

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2017-515507****(P2017-515507A)**(43) 公表日 **平成29年6月15日(2017.6.15)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/071 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/071	4 B 0 6 3
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁)

(21) 出願番号	特願2017-512643 (P2017-512643)	(71) 出願人	509087759
(86) (22) 出願日	平成27年5月7日 (2015.5.7)		ヤンセン バイオテック, インコーポレー
(85) 翻訳文提出日	平成29年1月10日 (2017.1.10)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/029636		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1904
(87) 国際公開番号	W02015/175307		4 ホーシヤム・リツジビユードライブ80
(87) 国際公開日	平成27年11月19日 (2015.11.19)		0/850
(31) 優先権主張番号	61/994, 259	(74) 代理人	100092783
(32) 優先日	平成26年5月16日 (2014.5.16)		弁理士 小林 浩
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100095360
			弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100093676
			弁理士 小林 純子
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵内分泌細胞内のMAFA発現を強化するための小分子の使用

## (57) 【要約】

本発明は、多能性幹細胞の、成熟した表現型の膵内分泌細胞への分化を促進する方法、細胞培養物、及び分化培地を提供する。結果として生じる膵内分泌細胞は、単一ホルモンインスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。1つ又は2つ以上の分化ステージにおいて、培養は、培養容器内の空気-液体界面において行うことができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する、分化した多能性幹細胞の集団を含み、前記分化細胞の少なくとも10%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する、インビトロ細胞培養物。

## 【請求項 2】

多能性細胞から誘導される細胞内でMAFA発現を誘導する方法であって、多能性細胞を培養することと、オーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、タンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される阻害剤が補充された培地での処理によって、前記多能性細胞を、より成熟した表現型の膵内分泌細胞に分化させることと、を含む、方法。

10

## 【請求項 3】

前記阻害剤が、オーロラキナーゼ阻害剤である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 4】

オーロラキナーゼ阻害剤が、オーロラキナーゼ阻害剤IIである、請求項3に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記阻害剤が、RSK阻害剤である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 6】

オーロラキナーゼ阻害剤が、RSK阻害剤IIである、請求項3に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記培地が、抗酸化剤を更に含む、請求項2に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2014年5月16日に出願された、米国特許仮出願第61/994,259号の利益を主張するものであり、参照によりその全体があらゆる目的で本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

(発明の分野)

本発明は、多能性幹細胞の分化のための方法、並びにそれから生じる細胞及び集団に関する。とりわけ、本発明は、MAFAの増加した発現を呈する膵内分泌細胞、及びそのような細胞の集団を生成するためのある特定の小分子の使用に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0003】

I型真性糖尿病の細胞補充療法の進歩及び移植可能なランゲルハンス島の不足により、生着に適したインスリン産生細胞、又はベータ( )細胞の供給源の開発に注目が集まっている。1つの手法として、胚性幹細胞などの多能性幹細胞から機能的細胞を生成するものがある。

40

## 【0004】

脊椎動物の胚発生では、多能性細胞は、原腸形成として知られるプロセスにおいて3つの胚葉(外胚葉、中胚葉、及び内胚葉)から構成される細胞群を生じる。例えば、甲状腺、胸腺、膵臓、腸、及び肝臓などの組織は、内胚葉から中間ステージを経て発達する。このプロセスにおける中間ステージは、胚体内胚葉(definitive endoderm)の形成である。

## 【0005】

原腸形成の終了までに、内胚葉は、内胚葉の前部、中間、及び後部の領域を特異的にマークする因子のパネルの発現によって認識することができる前部-後部ドメインに分割される。例えば、HHEX及びSOX2は内胚葉の前領域を特定し、CDX1、2及び4は

50

後老域を特定する。

【0006】

内胚葉組織の移行は、内胚葉を腸管の領域化に役立つ異なった中胚葉組織に近接させる。これは、線維芽細胞増殖因子(「FGF」)、WNTS、形質転換増殖因子(「TGF-」)、レチノイン酸、及び骨形成タンパク質(「BMP」)リガンド、並びにそれらのアンタゴニストなどの分泌因子の過多によって達成される。例えば、FGF4及びBMPは、推定後腸内胚葉においてCDX2の発現を促進し、前方の遺伝子HHEX及びSOX2の発現を抑制する(2000 Development, 127:1563~1567)。WNTシグナル伝達はまた、後腸の発達を促進し、前腸の運命を阻害するために、FGFシグナル伝達と平行して作用することが示されている(2007 Development, 134:2207~2217)。最後に、間葉によって分泌されるレチノイン酸は、前腸-後腸の境界を調節する(2002 Curr. Biol., 12:1215~1220)。

10

【0007】

特異的転写因子の発現レベルは、組織のアイデンティティを指定するために使用できる可能性がある。原腸管への胚体内胚葉の形質転換中に、腸管は、制限された遺伝子発現パターンにより分子レベルで観察することができる広いドメインに領域化される。腸管で領域化された膵臓ドメインは、PDX1の非常に高い発現並びにCDX2及びSOX2の非常に低い発現を示す。PDX1、NKX6.1/PTF1A、及びNKX2.2は、膵臓組織で高く発現し、CDX2の発現は腸組織で高い。

20

【0008】

膵臓の形成は、胚体内胚葉の膵臓内胚葉への分化により生じる。背側と腹側の膵臓ドメインは、前腸上皮から生じる。また、前腸は、食道、気管、肺、甲状腺、胃、肝臓、及び胆管系を生じさせる。

【0009】

膵臓内胚葉の細胞は膵臓-十二指腸ホメオボックス遺伝子PDX1を発現する。PDX1が存在しない場合、膵臓の発達は、腹側芽及び背側芽の形成より先に進行しない。したがって、PDX1の発現は、膵臓器官形成において重要な工程を示している。成熟した膵臓は、膵臓内胚葉の分化から生じる外分泌組織及び内分泌組織の両方を含有する。

【0010】

D'Amourらは、高濃度のアクチビン及び低血清の存在下でのヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉の濃縮培地の産生を記述している(Nature Biotechnology 2005, 23:1534~1541、米国特許第7,704,738号)。マウスの腎臓被膜下でのこれらの細胞の移植は、内胚葉組織の特徴を有する、より成熟した細胞への分化をもたらした(米国特許第7,704,738号)。ヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉細胞は、FGF-10及びレチノイン酸の添加後、PDX1陽性細胞に更に分化させることができる(米国特許出願公開第2005/0266554号)。免疫不全マウスの脂肪パッド中のこれら膵臓前駆細胞のその後の移植は、3~4ヶ月の成熟期の後に、機能的膵内分泌細胞の形成をもたらした(米国特許第7,534,608号及び同第7,993,920号)。

30

40

【0011】

Fiskらは、ヒト胚性幹細胞からの膵島細胞の産生のためのシステムを報告している(米国特許第7,033,831号)。この場合、分化経路は3つのステージに分割された。ヒト胚性幹細胞は、最初に、酪酸ナトリウムとアクチビンAとの組み合わせを用いて内胚葉に分化された(米国特許第7,326,572号)。次に細胞をノギンなどのBMPアンタゴニストと共に、EGF又はセルリンと組み合わせで培養して、PDX1陽性細胞を生成した。最終分化は、ニコチンアミドにより誘発された。

【0012】

小分子阻害剤もまた、膵内分泌前駆細胞の誘導のために使用されている。例えば、TGF-受容体及びBMP受容体の小分子阻害剤(Development 2011, 1

50

38:861~871、Diabetes 2011, 60:239~247)は、膵内分泌細胞の数を著しく増強するために使用されている。加えて、小分子活性因子もまた、胚体内胚葉細胞又は膵内前駆細胞を生成するために使用されている(Curr. Opin. Cell Biol. 2009, 21:727~732、Nature Chem. Biol. 2009, 5:258~265)。

#### 【0013】

HB9(HIXB9及びMNX1としても知られる)は、およそ胎生8日目を開始する膵臓発達において早期に発現される塩基性ヘリックスループヘリックス(「bHLH」)転写活性因子タンパク質である。HB9の発現は一時的であり、膵臓上皮内で約10.5日目にピークに達し、PDX1及びNKX6.1発現細胞内で発現される。約12.5日目に、HB9発現は減少し、後のステージにおいて、細胞のみに制限されるようになる。HB9のヌル突然変異のためのマウスホモ接合体において、膵臓の背葉は発達に失敗する(Nat. Genet. 23:67~70, 1999、Nat. Genet. 23:71~75, 1999)。HB9-/-細胞は、低レベルのグルコース輸送体、GLUT2、及びNKX6.1を発現する。更に、HB9-/-膵臓は、インスリン陽性細胞の数の著しい低減を示す一方、他の膵臓ホルモンの発現には著しく影響しない。したがって、HB9の一時的制御は、正常な細胞の発達及び機能に必須である。細胞内のHB9発現を調節する因子について多くは知られていないが、ゼブラフィッシュにおける近年の研究は、レチノイン酸がHB9の発現を積極的に調節できることを示唆する(Development, 138, 4597~4608, 2011)。

10

20

#### 【0014】

参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第13/998,883号において、トリヨードチロニン(「T3」)は、細胞を細胞に向かって分化させる際に、HB9タンパク質発現の誘導体として作用し得ることが実証された。T3及びT4の一方又は両方を使用して、NKX6.1、PDX1、及びHB9に陽性の膵臓内胚葉細胞を生成するための方法もまた、そこに開示されている。追加として、及び参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第13/998,884号に開示されるように、空気-液体界面において培養し、T3及びアクチビン受容体様キナーゼ(「ALK」)5阻害剤を使用することによって、膵内分泌マーカの発現が、著しく増強され得ることが実証された。

30

#### 【0015】

多様な転写因子は、膵内分泌細胞の、インスリン分泌細胞への分化を調節する。これらの因子には、v-maf鳥類筋腱膜線維腫発癌遺伝子相同体A(「MAFA」)がある。実際に、MAFAは、グルコース促進インスリン分泌の、細胞内の主要調節因子であり得ると考えられる。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0016】

一般に、前駆細胞を機能的細胞に分化させるプロセスは、様々なステージを経て、ヒト多能性幹細胞などの前駆細胞から膵臓細胞を生成するためのプロトコルを改善することにおいて大幅に進歩した。研究におけるこれらの進歩にも関わらず、前駆細胞を分化させるプロセスにおける各工程は、特有の問題を提示する。このようにして、機能的内分泌細胞、とりわけ機能的細胞を産生する目的で、更なる分化プロトコル開発の必要性が依然として存在する。とりわけ、膵内分泌細胞内のMAFAの発現が増強されるプロセスを開発することが望ましい。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0017】

【図1】図A~図Mは実施例1に従い分化される幹細胞株H1からの、PDX1、NKX6.1、PAX4、PAX6、NGN3、MAFA、ABCC8、クロモグラニン-A、G6PC2、IAPP、インスリン、グルカゴン、及びPTF1aの未分化ES細胞に対

50

する遺伝子発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【図2】図A～図Cは実施例1に従い分化され、図2AではKi67（Y軸）と共染色されるPDX1（X軸）、図2BではCDX2（Y軸）と共染色されるPDX1（X軸）、及び図2CではNKX6.1について染色された、ステージ3細胞のFACSプロファイルを描く。

【図3】図A～図Dは実施例1に従い分化され、図3AではNKX6.1（Y軸）と共染色されるクロモグラニン（X軸）、図3BではKi67（Y軸）と共染色されるPDX1（X軸）、図3Cではインスリン（Y軸）と共染色されるNKX6.1（X軸）、及び図3DではNeuroD1について染色された、ステージ4細胞のFACSプロファイルである。

10

【図4】図A～図Eは実施例1に従い分化され、図4AではNKX6.1（Y軸）と共染色されるクロモグラニン（X軸）、図4BではKi67（Y軸）と共染色されるPDX1（X軸）、図4Cではインスリン（Y軸）と共染色されるNKX6.1（X軸）、図4DではNeuroD1、及びグルカゴン（Y軸）と共染色されるインスリン（X軸）について染色された、ステージ5細胞のFACSプロファイルである。

【図5】図A～図Fは実施例1に従い分化され、図5AではNKX6.1（Y軸）と共染色されるクロモグラニン（X軸）、図5BではKi67（Y軸）と共染色されるPDX1（X軸）、図5Cではインスリン（Y軸）と共染色されるNKX6.1（X軸）、図5DではOct3/4（Y軸）と共染色されるPAX6（X軸）、図5Eではグルカゴン（Y軸）と共染色されるインスリン（X軸）、及び図5FではFOXA2について染色された、ステージ6細胞のFACSプロファイルである。

20

【図6】図A～図Fは実施例1に従い分化され、図6AではNKX6.1（Y軸）と共染色されるクロモグラニン（X軸）、図6BではKi67（Y軸）と共染色されるPDX1（X軸）、及び図6Cではインスリン（Y軸）と共染色されるNKX6.1（X軸）、図6DではOct3/4（Y軸）と共染色されるPAX6（X軸）、図6Eではグルカゴン（Y軸）と共染色されるインスリン（X軸）、及び図6FではFOXA2について染色された、ステージ7細胞のFACSプロファイルである。

【図7】実施例1に従い分化されたステージ3～ステージ7細胞の複数の膵内胚葉マーカー（FOXA2、PDX1、NKX6.1）、未分化ES細胞マーカー（Oct3/4）、内分泌マーカー（PAX6、ISL-1、NKX2.2、クロモグラニン）、及びホルモン（インスリン、グルカゴン）の発現率のグラフである。

30

【図8】図A～図Eはステージ6～7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のインスリン及びMAFAの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【図9】未分化細胞に対する実施例4の分化細胞のAXL及びGAS6の発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【図10A】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである。

【図10B】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである

40

【図10C】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである

【図10D】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである。

【図10E】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの

50

発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである。

【図10F】実施例6に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、UCN3、G6PC2、NKX6.1、PDX1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータのグラフである。

【図11A】実施例7に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、PDX1、NKX6.1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【図11B】実施例7に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、PDX1、NKX6.1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【図11C】実施例7に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、PDX1、NKX6.1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【図11D】実施例7に従うステージ7の小分子による処理後の、未分化細胞に対する分化細胞のMAFA、PDX1、NKX6.1、及びインスリンの発現の倍数変化のリアルタイムPCR分析からのデータを描くグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の以降の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことでより良好に理解されるであろう。本発明を例示する目的で、図面の本発明の実施形態を示す。しかしながら、本発明は、示される正確な構成、実施例、及び手段に限定されない。開示を分かりやすくするため、限定を目的とすることなく、「発明を実施するための形態」を、本発明の特定の特徴、実施形態、又は用途を説明又は例示する小項目に分割する。

【0019】

本発明は、ある特定の小分子による比較的成熟していない膵内分泌細胞の処理によって、より成熟した表現型の膵内分泌細胞を生成することを目的としている。本発明のある特定の実施形態において、膵内分泌細胞は、タンパク質メチルトランスフェラーゼ阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤、及びp90リボソームS6キナーゼ(「RSK」)阻害剤のうちの1つ又は2つ以上である小分子の存在下、1つ又は2つ以上のステージで培養される。したがって、本発明は、多能性幹細胞を、成熟した表現型の膵内分泌細胞の特徴を呈する細胞に分化させるための細胞培養物だけでなく、分化を開始させ、分化を促す分化培地、並びにそのような分化、及び分化から生じる分化細胞及び細胞集団を提供する。本発明の方法は、膵内分泌細胞集団の形成をもたらす、細胞の少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、及び最も好ましくは少なくとも50%が、単一ホルモンインスリンを発現し、PDX1、NKX6.1、及びMAFA陽性である。

【0020】

有利かつ好適に、本発明の細胞培養物及び分化培地は、空気-液体界面での分化と併せて使用されてもよい。培養は、多能性幹細胞から成熟した表現型の膵内分泌細胞への分化経路に関与する全てのステージで空気-液体界面で起こり得るか、又は分化の早期ステージで培地中に浸漬された平板培養上で培養することに続いて、分化の後期ステージのうちの1つ又は2つ以上の間に空気-液体界面で培養することを必要とし得る。より好ましくは、本発明のプロセスは、早期ステージを通じて培地中に浸漬された支持表面上で多能性幹細胞を培養することと、次いで分化の後期ステージに空気-液体界面で培養することとの組み合わせを必要とする。このような実施形態において、細胞は、最初に浸漬培養のための固体表面上に播種され、次いでその固体支持体から除去され、空気-液体界面で培養するために、多孔性支持体上に再度播種され得る。代替的に、細胞は、最初に多孔性支持体上に播種され、次いで分化の早期ステージで培地中に浸漬され、次に分化の後期ステージで空気-液体界面に置かれ得る。

【0021】

更に別の実施形態において、1つ又は2つ以上のステージでの分化はまた、T3、T4、それらの類似体のうちの1つ又は2つ以上の存在下、任意選択であるが好ましくはアクチビン受容体様キナーゼ5（「ALK5」）阻害剤を用いて行われる。好ましい実施形態において、腓内胚葉/内分泌前駆細胞の集団は、T3、T4、それらの類似体、及び腓内分泌細胞に対するALK5阻害剤のうちの1つ又は2つ以上を含有する培地中で培養される。より好ましい実施形態において、結果として生じる腓内分泌細胞は、T3、T4、それらの類似体、及びALK5阻害剤のうちの1つ又は2つ以上を含有する培地の存在下で更に分化される。

#### 【0022】

ALK5阻害剤及び甲状腺受容体アゴニストのうちの1つ又は2つ以上の組み合わせによる腓内胚葉細胞の処理に続いて、タンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤、及びRSK阻害剤のうちの1つ又は2つ以上と併せて、結果として生じる腓内分泌細胞を培養することは、単一ホルモンインスリン、MAFA、PDX1、及びNKX6.1を発現する集団内の細胞の数を著しく増強すると共に、細胞内のMAFA発現のレベルを増加させることは、本発明の特定の発見である。本発明は、空気-液体界面での分化と併せて使用されるときに特定の有用性を見出す。

10

#### 【0023】

##### 定義

幹細胞は、単一細胞レベルでの自己再生能及び分化能の両方によって定義される未分化細胞である。幹細胞は、自己再生前駆細胞、非再生性前駆細胞、及び最終分化細胞を含む子孫細胞を生成することができる。幹細胞はまた、複数の胚葉（内胚葉、中胚葉、及び外胚葉）から様々細胞系統の機能的細胞へと生体外で分化する能力を特徴とする。幹細胞はまた、移植後に複数の胚葉の組織を生じさせ、胚盤胞に注入後、実質的に（全てではないとしても）ほとんどの組織に寄与する。

20

#### 【0024】

幹細胞は、それらの発生上の潜在性によって分類される。多能性幹細胞は、全ての胚細胞型を生じさせることが可能である。

#### 【0025】

分化は、特殊化されていない（unspecialized）（「拘束されていない（uncommitted）」）又は比較的特殊化されていない細胞が、特殊化された細胞、例えば、神経細胞又は筋細胞の特徴を獲得するプロセスである。分化した細胞は、細胞の系統の範囲内で、より特殊化した（「拘束された」）状態を呈している細胞である。分化プロセスに適用された際の用語「拘束された」は、通常的环境下で特定の細胞型又は細胞型の小集合への分化を続け、かつ通常的环境下で異なる細胞型に分化したり、又は低分化細胞型に戻ったりすることができない地点まで、分化経路において進行した細胞を指す。「脱分化」は、細胞が細胞の系統内で比較的特殊化されて（又は拘束されて）いない状況に戻るプロセスを指す。本明細書で使用するとき、細胞の系統は、その細胞の遺伝性、すなわち、その細胞がどの細胞に由来するか、またその細胞がどのような細胞を生じさせ得るかを規定する。細胞の系統は、発達及び分化の遺伝スキームの範囲内で、その細胞を位置付けるものである。系統特異的マーカーとは、対象とする系統の細胞の表現型と特異的に関連した特徴を指し、拘束されていない細胞の、対象とする系統への分化を評価するために使用することができる。

30

40

#### 【0026】

本明細書で使用するとき「マーカー」とは、対象とする細胞で差別的に発現される核酸又はポリペプチド分子である。これに関して、差別的発現とは、未分化細胞又は分化の別のステージの細胞と比較して、陽性マーカーについては増殖したレベルを意味し、陰性マーカーについては減少したレベルを意味する。マーカー核酸又はポリペプチドの検出限界は、他の細胞と比較して対象とする細胞において十分に高いか又は低いことから、当該技術分野において知られる各種方法のいずれを用いても対象とする細胞を他の細胞から識別及び区別することが可能である。

50

## 【 0 0 2 7 】

本明細書で使用するとき、細胞は、特異的マーカーが細胞内で十分に検出されたとき、特異的マーカー「について陽性」、「陽性」又は「+」である。同様に、細胞は、特異的マーカーが細胞内で十分に検出されないとき、特異的マーカー「について陰性」、「陰性」又は「-」である。とりわけ、蛍光活性細胞分類サイトメトリー（「FACS」）による陽性は通常約2%を超えるが、FACSによる陰性閾値は通常約1%を下回る。ポリメラーゼ連鎖反応サイトメトリー（「PCR」）による陽性は、通常約30サイクル（Ct<sub>s</sub>）以下であるが、PCRによる陰性は、通常約31サイクルを超える。

## 【 0 0 2 8 】

静的生体内細胞培養において、多能性幹細胞の機能的膵内分泌細胞への分化を複製する試みでは、分化プロセスは、多くの連続ステージを通じて進行すると見られる場合が多い。とりわけ、分化プロセスは、一般に複数のステージを通じて進行すると見られている。この段階的分化において、「ステージ1」は、分化プロセスの第1の工程、多能性幹細胞の、胚体内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞（「ステージ1細胞」）への分化を指す。「ステージ2」は、第2の工程、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（「ステージ2細胞」）への分化を指す。「ステージ3」は、第3の工程、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（「ステージ3細胞」）への分化を指す。「ステージ4」は、第4の工程、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、膵前腸前駆体細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（「ステージ4細胞」）への分化を指す。「ステージ5」は、第5の工程、膵前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、膵内胚葉細胞及び膵内分泌前駆細胞のうち的一方又は両方に特徴的なマーカーを発現する細胞（集合的に「ステージ5細胞」又は代替的に「膵内胚葉/内分泌前駆体細胞」と称される）への分化を指す。ステージ6は、第6の工程、膵内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、未成熟細胞である膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞（「ステージ6細胞」）への分化を指す。ステージ6細胞は、単一ホルモンインスリンを発現し、PDX1、NKX6.1、及びクロモグラニン陽性である。本発明の細胞の集団を産生するプロセスにおいて、及びその目的で、第7の工程、「ステージ7」が使用され、未成熟細胞である膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、成熟化細胞であり、ステージ6細胞と比較してより成熟した表現型を有する膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化を指す。「ステージ7細胞」とは、単一ホルモンインスリン+、MAFA+、NKX6.1+、及びPDX1+であるが、未成熟細胞よりも高いレベルでMAFAを発現する膵内分泌細胞も意味する。追加として、ステージ7を実行することから生じる細胞集団は、ステージ6の細胞集団と比較してより高い割合のMAFA陽性及び単一ホルモンインスリン発現細胞を有する。

## 【 0 0 2 9 】

特定集団の全ての細胞がこれらのステージを同じ速度で進行するとは限らないことに留意されたい。結論として、生体外細胞培養において、特に後期分化ステージでは、集団に存在する細胞の大半よりも分化経路を進行していなかったり、大半よりも進行していたりする細胞の存在を検出することは稀ではない。例えば、ステージ5での細胞の培養中、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーの出現を見ることは稀ではない。本発明を例証する目的で、上で特定されたステージと関連した様々な細胞型の特徴が本明細書に記載される。

## 【 0 0 3 0 】

本明細書で使用するとき、「胚体内胚葉」は、原腸形成中、胚盤葉上層から生じ、胃腸管及びその誘導体を形成する細胞の特徴を保有している細胞を指す。胚体内胚葉細胞は、以下のマーカー、すなわち、FOXA2（肝細胞核因子3-（「HNF3-」）としても知られる）、GATA4、SOX17、CXCR4、ブラチュウリー（Brachyury）、ケルペロス、OTX2、グースコイド、C-Kit、CD99、及びMIXL1のうちの少なくとも1つを発現する。胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーは、CXCR4、FOXA2、及びSOX17である。したがって、胚体内胚葉細胞は、CXCR4、FOXA

10

20

30

40

50



2、及びSOX17の発現で特徴付けられ得る。加えて、細胞がステージ1に留まることができる時間の長さに応じて、HNF4における増加が観察され得る。

【0031】

「腸管細胞」は、本明細書で使用するとき、胚体内胚葉から誘導され、肺、肝臓、膵臓、胃、及び腸などの全ての内胚葉器官を生じ得る細胞を指す。腸管細胞は、胚体内胚葉細胞によって発現されたものに対するHNF4の実質的に増加した発現で特徴付けられ得る。例えば、HNF4のmRNA発現の10倍～40倍の増加が、ステージ2中に観察され得る。

【0032】

「前腸内胚葉細胞」は、本明細書で使用するとき、食道、肺、胃、肝臓、膵臓、膀胱、及び十二指腸の一部を生じる細胞を指す。前腸内胚葉細胞は、以下のマーカー、すなわち、PDX1、FOXA2、CDX2、SOX2、及びHNF4のうちの少なくとも1つを発現する。前腸内胚葉細胞は、腸管細胞と比較してPDX1の発現の増加で特徴付けられ得る。例えば、ステージ3培養において、細胞の50パーセント超が、典型的にPDX1を発現する。

10

【0033】

「膵前腸前駆細胞」は、本明細書で使用するとき、以下のマーカー、すなわち、PDX1、NKX6.1、HNF6、NGN3、SOX9、PAX4、PAX6、ISL1、ガストリン、FOXA2、PTF1a、PROX1、及びHNF4のうちの少なくとも1つを発現する細胞を指す。膵前腸前駆細胞は、PDX1、NKX6.1、及びSOX9のうちの少なくとも1つの発現について陽性であることで特徴付けられ得る。

20

【0034】

「膵内胚葉細胞」は、本明細書で使用するとき、以下のマーカー、すなわち、PDX1、NKX6.1、HNF1、PTF1、HNF6、HNF4、SOX9、NGN3、ガストリン、HB9、又はPROX1のうちの少なくとも1つを発現する細胞を指す。膵内胚葉細胞は、CDX2又はSOX2の実質的発現の欠失で特徴付けられ得る。

【0035】

「膵内分泌前駆細胞」は、本明細書で使用するとき、膵ホルモン発現細胞になることが可能な膵内胚葉細胞を指す。膵内分泌前駆細胞は、以下のマーカー、すなわち、NGN3、NKX2.2、NeuroD1、ISL1、PAX4、PAX6、又はARXのうちの少なくとも1つを発現する。膵内分泌前駆細胞は、NKX2.2及びNeuroD1の発現で特徴付けられ得る。

30

【0036】

「膵内分泌細胞」は、本明細書で使用するとき、以下のホルモン、すなわち、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、及び膵臓ポリペプチドのうちの少なくとも1つを発現することが可能な細胞を指す。これらのホルモンに加え、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーは、NeuroD1、ISL1、PDX1、NKX6.1、ARX、NKX2.2、HB9、及びPAX6のうちの1つ又は2つ以上を含む。膵内分泌細胞の1つのサブセットは、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、及び膵臓ポリペプチドではないが、インスリンを発現することが可能な細胞である「未成熟細胞」である。加えて、未成熟細胞に特徴的なマーカーは、NeuroD1、ISL1、PDX1、NKX6.1、NKX2.2、HB9、及びPAX6のうちの1つ又は2つ以上を含む。膵内分泌細胞の第2のサブセットは、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、及び膵臓ポリペプチドではないが、インスリンを発現することが可能な細胞である「成熟化細胞」である。追加として、成熟化細胞に特徴的なマーカーは、NeuroD1、ISL1、PDX1、NKX6.1、NKX2.2、HB9、PAX6、及びMAFAのうちの1つ又は2つ以上を含む。膵内分泌細胞の更に別のサブセットは、成熟細胞に特徴的なマーカーを発現するものであり、比較的成熟していない細胞のそれと比較して頑強かつ増加したグルコースチャレンジに反応するインスリン放出に伴うPDX1、NKX2.2、NKX6.1、NeuroD1、ISL1、HNF3、HB9、MAFA、及びPAX6の発現で特

40

50

徴付けられ得る。

【0037】

「空気-液体界面」又は「ALI」は、本明細書で使用するとき、開放培養容器又は培地で部分的に充填された培養容器内に存在する空気-液体界面を指す。本明細書では便宜上「空気」と称されるが、本発明は、周囲環境内で見出されるガス及び組成物の混合物に限定されない。本発明は、具体的に企図され、例えば、特定成分が豊富であるか、又は特定成分が枯渇若しくは排除された混合物を含む、周囲環境とは異なる組成物を有するガス混合物を含む。

【0038】

本明細書では、「d1」、「1d」、及び「1日目」、「d2」、「2d」、及び「2日目」などが同義的に使用される。これらの数字の組み合わせは、本願の段階的分化プロトコル中の異なるステージにおける培養の特定の日を指す。

10

【0039】

「LDN-193189」は、( (6 - (4 - (2 - (ピペリジン - 1 - イル) エトキシ) フェニル) - 3 - (ピリジン - 4 - イル) ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン、塩酸塩)、Shanghai ChemPartner, Co., LTDから入手可能なBMP受容体阻害剤を指す。

【0040】

多能性幹細胞の特徴付け、供給源、増殖、及び培養

A. 多能性幹細胞の特徴付け

多能性幹細胞は、指定されたTRA-1-60及びTRA-1-81抗体のうちの1つ又は2つ以上を発現し得る(Thomson et al. 1998, Science 282: 1145~1147)。多能性幹細胞の生体外分化は、TRA-1-60及びTRA-1-81発現の喪失をもたらす。未分化の多能性幹細胞は、典型的には、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、製造業者(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, California)によって記載されるように、商標VECTOR(登録商標)Redを付して販売されているアルカリホスファターゼ基質キットで発生させることによって検出され得る、アルカリホスファターゼ活性を有する。未分化の多能性幹細胞はまた、典型的には、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(「RT-PCR」)によって検出されるように、OCT4及びTERTも発現する。

20

30

【0041】

増殖させた多能性幹細胞の別の望ましい表現型は、内胚葉、中胚葉、及び外胚葉の3胚葉層の全ての細胞に分化する能力である。幹細胞の多能性は、例えば、細胞を重症複合免疫不全症(「SCID」)マウスに注入し、形成される奇形腫を4%パラホルムアルデヒドで固定し、次いでこれらの3胚葉由来の細胞型の根拠について組織学的に調べることで確認することができる。代替的に、多能性は、胚様体を形成し、この胚様体を3つの胚葉層に関連したマーカーの存在に対して評価することにより決定することができる。

【0042】

増殖させた多能性幹細胞株は、標準的なGバンド法を使用して核型を決定し、次いで確立された、対応する霊長類種の核型と比較することができる。細胞は「正常な核型」を有する細胞を獲得することが望ましく、「正常な核型」とは、細胞が正倍数体であり、ヒト染色体が全て揃っておりかつ目立った変化のないことを意味する。

40

【0043】

B. 多能性幹細胞の供給源

本発明の方法では、任意の多能性幹細胞が使用され得る。使用が可能な多能性幹細胞の例示の種類としては、妊娠期間中の任意の時期(必ずしもではないが、通常は妊娠約10~12週よりも前)に採取した前胚性組織(胚盤胞など)、胚性組織又は胎児組織を含む、多能性細胞の樹立株が挙げられる。限定されない例は、ヒト胚性幹細胞(「hESC」)又はヒト胚生殖細胞の樹立株であり、ヒト胚性幹細胞株H1(NIHコード:WA01)、H7(NIHコード:WA07)、H9(NIHコード:WA09)(WiCell

50

Research Institute, Madison, WI, USA)、及び SA 002 (Cellartis AB Corporation, Goteburg, Sweden) などである。

#### 【0044】

フィーダー細胞の非存在下で既に培養された多能性幹細胞集団から採取した細胞もまた好適である。OCT4、NANOG、SOX2、KLF4、及びZFP42など多数の多能性に関する転写因子の強制発現を使用して、成体体細胞から誘導される誘導性多能性細胞 (IPS) 又は再プログラム化された多能性細胞 (Annu Rev Genomics Hum Genet 2011, 12: 165~185、また、IPS, Cell, 126(4): 663~676も参照されたい) を使用することもできる。本発明の方法で使用されるヒト胚性幹細胞もまた、Thomsonらによって記載されるように調製され得る (米国特許第5,843,780号、Science, 1998, 282: 1145~1147、Curr Top Dev Biol 1998, 38: 133~165、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1995, 92: 7844~7848)。BG01v (BresaGen, Athens, Georgia.) などの変異体ヒト胚性幹細胞株、又はTakahashi et al., Cell 131: 1~12 (2007) に開示されている細胞などのヒト成体細胞に由来する細胞を使用することもできる。ある特定の実施形態において、本発明での使用に好適な多能性幹細胞は、Liら (Cell Stem Cell 4: 16~19, 2009)、Maheraliら (Cell Stem Cell 1: 55~70, 2007)、Stadtfeldら (Cell Stem Cell 2: 230~240)、Nakagawaraら (Nature Biotechnol 26: 101~106, 2008)、Takahashiら (Cell 131: 861~872, 2007)、及び米国特許出願公開第2011/0104805号に記載の方法に従って誘導することができる。ある特定の実施形態において、本発明での使用に好適な多能性幹細胞は、「ナイーブ」であると見なされ、以下に記載の方法に従って誘導することができる。Gafniら (Nature, 504: 282, 2013)、及びWareら (PNAS, 111: 4484~4489, 2014)。これらの参考文献、特許、及び特許出願の全ては、とりわけそれらが多能性細胞の単離、培養、増殖、及び分化に関するため、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0045】

多能性幹細胞の他の供給源は、誘導された多能性幹細胞を含む (IPS, Cell, 126(4): 663~676)。好適な細胞の更に他の供給源には、ヒト臍帯組織由来細胞、ヒト羊水由来細胞、ヒト胎盤由来細胞、及びヒト単為生殖生物が挙げられる。一実施形態において、臍帯組織由来細胞は、米国特許第7,510,873号に記載の方法によって得ることができる。別の実施形態において、胎盤組織由来細胞は、米国特許出願公開第2005/0058631号に記載の方法を使用して得ることができる。別の実施形態において、羊水由来細胞は、米国特許出願公開第2007/0122903号に記載の方法を使用して得ることができる。これらの特許出願の各々の開示は、それが細胞の単離及び特徴付けに関するため、その全体が本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態において、多能性幹細胞は、非胎生起源であり得る。

#### 【0046】

##### C. 多能性幹細胞の増殖及び培養

多能性幹細胞は、様々な点で多能性幹細胞を支持するフィーダー細胞の層上で一般的に培養される。代替的に、多能性幹細胞は、基本的にフィーダー細胞が存在しないにも関わらず、ほぼ分化を受けないで多能性幹細胞の増殖を支持する培養液システム中で培養され得る。多能性幹細胞を分化させずに無フィーダー培養液中で増殖させる際には、以前に他の細胞種を予め培養しておいて馴化させた培地を使用することでこの操作が支持される場合が多い。代替的に、多能性幹細胞を無フィーダー培養液中で分化させずに増殖させる際は、化学的合成培地を使用することでこの操作が支持され得る。

## 【0047】

多能性細胞は、様々なフィーダー層を用いて、又はマトリックスたんぱく質被覆した容器を用いて、容易に培養で増殖させることができる。代替的に、商標mTESR（登録商標）1を付して販売されている培地（StemCell Technologies, Inc., Vancouver, B.C., Canada）などの合成培地との組み合わせで、化学的合成表面を、細胞の常用増殖のために使用してもよい。多能性細胞は、酵素消化、機械的分離、又はエチレンジアミン四酢酸（「EDTA」）などの様々なカルシウムキレート剤を使用して、培養プレートから容易に取り出すことができる。代替的に、多能性細胞は、マトリックスタンパク質又はフィーダー層の非存在下で、懸濁液中で増殖させてもよい。

10

## 【0048】

多能性幹細胞を増殖及び培養する多くの異なる既知の方法が、特許請求される発明で使用されてもよい。例えば、本発明の方法は、Reubinooffら、Thompsonら、Richardsら、及び米国特許出願公開第2002/0072117号に記載の方法を使用することができる。Reubinooffら（Nature Biotechnology 18:399~404（2000））及びThompsonら（Science 282:1145~1147（1998））は、マウス胚性繊維芽細胞フィーダー細胞層を用いたヒト胚盤胞からの多能性幹細胞株の培養について開示している。Richardsら（Stem Cells 21:546~556, 2003）は、11の異なるヒト成体、胎児、及び新生児フィーダー細胞層の一群を、ヒト多能性幹細胞培養を支持する能力について評価し、「成体皮膚繊維芽細胞フィーダー上で培養されたヒト胚性幹細胞株が、ヒト胚性幹細胞の形態を保持し、多能性を保持する」ことを示した。米国特許出願公開第2002/0072117号は、無フィーダー培養において霊長類の多能性幹細胞の増殖を支持する培地を産生する細胞系を開示している。使用される細胞系は、胚性組織から得られるか又は胚性幹細胞から分化させた間葉系かつ繊維芽細胞様の細胞系である。米国特許出願公開第2002/0072117号はまた、霊長類のフィーダー細胞層としての細胞株の使用についても開示している。

20

## 【0049】

多能性幹細胞を増殖及び培養する他の好適な既知の方法は、例えば、Wangら、Stojkovicら、Miyamotoら、及びAmitらにおいて開示されている。Wangら（Stem Cells 23:1221~1227, 2005）は、ヒト胚性幹細胞由来のフィーダー細胞層上のヒト多能性幹細胞の長期増殖のための方法を開示している。Stojkovicら（Stem Cells 2005 23:306~314, 2005）は、ヒト胚性幹細胞の自然分化から誘導されたフィーダー細胞系を開示している。Miyamotoら（Stem Cells 22:433~440, 2004）は、ヒトの胎盤から得られたフィーダー細胞の供給源を開示している。Amitら（Biol. Reprod 68:2150~2156, 2003）は、ヒトの包皮由来のフィーダー細胞層を開示している。

30

## 【0050】

多能性幹細胞を増殖及び培養する他の好適な方法は、例えば、Inzunzaら、米国特許第6,642,048号、国際公開第2005/014799号、Xuら、及び米国特許出願公開第2007/0010011号に開示されている。Inzunzaら（Stem Cells 23:544~549, 2005）は、ヒトの出生直後産児の包皮繊維芽細胞から得られたフィーダー細胞層を開示している。米国特許第6,642,048号は、無フィーダー細胞培養中での霊長類の多能性幹細胞の増殖を支持する培地、及びこうした培地の産生に有用な細胞株を開示している。米国特許第6,642,048号は、胚性組織から得られるか、又は胚性幹細胞から分化した間葉系かつ繊維芽細胞様の細胞株、並びにこうした細胞株を誘導し、培地を処理し、こうした培地を用いて幹細胞を増殖させるための方法を報告している。国際公開第2005/014799号は、哺乳類細胞の維持、増殖及び分化のための馴化培地を開示している。国際公開第2005/01479

40

50

9号は、この開示を介して産生された培養培地が、マウス細胞、とりわけ、MMH (Me tマウス肝細胞)と呼ばれるそれらの分化及び不死化遺伝子導入幹細胞の細胞分泌活性によって馴化されることを報告している。Xuら (Stem Cells 22:972~980, 2004)は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素を過剰発現するように遺伝子改変されたヒト胚性幹細胞由来細胞から得られた馴化培地を開示している。米国特許出願公開第2007/0010011号は、多能性幹細胞の維持のための化学的合成培地を開示している。

#### 【0051】

既知の代替培養系は、胚性幹細胞の増殖を促進することができる増殖因子が補充された無血清培地を用いる。こうした培養系の例には、Cheonら、Levensteinら、及び米国特許出願公開第2005/0148070号が挙げられるが、これらに限定されない。Cheonら (BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870, October 19, 2005)は、胚性幹細胞の自己再生を誘発することが可能な異なる増殖因子が補充された非馴化血清補充培地中に胚性幹細胞が維持されている、無フィーダー、無血清培養系を開示している。Levensteinら (Stem Cells 24:568~574, 2006)は、線維芽細胞又は馴化培地の非存在下で、bFGFが補充された培地を使用して、ヒト胚幹細胞を長期間培養する方法を開示している。米国特許出願公開第2005/0148070号は、血清及び線維芽細胞フィーダー細胞を含まない合成培地中でのヒト胚幹細胞の培養方法を開示し、同方法は、アルブミン、アミノ酸、ビタミン、無機物、少なくとも1つのトランスフェリン又はトランスフェリン代替物、少なくとも1つのインスリン又はインスリン代替物を含有する培地中で幹細胞を培養することを含み、この培地は、本質的に哺乳類胎児血清を含有せず、線維芽細胞増殖因子シグナル伝達受容体を活性化できる少なくとも約100 ng/mLの線維芽細胞増殖因子を含有し、増殖因子は、線維芽細胞フィーダー層のみでなく他の源からも供給され、培地はフィーダー細胞又は馴化培地なしで、未分化状態の幹細胞の増殖を支持した。

#### 【0052】

多能性幹細胞を培養及び増殖させる更に他の既知の好適な方法は、米国特許出願公開第2005/0233446号、米国特許第6,800,480号、米国特許出願公開第2005/0244962号、及び国際公開第2005/065354号に開示されている。米国特許出願公開第2005/0233446号は、未分化の霊長類始原幹細胞を含む、幹細胞を培養する際に有用な合成培地を開示している。溶液において、培地は、培養されている幹細胞と比較して実質的に等張である。所定の培養において、特定の培地は、基本培地、及び実質的に未分化の始原幹細胞の増殖の支持に必要な、ある量のbFGF、インスリン、及びアスコルビン酸の各々である。米国特許第6,800,480号は、実質的に未分化状態の霊長類由来の始原幹細胞を増殖させるための細胞培地であって、霊長類由来の始原幹細胞の増殖を支持する上で効果的な低浸透圧、低エンドトキシンの基本培地を含む細胞培地が提供されることを報告している。この第6,800,480号特許の開示は更に、基本培地が、霊長類由来の始原幹細胞の増殖を支持する上で効果的な栄養素血清、並びにフィーダー細胞及びフィーダー細胞から誘導される細胞外マトリックス成分から選択される基質と組み合わせられることを報告している。この培地は更に、非必須アミノ酸、抗酸化剤、並びにヌクレオシド及びピルビン酸塩から選択される第1の増殖因子を含むことを述べている。米国特許出願公開第2005/0244962号は、本開示の一態様が、霊長類胚性幹細胞を培養する方法を提供すること、及び培養中の幹細胞が、線維芽細胞フィーダー層以外の源から供給される線維芽細胞増殖因子の存在下、本質的に哺乳類胎児血清を含まない(好ましくは本質的にいかなる動物血清も含まない)ことを報告している。

#### 【0053】

国際公開第2005/065354号は、本質的に無フィーダーかつ無血清であり、実質的に未分化の哺乳類幹細胞の増殖を支持するのに十分な量の基本培地、bFGF、イン

10

20

30

40

50

スリン、及びアスコルビン酸である、合成、等張培養培地を開示している。更に、国際公開第2005/086845号は、幹細胞を、細胞を未分化な状態に維持するのに十分な量の、形質転換増殖因子（「TGF-」）ファミリータンパク質のメンバー、線維芽細胞増殖因子（「FGF」）ファミリータンパク質のメンバー、又はニコチンアミドに、所望の結果を得るのに十分な時間にわたって曝露することを含む、未分化幹細胞を維持するための方法を開示している。

【0054】

多能性幹細胞は、好適な培養基質上で平板培養することができる。一実施形態において、好適な培養基質は、基底膜から誘導されたもの、又は接着分子受容体-リガンド結合の一部を形成し得るものなどの細胞外マトリックス成分である。好適な培養基質は、商標MATRIGEL（商標）（Corning Incorporated, Corning, New York）を付して販売されている再構成された基底膜である。MATRIGEL（商標）は、Engelbreth-Holm Swarm腫瘍細胞由来の可溶性製剤であり、室温でゲル化して再構成基底膜を形成する。

10

【0055】

当該技術分野において既知の他の細胞外マトリックス成分及び成分混合物は、代替物として好適である。増殖させる細胞型に応じて、これは、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、エンタクチン、ヘパリン硫酸塩などを、単独で又は様々な組み合わせで含み得る。

20

【0056】

多能性幹細胞は、好適な分布で、細胞の生存、増殖、及び所望の特徴の維持を促進する培地の存在下、基質上に平板培養されてもよい。これらの特徴の全ては、播種分布に細心の注意を払うことで利益を得られるものであり、当業者は容易に決定することができる。好適な培養培地は、以下の成分、Life Technologies Corporation, Grand Island New Yorkにより商標GIBCO（登録商標）（カタログ番号11965-092）を付して販売されているダルベッコ改変イーグル培地（「DMEM」）、Life Technologies Corporationにより商標GIBCO（登録商標）（カタログ番号10829-018）を付して販売されているノックアウトダルベッコ改変イーグル培地（「KO DMEM」）、ハムF12/50% DMEM基本培地、Life Technologiesにより商標GIBCO（登録商標）（カタログ番号25030-081）を付して販売されている200mM L-グルタミン、Life Technologiesにより商標GIBCO（登録商標）（カタログ番号11140-050）を付して販売されている非必須アミノ酸溶液、β-メルカプトエタノール、Sigma-Aldrich Company, LLC Saint Louis, MO（カタログ番号M7522）、Life Technologiesにより商標GIBCO（登録商標）（カタログ番号13256-029）を付して販売されているヒト組換え塩基性線維芽細胞増殖因子（「bFGF」）から作製され得る。

30

【0057】

ヒト胚性幹細胞の大規模増殖及び制御された分化はまた、懸濁バイオリアクターを使用して達成され得る。こうした系は、制御された培養系内で、優れた効能を有する、臨床に関連する細胞数を生成することができ得る。例えば、Journal of Biotechnology, May 2014, Vol. 178: 54~64、Stem Cell Reports, Apr 2014, Vol. 3, No. 6: 1132、及びTissue Engineering Part C: Methods, Feb 2013, Vol. 19, No. 2: 166~180に開示されるように、多能性マウス及びhES細胞の増殖を可能にする、確立されたバイオリアクター培養システムを使用することが知られている。

40

【0058】

多能性幹細胞の分化

50

多能性細胞が細胞に向かって分化するとき、それらは、様々なステージを通じて分化し、各々が特定のマーカーの存在又は非存在で特徴付けられ得る。これらのステージへの細胞の分化は、培養培地に添加されるある特定の因子の存在及び欠失を含む、特異的培養条件によって達成される。一般に、この分化は、多能性幹細胞の、胚体内胚葉系統及び胚体内胚葉細胞への分化を必要とし得る。次いでこれらの細胞は、腸管細胞へと更に分化され得、次いで順次前腸内胚葉細胞へと分化され得る。前腸内胚葉細胞は、膵前腸前駆細胞へと分化され得、次いで膵内胚葉細胞、膵内分泌前駆細胞、又は両方へと更に分化され得る。これらの細胞は、細胞を産生又は分泌する膵臓ホルモンへと分化され得る。この出願は、好ましくは培地で部分的に充填された培養容器内に存在する空気-液体界面で細胞を培養することによって、特にステージ5~7のうちの1つ又は2つ以上において空気-液体界面で細胞を培養することによって、多能性幹細胞の膵内分泌細胞への段階的分化を提供する。

10

**【0059】**

甲状腺ホルモントリヨードチロニン(「T3」)及びチロキシン(「T4」)、並びにそれらの類似体のうちの1つ又は2つ以上が、単独で又はALK5阻害剤との更なる組み合わせで、分化のステージ1~7のうちの1つ又は2つ以上で、好ましくはステージ5~7の各々で培養する細胞内で使用され得る。代替的に、ALK5阻害剤は、分化の1つ又は2つ以上のステージにおいて、しかし好ましくはステージ5~7の各々で、単独で使用され得る。より好ましくは、甲状腺ホルモン又はそれらの類似体及びALK5阻害剤のうちの1つ又は2つ以上は、1つ又は2つ以上の分化ステージにおいて、及び好ましくはステージ5~7の各々で使用される。好適な甲状腺ホルモン類似体には、制限なしに、GC-1(Sobertirone)(R&D Systems, Inc. Minneapolis, Minnesotaから入手可能)、3,5-ジヨードチロプロピオン酸(「DIPTA」)、J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2008, 111:262~267及びProc. Natl. Acad. Sci. US 2003, 100:10067~10072に論じられているKB-141、Proc. Natl. Acad. Sci. US 2007, 104:15490~15495に論じられているMB07344、J. Lipid Res., May 2009, 50:938及びEndocr. Pract. 2012, 18(6):954~964(これらの開示は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる)に論じられているT0681が挙げられ得る。有用なALK5阻害剤としては、好ましいALK5阻害剤でもある、ALK5阻害剤II(Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, New York)、ALK5i(Axxora, Inc., San Diego, California)、SD208(R&D Systems)、TGF-阻害剤SB431542(Xcess Biosciences, Inc., San Diego, California)、ITD-1(Xcess Biosciences)、LY2109761(Xcess Biosciences)、A83-01(Xcess Biosciences)、LY2157299(Xcess Biosciences)、TGF-受容体阻害剤V(EMD Millipore Chemical, Gibbstown, New Jersey)、TGF-受容体阻害剤I(EMD Millipore)、TGF-受容体阻害剤IV(EMD Millipore)、TGF-受容体阻害剤VII(EMD Millipore)、TGF-受容体阻害剤VIIII(EMD Millipore)、TGF-受容体阻害剤II(EMD Millipore)、TGF-受容体阻害剤VI(EMD Millipore)、及びTGF-受容体阻害剤VI(EMD Millipore)が挙げられる。

20

30

40

**【0060】**

加えて、本発明の好ましい実施形態において、これらの方法は、ビタミンE、アセチルシステイン、ビタミンC、抗酸化剤補助剤(カタログ番号A1345、Sigma-Aldrich Company, LLC Saint Louis, Missouri)、グルタチオン、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼなどの抗酸化剤、及びそれら

50

の組み合わせの一方又は両方を含む分化培地を用いて、1つ又は2つ以上のステージで細胞を処理すること、しかし好ましくは細胞をステージ7中に処理することを含む。更により好ましい実施形態において、ステージ6を実行する際に、分泌酵素阻害剤が使用され、これは分泌酵素阻害剤XX(EMD Millipore)、分泌酵素阻害剤XXI(EMD Millipore)、分泌酵素阻害剤XVI(EMD Millipore)、N-[ (3,5-ジフルオロフェニル)アセチル]-L-アラニル-2-フェニル]グリシン-1,1-ジメチルエチルエステル(「DAPT」)(カタログNi.2634, Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom)など、及びそれらの組み合わせであり得る。分泌酵素阻害剤の有用な量は、約50nM~5000nM、好ましくは約50nM~500nMであり得る。抗酸化剤の量は、約0.1~100μM、代替的には約0.1~20μM、及び好ましくは約1~10μMであり得る。代替的に、抗酸化剤の有用な量は、約100nM~5mM、約1000nM~2mM、及び好ましくは約0.1~1mMであり得る。

10

20

30

40

50

#### 【0061】

本発明の最も好ましい実施形態において、特定の小分子は、1つ又は2つ以上の分化のステージにおいて、好ましくはステージ6及び7の一方又は両方で使用される。関心対象の小分子は、オーロキナーゼ、p90リボソームS6キナーゼ、又はメチルトランスフェラーゼDOT1Lを阻害することが可能なものであり、好ましくは、培養された細胞の酸化ストレスを低減する抗酸化剤と共に使用される。こうした有用な阻害剤には、オーロキナーゼ阻害剤II(4-(4'-ベンズアミドアニリノ)-6,7-ジメトキシキノゾリン)、SNS314メシラート(N-(3-クロロフェニル)-N'-[5-[2-(チエノ[3,2-d]ピリミジン-4-イルアミノ)エチル]-2-チアゾリル]ウレアメタンスルホン酸塩)、GSK1070916(3-(4-(4-(2-(3-(ジメチルアミノ)メチル)フェニル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-4-イル)-1-エチル-1H-ピラゾール-3-イル)フェニル)-1,1-ジメチルウレア)、TAK-901(5-(3-(エチルスルホニル)フェニル)-3,8-ジメチル-N-(1-メチルピペリジン-4-イル)-9H-ピリド[2,3-b]インドール-7-カルボキシアミド)、RSK阻害剤II(ジヒドロプテリジノン2-(3,5-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-アニリノ)-8-イソペンチル-5,7-ジメチル-7H-プテリジン-6-オン)、及びEPZ-5676(9H-プリン-6-アミン,9-[5-デオキシ-5-[シス-3-[2-[6-(1,1-ジメチルエチル)-1H-ベンズイミダゾール-2-イル]エチル]シクロブチル](1-メチルエチル)アミノ]-D-リボフラノシル]-のラセミ混合物)、並びにそれらの組み合わせが挙げられる。オーロキナーゼ阻害剤II、及びRSK阻害剤II、及びDOT1L、とりわけEPZ-5676が特に関心対象である。本発明の好ましい実施形態において、小分子は、ステージ6及び7のうちの1つ又は2つ以上の培地中で、より好ましくはステージ7で使用される。有用な小分子の量は、成熟マーカーの最良の発現を示す量、及びどの量が毒性作用をもたらさないかを選択することによって決定され得る。典型的に、有用な量は、約500nM~10μM、代替的には約500nM~5μM、及び好ましくは約500nM~2μMとなる。

#### 【0062】

多能性細胞の、成熟した表現型を有する膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化

多能性幹細胞の特性は当業者には周知であり、多能性幹細胞の更なる特性が引き続き同定されている。多能性幹細胞のマーカーとして、例えば、以下のもの、すなわち、ABC G2、cripto、FOX D3、CONNEXIN43、CONNEXIN45、OC T4、SOX2、NANOG、hTERT、UTF1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81のうちの1つ又は2つ以上の発現が挙げられる。これらは、RT-PCRによって検出可能であり得る。

#### 【0063】



例示的な多能性幹細胞として、ヒト胚性幹細胞株 H9 (NIHコード: WA09)、ヒト胚性幹細胞株 H1 (NIHコード: WA01)、ヒト胚性幹細胞株 H7 (NIHコード: WA07)、及びヒト胚性幹細胞株 SA002 が挙げられる。また、多能性細胞に特徴的な以下のマーカー、すなわち、ABC G2、cripto、CD9、FOX D3、CONNEXIN43、CONNEXIN45、OCT4、SOX2、NANOG、hTERT、UTF1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、及びTRA-1-81のうち少なくとも1つを発現する細胞も好適である。

#### 【0064】

胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーの少なくとも1つを発現している細胞は本発明での使用に好適である。本発明の一態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、原始線条前駆体細胞である。別の態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、中内胚葉細胞である。別の態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、胚体内胚葉細胞である。

10

#### 【0065】

膵内胚葉系統に特徴的なこれらのマーカーのうち少なくとも1つを発現する細胞もまた、本発明における使用に適している。本発明の一態様では、膵内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、膵内胚葉細胞であり、PDX1及びNKX6.1の発現は、CDX2及びSOX2の発現より実質的に高い。ある特定の実施形態において、FACSにより測定して、細胞の30%超が、PDX1及びNKX6.1を発現し、細胞の30%未満が、CDX2又はSOX2を発現する。PDX1及びNKX6.1の発現が、CDX2又はSOX2の発現より少なくとも2倍高い細胞が特に有用である。

20

#### 【0066】

膵内分泌系統に特徴的なこれらのマーカーのうち少なくとも1つを発現する細胞もまた、本発明における使用に更に適している。本発明の一態様において、膵内分泌系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、膵内分泌細胞である。膵内分泌細胞は、膵臓ホルモン発現細胞であり得、以下のホルモン、すなわち、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、又は膵臓ポリペプチドのうち少なくとも1つを発現することが可能な細胞を意味する。好ましい実施形態において、膵内分泌細胞は、インスリン産生細胞である。

30

#### 【0067】

本発明のある特定の実施形態において、成熟した表現型の膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞に到達するために、多能性幹細胞で開始するプロトコルが用いられる。このプロトコルは、以下を含む。

ステージ1：細胞培養株から得られる胚性幹細胞などの多能性幹細胞が、胚体内胚葉細胞の形成を誘導するように適切な因子で処理される。

ステージ2：ステージ1から生じる細胞が、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への形成を誘導するように適切な因子で処理される。

ステージ3：ステージ2細胞から生じる細胞が、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への更なる分化を誘導するように適切な因子で処理される。

ステージ4：ステージ3から生じる細胞が、膵前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への更なる分化を誘導するように適切な因子で処理される。これらの細胞は、後期ステージ4において、空気-液体界面で任意選択で培養される。

40

ステージ5：ステージ4から生じる細胞が、ある特定の実施形態において、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体うちの1つ又は2つ以上、(ii) ALK5阻害剤、又は(iii) (i)及び(ii)の両方を含む適切な因子で処理され、任意選択で好ましくは空気-液体界面で培養されて、膵内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化を誘導する。

ステージ6：ステージ5細胞から生じる細胞が、ある特定の実施形態において、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体うちの1つ又は2つ以上、(ii) ALK5阻害剤、(iii) オーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランス

50

フェラーゼDOT1Lの阻害剤のうちの1つ又は2つ以上、(iv)(i)及び(ii)の両方、(v)(i)、(ii)、及び(iii)、(vi)(i)及び(iii)、又は(vii)(ii)及び(iii)を含む適切な因子で処理され、任意選択で好ましくは空気-液体界面で培養されて、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化を誘導する。

ステージ7：ステージ6細胞から生じる細胞が、ある特定の実施形態において、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体のうちの1つ又は2つ以上、(ii) ALK5阻害剤、(iii)抗酸化剤、(iv)オーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうちの1つ又は2つ以上、(v)(i)及び(ii)、(vi)(i)及び(iii)、(vii)(i)及び(iv)、(viii)(ii)及び(iii)、(ix)(ii)及び(iv)、(x)(i)、(xi)、及び(iii)、(xi)(i)、(iii)、及び(iv)、(xii)(ii)、(iii)、及び(iv)、(xiii)(i)、(ii)及び(iv)、(xiv)(iii)及び(iv)、又は(xv)(i)、(ii)、(iii)及び(iv)を含む適切な因子で処理され、任意選択で好ましくは空気-液体界面で培養されて、単一ホルモンインスリンを発現し、PDX1、NKX6.1、及びMAFA陽性であり、ステージ6細胞より高いレベルのMAFAの発現を有する膵内分泌細胞の形成を誘導し、結果として生じる細胞集団は、ステージ6細胞より高い割合のMAFA陽性かつ単一ホルモンインスリンを発現する細胞を有する。

#### 【0068】

ある特定の実施形態において、本発明は、多能性幹細胞(例えば、前ステージ1細胞)をステージ7細胞に分化させることを包含するが、本発明はまた、他のステージの細胞をステージ7に向かって分化させることも包含する。とりわけ、本発明は、ステージ4細胞のステージ7細胞への分化を包含する。更に、プロセスは別個のステージで記載されているが、分化プロセスを通じた細胞の処理並びに進行は、連続的又は継続的であり得る。更に、多能性幹細胞の、ステージ6又はステージ7細胞への分化は、懸濁培養において行うことができる。

#### 【0069】

分化効率は、被処理細胞集団を、関心対象の分化細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する剤、例えば抗体に曝露することにより決定することができる。培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカーの発現を評価する方法は、当技術分野にて標準的である。これらの方法としては、RT-PCR、ノーザンプロット、インシチュハイブリダイゼーション(例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 2001 supplement)を参照されたい)、及びイムノアッセイ、例えば、材料切片の免疫組織化学的分析、ウェスタンプロット、並びに無傷細胞内でアクセス可能なマーカーの場合、フローサイトメトリー分析(FACS)(例えば、Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)を参照されたい)が挙げられる。

#### 【0070】

分化細胞は、更に精製されてもよい。例えば、多能性幹細胞を本発明の方法で処理した後、被処理細胞集団を、精製される分化細胞により特徴的に発現されるタンパク質マーカーを特異的に認識する剤(抗体など)に曝露することにより、分化細胞を精製することができる。

#### 【0071】

細胞分化に望ましい十分な量のビタミン、無機物、塩、グルコース、アミノ酸、及び担体タンパク質を含有する任意の好適な増殖培地は、様々なステージ1~7に使用され得る。しかしながら、好ましくは、以下が使用される。ステージ1-MCDB-131(Life Technologies Corporation, Grand Island

10

20

30

40

50

d, NYから入手可能)又はRPMI (Sigma - Aldrichから入手可能)、ステージ2 - MCDB - 131又はダルベッコ改変イーグル培地F12 (「DMEM - F12」)、ステージ3~5 - MCDB - 131、BLAR (表1)、又はDMEM、及びステージ6及び7 - BLAR又はCMRL (Life Technologies)。好ましくは、培地のグルコース濃度は、ステージ1~4については約10mMで、又はより好ましくはそれより低く保持され、ステージ5~7については約10mMより高く保持される。

ステージ1:多能性細胞の、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

#### 【0072】

多能性幹細胞は、当技術分野において既知の任意の方法により、又は本発明で提案される任意の方法により、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化され得る。多能性幹細胞を、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させるために有用であると報告されている方法は、D'Amour et al., Nature Biotechnology 23, 1534~1541 (2005)、Shinozaki et al., Development 131, 1651~1662 (2004)、McLean et al., Stem Cells 25, 29~38 (2007)、D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392~1401 (2006)に開示されている。追加の好適な分化方法は、米国特許出願公開第2007/0254359号、同第2009/0170198号、同第2011/0091971号、同第2010/0015711号、同第2012/0190111号、同第2012/0190112号、同第2012/0196365号に開示されている。これらの開示は、それらが多能性幹細胞の胚体内胚葉細胞への分化に関するため、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0073】

一実施形態において、多能性細胞は、好適な増殖培地、好ましくはMCDB - 131又はRPMIで処理される。培地は、好ましくは増殖分化因子、例えば増殖分化因子8 (「GDF8」)、及びグリコゲンシンターゼキナーゼ - 3 (「GSK3」)阻害剤、例えば米国特許出願公開第2010/0015711 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に開示される環式アニリン - プリジントリアジン化合物が補充され、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化を誘導する。好ましいGSK3阻害剤は、14 - プロパ - 2 - エン - 1 - イル - 3, 5, 7, 14, 17, 23, 27 - ヘプタアザテトラシクロ [19.3.1.1~2, 6~.1~8, 12~]ヘプタコサ - 1 (25), 2 (27), 3, 5, 8 (26), 9, 11, 21, 23 - ノナエン - 16 - オン (「MCX化合物」)である。処理は、多能性幹細胞を、約50ng/mL~約150ng/mL、代替的に約75ng/mL~約125ng/mL、好ましくは約100ng/mLのGDF8が補充された培地と接触させることを必要とし得る。この処理はまた、細胞を、約0.1~約5μM、代替的に約0.5~約2.5μM、好ましくは約1μMのMCX化合物と接触させることも必要とし得る。多能性細胞は、約2~5日間、好ましくは約2~3日間にわたって培養され、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化を促進することができる。

#### 【0074】

好ましい実施形態において、細胞は、GDF8及びMCX化合物の存在下で1日培養され、続いてGDF8及びより低い濃度のMCX化合物の存在下で1日培養され、続いてGDF8の存在下、MCX化合物の非存在下で1日培養される。とりわけ、細胞は、GDF8及び約1μM MCX化合物の存在下で1日培養され、続いてGDF8及び約0.1μM MCX化合物の存在下で1日培養され、続いてGDF8の存在下、MCX化合物の非存在下で1日培養される。代替的に、細胞は、GDF8及び約1μM MCX化合物の存在下で1日培養され、続いてGDF8及び約0.1μM MCX化合物の存在下で1日培養される。

10

20

30

40

50

## 【0075】

代替的に、多能性幹細胞は、血清の非存在下、アクチビンAを含有する培地中で培養され得、次いで細胞をアクチビンA及び血清と培養した後、D'Amour et al., Nature Biotechnology 23, 1534~1541 (2005)に開示されるように、細胞を異なる濃度のアクチビンA及び血清と培養する。更に別の代替として、多能性幹細胞は、アクチビンAを含む培地中、血清の非存在下で多能性幹細胞を培養し、次いでD'Amour et al., Nature Biotechnology, 2005に開示されるように、細胞をアクチビンAと培養することによって胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。なおも更に、多能性幹細胞は、アクチビンA及びWNTリガンドを含む培地中、血清の非存在下で多能性幹細胞を培養し、次いでWNTリガンドを除去し、D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392~1401 (2006)に開示されるように、細胞をアクチビンAと培養することによって胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。

10

## 【0076】

本発明の一実施形態において、多能性幹細胞は、アクチビンA及びWNT3Aで処理され、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成をもたらす。処理は、多能性幹細胞を、約50 ng/mL~約150 ng/mL、代替的に約75 ng/mL~約125 ng/mL、代替的に約100 ng/mLのアクチビンAと接触させることを必要とし得る。この処理はまた、細胞を、約10 ng/mL~約50 ng/mL、代替的に約15 ng/mL~約30 ng/mL、代替的に約20 ng/mLのWNT3Aと接触させることを必要とし得る。多能性細胞は、約3日間培養され、胚体内胚葉細胞に到達し得る。一実施形態において、細胞は、アクチビンA及びWNT3Aの存在下で1日培養され、続いてアクチビンAの存在下で(WNT3Aは存在しない)残りを培養する。

20

## 【0077】

胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成は、以下の特定のプロトコルの前後に、マーカーの存在に関して試験することにより決定することができる。多能性幹細胞は、一般にかかるマーカーを発現しない。したがって、多能性細胞の分化は、細胞が胚体内胚葉に特徴的なマーカーを発現し始めた際に検出され得る。

ステージ2：胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

30

## 【0078】

胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞は、MCD B-131又はDMEM F12などの増殖培地中で、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと更に分化され得る。一実施形態において、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成は、胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を、線維芽細胞増殖因子(「FGF」)を含有する培地、好ましくはFGF7又はFGF10と培養して、細胞を分化させることを含む。例えば、細胞培養物は、約10 ng/mL~約75 ng/mL、代替的に約25 ng/mL~約75 ng/mL、更に代替的に約30 ng/mL~約60 ng/mL、代替的に約50 ng/mLの線維芽細胞増殖因子、好ましくはFGF7又はFGF10、より好ましくはFGF7、及び最も好ましくは約25 ng/mLのFGF7を含み得る。細胞は、これらの条件下で約2~3日間、好ましくは約2日間培養され得る。

40

## 【0079】

別の実施形態において、腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成は、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞を、線維芽細胞増殖因子、好ましくはFGF7又はFGF10、及びアスコルビン酸(ビタミンC)と培養することを含む。培養培地は、約0.1 mM~約0.5 mMのアスコルビン酸、代替的に約0.2 mM~約0.4 mMのアスコルビン酸、代替的に約0.25 mMのアスコルビン酸を含み得る。細胞培養物はまた、約10 ng/mL~約35 ng/mL、代替的に約15 ng/mL~約30 ng/mL、代替的に約25 ng/mLの線維芽細胞増殖因子、好ましくはFGF7又はFG

50

F 1 0、より好ましくはF G F 7を含み得る。例えば、細胞培養物は、約0.25 mMのアスコルビン酸及び約25 ng/mLのF G F 7を含み得る。一実施形態において、ステージ1細胞は、F G F 7及びアスコルビン酸で2日間処理される。

ステージ3：腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化

#### 【0080】

ステージ2を実行することから生じる腸管細胞は、これらの細胞を、M C D B - 1 3 1、D M E Mなどの増殖培地、又はB L A Rなどのカスタム培地（表I）中で培養することによってステージ3細胞、つまり前腸内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞へと更に分化し得る。培地は、(i)線維芽細胞増殖因子、好ましくはF G F 7又はF G F 1 0、及びより好ましくはF G F 7、(i i)レチノイン酸（「R A」）、(i i i)1-ピペラジンアミン、N-[(3,5-ジメチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)メチレン]-4-(フェニルメチル)-又は((E)-4-ベンキシル-N-((3,5-ジメチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル),エチレン-ピペラジン-1-アミン)である、ソニックヘッジホッグ（「S H H」）シグナル伝達経路アンタゴニスト（例えばスムーズド（Smoothened）アンタゴニスト（「S A N T - 1」）、2-メトキシエチル1,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-4-(3ヒドロキシフェニル)-7-(2-メトキシフェニル)-2-メチル-5-オキソ-3-キノリンカルボキシレートである、H P I - 1、及び好ましくはS A N T - 1、(i v)タンパク質キナーゼC（「P K C」）活性因子、例えば((2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)-2,4-ペンタジエンオイルアミノ)ベンゾラクタム)（「T P B」）、ホルボール-12,13-ジブチレート（「P D B u」）、ホルボール-12-ミリステート-13-酢酸塩（「P M A」）又はインドラクタムV（「I L V」）及び好ましくはT P B、(v)骨形成タンパク質（「B M P」）阻害剤、例えばL D N - 1 9 3 1 8 9、N o g g i n、又はC h o r d i n、及び好ましくはL D N - 1 9 3 1 8 9、並びに(v i)アスコルビン酸が補充され得る。代替的に、スムーズド（「S M O」）受容体阻害剤（例えば、M R T 1 0（N[[[3-ベンゾイルアミノ)フェニル]アミノ]チオキシメチル]-3,4,5-トリメトキシベンズアミド)又はシクロパミンが使用されてもよい。例えば、細胞培養物は、約100 nM~約500 nM、代替的に約100 nM~約400 nM、代替的に約200 nMのP K C活性因子を含み得る。細胞は、これらの増殖因子、小分子アゴニスト、及びアンタゴニストの存在下で約2~4日間、好ましくは約2~3日間、より好ましくは約2日間培養され得る。

#### 【0081】

代替的に、ステージ2細胞は、S M O受容体阻害剤、S A N T - 1、レチノイン酸、及びN o g g i nが補充された培養培地中でこれらの細胞を培養することによってステージ3細胞へと分化され得る。細胞は、約2~4日間、好ましくは約2日間培養され得る。

#### 【0082】

一実施形態において、培地は、約10 ng/mL~約35 ng/mL、代替的に約15 ng/mL~約30 ng/mL、代替的に約25 ng/mLの線維芽細胞増殖因子、好ましくはF G F 7又はF G F 1 0、より好ましくはF G F 7、約0.1 mM~約0.5 mMのアスコルビン酸、代替的に約0.2 mM~約0.4 mM、代替的に約0.25 mMのアスコルビン酸、約0.1 μM~約0.4 μMのS A N T - 1、約100~約300 nMのT P B、及び約50 nM~約200 nM、及び約100 nMのL D N - 1 9 3 1 8 9が補充される。別の実施形態において、培地は、約25 ng/mLのF G F - 7、約1 μMのレチノイン酸、約0.25 μMのS A N T - 1、約200 nMのT P B、約100 nMのL D N - 1 9 3 1 8 9、及び約0.25 mMのアスコルビン酸が補充される。

#### 【0083】

一実施形態において、培地は、約0.1 μM~約0.3 μMのS A N T - 1、約0.5 μM~約3 μMのレチノイン酸、及び約75 ng/mL~約125 ng/mLのN o g g i nが補充される。

10

20

30

40

50

ステージ４～ステージ７：オーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOLT1Lの阻害剤のうちの１つ又は２つ以上と共に甲状腺ホルモン及びALK阻害剤の一方又は両方が補充された培養培地での処理による、好ましくは空気-液体界面で培養することによる、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、成熟した表現型膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

【0084】

一実施形態において、本発明は、膵内分泌細胞への多能性細胞の経路における全てのステージについて、空気-液体界面で培養することを企図しているが、本発明は、好ましくは平板又は浸漬培養におけるステージ１～ステージ４細胞、並びに空気-液体界面で細胞を培養することによるステージ５、６、及び７細胞の形成を提供する。他の実施形態において、本発明は、ステージ４、５、及び６細胞を空気-液体界面で培養することを含む、多能性細胞の分化の段階的方法に関する。ある特定の実施形態において、ステージ４～７中に培養される細胞は、空気-液体界面で培養され得る。他の実施形態において、後期ステージ４～ステージ６細胞、又はステージ５及びステージ６細胞のみが空気-液体界面で培養される。更に別の代替実施形態において、ステージ１～４は、細胞を浸漬された平板培養において細胞を培養することによって行われ、ステージ５～７は、浸漬された懸濁培養において培養することによって行われる。

10

【0085】

追加として、ステージ５、６、及び７のうちの１つ又は２つ以上、好ましくは全ての間の培養は、T3、T4、及びそれらの類似体、ALK5阻害剤のうちの１つ若しくは２つ以上、又はT3、T4、及びそれらの類似体のうちの１つ若しくは２つ以上及びALK5阻害剤の両方の存在下で行われる。好ましい実施形態において、ステージ５、６、及び７のうちの１つ又は２つ以上、及び好ましくはそれらの全ての間の培養は、好ましくはT3及びALK5阻害剤の存在下、及びより好ましくはT3及びALK5阻害剤IIの存在下で行われる。甲状腺ホルモン又はそれらの類似体の好適な量は、約０～約１０００nM、代替的に約１０～約９００nM、代替的に約１００～約８００nM、代替的に約２００～約７００nM、代替的に約３００～約６００nM、代替的に約４００～約５００nM、代替的に約１～約５００nM、代替的に約１～約１００nM、代替的に約１００～約１００nM、代替的に約５００～約１０００nM、代替的に約１００～約５００nM、代替的に約１μM、及び好ましくは約０.１～１μMである。ALK5阻害剤の量は、約２５０nM～２μM、代替的に約３００～約２０００nM、代替的に約４００～約２０００nM、代替的に約５００～約２０００nM、代替的に約６００～約２０００nM、代替的に約７００～約２０００nM、代替的に約８００～約２０００nM、代替的に約１０００～約２０００nM、代替的に約１５００～約２０００nM、代替的に約２５０～約１０００nM、代替的に約２５０～約５００nM、代替的に約３００～約１０００nM、代替的に約４００～約１０００nM、代替的に約５００～約１０００nM、代替的に約６００～約１０００nM、代替的に約７００～約１０００nM、代替的に約８００～約１０００nM、代替的に約５００nM、代替的に約１０μM、及び好ましくは約１０μMである。

20

30

【0086】

細胞が空気-液体界面（「ALI」）で培養されるとき、細胞は、多孔性基質上で培養され得、それにより、細胞は上側で空気と接触し、底側で細胞培養培地と接触する。例えば、十分な体積の培地が、多孔性基質（例えば、フィルター挿入物）を収容する培養容器の底部に添加され得、それにより、培地は基質上に存在する細胞の底面と接触するが、それらを被包又は浸漬しない。好適な多孔性基質は、細胞の増殖及び分化に悪影響を及ぼさない任意の材料で形成され得る。例示的な多孔性基質は、ポリエチレンテレフタレート（「PET」）、ポリエステル、又はポリカーボネートなどのポリマーで作製される。好適な多孔性基質は、コーティングされても、コーティングされなくてもよい。一実施形態において、コーティングは、MATRIGEL（商標）であり得る。本発明の一実施形態において、多孔性基質は、MATRIGEL（商標）でコーティングされ得る多孔性フィルター挿入物である。本発明の一実施形態において、多孔性基質は、無コーティングフィル

40

50

ター挿入物である。基質の多孔性は、細胞生存性を維持し、細胞の分化を促進するのに十分であるべきである。好適な基質は、約0.3～約3.0 $\mu\text{m}$ 、約0.3～約2.0 $\mu\text{m}$ 、約0.3～約1.0 $\mu\text{m}$ 、約0.3～約0.8 $\mu\text{m}$ 、約0.3～約0.6 $\mu\text{m}$ 、約0.3～約0.5 $\mu\text{m}$ 、約0.3～約3.0 $\mu\text{m}$ 、約0.6～約3.0 $\mu\text{m}$ 、約0.8～約3.0 $\mu\text{m}$ 、約1.0～約3.0 $\mu\text{m}$ 、約2.0～約3.0 $\mu\text{m}$ 、好ましくは約0.4 $\mu\text{m}$ の孔径、及び約5000万～約1億2000万孔/ $\text{cm}^2$ 、約6000万～約1億1000万孔/ $\text{cm}^2$ 、約7000万～約1億孔/ $\text{cm}^2$ 、好ましくは約8000万～約1億孔/ $\text{cm}^2$ 、約9000万～約1億孔/ $\text{cm}^2$ 、及びより好ましくは約1億孔/ $\text{cm}^2$ の孔密度を有するフィルター挿入物を含む。

#### 【0087】

培地は、1日おき又は好ましくは毎日、交換又はリフレッシュされ得る。多孔性基質の上部で増殖される細胞は、一般に単一細胞ではないが、むしろそれらは、シートの形態であるか、又は集合細胞集団として存在する。ALIで培養される細胞は、培地中に浸漬された細胞と比較して、より高い酸素分圧を経験し得る。

#### 【0088】

本発明は、空気-液体界面でのステージ4～7、好ましくはステージ5～7細胞の形成を包含する。細胞は、多能性幹細胞を分化させることによって、又はステージ3、4、5、又は6細胞を分化させることによって形成され得る。ステージ4細胞は、空気-液体界面で全体的に培養され得るか、又は細胞は、ステージ4の早期部分(約1～2日を意味する)の間に、浸漬された平板培養において培養され得、次いでステージ4の後期部分(約2日目～3日目を意味する)については空気-液体界面で培養され得る。好ましくは、ステージ4は、ALIで行われ得ないが、浸漬培養において行われる。

#### 【0089】

一実施形態において、本発明は、多能性幹細胞から膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を産生するための方法を提供し、多能性幹細胞を培養することと、多能性幹細胞を、前腸内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることと、前腸内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞を、任意選択で空気-液体界面で培養することによって、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることとを含む。この方法は、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(ii) ALK5阻害剤、あるいは(i)及び(ii)の両方が補充された培地での処理を含み得る。この方法は、前腸内胚葉細胞(ステージ3細胞)に特徴的なマーカーを発現する細胞を、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(ii) ALK5阻害剤、又は(i)及び(ii)の両方が補充された培地での処理、並びに平板培養における培養によって膵前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞(ステージ4細胞)へと分化させることを含み得る。この方法はまた、膵前腸前駆細胞(ステージ4細胞)に特徴的なマーカーを発現する細胞を、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(ii) ALK5阻害剤、又は(i)及び(ii)の両方が補充された培地での処理、並びに平板培養における培養、好ましくは空気-液体界面での培養によって膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞(ステージ6細胞)へと分化させることを含み得る。この方法は、ステージ6細胞を、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(ii) ALK5阻害剤、又は(i)及び(ii)の両方が、オーロキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうちの1つ若しくは2つ以上、並びに任意選択だが好ましくはビタミンE、又は好ましくはアセチルシステインなどの抗酸化剤と共に補充された培地での処理によって、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現し、ステージ6と比較して、より成熟した表現型を有する細胞(ステージ7細胞)へと分化させることを更に含む。有用なアセチルシステインの量は、約0.1～約2mMである。ビタミンEの量は、約0.1～約10 $\mu\text{M}$ である。更に別の実施形態において、この方法は、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(ii) ALK5阻害剤、又は(i)及び(ii)の両方が、オーロキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のう

10

20

30

40

50

ちの1つ若しくは2つ以上と共に補充された培地でのステージ5細胞の処理によってステージ6を行うことを更に含む。更に別の実施形態において、ステージ6は、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(ii) ALK5阻害剤、又は(i)及び(ii)の両方が、オーロキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうち1つ若しくは2つ以上と共に補充された培地において、ステージ5細胞の処理によって行われ、続いてステージ7が、(i) T3、T4、若しくはそれらの類似体の一方又は両方、(ii) ALK5阻害剤、又は(i)及び(ii)の両方が、オーロキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうち1つ若しくは2つ以上、並びに任意選択だが好ましくはビタミンE、又は好ましくはアセチルシステインなどの抗酸化剤と共に補充された培地での処理によって行われる。

10

## 【0090】

本発明の一実施形態は、成熟化細胞に特徴的なマーカーを発現する膵内分泌細胞(ステージ7細胞)を形成する方法であり、膵前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞(ステージ4細胞)を、好ましくは空気-液体界面で培養することによってステージ7細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることを含む。別の実施形態において、本発明の方法は、ステージ6細胞、又は未成熟細胞である細胞の形成をもたらす。この方法は、好ましくは少なくともステージ5~7の間、T3、T4、若しくはそれらの類似体、ALK5阻害剤、又は両方が補充された培地での処理を含む。

20

## 【0091】

空気-液体界面での細胞の培養は、細胞を、多孔性フィルター挿入物などの多孔性基質上に播種することを含む。ある特定の実施形態において、基質孔径は、約0.3~約3ミクロンの範囲であり得る。播種は、細胞を単一細胞として単層培養物から、又は細胞の集団を単層培養物から懸濁液へと放出し、続いて単一細胞懸濁液又は懸濁された細胞培養物をALIで多孔性基質の上に分取することによって達成され得る。細胞は、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約100,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約90,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約80,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約70,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約60,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約50,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約40,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約30,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約20,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約10,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約1000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約5000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約5000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約100,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約10,000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約100,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約20,000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約100,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約30,000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約100,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約40,000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約100,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約50,000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約100,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約60,000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約100,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約20,000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約80,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約30,000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約70,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、約40,000細胞/ $\mu\text{L}$ ~約60,000細胞/ $\mu\text{L}$ 、及び好ましくは約50,000細胞/ $\mu\text{L}$ を有する懸濁液から多孔性基質の上に播種され得る。細胞は、個々の細胞又は細胞の集合体若しくは集団を含有する細胞懸濁液の液滴として播種され得る。結果として生じる細胞体積物は、約 $5 \times 10^6$ ~約 $5 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $6 \times 10^6$ ~約 $5 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $7 \times 10^6$ ~約 $5 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $8 \times 10^6$ ~約 $5 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $9 \times 10^6$ ~約 $5 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $1 \times 10^7$ ~約 $5 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $2 \times 10^7$ ~約 $5 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $3 \times 10^7$ ~約 $5 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $4 \times 10^7$ ~約 $5 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $5 \times 10^6$ ~約 $4 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $5 \times 10^6$ ~約 $3 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $5 \times 10^6$ ~約 $2 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $5 \times 10^6$ ~約 $1 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $5 \times 10^6$ ~約 $9 \times 10^6$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $5 \times 10^6$ ~約 $8 \times 10^6$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $5 \times 10^6$ ~約 $7 \times 10^6$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $5 \times 10^6$ ~約 $6 \times 10^6$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $7 \times 10^6$ ~約 $4 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $8 \times 10^6$ ~約 $3 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、約 $9 \times 10^6$ ~約 $2 \times 10^7$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 、及び

30

40

50



好ましくは約  $1 \times 10^7$  細胞 /  $\text{cm}^2$  を含有し得る。

【0092】

別の実施形態において、本発明は、単一ホルモン陽性細胞の数を増強する方法を指す（例えば、PDX1及びNKX6.1共発現細胞の集団を、好ましくは空気-液体界面で培養及び分化させることによって、NKX6.1及びインスリンを共発現する細胞、又はNKX6.1及びクロモグラニンを共発現する細胞）。別の実施形態において、空気-液体界面で培養された膵内胚葉細胞を、以下、すなわち、ALK5阻害剤、BMP阻害剤、分泌酵素阻害剤、エフリンリガンド、EphB阻害剤、PKC阻害剤、EGFr阻害剤、レチノイン酸、ビタミンC、T3/T4、グルコース、細胞周期調節因子、WNT調節因子、SHH阻害剤、オーロラ阻害剤、抗酸化剤、ビタミンE、アセチル-システイン、又はそれらの組み合わせから選択される化合物での処理によって膵内分泌細胞へと更に分化させる。

10

【0093】

更なる実施形態において、本発明は、多能性細胞を分化させる段階的方法に関し、ステージ4～ステージ6細胞を、十分な量の(i)T3、T4、及びそれらの類似体のうちの1つ又は2つ以上、(ii)ALK5阻害剤、又は(i)及び(ii)の両方を含有する培地中で培養することと、ステージ6細胞を、任意選択で好ましくはオーロラキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうちの1つ又は2つ以上、並びに抗酸化剤を含有する培地中で更に培養して、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する膵内分泌細胞及び膵内分泌細胞の集団を生成することを含む。

20

【0094】

一部の実施形態において、結果として生じる細胞集団の細胞の少なくとも10%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも20%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも30%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。更に他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも40%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。更に他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも50%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。代替実施形態において、細胞の少なくとも60%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。更に他の代替実施形態において、集団の細胞の少なくとも70%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。更に他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも80%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。他の実施形態において、集団の細胞の少なくとも90%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。代替実施形態において、集団の細胞の少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する。

30

ステージ4：前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、膵前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

40

【0095】

一実施形態において、本発明の方法は、ステージ3細胞を、任意の好適な増殖培地であり得、好ましくはMCDB-131、DMEM、又はBLARなどのカスタム培地（表I）である分化培地で処理することを含む。培地は、以下、すなわち、(a)TGF-受容体阻害剤V、TGF-受容体阻害剤I、TGF-受容体阻害剤IV、TGF-受容体阻害剤VII、TGF-受容体阻害剤VIII、TGF-受容体阻害剤II、TGF-受容体阻害剤VI、TGF-受容体阻害剤III、TGF-阻害剤SB431542、SD-208、ITD-1、LY2109761、A83-01、LY2157299、ALK5i及びALK5阻害剤IIからなる群から選択されるALK5阻害剤、(b)T3、T4、T3の類似体、T4の類似体、及びそれらの混合物からなる群から

50

選択される甲状腺ホルモン、(c) S A N T - 1 又は H I P - 1 から選択される S H H シグナル伝達経路アンタゴニスト、(d) L D N - 1 9 3 1 8 9、N o g g i n、又は C h o r d i n から選択される B M P 受容体阻害剤、(e) T P B、P P B u、P M A、及び I L V から選択される P K C 活性因子、(f) F G F - 7 又は F G F - 1 0 から選択される線維芽細胞増殖因子、(g) レチノイン酸、及び (h) アスコルビン酸のうちの一つ又は二つ以上が補充され得る。例えば、M C D B 1 3 1 又は好ましくは B L A R などの増殖培地は、S H H シグナル伝達経路アンタゴニスト (S A N T - 1 若しくは H P I - 1 など)、B M P 阻害剤 (L D N - 1 9 3 1 8 9、N o g g i n、若しくは C h o r d i n)、アスコルビン酸、及び P K C 活性因子 (T P B、P D B u、P M A、若しくは I L V) が補充され、有用な分化培地を提供することができる。ステージ 3 細胞を、こうした培地中

10

#### 【0096】

ステージ 4 において、細胞は、ステージ全体の間、又は好ましくは約 2 ~ 3 日間の平板培養後のいずれかに、空気 - 液体界面で培養され得る。具体的に、本発明は、空気 - 液体

20

#### 【0097】

更なる実施形態において、ステージ 4 の完了時の細胞は、R h o 関連キナーゼ (「R O C K」) 阻害剤、例えば、Y 2 7 6 3 2 ( ( 1 R , 4 r ) - 4 - ( ( R ) - 1 - アミノエチル) - N - (ピリジン - 4 - イル)シクロヘキサンカルボキシアミド)、G S K 2 6 9

30

#### 【0098】

ある特定の実施形態において、平板培養中で 1 ~ 2 日間培養された細胞を意味する、後期ステージ 4 細胞のみが、ステージ 4 の完了のために、続けて空気 - 液体界面で培養され得る。一実施形態において、R O C K 阻害剤で処理された後期ステージ 4 細胞のみが、空気 - 液体界面で培養される。他の実施形態において、 $0.5 \sim 約 0.75 \times 10^5$  細胞 /  $\mu L$  が播種され、空気 - 液体界面で培養される。代替的に、 $約 2 \sim 6 \times 10^6$  細胞が播種され、空気 - 液体界面で培養される。ある特定の実施形態において、細胞は、空気 - 液体界面での培養前に、T r y p L E (商標)、A c c u t a s e (商標)、又は D i s p a s e (商標) などのタンパク質分解及びコラーゲン分解酵素を含有する溶液などの細胞脱離溶液で処理され得る。

40

#### 【0099】

50

代替実施形態において、ステージ3細胞は、ALK5阻害剤、Noggin、及びPKC活性因子、例えばTPBが補充された増殖培地を含む分化培地で処理され得る。ある特定の実施形態において、培地は、約0.1 $\mu$ M ALK5阻害剤、約100ng/mLのNoggin、及び約500nM TPBが補充され得る。細胞培養は、単層形式であり得る。処理は、合計約3日間にわたって継続し得る。ある特定の実施形態において、細胞は、2日間処理され得、次いで最後の日に、細胞は、タンパク質分解酵素、コラーゲン分解酵素、又は両方、例えばDisperse(商標)で処理され、約100 $\mu$ m未満の直径を有する細胞集団に分割され、続いてALK5阻害剤及びLDN-193189の存在下で培養され得る。ある特定の実施形態において、約100 $\mu$ m未満の直径を有する細胞集団は、約200nM ALK5阻害剤及び約100nM LDN-193189

10

が補充された培地中で培養され得る。代替実施形態において、ステージ4細胞を空気-液体界面で培養することは、内分泌関連マーカーと共に、腓内胚葉マーカーを著しく増強することができる。したがって、本発明は、ステージ4細胞を空気-液体界面で培養することによって、腓内胚葉及び内分泌関連マーカーを増強する方法を提供する。

ステージ5：腓前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、腓内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

#### 【0100】

一実施形態において、本発明の方法は、ステージ4細胞を、任意の好適な増殖培地であり得、好ましくはMCDB-131、DMEMである分化培地、又は好ましくはBLARなどのカスタム培地(表I)で処理することを含む。培地は、以下、すなわち、(a) TGF-受容体阻害剤V、TGF-受容体阻害剤I、TGF-受容体阻害剤IV、TGF-受容体阻害剤VII、TGF-受容体阻害剤VIII、TGF-受容体阻害剤II、TGF-受容体阻害剤VI、TGF-受容体阻害剤III、TGF-阻害剤SB431542、SD-208、ITD-1、LY2109761、A83-01、LY2157299、ALK5i及びALK5阻害剤IIからなる群から選択されるALK5阻害剤、(b) T3、T4、T3の類似体、T4の類似体、及びそれらの混合物からなる群から選択される甲状腺ホルモン、(c) SNT-1又はHIP-1から選択されるSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、(d) LDN-193189、Noggin、又はChordinから選択されるBMP受容体阻害剤、(e) レチノイン酸、(f) アスコルビン酸(g) ヘパリン、及び(h) 硫酸亜鉛のうちの一つ又は二つ以上が補充され得、細胞を、好ましくは空気-液体界面で約2~4日間、好ましくは約3日間培養して、細胞をステージ5細胞へと分化させる。別の実施形態において、増殖培地はまた、SMO阻害剤(MRT10又はシクロパミンなど)、及び好ましくはFGF-7又はFGF-10から選択される線維芽細胞増殖因子の一方又は両方が補充される。ステージ4細胞の処理は、約2~4日間、好ましくは約3日間行われ、細胞をステージ5細胞へと分化させる。

20

30

#### 【0101】

好ましい実施形態において、ステージ4細胞は、約0.1 $\mu$ M~約0.4 $\mu$ MのSNT-1及び好ましくは約0.25 $\mu$ M SNT-1、約50nM RA、約0.1mM~約0.5mMアスコルビン酸、代替的に約0.2mM~約0.4mM及び好ましくは約0.25mMアスコルビン酸、約50nM~約200nM及び好ましくは約100nM LDN-193189、約1 $\mu$ MのT3、並びに約10000nM ALK5阻害剤、より好ましくはALK5阻害剤IIが補充された培地で細胞を処理することによって、ステージ5細胞へと分化される。更に別の実施形態において、細胞はまた、任意選択で好ましくは約1~15 $\mu$ M、代替的に約1~10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、代替的に約5~10 $\mu$ M、好ましくは約10 $\mu$ M、約10 $\mu$ M硫酸亜鉛、及び約1~100 $\mu$ g/mL、好ましくは約10 $\mu$ g/mLのヘパリンで処理される。ステージ4細胞の処理は、約2~4日間、好ましくは約3日間行われ、細胞をステージ5細胞へと分化させる。

40

#### 【0102】

更に別の実施形態において、本発明の方法は、ステージ4細胞を、ヘパリン、SMO阻

50

害剤、又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、RA、BMP受容体阻害剤、及びALK5阻害剤が補充された培地で処理することと、細胞を空気-液体界面で約3日間培養して、細胞をステージ5細胞へと分化させることとを含む。代替実施形態において、培地は、RA、BMP受容体阻害剤、及びALK5阻害剤と共に、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。したがって、一実施形態において、ステージ4細胞は、ヘパリン、 $ZnSO_4$ 、SMO阻害剤又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、RA、LDN-193189、及びALK5阻害剤IIが補充された培地でステージ4細胞を処理することによってステージ5細胞へと分化され得る。代替実施形態において、培地は、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。一実施形態において、ステージ4細胞は、約 $10\mu g/mL$ のヘパリン、約 $0.25\mu M$  SANT-1、約 $50nM$  RA、約 $50nM$  LDN-193189、約 $10nM$ のT3、及び約 $1000nM$  ALK5阻害剤が補充された培地で細胞を処理することによってステージ5細胞へと分化される。好適なALK5阻害剤としては、SD-208、ALK5阻害剤II、TGF-受容体阻害剤V、TGF-受容体阻害剤I、TGF-受容体阻害剤IV、TGF-受容体阻害剤VII、TGF-受容体阻害剤VIII、TGF-受容体阻害剤II、TGF-受容体阻害剤VI、TGF-受容体阻害剤III、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。ステージ4細胞の処理は、約2~4日間、好ましくは約3日間行われ、細胞をステージ5細胞へと分化させる。

#### 【0103】

好ましい実施形態において、ALK5阻害剤は、ALK5阻害剤IIである。別の好ましい実施形態において、約 $10000nM$ のALK5阻害剤IIが使用される。代替の好ましい実施形態において、ステージ4細胞は、約 $10\mu g/mL$ のヘパリン、約 $0.25\mu M$  SANT-1、約 $50nM$  RA、約 $100nM$  LDN-193189、及び約 $10000nM$ のALK5阻害剤IIが補充された培地で処理される。更に別の代替実施形態において、本発明の方法は、ステージ4細胞を、SMO阻害剤、又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、RA、及びALK5阻害剤が補充された培地で処理することと、細胞を好ましくは空気-液体界面で約2~4日間、好ましくは約3日間培養して、細胞をステージ5細胞へと分化させることとを含む。代替実施形態において、培地は、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。一実施形態において、ステージ4細胞は、約 $0.25\mu M$  SANT-1、約 $50nM$  RA、約 $50nM$  LDN-193189、約 $1\mu M$  T3、及び約 $1000nM$ のALK5阻害剤が補充された培地で細胞を処理することによってステージ5細胞へと分化される。

#### 【0104】

空気-液体界面で培養するために播種される細胞の量は異なり得る。例えば、細胞を空気-液体界面で培養するために、約 $0.5\sim 6\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ を含有する細胞懸濁液の液滴が多孔性基質（例えば、フィルター）上に播種され得る。懸濁液は、約 $2\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ ~約 $6\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ 、約 $4\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ ~約 $6\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ 、約 $5\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ ~約 $6\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ 、約 $5\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ ~約 $6\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ 、約 $2\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ ~約 $5\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ 、約 $2\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ ~約 $4\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ 、又は約 $3\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ を含有し得、空気-液体界面に位置するフィルターなどの多孔性基質の上に播種され得る。一部の実施形態において、約 $0.5\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ ~約 $0.75\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ 、約 $0.6\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ ~約 $0.75\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ 、又は約 $0.5\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ ~約 $0.6\times 10^5$ 細胞/ $\mu L$ を含有する細胞懸濁液の液滴は、ALIで培養されるように多孔性支持体の上に播種される。

#### 【0105】

別の実施形態において、本発明の方法は、ステージ4細胞を、BMP受容体阻害剤（例えば、LDN-193189、Noggin、又はChordin）及びALK5阻害剤が補充された培地で約1日間処理して、ステージ4細胞をステージ5細胞へと分化させる

ことを含む。例えば、培地は、約100 nMのLDN-193189、及び約100 nMのALK5阻害剤及び約1 μM T3が補充され得る。細胞は、集団の形態であり得る。ある特定の実施形態において、細胞は、空気-液体界面で培養する前に、タンパク質分解酵素及びコラーゲン分解酵素を含有する溶液などの細胞脱離溶液で処理され得る。

#### 【0106】

前述の方法に従い、本発明は、膵前腸前駆体に特徴的なマーカーを発現する細胞を、膵内胚葉/膵内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させるための細胞培養を更に提供し、(a)培養容器、(b)容器内の、容器の体積の一部のみを充填するのに十分な体積の増殖培地、(c)培地に隣接する容器の一部を充填する容器内の空気、(d)培地と空気との間の界面に位置する多孔性基質、及び(e)培地が細胞の表面の一部のみに接触するように、基質の表面上に配設された多能性幹細胞から誘導される膵前腸前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を含む。

ステージ6：膵内胚葉/膵内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、膵内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

#### 【0107】

一実施形態において、本発明の方法は、ステージ5細胞を、任意の好適な増殖培地、好ましくはMCD B-131又はCMRL、より好ましくはBLARなどのカスタム培地(表I)であり得る分化培地で処理することを含む。培地は、以下、すなわち、(a) TGF-受容体阻害剤V、TGF-受容体阻害剤I、TGF-受容体阻害剤IV、TGF-受容体阻害剤VII、TGF-受容体阻害剤VIII、TGF-受容体阻害剤II、TGF-受容体阻害剤VI、TGF-受容体阻害剤III、TGF-阻害剤SB431542、SD-208、ITD-1、LY2109761、A83-01、LY2157299、ALK5i及びALK5阻害剤IIからなる群から選択されるALK5阻害剤、(b) T3、T4、それらの類似体、及びそれらの混合物からなる群から選択される甲状腺ホルモン、(c)好ましくはLDN-193189、Noggin、又はChordinから選択されるBMP受容体阻害剤、(d) 分泌酵素阻害剤XX、分泌酵素阻害剤XXI、分泌酵素阻害剤XVI、又はDAPTなどの分泌酵素阻害剤、(e)アスコルビン酸、(f)ヘパリン、及び(g)硫酸亜鉛のうちの1つ又は2つ以上が補充され得、好ましくは空気-液体界面で、約2~4日間、好ましくは約3日間培養して、ステージ5細胞をステージ6細胞へと分化させることができる。任意選択で、培地は、追加としてSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、スムーズド受容体阻害剤、線維芽細胞増殖因子、及びレチノイン酸のうちの1つ又は2つ以上が補充され得る。

#### 【0108】

好ましい実施形態において、ステージ5細胞は、約50 nM RA、約0.25 mMアスコルビン酸、約100 nM LDN-193189、約10000 nMのALK5阻害剤及び好ましくはALK5阻害剤II、1 μM T3、約100 nMの分泌酵素阻害剤が補充された培地で約7日間処理することによってステージ6細胞へと分化され得る。代替的に、ステージ5細胞は、約0.25 μM SANT-1、約50 nM RA、約0.25 mMアスコルビン酸、約1000 nM ALK5阻害剤、及び1 μM T3が補充された培地で約3日間処理することによってステージ6細胞へと分化され得る。細胞は、こうした培地中で、必要に応じて更に2日間以上培養され得る。

#### 【0109】

代替的に、ステージ5細胞は、ヘパリン、SMO阻害剤又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、BMP阻害剤、T3、T4、それらの類似体及びそれらの混合物、並びにALK5阻害剤が補充された培地で処理し、好ましくは空気-液体界面で、約1~7日間、代替的に約6日間、代替的に約7日間培養することによってステージ6細胞へと分化され得る。代替実施形態において、培地は、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。例えば、細胞は、約10 μg/mLのヘパリン、約0.25 μM SANT-1、約100 nM LDN-193189、約1000 nMのT3、及び約500~約10,000 nM、代替的に約500 nM、代替的に約1000 m

M、及び代替的に約10,000 nMのALK5阻害剤が補充された培地中で培養され得る。好適なALK5阻害剤としては、SD-208、ALK5阻害剤II、TGF-受容体阻害剤V、TGF-受容体阻害剤I、TGF-受容体阻害剤IV、TGF-受容体阻害剤VII、TGF-受容体阻害剤VIII、TGF-受容体阻害剤II、TGF-受容体阻害剤VI、TGF-受容体阻害剤III、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0110】

好ましい実施形態において、ALK5阻害剤は、ALK5阻害剤IIである。より好ましい実施形態において、約10000 nMのALK5阻害剤IIが使用される。したがって、一実施形態において、ステージ5細胞は、ヘパリン、SMO阻害剤又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、BMP阻害剤、T3、T4、それらの類似体及びそれらの混合物、並びにALK5阻害剤が補充された培地で処理し、好ましくは空気-液体界面で、約7日間培養することによってステージ6細胞へと分化され得る。代替実施形態において、培地は、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。ある特定の実施形態において、細胞は、空気-液体界面で培養する前に、タンパク質分解酵素及びコラーゲン分解酵素を含有する溶液などの細胞脱離溶液で処理され得る。

10

【0111】

別の実施形態において、ステージ5細胞は、ヘパリン、SMO阻害剤又はSHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、BMP阻害剤、T3、及びALK5阻害剤IIが補充された培地で処理し、空気-液体界面で約5日~約7日間、代替的に約5日間、代替的に約6日間、代替的に約7日間培養することによってステージ6細胞へと分化され得る。これらの実施形態において、培地は、約10 µg/mLのヘパリン、約0.25 µM SANT-1、約100 nM LDN-193189、約1000 nMのT3、及び約10,000 nMのALK5阻害剤IIが補充され得る。ある特定の実施形態において、培地は、硫酸亜鉛(ZnSO<sub>4</sub>)が更に補充されてもよい。例えば、培地は、約10 mM ZnSO<sub>4</sub>が更に補充されてもよい。代替実施形態において、培地は、SMO阻害剤及びSHHシグナル伝達経路アンタゴニストの両方が補充され得る。

20

【0112】

本発明の特に好ましい実施形態において、オーロキナーゼ阻害剤、好ましくはオーロキナーゼ阻害剤II、RSK阻害剤、好ましくはRSK阻害剤II、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤、好ましくはEPZ 5676のうちの1つ又は2つ以上が培地に添加される。添加される量は、オーロキナーゼ及びRSK阻害剤については約100~5000 nM、代替的に約1000~5000 nM、代替的に約2000~5000 nM、代替的に約3000~5000 nM、好ましくは約1000~2000 nM、DOT1L阻害剤については約100~1000 nM、より好ましくは約1 µM~約10 nMであり得る。

30

【0113】

前述の方法に従い、本発明は、臍内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を、臍内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させるための細胞培養を更に提供し、(a)培養容器、(b)容器内の、容器の体積の一部分のみを充填するのに十分な体積の増殖培地、(c)培地に隣接する容器の一部分を充填する容器内の空気、(d)培地と空気との間の界面に位置する多孔性基質、及び(d)培地が細胞の表面の一部分のみに接触するように、基質の表面上に配設された多能性幹細胞から誘導される臍内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を含む。

40

【0114】

一実施形態において、本発明の実施形態に従い培養されたステージ5細胞が用いられ、ステージ6細胞へと分化されるが、他の実施形態において、他のプロトコルに従い培養されたステージ5細胞が用いられてもよい。

【0115】

別の実施形態において、本発明の方法は、単一ホルモン陽性であるステージ6細胞の形

50

成をもたらす。したがって、一実施形態において、本発明の方法は、NKX6.1、インスリン、クロモグラニン、及びPDX1を共発現するステージ6細胞をもたらす。別の実施形態において、本発明の方法は、NKX6.1及びインスリンを共発現するステージ6細胞をもたらす。本発明のある特定の実施形態において、この方法は、ステージ4~6、又は後期ステージ4~6、又はステージ5及び6でBLARカスタム培地(表Iを参照されたい)を用いる。培地は、毎日又は代替的に1日おきに交換され得るか、又は好ましくは交換される。

【0116】

別の実施形態において、本発明は、NKX6.1及びクロモグラニンを共発現するステージ6細胞を形成する方法に関し、ステージ4、好ましくは後期ステージ4細胞を、空気-液体界面でステージ6細胞へと培養することを含む。更に別の実施形態において、本発明は、ステージ4、好ましくは後期ステージ4細胞を、空気-液体界面でステージ6細胞へと培養することによって、NKX6.1ステージ6細胞を発現する単一ホルモンインスリン陽性細胞を形成する方法に関する。

ステージ7：膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞の、より成熟した表現型を有する膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞への分化。

【0117】

一実施形態において、本発明の方法は、ステージ6細胞を、任意の好適な増殖培地、好ましくはMCDB-131若しくはCMRL、又はより好ましくはBLARなどのカスタム培地(表I)であり得る、分化培地で処理することを含む。培地は、以下、すなわち、(a) TGF-受容体阻害剤V、TGF-受容体阻害剤I、TGF-受容体阻害剤IV、TGF-受容体阻害剤VII、TGF-受容体阻害剤VIII、TGF-受容体阻害剤II、TGF-受容体阻害剤VI、TGF-受容体阻害剤III、TGF-阻害剤SB431542、SD-208、ITD-1、LY2109761、A83-01、LY2157299、ALK5i及びALK5阻害剤IIからなる群から選択されるALK5阻害剤、(b) T3、T4、それらの類似体、及びそれらの混合物からなる群から選択される甲状腺ホルモン、(c) ヘパリン、(d) 硫酸亜鉛、(e) ビタミンE、ビタミンC、アセチルシステイン、抗酸化剤補助剤A1345、グルタチオン、ペルオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される抗酸化剤、並びに(f) 好ましくはオーロラキナーゼ阻害剤IIであるオーロラキナーゼ阻害剤、好ましくはRSK阻害剤IIであるRSK阻害剤、及び好ましくはEPZ5676であるタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤のうちの1つ又は2つ以上が補充され、好ましくは空気-液体界面で約7~21日間、好ましくは約7~10日間、より好ましくは約7日間培養して、ステージ6細胞をステージ7細胞へと分化させる。一実施形態において、増殖培地は、T3、T4、それらの類似体及びそれらの混合物、ALK5阻害剤、抗酸化剤、並びにオーロラキナーゼ阻害剤、好ましくはオーロラキナーゼ阻害剤II、又はRSK阻害剤、好ましくはRSK阻害剤IIが補充される。ステージ6細胞は、約10000nMのALK5阻害剤II、約1000nMのT3、約10µMの6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸(「Trolox」)、及び約1µM~約1µMのオーロラキナーゼ阻害剤II又はRSK阻害剤IIが補充された培地で約7日間処理することによってステージ7細胞へと分化され得る。

【0118】

一実施形態において、ステージ6細胞は、約10000nMのALK5阻害剤、約1µMのT3、約2µMの、オーロラキナーゼ阻害剤II、RSK阻害剤II、及びEPZ5676のうちの1つ又は2つ以上、並びに約1mM N-アセチルシステインが補充された培地で処理することによってステージ7細胞へと分化され得る。代替的に、約0.25µM SANT-1、約50nM RA、約0.25mMアスコルビン酸、及び約100nM LDN-193189のうちの1つ又は2つ以上が添加されてもよい。

【0119】

代替的に、ステージ6細胞は、ヘパリン、T3、T4、それらの類似体又はそれらの混

10

20

30

40

50

合物、ALK5阻害剤、抗酸化剤、及びオーロキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、DOT1Lのタンパク質メチルトランスフェラーゼ阻害剤、又はそれらの混合物が補充された培地で処理し、好ましくは空気-液体界面で約7~21日間、代替的に約7~10日間、好ましくは約7日間培養することによってステージ7細胞へと分化され得る。代替実施形態において、培地は、レチノイン酸、SMO阻害剤、SHHシグナル伝達経路アンタゴニスト、BMP受容体阻害剤、及びN-アセチルシステインのうちの一つ又は二つ以上が補充され得る。

#### 【0120】

好ましい実施形態において、ALK5阻害剤は、ALK5阻害剤IIである。より好ましい実施形態において、約10000nMのALK5阻害剤IIが使用される。したがって、一実施形態において、ステージ6細胞は、ヘパリン、T3、T4、それらの類似体及びそれらの混合物、並びにALK5阻害剤、抗酸化剤、及びオーロキナーゼ阻害剤、RSK阻害剤、又はタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤が補充された培地で処理し、好ましくは空気-液体界面で約7日間培養することによってステージ7細胞へと分化され得る。ある特定の実施形態において、細胞は、空気-液体界面で培養する前に、タンパク質分解酵素及びコラーゲン分解酵素を含有する溶液などの細胞脱離溶液で処理され得る。本発明の特に好ましい実施形態において、オーロキナーゼ阻害剤、好ましくはオーロキナーゼ阻害剤II、RSK阻害剤、好ましくはRSK阻害剤II、及びタンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤、好ましくはEPZ5676のうちの一つ又は二つ以上が培地に添加される。添加される量は、約100~5000nM、代替的に約1000~5000nM、代替的に約2000~5000nM、代替的に約3000~5000nM、より好ましくは約1000nM~2000nMオーロキナーゼ阻害剤、より好ましくは約2000nMオーロキナーゼ若しくはRSK阻害剤、又は約100~500nM DOT1L阻害剤、より好ましくは約1μM~約10nMのDOT1L阻害剤であり得る。

#### 【0121】

前述の方法に従い、本発明は、膵内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させるための細胞培養を更に提供し、(a)培養容器、(b)容器内の、容器の体積の一部分のみを充填するのに十分な体積の増殖培地、(c)培地に隣接する容器の一部分を充填する容器内の空気、(d)培地と空気との間の界面に位置する多孔性基質、及び(d)培地と細胞の表面の一部分のみに接触するように、基質の表面上に配設された多能性幹細胞から誘導される膵内胚葉/内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞を含む。

#### 【0122】

一実施形態において、本発明の実施形態に従い培養されたステージ6細胞が用いられ、ステージ7細胞へと分化されるが、他の実施形態において、他のプロトコルに従い培養されたステージ6細胞が用いられてもよい。

#### 【0123】

別の実施形態において、本発明の方法は、単一ホルモン陽性であるステージ7細胞の形成をもたらす。したがって、一実施形態において、本発明の方法は、NKX6.1、インスリン、PDX1、及びMAFAを共発現するステージ7細胞をもたらす。別の実施形態において、本発明の方法は、NKX6.1、PDX1、インスリン、及びMAFAを共発現するステージ7細胞をもたらす。更に別の実施形態において、細胞の各々の少なくとも約10%、代替的に少なくとも約20%、代替的に少なくとも約30%、代替的に少なくとも約40%、代替的に少なくとも約50%、代替的に少なくとも約60%、代替的に少なくとも約70%、代替的に少なくとも約80%、又は代替的に少なくとも約90%の細胞集団が、インスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFA結果を発現する細胞の集団が生じる。

#### 【0124】

本発明のある特定の好ましい実施形態において、この方法は、ステージ4~7又は後期



ステージ４～７、又はステージ５、６、及び７でＢＬＡＲカスタム培地（表Ⅰ）を用いる。培地は、好ましくは毎日、又は代替的に１日おきに交換され得る。

【０１２５】

別の実施形態において、本発明は、NKX6.1、PDX1、MAFA、及びインスリンを共発現するステージ７細胞を形成する方法に関し、ステージ４、好ましくは後期ステージ４細胞を、空気-液体界面でステージ７細胞へと培養することを含む。更に別の実施形態において、本発明は、ステージ４、好ましくは後期ステージ４細胞を、空気-液体界面でステージ７細胞へと培養することによって、NKX6.1、PDX1、及びMAFAステージ７細胞を発現する単一ホルモンインスリン陽性細胞を形成する方法に関する。

【０１２６】

本明細書に記載する方法に従い生成されたステージ６及び７細胞はまた、膵臓ホルモン及び内分泌マーカーの分泌に対するそれらの作用について化合物をスクリーニングにおける使用のために適切である。とりわけ、ALIで培養されたステージ４～ステージ７細胞は、384～6ウェルフォーマットの異なる培養フォーマットで試験され得る。こうしたフォーマットは、膵内胚葉、膵内分泌前駆体、膵内分泌及び膵細胞マーカーの後次発現に関する、様々な用量及び時間間隔での様々な小分子又は生物学の評価を可能にする。こうした評価は、遺伝子発現をPCRによって、タンパク質発現をFACS若しくは免疫染色によって、又は小分子/生物学の追加により影響される細胞による因子の分泌についてはELISAによって測定することにより達成され得る。

【０１２７】

本発明の方法により取得可能な細胞

本発明は、本発明の方法によって取得可能な細胞、又は細胞の集団を提供する。本発明はまた、好ましくは成熟した表現型の膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞、又は細胞集団を提供する。本発明はまた、好ましくは、NKX6.1発現（好ましくは約30%超）、PDX1発現（好ましくは約30%超）、及びMAFA発現（好ましくは約10%超）で特徴付けられる、成熟した表現型の膵内分泌細胞に特徴的なマーカーを発現するインスリン陽性細胞又はインスリン陽性細胞の集団を提供する。

【０１２８】

治療のための方法

本発明は、糖尿病の治療方法、とりわけ、糖尿病を罹患しているか、又は発症するリスクを有する患者を治療するための方法を提供する。本発明はまた、治療法で使用するために、本発明の方法によって取得可能な、又は得られる、細胞の集団を提供する。とりわけ、本発明は、糖尿病に罹患しているか、又は糖尿病を発症するリスクを有する人を治療する方法で使用する、本発明の方法によって取得可能な、又は得られる、細胞又は細胞の集団を提供する。糖尿病は、I型又はII型であり得る。

【０１２９】

一実施形態において、治療法は、本発明の方法によって得られるか、又は取得可能な細胞を患者に埋め込むことを含む。一実施形態において、治療法は、生体外で多能性細胞をステージ１、ステージ２、ステージ３、ステージ４、ステージ５、ステージ６、又はステージ７の細胞に分化させることと、例えば、本明細書に記載するように、分化した細胞を患者内に埋め込むこととを含む。別の実施形態において、この方法は、例えば、本明細書に記載するように、多能性幹細胞を分化させる工程の前に、多能性幹細胞を培養する工程を更にも含む。なおも更なる実施形態において、この方法は、埋め込む工程の後に、生体内で細胞を分化させる工程を更にも含む。一実施形態において、これらの方法のうちのいずれかにより治療される患者は、哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

【０１３０】

一実施形態において、細胞は、分散した細胞として埋め込まれてもよく、又は血管系、例えば、肝門脈内に注入され得る集団に形成されてもよい。あるいは、細胞は、生体適合性の分解性ポリマー支持体、多孔性の非分解性デバイス内に提供されてもよく、又は宿主の免疫系から保護されるよう封入されてもよい。一実施形態において、治療法は、埋め込

10

20

30

40

50

み前に、細胞を三次元の支持体内に取り込むことを更に含む。細胞は、患者に埋め込む前に、生体外でこの支持体上に維持されてもよい。あるいは、細胞を含む支持体は、更に生体外で培養することなく、直接患者に埋め込んでもよい。支持体は、場合により、埋め込まれた細胞の生存及び機能を促進する少なくとも1つの医薬品を組み込んでもよい。細胞は、例えば、肝臓、天然の膵臓、腎被膜下空間、網、腹膜、漿膜下空間、腸、胃、又は皮下ポケットを含む、レシピエントの適切な部位に埋め込まれ得る。

【0131】

生体内で埋め込まれた細胞の更なる分化、生存、又は活性を向上させるために、増殖因子、抗酸化剤、又は抗炎症剤などの追加の因子を、細胞の投与前に、投与と同時に、又は投与後に投与してもよい。これらの因子は、内在性細胞により分泌され、投与された細胞に原位置で曝露されてもよい。移植された細胞には、当該技術分野で既知の内因性の及び外因性の増殖因子の任意の組み合わせにより、分化を誘導することもできる。

10

【0132】

埋め込みに使用する細胞の量は、埋め込み対象の状態及び埋め込み治療に対する応答を含む、多数の要因に基づき、当業者により決定され得る。

【0133】

本発明は、以下の限定されない例を考察することによって更に明確にすることができるだろう。

【実施例】

【0134】

20

(実施例1)

空気 - 液体界面で培養された膵内胚葉細胞 - ステージ5 ~ ステージ7のMAFAの発現の漸増

この実施例は、ステージ5 ~ 7中に空気 - 液体界面(「ALI」)で培養され、ステージ5 ~ ステージ7にT3及びALK5阻害剤I1で処理された膵内胚葉細胞内のMAFA発現の動態を実証する。経路42におけるヒト胚幹細胞株H1の細胞(WA01細胞、WiCell Research Institute, Madison, Wisconsin)を、単一細胞として $1 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>で、MATRIGEL(商標)上に、1:30希釈液(Corning Incorporated, Corning New York, カタログ番号354230)でコーティングされた皿で、ダルベッコ改変イーグル培地、栄養素混合物F-12(「DMEM-F12」)(Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, カタログ番号11330-032)、1:100希釈(「1倍濃度」)のGlutaMAX(商標)(Life Technologies、カタログ番号35050-079)、0.25mMアスコルビン酸(Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis Missouri、カタログ番号A4544)、100ng/mLの線維芽細胞増殖因子2(「FGF2」)(R&D Systems, Minneapolis, Minnesota、カタログ番号233-FB-025)、1ng/mLの形質転換増殖因子(「TGF- $\beta$ 」)(R&D Systems Inc.、カタログ番号240-B-002)、1:100希釈でのインスリン - トランスフェリン - セレニウム - エタノールアミン(「ITS-X」)(Life Technologies、カタログ番号51500056)、2%無脂肪酸ウシ血清アルブミン(「FAF-BSA」)(Proliant, Inc., Boone, Idaho、カタログ番号68700)、及び20ng/mLのインスリン様増殖因子-1(「IGF-1」)(R&D Systems、カタログ番号291-G1-200)の、10 $\mu$ Mのロック阻害剤Y-27632(カタログ番号Y0503、Sigma-Aldrich)が補充された培地中に播種した。播種から48時間後、培養物を不完全PBS(マグネシウム又はカルシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水)中で洗浄し、続いて1倍TrypLE(商標)発現酵素(Life Science、カタログ番号14190)で3~5分間、37 $^{\circ}$ Cで培養した。放出された細胞を、DMEM-F12ですすぎ、1000rpmで5分間回転させた。結果として生じる

30

40

50

ペレットを、 $10\ \mu\text{M}$  Y-27632、 $1:100$ 希釈(「1倍濃度」)のGlutaMAX(商標)、 $0.25\ \text{mM}$ アスコルビン酸、 $100\ \text{ng}/\text{mL}$  FGF2、 $1\ \text{ng}/\text{mL}$  TGF- $\beta$ 、 $1:100$ 希釈のITS-X、 $2\%$  FAF-BSA、及び $20\ \text{ng}/\text{mL}$  IGF-1が補充されたDMEM-F12中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、約 $1.3 \sim 1.5 \times 10^5$ 細胞/ $\text{cm}^2$ で播種した。培養物を培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の48時間後に分化が開始し、約90%の開始培養密度をもたらした。使用される分化プロトコルのステージ1~4の間、培養は、平板接着培養上で、かつ空気-液体界面でステージ5~7の間維持された。

#### 【0135】

ステージ1(3日間):

MATRIGEL(商標)( $1:30$ 希釈)でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで以下のステージ1培地、すなわち、 $0.5\%$  FAF-BSA、 $1.2\ \text{g}/1000\ \text{mL}$ 重炭酸ナトリウム(Sigma-Aldrich、カタログ番号S3187)、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、このステージでは $4.5\ \text{mM}$  D-グルコース(Sigma-Aldrich、カタログ番号G8769)(続くステージを使用して、 $10\ \text{mM}$ 濃度のグルコース(Sigma-Aldrich、カタログ番号G8769)を得た)、 $100\ \text{ng}/\text{mL}$ 増殖/分化因子8(「GDF8」)(Peprotech, Rocky Hill, New Jersey、カタログ番号120-00)、及び $1\ \mu\text{M}$ の14-プロバ-2-エン-1-イル-3,5,7,14,17,23,27-ヘプタアザテトラシクロ[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]ヘプタコサ-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-ノナエン-16-オン(「MCX化合物」)が補充されたMCDB-131培地(Life Technologies、カタログ番号10372-019)中で1日培養した。次いで、細胞を、 $0.5\%$  FAF-BSA、 $0.0012\ \text{g}/\text{mL}$ 重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、 $4.5\ \text{mM}$  D-グルコース、 $100\ \text{ng}/\text{mL}$  GDF8、及び $0.1\ \mu\text{M}$  MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。次いで、細胞を、 $0.5\%$ の無脂肪酸BSA、 $1.2\ \text{g}/1000\ \text{mL}$ 重炭酸ナトリウム、1倍GlutaMAX(商標)、 $4.5\ \text{mM}$  D-グルコース、及び $100\ \text{ng}/\text{mL}$  GDF8が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。

10

20

30

#### 【0136】

ステージ2(2日間):

細胞を最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで2日間、 $0.5\%$  FAF-BSA、 $1.2\ \text{g}/1000\ \text{mL}$ 重炭酸ナトリウム、1倍GlutaMAX(商標)、 $4.5\ \text{mM}$  D-グルコース、 $0.25\ \text{mM}$ アスコルビン酸、及び $25\ \text{ng}/\text{mL}$  FGF7(R&D Systems, Inc.、カタログ番号251-KG)が補充されたMCDB-131培地で処理した。

#### 【0137】

ステージ3(2日間):

細胞を、 $1:200$ 希釈のITS-X、 $4.5\ \text{mM}$ グルコース、1倍GlutaMAX(商標)、 $2.5\ \text{g}/1000\ \text{mL}$ 重炭酸ナトリウム、 $2\%$  FAF-BSA、 $0.25\ \mu\text{M}$  SANT-1(N-[ (3,5-ジメチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)メチレン]-4-(フェニルメチル)-1-ピペラジニアミン)(Sigma Aldrich、カタログ番号S4572)、 $1\ \mu\text{M}$ レチノイン酸(「RA」)(Sigma Aldrich、カタログ番号R2625)、 $25\ \text{ng}/\text{mL}$  FGF7、 $0.25\ \text{mM}$ アスコルビン酸、 $200\ \text{nM}$  PKC活性剤((2S,5S-(E,E)-8-(5-(4-トリフルオロメチル)フェニル)-2,4-ペンタジエノイルアミノ)ベンゾラクトム(「TPB」)(EMD Millipore Corporation, Gibbstown, New Jersey、カタログ番号565740)、及び $100\ \text{nM}$ の骨形成タンパク質(「BMP」)受容体阻害剤LDN-193189(Shangha

40

50

i ChemPartners Co Ltd., Shanghai, China) が補充されたBLARカスタム培地 (Life Technologiesにより製造、成分は表Iに列挙される) で2日間処理した。

【0138】

ステージ4 (3日間) :

細胞を、1:200希釈のITS-X、4.5mMグルコース、1倍濃度のGlutaMAX (商標)、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、100nM RA、2ng/mL FGF7、100nM LDN-193189、0.25mMアスコルビン酸、及び200nM TPBが補充されたBLAR培地で3日間処理した。ステージ4 (3日間) の最後に、平皿上で培養された細胞を、10μMのY27632で4時間処理し、PBSですすいで、1倍濃度の酵素TrypLE (商標) 発現酵素 (Life Technologies Corporation、カタログ番号12604-013) で5分間室温で処理した後、酵素を除去し、BLAR培地ですすいで、細胞スクレーパによって細胞をこすり取った。結果として生じる細胞の懸濁液を、 $0.5 \sim 0.75 \times 10^6$ 細胞 (5~10μL分量) の密度で、6ウェルプレートの0.4ミクロン多孔性細胞培養フィルター挿入物 (Corning、カタログ番号353493) 上に播種した。1.5mLの培地を、各挿入物の底部に添加し、フィルターの尖端、又は上部、側部には更なる培地を添加しなかった。培地は、ステージ5、6、及び7の期間に毎日交換した。

10

20

【0139】

ステージ5 (3日間) :

空気-液体界面で培養された細胞を、1:200希釈のITS-X、最終濃度20mMのグルコースを達成するためのグルコース、1倍濃度のGlutaMAX (商標)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25mMアスコルビン酸、10μg/mLのヘパリン (Sigma-Aldrich、カタログ番号H3149)、10μM ZnSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich、カタログ番号Z0251)、0.25μM SANT-1、50nM RA、100nM LDN-193189、3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩 (Sigma-Aldrich、カタログ番号T6397)、10000nMの2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン (「ALK5阻害剤II」) (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, New York、カタログ番号ALX-270-445) の形態の1μMのT3が補充されたBLAR培地で3日間処理した。

30

40

【0140】

ステージ6 (7日間) :

ステージ5細胞を、1:200希釈のITS-X、最終濃度20mMのグルコースを達成するためのグルコース、1倍濃度のGlutaMAX (商標)、1.5g/mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25mMアスコルビン酸、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO<sub>4</sub>、100nM LDN-193189、1μM T3、100nM (S,S)-2-[2-(3,5-ジフルオロフェニル)アセチルアミノ]-N-(5-メチル-6-オキソ-6,7-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,d]アゼピン-7-イル)プロピオンアミド (「分泌酵素阻害剤XX」) (EMD Millipore、カタログ番号#565789)、及び10000nM ALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地で7日間処理した。

【0141】

ステージ7 (7日間) :

ステージ6細胞を、1:200希釈のITS-X、最終濃度20mMのグルコースを達成するためのグルコース、1倍濃度のGlutaMAX (商標)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO<sub>4</sub>、1μM T3、10000nM ALK5阻害剤II、10μMビタミンE類似体T

50

rolox (EMD Millipore、カタログ番号648471)が補充されたBLAR培地で7~15日間処理した。

【0142】

図1A~Mは、実施例1に概説するように分化させたヒト胚性幹細胞株H1の細胞における以下の遺伝子のリアルタイムPCR解析のデータを示す：PDX1(図1A)、NKX6.1(図1B)、PAX4(図1C)、PAX6(図1D)、NGN3(図1E)、MAFA(図1F)、ABCC8(図1G)、クロモグラニン-A(図1H)、G6PC2(図1I)、IAPP(図1J)、インスリン(図1K)、グルカゴン(図1L)、及びPTF1a(図1M)。図1Fに示されるように、ステージ4及び5をステージ6及び7と比較して、MAFAに明らかな増加又は上方調節があり、細胞系統に向かう細胞の成熟の増加を実証する。しかしながら、ステージ6及び7において、MAFAのmRNA発現は、成人膵島よりも低かった。

【0143】

【表 1】

表I. BLAR培地の成分の一覧	
構成成分	濃度 (mM)
アミノ酸	
グリシン	3.0E-02
アラニン	3.0E-02
アルギニン	3.0E-01
アスパラギン	1.0E-01
アスパラギン酸	1.0E-01
システイン	2.0E-01
グルタミン酸	3.0E-02
ヒスチジン	1.1E-01
イソロイシン	1.0E-02
ロイシン	9.0E-02
リジン塩酸塩	1.5E-01
メチアン	3.0E-02
フェニルアラニン	3.0E-02
プロリン	1.0E-01
セリン	1.0E-01
トレオニン	3.0E-02
トリプトファン	2.0E-03
チロシンナトリウム	1.0E-02
バリン	3.0E-02
ビタミン	
ビオチン	3.0E-05
塩化コリン	5.0E-03
D-パントテン酸カルシウム	1.5E-03
フォリン酸カルシウム塩	2.3E-03
ナイアシンアミド	4.9E-03
ピリドキシン塩酸塩	9.7E-04
リボフラビン	1.0E-05
チアミン塩酸塩	3.0E-03
ビタミンB12	3.7E-06
i-イノシトール	2.8E-03
無機物/その他	
塩化カルシウム (CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O)	3.0E-01
硫酸銅 (CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O)	4.8E-06
硫酸鉄 (FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	1.0E-03
硫酸マグネシウム (MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	4.1E-01
塩化カリウム (KCl)	3.8E+00
重炭酸ナトリウム (NaHCO <sub>3</sub> )	1.4E+01
塩化ナトリウム (NaCl)	1.1E+02
二塩基性リン酸ナトリウム (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	5.0E-01
硫酸亜鉛 (ZnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O)	1.0E-04
アデニン	1.0E-03
D-グルコース (デキストロース)	5.0E+00
リボ酸	1.2E+05
フェノール赤	1.0E-02
ピルビン酸ナトリウム	1.0E+00
チミジン	9.8E-05

10

20

30

40

## 【 0 1 4 4 】

様々なステージの追加的な特徴付けのために、細胞をステージ 3、4、5、6、及び 7

50

で採取し、蛍光活性化フローサイトメトリー（「FACS」）によって解析した。FACS染色は、Diabetes, 61, 2016, 2012に記載されるように、かつ表I I Iに列挙される抗体を使用して行った。簡単に言うと、細胞をTrypLE（商標）Express（Life Technologies、カタログ番号12604）中で3~5分間37℃で培養し、単一細胞懸濁液へと放出した後、それらを0.2% BSAを含有するPBSの染色緩衝液（BD Sciences、カタログ番号554657）で2回洗浄した。細胞（ $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ ）を、表面マーキングのために、染色緩衝液中に1:4で希釈された0.5%ヒト IgGの100  $\mu$ L遮断緩衝液に再懸濁した。細胞に、最終希釈1:20で、直接共役一次抗体を添加し、続いて4℃で30分間培養した。染色した細胞を、染色緩衝液中で2回洗浄し、続いて200  $\mu$ L染色緩衝液中に再懸濁した後、BD Canto II上のFACS解析の前に、生/死区別のために、15  $\mu$ Lの7AAD中で培養した。細胞内抗体染色は、最初に緑色蛍光生/死細胞染料（Life Technologies、カタログ番号L23101）を用いて4℃で20分間培養し、続いて冷たいPBSで単回洗浄することによって達成した。250  $\mu$ LのCytotfix/Cytoperm緩衝液（BDカタログ番号554723）中に細胞を固定し、続いて2%正常ヤギ血清を含む100  $\mu$ LのPerm洗浄緩衝液/遮断溶液中に細胞を再懸濁した。細胞を、実験的に事前決定された希釈で一次抗体と4℃で30分間培養し、続いてPerm/Wash緩衝液中で2回洗浄した。次いで細胞を、適切な抗体と4℃で30分間培養した後、BD FACS Canto II上の解析前に2回洗浄した。使用した抗体の濃度を表I I Iに示す。膵臓マーカーのための抗体は、ヒト膵島又は未分化H1細胞を陽性対照として使用し、特異性について試験した。二次抗体については、以下、すなわち、1:500の抗マウスAlexa Fluor（登録商標）647（Life Technologies）、1:200（v）のヤギ抗ウサギPE又は1:800のロバ抗ヤギAlexa 647（Life Technologies）を添加し、4℃で30分間培養し、続いてPerm/Wash緩衝液中で最終洗浄し、BD FACS Divaソフトウェアを使用してBD FACS Canto II上で解析し、少なくとも30,000事象を獲得した。

10

20

30

40

#### 【0145】

図2~6は、それぞれステージ3、4、5、6、及び7で収集された細胞のFACSプロファイルを描く。図4に示されるように、ステージ5において、細胞の約15%がインスリン及びNKX6.1を共発現し、PDX1陽性細胞の約21%が、PDX1及びKI-67の共発現によって測定して、活性細胞周期にあった（約23%、KI-67は、活性細胞周期にある細胞を示す）。しかしながら、ステージ6及びステージ7によって（図5及び6）、PDX1+細胞の増殖は著しく低下したが（1~2%）、インスリンを共発現するNKX6.1+細胞の数は著しく増加した（ステージ6で約39%、及びステージ7で約50%）。更に、内分泌前駆体マーカーISL-1、NeuroD1、及びNKX2.2を発現する細胞が著しく上昇した。これらの結果は、ステージ6及び7の培養が、内分泌細胞を早期に成熟させる増殖前駆体から離れて細胞の急速成熟を可能にすることを示している。加えて、インスリン及びNKX6.1を共発現する細胞の割合の増加（33%）は、ステージ6からステージ7へと延長することによって観察された（図5を図6と比較して）。図7は、複数の膵内胚葉（FOXA2、PDX-1、NKX6.1）、未分化ES細胞（Oct3/4）、内分泌（Pax6、ISL-1、NKX2.2、クロモグラニン）、及びホルモン（インスリン、グルカゴン）の、ステージ3~ステージ7の発現率を要約する。

#### 【0146】

【表 2】

表II. FACS解析に使用した抗体の一覧			
抗原	種	供給元／カタログ番号	希釈
グルカゴン	マウス	Sigma-Aldrich Co. LLC/G2654	1:250
インスリン	ウサギ	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA/3014B	1:10
NKX6. 1	マウス	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa/F55A12	1:50
NKX2. 2	マウス	Developmental Studies Hybridoma Bank/74. 5A5	1:100
PDX1	マウス	BD BioSciences, San Jose, CA/562161	1:50
Ki67	マウス	BD Biosciences/558595	1:20
Pax6	マウス	BD Biosciences, 561552	1:20
クロモグラニンA	ウサギ	Dako, Carpinteria, CA/A0430	1:40
ISL-1	マウス	BD Biosciences/562547	1:20
NeuroD1	マウス	BD Bioscience/563001	1:40
FOXA2	マウス	BD Bioscience/561589	1:80
OCT3/4	マウス	BD Biosciences/560329	1:20

10

## 【0147】

(実施例2)

M A F A 及びインスリン発現の一方又は両方を著しく上方調節することができる小分子を特定するためのスクリーニング

20

この実施例は、膵細胞に向かう細胞の成熟を著しく増強することができる小分子を特定することを目的とする。経路42におけるヒト胚幹細胞株H1(WA01)の細胞を、単一細胞として $1 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>で、M A T R I G E L (商標)(1:30希釈)コーティングされた皿上で、D M E M - F 1 2、G l u t a M A X (商標)(1:100希釈)、0.25mMアスコルビン酸、100ng/mLのF G F 2 (R & D s y s t e m s, M N)、1ng/mLのT G F -  $\beta$ 、I T S - X (1:100希釈)、2% F A F - B S A、及び20ng/mLのI G F - 1から構成される、10 $\mu$ MのY - 2 7 6 3 2が補充された培地中に播種した。播種から48時間後、培養物を不完全P B S (M g 又はC a を含まないリン酸緩衝生理食塩水)中で洗浄し、続いて1倍T r y p L E (商標)発現酵素(L i f e S c i e n c e、カタログ番号14190)で3~5分間、37

で培養した。放出された細胞を、D M E M - F 1 2ですすぎ、1000rpmで5分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、10 $\mu$ M Y - 2 7 6 3 2、1倍G l u t a M A X (商標)、0.25mMアスコルビン酸、100ng/mL F G F 2、1ng/mL T G F -  $\beta$ 、1:100希釈のI T S - X、2% F A F - B S A、及び20ng/mLのI G F - 1が補充されたD M E M - F 1 2中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、約 $1.3 \sim 1.5 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>で播種した。培養物を培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の48時間後に分化が開始し、約90%の開始培養密度をもたらした。別途記載されない限り、実施例で使用した培地、試薬、分子などの供給元は、実施例1に記載のとおりである。

30

## 【0148】

ステージ1(3日間):

M A T R I G E L (商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に1倍不完全D P B Sですすぎ、次いで以下のステージ1培地、すなわち、0.5% F A F - B S A、0.0012g/mL重炭酸ナトリウム、1倍濃度のG l u t a M A X (商標)、4.5mM D - グルコース、100ng/mL G D F 8、及び1 $\mu$ M M C X化合物が補充されたM C D B - 1 3 1培地中で1日培養した。次いで、細胞を、0.5% F A F - B S A、0.0012g/mL重炭酸ナトリウム、1倍濃度のG l u t a M A X (商標)、4.5mMのD - グルコース、100ng/mL G D F 8、及び0.1 $\mu$ M M C X化合物が補充されたM C D B - 1 3 1培地中でもう1日培養した。次いで、細胞を、0.5% F A F - B S A、0.0012g/mL重炭酸ナトリウ

40

50



ム、1倍濃度のG l u t a M A X (商標)、4.5 mM D - グルコース、及び100 ng / m L G D F 8 が補充されたM C D B - 1 3 1 培地中でもう1日培養した。

【0149】

ステージ2 (2日間) :

細胞を最初に1倍不完全D P B Sですすぎ、次いで2日間、0.5% F A F - B S A、0.0012 g / m L 重炭酸ナトリウム、1倍濃度のG l u t a M A X (商標)、4.5 mM D - グルコース、0.25 mM アスコルビン酸、及び25 ng / m L F G F 7 が補充されたM C D B - 1 3 1 培地で処理した。

【0150】

ステージ3 (2日間) :

細胞を、1:200希釈のI T S - X、4.5 mM グルコース、1倍濃度のG l u t a M A X (商標)、0.0025 g / m L 重炭酸ナトリウム、2% F A F - B S A、0.25 μ M S A N T - 1、1 μ M R A、25 ng / m L F G F 7、0.25 mM アスコルビン酸、200 n M T P B、及び100 n M L D N - 1 9 3 1 8 9 が補充されたB L A R カスタム培地で2日間処理した。

【0151】

ステージ4 (3日間) :

細胞を、1:200希釈のI T S - X、4.5 mM グルコース、1倍濃度のG l u t a M A X (商標)、0.0025 g / m L 重炭酸ナトリウム、2% F A F - B S A、0.25 μ M S A N T - 1、100 n M R A、2 ng / m L F G F 7、100 n M L D N - 1 9 3 1 8 9、0.25 mM アスコルビン酸、及び200 n M T P B が補充されたB L A R 培地で3日間処理した後、ステージ4の最後に、平板皿上で培養された細胞を、10 μ M のY - 2 7 6 3 2 で4時間処理し、P B Sですすぎ、1倍濃度のT r y p L E (商標)で5分間、室温で処理した後、酵素を除去し、B L A R 基本培地ですすぎ、細胞スクレーパによって細胞をこすり取った。結果として生じる細胞の懸濁液を、 $0.5 \sim 0.75 \times 10^6$ 細胞 (5 ~ 10 μ L 分量) の密度で、6ウェルプレートの0.4ミクロン多孔性細胞培養フィルター挿入物上に播種した。1.5 mL の培地を、各挿入物の底部に添加し、フィルターの尖端側には更なる培地を添加しなかった。培地は、ステージ5、6、及び7の期間に毎日交換した。

【0152】

ステージ5 (3日間) :

空気 - 液体界面で培養された細胞を、1:200希釈のI T S - X、20 mM グルコース、1倍G l u t a M A X (商標)、0.0015 g / m L 重炭酸ナトリウム、2% F A F - B S A、0.25 mM アスコルビン酸、10 μ g / m L のヘパリン、10 μ M Z n S O<sub>4</sub>、0.25 μ M S A N T - 1、50 n M R A、100 n M L D N - 1 9 3 1 8 9、1 μ M のT 3 (3, 3', 5 - トリヨード - L - チロニンナトリウム塩として)、及び10000 n M のA L K 5 阻害剤I I が補充されたB L A R 培地で3日間処理した。

【0153】

ステージ6 (7日間) :

ステージ5細胞を、空気 - 液体界面で培養し、1:200希釈のI T S - X、20 mM グルコース、1倍濃度のG l u t a M A X (商標)、0.0015 g / m L 重炭酸ナトリウム、2% F A F - B S A、0.25 mM アスコルビン酸、10 μ g / m L のヘパリン、10 μ M Z n S O<sub>4</sub>、100 n M L D N - 1 9 3 1 8 9、1 μ M T 3 (3, 3', 5 - トリヨード - L - チロニンナトリウム塩として)、100 n M 分泌酵素阻害剤X X、及び10000 n M A L K 5 阻害剤I I が補充されたB L A R 培地で7日間処理した。

【0154】

ステージ7 (7日間) :

ステージ6細胞を、空気 - 液体界面で培養し、1:200希釈のI T S - X、20 mM

10

20

30

40

50

グルコース、1倍濃度のG l u t a M A X (商標)、0.0015 g / m L 重炭酸ナトリウム、2% F A F - B S A、10 μ g / m L のヘパリン、10 μ M Z n S O<sub>4</sub>、1000 n M T 3 ( 3 , 3 ' , 5 - トリヨード - L - チロニンナトリウム塩として)、10000 n M A L K 5 阻害剤 I I、10 μ M T r o l o x が補充されたB L A R 培地で7日間処理した。

## 【 0 1 5 5 】

ステージ6又は7において、様々な小分子を添加し、それらの作用をリアルタイムP C R によって評価した。表 I I I は、評価した小分子、及びそれらがいつ添加されたかを列挙している。

## 【 0 1 5 6 】

## 【 表 3 】

表III: 評価した小分子			
化学名 / CAS番号 / 分子式	対象	小分子名 / 供給元 / カタログ番号	濃度
4-(アセチルアミノ)-N-(2-アミノフェニル)ベンズアミド / 112522-64-2 / C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤	CI-994 / Sigma Aldrich Co. LLC. / EPI109A	S6で1 μ M
(E)-N-ヒドロキシ-3-[4-[[2-(2-メチル-1H-インドール-3-イル)エチルアミノ]メチル]フェニル]プロパ-2-エンアミド / 404950-80-7 / C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	両方のヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1)活性の阻害剤	Panobinostat(LBH-589) / Sigma Aldrich Co. LLC / EPI009B	S6で1 μ M
N-ヒドロキシ-N'-フェニル-オクタンジアミド / 149647-78-9 / C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	ヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1)及び3(HDAC3)の阻害剤	SAHA / Sigma Aldrich Co. LLC. / EPI009C	S6で1 μ M
N, N'-ジヒドロキシオクタンジアミド / 38937-66-5 / C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	HDAC1を阻害することが示されたヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤	SBHA / Sigma Aldrich Co. LLC. / EPI009D	S6で1 μ M
6-(1,3-ジオキソ-1H,3H-ベンゾ[デ]イソキノリン-2-イル)-ヘキサン酸ヒドロキシアミド / 287383-59-9 / C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤	Scriptaid / Sigma Aldrich Co. LLC. / EPI009E	S6で1 μ M
[R-(E, E)]-7-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-N-ヒドロキシ-4,6-ジメチル-7-オキソ-2,4-ヘプタジエンアミド / 58880-19-6 / C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤	トリコスタチンA / Sigma Aldrich Co. LLC. / EPI009F	S6で1 μ M
N1-[4-[(2R,4R,6S)-4-[[4,5-ジフェニル-2-オキサゾリル]チオ]メチル]-6-[4-(ヒドロキシメチル)フェニル]-1,3-ジオキサソ-2-イル]フェニル]-N8-ヒドロキシ-オクタンジアミド / 537049-40-4 / C <sub>41</sub> H <sub>43</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S	ヒストン脱アセチル化酵素6の阻害剤	Tubacin / Sigma Aldrich Co. LLC. / EPI009G	S6で1 μ M

## 【 0 1 5 7 】

10

20

30

40

【表4】

表III: 評価した小分子(続き)			
1, 4-ジメトキシ-9(10H)- アクリジンチオン/141992- 47-4/C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> S	サイクリン依存性 キナーゼ(cdk)4 阻害剤	NSC625987/Tocris Bioscience/2152	S6で1 μM
4-[4, 5-ジヒドロ-5-(4- メトキシフェニル)-3-フェニル- 1H-ピラゾール-1-イル] ベンゼンスルホンアミド/71203- 35-5/C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	Cdc42 GTPaseの 阻害剤	ML141/Tocris Bioscience/4266	S6で1 μM
N-(2-クロロフェニル)-6- (ペリジジン-4-イル)イミダゾ [1, 2-a]ピリジン-3- カルボキシアミドシウ酸塩/ 1198408-39-7/ C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> CIN <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	EphB3受容体 チロシンキナーゼの 阻害剤	LDN211904(EphB3 阻害剤)/EMD Millipore Corporation, MA/ 428201-5MG	S6で1 μM
(S)-2-(4-(4- クロロフェニル)-2, 3, 9- トリメチル-6H-チエノ[3, 2-f] [1, 2, 4]トリアゾロ[4, 3-a] [1, 4]ジアゼピン-6-イル) アセトアミド/1446144-04- 2/C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> CIN <sub>5</sub> OS	プロモドメイン及び 特異的末端(BET) ファミリータンパク質 BRD4のCPIe阻害剤	CPI203/Xcess Biosciences, Inc., San Diego, CA/M60124-2	S6で1 μM
1-(3, 6-ジプロモ-9H- カルバゾール-9-イル)-3- (フェニルアミノ)プロパン-2- オル/301353-96-8/ C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	前神経原性、神経保護性 小分子	P7C3/Xcess Biosciences, Inc. / M60017-2	S6で1 μM
2-(4-ベンゾイルフェノキシ)- N-(1-ベンジルピペリジン-4- イル)アセトアミド/924416- 43-3/C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	アジポネクチン受容体 (AdipoR)の アゴニスト	AdipoRon/Xcess Biosciences, Inc. / M60152-2s	S6で1 μM
(S)-2-((S)-2-(3, 5- ジフルオロフェニル)-2- ヒドロキシアセトアミド)-N-((S)- 5-メチル-6-オキソ-6, 7- ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, d] アゼピン-7-イル)プロパンアミド /209984-57-6/ C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	γ分泌酵素の阻害剤	LY411575/Xcess Biosciences, Inc. / M60078-5s	S6で1 μM
2-(4-(tert-ブチル)フェニル) -1H-ベンゾ[d]イミダゾール/ 49671-76-3/C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>	PGC-1αの 転写活性因子	ZLN005/Xcess Biosciences, Inc. / M60142-5s	S6で1 μM
2-クロロ-4-フルオロ-3- メチル-N-(2-(4- メチルピペラジン-1-イル)- 5-ニトロフェニル)ベンズアミド/ 1422389-91-O/ C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> ClFN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	WDR5-MLL 相互作用のアゴニスト	WDR5-C47/Xcess Biosciences, Inc. / M60118-2	S6で1 μM
3-ピリジニルメチル[[4-[[2- アミノフェニル)アミノ]カルボニル] フェニル]メチル]カルバメート/ 209783-80-2/C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	HDAC阻害剤、抗増殖、 HDAC3よりも優先して HDAC1を阻害する	MS-275/Sigma Aldrich Co LLC. / EPS002	S6で1 μM
4-ジメチルアミノ)-N-[7- (ヒドロキシアミノ)-7- オキソヘプチル]-ベンズアミド/ 251456-60-7/C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	HDAC阻害剤、 HDAC1よりも HDAC6に対して 選択的な亜型	M344/Sigma Aldrich Co LLC. /M5820	S6で1 μM
1-[[4-エチル-5-[5-(4- フェノキシフェニル)-1, 2, 4- オキサジアゾール-3-イル]-2- チエニル]メチル]-3- アゼチンカルボン酸/913827 -99-3/C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	スフィンゴシン-1- リン酸塩受容体1 (S1P1)アゴニスト、 S1P3よりもヒト S1P1に対して 5000倍の選択性を 呈する	CS2100/Tocris BioSciences, Bristol, BS11 0QL, UK/4543	S6で1 μM

10

20

30

40

【表5】

表III: 評価した小分子(続き)			
2-(4-ブromo-2-クロロフェノキシ)-N-[[[4-[(4,6-ジメチル-2-ピリミジニル)アミノ]スルホニル]フェニル]アミノ]チオキソメチル]アセトアミド/ 587841-73-4/ C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> BrClN <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	Cdc42の選択的阻害剤	ZCL278/Tocris Bioscience/4794	S6で1 μM
N-(4-(2-アミノ-3-クロロピリジン-4-イルオキシ)-3-フルオロフェニル)-4-エトキシ-1-(4-フルオロフェニル)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-カルボキシアミド/1025720-94-8/ C <sub>25</sub> H <sub>19</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	c-Met, Axl, Ron、及びTyro3のMet関連阻害剤	BMS-777607/Selleck Chemicals, Houston, TX/S1561	S6で1 μM
N-(2,6-ジフルオロフェニル)-5-(3-(2-(5-エチル-2-メトキシ-4-(4-(4-(メチルスルホニル)ピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル)フェニルアミノ)ピリミジン-4-イル)H-イミダゾ[1,2-a]ピリジン-2-イル)-2-メトキシベンズアミド/ 1089283-49-7/ C <sub>44</sub> H <sub>47</sub> F <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>5</sub> S	IGF-1R及びIRの阻害剤	GSK1904529A/Selleck Chemicals/S1093	S6で1 μM
N-(4-(3-(2-アミノピリミジン-4-イル)ピリジン-2-イルオキシ)フェニル)-4-(4-メチルチオフェン-2-イル)フタラジン-1-アミン/945595-80-2/ C <sub>28</sub> H <sub>21</sub> N <sub>7</sub> OS	オーロラA/B/Cのpan-オーロラキナーゼ阻害剤	AMG-900/Selleck Chemicals/S2719	S6で1 μM
5-((1-(3-イソプロピル-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ピペリジン-4-イル)メトキシ)-2-(4-(メチルスルホニル)フェニル)ピリジン/1032823-75-8/ C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	GPR119アゴニスト	GSK1292263/Selleck Chemicals/S2149	S6で1 μM
4-(5-アミノ-1-(2,6-ジフルオロベンゾイル)-1H-[1,2,4]トリアゾール-3-イルアミノ)-ベンゼンスルホンアミド/ 443797-96-4/ C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S	CDK1/2に対して最高の能力を有するpan-CDK阻害剤	JNJ-7706621/Selleck Chemicals/S1249	S6で1 μM
6-(ジフルオロ(6-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-[1,2,4]トリアゾロ[4,3-b]ピリダジン-3-イル)メチル)キノリン/ 943540-75-8/ C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> F <sub>2</sub> N <sub>7</sub>	c-Metの阻害剤	JNJ-38877605/ Selleck Chemicals/ S1114	S6で1 μM
(R)-4-(8-シクロペンチル-7-エチル-5-メチル-6-オキソ-5,6,7,8-テトラヒドロプテリジン-2-イルアミノ)-3-メトキシ-N-(1-メチルピペリジン-4-イル)ベンズアミド/755038-02-9/ C <sub>28</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	PIK1阻害剤	BI2536/Selleck Chemicals/S1109	S6で1 μM

10

20

30

40

【0159】

【表 6】

表III: 評価した小分子 (続き)			
N-ヒドロキシ-2-(4-((1-メチル-1H-インドール-3-イル)メチルアミノ)メチル)ピペリジン-1-イル)ピリミジン-5-カルボキシアミド/875320-29-9/C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	HDAC1に対して最高の能力、HDAC6及び7に対して最低の能力を有するHDAC阻害剤、第2相	Quisinostat(JNJ-26481585)/Selleck Chemicals/S1096	S6で1 μM
シクロヘキシル2,7,7-トリメチル-4-(4-ニトロフェニル)-5-オキソ-1,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロキノリン-3-カルボキシレート/313967-18-9/C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Notchシグナル伝達の阻害剤	FLI-06/Selleck Chemicals/S7399	S6で1 μM
4H-[1,2,4]トリアゾロ[4,3-a][1,4]ベンゾジアゼピン-4-アセトアミド、6-(4-クロロフェニル)-N-エチル-8-メトキシ-1-メチル-, (4S)-/1260907-17-2/C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	BETタンパク質の阻害剤	I-BET-762 (GSK525762)/Selleck Chemicals/S7189	S6で1 μM
N-(6-(4-(2-((4-((4-メチルピペラジン-1-イル)メチル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル)アミノ)-2-オキソエチル)フェノキシ)ピリミジン-4-イル)シクロプロパンカルボキシアミド/1421227-53-3/C <sub>29</sub> H <sub>31</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	齧歯類及びヒト霊長類膵島内で膵β細胞増殖を促進する小分子	WS6/Xcess Biosciences, Inc. / M60097-2s	S6で1 μM
1-[3-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-5-ブロモ-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-7-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル]メチル](イソプロピル)アミノ]プロピル]-3-[4-(2,2-ジメチルエチル)フェニル]ウレア/-----/C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> BrN <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	DOT1Lメチルトランスフェラーゼ阻害剤	SGC0946/Selleck Chemicals/S7079	S6で1 μM
9H-プリン-6-アミン, 9-[5-デオキシ-5-[[[シス-3-[2-[6-(1,1-ジメチルエチル)-1H-ベンズイミダゾール-2-イル]エチル]シクロブチル](1-メチルエチル)アミノ]-β-D-リボフラノシル]-/1380288-87-8/C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> N <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	タンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤	EPZ5676/Selleck Chemicals/S7062	S6で1 μM
(2R)-2-(N-(2-フルオロ-4-(1,2,4-オキサジアゾール-3-イル)ベンジル)-4-クロロフェニルスルホンアミド)-5,5,5-トリフルオロペンタンアミド/1146699-66-2/C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> ClF <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	Aβ40及びAβ42のγ分泌酵素阻害剤	Avagacestat(BMS-708163)/Selleck Chemicals/S1262	S6で1 μM
[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシアミド、N-[(1,2-ジヒドロ-4,6-ジメチル-2-オキソ-3-ピリジニル)メチル]-5-[エチル(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)アミノ]-4-メチル-4'-(4-モルホリニルメチル)-/1403254-99-8/C <sub>34</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	EZH2阻害剤	EPZ-6438/Selleck Chemicals/S7128	S6で1 μM

10

20

30

40

【表 7】

表III: 評価した小分子(続き)			
N-(4-(6,7-ジメトキシキノリン-4-イルオキシ)フェニル)-N-(4-フルオロフェニル)シクロプロパン-1,1-ジカルボキシアミド/849217-68-1/C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	VEGFR2阻害剤	カボザンチニブ(XL184、BMS-907351)/Selleck Chemicals/S1119	S6で1 μM
3-(ベンゾ[d]チアゾール-2-イル)-6-エチル-7-ヒドロキシ-8-(ピペリジン-1-イルメチル)-4H-クロメン-4-オン/222716-34-9/C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	Skp2阻害剤	SKP2-C25/Xcess Biosciences, Inc. M60136-2s	S6で1 μM
5-クロロ-2-[(E)-2-[フェニル(ピリジン-2-イル)メチリデン]ヒドラジン-1-イル]ピリジン/199596-05-9/C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> CIN <sub>4</sub>	Jumonjiヒストン脱メチル化酵素阻害剤	JIB-04/Selleck Chemicals/S7281	S6で1 μM
1H-1,2,4-トリアゾール-3,5-ジアミン,1-(6,7-ジヒドロ-5H-ベンゾ[6,7]シクロヘプタ[1,2-c]ピリダジン-3-イル)-N3-[(7S)-6,7,8,9-テトラヒドロ-7-(1-ピロリジニル)-5H-ベンゾシクロヘプテン-2-イル]-/1037624-75-1/C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> N <sub>8</sub>	Axlの阻害剤	R428(BGB324)/Selleck Chemicals/S2841	S7で1 μM
2-クロロ-3-[2-(2,4-ジクロロフェノキシ)エトキシ]-6-(フルオロメチル)ピリジン/1355026-60-6/C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> FNO <sub>2</sub>	強力なスフィンゴシン-1-リン酸塩受容体4(S1P4)アゴニスト	CYM50260/Tocris Bioscience/4677	S6~S7で2 μM
N,N-ジシクロヘキシル-5-シクロプロピル-3-イソキサゾールカルボキシアミド/945128-26-7/C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	選択的スフィンゴシン-1-リン酸塩受容体3(S1P3)アロステリック	CYM5541/Tocris Bioscience/4897	S6~S7で2 μM
5-[4-フェニル-5-(トリフルオロメチル)チオフェン-2-イル]-3-[3-(トリフルオロメチル)フェニル]1,2,4-オキサジアゾール/256414-75-2/C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> OS	強力な選択的スフィンゴシン-1-リン酸塩1(S1P1)受容体アゴニスト	SEW2871/Tocris Bioscience/2284	S6~S7で2 μM
[9S-(9α,10β,11β,13α)]-2,3,10,11,12,13-ヘキサヒドロ-10-メトキシ-9-メチル-11-(メチルアミノ)-9,13-エポキシ-1H,9H-ジインドロ[1,2,3-gh:3',2',1'-lm]ピロロ[3,4-i][1,7]ベンゾジアゾニン-1-オン/62996-74-1/C <sub>28</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	広域スペクトルタンパク質キナーゼ阻害剤	スタウロスポリン/Tocris Bioscience/1285	S6~S7で10nM

10

20

30

40

## 【0161】

小分子での処理後のインスリン及びMAFAの発現のリアルタイムPCR解析のデータを描くグラフである図8A~8Eに示されるように、EPZ-5676(タンパク質メチルトランスフェラーゼDOT1Lの阻害剤)及びAXL阻害剤(R428)の添加は、それぞれステージ6及びステージ7での未処理の培養物と比較して、MAFAの発現を著しく上方調節した。

## 【0162】

(実施例3)(仮説)

懸濁培養中でインスリン、PDx-1、NKx6.1、及びMAFAを共発現する内分泌細胞の生成

ヒト胚幹細胞株H1(WA01)の細胞を、単一細胞として1×10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>で、

50

MATRIGEL (商標) (1:30希釈)でコーティングされた皿上で、DMEM-F12、GlutaMAX (商標) (1:100希釈)、0.25mMアスコルビン酸、100ng/mLのFGF2 (R&D systems, MN)、1ng/mLのTGF- $\beta$ 1、ITS-X (1:100希釈)、2% FAF-BSA、及び20ng/mLのIGF-1から構成される、10 $\mu$ MのY-27632が補充された培地中に播種した。播種から48時間後、培養物を不完全PBS (Mg又はCaを含まないリン酸緩衝生理食塩水)中で洗浄し、続いて1倍TrypLE (商標)発現酵素で3~5分間、37℃で培養する。放出された細胞を、DMEM-F12ですすぎ、1000rpmで5分間回転させる。結果として生じる細胞ペレットを、10 $\mu$ M Y-27632、1倍GlutaMAX (商標)、0.25mMアスコルビン酸、100ng/mL FGF2、1ng/mL TGF- $\beta$ 1、ITS-X (1:100希釈)、2% FAF-BSA、及び20ng/mLのIGF-1が補充されたDMEM-F12中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、約1.3~1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>で播種する。培養物を培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の48時間後に分化が開始し、約90%の開始培養密度をもたらす。ステージ1~ステージ4は、平坦接着培養上で維持され、一方ステージ5~7は、懸濁培養において維持される。

10

## 【0163】

ステージ1 (3日間) :

MATRIGEL (商標) (1:30希釈)でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで以下のステージ1培地、すなわち、0.5% FAF-BSA、1.2g/1000mL重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutaMAX (商標)、4.5mM D-グルコース、100ng/mL GDF8、及び1 $\mu$ M MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中で1日培養する。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.2g/1000mL重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutaMAX (商標)、4.5mM D-グルコース、100ng/mL GDF8、及び0.1 $\mu$ MのMCX化合物が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養する。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.2g/1000mL重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutaMAX (商標)、4.5mM D-グルコース、及び100ng/mL GDF8が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養する。

20

## 【0164】

ステージ2 (2日間) :

細胞を最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで2日間、0.5% FAF-BSA、1.2g/1000mL重炭酸ナトリウム、1倍濃度のGlutaMAX (商標)、4.5mM D-グルコース、0.25mMアスコルビン酸、及び25ng/mL FGF7が補充されたMCDB-131培地で処理する。

30

## 【0165】

ステージ3 (2日間) :

細胞を、1:200希釈のITS-X、4.5mMグルコース、1倍濃度のGlutaMAX (商標)、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25 $\mu$ M SANT-1、1 $\mu$ M RA、25ng/mL FGF7、0.25mMアスコルビン酸、200nM TPB、及び100nM LDN-193189、TPBが補充されたBLARカスタム培地で2日間処理する。

40

## 【0166】

ステージ4 (3日間) :

細胞を、1:200希釈のITS-X、4.5mMグルコース、1倍濃度のGlutaMAX (商標)、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25 $\mu$ M SANT-1、100nM RA、2ng/mL FGF7、100nM LDN-193189、0.25mMアスコルビン酸、及び200nM TPBが補充されたBLAR培地で3日間処理した後、ステージ4の最後に、平板皿上で培養された細胞を、10 $\mu$ MのY-27632で4時間処理し、PBSですすぎ、1倍濃度のStemP

50

ro (登録商標) Accutase (登録商標) 酵素 (Life Technologies、# A11105-01) で5分間、室温で処理し、酵素を除去して、BLAR基本培地ですすぎ、細胞スクレーパを使用して細胞をこすり取り、細胞集団に分割する(100ミクロン未満)。細胞集団を、使い捨てポリスチレン125mLスピナーフラスコ(Corning)へと移し、下で指定されるステージ5培地を含む懸濁液中で80~100rpmで回転させる。

#### 【0167】

ステージ5(3日間)：

集団として調製されたステージ4細胞を、1:200希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1倍GlutaMAX(商標)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25mMアスコルビン酸、10 $\mu$ g/mLのヘパリン、10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、0.25 $\mu$ M SANT-1、50nM RA、100nM LDN-193189、1 $\mu$ MのT3(3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、及び10000nMのALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中の懸濁液中で3日間培養する。

10

#### 【0168】

ステージ6(7日間)：

ステージ5細胞を、懸濁液中で培養し、1:200希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25mMアスコルビン酸、10 $\mu$ g/mLのヘパリン、10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、100nM LDN-193189、1 $\mu$ M T3(3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、100nM 分泌酵素阻害剤XX、及び10000nM ALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地で7日間処理する。

20

#### 【0169】

ステージ7(15日間)：

ステージ6細胞を、懸濁液中で培養し、1:200希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1倍濃度のGlutaMAX(商標)、0.0015g/mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10 $\mu$ g/mLのヘパリン、10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、1nM T3(3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、10000nM ALK5阻害剤II、10 $\mu$ M Trolox、1mM N-アセチルシステイン、及び2 $\mu$ M AXL阻害剤(R428)が補充されたBLAR培地で最大15日間処理する。

30

#### 【0170】

ステージ5~7において、細胞集団の分量を除去し、PCR、FACS、及び免疫組織化学によって、インスリン、NKX6.1、PDX-1、MAFAの共発現について特徴付ける。こうした試験の結果は、同一細胞及び細胞の集団内でインスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAの共発現を示すことが予想され、細胞集団の少なくとも約10%が、こうした発現を示した。

#### 【0171】

(実施例4)

AXL及び共リガンドGAS6のmRNA発現は、ステージ7又はヒト臍島細胞に対して非常に低い

40

ヒト胚幹細胞株H1(WA01)の細胞を、単一細胞として1 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上で、Essential 8(商標)(「E8」)(BD Biosciences、カタログ番号356231)から構成される培地中に播種した。播種から48時間後に、培養物を1倍不完全PBSで洗浄し、続いて1倍TrypLE(商標)発現酵素(Life Science、カタログ番号14190)で3~5分間、37 $^{\circ}$ Cで培養した。放出された細胞を、E8ですすぎ、1000rpmで5分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、10

50



$\mu\text{M}$  Y - 27632 が補充された E8 中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、 $1.3 \sim 1.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  で播種した。培養物を E8 培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の 48 時間後に分化が開始し、約 90% の開始培養密度をもたらした。

【0172】

ステージ 1 (3 日間) :

MATRIGEL (商標) (1:30 希釈) でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に 1 倍不完全 DPBS ですすぎ、次いで以下のステージ 1 培地、すなわち、0.5% FAF-BSA、1.5 g / 1000 mL 重炭酸ナトリウム、1 倍濃度の Glutamax (商標)、4.5 mM D-グルコース、100 ng / mL GDF8、及び 1.5  $\mu\text{M}$  MCX 化合物が補充された MCDB - 131 培地中で 1 日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5 g / 1000 mL 重炭酸ナトリウム、1 倍濃度の Glutamax (商標)、4.5 mM D-グルコース濃度、100 ng / mL GDF8、及び 0.1  $\mu\text{M}$  MCX 化合物が補充された MCDB - 131 培地中であらう 1 日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5 g / 1000 mL 重炭酸ナトリウム、1 倍濃度の Glutamax (商標)、4.5 mM D-グルコース、及び 100 ng / mL GDF8 が補充された MCDB - 131 培地中であらう 1 日培養した。

10

【0173】

ステージ 2 (2 日間) :

細胞を最初に 1 倍不完全 DPBS ですすぎ、次いで 2 日間、0.5% FAF-BSA、1.5 g / 1000 mL 重炭酸ナトリウム、1 倍濃度の Glutamax (商標)、4.5 mM D-グルコース、0.25 mM アスコルビン酸、及び 50 ng / mL FGF7 が補充された MCDB - 131 培地で培養した。

20

【0174】

ステージ 3 (2 日間) :

細胞を、1:100 希釈の ITS - X、1 倍濃度の Glutamax (商標)、4.5 mM D-グルコース、2.5 g / 1000 mL 重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25  $\mu\text{M}$  SANT - 1、1  $\mu\text{M}$  RA、25 ng / mL FGF7、0.25 mM アスコルビン酸、300 nM TPB、及び 100 nM LDN - 193189 が補充された BLAR カスタム培地中で 2 日間培養した。

30

【0175】

ステージ 4 (3 日間) :

細胞を、1:100 希釈の ITS - X、1 倍濃度の Glutamax (商標)、4.5 mM D-グルコース、2.5 g / 1000 mL 重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25  $\mu\text{M}$  SANT - 1、0.1  $\mu\text{M}$  RA、2 ng / mL FGF7、100 nM LDN - 193189、0.25 mM アスコルビン酸、及び 200 nM TPB が補充された BLAR 培地中で 3 日間培養し、次いでステージ 4 の最後に、平板皿上で培養された細胞を、10  $\mu\text{M}$  の Y - 27632 で 4 時間処理し、1 倍不完全 PBS ですすぎ、1 倍 TrypLE (商標) で 3 ~ 5 分間、室温で処理した。酵素を除去し、細胞を放出して BLAR 培地ですすぎ、使い捨てポリスチレン 125 mL スピナーフラスコへと移し、1000 rpm で 3 分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、単一細胞として、約  $0.5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度で、フィルター挿入物 (BD Biosciences、カタログ番号 3420) 上に再懸濁した (合計 25 万 ~ 50 万細胞 / スポットの場合、スポット当たり 5 ~ 10  $\mu\text{L}$ )。各スポット領域は、添加された細胞の体積に応じて、直径約 1 ~ 2 mm と測定された。6 ウェル挿入物の場合、1.5 mL / ウェルを各挿入物の底部に添加したが、10 cm フィルター挿入物の場合、8 mL を添加した。典型的に、6 ウェル挿入物の 1 ウェル当たり 20 ~ 15 スポットを使用し、10 cm 挿入物の場合、80 ~ 90 スポットを使用した。

40

【0176】

ステージ 5 (3 日間) :

50

ステージ4細胞を、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10 $\mu$ g/mLのヘパリン、10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、0.25 $\mu$ M SANT-1、0.05 $\mu$ M RA、100nM LDN-193189、1 $\mu$ MのT3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、及び10 $\mu$ MのALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中で3日間培養した。

【0177】

ステージ6(7日間):

ステージ5細胞を、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10 $\mu$ g/mLのヘパリン、10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、100nM LDN-193189、1 $\mu$ M T3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、100nM 分泌酵素阻害剤XX、及び10 $\mu$ M ALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中で7日間培養した。

10

【0178】

ステージ7(7日間):

ステージ6細胞を、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/L重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10 $\mu$ g/mLのヘパリン、10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、1 $\mu$ M T3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、10 $\mu$ M ALK5阻害剤II、1mM N-アセチルシステイン、及び2 $\mu$ M AXL阻害剤(R428)が補充されたBLAR培地中で7日間培養した。

20

【0179】

ステージ4の3日目、ステージ5の3日目、ステージ6の3日目、及びステージ7の7日目において、mRNAを収集し、AXL及びGAS6の発現を、未分化ヒト幹細胞及び屍体ヒト臍島(Prodo Labs, California)と比較して評価した。図9に描かれるように、AXLの発現は、未分化幹細胞中に高レベルで存在した。しかしながら、幹細胞の、臍内胚葉、臍内分泌、及び未成熟細胞への分化は、AXL発現の急落をもたらした。更に、ステージ4~7では、GAS6発現が低レベルで維持された。AXLの発現もまた、未分化幹細胞と比較して、ヒト臍島において著しく低かった。これらの結果は、ステージ6及び7細胞が、非常に低いAXLの発現を有することを示す。

30

【0180】

(実施例5)

R428は、AXL及び多くの追加のキナーゼを阻害する

異なるキナーゼを標的とするためのAXL阻害剤R428の効率を、キナーゼプロファイリングサービスによって、100 $\mu$ M ATP濃度(EMD Millipore)を使用して評価した。R428を、1 $\mu$ M及び10 $\mu$ Mで試験した。表IVは、キナーゼを標的とする際の効率に従ってプロファイルされたキナーゼを列挙し、より小さい数字は、特定キナーゼのより頑強な阻害を示す。

【0181】

## 【表 8】

表 I V - R 4 2 8 のキナーゼプロファイリング

キナーゼ	R428	R428
	1001010@1 $\mu$ M	1001010@10 $\mu$ M
ALK4(h)	84	48
オーロラ-A(h)	20	3
オーロラ-B(h)	1	0
Axl(h)	-1	-1
Blk(h)	27	2
CaMKII $\beta$ (h)	76	5
CaMKI $\delta$ (h)	76	24
CDK1/シクリンB(Hh)	101	88
CDK5/p35(h)	101	94
CHK1(h)	71	23
CHK2(h)	47	9
CK2(h)	103	106
CK2 $\alpha$ 2(h)	112	97
CLK2(h)	78	28
cSRC(h)	51	10
EGFR(h)	89	40

10

20

【 0 1 8 2 】

【表 9】

表IV-R428の キナーゼプロファイリング(続き)		
Eph A2(h)	54	12
FGFR1(h)	17	1
Flt3(h)	9	1
GSK3 $\alpha$ (h)	95	105
GSK3 $\beta$ (h)	106	99
IGF-1R(h)	93	58
IKK $\beta$ (h)	86	53
IR(h)	83	24
IRAK4(h)	94	51
JAK2(h)	96	41
JAK3(h)	69	18
MAPK1(h)	108	106
Met(h)	49	-1
NEK2(h)	60	10
PAK4(h)	97	73
PDGFR $\beta$ (h)	37	21
Pim-2(h)	87	74
PKA(h)	88	35
PKB $\alpha$ (h)	87	57
PKC $\alpha$ (h)	101	96
PKC $\beta$ 1(h)	102	95
Plk1(h)	83	65
Plk3(h)	101	81
Ret(h)	1	1
ROCK-1(h)	93	41
Rsk3(h)	2	1
SAPK3(h)	106	108
SAPK4(h)	94	91
TGFBR1(h)	97	69
TrkC(h)	47	13
ZAP-70(h)	92	66
ZIPK(h)	97	46

10

20

30

## 【0183】

キナーゼプロファイリング結果は、R428が、予想どおりAXLを阻害することを示す。しかしながら、追加として、R428は、RSK3、Ret、Flt、FGFR1、オーロラA、及びオーロラBキナーゼを1 $\mu$ M及び10 $\mu$ Mで強力に阻害する。これは、MAFAの誘導におけるR428の作用機序が、AXL受容体阻害剤によるものではない場合があることを意味する。実際に、本明細書の実施例は、ステージ7におけるAXLのmRNA発現が非常に低いことを示し、MAFA発現を誘導することにおけるR428の作用機序は、AXLの阻害によるものではないが、むしろRSK3及びオーロラキナーゼなどの他のキナーゼの阻害によるものであることを強調する。

40

## 【0184】

(実施例6)

オーロラキナーゼ発現の阻害は、R428の非存在下、ステージ7におけるMAFA発現を増強した

ヒト胚幹細胞株H1(WA01)の細胞を、単一細胞として1 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上のE8培地中に播種した。約70~80%の培養密度で、培養物を1倍不完全DPBSで洗浄し、続いて1

50

倍 TrypLE (商標) 発現酵素で3~5分間、37℃で培養した。放出された細胞を、E8ですすぎ、1000rpmで5分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、10μM Y-27632が補充されたE8中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、約 $1.3 \sim 1.5 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>で播種した。培養物をE8培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の48時間後に分化が開始し、約90%の開始培養密度をもたらした。

#### 【0185】

ステージ1(3日間) :

MATRIGEL (商標) (1:30希釈)でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで以下のステージ1培地、すなわち、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mM最終グルコース濃度、100ng/mL GDF8、及び1.5μM MCX化合物が補充されたMCD B-131培地中で1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mMの最終グルコース濃度、100ng/mL GDF8、及び0.1μM MCX化合物が補充されたMCD B-131培地中でもう1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mMの最終グルコース濃度、及び100ng/mL GDF8が補充されたMCD B-131培地中でもう1日培養した。

10

#### 【0186】

ステージ2(2日間) :

細胞を1倍不完全DPBSですすぎ、次いで2日間、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mM最終グルコース濃度、0.25mMアスコルビン酸、及び50ng/mL FGF7が補充されたMCD B-131培地で培養した。

20

#### 【0187】

ステージ3(2日間) :

細胞を、1:100希釈のITS-X、10mM最終グルコース濃度、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、1μM RA、25ng/mL FGF7、0.25mMアスコルビン酸、300nM TPB、及び100nM LDN-193189が補充されたBLARカスタム培地中で2日間培養した。

30

#### 【0188】

ステージ4(3日間) :

細胞を、1:100希釈のITS-X、10mM最終グルコース濃度、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、0.1μM RA、2ng/mL FGF7、100nM LDN-193189、0.25mMアスコルビン酸、及び200nM TPBが補充されたBLAR培地中で3日間培養し、次いでステージ4の最後に、平板皿上で培養された細胞を、10μMのY-27632で4時間処理し、1倍不完全PBSですすぎ、1倍TrypLE(商標)で3~5分間、室温で処理した。酵素を除去し、細胞を放出してBLAR培地ですすぎ、使い捨てポリスチレン125mLスピナーフラスコへと移し、1000rpmで3分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、単一細胞として、約 $0.5 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>の密度で、フィルター挿入物上で再懸濁した(合計25万~50万細胞/スポットに対して1スポット当たり5~10μL)。各スポット領域は、添加された細胞の体積に応じて、直径約1~2mmと測定された。6ウェル挿入物の場合、1.5mL/ウェルを各挿入物の底部に添加したが、10cmフィルター挿入物の場合、8mLを添加した。典型的に、6ウェル挿入物の1ウェル当たり20~15スポットを使用し、10cm挿入物の場合、80~90スポットを使用した。

40

#### 【0189】

ステージ5(3日間) :

50

ステージ4細胞を、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10 $\mu$ g/mLのヘパリン、10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、0.25 $\mu$ M SANT-1、0.05 $\mu$ M RA、100nM LDN-193189、1 $\mu$ MのT3(3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、及び10 $\mu$ MのALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中で3日間培養した。

#### 【0190】

ステージ6(7日間):

ステージ5細胞を、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10 $\mu$ g/mLのヘパリン、10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、100nM LDN-193189、1 $\mu$ M T3(3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、100nM 分泌酵素阻害剤XX、及び10 $\mu$ M ALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中で7日間培養した。

10

#### 【0191】

ステージ7(7日間):

ステージ6細胞を、7日間、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/L重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10 $\mu$ g/mLのヘパリン、10 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>、1nM T3(3, 3', 5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、10 $\mu$ M ALK5阻害剤II、1mM N-アセチルシステインが補充されたBLAR培地中で培養した。一部の培養物はまた、2 $\mu$ M R428、2 $\mu$ M オーロキナーゼ阻害剤VI(4-(4-(N-ベンゾイルアミノ)アニリノ)-6-メトキシ-7-(3-(1-モルホリノ)プロポキシ)キナゾリン)(EMD Millipore、カタログ番号18941)、又は2 $\mu$ M オーロキナーゼ阻害剤II(4-(4'-ベンズアミドアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン)(EMD Millipore、カタログ番号189404)のうちの1つを含んでいた。

20

#### 【0192】

ステージ7の7日目に、mRNAを収集し、MAFA、UCN3、PDX1、NKX6.1、インスリン、及びG6PC2の発現を、未分化ヒト幹細胞と比較して評価した。図10に描かれるように、R428の除去は、MAFA発現の著しい減少をもたらした。成熟細胞の両方のマーカー、UCN3及びG6PC2発現の著しい上昇は、R428で処理されていない培養物について示され、R428は、MAFA発現を増加させるが、化合物が他の細胞成熟マーカーを低減することを示唆している。オーロキナーゼ阻害剤をR428に置換することは、MAFA発現を回復するが、G6PC2レベルを減少させない。したがって、ステージ7でのR428によるMAFA発現の誘導は、AXL阻害剤によるものではなく、オーロキナーゼの阻害によるものである可能性があった。オーロキナーゼ阻害剤IIの使用は、MAFA発現の増加及びUCN3及びG6PC2発現の維持をもたらした。

30

#### 【0193】

(実施例7)

オーロキナーゼ又はRSKの阻害は、R428の非存在下、ステージ7におけるMAFA発現の発現を増強した

40

ヒト胚幹細胞株H1(WA01)の細胞を、単一細胞として1 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>で、MATRIGEL(商標)(1:30希釈)でコーティングされた皿上のE8培地中に播種した。約70~80%の培養密度で、培養物を1倍不完全DPBSで洗浄し、続いて1倍TrypLE(商標)発現酵素で3~5分間、37 $^{\circ}$ Cで培養した。放出された細胞を、E8ですすぎ、1000rpmで5分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、10 $\mu$ M Y-27632が補充されたE8中に再懸濁し、単一細胞懸濁液を、約1.3~1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/cm<sup>2</sup>で播種した。培養物をE8培地と共に毎日供給し、以下のプロトコルに従い、播種の48時間後に分化が開始し、約90%の開始培養密度をもたらした。

50

た。

【0194】

ステージ1 (3日間) :

MATRIGEL (商標) (1:30希釈)でコーティングされた皿上で平板培養した細胞を、最初に1倍不完全DPBSですすぎ、次いで以下のステージ1培地、すなわち、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mM最終グルコース濃度、100ng/mL GDF8、及び1.5μM MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中で1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mMの最終グルコース濃度、100ng/mL GDF8、及び0.1μM MCX化合物が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。次いで、細胞を、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mMの最終グルコース濃度、及び100ng/mL GDF8が補充されたMCDB-131培地中でもう1日培養した。

10

【0195】

ステージ2 (2日間) :

細胞を1倍不完全DPBSですすぎ、次いで2日間、0.5% FAF-BSA、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、10mM最終グルコース濃度、0.25mMアスコルビン酸、及び50ng/mL FGF7が補充されたMCDB-131培地で培養した。

20

【0196】

ステージ3 (2日間) :

細胞を、1:100希釈のITS-X、10mM最終グルコース濃度、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、1μM RA、25ng/mL FGF7、0.25mMアスコルビン酸、300nM TPB、及び100nM LDN-193189が補充されたBLARカスタム培地中で2日間培養した。

30

【0197】

ステージ4 (3日間) :

細胞を、1:100希釈のITS-X、10mM最終グルコース濃度、2.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、0.25μM SANT-1、0.1μM RA、2ng/mL FGF7、100nM LDN-193189、0.25mMアスコルビン酸、及び200nM TPBが補充されたBLAR培地中で3日間培養し、次いでステージ4の最後に、平板皿上で培養された細胞を、10μMのY-27632で4時間処理し、1倍不完全PBSですすぎ、1倍TrypLE (商標)で3~5分間、室温で処理した。酵素を除去し、細胞を放出してBLAR培地ですすぎ、使い捨てポリスチレン125mLスピナーフラスコへと移し、1000rpmで3分間回転させた。結果として生じる細胞ペレットを、単一細胞として、約 $0.5 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>の密度で、フィルター挿入物上で再懸濁した(合計25万~50万細胞/スポットに対して1スポット当たり5~10μL)。各スポット領域は、添加された細胞の体積に応じて、直径約1~2mmと測定された。6ウェル挿入物の場合、1.5mL/ウェルを各挿入物の底部に添加したが、10cmフィルター挿入物の場合、8mLを添加した。典型的に、6ウェル挿入物の1ウェル当たり20~15スポットを使用し、10cm挿入物の場合、80~90スポットを使用した。

30

40

【0198】

ステージ5 (3日間) :

ステージ4細胞を、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO<sub>4</sub>、0.25μM SANT-1、0.05μM RA、100nM LDN-193189、1μMのT3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、及び10μMのALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中

50

で3日間培養した。

【0199】

ステージ6(7日間)：

ステージ5細胞を、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/1000mL重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10μM ZnSO<sub>4</sub>、100nM LDN-193189、1μM T3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、100nM 分泌酵素阻害剤XX、及び10μM ALK5阻害剤IIが補充されたBLAR培地中で7日間培養した。

【0200】

ステージ7(7日間)：

ステージ6細胞を、14日間、1:100希釈のITS-X、20mMグルコース(最終)、1.5g/L重炭酸ナトリウム、2% FAF-BSA、10μg/mLのヘパリン、10M ZnSO<sub>4</sub>、1μM T3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)、10μM ALK5阻害剤II、1mM N-アセチルシステインが補充されたBLAR培地中で培養した。一部の培養物はまた、2μM R428、2~5μM RSK阻害剤II(2-(3,5-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-アニリノ)-8-イソペンチル-5,7-ジメチル-7H-プテリジン-6-オン)(EMD Millipore、カタログ番号559286-5MG)、2~5μMオーロラキナーゼ阻害剤II(EMD Millipore、又は2~5μM RSK阻害剤II、及び2~5μMオーロラキナーゼII阻害剤の組み合わせ)のうちの1つを含んでいた。

【0201】

ステージ7の14日目に、mRNAを収集し、未分化ヒト幹細胞と比較した。図11に描かれるように、R428の除去は、MAFA発現の著しい減少をもたらした。R428をオーロラキナーゼ阻害剤IIと置換することは、MAFA発現を回復した。同様に、R428をRSK阻害剤と置換することは、MAFA発現を回復した。R428をオーロラキナーゼ阻害剤II及びRSK阻害剤と置換することは、MAFA発現を更に増強した。このデータは、R428によるMAFA発現の誘導が、AXL阻害剤によるものではなく、むしろオーロラキナーゼ、RSK、又はそれらの組み合わせの阻害によるものである可能性があったことを示す。

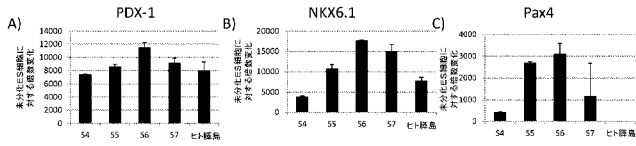
10

20

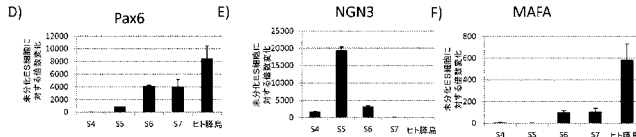
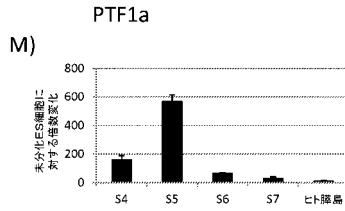
30



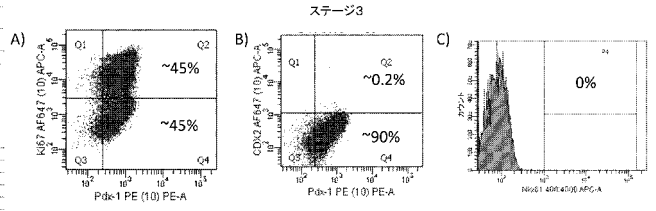
【 図 1 - 1 】



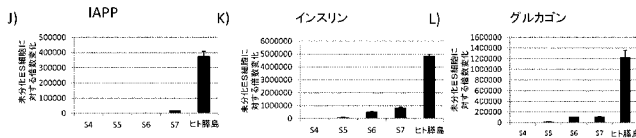
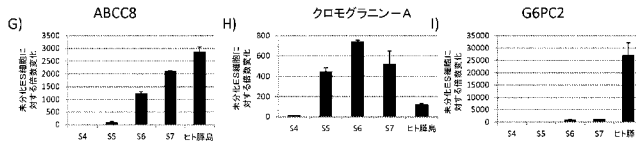
【 図 1 - 3 】



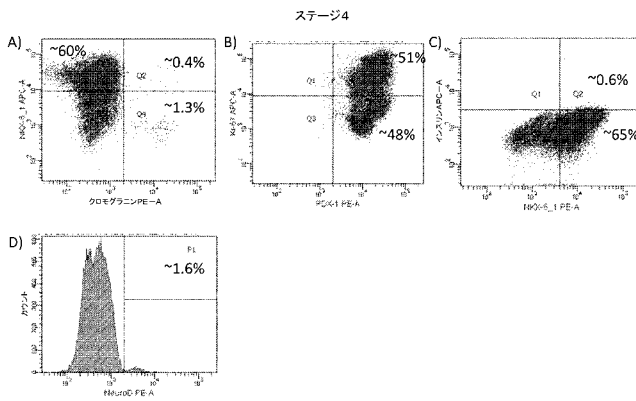
【 図 2 】



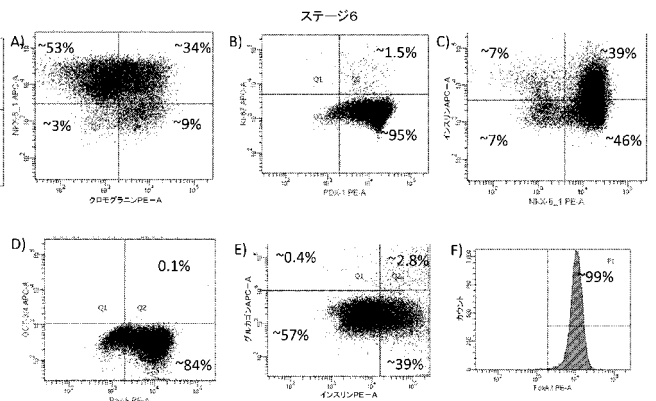
【 図 1 - 2 】



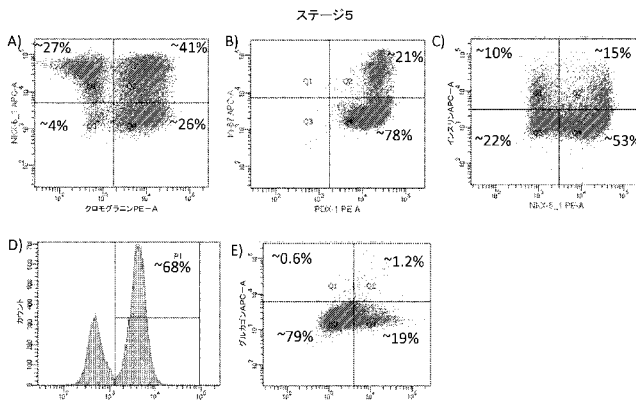
【 図 3 】



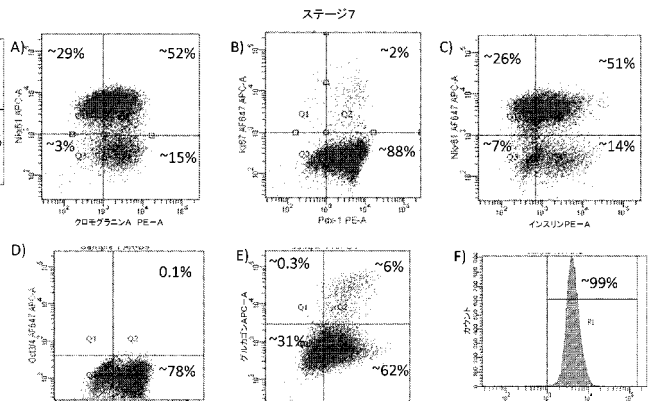
【 図 5 】



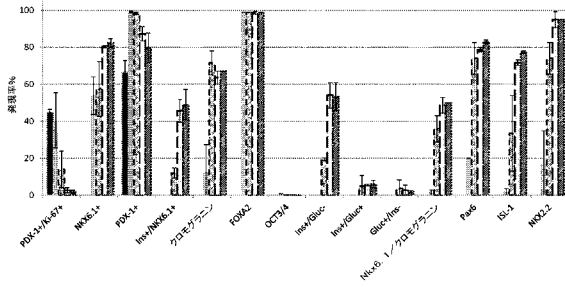
【 図 4 】



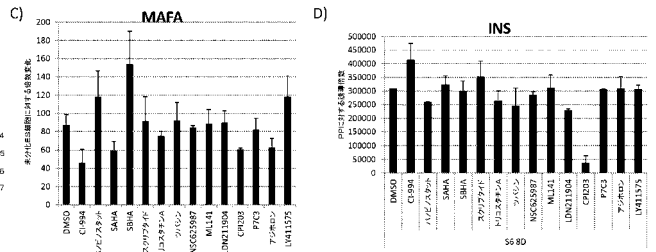
【 図 6 】



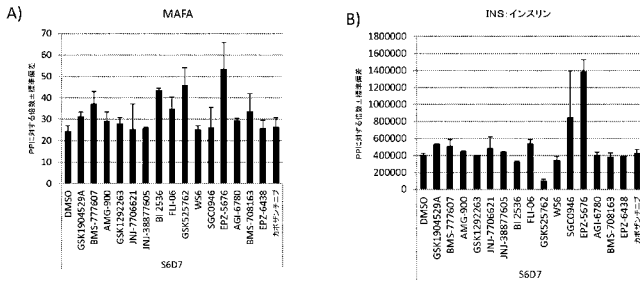
【図7】



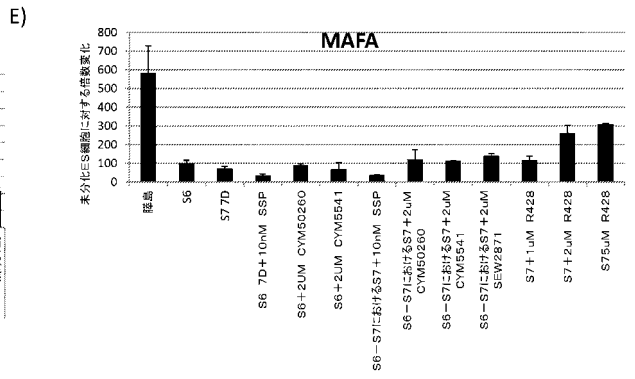
【図8-2】



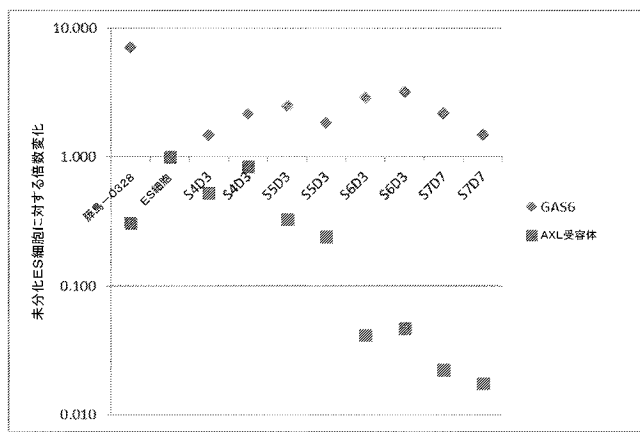
【図8-1】



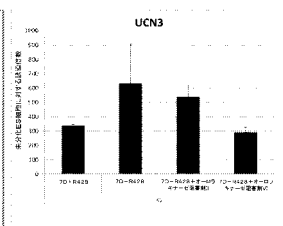
【図8-3】



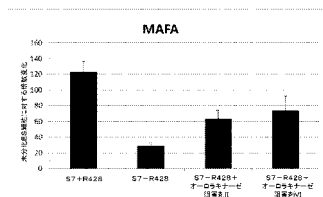
【図9】



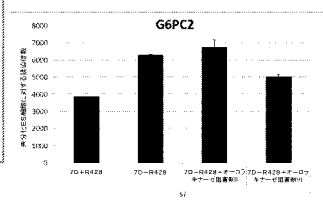
【図10B】



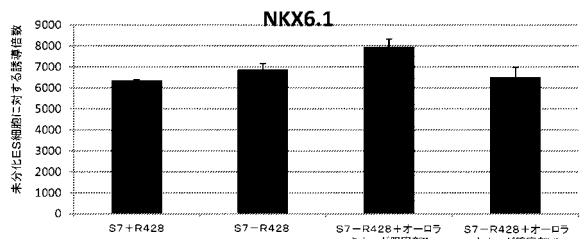
【図10A】



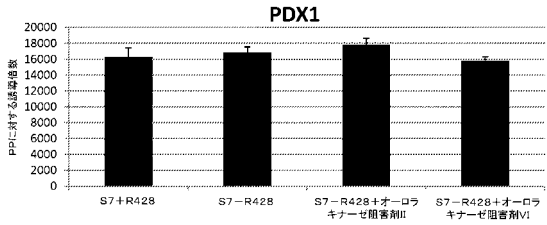
【図10C】



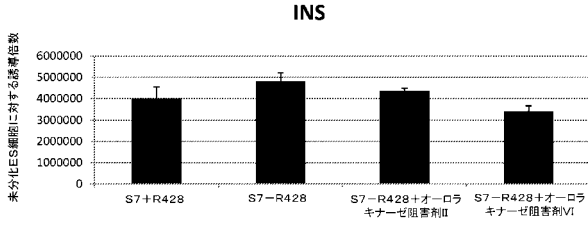
【図10D】



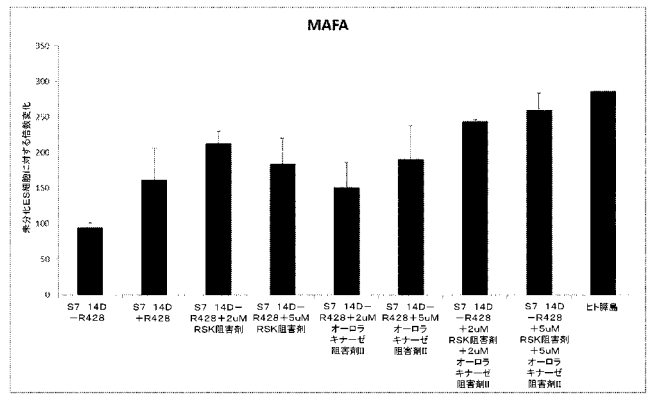
【図10E】



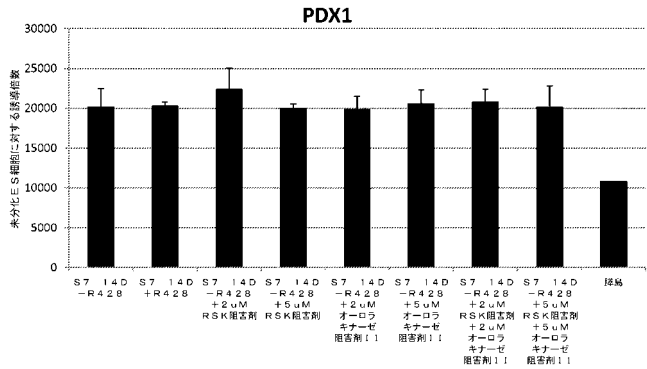
【図10F】



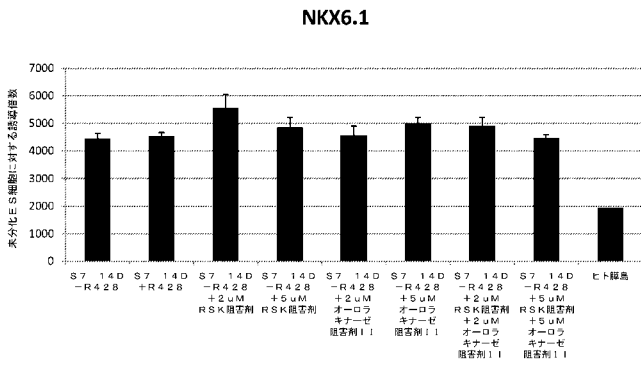
【図11A】



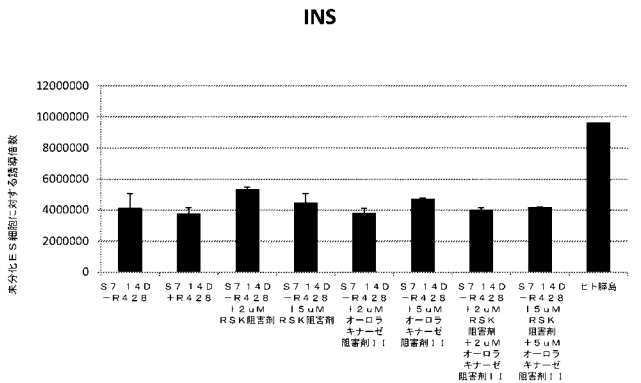
【図11B】



【図11C】



【図11D】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/029636

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N5/071 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/051223 A1 (CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC [US]; REZANIA ALIREZA [US]; FRYER BENJAMIN) 6 May 2010 (2010-05-06)	1-4
Y	tables 5, 6 paragraph [0093]	5-7
X	WO 2013/095953 A1 (JANSSEN BIOTECH INC [US]) 27 June 2013 (2013-06-27) page 17; claims 1-3	1
X	US 2011/151561 A1 (DAVIS JANET [US] ET AL) 23 June 2011 (2011-06-23) page 8, paragraph 0116; claim 1; tables 2, 3	1-3
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 October 2015		19/10/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Paresce, Donata

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2015/029636
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/055397 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENTER [US]; ONDER TAMER T [US]; DALEY GEORGE Q [US]) 18 April 2013 (2013-04-18) page 19 - page 20; claims 1-2 -----	2
X	REZANIA ALIREZA ET AL: "Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitors Into Functional Islets Capable of Treating Pre-existing Diabetes in Mice", DIABETES, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, US, vol. 61, no. 8, 1 August 2012 (2012-08-01), pages 2016-2029, XP008162152, ISSN: 0012-1797, DOI: 10.2337/DB11-1711 [retrieved on 2012-06-27] -----	1
Y	figure 2	5-7
X	A. REZANIA ET AL: "Production of Functional Glucagon-Secreting -Cells From Human Embryonic Stem Cells", DIABETES, vol. 60, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 239-247, XP055067542, ISSN: 0012-1797, DOI: 10.2337/db10-0573 -----	1
Y	figure 1	5-7
X	WO 2014/033322 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]; CELLECTIS SA [FR]) 6 March 2014 (2014-03-06) -----	1
Y	claims 1-8, 11; tables 1-2	5-7
X	SHUIBING CHEN ET AL: "A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, NATURE PUB. GROUP, vol. 5, no. 4, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 258-265, XP008164145, ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/NCHEMBIO.154 [retrieved on 2009-03-15] -----	1
Y	figures 2-3	5-7
Y	D. FOMINA-YADLIN ET AL: "Small-molecule inducers of insulin expression in pancreatic -cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 34, 9 August 2010 (2010-08-09), pages 15099-15104, XP055200934, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1010018107 page 15099 - page 15100 -----	5-7
	----- -/--	

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/029636

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VANDERFORD N L ET AL: "Multiple kinases regulate mafA expression in the pancreatic beta cell line MIN6", ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, ACADEMIC PRESS, US, vol. 480, no. 2, 15 December 2008 (2008-12-15), pages 138-142, XP025670235, ISSN: 0003-9861, DOI: 10.1016/J.ABB.2008.10.001 [retrieved on 2008-11-12] the whole document -----	1-7
A	YUYA KUNISADA ET AL: "Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells", STEM CELL RESEARCH, vol. 8, no. 2, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 274-284, XP055094959, ISSN: 1873-5061, DOI: 10.1016/j.scr.2011.10.002 the whole document -----	1-7
A	EP 2 604 685 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL [JP]) 19 June 2013 (2013-06-19) claim 1 -----	1-7
X,P	WO 2014/105546 A1 (JANSSEN BIOTECH INC) 3 July 2014 (2014-07-03) claim 38 -----	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/029636

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2010051223 A1	06-05-2010	AU 2009308967 A1	06-05-2010		
		BR P10919885 A2	11-08-2015		
		CA 2742268 A1	06-05-2010		
		CN 102272291 A	07-12-2011		
		EP 2346988 A1	27-07-2011		
		JP 5785088 B2	24-09-2015		
		JP 2012507292 A	29-03-2012		
		KR 20110077016 A	06-07-2011		
		RU 2011121842 A	10-12-2012		
		US 2010112693 A1	06-05-2010		
		WO 2010051223 A1	06-05-2010		
		WO 2013095953 A1	27-06-2013	AR 089426 A1	20-08-2014
				AU 2012355698 A1	10-07-2014
CA 2860107 A1	27-06-2013				
EP 2794857 A1	29-10-2014				
JP 2015503331 A	02-02-2015				
KR 20140103179 A	25-08-2014				
PH 12014501429 A1	22-09-2014				
US 2013189777 A1	25-07-2013				
WO 2013095953 A1	27-06-2013				
US 2011151561 A1	23-06-2011			AU 2010333840 A1	12-07-2012
		CA 2784425 A1	30-06-2011		
		CN 102712902 A	03-10-2012		
		EP 2516626 A2	31-10-2012		
		JP 2013515481 A	09-05-2013		
		KR 20120104386 A	20-09-2012		
		RU 2012130940 A	27-01-2014		
		SG 181685 A1	30-07-2012		
		SG 181822 A1	30-08-2012		
		US 2011151561 A1	23-06-2011		
		WO 2011079018 A2	30-06-2011		
		WO 2013055397 A1	18-04-2013	EP 2766474 A1	20-08-2014
US 2014242046 A1	28-08-2014				
WO 2013055397 A1	18-04-2013				
WO 2014033322 A1	06-03-2014	CN 104903440 A	09-09-2015		
		EP 2893000 A1	15-07-2015		
		JP 2015528289 A	28-09-2015		
		US 2015247123 A1	03-09-2015		
		WO 2014033322 A1	06-03-2014		
EP 2604685 A1	19-06-2013	AU 2011290123 A1	07-03-2013		
		CA 2807935 A1	16-02-2012		
		CN 103154240 A	12-06-2013		
		EP 2604685 A1	19-06-2013		
		KR 20130099035 A	05-09-2013		
		RU 2013109949 A	20-09-2014		
		SG 187655 A1	28-03-2013		
		US 2013210060 A1	15-08-2013		
		WO 2012020845 A1	16-02-2012		
WO 2014105546 A1	03-07-2014	AU 2013368224 A1	09-07-2015		
		CA 2896658 A1	03-07-2014		
		EP 2938723 A1	04-11-2015		
		SG 11201505112S A	30-07-2015		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/029636

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2014186953 A1	03-07-2014
		WO 2014105546 A1	03-07-2014



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2015/029636**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2015/ 029636

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claim: 1

An in vitro cell culture, comprising a population of differentiated pluripotent stem cells expressing markers characteristics of pancreatic endocrine cells, wherein at least 10% of the differentiated cells express insulin, PDX1 NKX6.1, and MAFA.

---

2. claims: 3, 4(completely); 2, 7(partially)

A method of inducing MAFA expression in cells derived from pluripotent cells, comprising culturing pluripotent cells, differentiating the pluripotent cells into pancreatic endocrine cells of a more mature phenotype by treatment with a medium supplemented with an inhibitor selected from the group consisting of an aurora kinase inhibitor as well as an aurora kinase inhibitor in combination with a RSK and/or a DOT1L inhibitor.

---

3. claims: 5, 6(completely); 2, 7(partially)

A method of inducing MAFA expression in cells derived from pluripotent cells, comprising culturing pluripotent cells, differentiating the pluripotent cells into pancreatic endocrine cells of a more mature phenotype by treatment with a medium supplemented with an inhibitor selected from the group consisting of a RSK inhibitor as well as an RSK inhibitor in combination with an aurora kinase inhibitor and/or a DOT1L inhibitor.

---

4. claims: 2, 7(all partially)

A method of inducing MAFA expression in cells derived from pluripotent cells, comprising culturing pluripotent cells, differentiating the pluripotent cells into pancreatic endocrine cells of a more mature phenotype by treatment with a medium supplemented with an inhibitor of protein methyltransferase DOT 1 L, and combinations of the DOT1L inhibitor with an aurora kinase inhibitor and/or an RSK inhibitor.

---

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100147131

弁理士 今里 崇之

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 レザニア, アリレザ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08869, ラリタン, 1000 ルート 202 サウス

Fターム(参考) 4B063 QA20 QQ02 QQ08 QQ91 QQ95 QR53 QR67 QR72 QR77 QS36

QX01 QX02

4B065 AA90X AC20 BD21 CA46