effective date for property rights:
18.09.2019

Registration date:
30.10.2024

Priority:

(30) Convention priority:
19.09.2018 JP 2018-175465

(43) Application published: **19.10.2022 Bull. № 29**

(45) Date of publication: **30.10.2024 Bull. № 31**

(85) Commencement of national phase: **19.04.2021**

(86) PCT application:
JP 2019/037725 (18.09.2019)

(87) PCT publication:
WO 2020/059892 (26.03.2020)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**ITO, Ryo (JP),
YAMAZOE, Noriko (JP),
HIYOSHI, Hideyuki (JP),
MOCHIDA, Taisuke (JP),
UENO, Hikaru (JP),
SAKUMA, Kensuke (JP),
YAMAURA, Junji (JP),
MATSUMOTO, Hirokazu (JP),
TOYODA, Taro (JP),
KONAGAYA, Shuhei (JP)**

(73) Proprietor(s):

ORIZURU THERAPEUTICS, INC. (JP)

(54) INSULIN-PRODUCING CELLS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to a population of insulin-producing cells containing: insulin-positive and NKX6.1-positive cells in amount of 30 to 50%; insulin-positive and NKX6.1-negative cells in amount of 20 to 32%; and Ki67-positive cells in an amount of less than 3%, as well as to a drug containing it. Also disclosed is a method of producing insulin-producing cells, involving culturing pluripotent stem cells in presence of 5–50 ng/ml of activin A to obtain definitive endoderm cells, induction of differentiation of definitive endoderm cells into endocrine precursor cells and

culturing endocrine precursor cells in a medium containing an FGFR1 inhibitor to obtain insulin-producing cells, and a method of creating pancreatic islet cells is also disclosed, where the method involves transplantation of insulin-producing cells into a living body to cause differentiation into pancreatic islet cells.

EFFECT: invention is effective for treating diabetes mellitus, for improving fasting or postprandial glucose levels in a patient, as well as for reducing a risk of hypoglycaemia in a patient suffering diabetes mellitus.

23 cl, 9 dwg, 7 tbl, 5 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к инсулинпродуцирующим клеткам, которые позволяют эффективную индукции/продуцирование эндокринных клеток, которые секретируют гормоны, такие как β клетки поджелудочной железы и α клетки поджелудочной железы, способ получения инсулинпродуцирующих клеток и применение инсулинпродуцирующих клеток.

Уровень техники

Ведутся исследования по индукции дифференциации плюрипотентных стволовых клеток, таких как индуцированные плюрипотентные клетки и эмбриональные стволовые клетки (ES клетки), в эндокринные клетки, которые секретируют гормоны, такие как β клетки поджелудочной железы и α клетки поджелудочной железы, и применению полученных клеток для лечения сахарного диабета. Известно, что клетки, имеющие разные характеристики в зависимости от стадий дифференциации, появляются, когда индуцируется дифференциация плюрипотентных стволовых клеток (WO2009/012428, WO2016/021734). Например, стадии дифференциации можно в широком смысле классифицировать на плюрипотентные стволовые клетки, дефинитивные клетки энтодермы, трубчатые клетки первичной кишки, задние клетки передней кишки, клетки-предшественники поджелудочной железы, клетки-предшественники эндокринной железы, инсулинпродуцирующие клетки и β клетки поджелудочной железы в порядке от относительно не дифференцированных до дифференцированных форм.

Ранее были разработаны и описаны подходы к индуцированию дифференциации плюрипотентных стволовых клеток в эндокринные клетки, включая инсулин-положительные клетки. Например, в не патентной литературе 1 и 2 описаны способы получения инсулинпродуцирующих клеток, образованных индукцией дифференциации плюрипотентных стволовых клеток и содержащих инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве 30% или более, а также инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве 15% или меньше.

Кроме того, сообщалось о подходах к продуцированию эндокринных клеток индукцией дифференциации плюрипотентных стволовых клеток в клетки-предшественники поджелудочной железы и трансплантацией клеток-предшественников поджелудочной железы в живой организм и созревания клеток-предшественников поджелудочной железы. Например, в не патентной литературе 3 описан способ получения эндокринных клеток, содержащих инсулин-положительные клетки и глюкагон-положительные клетки, трансплантацией клеток-предшественников поджелудочной железы, образованных индуцированием дифференциации плюрипотентных стволовых клеток мыши и созреванием клеток-предшественников поджелудочной железы.

Однако доля эндокринных клеток, продуцированных любым из вышеперечисленных способов, никогда не бывает достаточно высокой, и в данной области техники все еще требуется способ эффективной индукции/продуцирования эндокринных клеток из плюрипотентных стволовых клеток.

Список цитирования

Патентная литература

Патентная литература 1: WO2009/012428

Патентная литература 2: WO2016/021734

Не патентная литература

Не патентная литература 1: Rezania A. et al, Nat Biotechnol. 2014; 32: 1121-33.

Не патентная литература 2: Felicia W. Pagliuca et al, Cell. 2014 October 9; 159(2): 428-

439.

Не патентная литература 3: Robert T et al, Stem Cell Reports. 2018Mar13; 10(3): 739-750.

Сущность изобретения

Техническая проблема

5 Объектом настоящего изобретения является новый подход, который позволяет эффективную индукцию/продуцирование островковоподобных клеток поджелудочной железы, включающий определенные доли инсулин-положительных клеток и глюкагон-положительных клеток из плюрипотентных стволовых клеток.

Решение проблемы

10 В то время как предыдущие исследования в основном были сфокусированы на том, как увеличить долю инсулин-положительных и NKX6.1-положительных клеток и сделать клетки зрелыми, авторы настоящего изобретения провели тщательные исследования для достижения цели и, следовательно, обнаружили, что включение определенной доли клеток, отличных от упомянутых выше, обеспечивают эффективную индукцию/
15 продуцирование островковоподобных клеток поджелудочной железы с высокой чистотой в живом организме. Индуцируется дифференциация в инсулинпродуцирующих клетках и с меньшим созреванием, чем в инсулинпродуцирующих клетках, полученных обычным подходом, в частности, в инсулинпродуцирующих клетках, содержащих множество клеток, не экспрессирующих маркеры созревания, такие как MafA, и которые
20 становятся клетками, продуцирующими глюкагон. Клетки с низкой степенью созревания могут давать клетки с низкой чистотой после трансплантации; однако авторы настоящего изобретения преуспели в получении зрелых островковоподобных клеточной поджелудочной железы с высокой степенью чистоты, сохраняющихся в живом организме, комбинированием подхода к сокращению Ki67-положительных клеток,
25 которые обладают пролиферативной способностью, до максимального предела.

Настоящее изобретение может эффективно индуцировать островковоподобные клетки поджелудочной железы с высокой чистотой за максимально короткий период производства и, следовательно, представляет наиболее подходящий подход для достижения клеточной терапии панкреатических островков.

30 Настоящее изобретение основано на этих новых открытиях и охватывает следующие изобретения.

[1] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток), содержащие: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве 30% или более; и инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве более 15%.

35 [2] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [1], где уровень экспрессии MafA гена или генного продукта ниже, чем уровень экспрессии MafA гена или генного продукта в панкреатических островках.

[3] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [1] или [2], содержащие Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%.

40 [3-1] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [1] или [2], содержащее Ki67-положительные клетки в количестве менее 1%.

[4] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [3-1], содержащие глюкагон-положительные и инсулин-отрицательные клетки в количестве менее 3%.

45 [5] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [4], где инсулинпродуцирующие клетки демонстрируют ответ на стимулированную глюкозой секрецию инсулина (GSIS).

[6] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [5],

содержащие хромогранин А-положительные клетки в количестве более 45%.

[6-1] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [5], содержащие хромогранин А-положительные клетки в количестве более 80%.

5 [6-2] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [5], содержащие хромогранин А-положительные клетки в количестве более 85%.

[6-3] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [5], содержащие хромогранин А-положительные клетки в количестве более 90%.

[6-4] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [5], содержащие хромогранин А-положительные клетки в количестве более 93%.

10 [7] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [6-4], содержащие щелочная фосфатаза-положительные плюрипотентные стволовые клетки в количестве менее 0,01%.

[7-1] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [7], где инсулинпродуцирующие клетки дифференцируют в островковоподобные клетки
15 поджелудочной железы в живом организме.

[7-2] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [7-1], где островковоподобные клетки поджелудочной железы содержат хромогранин А-положительные клетки в количестве 50% или более.

[7-2-1] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [7-1], где
20 островковоподобные клетки поджелудочной железы содержат хромогранин А-положительные клетки в количестве 95% или более.

[7-3] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [7-1] - [7-2-1], где островковоподобные клетки поджелудочной железы содержат Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%.

25 [7-3-1] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [7-1] - [7-2-1], где островковоподобные клетки поджелудочной железы содержат Ki67-положительные клетки в количестве менее 1%.

[7-4] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [7-1] - [7-3-1], где островковоподобные клетки поджелудочной железы содержат глюкагон-
30 положительные и инсулин-отрицательные клетки в количестве 10% или более.

[7-5] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [7-1] - [7-4], где островковоподобные клетки поджелудочной железы демонстрируют инсулин-секретирующее действие в ответ на гипогликемию.

35 [8] Лекарственное средство, содержащее инсулинпродуцирующие клетки по любому из [1] - [7-5].

[9] Лекарственное средство по [8], где инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) размещены в устройстве.

[10] Лекарственное средство по [8] или [9], где инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) диспергированы в гидрогеле.

40 [11] Лекарственное средство по любому из [8] - [10], применяемые для трансплантации в живой организм.

[12] Лекарственное средство по любому из [8] - [11], применяемые для подкожной трансплантации.

45 [13] Лекарственное средство по любому из [8] - [12], для применения в лечении сахарного диабета.

[14] Лекарственное средство по любому из [8] - [12], для применения в улучшении и/или сохранении контроля уровней глюкозы у пациента натощак и после приема пищи.

[15] Лекарственное средство по любому из [8] - [12], применяемое для снижения

риска гипогликемии у пациента с сахарным диабетом.

[16] Лекарственное средство по любому из [8] - [12], для применения в способе индуцирования дифференциации в островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяцию клеток) в живом организме.

5 [17] Лекарственное средство по [16], где островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме, содержат хромогранин А-положительные клетки в количестве 50% или более.

[17-1] Лекарственное средство по [16], где островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме,
10 содержат хромогранин А-положительные клетки в количестве 95% или более.

[18] Лекарственное средство по любому из [16] - [17-1], где островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме, содержат Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%.

[18] Лекарственное средство по любому из [16] - [17-1], где островковоподобные
15 клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме, содержат Ki67-положительные клетки в количестве менее 1%.

[19] Лекарственное средство по любому из [16] - [18], где островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме,
20 содержат глюкагон-положительные и инсулин-отрицательные клетки в количестве 10% или более.

[20] Лекарственное средство по любому из [16] - [19], где островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме, демонстрируют инсулин-секретирующее действие в ответ на гипогликемию.

[21] Способ получения инсулинпродуцирующих клеток (популяции клеток),
25 включающий: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве 30% или более; и инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве более 15%, где способ включает стадии:

культивирования плюрипотентных стволовых клеток в присутствии низкой дозы активина А с получением дефинитивных клеток эндодермы (популяции клеток); и

30 культивирования эндокринных клеток-предшественников в среде, содержащей ингибитор FGFR1, с получением инсулинпродуцирующих клеток (популяция клеток).

[22] Способ создания островковоподобных клеток поджелудочной железы (популяции клеток), где способ включает

- трансплантацию инсулинпродуцирующих клеток (популяции клеток) в живой
35 организм чтобы вызвать дифференциацию в островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяцию клеток), где инсулинпродуцирующие клетки содержат: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве 30% или более; и инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве более 15%.

[23] Способ лечения сахарного диабета, где способ включает

40 трансплантацию инсулинпродуцирующих клеток (популяции клеток) в живой организм чтобы вызвать дифференциацию в островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяцию клеток), где инсулинпродуцирующие клетки содержат: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве 30% или более; и инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве более 15%.

45 [24] Способ улучшения и/или сохранения контроля уровней глюкозы в плазме пациента натощак или после приема пищи, где способ включает

трансплантацию инсулинпродуцирующих клеток (популяции клеток) в живой организм, чтобы вызвать дифференциацию в островковоподобные клетки

поджелудочной железы (популяцию клеток), где инсулинпродуцирующие клетки содержат: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве 30% или более; и инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве более 15%.

5 [25] Способ снижения риска гипогликемии у пациента с сахарным диабетом, где способ включает:

трансплантацию инсулинпродуцирующих клеток (популяции клеток) в живой организм, чтобы вызвать дифференциацию в островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяцию клеток), где инсулинпродуцирующие клетки
10 содержат: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве 30% или более; и инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве более 15%.

[26] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [7-5], для применения в способе лечения сахарного диабета.

15 [27] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [7-5], для применения в способе улучшения и/или сохранения контроля уровней глюкозы в плазме пациента натощак или после приема пищи.

[28] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [7-5], для применения в способе снижения риска гипогликемии у пациента с сахарным диабетом.

20 [29] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [1] - [7-5], для применения в способе вызова дифференциации в островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяцию клеток) в живом организме.

[30] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [26] - [29], где инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) размещены в устройстве.

25 [31] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [26] - [30], где инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) диспергированы в гидрогеле.

[32] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [26] - [31], применяемые для трансплантации в живой организм.

30 [33] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по любому из [26] - [32], применяемые для подкожной трансплантации.

[34] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [29], где островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме, содержат хромогранин А-положительные клетки в количестве 50% или более.

35 [34-1] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [29], где островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме, содержат хромогранин А-положительные клетки в количестве 95% или более.

40 [35] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [29], где островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме, содержат Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%.

45 [35-1] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [29], где островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме, содержат Ki67-положительные клетки в количестве менее 1%.

[35-2] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [29], где островковоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток),

дифференцированные в живом организме, содержат глюкагон-положительные и инсулин-отрицательные клетки в количестве 10% или более.

[36] Инсулинпродуцирующие клетки (популяция клеток) по [29], где островкоподобные клетки поджелудочной железы (популяция клеток), дифференцированные в живом организме, демонстрируют инсулин-секретирующее действие в ответ на гипогликемию.

[37] Применение инсулинпродуцирующих клеток (популяции клеток) по любому из [1] - [7-5] в производстве лекарственного средства для лечения сахарного диабета.

[38] Применение инсулинпродуцирующих клеток (популяции клеток) по любому из [1] - [7-5] в производстве лекарственного средства для улучшения и/или сохранения контроля уровней глюкозы в плазме пациента натощак или после приема пищи.

[39] Применение инсулинпродуцирующих клеток (популяции клеток) по любому из [1] - [7-5] в производстве лекарственного средства для снижения риска гипогликемии у пациента с сахарным диабетом.

Настоящая спецификация охватывает содержание, описанное в спецификации и/или чертежах из заявки на патент Японии № 2018-175465, на которой основан приоритет настоящей заявки.

Все публикации, патенты и заявки на патенты, цитированные в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Преимущественные эффекты изобретения

Настоящее изобретение может предоставить новый подход, который позволяет эффективную индукцию/продуцирование эндокринных клеток из плюрипотентных стволовых клеток.

Краткое описание чертежей

[Фигура 1] Фигура 1 показывает результаты измерений проточной цитометрией экспрессии инсулина (INS), NKX6.1, глюкагона (GCG) и Ki67 в прототипе инсулинпродуцирующих клеток (прототип), инсулинпродуцирующих клетках и панкреатическом островке человека (островок).

[Фигура 2] Фигура 2 показывает результаты измерения уровней экспрессии генов для инсулина (INS), глюкагона (GCG), MafA и UCN3 в прототипе инсулинпродуцирующих клеток (прототип), инсулинпродуцирующих клетках и панкреатическом островке человека (островок), способом количественной ПЦР.

[Фигура 3] Фигура 3 показывает график, представляющий количество колоний клеток iPS, сохраняющихся в недифференцированном состоянии в инсулинпродуцирующих клетках, полученных добавлением 30 (0,005%) iPS клеток, 6 (0,001%) iPS клеток и 0 iPS клеток, оставшихся в недифференцированном состоянии.

[Фигура 4] Фигура 4 показывает фазоконтрастное микроскопическое изображение клеточного агрегата, полученного оттаиванием криоконсервированных инсулинпродуцирующих клеток с последующим культивированием инсулинпродуцирующих клеток в трехмерной культуре в течение 4 дней.

[Фигура 5] Фигура 5 показывает результаты измерения проточной цитометрией экспрессии INS, NKX6.1 и Ki67 в инсулинпродуцирующих клетках до криоконсервации и инсулинпродуцирующих клеток после криоконсервации и оттаивания.

[Фигура 6] Фигура 6 показывает результаты измерения концентраций С-пептида человека в крови после загрузки глюкозы у мышей с сахарным диабетом с трансплантированными инсулинпродуцирующими клетками и мышей без сахарного диабета, без трансплантированных инсулинпродуцирующих клеток.

[Фигура 7] Фигура 7 показывает результаты измерения концентраций С-пептида в

крови и концентраций глюкагона в крови после введения гларгина у мышей с сахарным диабетом с трансплантированными инсулинпродуцирующими клетками и мышей без сахарного диабета, без трансплантированных инсулинпродуцирующих клеток.

[Фигура 8] Фигура 8 показывает результаты измерения проточной цитометрией экспрессии инсулина, NKX6.1, глюкагона и хромогранин А в подкожно трансплантированных инсулинпродуцирующих клетках.

[Фигура 9] Фигура 9 показывает результаты иммунологического окрашивания для инсулин и глюкагона в подкожно трансплантированных инсулинпродуцирующих клетках. Зеленый: инсулин-положительные клетки. Красный: глюкагон-положительные клетки.

Описание вариантов осуществления

1. Терминология

Далее будут объяснены описанные в настоящем документе термины.

В настоящем документе, «примерно» относится к значению, которое может варьироваться вплоть до плюс или минус 25%, 20%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от эталонного значения. Предпочтительно, термин «примерно» или «около» относится к интервалу от минут или плюс 15%, 10%, 5% или 1% от эталонного значения.

Каждый числовой диапазон, определяющий настоящее изобретение, включает числовые значения, по существу рассматриваемые как нижнее предельное значение и верхнее предельное значение числового диапазона, даже когда «примерно» не указано.

В настоящем документе, «включает» или «включающий» означает включение элемента(ов) после слов «не ограничивающихся ими». Следовательно, оно означает включение элемента(ов) после слова, но не указывает на исключение какого-либо другого элемента.

В настоящем документе, «состоит из» или «состоящий из» означает включение всех элементов после фразы «и ограничивающихся ими». Следовательно, фраза «состоит из» или «состоящий из» указывает, что пронумерованные элементы требуются или необходимы и по существу не имеется никаких других элементов.

В настоящем документе «без использования питающих клеток» означает, в основном отсутствие питающих клеток и без применения среды, предварительно обработанной культивированием питающих клеток. Соответственно, среда не содержит никаких веществ, таких как фактор роста или цитокин, секретированных питающими клетками.

«Питающие клетки» или «фидер» означает клетки, которые совместно культивируют с клетками другого типа, поддерживают клетки и обеспечивают среду, которая позволяет клеткам расти. Питающие клетки могут быть получены от тех же видов, что и клетки, которые они поддерживают, или от других видов. Например, в качестве фидера для клеток человека могут быть использованы фибробласты кожи человека или эмбриональные стволовые клетки человека, или может быть использована первичная культура эмбриональных фибробластов мыши или иммортализованных эмбриональных фибробластов мыши. Питающие клетки могут быть инактивированы облучением или обработкой митомицином С.

В настоящем документе «прилипающие (липкие, срастающиеся, адгезионные)» относятся к клеткам, прикрепленным к контейнеру, например, клеткам, прикрепленным к чашке для культивирования клеток или колбе из стерилизованного пластика (или пластика с покрытием) в присутствии подходящего носителя. Некоторые клетки не могут поддерживаться или расти в культуре без прилипания к контейнеру для культивирования клеток. Наоборот, не прилипающие клетки могут сохраняться и размножаться в культуре, не прилипая к контейнеру.

В настоящем документе «культура» относится к поддержанию, росту и/или дифференциации клеток в среде *in vitro*. «Культивирование» означает поддержание, пролиферацию (рост) и/или дифференциацию клеток из ткани или живого организма, например, в чашке или колбе для культивирования клеток. Культура включает

5 двухмерную культуру (плоская культура) и трехмерную культуру (суспензионная культура).

В настоящем документе «обогащать» и «обогащение» относятся к увеличению количества определенного компонента в композиции, такой как композиция клеток, и «обогащенные» относится, когда используется для описания состава клеток, например,

10 популяции клеток, к популяции клеток с увеличенным количеством определенного компонента по сравнению с долей такого компонента в популяции клеток до обогащения. Например, композиция, такая как популяция клеток, может быть обогащена типом клеток-мишеней, и, соответственно, доля типа клеток-мишеней увеличивается по сравнению с долей клеток-мишеней, присутствующих в популяции клеток до

15 обогащения. Популяция клеток могут быть обогащена типом клеток-мишеней с помощью способа отбора и сортировки клеток, известных в данной области техники. Популяция клеток может быть обогащена с помощью определенного процесса сортировки или отбора, описанного здесь. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения, популяция клеток обогащена для популяции клеток-мишеней

20 на, по меньшей мере, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% способом обогащения популяции клеток-мишеней.

В настоящем документе «обеднять» и «обеднение» относятся к уменьшению количества определенного компонента в клетках или композиции, такой как композиция клеток, а «обедненные» относится, при описании клеток или композиции клеток,

25 например, популяции клеток, к популяции клеток с уменьшенным количеством определенного компонента по сравнению с долей такого компонента в популяции клеток до обеднения. Например, композиция, такая как популяция клеток, может быть обеднена для типа клеток-мишеней и, соответственно, доля клеток-мишеней уменьшается по сравнению с долей клеток-мишеней, присутствующих в популяции клеток до

30 обеднения. Популяция клеток может быть обеднена для типа клеток мишеней с помощью способа отбора и сортировки клеток, известного в данной области техники. Популяция клеток может быть обеднена в результате определенного процесса сортировки или отбора, описанного здесь. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения, популяцию клеток уменьшают (обедняют) для популяции клеток-мишеней,

35 по меньшей мере, на 50%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% за счет способа обеднения популяции клеток-мишеней.

В настоящем документе, «очищать» и «очистка» относятся к удалению примесей в композиции, такой как композиция клеток, и ее очистке для определенного компонента, а «очищенные» относятся, при применении для описания композиции клеток, например,

40 популяции клеток, к популяции клеток, в которых количество примесей уменьшено по сравнению с долей таких компонентов в популяции клеток до очистки, и чистота определенного компонента улучшена. Например, композиция, такая как популяция клеток, может быть очищена для определенного типа клеток-мишеней, и, соответственно, доля типа клеток-мишеней увеличивается по сравнению с долей клеток-мишеней, присутствующих в популяции клеток до очистки. Популяция клеток может быть очищена для типа клеток-мишеней с помощью способа отбора и сортировки

45 клеток, известного в данной области техники. Популяцию клеток можно очистить с помощью определенного процесса сортировки или отбора, описанного в настоящем

документе. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения, чистота популяции клеток-мишеней достигается способом очистки популяции клеток-мишеней до, по меньшей мере, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%, или в той степени, в которой примеси (включая загрязняющие клетки) не обнаруживаются.

5 В настоящем документе, «фактор, обладающей активностью, ингибирующей CDK8/19» означает любое вещество, обладающее ингибирующей активностью в отношении CDK8/19. CDK8, в отличие от других белков того же семейства CDK, не требуется для пролиферации клеток. Ингибирование CDK8 не имеет большого эффекта в обычных условиях. CDK19 и CDK8 похожи друг на друга. Обычно ингибирование CDK8 также
10 включает ингибирование CDK19.

«Фактор роста» является эндогенным белком, который способствует дифференциации и/или пролиферации конкретных клеток. Примеры «фактора роста» включают эпидермальный фактор роста (EGF), кислотный фактор роста фибробластов (aFGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста гепатоцитов (HGF),
15 инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF-2), фактор роста кератиноцитов (KGF), фактор роста нервов (NGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), трансформационный фактор роста бета (TGF- β), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), трансферрин, разные интерлейкины (например, IL-1 - IL-18), разные колониестимулирующие факторы (например, гранулоцитарный/
20 макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF)), разные интерфероны (например, IFN- γ , и подобные), и другие цитокины, оказывающие действие на стволовые клетки, например, фактор стволовых клеток (SCF) и эритропоэтин (Epo).

В настоящем документе, «ингибитор ROCK» означает вещество, которое ингибирует Rho киназу (ROCK: Rho-ассоциированную, содержащую суперспираль протеникиназу)
25 и может быть веществом, которое ингибирует любую из ROCK I и ROCK II. Ингибитор ROCK особенно не ограничен, пока он обладает вышеуказанной функцией, и его примеры включают N-(4-пиридинил)-4 β -[(R)-1-аминоэтил]циклогексан-1 α -карбоксамид (который также может быть назван Y-27632), Фазудил (HA1077), (2S)-2-метил-1-[(4-метил-5-изохинолинил)сульфонил]гексагидро-1H-1,4-дiazепин (H-1152), 4 β -[(1R)-1-аминоэтил]-N-(4-пиридил)бензол-1-карбоксамид (Wf-536), N-(1H-пирроло[2,3-b]
30 пиридин-4-ил)-4 β -[(R)-1-аминоэтил]циклогексан-1 α -карбоксамид (Y-30141), N-(3-{[2-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-1-этил-1H-имидазо[4,5-c]пиридин-6-ил]окси}фенил)-4-{[2-(4-морфолинил)этил]окси}бензамид (GSK269962A), N-(6-фтор-1H-индазол-5-ил)-6-метил-2-оксо-4-[4-(трифторметил)фенил]-3,4-дигидро-1H-пиридин-5-карбоксамид
35 (GSK429286A). Ингибитор ROCK не ограничен ими, и антисмысловые олигонуклеотиды и кРНК для ROCK и РНК, антитела, которые связываются с ROCK, и доминантные отрицательные ROCK мутанты также могут применяться в качестве ингибитора ROCK, и они являются коммерчески доступными или могут быть синтезированы известными способами.

40 В настоящем документе, «ингибитор GSK3 β » является веществом, имеющим ингибирующее действие на GSK3 β (гликоген-синтаза-киназа-3 β). GSK3 (гликоген-синтаза-киназа-3) является серин/треонинпротеинкиназой и вовлечена во множество сигнальных путей, ассоциированных с продуцированием гликогена, апоптозом, сохранением стволовых клеток и т.д. GSK3 имеет 2 изоформы α и β . «Ингибитор GSK3 β »,
45 применяемый в настоящем изобретении, особенно не ограничен, пока он обладает GSK3 β -ингибирующей активностью, и им может быть вещество, имеющее как GSK3 α -ингибирующую активность, так и GSK3 β -ингибирующую активность.

Примеры GSK3 β ингибитора включают CHIR98014 (2-[[2-[(5-нитро-6-аминопиридин-

2-ил)амино]этил]амино]-4-(2,4-дихлорфенил)-5-(1H-имидазол-1-ил)пиримидин), CHIR99021 (6-[[2-[[4-(2,4-дихлорфенил)-5-(4-метил-1H-имидазол-2-ил)-2-пиримидинил]амино]этил]амино]никотинитрил), TDZD-8 (4-бензил-2-метил-1,2,4-тиадиазолин-3,5-дион), SB216763 (3-(2,4-дихлорфенил)-4-(1-метил-1H-индол-3-ил)-1H-пиррол-2,5-дион), TWS-119 (3-[6-(3-аминофенил)-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-илокси]фенол), кенпауллон, 1-азакенпауллон, SB216763 (3-(2,4-дихлорфенил)-4-(1-метил-1H-индол-3-ил)-1H-пиррол-2,5-дион), SB415286 (3-[(3-хлор-4-гидроксифенил)амино]-4-(2-нитрофенил)-1H-пиррол-2,5-дион) и AR-AO144-18, CT99021, CT20026, BIO, BIO-ацетоксим, комплекс пиридокарбазол-рутевый циклопентадиенил, OTDZT, альфа-4-дибромацетофенон, литий и подобные. GSK3 β не ограничен ими, и антисмысловые олигонуклеотиды и кРНК к GSK3 β и РНК, антитела, которые связываются с GSK3 β , доминантные отрицательные GSK3 β мутанты и подобные также могут применяться в качестве ингибитора GSK3 β , и они являются коммерчески доступными или могут быть синтезированы известными способами.

В настоящем документе, примеры «заменителя сыворотки» включают Knockout Serum Replacement (KSR: Invitrogen), StemSure Serum Replacement (Wako), B-27 добавку, N2-добавку, альбумин (например, высокожирный альбумин), инсулин, трансферрин, жирные кислоты, предшественники коллагена, следовые элементы (например, цинк, селен (например, селенит селена)), 2-меркаптоэтанол, 3'-тиоглицерин или их смеси (например, ITS-G). Предпочтительными заменителями сыворотки являются B-27 добавка, KSR, StemSure Serum Replacement, ITS-G. Концентрация заменителя сыворотки в среде при добавлении в среду составляет 0,01-10% массовых, и, предпочтительно, 0,1-2% массовых. В настоящем изобретении, «заменитель сыворотки» предпочтительно применяют вместо сыворотки.

В настоящем документе «ингибитор FGFR1» представляет собой вещество, обладающее ингибирующей активностью в отношении рецептора фактора роста фибробластов (FGFR)1. FGFR1 является членом семейства четырехпроходных трансмембранных тирозинкиназ (FGFR1, FGFR2, FGFR3 и FGFR4) в качестве рецептора, обладающего высоким сродством к факторам роста FGF1 к FGF17. Ингибитор FGFR1 особо не ограничен при условии, что ингибитор FGFR1 обладает активностью ингибирования FGFR1. Ингибитор FGFR1 может быть веществом, обладающим ингибирующей FGFR1 активностью, а также ингибирующей активностью в отношении других FGFR. В настоящем описании «ингибитор FGFR1» включает вещество, обладающее ингибирующей FGFR1 активностью, даже если она незначительна, и, предпочтительно, относится к веществу, которое ингибирует FGFR1 на 50% или более, более предпочтительно, к веществу, имеющему 50% ингибирующую концентрацию (IC₅₀) 1 мкМ или ниже, более предпочтительно, 100 нМ или ниже, против FGFR1. Способ определения ингибирующей FGFR1 активности может быть выбран из известных способов. Их примеры включают способы определения с использованием набора EnzyChrom Kinase Assay Kit (BioAssay Systems). Можно использовать традиционно известный ингибитор FGFR1, который можно найти в патентной литературе или не патентной литературе.

В настоящем документе, примеры «ингибитора FGFR1» включают соединения, приведенные ниже (группа соединений D), а также соединения, обладающие ингибирующей активностью в отношении FGFR1 (или их соли), среди соединений, имеющих структурные формулы, представленные общими формулами, приведенными ниже. Ингибитором FGFR1 предпочтительно является соединение, имеющее 50% ингибирующую концентрацию (IC₅₀) 1 мкМ или ниже, более предпочтительно, 100 нМ

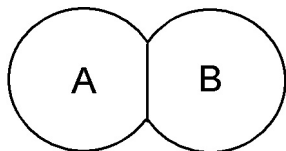
или ниже, против FGFR1 (или его соли) среди соединения I и соединения II, имеющих структурные формулы, представленные следующими общими формулами.

(Соединение I)

Примеры соединения I включают соединения, представленные следующей формулой

1:

[Формула 1]



где кольцо АВ показывает бициклический гетероцикл, имеющий один или несколько заместителей (кольцо АВ может быть трициклическим гетероциклом, имеющим один или несколько заместителей).

или их соли.

Предпочтительно, в формуле, кольцо АВ показывает бициклический азотсодержащий гетероцикл, имеющий три заместителя.

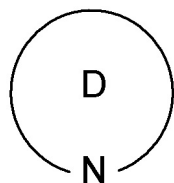
Примеры заместителей включают заместители, данные ниже, и заместители соединения группы D. Заместители соединения группы D являются предпочтительными.

(Соединение II)

Примеры соединения II включают соединения, представленные следующей формулой

2:

[Формула 2]



где кольцо D показывает 5- или 6-членный моноциклический азотсодержащий гетероцикл, необязательно имеющий заместители; и

один или несколько азотсодержащих гетероциклов, отличных от тех, которые содержит кольцо D

или их соли.

Предпочтительно, в формуле, кольцо D показывает ароматическое кольцо, содержащее один или два атома азота и необязательно имеющее заместители.

Предпочтительно, примеры одного или нескольких азотсодержащих гетероциклов, отличных от кольца D, включают пиперазин, необязательно имеющие заместители.

Примеры заместителей включают заместители, указанные ниже, и заместители соединения группы D. Заместители соединения группы D являются предпочтительными.

В настоящем документе, примеры «гетероцикла» включают ароматические гетероциклы и не ароматические гетероциклы, каждый из которых содержат, в качестве атомов кольца, кроме атома углерода, 1-4 гетероатомов, выбранных из атома азота, атома серы и атома кислорода.

В настоящем документе, примеры «ароматического гетероцикла» включают 5-14-членный (предпочтительно, 5-10-членный) ароматический гетероцикл, содержащий, в качестве атомов кольца, кроме атома углерода, 1-4 гетероатомов, выбранных из атома азота, атома серы и атома кислорода. Предпочтительные примеры «ароматического гетероцикла» включают 5- или 6-членные моноциклические ароматические гетероциклы, такие как тиофен, фуран, пиррол, имидазол, пиразол, тиазол, изотиазол, оксазол,

изоксазол, пиридин, пиразин, пиримидин, пиридазин, 1,2,4-оксадиазол, 1,3,4-оксадиазол, 1,2,4-тиадиазол, 1,3,4-тиадиазол, триазол, тетразол и триазин; и

8-14-членные конденсированные полициклические (предпочтительно, бициклические или трициклические) ароматические гетероциклы, такие как бензотиофен, бензофуран, бензимидазол, бензоксазол, бензизоксазол, бензотиазол, бензизотиазол, бензотриазол, имидазопиридин, тиенопиридин, фуropиридин, пирролопиридин, пиразолопиридин, оксазолопиридин, тиазолопиридин, имидазопиразин, имидазопиримидин, тиенопиримидин, фуropиримидин, пирролопиримидин, пиразолопиримидин, оксазолопиримидин, тиазолопиримидин, пиразолопиримидин, пиразолотриазин, нафто [2,3-*b*]тиофен, феноксатиин, индол, изоиндол, 1Н-индазол, пурин, изохинолин, хинолин, фталазин, нафтиридин, хиноксалин, хиназолин, циннолин, карбазол, β -карболин, фенантридин, акридин, феназин, фенотиазин и феноксазин.

В настоящем документе примеры «не ароматического гетероцикла» включают 3-14-членный (предпочтительно, 4-10-членный) не ароматический гетероцикл, содержащий, в качестве атомов кольца, кроме атома углерода, 1-4 гетероатомов, выбранных из атома азота, атома серы и атома кислорода. Предпочтительные примеры «не ароматического гетероцикла» включают 3-8-членные моноциклические неароматические гетероциклы, такие как азиридин, оксиран, тиран, азетидин, оксетан, тиетан, тетрагидротиофен, тетрагидрофуран, пирролин, пирролидин, имидазолин, имидазолидин, оксазолин, оксазолидин, пиразолин, пиразолидин, тиазолин, тиазолидин, тетрагидроизотиазол, тетрагидрооксазол, тетрагидроизоксазол, пиперидин, пиперазин, тетрагидропиридин, дигидропиридин, дигидротиопиран, тетрагидропиримидин, тетрагидропиридазин, дигидропиран, тетрагидропиран, тетрагидротиопиран, морфолин, тиоморфолин, азепанин, диазепан, азепин, азокан, диазокан, оксепан; и

9-14-членные конденсированные полициклические (предпочтительно би- или трициклические) не ароматические гетероциклы, такие как дигидробензофуран, дигидробензимидазол, дигидробензоксазол, дигидробензотиазол, дигидробензизотиазол, дигидронафто[2,3-*b*]тиофен, тетрагидроизохинолин, тетрагидрохинолин, 4Н-хинолизин, индолин, изоиндолин, тетрагидротиено[2,3-*c*]пиридин, тетрагидробензазепин, тетрагидрохиноксалин, тетрагидрофенантридин, гексагидрофенотиазин, гексагидрофеноксазин, тетрагидрофталазин, тетрагидронафтиридин, тетрагидрохиназолин, тетрагидроциннолин, тетрагидрокарбазол, тетрагидро- β -карболин, тетрагидроакридин, тетрагидрофеназин, тетрагидротиоксантен, октагидроизохинолин.

В настоящем документе, примеры «азотсодержащего гетероцикла» включают «гетероциклы», содержащие, по меньшей мере, один или несколько атомов азота в качестве атомов кольца.

Далее по тексту, каждый используемый здесь заместитель будет описан подробно. Каждый заместитель имеет значения, указанные ниже, если не указано иное.

В настоящем документе примеры «атома галогена» включают фтор, хлорид, бром и йод.

В настоящем документе примеры « C_{1-6} алкильной группы» включают метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, изопентил, неопентил, 1-этилпропил, гексил, изогексил, 1,1-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 3,3-диметилбутил и 2-этилбутил.

В настоящем документе, примеры «необязательно галогенированной C_{1-6} алкильной группы» включают C_{1-6} алкильную группу, необязательно имеющую от 1 до 7,

предпочтительно, от 1 до 5 атомов галогена. Ее конкретные примеры включают метил, хлорметил, дифторметил, трихлорметил, трифторметил, этил, 2-бромэтил, 2,2,2-трифторэтил, тетрафторэтил, пентафторэтил, пропил, 2,2-дифторпропил, 3,3,3-трифторпропил, изопропил, бутил, 4,4,4-трифторбутил, изобутил, втор-бутил, трет-

бутил, пентил, изопентил, неопентил, 5,5,5-трифторпентил, гексил и 6,6,6-трифторгексил. В настоящем документе, примеры «C₂₋₆ алкенильной группы» включают этенил, 1-пропенил, 2-пропенил, 2-метил-1-пропенил, 1-бутенил, 2-бутенил, 3-бутенил, 3-метил-2-бутенил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-пентенил, 4-пентенил, 4-метил-3-пентенил, 1-гексенил, 3-гексенил и 5-гексенил.

В настоящем документе примеры «C₂₋₆ алкинильной группы» включают этинил, 1-пропинил, 2-пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 3-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-пентинил, 4-пентинил, 1-гексинил, 2-гексинил, 3-гексинил, 4-гексинил, 5-гексинил и 4-метил-2-пентинил.

В настоящем документе примеры «C₃₋₁₀ циклоалкильной группы» включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, бицикло[2.2.1]гептил, бицикло[2.2.2]октил, бицикло[3.2.1]октил и адамантил.

В настоящем документе примеры «необязательно галогенированной C₃₋₁₀ циклоалкильной группы» включают C₃₋₁₀ циклоалкильную группу, необязательно имеющую от 1 до 7, предпочтительно, от 1 до 5 атомов галогена. Их конкретные примеры включают циклопропил, 2,2-дифторциклопропил, 2,3-дифторциклопропил, циклобутил, дифторциклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил.

В настоящем документе, примеры «C₃₋₁₀ циклоалкенильной группы» включают циклопропенил, циклобутенил, циклопентенил, циклогексенил, циклогептенил и циклооктенил.

В настоящем документе примеры «C₆₋₁₄ арильной группы» включают фенил, 1-нафтил, 2-нафтил, 1-антрил, 2-антрил и 9-антрил.

В настоящем документе, примеры «C₇₋₁₆ арилкильной группы» включают бензил, фенэтил, нафтилметил и фенилпропил.

В настоящем документе, примеры «C₁₋₆ алкоксигруппы» включают метокси, этокси, пропокси, изопропокси, бутокси, изобутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, пентилокси и гексилокси.

В настоящем документе, примеры «необязательно галогенированной C₁₋₆ алкоксигруппы» включают C₁₋₆ алкоксигруппу, необязательно имеющую от 1 до 7, предпочтительно, от 1 до 5 атомов галогена. Ее конкретные примеры включают метокси, дифторметокси, трифторметокси, этокси, 2,2,2-трифторэтокси, пропокси, изопропокси, бутокси, 4,4,4-трифторбутокси, изобутокси, втор-бутокси, пентилокси и гексилокси.

В настоящем документе примеры «C₃₋₁₀ циклоалкилокси группы» включают циклопропилокси, циклобутилокси, циклопентилокси, циклогексилокси, циклогептилокси и циклооктилокси.

В настоящем документе примеры «C₁₋₆ алкилтиогруппы» включают метилтио, этилтио, пропилтио, изопропилтио, бутилтио, втор-бутилтио, трет-бутилтио, пентилтио и гексилтио.

В настоящем документе примеры «необязательно галогенированной C₁₋₆ алкилтиогруппы» включают C₁₋₆ алкилтиогруппу, необязательно имеющую от 1 до 7, предпочтительно от 1 до 5 атомов галогена. Их конкретные примеры включают

метилтио, дифторметилтио, трифторметилтио, этилтио, пропилтио, изопропилтио, бутилтио, 4,4,4-трифторбутилтио, пентилтио и гексилтио.

В настоящем документе примеры «C₁₋₆ алкилкарбонильной группы» включают ацетил, пропаноил, бутаноил, 2-метилпропаноил, пентаноил, 3-метилбутаноил, 2-метилбутаноил, 2,2-диметилпропаноил, гексаноил и гептаноил.

В настоящем документе, примеры «необязательно галогенированной C₁₋₆ алкилкарбонильной группы» включают C₁₋₆ алкилкарбонильную группу, необязательно имеющую от 1 до 7, предпочтительно, от 1 до 5 атомов галогена. Их конкретные примеры включают ацетил, хлорацетил, трифторацетил, трихлорацетил, пропаноил, бутаноил, пентаноил и гексаноил.

В настоящем документе, примеры «C₁₋₆ алкоксикарбонильной группы» включают метоксикарбонил, этоксикарбонил, пропоксикарбонил, изопропоксикарбонил, бутоксикарбонил, изобутоксикарбонил, втор-бутоксикарбонил, трет-бутоксикарбонил, пентилоксикарбонил и гексилоксикарбонил.

В настоящем документе примеры «C₆₋₁₄ арилкарбонильной группы» включают бензоил, 1-нафтоил и 2-нафтоил.

В настоящем документе примеры «C₇₋₁₆ аралкилкарбонильной группы» включают фенилацетил и фенилпропионил.

В настоящем документе примеры «5-14-членной ароматической гетероциклической карбонильной группы» включают никотиноил, изоникотиноил, теноил и фурилоил.

В настоящем документе примеры «3-14-членной не ароматической гетероциклической карбонильной группы» включают морфолинилкарбонил, пиперидинилкарбонил и пирролидинилкарбонил.

В настоящем документе примеры «моно- или ди-C₁₋₆ алкилкарбамоильной группы» включают метилкарбамоил, этилкарбамоил, диметилкарбамоил, диэтилкарбамоил и N-этил-N-метилкарбамоил.

В настоящем документе, примеры «моно- или ди-C₇₋₁₆ аралкилкарбамоильной группы» включают бензилкарбамоил и фенэтилкарбамоил.

В настоящем документе, примеры «C₁₋₆ алкилсульфонильной группы» включают метилсульфонил, этилсульфонил, пропилсульфонил, изопропилсульфонил, бутилсульфонил, втор-бутилсульфонил и трет-бутилсульфонил.

В настоящем документе, примеры «необязательно галогенированной C₁₋₆ алкилсульфонильной группы» включают C₁₋₆ алкилсульфонильную группу, необязательно имеющую от 1 до 7, предпочтительно, от 1 до 5 атомов галогена. Его конкретные примеры включают метилсульфонил, дифторметилсульфонил, трифторметилсульфонил, этилсульфонил, пропилсульфонил, изопропилсульфонил, бутилсульфонил, 4,4,4-трифторбутилсульфонил, пентилсульфонил и гексилсульфонил.

В настоящем документе, примеры «C₆₋₁₄ арилсульфонильной группы» включают фенилсульфонил, 1-нафтилсульфонил и 2-нафтилсульфонил.

В настоящем документе, примеры «заместителя» включают атом галогена, цианогруппу, нитрогруппу, необязательно замещенную углеводородную группу, необязательно замещенную гетероциклическую группу, ацильную группу, необязательно замещенную аминогруппу, необязательно замещенную карбамоильную группу, необязательно замещенную тиокарбамоильную группу, необязательно замещенную сульфамойльную группу, необязательно замещенную гидроксигруппу, необязательно

замещенную сульфанильную (SH) группу и необязательно замещенную силильную группу.

В настоящем описании, примеры «углеводородной группы» (включая «углеводородную группу» из «необязательно замещенной углеводородной группы») включают C₁₋₆ алкильную группу, C₂₋₆ алкенильную группу, C₂₋₆ алкинильную группу, C₃₋₁₀ циклоалкильную группу, C₃₋₁₀ циклоалкенильную группу, C₆₋₁₄ арильную группу и C₇₋₁₆ аралкильную группу.

В настоящем описании примеры «необязательно замещенной углеводородной группы» включают углеводородную группу, необязательно имеющую заместитель(и), выбранный из следующей группы заместителей А.

[Группа заместителей А]

- (1) атом галогена,
- (2) нитрогруппа,
- (3) цианогруппа,
- (4) оксогруппа,
- (5) гидроксигруппа,
- (6) необязательно галогенированная C₁₋₆ алкоксигруппа,
- (7) C₆₋₁₄ арилоксигруппа (например, фенокси, нафтокси),
- (8) C₇₋₁₆ аралкилоксигруппа (например, бензилокси),
- (9) 5-14-членная ароматическая гетероциклоксигруппа (например, пиридилокси),
- (10) 3-14-членная не ароматическая гетероциклоксигруппа (например, морфолинилокси, пиперидинилокси),
- (11) C₁₋₆ алкил-карбонилксигруппа (например, ацетокси, пропаноилокси),
- (12) C₆₋₁₄ арил-карбонилксигруппа (например, бензоилокси, 1-нафтоилокси, 2-нафтоилокси),
- (13) C₁₋₆ алкокси-карбонилксигруппа (например, метоксикарбонилкси, этоксикарбонилкси, пропоксикарбонилкси, бутоксикарбонилкси),
- (14) моно- или ди-C₁₋₆ алкил-карбамоилоксигруппа (например, метилкарбамоилокси, этилкарбамоилокси, диметилкарбамоилокси, диэтилкарбамоилокси),
- (15) C₆₋₁₄ арил-карбамоилоксигруппа (например, фенилкарбамоилокси, нафтилкарбамоилокси),
- (16) 5-14-членная ароматическая гетероциклкарбонилксигруппа (например, никотиноилокси),
- (17) 3-14-членная не ароматическая гетероциклкарбонилксигруппа (например, морфолинилкарбонилкси, пиперидинилкарбонилкси),
- (18) необязательно галогенированная C₁₋₆ алкилсульфонилксигруппа (например, метилсульфонилкси, трифторметилсульфонилкси),
- (19) C₆₋₁₄ арилсульфонилксигруппа, необязательно замещенная C₁₋₆ алкильной группой (например, фенилсульфонилкси, толуолсульфонилкси),
- (20) необязательно галогенированная C₁₋₆ алкилтиогруппа,
- (21) 5-14-членная ароматическая гетероциклическая группа,
- (22) 3-14-членная не ароматическая гетероциклическая группа,
- (23) формильная группа,
- (24) карбоксигруппа,
- (25) необязательно галогенированная C₁₋₆ алкилкарбонильная группа,

- (26) C₆₋₁₄ арилкарбонильная группа,
 (27) 5-14-членная ароматическая гетероциклкарбонильная группа,
 (28) 3-14-членная не ароматическая гетероциклкарбонильная группа,
 (29) C₁₋₆ алкоксикарбонильная группа,
 5 (30) C₆₋₁₄ арилоксикарбонильная группа (например, фенилоксикарбонил, 1-нафтилоксикарбонил, 2-нафтилоксикарбонил),
 (31) C₇₋₁₆ аралкилоксикарбонильная группа (например, бензилоксикарбонил, фенэтилоксикарбонил),
 10 (32) карбамоильная группа,
 (33) тиокарбамоильная группа,
 (34) моно- или ди-C₁₋₆ алкилкарбамоильная группа,
 (35) C₆₋₁₄ арилкарбамоильная группа (например, фенилкарбамоил),
 (36) 5-14-членная ароматическая гетероциклкарбамоильная группа (например,
 15 пиридилкарбамоил, тиенилкарбамоил),
 (37) 3-14-членная не ароматическая гетероциклкарбамоильная группа (например, морфолинилкарбамоил, пиперидинилкарбамоил),
 (38) необязательно галогенированная C₁₋₆ алкилсульфонильная группа,
 20 (39) C₆₋₁₄ арилсульфонильная группа,
 (40) 5-14-членная ароматическая гетероциклсульфонильная группа (например, пиридилсульфонил, тиенилсульфонил),
 (41) необязательно галогенированная C₁₋₆ алкилсульфинильная группа,
 (42) C₆₋₁₄ арилсульфинильная группа (например, фенилсульфинил, 1-нафтилсульфинил,
 25 2-нафтилсульфинил),
 (43) 5-14-членная ароматическая гетероциклсульфинильная группа (например, пиридилсульфинил, тиенилсульфинил),
 (44) аминогруппа,
 (45) моно- или ди-C₁₋₆ алкиламиногруппа (например, метиламино, этиламино,
 30 пропиламино, изопропиламино, бутиламино, диметиламино, диэтиламино, дипропиламино, дибутиламино, N-этил-N-метиламино),
 (46) моно- или ди-C₆₋₁₄ ариламиногруппа (например, фениламино),
 (47) 5-14-членная ароматическая гетероцикламиногруппа (например,
 35 пиридиламино),
 (48) C₇₋₁₆ аралкиламиногруппа (например, бензиламино),
 (49) формиламиногруппа,
 (50) C₁₋₆ алкилкарбониламиногруппа (например, ацетиламино, пропаноиламино, бутаноиламино),
 40 (51) (C₁₋₆ алкил)(C₁₋₆ алкилкарбонил)аминогруппа (например, N-ацетил-N-метиламино),
 (52) C₆₋₁₄ арилкарбониламиногруппа (например, фенилкарбониламино, нафтилкарбониламино),
 45 (53) C₁₋₆ алкокси-карбониламиногруппа (например, метоксикарбониламино, этоксикарбониламино, пропоксикарбониламино, буюксикарбониламино, трет-буюксикарбониламино),
 (54) C₇₋₁₆ аралкилокси-карбониламиногруппа (например, бензилоксикарбониламино),

(55) C₁₋₆ алкилсульфониламиногруппа (например, метилсульфониламино, этилсульфониламино),

(56) C₆₋₁₄ арилсульфониламиногруппа, необязательно замещенная C₁₋₆ алкильной группой (например, фенилсульфониламино, толуолсульфониламино),

(57) необязательно галогенированная C₁₋₆ алкильная группа,

(58) C₂₋₆ алкенильная группа,

(59) C₂₋₆ алкинильная группа,

(60) C₃₋₁₀ циклоалкильная группа,

(61) C₃₋₁₀ циклоалкенильная группа, и

(62) C₆₋₁₄ арильная группа.

Число вышеупомянутых заместителей в «необязательно замещенной углеводородной группе» составляет, например, от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 3. Когда количество заместителей равно двум или более, соответствующие заместители могут быть одинаковыми или разными.

В настоящем описании примеры «гетероциклической группы» (включая «гетероциклическую группу» из «необязательно замещенной гетероциклической группы») включают (i) ароматическую гетероциклическую группу, (ii) не ароматическую гетероциклическую группу и (iii) 7-10-членную мостиковую гетероциклическую группу, каждая из которых содержит, в качестве образующего кольцо атома, помимо атома углерода, от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из атома азота, атома серы и атома кислорода.

В настоящем описании, примеры «ароматической гетероциклической группы» (включая «5-14-членную ароматическую гетероциклическую группу») включают 5-14-членную (предпочтительно 5-10-членную) ароматическую гетероциклическую группу, содержащую, в качестве атомов кольца, кроме атома углерода, 1-4 гетероатомов, выбранных из атома азота, атома серы и атома кислорода.

Предпочтительные примеры «ароматической гетероциклической группы» включают 5- или 6-членные моноциклические ароматические гетероциклические группы, такие как тиенил, фурил, пирролил, имидазолил, пиразолил, тиазолил, изотиазолил, оксазолил, изоксазолил, пиридил, пиразинил, пиримидинил, пиридазинил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, триазолил, тетразолил, триазинил и подобные; и

8-14-членные конденсированные полициклические (предпочтительно би- или трициклические) ароматические гетероциклические группы, такие как бензотиофенил, бензофуранил, бензимидазолил, бензоксазолил, бензизоксазолил, бензотиазолил, бензизотиазолил, бензотриазолил, имидазопиридинил, тиенопиридинил, фуропиридинил, пирролопиридинил, пиразолопиридинил, оксазолопиридинил, тиазолопиридинил, имидазопиразинил, имидазопиримидинил, тиенопиримидинил, фуропиримидинил, пирролопиримидинил, пиразолопиримидинил, оксазолопиримидинил, тиазолопиримидинил, пиразолотриазинил, нафто[2,3-b]тиенил, феноксатиинил, индолил, изоиндолил, 1H-индазолил, пуринил, изохинолил, хинолил, фталазинил, нафтиридинил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, карбазолил, β-карболинил, фенантридинил, акридинил, феназинил, фенотиазинил, феноксазинил и подобные.

В настоящем описании, примеры «не ароматической гетероциклической группы» (включая «3-14-членную не ароматическую гетероциклическую группу») включают 3-14-членную (предпочтительно 4-10-членную) не ароматическую гетероциклическую

группу, содержащую, в качестве элементов кольца, кроме атома углерода, 1-4 гетероатомов, выбранных из атома азота, атома серы и атома кислорода.

Предпочтительные примеры «не ароматической гетероциклической группы» включают 3-8-членные моноциклические не ароматические гетероциклические группы, такие как азиридирил, оксиранил, тирианил, азетидинил, оксетанил, тиетанил, тетрагидротиенил, тетрагидрофуранил, пирролинил, пирролидинил, имидазолинил, имидазолидинил, оксазолинил, оксазолидинил, пиразолинил, пиразолидинил, тиазолинил, тиазолидинил, тетрагидроизотиазолил, тетрагидрооксазолил, тетрагидроизооксазолил, пиперидинил, пиперазинил, тетрагидропиридинил, дигидропиридинил, дигидротиопирианил, тетрагидропиримидинил, тетрагидропиридазинил, дигидропирианил, тетрагидропирианил, тетрагидротиопирианил, морфолинил, тиоморфолинил, азепанил, диазепанил, азепинил, оксепанил, азоканил, диазоканил и подобные; и

9-14-членные конденсированные полициклические (предпочтительно би- или трициклические) не ароматические гетероциклические группы, такие как дигидробензофуранил, дигидробензимидазолил, дигидробензоксазолил, дигидробензотиазолил, дигидробензизотиазолил, дигидронафто[2,3-b]тиенил, тетрагидроизохинолил, тетрагидрохинолил, 4Н-хинолизинил, индолинил, изоиндолинил, тетрагидротиено[2,3-с]пиридинил, тетрагидробензазепинил, тетрагидрохиноксалинил, тетрагидрофенантридинил, гексагидрофенотиазинил, гексагидрофеноксазинил, тетрагидрофалазинил, тетрагидронафтиридинил, тетрагидрохиназолинил, тетрагидроциннолинил, тетрагидрокарбазолил, тетрагидро-β-карболинил, тетрагидроакридинил, тетрагидрофеназинил, тетрагидротиоксантил, октагидроизохинолил и подобные.

В настоящем описании, предпочтительные примеры «7-10-членной мостиковой гетероциклической группы» включают хинуклидинил и 7-азабицикло[2.2.1]гептанил.

В настоящем описании, примеры «азотсодержащей гетероциклической группы» включают «гетероциклическую группу», содержащую, по меньшей мере, один атом азота в качестве атома, образующего кольцо.

В настоящем описании, примеры «необязательно замещенной гетероциклической группы» включают гетероциклическую группу, необязательно имеющую заместитель (и), выбранный из вышеупомянутой группы заместителей А.

Число заместителей в «необязательно замещенной гетероциклической группе» составляет, например, от 1 до 3. Когда количество заместителей равно двум или более, соответствующие заместители могут быть одинаковыми или разными.

В настоящем описании, примеры «ацильной группы» включают формильную группу, карбоксигруппу, карбамоильную группу, тиокарбамоильную группу, сульфиногруппу, сульфогруппу, сульфамойльную группу и фосфоногруппу, каждая из которых имеет «1 или 2 заместителя, выбранных из C₁₋₆ алкильной группы, C₂₋₆ алкенильной группы, C₃₋₁₀ циклоалкильной группы, C₃₋₁₀ циклоалкенильной группы, C₆₋₁₄ арильной группы, C₇₋₁₆ аралкильной группы, 5-14-членной ароматической гетероциклической группы и 3-14-членной не ароматической гетероциклической группы, каждая из которых необязательно имеет 1-3 заместителя, выбранных из атома галогена, необязательно галогенированной C₁₋₆ алкоксигруппы, гидроксигруппы, нитрогруппы, цианогруппы, аминогруппы и карбамоильной группы».

Примеры «ацильной группы» также включают углеводородную сульфонильную группу, гетероциклизсульфонильную группу, углеводородную сульфинильную группу и гетероциклизсульфинильную группу.

В настоящем документе, углеводородсульфонильная группа означает связанную с углеводородной группой сульфонильную группу, гетероциклизсульфонильная группа означает связанную с гетероциклической группой сульфонильную группу, углеводородсульфинильная группа означает связанную с углеводородной группой сульфинильную группу, гетероциклизсульфинильная группа означает связанную с гетероциклической группой сульфинильную группу.

Предпочтительные примеры «ацильной группы» включают формильную группу, карбоксигруппу, C₁₋₆ алкилкарбонильную группу, C₂₋₆ алкенилкарбонильную группу (например, кротоноил), C₃₋₁₀ циклоалкилкарбонильную группу (например, циклобутанкарбонил, циклопентанкарбонил, циклогексанкарбонил, циклогептанкарбонил), C₃₋₁₀ циклоалкенилкарбонильную группу (например, 2-циклогексенкарбонил), C₆₋₁₄ арилкарбонильную группу, C₇₋₁₆ аралкилкарбонильную группу, 5-14-членную ароматическую гетероциклизкарбонильную группу, 3-14-членную не ароматическую гетероциклизкарбонильную группу, C₁₋₆ алкоксикарбонильную группу, C₆₋₁₄ арилоксикарбонильную группу (например, фенилоксикарбонил, нафтилоксикарбонил), C₇₋₁₆ аралкилоксикарбонильную группу (например, бензилоксикарбонил, фенэтилоксикарбонил), карбамоильную группу, моно- или ди-C₁₋₆ алкилкарбамоильную группу, моно- или ди-C₂₋₆ алкенилкарбамоильную группу (например, диаллилкарбамоил), моно- или ди-C₃₋₁₀ циклоалкилкарбамоильную группу (например, циклопропилкарбамоил), моно- или ди-C₆₋₁₄ арилкарбамоильную группу (например, фенилкарбамоил), моно- или ди-C₇₋₁₆ аралкилкарбамоильную группу, 5-14-членную ароматическую гетероциклизкарбамоильную группу (например, пиридилкарбамоил), тиокарбамоильную группу, моно- или ди-C₁₋₆ алкилтиокарбамоильную группу (например, метилтиокарбамоил, N-этил-N-метилтиокарбамоил), моно- или ди-C₂₋₆ аленилтиокарбамоильную группу (например, диаллилтиокарбамоил), моно- или ди-C₃₋₁₀ циклоалкилтиокарбамоильную группу (например, циклопропилтиокарбамоил, циклогексилтиокарбамоил), моно- или ди-C₆₋₁₄ арилтиокарбамоильную группу (например, фенилтиокарбамоил), моно- или ди-C₇₋₁₆ аралкилтиокарбамоильную группу (например, бензилтиокарбамоил, фенэтилтиокарбамоил), 5-14-членную ароматическую гетероциклизтиокарбамоильную группу (например, пиридилтиокарбамоил), сульфиногруппу, C₁₋₆ алкилсульфинильную группу (например, метилсульфинил, этилсульфинил), сульфогруппу, C₁₋₆ алкилсульфонильную группу, C₆₋₁₄ арилсульфонильную группу, фосфоногруппу и моно- или ди-C₁₋₆ алкилфосфоногруппу (например, диметилфосфоно, диэтилфосфоно, диизопропилфосфоно, дибутилфосфоно).

В настоящем описании, примеры «необязательно замещенной аминогруппы» включают аминогруппу, необязательно имеющую «1 или 2 заместителя, выбранного из C₁₋₆ алкильной группы, C₂₋₆ алкенильной группы, C₃₋₁₀ циклоалкильной группы, C₆₋₁₄ арильной группы, C₇₋₁₆ аралкильной группы, C₁₋₆ алкилкарбонильной группы, C₆₋₁₄ арилкарбонильной группы, C₇₋₁₆ аралкилкарбонильной группы, 5-14-членной ароматической гетероциклизкарбонильной группы, 3-14-членной не ароматической гетероциклизкарбонильной группы, C₁₋₆ алкоксикарбонильной группы, 5-14-членной

ароматической гетероциклической группы, карбамоильной группы, моно- или ди-С₁₋₆ алкилкарбамоильной группы, моно- или ди-С₇₋₁₆ аралкилкарбамоильной группы, С₁₋₆ алкилсульфонильной группы и С₆₋₁₄ арилсульфонильной группы, каждая из которых

5 необязательно имеет 1-3 заместителя, выбранных из группы заместителей А».

Предпочтительные примеры необязательно замещенной аминогруппы включают аминогруппу, моно- или ди-(необязательно галогенированную С₁₋₆ алкил)аминогруппу (например, метиламино, трифторметиламино, диметиламино, этиламино, диэтиламино, пропиламино, дибутиламино), моно- или ди-С₂₋₆ алкениламиногруппу (например,

10 диаллиламино), моно- или ди-С₃₋₁₀ циклоалкиламиногруппу (например, циклопропиламино, циклогексиламино), моно- или ди-С₆₋₁₄ ариламиногруппу (например, фениламино), моно- или ди-С₇₋₁₆ аралкиламиногруппу (например, бензиламино, дибензиламино), моно- или ди-(необязательно галогенированную С₁₋₆ алкил)

15 карбониламиногруппу (например, ацетиламино, пропиониламино), моно- или ди-С₆₋₁₄ арилкарбониламиногруппу (например, бензоиламино), моно- или ди-С₇₋₁₆ аралкилкарбониламино группу (например, бензилкарбониламино), моно- или ди-5-14-членную ароматическую гетероциклизкарбониламиногруппу (например,

20 никотиноиламино, изоникотиноиламино), моно- или ди-3-14-членную не ароматическую гетероциклизкарбониламиногруппу (например, пиперидинилкарбониламино), моно- или ди-С₁₋₆ алкоксикарбониламиногруппу (например, трет-бутоксикарбониламино),

5-14-членную ароматическую гетероциклиламиногруппу (например, пиридиламино), карбамоиламиногруппу, (моно- или ди-С₁₋₆ алкил-карбамоил)аминогруппу (например,

25 метилкарбамоиламино), (моно- или ди-С₇₋₁₆ аралкилкарбамоил)аминогруппу (например, бензилкарбамоиламино), С₁₋₆ алкилсульфониламиногруппу (например, метилсульфониламино, этилсульфониламино), С₆₋₁₄ арилсульфониламиногруппу

(например, фенилсульфониламино), (С₁₋₆ алкил)(С₁₋₆ алкилкарбонил)аминогруппу

30 (например, N-ацетил-N-метиламино) и (С₁₋₆ алкил)(С₆₋₁₄ арилкарбонил)аминогруппу (например, N-бензоил-N-метиламино).

В настоящем описании примеры «необязательно замещенных карбамоильных групп» включают карбамоильные группы, необязательно имеющие «1 или 2 заместителя,

35 выбранных из С₁₋₆ алкильной группы, С₂₋₆ алкенильной группы, С₃₋₁₀ циклоалкильной группы, С₆₋₁₄ арильной группы, С₇₋₁₆ аралкильной группы, С₁₋₆ алкилкарбонильной группы, С₆₋₁₄ арилкарбонильной группы, С₇₋₁₆ аралкилкарбонильной группы, 5-14-членной ароматической гетероциклизкарбонильной группы, 3-14-членной не ароматической гетероциклизкарбонильной группы, С₁₋₆ алкоксикарбонильной группы,

40 5-14-членной ароматической гетероциклической группы, карбамоильной группы, моно- или ди-С₁₋₆ алкилкарбамоильной группы и моно- или ди-С₇₋₁₆ аралкилкарбамоильной группы, каждая из которых необязательно имеет от 1 до 3 заместителей, выбранных из группы заместителей А ».

Предпочтительные примеры необязательно замещенной карбамоильной группы

45 включают карбамоильную группу, моно- или ди-С₁₋₆ алкилкарбамоильную группу, моно- или ди-С₂₋₆ алкенилкарбамоильную группу (например, диаллилкарбамоил), моно- или ди-С₃₋₁₀ циклоалкилкарбамоильную группу (например,

циклопропилкарбамоил, циклогексилкарбамоил), моно- или ди- C_{6-14} арилкарбамоильную группу (например, фенилкарбамоил), моно- или ди- C_{7-16} аралкилкарбамоильную группу, моно- или ди- C_{1-6} алкилкарбонилкарбамоильную группу (например, ацетилкарбамоил, пропионилкарбамоил), моно- или ди- C_{6-14} арилкарбонилкарбамоильную группу (например, бензоилкарбамоил) и 5-14-членную ароматическую гетероциклилкарбамоильную группу (например, пиридилкарбамоил).

В настоящем описании примеры «необязательно замещенных тиокарбамоильных групп» включают тиокарбамоильные группы, необязательно имеющие «1 или 2 заместителя, выбранных из C_{1-6} алкильной группы, C_{2-6} алкенильной группы, C_{3-10} циклоалкильной группы, C_{6-14} арильной группы, C_{7-16} аралкильной группы, C_{1-6} алкилкарбонильной группы, C_{6-14} арилкарбонильной группы, C_{7-16} аралкилкарбонильной группы, 5-14-членной ароматической гетероциклилкарбонильной группы, 3-14-членной не ароматической гетероциклилкарбонильной группы, C_{1-6} алкоксикарбонильной группы, 5-14-членной ароматической гетероциклической группы, карбамоильной группы, моно- или ди- C_{1-6} алкилкарбамоильной группы и моно- или ди- C_{7-16} аралкилкарбамоильной группы, каждая из которых необязательно имеет от 1 до 3 заместителей, выбранных из группы заместителей А ».

Предпочтительные примеры необязательно замещенной тиокарбамоильной группы включают тиокарбамоильную группу, моно- или ди- C_{1-6} алкилтиокарбамоильную группу (например, метилтиокарбамоил, этилтиокарбамоил, диметилтиокарбамоил, диэтилтиокарбамоил, N-этил-N-метилтиокарбамоил), моно- или ди- C_{2-6} алкенилтиокарбамоильную группу (например, диаллилтиокарбамоил), моно- или ди- C_{3-10} циклоалкилтиокарбамоильную группу (например, циклопропилтиокарбамоил, циклогексилтиокарбамоил), моно- или ди- C_{6-14} арилтиокарбамоильную группу (например, фенилтиокарбамоил), моно- или ди- C_{7-16} аралкилтиокарбамоильную группу (например, бензилтиокарбамоил, фенэтилтиокарбамоил), моно- или ди- C_{1-6} алкилкарбонилтиокарбамоильную группу (например, ацетилтиокарбамоил, пропионилтиокарбамоил), моно- или ди- C_{6-14} арилкарбонилтиокарбамоильную группу (например, бензоилтиокарбамоил) и 5-14-членную ароматическую гетероциклилтиокарбамоильную группу (например, пиридилтиокарбамоил).

В настоящем описании примеры «необязательно замещенной сульфамойльной группы» включают сульфамойльную группу, необязательно имеющую «1 или заместителя, выбранных из C_{1-6} алкильной группы, C_{2-6} алкенильной группы, C_{3-10} циклоалкильной группы, C_{6-14} арильной группы, C_{7-16} аралкильной группы, C_{1-6} алкилкарбонильной группы, C_{6-14} арилкарбонильной группы, C_{7-16} аралкилкарбонильной группы, 5-14-членной ароматической гетероциклилкарбонильной группы, 3-14-членной не ароматической гетероциклилкарбонильной группы, C_{1-6} алкоксикарбонильной группы, 5-14-членной ароматической гетероциклической группы, карбамоильной группы, моно- или ди- C_{1-6} алкилкарбамоильной группы и моно- или ди- C_{7-16} аралкилкарбамоильной группы, каждая из которых необязательно имеет от 1 до 3 заместителей, выбранных из группы заместителей А ».

Предпочтительные примеры необязательно замещенной сульфамойльной группы включают сульфамойльную группу, моно- или ди- C_{1-6} алкилсульфамойльную группу

(например, метилсульфамоил, этилсульфамоил, диметилсульфамоил, диэтилсульфамоил, N-этил-N-метилсульфамоил), моно- или ди- C_{2-6} алкенилсульфамоильную группу (например, даллилсульфамоил), моно- или ди- C_{3-10} циклоалкилсульфамоильную группу (например, циклопропилсульфамоил, циклогексилсульфамоил), моно- или ди- C_{6-14} арилсульфамоильную группу (например, фенилсульфамоил), моно- или ди- C_{7-16} аралкилсульфамоильную группу (например, бензилсульфамоил, фенэтилсульфамоил), моно- или ди- C_{1-6} алкилкарбонилсульфамоильную группу (например, ацетилсульфамоил, пропионилсульфамоил), моно- или ди- C_{6-14} арилкарбонилсульфамоильную группу (например, бензоилсульфамоил) и 5-14-членную ароматическую гетероциклсульфамоильную группу (например, пиридилсульфамоил).

В настоящем описании примеры «необязательно замещенной гидроксигруппы» включают гидроксигруппу, необязательно имеющую «заместитель, выбранный из C_{1-6} алкильной группы, C_{2-6} алкенильной группы, C_{3-10} циклоалкильной группы, C_{6-14} арильной группы, C_{7-16} аралкильной группы, C_{1-6} алкилкарбонильной группы, C_{6-14} арилкарбонильной группы, C_{7-16} аралкилкарбонильной группы, 5-14-членной ароматической гетероциклкарбонильной группы, 3-14-членной не ароматической гетероциклкарбонильной группы, C_{1-6} алкоксикарбонильной группы, 5-14-членной ароматической гетероциклической группы, карбамоильной группы, моно- или ди- C_{1-6} алкилкарбамоильной группы, моно- или ди- C_{7-16} аралкилкарбамоильной группы, C_{1-6} алкилсульфонильной группы и C_{6-14} арилсульфонильной группы, каждая из которых необязательно имеет от 1 до 3 заместителей, выбранных из группы заместителей А».

Предпочтительные примеры необязательно замещенной гидроксигруппы включают гидроксигруппу, C_{1-6} алкоксигруппу, C_{2-6} алкенилоксигруппу (например, аллилокси, 2-бутенилокси, 2-пентенилокси, 3-гексенилокси), C_{3-10} циклоалкилоксигруппу (например, циклогексилокси), C_{6-14} арилоксигруппу (например, фенокси, нафтилокси), C_{7-16} аралкилоксигруппу (например, бензилокси, фенэтилокси), C_{1-6} алкилкарбонилоксигруппу (например, ацетилокси, пропионилокси, бутурилокси, изобутурилокси, пивалоилокси), C_{6-14} арилкарбонилоксигруппу (например, бензоилокси), C_{7-16} аралкилкарбонилоксигруппу (например, бензилкарбонилокси), 5-14-членную ароматическую гетероциклкарбонилоксигруппу (например, никотиноилокси), 3-14-членную не ароматическую гетероциклкарбонилоксигруппу (например, пиперидинилкарбонилокси), C_{1-6} алкоксикарбонилоксигруппу (например, трет-бутоксикарбонилокси), 5-14-членную ароматическую гетероциклоксигруппу (например, пиридилокси), карбамоилоксигруппу, C_{1-6} алкилкарбамоилоксигруппу (например, метилкарбамоилокси), C_{7-16} аралкилкарбамоилоксигруппу (например, бензилкарбамоилокси), C_{1-6} алкилсульфонилоксигруппу (например, метилсульфонилокси, этилсульфонилокси) и C_{6-14} арилсульфонилоксигруппу (например, фенилсульфонилокси).

В настоящем описании примеры «необязательно замещенной сульфанильной группы» включают сульфанильную группу, необязательно имеющую «заместитель, выбранный из C_{1-6} алкильной группы, C_{2-6} алкенильной группы, C_{3-10} циклоалкильной группы, C_{6-14} арильной группы, C_{7-16} аралкильной группы, C_{1-6} алкилкарбонильной группы, C_{6-14}

14 арилкарбонильной группы и 5-14-членной ароматической гетероциклической группы, каждая из которых необязательно имеет от 1 до 3 заместителей, выбранных из группы заместителей А» и галогенированной сульфанильной группы.

Предпочтительные примеры необязательно замещенной сульфанильной группы
 5 включают сульфанильную (-SH) группу, C₁₋₆ алкилтиогруппу, C₂₋₆ алкенилтиогруппу (например, аллилтио, 2-бутенилтио, 2-пентенилтио, 3-гексенилтио), C₃₋₁₀ циклоалкилтиогруппу (например, циклогексилтио), C₆₋₁₄ арилтиогруппу (например, фенилтио, нафтилтио), C₇₋₁₆ аралкилтиогруппу (например, бензилтио, фенэтилтио),
 10 C₁₋₆ алкилкарбонилтиогруппу (например, ацетилтио, пропионилтио, бутурилтио, изобутурилтио, пивалоилтио), C₆₋₁₄ арилкарбонилтиогруппу (например, бензоилтио), 5-14-членную ароматическую гетероциклилтиогруппу (например, пиридилтио) и галогенированную тиогруппу (например, пентафтортио).

В настоящем описании примеры «необязательно замещенной силильной группы»
 15 включают силильную группу, необязательно имеющую «1-3 заместителя, выбранных из C₁₋₆ алкильной группы, C₂₋₆ алкенильной группы, C₃₋₁₀ циклоалкильной группы, C₆₋₁₄ арильной группы и C₇₋₁₆ аралкильной группы, каждая из которых необязательно имеет от 1 до 3 заместителей, выбранных из группы заместителей А».

Предпочтительные примеры необязательно замещенной силильной группы включает
 20 три-C₁₋₆ алкилсилильную группу (например, триметилсиллил, трет-бутил(диметил)силлил).

Более конкретно, примеры ингибитора FGFR1, который может применяться в настоящем изобретении, включают PD-166866 (1-[2-амино-6-(3,5-диметоксифенил) пиридо(2,3-d)пиримидин-7-ил]-3-трет-бутилмочевину: (CAS No.: 192705-79-6), E-3810
 25 (CAS No.: 1058137-23-7), PD-173074 (CAS No.: 219580-11-7), FGFR4-IN-1 (CAS No.: 1708971-72-5), FGFR-IN-1 (CAS No.: 1448169-71-8), FIIN-2 (CAS No.: 1633044-56-0), AZD4547 (CAS No.: 1035270-39-3), FIIN-3 (CAS No.: 1637735-84-2), NVP-BGJ398 (CAS No.: 1310746-10-1), NVP-BGJ398 (CAS No.: 872511-34-7), CH5183284 (CAS No.: 1265229-25-1), Деразантиниб (CAS No.: 1234356-69-4), Деразантиниб рацемат, феруловая кислота (CAS No.: 1135-24-
 30 6), SSR128129E (CAS No.: 848318-25-2), SSR128129E свободная кислота (CAS No.: 848463-13-8), Эрдафитиниб (CAS No.: 1346242-81-6), BLU9931 (CAS No.: 1538604-68-0), PRN1371 (CAS No.: 1802929-43-6), S49076 (CAS No.: 1265965-22-7), LY2874455 (CAS No.: 1254473-64-7), Линситиниб (CAS No.: 867160-71-2), Довитиниб (CAS No.: 405169-16-6), Анлотиниб (CAS No.: 1058156-90-3), Бриваниб (CAS No.: 649735-46-6), Деразантиниб (CAS No.:
 35 1234356-69-4), Анлотиниб дигидрохлорид (CAS No.: 1360460-82-7), АКТВ-1003 (CAS No.: 939805-30-8), BLU-554 (CAS No.: 1707289-21-1), Рогаратиниб (CAS No.: 1443530-05-9), BIBF 1120 эзилат (CAS No.: 656247-18-6), TG 100572 гидрохлорид (CAS No.: 867331-64-4), ENMD-2076 (CAS No.: 934353-76-1), Бриваниб аланинат (CAS No.: 649735-63-7), TG 100572 (CAS No.: 867334-05-2), BIBF 1120 (CAS No.: 656247-17-5), ENMD-2076 тартрат
 40 (CAS No.: 1291074-87-7), TSU-68 (CAS No.: 252916-29-3), Понатиниб (CAS No.: 943319-70-8), Сульфатиниб (CAS No.: 1308672-74-3), LY2784544 (CAS No.: 1229236-86-5), Довитиниб лактат (CAS No.: 692737-80-7), SU 5402 (CAS No.: 215543-92-3), FGF-401 (CAS No.: 1708971-55-4), тирозинкиназа-IN-1 (CAS No.: 705946-27-6), PP58 (CAS No.: 212391-58-7), TG 100801 гидрохлорид (CAS No.: 1018069-81-2), Креноланиб (CAS No.: 670220-88-9), TG 100801 (CAS No.: 867331-82-6), Пазопаниб гидрохлорид (CAS No.: 635702-64-6), Пазопаниб (CAS No.: 444731-52-6), PD168393 (CAS No.: 194423-15-9), Апатиниб (CAS No.: 1218779-75-9), Пальбоциклиб изетионат (CAS No.: 827022-33-3), Форетиниб (CAS No.: 849217-64-7), Ленватиниб (CAS No.: 417716-92-8), Тандутиниб (CAS No.: 387867-13-

2) и их соли (эти соединения названы соединениями группы D). Каждое из этих соединений может иметь один или несколько заместителей, выбранных из описанных выше, пока соединение обладает ингибирующей FGFR1 активностью, предпочтительно, 50% ингибирующую концентрацию (IC₅₀) 100 нМ или ниже против FGFR1.

Субструктура (заместитель, кольцо и т.д.) каждого из этих соединений может быть частично превращено, пока соединение обладает ингибирующей FGFR1 активностью, предпочтительно, 50% ингибирующую концентрацию (IC₅₀) 100 нМ или ниже против FGFR1.

В настоящем изобретении, ингибитором FGFR1 предпочтительно является CAS192705-79-6 (1-[2-амино-6-(3,5-диметоксифенил)-пиридо(2,3-d)пиримидин-7-ил]-3-трет-бутилмочевина: CAS No.: 192705-79-6), E-3810 (CAS No.: 1058137-23-7) или PD173074 (CAS No.: 219580-11-7).

Ингибитор FGFR1 не ограничивается соединениями, описанными выше, и антисмысловой олигонуклеотид или мРНК против мРНК FGFR1, антитело, связывающееся с FGFR1, доминантно-отрицательный мутант FGFR1 или подобные, также можно использовать в качестве ингибитора FGFR1. Такой ингибитор FGFR1 коммерчески доступен или может быть синтезирован известным способом.

В настоящем документе «маркер» означает клеточный антиген или его ген, который специфически экспрессируется в зависимости от заранее определенного типа клетки, такой как «маркерный белок» и «маркерный ген». Предпочтительно маркером является маркер клеточной поверхности, что позволяет концентрировать, выделять и/или обнаруживать живые клетки. Маркер может быть маркером позитивной селекции или маркером негативной селекции.

Обнаружение маркерного белка может быть проведено с помощью иммунологического анализа, например, ELISA, иммуноокрашивания или проточной цитометрии с использованием антитела, специфичного для маркерного белка. Обнаружение маркерного гена может быть проведено с помощью способа амплификации и/или обнаружения нуклеиновой кислоты, известного в данной области техники, например, ОТ-ПЦР, микроматрицы, биочипа или подобного. В настоящем документе «положительный» относительно маркерного белка означает, что он определен как положительный с помощью проточной цитометрии, а «отрицательный» означает, что он равен или меньше нижнего предела обнаружения в проточной цитометрии. Кроме того, «положительный» для маркерного гена означают, что он обнаружен с помощью ОТ-ПЦР, а «отрицательный» означает, что он равен или меньше нижнего предела обнаружения в ОТ-ПЦР.

В настоящем документе «экспрессия» определяется как транскрипция и/или трансляция определенной нуклеотидной последовательности, управляемая внутриклеточным промотором.

В настоящем документе «клетки» означает композицию клеток, другими словами, популяцию клеток, если не указано иное. Соответственно, «клетки» могут включать не только клетки или популяцию клеток определенного типа, но также клетки или популяцию клеток одного или нескольких других типов. Доля клеток определенного типа в «клетках» может быть увеличена обогащением или очисткой, или обеднением клетками одного или нескольких других типов.

В настоящем документе, «плюрипотентность» означает способность дифференцироваться в ткани и клетки, имеющие разные формы и функции, и дифференцироваться в клетки любой колонии из 3-х зародышевых слоев. «Плюрипотентность» отличается от «тотипотентности», которая представляет собой

способность дифференцироваться в любую ткань живого организма, включая бластодиск, тем, что плюрипотентные клетки не могут дифференцироваться в бластодиск и, следовательно, не имеют способности образовывать индивидуум.

В настоящем документе, «мультипотентность» означает способность дифференцироваться в множественное и ограниченное количество клеточных линий. Например, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, нервные стволовые клетки мультипотентны, но не плюрипотентны.

В настоящем документе «плюрипотентные стволовые клетки» относятся к эмбриональным стволовым клеткам (ES клеткам) и клеткам, потенциально имеющим плюрипотентность, аналогичную таковой у ES клеток, то есть способность дифференцироваться в различные ткани (все энтодермальные, мезодермальные и эктодермальные ткани) в живом организме. Примеры клеток, обладающих плюрипотентностью, сходной с плюрипотентностью ES клеток, включают «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» (которые здесь также могут называться «iPS клетки»). В настоящем изобретении, предпочтительно, плюрипотентные стволовые клетки являются плюрипотентными стволовыми клетками человека.

Доступные «ES клетки включают ES клетки мыши, такие как разные клеточные линии ES клеток мышей, установленные inGenious, RIKEN, и подобные, и ES клетки человека, такие как разные ES клеточные линии человека, установленные NIH, RIKEN, Kyoto University, Cellartis, и подобные. Например, доступные ES клеточные линии включают CHB-1 - CHB-12, RUES1, RUES2, HUES1 - HUES28 от NIH, и подобные; H1 и H9 от WisCell Research; и KhES-1, KhES-2, KhES-3, KhES-4, KhES-5, SSES1, SSES2, SSES3 от RIKEN, и подобные.

«Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки» относятся к клеткам, полученным репрограммированием соматических клеток млекопитающих или недифференцированных стволовых клеток введением конкретных факторов (факторов репрограммирования ядра). В настоящее время существуют разные «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» и iPS клетки, установленные Yamanaka, et al. введением 4 факторов Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc в фибробласты мышей (Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676); iPS клетки, полученные из клеток человека, установленные введением аналогичных 4 факторов в фибробласты человека (Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.); Nanog-iPS клетки, установленные сортировкой клеток с применением экспрессии Nanog в качестве индикатора после введения 4 факторов (Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.); iPS клетки, полученные способом без применения c-Myc (Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106); и iPS клетки, установленные введением 6 факторов безвирусным путем (Okita K et al. Nat. Methods 2011 May; 8(5): 409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31 (3) 458-66) также могут быть использованы. Также, могут применяться индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, установленные введением 4 факторов OCT3/4, SOX2, NANOG и LIN28, полученные Thomson et al. (Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные Daley et al. (Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные Sakurada et al. (Публикация не прошедшей экспертизу заявки на патент Японии № 2008-307007) и подобные.

Кроме того, могут применяться любые индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, известные в данной области техники, описанные во всех опубликованных статьях (например, Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol 3, Issue 5, 568-574; Kim

JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No. 7, 795-797) или патентах (например, Публикация не прошедшей экспертизу заявки на патент Японии № 2008-307007, Публикация не прошедшей экспертизу заявки на патент Японии № 2008-283972, US2008-2336610, US2009-047263, WO2007-069666, WO2008-118220, WO2008-124133, WO2008-151058, WO2009-006930, WO2009-006997, WO2009-007852).

Доступные индуцированные плюрипотентные клеточные линии включают разные iPS клеточные линии, установленные NIH, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Kyoto University и подобные. Например, такие iPS клеточные линии человека включают RIKEN клеточные линии HiPS-RIKEN-1A, HiPS-RIKEN-2A, HiPS-RIKEN-12A и Nips-B2 и Kyoto University клеточные линии Ff-WJ-18, Ff-I01s01, Ff-I01s02, Ff-I01s04, Ff-I01s06, Ff-I14s03, Ff-I14s04, QHJI01s01, QHJI01s04, QHJI14s03, QHJI14s04, RWMH15s02, Ff-MH15s02, 253G1, 201B7, 409B2, 454E2, 606A1, 610B1, 648A1, CDI клеточные линии MyCell iPS клетки (21525.102.10A), MyCell iPS клетки (21526.101.10A) и подобные.

В настоящем документе, «дефинитивные клетки эндодермы» означают клетки, отличающиеся экспрессией, по меньшей мере, одного маркера SOX17, FOXA2, BMP2, CER и CXCR4.

В настоящем документе, «трубчатые клетки первичной кишки» означают клетки, отличающиеся экспрессией, по меньшей мере, одного маркера HNF1B и HNF4A.

В настоящем документе, «клетки задней передней кишки» означает клетки, отличающиеся экспрессией, по меньшей мере, одного маркера PDX-1, HNF6 и HLXB9.

В настоящем документе, «клетки-предшественники поджелудочной железы» означает клетки, отличающиеся экспрессией, по меньшей мере, одного маркера PDX-1, NKX6.1, PTF-1 α , GATA4 и SOX9.

В настоящем документе, «эндокринные клетки-предшественники» означают клетки, отличающиеся экспрессией, по меньшей мере, одного маркера хромогранина A, NeuroD и Ngn3, отсутствие экспрессии какого-либо маркера гормональной системы, связанной с поджелудочной железой (такого как инсулин). Эндокринные клетки-предшественники могут экспрессировать маркеры Pax-4, NKX2-2, Islet-1, PDX-1, PTF-1 α , и т.д.

Клетки на каждой стадии дифференциации могут быть получены с применением подходов, подробно описанных ниже.

2. Инсулинпродуцирующие клетки

«Инсулинпродуцирующие клетки» настоящего изобретения означают клетки, отличающиеся экспрессией инсулина и полученные индуцированием дифференциации плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*. Более конкретно, «инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения отличаются тем, что содержат: клетки, экспрессирующие оба маркера инсулина и NKX6.1 (то есть, инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки) в количестве примерно 30% или более; и клетки, экспрессирующие только инсулин в качестве маркера, но не оба инсулин и NKX6.1 (то есть, инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки, далее названные «Ins+ NKX- клетки»), в количестве более примерно 15%. В настоящем документе, «инсулин-положительные» также называются «Ins+», NKX6.1-положительные называются «NKX+» и NKX6.1-отрицательные называются «NKX-». «Инсулин положительные и NKX6.1-положительные клетки» также называются «Ins+ NKX+ клетки», и «инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки» называются «Ins+ NKX- клетки».

Верхний предел доли Ins+ NKX+ клеток в инсулинпродуцирующих клетках особенно не ограничен, и предпочтительно может составлять примерно 50% или менее.

Доля Ins+ NKX- клеток в инсулинпродуцирующих клетках предпочтительно может

составлять примерно 20% или более, более предпочтительно, примерно 25% или более, еще более предпочтительно, примерно 30% или более. Верхний предел доли Ins+NKX-клеток в инсулинпродуцирующих клетках особенно не ограничен и предпочтительно может составлять примерно 40% или менее.

- 5 Например, инсулинпродуцирующие клетки содержат: Ins+NKX+ клетки в количестве примерно 30% или более и примерно 50% или менее; и Ins+NKX- клетки в количестве более примерно 15% и примерно 40% или менее, предпочтительно, в количестве примерно 20% или более и примерно 40% или менее, более предпочтительно, в количестве примерно 25% или более и примерно 40% или менее, еще предпочтительно, в количестве примерно 30% или более и примерно 40% или менее.

10 В настоящем документе, доля клеток определенного типа в инсулинпродуцирующих клетках означает долю к общему количеству клеток, содержащихся в инсулинпродуцирующих клетках. Доля клеток каждого типа указывает на значение в инсулинпродуцирующих клетках, которые подвергаются индукции дифференциации в островковоподобные клетки поджелудочной железы (то есть, подвергаются трансплантации в живой организм).

Так как большая часть Ins+NKX- клеток была найдена в незрелых инсулинпродуцирующих клетках (на ранней стадии дифференциации), более высокая доля Ins+NKX- клеток показывает, что инсулинпродуцирующие клетки являются более незрелыми инсулинпродуцирующими клетками (на ранней стадии дифференциации).

Инсулинпродуцирующие клетки могут быть дополнительно охарактеризованы одним или несколькими, выбранными из следующих a - f:

- a. низкий уровень экспрессии MafA гена или его белка,
- b. низкая доля Ki67-положительных клеток,
- 25 c. низкая доля глюкагон-положительных и инсулин-отрицательных клеток,
- d. свойство демонстрировать ответ стимулированной глюкозой секреции инсулина,
- e. высокая доля хромогранин A-положительных клеток, и
- f. низкая доля щелочная фосфатаза-положительных плюрипотентных стволовых клеток.

30 В настоящем документе, «несколько» означает 2, 3, 4, 5 или 6.

- a. Низкий уровень экспрессии MafA гена или его генного продукта

Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения отличаются тем, что уровень экспрессии гена MafA или белка, кодируемого геном MafA, ниже, чем уровень экспрессии гена MafA или белка, кодируемого геном MafA в островке поджелудочной железы.

35 «Островок поджелудочной железы» означает клетки на более продвинутой стадии дифференциации, чем инсулинпродуцирующие клетки, включая зрелые β клетки поджелудочной железы, и отличающиеся экспрессией, по меньшей мере, одного из MafA, UCN3 и IAPP, которые являются маркерами зрелых β клеток поджелудочной железы. Можно использовать островок поджелудочной железы, выделенный у здорового человека.

40 Сравнение уровней экспрессии гена MafA или белка, кодируемого геном MafA, между инсулинпродуцирующими клетками и островком поджелудочной железы может быть проведено с использованием подхода, известного в данной области техники, например, таким образом, чтобы уровень экспрессии гена MafA или белка кодируемого геном MafA, обнаруженный и количественно оцененный с использованием подхода, например, ОТ-ПЦР, микрочипа, биочипа, вестерн-блоттинга, ELISA, иммуноокрашивания или проточной цитометрии, корректируется уровнем экспрессии гена внутреннего стандарта

или белка, кодируемого геном внутреннего стандарта, для получения относительной величины, которую используют для сравнения. «Ген внутреннего стандарта» особенно не ограничен, и может применяться GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), β -актин, β 2-микроглобулин, HPRT1 (гипоксантинфосфорибозилтрансфераза 1) и т.д.

5 Уровень экспрессии гена MafA или белка, кодируемого геном MafA в инсулинпродуцирующих клетках, составляет примерно 20% или менее, предпочтительно, примерно 15% или менее, более предпочтительно, примерно 10% или менее, еще предпочтительнее, примерно 5% или менее, особенно предпочтительно, примерно 1% или менее уровня экспрессии гена MafA или белка, кодируемого геном MafA, в островке

10 поджелудочной железы.

Поскольку ген MafA или белок, кодируемый геном MafA, является маркером зрелых β клеток поджелудочной железы, данная особенность указывает на то, что инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения содержат очень мало зрелых β клеток поджелудочной железы, или что инсулинпродуцирующие клетки настоящего

15 изобретения находятся на такой стадии дифференциации, что инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения содержат только низкую долю зрелых β клеток поджелудочной железы.

б. Низкая доля Ki67-положительных клеток

Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения отличаются тем, что

20 содержат Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%.

«Ki67-положительные клетки» означают высоко пролиферативные клетки, сосуществующие в инсулинпродуцирующих клетках, образованных индукцией дифференциации плюрипотентных стволовых клеток, и отличающиеся экспрессией Ki67 в качестве маркера. «Ki67» известен как нуклеопротеин, относящийся к клеточному

25 циклу, и также известен как маркер пролиферации клеток и клеточного цикла, так как его экспрессия найдена в G1, S, G2 и M фазах пролиферирующих клеток и не найдена в G0 фазе, стадии покоя.

В настоящем документе, «Ki67-положительные» также называются «Ki67+». «Ki67-положительные клетки» также называются «Ki67+ клетки».

30 Доля Ki67+ клеток в инсулинпродуцирующих клетках составляет примерно менее чем 3%, примерно менее чем 1,5%, предпочтительно, примерно менее чем 1%, более предпочтительно, примерно менее чем 0,8%, еще предпочтительнее, примерно менее чем 0,5%.

Данная характеристика показывает, что инсулинпродуцирующие клетки настоящего

35 изобретения содержат незначительное количество сосуществующих или оставшихся Ki67+ клеток, или содержат только низкую долю сосуществующих или оставшихся Ki67+ клеток. Ki67+ клетки могут негативно влиять на реципиентов или влиять на долговременное выживание трансплантата или трансплантированных клеток из-за высокой пролиферативной способности, и сосуществующие или оставшиеся Ki67+

40 клетки не являются предпочтительными в некоторых случаях.

с. Низкая доля глюкагон-положительных и инсулин-отрицательных клеток

Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения отличаются содержанием глюкагон-положительных и Ins- клеток в количестве менее 3%. В настоящем документе, «глюкагон-положительные» также называют «Gcg+». «Глюкагон-положительные и

45 инсулин-отрицательные клетки» также называются «Gcg+Ins- клетки».

Доля Gcg+Ins- клеток в инсулинпродуцирующих клетках составляет примерно 2,5% или менее, предпочтительно, примерно 2% или менее, более предпочтительно, примерно 1% или менее, еще предпочтительнее, примерно 0,5% или менее.

Так как Gcg+Ins- являются маркером зрелых α клеток поджелудочной железы, данная характеристика означает, что инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения содержат очень мало α клеток поджелудочной железы, или что инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения, как таковые, находятся на такой стадии

дифференциации, что инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения содержат только низкую долю зрелых α клеток поджелудочной железы.

d. Свойство демонстрировать ответ стимулированной глюкозой секреции инсулина (GSIS).

Ответ GSIS инсулинпродуцирующими клетками может быть вызван в соответствии с широко известным подходом (например, заявка на патент США № 11/773,944), и может быть оценен, например, через измерение количества С-пептида, секретированного в среду. С-пептид представляет собой продукт разложения, полученный в количестве молей, эквивалентном таковому инсулина во время созревания проинсулина. Измерение количества С-пептида может проводиться, например, через ELISA с применением анти-С-пептидного моноклонального антитела.

e. Высокая доля хромогранин А-положительных клеток

Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения отличаются содержанием хромогранин А-положительных клеток в количестве более примерно 45%.

В настоящем документе, «хромогранин А-положительные» также называют «Chga+». «Хромогранин А-положительные клетки» также называют «Chga+ клетки».

Доля Chga+ клеток в инсулинпродуцирующих клетках может составлять, предпочтительно, примерно 50% или более (например, примерно 55% или более), более предпочтительно, примерно 60% или более, более предпочтительно, примерно 70% или более, более предпочтительно, примерно 80% или более, более предпочтительно, примерно 85% или более, особенно предпочтительно, примерно 90% или более. Верхний предел доли Chga+ клеток в инсулинпродуцирующих клетках особенно не ограничен и может составлять, например, менее чем примерно 95%, или менее чем примерно 99%. Доля Chga+ клеток инсулинпродуцирующих клетках может составлять примерно 93% или более.

Chga+ клетки включают клетки, которые секретируют гормон, такой как инсулин (эндокринные клетки), которые также включают вышеуказанные Ins+NKX+ клетки и Ins+NKX- клетки. Следовательно, данная характеристика показывает, что инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения содержат эндокринные клетки в высокой доле.

f. Низкая доля щелочная фосфатаза-положительных плюрипотентных стволовых клеток

Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения отличаются содержанием щелочная фосфатаза-положительных плюрипотентных стволовых клеток в количестве менее примерно 0,01%.

Доля щелочная фосфатаза-положительных плюрипотентных стволовых клеток в инсулинпродуцирующих клетках может составлять, предпочтительно, примерно 0,008% или менее, более предпочтительно, примерно 0,005% или менее, еще предпочтительнее, примерно 0,001% или менее.

Так как щелочная фосфатаза является маркером, указывающим на недифференцированное состояние плюрипотентных стволовых клеток, данная характеристика показывает, что инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения содержат очень незначительное количество нежелательных плюрипотентных стволовых клеток, которые не претерпели индукцию дифференциации, или содержат нежелательные

плюрипотентные стволовые клетки, которые не претерпели индукцию дифференциации, в низкой доле.

Щелочная фосфатаза-положительные плюрипотентные стволовые клетки могут дополнительно экспрессировать дополнительный маркер, указывающий на плюрипотентность. В качестве дополнительного маркера, указывающего на плюрипотентность плюрипотентных стволовых клеток, может применяться, по меньшей мере, один, выбранный из Nanog, Sox2, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 и т.д.

Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения могут находиться в криоконсервированном состоянии. Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения при криоконсервации могут дифференцироваться в островкоподобные клетки поджелудочной железы и созревать, чтобы секретировать гормон после оттаивания, как в случае свежих инсулинпродуцирующих клеток, которые не подвергались криоконсервации. Криоконсервацию и оттаивание можно проводить с использованием подхода, обычно используемого в данной области техники.

Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения могут быть получены подходами, подробно описанными ниже.

3. Островкоподобные клетки поджелудочной железы

В настоящем документе, «островкоподобные клетки поджелудочной железы» означают зрелые клетки, полученные индуцированием дифференциации вышеописанных инсулинпродуцирующих клеток и, в случае «островков поджелудочной железы», образованных развитием поджелудочной железы в живом организме, отличаются тем, что экспрессируют, по меньшей мере, один маркер MafA, UCN3 и IAPP, которые являются маркерами созревания β клеток поджелудочной железы, и экспрессируют глюкагон, который является маркером созревания α клеток поджелудочной железы.

Более конкретно, «островкоподобные клетки поджелудочной железы» в настоящем документе могут быть охарактеризованы одним или несколькими, выбранными из следующих (a) - (d):

(a) высокая доля хромогранин А-положительных клеток (Chga+ клеток),

(b) низкая доля Ki67-положительных клеток (Ki67+ клеток),

(c) высокая доля глюкагон-положительных и инсулин-отрицательных клеток (Gcg+ Ins- клеток), и

(d) свойство демонстрировать инсулин-секретирующее действие в ответ на гипогликемию.

В настоящем документе, «несколько» означает 2, 3 или 4.

Оценка может проводиться на наличие или отсутствие характеристик от (a) до (d) через 1 неделю, предпочтительно, 2 недели после индукции дифференциации инсулинпродуцирующих клеток (например, после трансплантации в живой организм), где верхний предел срока периода особенно не ограничен и может составлять до 1 года.

Доля клеток определенного типа в островкоподобных клетках поджелудочной железы означает долю кластеров клеток, полученных из трансплантата, к общему количеству клеток.

(a) Высокая доля Chga+ клеток

Островкоподобные клетки поджелудочной железы настоящего изобретения отличаются тем, что содержат Chga+ клетки в количестве примерно 50% или более. Доля Chga+ клеток в островкоподобных клетках поджелудочной железы составляет, предпочтительно, примерно 60% или более, более предпочтительно, примерно 70% или более, еще более предпочтительно, примерно 90% или более, особенно предпочтительно,

примерно 95% или более (например, примерно 97% или более, примерно 98% или более).

Chga+ клетки включают клетки, которые секретируют гормон, такой как инсулин и глюкагон (эндокринные клетки), и данная характеристика означает, что островковоподобные клетки поджелудочной железы содержат эндокринные клетки в

5 (b) Низкая доля Ki67+ клеток

Островковоподобные клетки поджелудочной железы настоящего изобретения отличаются тем, что содержат Ki67-положительные клетки в количестве менее примерно 3%. Доля Ki67-положительных клеток в островковоподобных клетках поджелудочной

10 железы предпочтительно составляет менее чем примерно 1%, более предпочтительно, менее чем примерно 0,8%, еще предпочтительнее, менее чем примерно 0,5%.
Настоящая характеристика означает, что островковоподобные клетки поджелудочной железы содержат очень незначительное количество Ki67+ клеток, сосуществование или остаток которых может быть нежелательным, или содержит Ki67+ клетки в очень

15 (c) Высокая доля Gcg+Ins- клеток

Островковоподобные клетки поджелудочной железы настоящего изобретения отличаются тем, что содержат Gcg+Ins- клетки в количестве примерно 10% или более. Доля Gcg+Ins- клеток в островковоподобных клетках поджелудочной железы составляет,

20 предпочтительно, примерно 15% или более, более предпочтительно, примерно 20% или более, еще более предпочтительно, примерно 25% или более. Верхний предел доли Gcg+Ins- клеток в островковоподобных клетках поджелудочной железы особенно не ограничен и может составлять, например, примерно 50% или менее, предпочтительно, примерно 45% или менее, более предпочтительно, примерно 40% или менее.

25 Поскольку он является маркером зрелых α клеток поджелудочной железы, Gcg+Ins- означает, что островковоподобные клетки поджелудочной железы содержат зрелые α клетки поджелудочной железы в большей пропорции, чем инсулинпродуцирующие клетки. Gcg+Ins- означает, что островковоподобные клетки поджелудочной железы находятся в более зрелой стадии дифференциации, чем инсулинпродуцирующие клетки.

30 (d) Свойство демонстрировать инсулин-секретирующее действие в ответ на гипогликемию
Островковоподобные клетки поджелудочной железы настоящего изобретения отличаются тем, что демонстрируют инсулин-секретирующее действие в ответ на гипогликемию. «Инсулин-секретирующее действие в ответ на гипогликемию» означает,

35 что количество секретированного инсулина возрастает через 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа или 5 часов после возникновения гипогликемии. «Гипогликемия» означает случай, когда концентрацию глюкозы в крови или в среде составляет примерно 70 мг/дл или менее. Измерение количества секретированного инсулина может проводиться с применением любого общеизвестного подхода, который особенно не ограничен, и

40 может быть достигнут через измерение количества С-пептида в крови или в среде.
При возникновении гипогликемии в живом организме, в обычных случаях, повышению уровня глюкозы в крови способствует секреция глюкагона или подобного, и в то же время инсулин секретируется как антагонизм против глюкагона, контролирующего уровень глюкозы в крови. Также, островковоподобные клетки

45 поджелудочной железы настоящего изобретения позволяют контролировать уровни глюкозы в крови при гипогликемии, и демонстрируют действие, способствующее повышению уровня глюкозы в крови в ответ на гипогликемию, и в то же время, секретируют инсулин в качестве антагонизма против повышения уровня глюкозы в

крови.

4. Способ продуцирования клеток

Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения могут быть получены индуцированием дифференциации плюрипотентных стволовых клеток. Индукция дифференциации плюрипотентных стволовых клеток в инсулинпродуцирующие клетки

может проводиться с применением следующих стадий индуцирования дифференциации: стадия 1) индукция дифференциации плюрипотентных стволовых клеток в дефинитивные клетки энтодермы;

стадия 2) индукция дифференциации дефинитивных клеток энтодермы в трубчатые клетки первичной кишки;

стадия 3) индукция дифференциации трубчатых клеток первичной кишки в клетки задней передней кишки;

стадия 4) индукция дифференциации клеток задней передней кишки в клетки-предшественники поджелудочной железы;

стадия 5) индукция дифференциации клеток-предшественников поджелудочной железы в эндокринные клетки-предшественники; и

стадия 6) индукция дифференциации эндокринных клеток-предшественников в инсулинпродуцирующие клетки.

В настоящем документе будет описана каждая стадия индуцирования дифференциации в каждой клетке, хотя она не ограничена этими подходами.

Стадия 1) Дифференциация в дефинитивные клетки энтодермы

Плюрипотентные стволовые клетки культивируют в среде, содержащей низкую дозу активина А, чтобы позволить дифференцировать в дефинитивные клетки энтодермы.

Средой, применяемой на этой стадии, может быть основанная среда для применения для культивирования клеток млекопитающих, такая как RPMI среда, MEM среда, iMEM среда, DMEM (Среда игла, модифицированная по Дульбекко) среда, улучшенная среда MEM Zinc Option, улучшенная MEM/1% B-27 добавка/пенициллин стрептомициновая среда или MCDB131/20 mM глюкоза/NaHCO₃/FAF-BSA/ITS-X/Glutamax/аскорбиновая кислота/пенициллин стрептомициновая среда.

Активин А может содержаться в среде в низкой дозе, например, 5-100 нг/мл, предпочтительно, 5-50 нг/мл, более предпочтительно, 5-10 нг/мл.

Затем к среде может быть добавлен ингибитор ROCK и ингибитор GSK3 β .

Концентрацию ингибитора GSK3 β в среде устанавливают приблизительно, в зависимости от типа применяемого ингибитора GSK3 β . Например, в случае применения CHIR в качестве ингибитора GSK3 β , его концентрация обычно составляет 2-5 мкМ, предпочтительно, 2-4 мкМ, особенно предпочтительно, примерно 3 мкМ.

Концентрацию ингибитора ROCK в среде устанавливают приблизительно, в зависимости от типа применяемого ингибитора ROCK. Например, в случае применения Y27632 в качестве ингибитора ROCK, его концентрация обычно составляет 5-20 мкМ, предпочтительно, 5-15 мкМ, особенно предпочтительно, примерно 10 мкМ.

К среде дополнительно может быть добавлен инсулин. Инсулин может содержаться в количестве 0,01-20 мкМ, предпочтительно, 0,1-10 мкМ, более предпочтительно, 0,5-5 мкМ, в среде. Концентрация инсулина в среде может быть, но не ограничена ими, концентрацией инсулина, содержащейся в добавленной B-27 добавке.

Количество клеток в начале культивирования особенно не ограничено и составляет 22000-150000 клеток/см², предпочтительно, 22000-100000 клеток/см², более предпочтительно, 22000-80000 клеток/см². Период культивирования составляет от 1

дня до 4 дней, предпочтительно, от 1 дня до 3 дней, особенно предпочтительно, 3 дня.

Температура культивирования особо не ограничена, и культивирование проводят при температуре от 30 до 40°C (например, 37°C). Концентрация углекислого газа в контейнере с культурой составляет порядка, например, 5%.

5 Альтернативно, в настоящем изобретении, плюрипотентные стволовые клетки могут быть подвергнуты первому культивированию в среде в условиях, допускающих действие инсулина в присутствии низкой дозы активина А, а затем подвергнуть второму культивированию в среде в условиях, которые не допускают действие инсулина для выработки дефинитивных клеток эндодермы.

10 (1) Первое культивирование

«Условия, которые допускают действие инсулин» означают условия, которые вызывают активацию пути передачи сигнала инсулина в клетках через инсулин. В нормальных случаях, инсулин связывается с рецептором инсулина, присутствующим на поверхности клеточной мембраны, чтобы активировать тирозинкиназу, присутствующую в рецепторе, тем самым тирозин-фосфорилируя семейство белков субстрата рецептора инсулина (IRS: IRS-1, 2, 3). В настоящем документе, возникновение серии реакций, которые инициируются связыванием инсулина с рецептором инсулина, называют «вызвать активацию пути передачи сигнала инсулина».

Примеры условий, позволяющих действие инсулина, включают случай, когда инсулин содержится в среде. Инсулин может быть любого типа, который может активировать путь передачи сигнала инсулина в плюрипотентных стволовых клетках, и может быть инсулином, продуцируемым рекомбинантным способом, или инсулином, полученным путем синтеза с использованием способа твердофазного синтеза. Например, можно использовать инсулин, полученный от человека, примата, не относящегося к человеку, свиньи, крупного рогатого скота, лошади, овцы, козы, ламы, собаки, кошки, кролика, 25 мыши или морской свинки, и предпочтительным является инсулин человека.

В настоящем изобретении, любой мутант инсулина, производное инсулина или агонист инсулина, которые могут вызывать активацию пути передачи сигнала инсулина в плюрипотентных стволовых клетках, можно использовать в качестве «инсулина».

30 Примеры «мутанта инсулина» включают: мутант инсулина, обладающий полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности, образованной делецией, заменой, добавлением или вставкой от 1 до 20 аминокислот, предпочтительно от 1 до 10 аминокислот, еще предпочтительнее, от 1 до 5 аминокислот в аминокислотной последовательности инсулина, и способный вызывать активацию пути передачи сигнала инсулина; и мутант инсулина, имеющий полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей идентичность последовательности 80% или выше, более предпочтительно, 90% или выше, еще предпочтительнее, 95% или выше, наиболее предпочтительно, 99% или выше, к аминокислотной последовательности инсулина, и способный вызывать активацию пути передачи сигнала инсулина. Сравнение 40 аминокислотных последовательностей может быть выполнено с использованием известного подхода, например, с использованием BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information), например, с настройками по умолчанию. «Производное инсулина» означает: полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, образованной химическим замещением (например, α-метилированием, α-гидроксилированием), делецией (например, дезаминированием) или модификацией (например, N-метилированием) некоторых групп в аминокислотных остатках инсулина или мутанта инсулина, и способный вызывать активацию пути передачи сигнала инсулина; или вещество, обладающее таким же действием. «Агонист

инсулина» означает полипептид, способный вызывать активацию пути передачи сигнала инсулина через связывание с рецептором инсулина независимо от структуры инсулина, или вещество, которое проявляет такое же действие.

Инсулин может содержаться в количестве от 0,01 до 20 мкМ, предпочтительно, от 0,1 до 10 мкМ, более предпочтительно, от 0,5 до 5 мкМ, в среде для первого культивирования. Концентрацией инсулина в среде может быть, но не ограничивается, концентрация инсулина, содержащегося в добавке В-27.

В среду может быть дополнительно добавлен ингибитор ROCK и/или ингибитор GSK3 β . Концентрацию ингибитора ROCK в среде устанавливают соответствующим образом в зависимости от типа используемого ингибитора ROCK. Например, в случае использования Y27632 в качестве ингибитора ROCK, его концентрация обычно составляет от 5 до 20 мкМ, и может быть предпочтительно, от 5 до 15 мкМ, особенно предпочтительно, примерно 10 мкМ. Концентрацию ингибитора GSK3 β в окружающей среде соответствующим образом устанавливают в зависимости от типа используемого ингибитора GSK3 β . Например, в случае использования CHIR в качестве ингибитора GSK3 β , его концентрация обычно составляет от 2 до 5 мкМ, и может быть предпочтительно, от 2 до 4 мкМ, особенно предпочтительно, примерно 3 мкМ.

В среду может быть дополнительно добавлен один или несколько, выбранные из группы, состоящей из пирувата (например, натриевой соли), L-аланил L-глутамин и глюкозы. В среду может быть добавлен пируват в количестве от 10 до 1000 мг/л, предпочтительно, 30-500 мг/л, более предпочтительно, 50-200 мг/л, особенно предпочтительно, примерно 110 мг/л. В среду может быть добавлен L-аланил L-глутамин в количестве от 50 до 2000 мг/л, предпочтительно, 100-1500 мг/л, более предпочтительно, 500-1000 мг/л, особенно предпочтительно, примерно 860 мг/л. В среду может быть добавлена глюкоза в количестве 15 мМ или более, предпочтительно, 15-30 мМ, более предпочтительно, 15-25, особенно предпочтительно, примерно 25 мМ. Концентрации пирувата, L-аланил L-глутамин и глюкозы в среде могут быть, но не ограничены ими, концентрациями пирувата, L-аланил L-глутамин и глюкозы, содержащихся в DMEM среде (DMEM, высокоглюкозная, GlutaMAX(TM), пируватная(Thermo Fisher Scientific)) или другой DMEM среде.

Среда, приготовленная с использованием любой из вышеуказанных основных сред в качестве основания, с добавлением одного или нескольких из вышеуказанных компонентов, может быть использована в качестве среды. Основная среда представляет собой, предпочтительно, среду DMEM, более предпочтительно, среду DMEM, содержащую пируват, L-аланил L-глутамин и глюкозу в указанных выше количествах.

Период культивирования при первом культивировании может быть в интервале, выбранном от 6 часов до 48 часов, предпочтительно, 12-24 часа. Температура культивирования особенно не ограничена, и культивирование проводят при 30-40°C (например, 37°C). Концентрация диоксида углерода в контейнере для культивирования составляет порядка, например, 5%. Культивирование может проводиться в любой двухмерной культуре или трехмерной культуре. Для двухмерной культуры, количество клеток в начале культивирования особенно не ограничено и может составлять 50000-1000000 клеток/см², предпочтительно, 150000-300000 клеток/см², более предпочтительно, примерно 200000 клеток/см². Для трехмерной культуры, количество клеток в начале культивирования особенно не ограничено и может составлять 10000-1000000 клеток/мл, предпочтительно, 100000-500000 клеток/мл.

(2) Второе культивирование

«Условия, не допускающие действия инсулин» означают условия, которые не

вызывают активацию пути передачи сигнала инсулина в клетки через инсулин. «Не вызывать активацию пути передачи сигнала инсулина» означает не только полное отсутствие активации пути передачи сигнала инсулина, но также означает, что вызывается лишь небольшая активация пути передачи сигнала инсулина до такой степени, что любое существенное различие, по сравнению с активацией пути передачи сигнала инсулина в отсутствие инсулина, не обнаружено. Таким образом, примеры «условий, не допускающих действие инсулина» включают случай, когда инсулин не содержится в среде, или, даже если инсулин содержится в среде, его количество таково, что вызывает лишь небольшую активацию, до такой степени, что существенной разницы не обнаружено. Альтернативно, «условия, не допускающие действие инсулина» означают, что даже если инсулин содержится в среде, активация пути передачи сигнала инсулина не вызывается через совместное включение ингибитора сигнала инсулина. «Ингибитор сигнала инсулина» означает компонент, способный блокировать путь передачи сигнала инсулина на любой стадии. Примеры ингибитора сигнала инсулина включают полипептиды и соединения, которые связываются или конкурируют с любым из инсулина, рецептора инсулина, различных белков, которые действуют как сигнальное вещество и т.д., для ингибирования межмолекулярного взаимодействия, в котором участвуют такие факторы. Примеры такого ингибитора сигнала инсулина включают LY294002 [2-(4-морфолинил)-8-фенил-4Н-1-бензопиран-4-он], который конкурирует с и ингибирует связывание каталитической субъединицы PI3 киназы. Ингибитор сигнала инсулина не ограничивается этим, и антитела, которые связываются с любым из инсулина, рецептора инсулина и различными белками, которые действуют как сигнальное вещество, или доминантно-негативные мутанты антител, и антисмысловые олигонуклеотиды, миРНК и подобные для иРНК любого рецептора инсулина и различных белков, которые действуют как сигнальное вещество, также могут быть использованы в качестве ингибитора сигнала инсулина. Ингибитор сигнала инсулин коммерчески доступен или может быть синтезирован известным способом.

В среду можно дополнительно добавить ингибитор ROCK и/или ингибитор GSK3 β . Количество (а) ингибитора ROCK и/или ингибитора GSK3 β в среде может быть выбрано из диапазонов, описанных выше для первой культуры, и может быть таким же или отличаться от количества для использования в первой культуре.

В среду могут быть дополнительно добавлены одна или несколько групп, выбранных из группы, состоящей из пирувата, L-аланил L-глутамин и глюкозы. Количества пирувата, L-аланил L-глутамин и глюкозы в среде могут быть выбраны из диапазонов, описанных выше для первой культуры, и могут быть такими же или отличаться от количеств для использования в первой культуре.

Среду, приготовленную с основной средой для использования в культуре клеток млекопитающих, в качестве основы, дополненной одним или несколькими из вышеперечисленных компонентов, можно использовать в качестве среды для использования во второй культуре. Для основной среды может использоваться среда, описанная выше для первой культуры, и основная среда может быть такой же или отличаться от основной среды для использования в первой культуре. Основной средой предпочтительно является среда DMEM, более предпочтительно, среда DMEM, содержащая пируват, L-аланил L-глутамин и глюкозу в указанных выше количествах.

Период культивирования при втором культивировании составляет, по меньшей мере, 6 часов, и может быть в диапазоне, выбранном предпочтительно, от 6 часов до 72 часов, еще предпочтительнее, от 24 до 72 часов. Температура культивирования особо не ограничена, и культивирование проводят при температуре от 30 до 40°C (например,

37°C). Культивирование может проводиться либо двухмерным культивированием, либо трехмерным культивированием. Концентрация диоксида углерода в контейнере с культурой составляет порядка, например, 5%.

Среда в первой культуре и второй культуре может быть дополнена указанной выше 5 низкой дозой активина А. Количество активина А, содержащееся в среде в первой культуре, и количество активина А, содержащегося в среде во второй культуре, может быть одинаковым или разным.

Среда в первой культуре и во второй культуре может быть дополнительно дополнена диметилсульфоксидом.

10 Доля эндокринных клеток, полученная после стадии б), может быть увеличена путем культивирования плюрипотентных стволовых клеток в присутствии низкой дозы активина А или путем воздействия на плюрипотентные стволовые клетки первой культуры в среде в условиях, допускающих действие инсулина в присутствии низкой 15 дозы активина А, и затем во второй культуре в среде в условиях, не допускающих действия инсулина.

Стадия 2) Дифференциация в трубчатые клетки первичной кишки

Дефинитивные клетки эндодермы, полученные на стадии 1), дополнительно культивируют в среде, содержащей фактор роста, чтобы индуцировать их дифференциацию в трубчатые клетки первичной кишки. Период культивирования 20 составляет от 2 дней до 8 дней, предпочтительно, примерно 4 дня.

Температура культивирования особенно не ограничена, и культивирование проводят при 30-40°C (например, 37°C). Концентрация двуокиси углерода в контейнере с культурой составляет порядка, например, 5%.

Любая из основных сред для использования в культуре клеток млекопитающих, 25 описанной выше в Стадии 1), может использоваться в качестве культуральной среды. Среда может быть соответствующим образом дополнена заменителем сыворотки, витамином, антибиотиком и подобными в дополнение к фактору роста.

Фактором роста предпочтительно является EGF, KGF и/или FGF10, более предпочтительно, EGF и/или KGF, еще предпочтительнее, KGF.

30 Концентрацию фактора роста в среда подходящим образом устанавливают в зависимости от типа применяемого фактора роста, и обычно составляет примерно 0,1 нМ - 1000 мкМ, предпочтительно, примерно 0,1 нМ - 100 мкМ. В случае EGF, его концентрация составляет примерно 5-2000 нг/мл (то есть, примерно 0,8-320 нМ), 35 предпочтительно, примерно 5-1000 нг/мл (то есть, примерно 0,8-160 нМ), более предпочтительно, примерно 10-1000 нг/мл (то есть, примерно 1,6-160 нМ). В случае FGF10, его концентрация составляет примерно 5-2000 нг/мл (то есть, примерно 0,3-116 нМ), предпочтительно, примерно 10-1000 нг/мл (то есть, примерно 0,6-58 нМ), более 40 предпочтительно, примерно 10-1000 нг/мл (то есть, примерно 0,6-58 нМ). Например, в случае применения KGF в качестве фактора роста, его концентрация обычно составляет 5-150 нг/мл, предпочтительно, 30-100 нг/мл, особенно предпочтительно, примерно 50 нг/мл.

Стадия 3) Дифференциация в клетки задней передней кишки

Трубчатые клетки первичной кишки, полученные на стадии 2), дополнительно культивируют в среде, содержащей фактор роста, циклопамин, ноггин и подобные, 45 чтобы вызвать их дифференциацию в клетки задней передней кишки. Период культивирования составляет от 1 дня до 5 дней, предпочтительно, примерно 2 дня.

Температура культивирования особо не ограничена, и культивирование проводят при температуре от 30 до 40°C (например, 37°C). Концентрация диоксида углерода в

контейнере с культурой составляет порядка, например, 5%.

Любая из основных сред для использования в культуре клеток млекопитающих, описанной выше в Стадии 1), может использоваться в качестве культуральной среды. Среда может быть соответствующим образом дополнена заменителем сыворотки, витамином, антибиотиком и подобными в дополнение к фактору роста.

Фактором роста является, предпочтительно, EGF, KGF и/или FGF10, более предпочтительно, EGF и/или KGF, еще предпочтительнее, KGF.

Концентрацию фактора роста в среда подходящим образом устанавливают в зависимости от типа применяемого фактора роста, и обычно составляет примерно 0,1 нМ - 1000 мкМ, предпочтительно, примерно 0,1 нМ - 100 мкМ. В случае EGF, его концентрация составляет примерно 5-2000 нг/мл (то есть, примерно 0,8-320 нМ), предпочтительно, примерно 5-1000 нг/мл (то есть, примерно 0,8-160 нМ), более предпочтительно, примерно 10-1000 нг/мл (то есть, примерно 1,6-160 нМ). В случае FGF10, его концентрация составляет примерно 5-2000 нг/мл (то есть, примерно 0,3-116 нМ), предпочтительно, примерно 10-1000 нг/мл (то есть, примерно 0,6-58 нМ), более предпочтительно, примерно 10-1000 нг/мл (то есть, примерно 0,6-58 нМ). Например, в случае применения KGF в качестве фактора роста, его концентрация обычно составляет 5-150 нг/мл, предпочтительно, 30-100 нг/мл, особенно предпочтительно, примерно 50 нг/мл.

Концентрация циклопана особенно не ограничена и обычно составляет 0,5-1,5 мкМ, предпочтительно, 0,3-1,0 мкМ, особенно предпочтительно, примерно 0.5 мкМ.

Концентрация ноггина особенно не ограничена и обычно составляет 10-200 нг/мл, предпочтительно, 50-150 нг/мл, особенно предпочтительно, примерно 100 нг/мл.

Среда также может быть дополнена диметилсульфоксидом.

Стадия 4) Дифференциация в клетки-предшественники поджелудочной железы

Клетки задней передней кишки, полученные на стадии 3) могут быть дополнительно культивированы в среде, содержащей фактор, обладающей CDK8/19-ингибирующей активностью, предпочтительно, среде, содержащей фактор, обладающий CDK8/19-ингибирующей активностью, и фактор роста, чтобы вызвать их дифференциацию в клетки-предшественники поджелудочной железы. Период культивирования составляет от 2 дней до 10 дней, предпочтительно, примерно 5 дней.

Согласно описанному ранее (Toyoda et al., Stem cell Research (2015) 14, 185-197), клетки задней передней кишки, полученные на стадии 3) обрабатывают и диспергируют пипетированием с 0,25% трипсином-ЭДТК, и дисперсию подвергают разделению центрифугированием с получением суспензии клеток, и затем повторно суспендируют в свежей среде со стадии 4).

Как и на стадии 1), основная среда для использования в культуре клеток млекопитающих может использоваться в качестве культуральной среды. Среда может быть соответствующим образом дополнена заменителем сыворотки, витамином, антибиотиком и подобными в дополнение к фактору роста.

Каждое из упомянутых выше соединений или их солей может быть использовано в качестве фактора, обладающего CDK8/19-ингибирующей активностью. Количество фактора, добавляемого в среду, соответствующим образом определяется в зависимости от используемого соединения или его соли и обычно составляет примерно 0,00001 мкМ - 5 мкМ, предпочтительно 0,00001 мкМ - 1 мкМ. Концентрацией фактора, обладающего CDK8/19-ингибирующей активностью, в среде предпочтительно является концентрация, которая достигает ингибирующей активности 50% или более для CDK8/19.

Фактором роста является, предпочтительно, EGF, KGF и/или FGF10, более

предпочтительно, KGF и/или EGF, еще предпочтительнее, KGF и EGF.

Концентрацию фактора роста в среда подходящим образом устанавливают в зависимости от типа применяемого фактора роста, и обычно составляет примерно 0,1 нМ - 1000 мкМ, предпочтительно, примерно 0,1 нМ - 100 мкМ. В случае EGF, его концентрация составляет примерно 5-2000 нг/мл (то есть, примерно 0,8-320 нМ), предпочтительно, примерно 5-1000 нг/мл (то есть, примерно 0,8-160 нМ), более предпочтительно, примерно 10-1000 нг/мл (то есть, примерно 1,6-160 нМ). В случае FGF10, его концентрация составляет примерно 5-2000 нг/мл (то есть, примерно 0,3-116 нМ), предпочтительно, примерно 10-1000 нг/мл (то есть, примерно 0,6-58 нМ), более предпочтительно, примерно 10-1000 нг/мл (то есть, примерно 0,6-58 нМ). Например, в случае применения KGF и EGF в качестве фактора роста, концентрация KGF обычно составляет 5-150 нг/мл, предпочтительно, 30-100 нг/мл, особенно предпочтительно, примерно 50 нг/мл, и концентрация EGF обычно составляет 10-200 нг/мл, предпочтительно, 50-150 нг/мл, особенно предпочтительно, примерно 100 нг/мл.

Культивирование в первый день стадии 4) может проводиться в присутствии ингибитора ROCK, и культивирование в следующие дни могут проводиться в среде, содержащей ингибитор ROCK.

Среда также может содержать РКС активатор. PdBU (РКС активатор II), TPB (РКС активатор V) или подобные применяют в качестве РКС активатора, хотя РКС активатор не ограничен ими. Концентрация добавляемого активин А составляет примерно 0,1-100 нг/мл, предпочтительно, примерно 1-50 нг/мл, более предпочтительно, примерно 3-10 нг/мл.

Среда также может быть дополнена диметилсульфоксидом.

На любой из стадий, среда может быть дополнена заменителем сыворотки (например, добавкой B-27, ITS-G) в дополнение к компонентам, описанным выше. Кроме того, аминокислота, L-глутамин, GlutaMAX (название продукта), не относящаяся к незаменимым аминокислота, витамин, антибиотик (например, антибиотик-антимикотик (также называемый АА в настоящем документе), пенициллин, стрептомицин или их смесь), противомикробный агент (например, амфотерицин В), антиоксидант, пировиноградная кислота, буфер, неорганические соли и подобные могут быть добавлены туда при необходимости. В случае добавления антибиотика к среде, его концентрация в среде обычно составляет 0,01-20% массовых, предпочтительно, 0,1-10% массовых.

Культивирование клеток проводят в адгезивной культуре без применения питающих клеток. Для культивирования применяют культуральный контейнер, например, чашку, колбу, микропланшет или пластина для культивирования клеток, такая как OptiCell (наименование продукта) (Nunc). Поверхность культурального контейнера предпочтительно обрабатывают для того, чтобы улучшить адгезивность к клеткам (гидрофильность), или покрывают субстратом для адгезии клеток, таким как коллаген, желатин, поли-L-лизин, поли-D-лизин, ламинин, фибронектин, Матригель (например, BD Matrigel (Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.)) ли витронектин. Культуральным контейнером предпочтительно является культуральный контейнер, покрытый коллагеном I типа, Матригелем, фибронектином, витронектином или поли-D-лизином, более предпочтительно, культуральный контейнер, покрытый Матригелем или поли-D-лизином.

Температура культивирования особенно не ограничена, и культивирование проводят при 30-40°C (например, 37°C). Концентрация диоксида углерода в культуральном контейнере составляет порядка, например, 5%.

Стадия 5) Дифференциация в эндокринные клетки-предшественники

Клетки-предшественники поджелудочной железы, полученные на стадии 4), дополнительно культивируют в среде, содержащей фактор роста, чтобы вызвать дифференциацию в эндокринные клетки-предшественники. Период культивирования составляет от 2 дней до 3 дней, предпочтительно, примерно 2 дня.

Любая из основных сред для использования в культуре клеток млекопитающих, описанной выше в Стадии 1), может использоваться в качестве культуральной среды. Среда дополняют SANT1, ретиноевой кислотой, ингибитором ALK5 II, T3 и LDN согласно описанному ранее (Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133) и подходящим образом дополнительно дополняют ингибитором Wnt, ингибитором ROCK, FGF (предпочтительно, FGF2), заменителем сыворотки, витамином, антибиотиком и подобными. Среда также дополняют диметилсульфоксидом.

Культивирование клеток проводят культивированием без прилипания, без использования питающих клеток. Для культивирования используют чашку, колбу, микропланшет, пористый планшет (Nunc) или подобное, или биореактор. Контейнер для культивирования предпочтительно имеет поверхность с обработкой для уменьшения адгезии к клеткам.

Температура культивирования особенно не ограничена, и культивирование проводят при 30-40°C (например, 37°C). Концентрация диоксида углерода в культуральном контейнере составляет порядка, например, 5%.

Стадия 6) Дифференциация в инсулинпродуцирующие клетки

Эндокринные клетки-предшественники, полученные на стадии 5), дополнительно культивируют в среде, содержащей ингибитор FGFR1, чтобы вызвать их дифференциацию в инсулинпродуцирующие клетки. Период культивирования составляет от 14 дней до 30 дней, предпочтительно, примерно 14-20 дней.

Любая из основных сред для использования в культуре клеток млекопитающих, описанной выше в Стадии 1), может использоваться в качестве культуральной среды. Среда дополняют ингибитором ALK5 II, T3, LDN, ингибитором γ -секретазы XX, ингибитором γ -секретазы RO, N-цистеином, ингибитором AXL и аскорбиновой кислотой согласно описанному ранее (Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133) и подходящим образом дополнительно дополняют ингибитором Wnt, ингибитором ROCK, FGF (предпочтительно, FGF2), заменителем сыворотки, витамином, антибиотиком и подобными. Например, среда может быть дополнена ингибитором ALK5 II, T3, LDN, ингибитором γ -секретазы RO и аскорбиновой кислотой, или может быть дополнена T3, ингибитором ALK5 II, ZnSO₄, гепарином, N-ацетилцистеином, Тролоксом и R428.

Культивирование клеток проводят культивированием без прилипания, без использования питающих клеток. Для культивирования используют чашку, колбу, микропланшет, пористый планшет (Nunc) или подобное, или биореактор. Контейнер для культивирования предпочтительно имеет поверхность с обработкой для уменьшения адгезии к клеткам.

Температура культивирования особенно не ограничена, и культивирование проводят при 30-40°C (например, 37°C). Концентрация диоксида углерода в культуральном контейнере составляет порядка, например, 5%.

Ингибитор FGFR1 может содержаться в любом количестве, способном ингибировать активность FGFR1 в среде, и может содержаться в количестве, например, 10 мкМ или менее или 5 мкМ или менее, предпочтительно, в количестве менее чем 5 мкМ, менее чем 4 мкМ, менее чем 3 мкМ или менее чем 2 мкМ. Нижний предел добавляемого количества ингибитора FGFR1 особенно не ограничен и может составлять 0,1 мкМ или

более, предпочтительно, 0,5 мкМ или более. Количество добавляемого ингибитора FGFR1 предпочтительно составляет менее чем 5 мкМ и 0,1 мкМ или более, более предпочтительно, менее чем 5 мкМ и 0,5 мкМ или более. Культивирование в присутствии ингибитора FGFR1 может проводиться в течение, по меньшей мере, 12 часов, предпочтительно, 24 часов или дольше, 2 дней или дольше, 4 дней или дольше, 8 дней или дольше, 10 дней или дольше или 15 дней или дольше. Культивирование в присутствии ингибитора FGFR1 проводят, предпочтительно, в течение 4 дней или дольше. Культивирование в присутствии ингибитора FGFR1 может проводиться, например, в течение последних 4-15 дней, предпочтительно, примерно последних 4-7 дней стадии 6). Среда может быть заменена во время периода обработки ингибитором FGFR1 и может быть заменена средой с добавлением ингибитора FGFR1, имеющей такой же или отличающийся состав, как до замены, или отличный от него, согласно графику культивирования.

Культивируемые клетки в среде, содержащей ингибитор FGFR1, может ингибировать пролиферацию Ki67-положительных клеток в получаемых инсулинпродуцирующих клетках.

Инсулинпродуцирующие клетки, полученные на стадии 6), могут быть криоконсервированы до применения.

5. Дифференциация в островкоподобные клетки поджелудочной железы

Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения могут быть индуцированы для дифференциации в островкоподобные клетки поджелудочной железы трансплантацией в живой организм или животному.

«Животным» предпочтительно является млекопитающее. Их примеры включают людей, приматов, не относящихся к человеку, свиней, крупный рогатый скот, лошадей, овец, коз, лам, собак, кошек, кроликов, мышей и морских свинок. Человек является предпочтительным.

Трансплантация предпочтительно проводят в *in vivo* области, где клетки могут фиксироваться в данном положении, и может проводиться, например, подкожно, внутрибрюшинно, в мезотелий брюшины, в большой сальник, в жировую ткань, в мышечную ткань или под капсулой каждого органа, такого как поджелудочная железа или почка, у животного. Количество клеток, подлежащих трансплантации, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как возраст и масса тела реципиента, а также размер места трансплантации, и не имеет особых ограничений. Например, количество клеток может составлять порядка от 10×10^4 клеток до 10×10^{11} клеток. Трансплантированные клетки индуцируют для дифференциации в *in vivo* среде, и поэтому они могут дифференцироваться в островкоподобные клетки поджелудочной железы. Трансплантированные инсулинпродуцирующие клетки дифференцируются и созревают в островкоподобные клетки поджелудочной железы через 1 неделю, предпочтительно, 2 недели после трансплантации, хотя этот период может варьироваться в зависимости от таких факторов, как количество клеток, подлежащих трансплантации, возраст и масса тела реципиента, и место трансплантации. Полученные островкоподобные клетки поджелудочной железы затем могут быть восстановлены или могут быть постоянно находиться *in vivo* в том виде, в котором они есть.

6. Применение

Инсулинпродуцирующие клетки настоящего изобретения могут быть безопасно введены как таковые или в форме лекарственного средства, содержащего клетки, смешанные с фармакологически приемлемым носителем и т.д., пациенту, нуждающемуся в этом.

«Фармакологически приемлемым носителем» может быть любой фармакологически приемлемый носитель, который позволяет трансплантацию вместе с инсулинпродуцирующими клетками в живом организме, и позволяет трансплантированным инсулинпродуцирующим клеткам дифференцировать и созревать в островкоподобные клетки поджелудочной железы, и может подходящим образом применяться любой фармакологически приемлемый носитель согласно желаемой дозированной форме. Примеры «фармакологически приемлемого носителя» включает гидрогель. Гидрогелем предпочтительно является гидрогель, состоящий из биосовместимого и/или биоразлагаемого полимера, и гидрогеля, состоящего из одного или нескольких, выбранных из альгиновой кислоты, фибронектина, желатина, коллагена, протеогликана, глюкозаминогликана (например, гиалуроновой кислоты, сульфата хондроитина, сульфата дерматана, сульфата гепарина, гепарина, сульфата кератана), ламинина и витронектина, и их соли и сложные эфиры могут применяться в качестве такого гидрогеля. Для гидрогеля, например, может подходящим образом применяться гель, содержащий альгиновую кислоту, приготовленный с применением соли альгиновой кислоты (например, альгината натрия, альгината кальция, альгината аммония) или сложного эфира альгиновой кислоты (также называемого альгинат пропиленгликоля) (WO2010/032242 и WO2011/154941). Гидрогель может применяться с инсулинпродуцирующими клетками, диспергированными в геле.

Инсулинпродуцирующие клетки или лекарственное средство могут содержаться в устройстве, способном принимать инсулинпродуцирующие клетки или лекарственное средство. Устройством может быть любое устройство, которое позволяет трансплантацию вместе с инсулинпродуцирующими клетками или лекарственным средством в живой организм, и позволяет трансплантированным инсулинпродуцирующим клеткам дифференцироваться и созревать в островкоподобные клетки поджелудочной железы, и может использоваться устройство любой формы и материала. Для такого устройства, например, можно использовать устройство, состоящее из биосовместимого и/или биоразлагаемого полимера (например, полигликолевой кислоты, полимолочной кислоты), керамики или металла (например, титана, нержавеющей стали, кобальта или любого их сплава). Форма устройства особенно не ограничена, и может принимать форму капсулы, мешка, камеры или подобного, которые могут принимать инсулинпродуцирующие клетки или лекарственное средство. Устройство предпочтительно имеет пористую часть, отверстие, дорожку и подобное, которые позволяют внутреннему и внешнему окружению взаимодействовать друг с другом.

Инсулинпродуцирующие клетки или лекарственные средства по настоящему изобретению могут поставляться в криоконсервированной форме и могут использоваться путем размораживания при использовании.

Инсулинпродуцирующие клетки или лекарственные средства по настоящему изобретению могут применяться через трансплантацию в живой организм пациента, нуждающегося в этом. Трансплантацию предпочтительно проводят в *in vivo* область, где клетки могут фиксироваться в данном положении, и она может выполняться, например, подкожно, внутрибрюшинно, в мезотелий брюшины, в большой сальник, в жировую ткань, в мышечную ткань или под капсулой каждого органа, такого как поджелудочная железа или почка. Предпочтительна подкожная трансплантация, которая менее инвазивна. Подлежащие трансплантации инсулинпродуцирующие клетки могут быть подходящим образом введены в терапевтически эффективном количестве, которое может варьироваться в зависимости от таких факторов, как возраст и масса

тела реципиента, размер места трансплантации и тяжесть заболевания, и это не особенно ограничено. Например, терапевтически эффективное количество может составлять от 10×10^4 клеток до 10×10^{11} клеток.

Трансплантированные инсулинпродуцирующие клетки дифференцируются и созревают в живом организме, чтобы стать островкоподобными клетками поджелудочной железы и выполнять функции, полезные для лечения или профилактики заболеваний, расстройств или симптомов. То есть, инсулинпродуцирующие клетки или лекарственное средство настоящего изобретения могут применяться в качестве пролекарства.

С помощью инсулинпродуцирующих клеток или лекарственного средства по настоящему изобретению, островкоподобные клетки поджелудочной железы могут быть сформированы в живом организме пациента, и уровень глюкозы в крови у пациента может быть улучшен и/или сохранен за счет действия инсулина и глюкагона, секретированных островкоподобными клетками поджелудочной железы.

Следовательно, инсулинпродуцирующие клетки или лекарственное средство по настоящему изобретению могут применяться для лечения или профилактики заболевания, расстройства или симптома, для которых необходимо улучшение и/или сохранение уровней глюкозы в крови. Примеры заболевания, расстройства или симптома включают, но не ограничиваются ими, сахарный диабет, аномальные уровни глюкозы натощак и после приема пищи, а также гипогликемию у пациента, в частности, у пациента с сахарным диабетом (например, гипогликемию при введении инсулина у пациента с сахарным диабетом). «Лечение» означает лечение, излечение, профилактику или улучшение ремиссии заболевания, расстройства или симптома, или снижение скорости прогрессирования заболевания, расстройства или симптома. «Профилактика» означает уменьшение возможности или риска возникновения заболевания, расстройства или симптома, или замедление начала заболевания, расстройства или симптома.

Пациентом является млекопитающее (например, мышь, крыса, хомяк, кролик, кошка, собака, крупный рогатый скот, овца, обезьяна и человек), предпочтительно, человек.

В настоящем документе, настоящее изобретение будет описано со ссылкой на Примеры. Однако настоящее изобретение не ограничивается этими примерами.

Примеры

Пример 1: Степень созревания инсулинпродуцирующих клеток и доля сосуществующих пролиферативных клеток

1. Способ

(1) Приготовление инсулинпродуцирующих клеток

Индукция дифференциации iPS клеточной линии Ff-I14s04 в инсулинпродуцирующие клетки проводят согласно стадиям 1) - 6) выше или ранее описанному (Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133).

Более конкретно, iPS клетки суспендируют в среде для iPS клеток, содержащей 10 мкМ ингибитора ROCK (Y-27632), считают с применением счетчика клеток NC200 (ChemoMetec), доводят до $37,5 \times 10^4$ клеток/мл, и высевают для инкубирования в планшет, покрытый iMatrix в количестве 2 мл/лунку (75×10^4 клеток/лунку). Затем первое культивирование проводят в условиях, которые позволяют действие инсулина, то есть, в среде (DMEM-высокоглюкозная-GlutaMAX-пируват/2% B27 (с инсулином)/пенициллин стрептомицин/1% диметилсульфоксид), содержащей фактор, вызывающий дифференциацию (ингибитор GSK3 β (3 мкМ CHIR99021), низкую дозу (10 нг/мл) активина A), и затем проводят второе культивирование в условиях, которые не позволяют действие

инсулина, то есть, в среде (DMEM-высокоглюкозная-GlutaMAX-пируват/2% B27 (без инсулина)/пенициллин стрептомицин/1% диметилсульфоксид), содержащей фактор, вызывающий дифференциацию (низкая доза (10 нг/мл) активина А) с получением дефинитивных клеток эндодермы. Полученные дефинитивные клетки эндодермы культивируют в среде (улучшенная MEM/1% B27 (с инсулином)/пенициллин стрептомицин), содержащей 50 нг/мл KGF, и затем в среде (улучшенная MEM/1% B27 (с инсулином)/Пенициллин стрептомицин), содержащей 50 нг/мл KGF, 100 нг/мл ноггина, 0,5 мкМ циклопамина, 10 нМ TTNPB и 250 мкМ витамина С, и полученные клетки задней передней кишки восстанавливают. Клетки задней передней кишки суспендируют в среде (улучшенная MEM/1% B27 (с инсулином)/Пенициллин стрептомицин), содержащей 0,1 мкМ ингибитора ROCK, 100 нг/мл KGF, 50 нг/мл EGF, 10 мМ никотинамида и 250 мкМ витамина С, доведенной до 175×10^4 клеток/мл, и повторно высевает для культивирования на планшете, покрытом iMatrix в количестве 350×10^4 клеток/лунку. Полученные клетки восстанавливают снова, суспендируют в среде (улучшенная MEM/1% B27 (с инсулином)/Пенициллин стрептомицин), содержащей 0,25 мкМ SANT-1, 50 нМ ретиноевой кислоты, 10 мкМ ингибитора ALK5 II, 100 нМ LDN, 1 мкМ T3, 50 нг/мл bFGF, 1 мкМ XAV и 10 мкМ Y-27632, доводят до 20×10^4 клеток/мл, и повторно высевает для культивирования на не адгезивной 96-луночной планшете (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) в количестве 3×10^4 клеток/лунку.

Полученную популяцию клеток культивируют в среде (улучшенной MEM/1% B27 (с инсулином)/Пенициллин стрептомицин), содержащей 10 мкМ ингибитора ALK5 II, 1 мкМ T3, 100 мкМ LDN, 1 мкМ ингибитора γ -секретазы (RO-4929097), 250 мкМ аскорбиновой кислоты и 1 мкМ ингибитора FGF рецептора 1 (PD-166866) с получением инсулинпродуцирующих клеток.

(2) Оценка экспрессии белков

Экспрессию белка (инсулина (INS), NKX6.1, глюкагона (GCG), Ki67) в инсулинпродуцирующих клетках, полученных из клеточной линии iPS Ff-I14s04 и островках поджелудочной железы человека от здорового индивидуума (в настоящем документе, названного «островок») измеряют проточной цитометрией. В качестве контроля, прототип инсулинпродуцирующей клетки, полученный без обработки ингибитором FGF рецептора 1 (PD-166866) (в настоящем документе, названным «прототип») подвергают измерениям таким же образом.

(3) Оценка уровней экспрессии гена

С кДНК, синтезированной из фракций тотальной РНК, собранных из образцов прототипа, уровни экспрессии инсулина, глюкагона и MafA и UCN3, которые известны как маркеры зрелых β клеток поджелудочной железы, инсулинпродуцирующими клетками и островками, мРНК, измеряют с применением способа количественной ПЦР. Нормализацию проводят с уровнем экспрессии GAPDH мРНК в качестве контрольного гена, измеренной таким же образом.

2. Результаты

(1) Оценка экспрессии белка

На Фигуре 1 показаны результаты измерения проточной цитометрией. В таблице 1 показаны доли инсулин-положительных/NKX6.1-положительных клеток, доли инсулин-положительных/NKX6.1-отрицательных клеток, доли хромогранин А-положительных клеток и доли Ki67-положительных клеток. Инсулинпродуцирующие клетки демонстрируют долю инсулин-положительных/NKX6.1-положительных клеток, сравнимую с или выше, чем для островка. С другой стороны, было обнаружено, что

доля инсулин-положительных/NKX6.1-отрицательных клеток явно выше, чем для островка. Сравнение между инсулинпродуцирующими клетками и прототипом показало, что инсулинпродуцирующие клетки демонстрируют повышенные доли инсулин-положительных/NKX6.1-положительных клеток, инсулин-положительных/NKX6.1-отрицательных клеток и хромогранин А-положительных клеток, и демонстрируют значительно пониженные доли Ki67-положительных клеток.

[Таблица 1]

Клеточная линия	Ff-I14-s04		
	Прототип	Инсулинпродуцирующие клетки	островок
Доля инсулин-положительных/NKX6.1-положительных клеток	30,8%	37,8%	31,8%
Доля хромогранин А-положительных клеток	83,9%	94,7%	88,7%
Доля инсулин-положительных/NKX6.1-отрицательных клеток	21,8%	28,2%	2,3%
Доля Ki67-положительных клеток	5,5%	0,4%	н.о.

н.о. - не определено

(2) Оценка уровней экспрессии гена

В таблице 2 и на фигуре 2 показаны уровни экспрессии инсулина, глюкагона, MafA и UCN3 в прототипе, инсулинпродуцирующих клетках и островке.

Согласно вышеуказанным результатам определения долей инсулин-положительных клеток и долей глюкагон-положительных клеток проточной цитометрией, было обнаружено, что инсулинпродуцирующие клетки демонстрируют повышенные уровни экспрессии инсулина и глюкагона по сравнению с таковыми в прототипе, и уровни экспрессии достигают ~50% таковых в островке. Наоборот, уровни экспрессии MafA и UCN3 в инсулинпродуцирующих клетках оказались значительно ниже, чем таковые в островке поджелудочной железы человека.

[Таблица 2]

Клеточная линия	Ff-I14-s04		
	Прототип	Инсулинпродуцирующие клетки	Островок
INS ген	121	162	326
GCG ген	2,4	6,9	25,7
MafA ген	0,01	0,01	0,39
UCN3 ген	0,01	0,02	0,44

Вышеуказанные результаты показывают, что инсулинпродуцирующие клетки представляют собой клеточные агрегаты, включающие β клетки в доле, сопоставимой с таковой в островке поджелудочной железы, но еще не являются полностью зрелым островком поджелудочной железы. Кроме того, было подтверждено, что инсулинпродуцирующие клетки включают очень мало пролиферативных нежелательных клеток (Ki67-положительных клеток).

Пример 2: Доля сосуществующих iPS клеток, сохраняющих недифференцированное состояние в инсулинпродуцирующих клетках

1. Способ

Высокочувствительное определение iPS клеток, сохраняющих недифференцированное состояние (высокоэффективный анализ культуры клеток)

Дефинитивные клетки эндодермы, полученные культивированием iPS клеток Ff-I14s04 в среде (RPMI/1% B27 (с инсулином)/Пенициллин стрептомицин/диметилсульфоксид), содержащей фактор, индуцирующий дифференциацию (ингибитор GSK3 β , ингибитор ROCK, низкую дозу активина А) индуцируют для дифференциации

в клетки-предшественники поджелудочной железы (промежуточные клетки в курсе создания инсулинпродуцирующих клеток). Суспензию 6×10^5 клеток клеток-предшественников поджелудочной железы обогащают 0,6 (0,001%) или 30 (0,005%) клетками iPS клеток, оставшихся в недифференцированном состоянии, и результат

5 высевают на 10-см чашки и культивируют в условиях AK03N среды и iMatrix-511 покрытия, которые являются условиями, предпочтительными для iPS клеток, оставшихся в недифференцированном состоянии, в течение 7 дней. В тех же условиях, культивируют

отдельные 6×10^5 клетки клеток-предшественников поджелудочной железы без

10 обогащения iPS клетками. После завершения культивирования, созданные колонии iPS клеток, оставшихся в недифференцированном состоянии, визуализируют окрашиванием щелочной фосфатазой, и подсчитывают количество.

2. Результаты

На фигуре 3 показаны результаты. В культуральных чашках для клеток-предшественников поджелудочной железы, обогащенных 6 клетками и 30 клетками

15 iPS клеток, оставшихся в недифференцированном состоянии, в среднем наблюдают 3 и 16 колоний, соответственно. Наоборот, в культуральной чашке для клеток-предшественников поджелудочной железы без обогащения, не наблюдалось никаких колоний. Эти результаты показали, что доля сосуществующих iPS клеток, сохраняющих

20 недифференцированное состояние, составляет 0,001% или меньше в клетках-предшественниках поджелудочной железы, созданных настоящим способом индукции дифференциации, и инсулинпродуцирующих клетках, образующихся впоследствии.

Приведенные выше результаты подтвердили, что инсулинпродуцирующие клетки не содержат или содержат очень мало сосуществующих iPS-клеток, сохраняющих

25 недифференцированное состояние.

Пример 3: Влияние замораживания и оттаивания на инсулинпродуцирующие клетки

1. Способ

(1) Реагрегация инсулинпродуцирующих клеток после замораживания и оттаивания

Инсулинпродуцирующие клетки получают тем же способом, что и способ, описанные

30 в примере 1, за исключением того, что дефинитивные клетки эндодермы получают культивированием iPS клеток Ff-I14s04 в среде (RPMI/1% B27 (с инсулином)/Пенициллин стрептомицин/диметилсульфоксид), содержащей фактор, вызывающий дифференциацию (ингибитор GSK3 β , ингибитор ROCK, низкую дозу активина A), замораживают способом медленной заморозки с применением коммерчески доступного раствора для

35 криоконсервации (Cryo Stor CS10 (Bio Life Solutions Inc.)). Более конкретно, 3×10^6 клетки суспендируют в 1 мл раствора для криоконсервации и впрыскивают во флакон для замораживания. Флакон помещают в сосуд для замораживания (BICELL, Nihon Freezer Co., Ltd.) и хранят при -80°C .

При оттаивании, флакон для замораживания нагревают на ThawSTAR Cell Thawing

40 System (Astero Bio Corporation) для быстрого оттаивания. Оттаявшую суспензию клеток добавляют к 10 мл культурального раствора. После удаления супернатанта через разделение центрифугированием, клетки суспендируют в среде, содержащей 10 мкМ ингибитора ROCK (Y-27632), и подсчитывают жизнеспособные клетки, и степень выживания клеток после оттаивания измеряют с применением счетчика клеток NC200

45 (Chemo Metec). Клетки после оттаивания высевают в пористый планшет (Kuraray Co., Ltd.) и подвергают трехмерному культивированию для получения агрегата клеток.

(2) Трансплантация инсулинпродуцирующих клеток после замораживания и оттаивания в живой организм

Инсулинпродуцирующие клетки после замораживания и оттаивания трансплантируют под капсулу почки с использованием иммунодефицитных мышей NOD/SCID, страдающих индуцированным стрептозотоцином инсулин-дефицитным сахарным диабетом. Для последующего наблюдения после трансплантации измеряют концентрации С-пептида человека в крови и уровни глюкозы в крови.

2. Результаты

(1) Реагрегация инсулинпродуцирующих клеток после замораживания и оттаивания

Выживаемость клеток сразу же после оттаивания составила 80,9%. Из клеток, введенных во флакон для замораживания, 77,0% были успешно восстановлены в виде жизнеспособных клеток. На фигуре 4 показано фазово-контрастное микроскопическое изображение клеток, культивированных трехмерным культивированием в течение 4 дней. Как показано на фигуре 4, ясно, что криоконсервированные клетки выживают и сохраняют способность образовывать клеточные агрегаты.

На фигуре 5 показаны результаты измерения проточной цитометрией экспрессии INS, NKX6.1 и Ki67 в клетках до криоконсервации, а также после оттаивания и повторного культивирования. В таблице 3 показаны доли инсулин-положительных и Ki67-положительных клеток. Как показано на фигуре 5 и таблице 3, после криоконсервации не наблюдается уменьшения доли инсулин-положительных клеток и увеличения количества Ki67-положительных клеток.

[Таблица 3]

	До криоконсервации	После оттаивания и повторного культивирования
Доля инсулин-положительных клеток	52,7%	85,7%
Доля Ki67-положительных клеток	1,3%	0,3%

(2) Трансплантация инсулинпродуцирующих клеток в живой организм

Результаты, касающиеся концентраций С-пептида человека в крови и уровней глюкозы в крови, измеренные для последующего наблюдения после трансплантации, показаны в таблице 4. Было обнаружено, что инсулинпродуцирующие клетки, трансплантированные под капсулу почки после замораживания и оттаивания, секретируют С-пептид человека в кровь и демонстрируют эффект улучшения высокого уровня глюкозы в крови через 4 месяца после трансплантации.

[Таблица 4]

	При трансплантации	4 месяца после трансплантации
Концентрация С-пептида человека в крови (пМ)	н.о.	982,4 (N=1)
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)	500 (N=1)	117 (N=1)

Эти результаты подтверждают, что инсулинпродуцирующие клетки сохраняют эффективность индукции дифференциации даже после замораживания и оттаивания.

Пример 4: Инсулинпродуцирующие клетки, трансплантированные в живой организм

1. Способ

(1) Трансплантация инсулинпродуцирующих клеток в живой организм

Инсулинпродуцирующие клетки, полученные тем же способом, что и в Примере 3, трансплантируют под капсулу почки с использованием иммунодефицитных мышей NOD/SCID с индуцированным стрептозотоцином (STZ) сахарным диабетом, и подкожно трансплантируют мышам NOD/SCID, имеющим мутацию гена Akita, вызывающую спонтанное начало сахарного диабета. При подкожной трансплантации гель Фибрин используют в качестве носителя для инсулинпродуцирующих клеток. После трансплантации измеряют концентрацию С-пептида человека (индекс инсулина,

полученного из инсулинпродуцирующих клеток) в крови и уровни глюкозы в крови для оценки выживаемости трансплантата инсулинпродуцирующих клеток.

(2) Оценка ответа инсулинпродуцирующих клеток на загрузку глюкозы или гипогликемию

Мышам, которым трансплантировали инсулинпродуцирующие клетки, которые достигли выживаемости трансплантата, принудительно вводят глюкозу перорально для временного повышения уровня глюкозы в крови, или инсулиновый состав гларгин вводят подкожно, чтобы вызвать гипогликемию, и затем оценивают ответ инсулинпродуцирующих клеток, измеряя концентрации С-пептида человека в крови и концентрации глюкагона в крови. В качестве контроля используют мышей NOD/SCID без сахарного диабета, без трансплантации, и измеряют концентрации в крови С-пептида мыши, происходящего из эндогенных островков поджелудочной железы, и глюкагона.

2. Результаты

(1) Оценка выживания трансплантата инсулинпродуцирующих клеток, трансплантированных в живой организм

В таблице 5 показаны результаты измерения концентраций С-пептида человека в крови и уровней глюкозы в крови после трансплантации. Для любого животного и места трансплантации, С-пептид человека был обнаружен в крови через 3-4 месяца после трансплантации. У мышей высокий уровень глюкозы в крови улучшился через 3 месяца после трансплантации, а уровни глюкозы в крови сохранялись на нормальном уровне в течение 5-6 месяцев, что указывает на долгосрочную выживаемость трансплантата трансплантированных инсулинпродуцирующих клеток.

[Таблица 5]

Метро трансплантации у животного	Концентрация С-пептида человека в крови (пМ)		Уровень глюкозы в крови (мг/дл)		
	3-4 месяца после трансплантации	Через 5-6 месяцев	При трансплантации	Через 3 месяца	Через 5-6 месяцев
STZ NOD/SCID мышам - капсула под почкой	898±335 (N=3)	915, 1060 (N=2)	516±33 (N=4)	113±64 (N=3)	117, 91 (N=2)
Akita NOD/SCID мышам - подкожно	2436±516 (N=4)	2195±882 (N=4)	562±31 (N=4)	83±27 (N=4)	61±7 (N=3)

Среднее±стандартное отклонение для N=3 или более, индивидуальные данные для N=2

(2) Оценка ответа инсулинпродуцирующих клеток на загрузку глюкозы или гипогликемию

На фигуре 6 показаны концентрации С-пептида человека в крови после нагрузки глюкозой, а на фигуре 7 показаны концентрации С-пептида человека в крови и концентрации глюкагона в крови после введения гларгина. Через 3-4,5 месяца после трансплантации инсулинпродуцирующих клеток концентрация С-пептида человека в крови временно увеличивается в результате нагрузки глюкозой, и, с другой стороны, снижается, когда гипогликемию вызывают введением гларгина. Эти изменения были аналогичны изменениям концентрации в крови эндогенного С-пептида мыши у мышей без сахарного диабета, без трансплантации. Мыши с трансплантированными инсулинпродуцирующими клетками показали более высокие концентрации глюкагона в крови, чем мыши, не страдающие сахарным диабетом, без трансплантации, что свидетельствует о том, что инсулинпродуцирующие клетки выделяют глюкагон в кровь.

Вышеуказанные результаты показали, что инсулинпродуцирующие клетки, трансплантированные в живой организм, достигают долгосрочной выживаемости трансплантата и оказывают физиологическое инсулин-регулирующее действие, сходное

с действием эндогенного островка поджелудочной железы, в ответ на изменение уровня глюкозы в крови.

Пример 5: Подкожно трансплантированные инсулинпродуцирующие клетки

1. Способ

(1) Трансплантация инсулинпродуцирующих клеток в живой организм

Инсулинпродуцирующие клетки, диспергированные в альгинатном гидрогеле, подкожно трансплантируют иммунодефицитным мышам NOD/SCID, страдающим индуцированным стрептозотоцином инсулин-дефицитным сахарным диабетом. Для последующего наблюдения после трансплантации измеряют концентрации С-пептида человека в крови и уровни глюкозы в крови. Трансплантаты иссекают через 3 месяца после трансплантации.

(2) Оценка экспрессии белка в трансплантатах

Каждый иссеченный трансплантат обрабатывают для разделения на отдельные клетки, которые фиксируют и подвергают проточной цитометрии для измерения экспрессии белков (инсулина, NKX6.1, глюкагона, хромогранина А) в инсулинпродуцирующих клетках. Кроме того, инсулинпродуцирующие клетки в иссеченных трансплантатах и при трансплантации фиксируют и обезвоживают, из них готовят замороженные срезы для оценки экспрессии предполагаемых белков (инсулина, глюкагона) с помощью иммуногистологического окрашивания.

2. Результаты

(1) Трансплантация инсулинпродуцирующих клеток в живой организм

Результаты, относящиеся к концентрации С-пептида человека в крови и уровни глюкозы в крови, измеренные для последующего наблюдения после трансплантации, показаны в таблице 6. Было обнаружено, что подкожно трансплантированные инсулинпродуцирующие клетки секретируют С-пептид человека в кровь и демонстрируют эффект улучшения высокого уровня глюкозы в крови, через 1-3 месяца после трансплантации.

[Таблица 6]

	При трансплантации	1 месяц после трансплантации	3 месяца после трансплантации
Концентрация С-пептида человека в крови (пМ)	н.о.	490,4, 307,6 (N=2)	714,3 (N=1)
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)	568, 457 (N=2)	238, 196 (N=2)	62 (N=1)

(2) Оценка экспрессии белка в трансплантатах

В таблице 7 и на фигуре 8 показаны результаты измерения доли инсулин-положительных/NKX6.1-положительных клеток, доли инсулин-положительных/NKX6.1-отрицательных клеток, доли глюкагон-положительных/инсулин-отрицательных клеток и доли хромогранин А-положительных клеток. В трансплантате через 3 месяца после трансплантации была обнаружена повышенная доля глюкагон-положительных/инсулин-отрицательных клеток и пониженная доля инсулин-положительных/NKX6.1-отрицательных клеток по сравнению с таковыми при трансплантации. Кроме того, трансплантат через 3 месяца после трансплантации содержит высокую долю хромогранин А-положительных эндокринных клеток. Результаты иммуногистологического окрашивания иссеченного трансплантата показаны на фигуре 9. В трансплантате через 3 месяца после трансплантации была обнаружена повышенная доля клеток, положительных только для глюкагон, по сравнению с таковой при трансплантации, что свидетельствует о достижении дифференциации в зрелые островковоподобные клетки поджелудочной железы в живом организме.

[Таблица 7]

	При трансплантации	Через 3 месяца после трансплантации
Доля инсулин-положительных/NKX6.1-положительных клеток	46,0%	19,3%
Доля инсулин-положительных/NKX6.1-отрицательных клеток	32,0%	7,6%
Доля глюкагон-положительных/инсулин-отрицательных клеток	0,1%	32,1%
Доля хромогранин А-положительных клеток	н.о.	96,2%

Вышеуказанные результаты подтвердили, что инсулинпродуцирующие клетки, подкожно трансплантированные мышам с сахарным диабетом, сохраняют высокие доли эндокринных клеток и дифференцируются в зрелые островкоподобные клетки поджелудочной железы, включая зрелые α клетки в живом организме.

Кроме того, было подтверждено, что островкоподобные клетки поджелудочной железы, которые созрели в живом организме, содержат крайне мало (например, менее 3%) сосуществующих пролиферативных нежелательных клеток (Ki67-положительных клеток).

(57) Формула изобретения

1. Популяция инсулинпродуцирующих клеток для применения в лечении сахарного диабета, содержащая: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве от 30% до 50%, инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве от 20% до 32%; и Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%.

2. Популяция инсулинпродуцирующих клеток по п. 1, где уровень экспрессии MafA гена или его генного продукта ниже, чем уровень экспрессии MafA гена или его генного продукта в островке поджелудочной железы.

3. Популяция инсулинпродуцирующих клеток по п. 1, содержащая глюкагон-положительные и инсулин-отрицательные клетки в количестве менее 3%.

4. Популяция инсулинпродуцирующих клеток по п. 1, где инсулинпродуцирующие клетки демонстрируют ответ стимулированной глюкозой секреции инсулина (GSIS).

5. Популяция инсулинпродуцирующих клеток по п. 1, содержащая хромогранин А-положительные клетки в количестве 90% или более.

6. Популяция инсулинпродуцирующих клеток по п. 1, содержащая щелочная фосфатаза-положительные плюрипотентные стволовые клетки в количестве 0,005% или менее.

7. Лекарственное средство для применения в лечении сахарного диабета, которое содержит эффективное количество популяции инсулинпродуцирующих клеток по любому из пп. 1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

8. Лекарственное средство для применения в улучшении уровней глюкозы у пациента натощак или после приема пищи, которое содержит эффективное количество популяции инсулинпродуцирующих клеток по любому из пп. 1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

9. Лекарственное средство для применения в снижении риска гипогликемии у пациента с сахарным диабетом, которое содержит эффективное количество популяции инсулинпродуцирующих клеток по любому из пп. 1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Лекарственное средство для применения в способе индукции дифференциации в островкоподобные клетки поджелудочной железы в живом организме, которое содержит эффективное количество популяции инсулинпродуцирующих клеток по любому из пп. 1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Лекарственное средство по п. 10, где островковоподобные клетки поджелудочной железы, дифференцированные в живом организме, содержат хромогранин А-положительные клетки в количестве 90% или более.

12. Лекарственное средство по п. 10, где островковоподобные клетки поджелудочной железы, дифференцированные в живом организме, содержат Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%.

13. Лекарственное средство по п. 10, где островковоподобные клетки поджелудочной железы, дифференцированные в живом организме, содержат глюкагон-положительные и инсулин-отрицательные клетки в количестве 10% или более и 40% или менее.

14. Лекарственное средство по п. 10, где островковоподобные клетки поджелудочной железы, дифференцированные в живом организме, демонстрируют инсулин-секретирующее действие в ответ на гипогликемию.

15. Лекарственное средство по любому из пп. 7-10, где популяция инсулинпродуцирующих клеток расположена в устройстве.

16. Лекарственное средство по любому из пп. 7-10, где популяция инсулинпродуцирующих клеток диспергирована в гидрогеле.

17. Лекарственное средство по любому из пп. 7-10, применяемое для трансплантации в живой организм.

18. Лекарственное средство по любому из пп. 7-10, применяемое для подкожной трансплантации.

19. Способ продуцирования инсулинпродуцирующих клеток, включающий: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве от 30% до 50% и инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве от 20% до 32%, где способ включает стадии:

культивирования плюрипотентных стволовых клеток в присутствии 5-50 нг/мл активина А с получением дефинитивных клеток эндодермы;

индукции дифференцировки дефинитивных клеток эндодермы в эндокринные клетки-предшественники; и

культивирования эндокринных клеток-предшественников в среде, содержащей ингибитор FGFR1, с получением инсулинпродуцирующих клеток.

20. Способ создания островковоподобных клеток поджелудочной железы, где способ включает

трансплантацию инсулинпродуцирующих клеток в живой организм, чтобы вызвать дифференциацию в островковоподобные клетки поджелудочной железы, где инсулинпродуцирующие клетки содержат инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве от 30% до 50%, инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве от 20% до 32% и Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%.

21. Способ лечения сахарного диабета, где способ включает

трансплантацию инсулинпродуцирующих клеток в живой организм, чтобы вызвать дифференциацию в островковоподобные клетки поджелудочной железы, где инсулинпродуцирующие клетки содержат: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве от 30,8% по 46%, инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве от 21,8% по 32% и Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%; и

лечение сахарного диабета островковоподобными клетками поджелудочной железы.

22. Способ улучшения уровней глюкозы у пациента натощак или после приема пищи, где способ включает

трансплантацию инсулинпродуцирующих клеток в живой организм, чтобы вызвать дифференциацию в островковоподобные клетки поджелудочной железы, где инсулинпродуцирующие клетки содержат инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве от 30% до 50%, инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве от 20% до 32% и Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%; и

улучшение уровней глюкозы натощак или после приема пищи островковоподобными клетками поджелудочной железы.

23. Способ снижения риска гипогликемии у пациента с сахарным диабетом, где способ включает

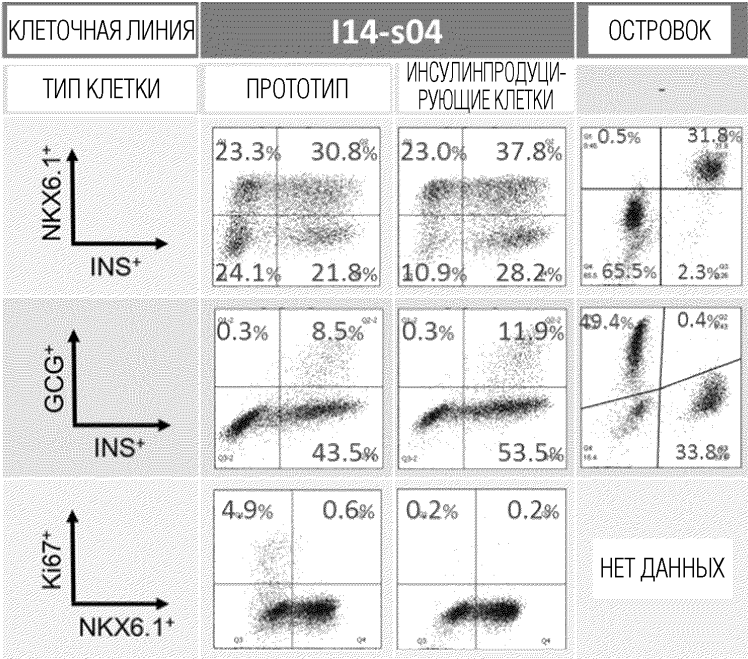
трансплантацию инсулинпродуцирующих клеток в живой организм, чтобы вызвать дифференциацию в островковоподобные клетки поджелудочной железы, где инсулинпродуцирующие клетки содержат: инсулин-положительные и NKX6.1-положительные клетки в количестве от 30% до 46%, инсулин-положительные и NKX6.1-отрицательные клетки в количестве от 20% до 32% и Ki67-положительные клетки в количестве менее 3%; и

снижение риска гипогликемии у пациента с сахарным диабетом островковоподобными клетками поджелудочной железы.

1

1/6

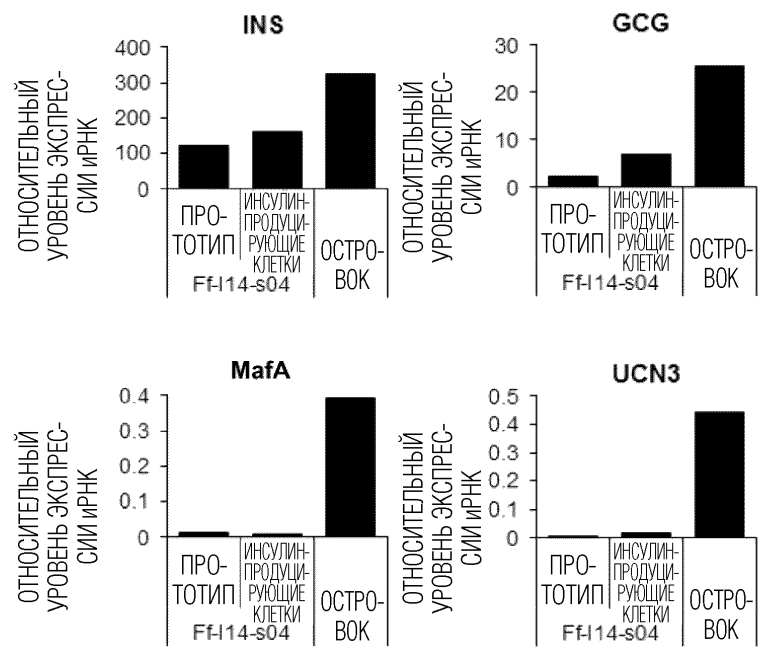
ФИГ. 1



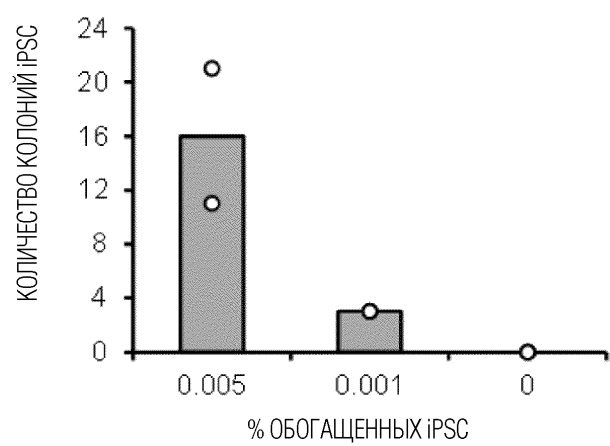
2

2/6

ФИГ. 2

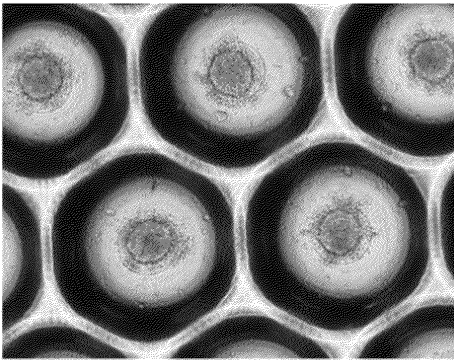


ФИГ. 3

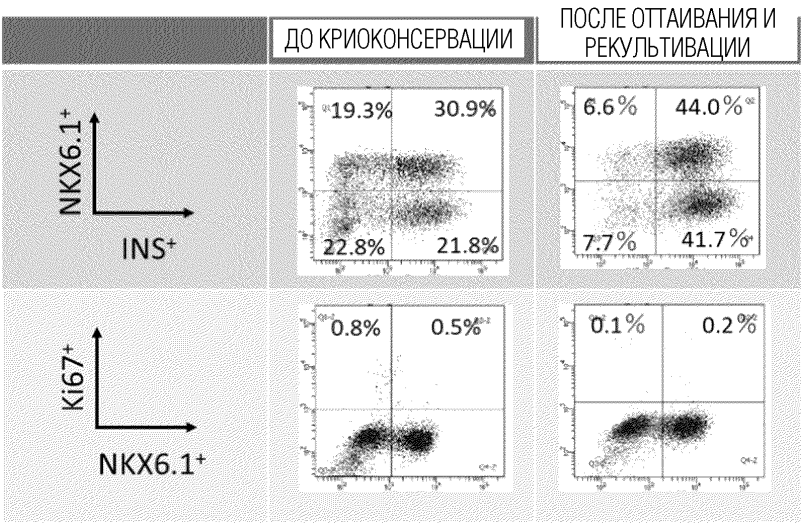


3/6

ФИГ. 4

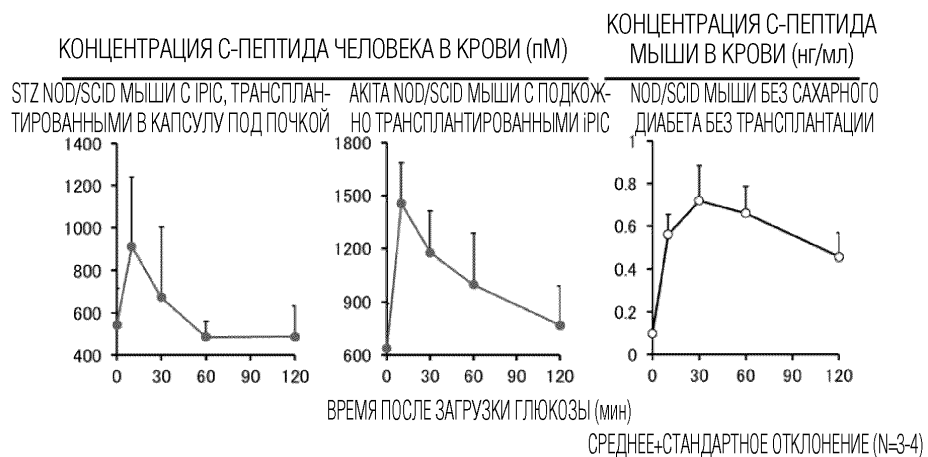


ФИГ. 5

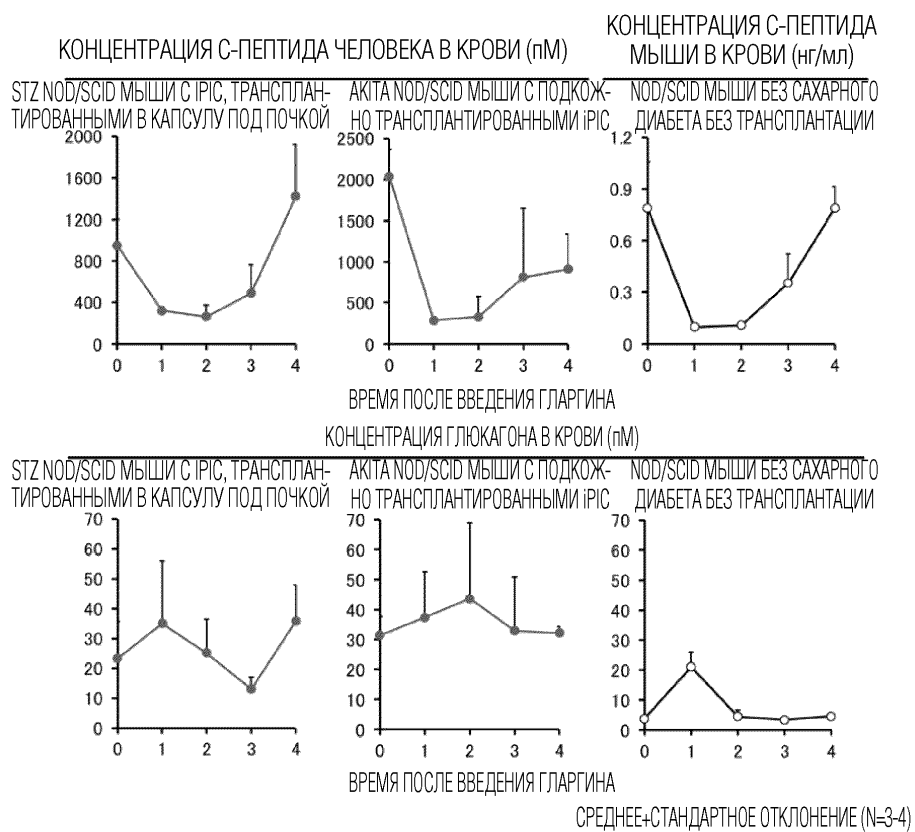


4/6

ФИГ. 6

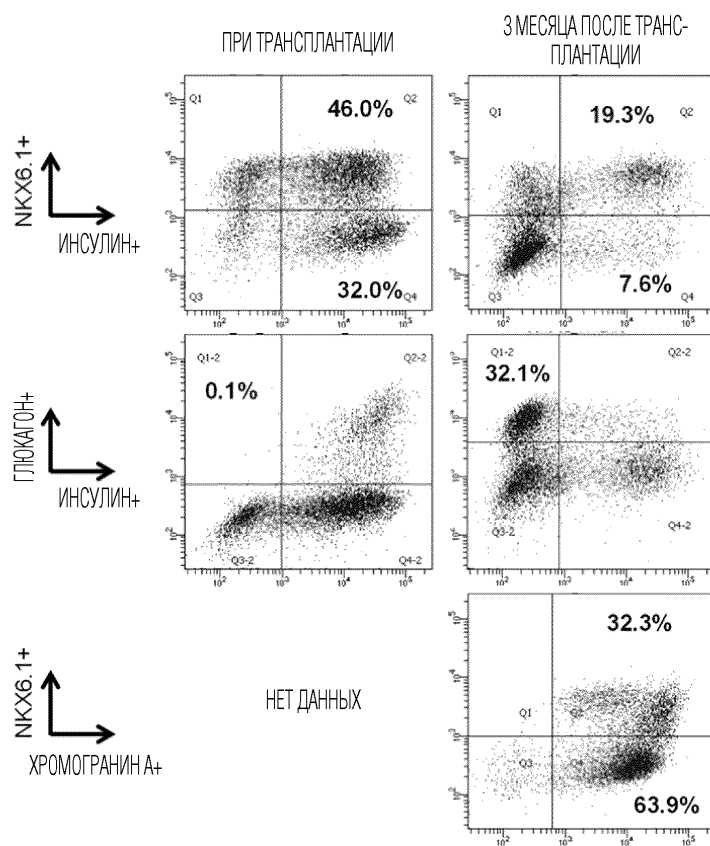


ФИГ. 7



5/6

ФИГ. 8



6/6

ФИГ. 9

