(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112867787 B
(45)授权公告日 2024.11.22

(21)申请号 201980061019.8

(22)申请日 2019.09.18

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112867787 A

(43)申请公布日 2021.05.28

(30)优先权数据
2018-175465 2018.09.19 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2019/037725 2019.09.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/059892 JA 2020.03.26

(73)专利权人 千纸鹤治疗公司
地址 日本神奈川县藤泽市村冈东1-26 (251-8555)

(72)发明人 伊藤亮 山添则子 日吉秀行 持田泰佑 上野光 佐久间健介 山浦顺司 松元宽和 豊田太郎 小长谷周平

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

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

(56)对比文件
US 2012270890 A1,2012.10.25
WO 2017094001 A1,2017.06.08
ALIREZA REZANIA等.Enrichment of Human Embryonic Stem Cell-Derived NKX6.1-Expressing Pancreatic Progenitor Cells Accelerates the Maturation of Insulin-Secreting Cells In Vivo.STEM CELLS .2013,第31卷第2432-2442页.
Yong Zhao等.A unique human blood-derived cell population displays high potential for producing insulin.Biochemical and Biophysical Research Communications.2007,第360卷第205-211页.
Felicia W. Pagliuca等.Generation of Functional Human Pancreatic b Cells In Vitro.Cell .2014,第159卷第 428-439页.

审查员 邓雪霞

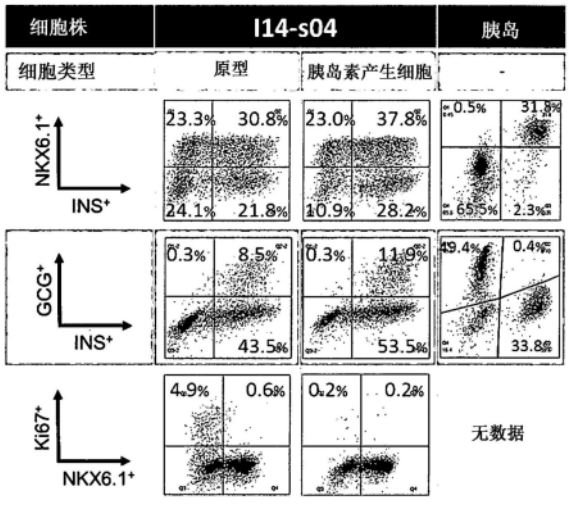
权利要求书1页 说明书37页 附图7页

(54)发明名称

胰岛素产生细胞

(57)摘要

本发明的目的在于提供一种能够从多能干细胞高效地诱导/制造内分泌细胞的新技术。一种胰岛素产生细胞,所述胰岛素产生细胞以30%以上的比例包含胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞,且以超过15%的比例的包含胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞。



CN 112867787 B

1.一种胰岛素产生细胞,所述胰岛素产生细胞包含30%以上的比例的胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞,以及超过15%的比例的胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞;小于3%的比例的Ki67阳性细胞;以及85%以上的比例的嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

2.根据权利要求1所述的胰岛素产生细胞,其中,MafA基因或其基因产物的表达量低于胰岛中的MafA基因或其基因产物的表达量。

3.根据权利要求1所述的胰岛素产生细胞,所述胰岛素产生细胞以小于3%的比例包含胰高血糖素阳性且胰岛素阴性的细胞。

4.根据权利要求1所述的胰岛素产生细胞,所述胰岛素产生细胞显示出葡萄糖刺激性胰岛素分泌(GSIS)响应。

5.根据权利要求1所述的胰岛素产生细胞,所述胰岛素产生细胞以小于0.01%的比例包含碱性磷酸酶阳性的多能干细胞。

6.一种药物,所述药物包含根据权利要求1至5中任一项所述的胰岛素产生细胞。

7.根据权利要求6所述的药物,其中,所述胰岛素产生细胞被容纳在器具中。

8.根据权利要求6所述的药物,其中,所述胰岛素产生细胞分散于水凝胶中。

9.根据权利要求1至5中任一项所述的胰岛素产生细胞在制备用于糖尿病的药物中的用途。

10.根据权利要求1至5中任一项所述的胰岛素产生细胞在制备用于改善和/或维持对患有糖尿病的患者空腹时及餐后葡萄糖水平的控制的药物中的用途。

11.根据权利要求1至5中任一项所述的胰岛素产生细胞在制备用于降低糖尿病患者中的低血糖症的风险的药物中的用途。

12.根据权利要求1至5中任一项所述的胰岛素产生细胞在制备用于在活体内诱导分化出胰岛样细胞的药物中的用途。

13.根据权利要求12所述的用途,其中,在活体内分化的所述胰岛样细胞以50%以上的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

14.根据权利要求12所述的用途,其中,在活体内分化的所述胰岛样细胞以小于3%的比例包含Ki67阳性细胞。

15.根据权利要求12所述的用途,其中,在活体内分化的所述胰岛样细胞以10%以上的比例包含胰高血糖素阳性和胰岛素阴性的细胞。

16.根据权利要求12所述的用途,其中,在活体内分化的所述胰岛样细胞具有响应于低血糖的胰岛素分泌作用。

17. 一种胰岛素产生细胞的制造方法,其中,所述胰岛素产生细胞包含30%以上的比例胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞,以及超过15%的比例的胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞;小于3%的比例的Ki67阳性细胞;以及85%以上的比例的嗜铬粒蛋白A阳性细胞;所述胰岛素产生细胞的制造方法包括下列步骤:

将多能干细胞在5至10 ng/mL的激活素A的存在下进行培养,以制造胚体内胚层细胞的步骤;以及

将内分泌前体细胞在包含10 μM以下的FGFR1抑制剂的培养基中进行培养,以制造所述胰岛素产生细胞的步骤。

胰岛素产生细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及一种胰岛素产生细胞及其制造法和用途,该胰岛素产生细胞能够高效地诱导/制造称为胰岛β细胞或胰岛α细胞的、进行激素分泌的内分泌细胞。

背景技术

[0002] 从人工多能细胞或胚胎干细胞(ES细胞)等多能干细胞分化诱导出称为胰岛β细胞或胰岛α细胞的、进行激素分泌的内分泌细胞,并将其应用于糖尿病的治疗的研究正在推进。已知分化诱导多能干细胞时,在不同的分化阶段会出现具有不同特征的细胞(WO 2009/012428、WO 2016/021734)。例如,此分化阶段可以按照相对未分化的顺序大致分为多能干细胞、胚体内胚层细胞、胃肠道细胞、后前肠细胞、胰腺前体细胞、内分泌前体细胞、胰岛素产生细胞和胰岛β细胞。

[0003] 迄今为止,已经开发并报道从多能干细胞分化诱导为包含胰岛素阳性细胞的内分泌细胞的技术。例如,在非专利文献1及2中,已经描述了制造从多能干细胞分化诱导出胰岛素产生细胞的方法,该胰岛素产生细胞以30%以上的比例包含胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞,且以15%以下的比例包含胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞。

[0004] 此外,迄今为止,已经报道了从多能干细胞分化诱导为胰腺前体细胞,通过将其移植至活体内并使其成熟化,来制造内分泌细胞的技术。例如,在非专利文献3中,已经描述了通过将从多能干细胞分化诱导出的胰腺前体细胞移植至小鼠并使其成熟化,制造包含胰岛素阳性细胞及胰高血糖素阳性细胞的内分泌细胞的方法。

[0005] 然而,上述方法所制造出的内分泌细胞的比例称不上足够高,在该领域中仍然企望从多能干细胞高效地诱导/制造内分泌细胞的方法。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:WO 2009/012428

[0009] 专利文件2:WO 2016/021734

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:Rezania A.等人,Nat Biotechnol.2014;32:1121-33.

[0012] 非专利文献2:Felicia W.Pagliuca等人,Cell.2014年10月9日;159(2):428-439.

[0013] 非专利文献3:Robert T等人,Stem Cell Reports.2018年3月13日;10(3):739-750.

发明内容

[0014] 发明要解决的课题

[0015] 本发明的目的在于提供一种能够从多能干细胞高效地诱导/制造以一定的比例包含胰岛素阳性细胞及胰高血糖素阳性细胞的胰岛样细胞的新技术。

[0016] 用于解决课题的手段

[0017] 以往,将焦点着眼于如何提升胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞的比例,以及使其成熟化,本发明者等人为了解决上述课题而锐意研究,结果发现,通过使上述以外的细胞成为规定的比例,可以在活体内高效地诱导/制造纯度较高的胰岛样细胞。分化诱导出不如以往的技术所产生的胰岛素产生细胞成熟的胰岛素产生细胞,具体而言,不表达MafA等成熟化指标,并且,包含许多成为胰高血糖素产生细胞起源的细胞的胰岛素产生细胞。人们担心成熟度较低的细胞在移植后会获得纯度较低的细胞,但通过结合将具有增殖能力的Ki67阳性细胞减至极限的技术,已成功地在保有较高的纯度下,在活体内使胰岛样细胞成熟化。

[0018] 本发明提供了一种用于实现胰岛的细胞治疗的最合适的技术,因为其可以在最短的制造期间内高效地诱导纯度较高的胰岛样细胞。

[0019] 本发明基于这些新认知,包括以下发明。

[0020] [1]一种胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)以30%以上的比例包含胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞,且以超过15%的比例的包含胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞。

[0021] [2]根据[1]中所述的胰岛素产生细胞(群),其中,MafA基因或其基因产物的表达量低于胰岛中的MafA基因或其基因产物的表达量。

[0022] [3]根据[1]或[2]中所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)以小于3%的比例包含Ki67阳性细胞。

[0023] [3-1]根据[1]或[2]中所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)以小于1%的比例包含Ki67阳性细胞。

[0024] [4]根据[1]至[3-1]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)以小于3%的比例包含胰高血糖素阳性且胰岛素阴性的细胞。

[0025] [5]根据[1]至[4]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)显示出葡萄糖刺激性胰岛素分泌(GSIS)响应。

[0026] [6]根据[1]至[5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)以超过45%的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0027] [6-1]根据[1]至[5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)以超过80%的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0028] [6-2]根据[1]至[5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)以超过85%的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0029] [6-3]根据[1]至[5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)以超过90%的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0030] [6-4]根据[1]至[5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)以超过93%的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0031] [7]根据[1]至[6-4]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)以小于0.01%的比例包含碱性磷酸酶阳性的多能干细胞。

[0032] [7-1]根据[1]至[7]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)在活体内分化为胰岛样细胞。

[0033] [7-2]根据[7-1]中所述的胰岛素产生细胞(群),其中,所述胰岛样细胞以50%以上的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0034] [7-2-1]根据[7-1]中所述的胰岛素产生细胞(群),其中,所述胰岛样细胞以95%以上的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0035] [7-3]根据[7-1]至[7-2-1]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),其中,所述胰岛样细胞以小于3%的比例包含Ki67阳性细胞。

[0036] [7-3-1]根据[7-1]至[7-2-1]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),其中,所述胰岛样细胞以小于1%的比例包含Ki67阳性细胞。

[0037] [7-4]根据[7-1]至[7-3-1]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),其中,所述胰岛样细胞以10%以上的比例包含胰高血糖素阳性且胰岛素阴性的细胞。

[0038] [7-5]根据[7-1]至[7-4]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),其中,所述胰岛样细胞具有响应于低血糖的胰岛素分泌作用。

[0039] [8]一种药物,所述药物包含根据[1]至[7-5]中任一项所述的胰岛素产生细胞。

[0040] [9]根据[8]中所述的药物,其中,所述胰岛素产生细胞(群)被容纳在器具中。

[0041] [10]根据[8]或[9]中所述的药物,其中,所述胰岛素产生细胞(群)分散于水凝胶中。

[0042] [11]根据[8]至[10]中任一项所述的药物,所述药物通过移植至活体内来使用。

[0043] [12]根据[8]至[11]中任一项所述的药物,所述药物通过皮下移植来使用。

[0044] [13]根据[8]至[12]中任一项所述的药物,所述药物用于糖尿病的治疗。

[0045] [14]根据[8]至[12]中任一项所述的药物,所述药物用于改善和/或维持对患者空腹时及餐后葡萄糖水平的控制。

[0046] [15]根据[8]至[12]中任一项所述的药物,所述药物用于降低糖尿病患者中的低血糖症的风险。

[0047] [16]根据[8]至[12]中任一项所述的药物,所述药物用于在活体内分化诱导出胰岛样细胞(群)的方法。

[0048] [17]根据[16]中所述的药物,其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)以50%以上的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0049] [17-1]根据[16]中所述的药物,其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)以95%以上的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0050] [18]根据[16]至[17-1]中任一项所述的药物,其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)以小于3%的比例包含Ki67阳性细胞。

[0051] [18]根据[16]至[17-1]中任一项所述的药物,其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)以小于1%的比例包含Ki67阳性细胞。

[0052] [19]根据[16]至[18]中任一项所述的药物,其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)以10%以上的比例包含胰高血糖素阳性且胰岛素阴性的细胞。

[0053] [20]根据[16]至[19]中任一项所述的药物,其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)具有响应于低血糖的胰岛素分泌作用。

[0054] [21]一种胰岛素产生细胞(群)的制造方法,其中,所述胰岛素产生细胞(群)以30%以上的比例包含胰岛素阳性且NKX6.1阳性细胞,且以超过15%的比例包含胰岛素阳性且NKX6.1阴性细胞;所述胰岛素产生细胞(群)的制造方法包括下列步骤:将多能干细胞在低剂量的激活素A的存在下进行培养,以制造胚体内胚层细胞的步骤;以及将内分泌前体细

胞在包含FGFR1抑制剂的培养基中进行培养,以制造所述胰岛素产生细胞(群)的步骤。

[0055] [22]一种胰岛样细胞(群)的产生方法,所述产生方法包括将胰岛素产生细胞(群)移植至活体内,分化诱导为胰岛样细胞(群),其中,所述胰岛素产生细胞(群)以30%以上的比例包含胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞,且以超过15%的比例的包含胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞。

[0056] [23]一种治疗糖尿病的方法,所述方法包括将胰岛素产生细胞(群)移植至活体内,分化诱导为胰岛样细胞(群),其中,所述胰岛素产生细胞(群)以30%以上的比例包含胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞,且以超过15%的比例的包含胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞。

[0057] [24]一种改善和/或维持对患者空腹时及餐后葡萄糖水平的控制的方法,所述方法包括将胰岛素产生细胞(群)移植至活体内,分化诱导为胰岛样细胞(群),其中,所述胰岛素产生细胞(群)以30%以上的比例包含胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞,且以超过15%的比例的包含胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞。

[0058] [25]一种降低糖尿病患者中的低血糖症的风险的方法,所述方法包括将胰岛素产生细胞(群)移植至活体内,分化诱导为胰岛样细胞(群),其中,所述胰岛素产生细胞(群)以30%以上的比例包含胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞,且以超过15%的比例的包含胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞。

[0059] [26]根据[1]至[7-5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)用于糖尿病的治疗方法。

[0060] [27]根据[1]至[7-5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)用于改善和/或维持对患者空腹时及餐后葡萄糖水平的控制。

[0061] [28]根据[1]至[7-5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)用于降低糖尿病患者中的低血糖症的风险的方法。

[0062] [29]根据[1]至[7-5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)用于在活体内分化诱导出胰岛样细胞(群)的方法。

[0063] [30]根据[26]至[29]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)被容纳在器具中。

[0064] [31]根据[26]至[30]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)分散于水凝胶中。

[0065] [32]根据[26]至[31]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)通过移植至活体内来使用。

[0066] [33]根据[26]至[32]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群),所述胰岛素产生细胞(群)通过皮下移植来使用。

[0067] [34]根据[29]中所述的胰岛素产生细胞(群),其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)以50%以上的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0068] [34-1]根据[29]中所述的胰岛素产生细胞(群),其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)以95%以上的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0069] [35]根据[29]中所述的胰岛素产生细胞(群),其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)以小于3%的比例包含Ki67阳性细胞。

[0070] [35-1]根据[29]中所述的胰岛素产生细胞(群),其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)以小于1%的比例包含Ki67阳性细胞。

[0071] [35-2]根据[29]中所述的胰岛素产生细胞(群),其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)以10%以上的比例包含胰高血糖素阳性且胰岛素阴性的细胞。

[0072] [36]根据[29]中所述的胰岛素产生细胞(群),其中,在活体内被分化诱导出的胰岛样细胞(群)具有响应于低血糖的胰岛素分泌作用。

[0073] [37]一种根据[1]至[7-5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群)的用途,所述的胰岛素产生细胞(群)用于制造用来治疗糖尿病的药物。

[0074] [38]一种根据[1]至[7-5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群)的用途,所述的胰岛素产生细胞(群)用于制造用来改善和/或维持对患者空腹时及餐后葡萄糖水平的控制的药物。

[0075] [39]一种根据[1]至[7-5]中任一项所述的胰岛素产生细胞(群)的用途,所述的胰岛素产生细胞(群)用于制造用来降低糖尿病患者中的低血糖症的风险的药物。

[0076] 本说明书包含作为本申请优先权的基础的日本专利申请2018-175465的说明书和/或附图中所描述的内容。

[0077] 在本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请都按原样通过引用并入本文。

[0078] 发明的效果

[0079] 根据本发明,能够提供一种能够从多能干细胞高效地诱导/制造内分泌细胞的新技术。

附图说明

[0080] 图1示出了通过流式细胞术测定胰岛素产生细胞的原型(prototype)、胰岛素产生细胞及人类胰岛(islet)中的胰岛素(INS)、NKX6.1、胰高血糖素(GCG)及Ki67的表达的结果。

[0081] 图2示出了通过定量PCR法测定胰岛素产生细胞的原型、胰岛素产生细胞及人类胰岛(islet)中的胰岛素(INS)、胰高血糖素(GCG)、MafA及UCN3的各基因表达量的结果。

[0082] 图3示出了掺加30(0.005%)个细胞、6(0.001%)个细胞、0个细胞的维持未分化状态的iPS细胞所制备出的胰岛素产生细胞中的维持未分化状态的iPS细胞的菌落数的图表。

[0083] 图4示出了将经冷冻保存的胰岛素产生细胞解冻后,通过三维培养培养4天所获得的细胞凝集体的相位差显微镜影图像。

[0084] 图5示出了通过流式细胞术测定冷冻保存前的胰岛素产生细胞以及冷冻保存/解冻后的胰岛素产生细胞中的INS、NKX6.1及Ki67的表达的结果。

[0085] 图6示出了移植有胰岛素产生细胞的糖尿病小鼠及未移植胰岛素产生细胞的非糖尿病小鼠中,葡萄糖负荷后的血中人类C肽浓度的测定结果。

[0086] 图7示出了移植有胰岛素产生细胞的糖尿病小鼠及未移植胰岛素产生细胞的非糖尿病小鼠中,甘精胰岛素(glargine)投与后的血中人类C肽浓度及血中胰高血糖素浓度的测定结果。

[0087] 图8示出了通过流式细胞术测定经皮下移植的胰岛素产生细胞中的胰岛素、NKX6.1、胰高血糖素及嗜铬粒蛋白A的表达的结果。

[0088] 图9示出了经皮下移植的胰岛素产生细胞中的胰岛素及胰高血糖素的免疫组织化学染色的结果。绿:胰岛素阳性细胞。红:胰高血糖素阳性细胞。

具体实施方式

[0089] 1.术语

[0090] 在下文中,将描述本说明书中使用的术语。

[0091] 本说明书中,示出了“约”是指相对于基准值的正负分别25%、20%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或直到1%的波动值。优选地,“约”或“大约”这一术语表示相对于基准值的正负分别15%、10%、5%或1%的范围。

[0092] 本说明书中,规定本发明的数值范围即使没有“约”的描述也包含与其下限值及上限值实质上被视为相同的数值。

[0093] 本说明书中,“包括/包含(comprise(s)或comprising)”是指包括/包含但不限定于该术语之后的要素。因此,暗示了包含该术语之后的要素,但并非暗示排除其它任意要素。

[0094] 本说明书中,“由……组成(consist(s)of或consisting of)”是指包含且限于该术语之后的所有要素。因此,“由……组成”这一术语表示所列举的要素是必要或必需的,实质上不存在其它要素。

[0095] 本说明书中,不“使用饲养细胞”是指基本上不包含饲养细胞,不使用通过对饲养细胞进行培养来预调理的培养基等。因此,培养基中不包含饲养细胞分泌的成长因子及细胞因子等物质。

[0096] 另外,“饲养细胞”或“饲养”是指与其它种类的细胞进行共培养以支持该细胞并提供可成长的环境的细胞。饲养细胞可以源自与它们所支持的细胞相同的种类,也可以源自不同的种类。例如,就人类细胞的饲养细胞(feeder)而言,可以使用人类皮肤成纤维细胞或人类胚胎干细胞,也可以使用小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养物及永生化小鼠胚胎成纤维细胞。饲养细胞可以通过放射线照射或丝裂霉素C处理等而去活化。

[0097] 本说明书中,“粘附”是指细胞附着于容器,例如,细胞在合适的培养基存在下附着于灭菌塑料(或经涂覆的塑料)细胞培养皿或烧瓶。细胞之中,也存在不粘附于细胞培养容器就无法在培养物中维持、或者不成长的细胞。相比之下,非粘附性细胞可以在不粘附于容器的情况下在培养物中维持、增殖。

[0098] 本说明书中,“培养”是指在体外环境中维持细胞、使其成长和/或使其分化。“进行培养”是指在组织中或体外,例如,在细胞培养皿或烧瓶中,使细胞持续、增殖(成长)和/或分化。培养包括二维培养(平面培养)、三维培养(悬浮培养)。

[0099] 本说明书中,“进行富集(enrich)”以及“富集(enrichment)”是指使细胞的组合物等组合物中的特定的构成成分的量增加,“经富集(enriched)”在用于对细胞的组合物例如细胞群进行说明时,是指与富集前的细胞群中特定的构成成分的比例相比该构成成分的量增加了的细胞群。例如,可以将细胞群等的组合物针对靶细胞型进行富集,因此,与富集前的细胞群内存在的靶细胞的比例相比靶细胞型的比例增加。细胞群也可以通过本技术领域公知的细胞选择以及筛选方法针对靶细胞型进行富集。细胞群也可以通过本说明书所描述的特定筛选或选择过程来进行富集。在本发明的特定实施方式中,通过将靶细胞群进行富

集的方法,细胞群相对于靶细胞群为至少富集20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%。

[0100] 本说明书中,“进行耗尽(deplete)”和“耗尽(depletion)”是指使细胞或细胞的组合物等组合物中的特定的构成成分的量减少;“经耗尽的(depleted)”在用于对细胞或细胞的组合物例如细胞群进行说明时是指特定的构成成分的量与耗尽前的细胞群中的该构成成分的比例相比减少了的细胞群。例如,可以将细胞群等的组合物针对靶细胞型进行耗尽,因此,与耗尽前的细胞群内存在的靶细胞的比例相比靶细胞型的比例减少。细胞群也可以通过本技术领域公知的细胞选择以及筛选方法针对靶细胞型进行耗尽。细胞群也可以通过本说明书所描述的特定筛选或选择过程进行耗尽。在本发明的特定实施方式中,通过使靶细胞群耗尽的方法,使细胞群相对于靶细胞群减少(耗尽)至少50%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%。

[0101] 本说明书中,“进行纯化(purify)”以及“纯化(purification)”是指去除细胞组合物等组合物中的杂质,使特定的构成成分变得纯净,“经纯化的(purified)”在用于对细胞组合物例如细胞群进行说明时是指杂质的量与纯化前的细胞群中的该构成成分的比例相比减少,特定的构成成分的纯度升高的细胞群。例如,可以将细胞群等的组合物针对靶细胞型进行纯化,因此,与纯化前的细胞群内存在的靶细胞的比例相比靶细胞型的比例增加。细胞群也可以通过本技术领域公知的细胞选择以及筛选方法针对靶细胞型进行纯化。细胞群也可以通过本说明书中描述的特定筛选或选择过程来进行纯化。在本发明的特定的实施方式中,通过对靶细胞群进行纯化的方法,靶细胞群的纯度至少为70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%,或可达到检测不出杂质(包含夹杂细胞)的程度。

[0102] 本说明书中,“具有CDK8/19抑制活性的因子”是指具有CDK8/19抑制活性的所有物质。与同一CDK家族的其他蛋白相比,CDK8对细胞增殖来说不是必要的,并且在通常情况下,对CDK8的抑制对细胞增殖的效果的影响不明显。CDK19和CDK8与类似,CDK8的抑制通常伴随CDK19的抑制。

[0103] “生长因子”是促进特定细胞的分化和/或增殖的内源性蛋白质。“生长因子”可列举例如,表皮生长因子(EGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、胰岛素样生长因子2(IGF-2)、角质细胞生长因子(KGF)、神经生长因子(NGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子β(TGF-β)、血管内皮生长因子(VEGF)、运铁蛋白、各种白细胞介素(例如IL-1至IL-18)、各种集落刺激因子(例如粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF))、各种干扰素(例如,IFN-γ等)及对干细胞有影响的其他细胞因子,例如,干细胞因子(SCF)及促红细胞生成素(Epo)。

[0104] 本说明书中,“ROCK抑制剂”是指抑制Rho激酶的物质(ROCK:Rho相关联、包含卷曲螺旋的蛋白激酶),也可以是抑制ROCK I和ROCK II中任意一种的物质。ROCK抑制剂只要具有上述功能就没有特别限定,例如,N-(4-吡啶基)-4β-[(R)-1-氨基乙基]环己烷-1α-甲酰胺(有时被称为Y-27632)、法舒地尔(Fasudil)(HA1077)、(2S)-2-甲基-1-[(4-甲基-5-异喹啉基)磺酰基]六氢-1H-1,4-二氮杂卓(H-1152)、4β-[(1R)-1-氨基乙基]-N-(4-吡啶基)苯并-1α-甲酰胺(Wf-536),N-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-4β(R)-1-氨基乙基]环己烷-1α-甲酰胺(Y-30141),N-(3-{[2-(4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-基)-1-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基]氧基}苯基)-4-{[2-(4-吗啉基)乙基]-氧基}苯甲酰胺(GSK269962A)、N-(6-氟-

1H-吲唑-5-基)-6-甲基-2-氧代基-4-[4-(三氟甲基)苯基]-3,4-二氢-1H-吡啶-5-甲酰胺(GSK429286A)。ROCK抑制剂不仅限于以上这些,也可以将针对ROCK的mRNA的反义寡核苷酸、siRNA、与ROCK结合的抗体、显性负ROCK突变体等用作ROCK抑制剂,其可商购或可根据公知方法合成。

[0105] 本说明书中,“GSK3β抑制剂”是指对GSK3β(糖原合酶激酶3β)具有抑制活性的物质。GSK3(糖原合酶激酶3)是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的一种,并参与与糖原产生、细胞凋亡、干细胞维持等有关的许多信号路径。GSK3中存在α和β两种亚型。本发明中使用的“GSK3β抑制剂”只要具有GSK3β抑制活性就没有特别限定,也可以是兼具GSK3β抑制活性和GSK3α抑制活性的物质。

[0106] 作为GSK3β抑制剂,例示了CHIR 98014(2-[[2-[(5-硝基-6-氨基吡啶-2—基)氨基]乙基]氨基)-4-(2,4-二氯苯基)-5-(1H-咪唑-1-基)嘧啶)、CHIR99021(6-[[2-[[4-(2,4-二氯苯基)-5-(4-甲基-1H-咪唑基-2-基)-2-嘧啶基)-氨基]乙基]氨基)尼古丁腈、TDZD-8(4-苄基-2-甲基-1,2,4-噻二唑烷-3,5-二酮,SB216763(3-(2,4-二氯苯基)-4-(1-甲基-1H-吲哚-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮),TWS-119(3-[6-(3-氨苯基)-7H-吡咯并[[2,3-d]嘧啶-4-基]氧基)苯酚、坎帕罗酮(Kenpaullone)、1-氮杂坎帕罗酮(Azakenpaullone)、SB216763(3-(2,4-二氯苯基)-4-(1-甲基-1H-吲哚-3-基)-1H-吡咯并-2,5-二酮)、SB415286(3-[(3-氯-4-羟基苯基)氨基]-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮)及AR-AO144-18、CT99021、CT20026、BIO、BIO-丙酮肟、吡啶并咔唑-环戊二烯基钌复合物、OTDZT、α-4-二溴苯乙酮、锂等。GSK3β不限于以上这些,也可以将针对GSK3β的mRNA的反义寡核苷酸、siRNA、与GSK3β结合的抗体、显性负GSK3β突变体等用作GSK3β抑制剂,其可商购或可根据公知方法合成。

[0107] 本说明书中,“血清替代物”可列举例如,Knockout血清替代物(KSR:Invitrogen),StemSure血清替代物(Wako)、B-27补充剂、N2补充剂、白蛋白(例如,富含脂质的白蛋白)、胰岛素、运铁蛋白、脂肪酸、胶原蛋白前体、微量元素(例如锌、硒(例如,亚硒酸钠))、2-巯基乙醇、3’硫醇甘油或其混合物(例如,ITS-G)。优选B-27补充剂、KSR、StemSure血清替代物、ITS-G作为血清替代物。将血清替代物添加到培养基中时,培养基中的浓度按重量计为0.01%至10%,优选地,按重量计为0.1%至2%。在本发明中,优选地使用“血清替代物”来代替血清。

[0108] 本说明书中,“FGFR1抑制剂”是指对成纤维细胞生长因子受体(FGFR)1具有抑制活性的物质。FGFR1是作为对属于生长因子的FGF1至FGF17具有高亲和性的受体,其是4次膜贯通型酪氨酸激酶家族(FGFR1、2、3、4)的成员。FGFR1抑制剂只要具有FGFR1抑制活性就没有特别限定,也可以是兼具FGFR1抑制活性和其他FGFR抑制活性的物质。本说明书中,“FGFR1抑制剂”是指包含稍微具有FGFR1抑制活性的物质,优选地指抑制50%以上FGFR1的物质、更优选地指FGFR1的50%抑制浓度(IC_{50})为1μM以下、进一步优选地为100nM以下的物质。FGFR1抑制活性的判定方法只要选自公知的方法即可,可列举例如使用EnzyChrom Kinase Assay Kit(BioAssay Systems公司)的判定方法等。可以使用常规公知的FGFR1抑制剂,可从专利文献或非专利文献中寻找。

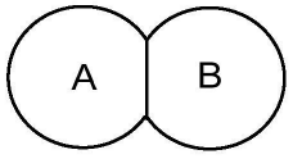
[0109] 例如,本说明书中,“FGFR1抑制剂”是指除了下述所示的化合物(化合物群组D)以外,还可列举具有下述通式所示的结构式的化合物中,对FGFR1具有抑制活性的化合物(或

其盐),优选地具有下述通式所示的结构式的化合物I及化合物II中,FGFR1的50％抑制浓度(IC_{50})为1μM以下、更优选地100nM以下的化合物(或其盐)。

[0110] (化合物I)

[0111] 化合物I可列举下述式1所示的化合物或其盐:

[0112] [化1]

[0113] 

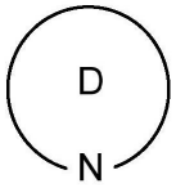
[0114] 〔式中,环AB表示具有1个以上取代基的2环杂环。(环AB也可以是具有1个以上取代基的三环杂环)〕。

[0115] 优选地,式中,环AB表示具有3个取代基的2环含氮杂环。取代基可列举下述所示的取代基或化合物群组D所具有的取代基,优选地表示化合物群组D所具有的取代基。

[0116] (化合物II)

[0117] 化合物II可列举下述式2所示的化合物或其盐:

[0118] [化2]

[0119] 

[0120] 〔式中,环D表示可具有取代基的5至6元单环含氮杂环;表示在环D以外包含1个以上的含氮杂环〕。

[0121] 优选地,式中,环D表示可具有取代基的包含1或2个氮的芳香环。

[0122] 此外,优选地,作为环D以外的1个以上的含氮杂环,可列举可具有取代基的哌嗪。

[0123] 取代基可列举下述所示的取代基或化合物群组D所具有的取代基,优选地表示化合物群组D所具有的取代基。

[0124] 本说明书中,“杂环”可列举例如除了碳原子以外,还各自包含选自氮原子、硫原子及氧原子的1至4个杂原子作为环构成原子的芳香族杂环及非芳香族杂环。

[0125] 本说明书中,“芳香族杂环”可列举例如除了碳原子以外,还包含选自氮原子、硫原子及氧原子的1至4个杂原子作为环构成原子的5至14元(优选地为5至10元)的芳香族杂环。该“芳香族杂环”的优选例可列举:噻吩、呋喃、吡咯、咪唑、吡唑、噻唑、异噻唑、噁唑、异噁唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪、1,2,4-噁二唑、1,3,4-噁二唑、1,2,4-噻二唑、1,3,4-噻二唑、三唑、四唑、三嗪等5至6元单环芳香族杂环;

[0126] 苯并噻吩、苯并呋喃、苯并咪唑、苯并噁唑、苯并异噁唑、苯并噻唑、苯并异噻唑、苯并三唑、咪唑并吡啶、噻吩并吡啶、呋喃并吡啶、吡咯并吡啶、吡唑并吡啶、噁唑并吡啶、噻唑并吡啶、咪唑并吡嗪、咪唑并嘧啶、噻吩并嘧啶、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、吡唑并嘧啶、噁唑并嘧啶、噻唑并嘧啶、吡唑并嘧啶、吡唑并三嗪、萘并[2,3-b]噻吩、吩噁噻、吲哚、异吲哚、1H-吲唑、嘌呤、异喹啉、喹啉、酞嗪、萘啶、喹噁啉、喹唑啉、噌啉、咔唑、β-咔啉、吩啶、吖啶、吩嗪、吩噻嗪、吩噁嗪等8至14元缩合多环(优选地为2或3环)芳香族杂环。

[0127] 本说明书中,“非芳香族杂环”可列举例如除了碳原子以外,还包含选自氮原子、硫原子及氧原子的1至4个杂原子作为环构成原子的3至14元(优选地为4至10元)的非芳香族杂环。该“非芳香族杂环”的优选例可列举:氮杂环丙烷、氧杂环丙烷、硫杂环丙烷、氮杂环丁烷、氧杂环丁烷、硫杂环丁烷、四氢噻吩、四氢呋喃、吡咯啉、吡咯啶、咪唑啉、咪唑啶、噁唑啉、噁唑啶、吡唑啉、吡唑啶、噻唑啉、噻唑啶、四氢异噻唑、四氢噁唑、四氢异噁唑、哌啶、哌嗪、四氢吡啶、二氢吡啶、二氢噻喃、四氢嘧啶、四氢哒嗪、二氢哌喃、四氢哌喃、四氢噻喃、吗啉、硫代吗啉、氮杂环庚烷、二氮杂环庚烷、氮杂环庚烯、氮杂环辛烷、二氮杂环辛烷等3至8元单环非芳香族杂环;

[0128] 二氢苯并呋喃、二氢苯并咪唑、二氢苯并噁唑、二氢苯并噻唑、二氢苯并异噻唑、二氢萘并[2,3-b]噻吩、四氢异喹啉、四氢喹啉、4H-喹嗪、吲哚啉、异吲哚啉、四氢噻吩并[2,3-c]吡啶、四氢苯并氮杂环庚烯、四氢喹噁啉、四氢吩啶、六氢吩噻嗪、六氢吩噁嗪、四氢酞嗪、四氢萘啶、四氢喹唑啉、四氢噌啉、四氢咔唑、四氢-β-咔啉、四氢吖啶、四氢吩嗪、四氢硫二苯并哌喃、八氢异喹啉等9至14元缩合多环(优选地为2或3环)非芳香族杂环。

[0129] 本说明书中,“含氮杂环”可列举“杂环”中包含至少1个以上氮原子作为环构成原子的。

[0130] 在下文中,对本说明书中所使用的各取代基的定义进行详述。除非另有说明,否则各取代基具有以下定义。

[0131] 本说明书中,“卤素原子”可列举例如:氟、氯、溴、碘。

[0132] 本说明书中,“C_{1-6}烷基”可列举例如:甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、1-乙丙基、己基、异己基、1,1-二甲丁基、2,2-二甲丁基、3,3-二甲丁基、2-乙丁基。

[0133] 本说明书中,“可经卤化的C_{1-6}烷基”,可列举例如可具有1至7个、优选地为1至5个卤素原子的C_{1-6}烷基。具体例可列举:甲基、氯甲基、二氟甲基、三氯甲基、三氟甲基、乙基、2-溴乙基、2,2,2-三氟乙基、四氟乙基、五氟乙基、丙基、2,2-二氟丙基、3,3,3-三氟丙基、异丙基、丁基、4,4,4-三氟丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、5,5,5-三氟戊基、己基、6,6,6-三氟己基。

[0134] 本说明书中,“C_{2-6}烯基”可列举例如:乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、3-甲基-2-丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、4-甲基-3-戊烯基、1-己烯基、3-己烯基、5-己烯基。

[0135] 本说明书中,“C_{2-6}炔基”可列举例如:乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-戊炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、4-己炔基、5-己炔基、4-甲基-2-戊炔基。

[0136] 本说明书中,“C_{3-10}环烷基”可列举例如:环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、双环[2.2.1]庚基、双环[2.2.2]辛基、双环[3.2.1]辛基、金刚烷基。

[0137] 本说明书中,“可经卤化的C_{3-10}环烷基”,可列举例如可具有1至7个、优选地为1至5个卤素原子的C_{3-10}环烷基。具体例可列举:环丙基、2,2-二氟环丙基、2,3-二氟环丙基、环丁基、二氟环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基。

[0138] 本说明书中,“C_{3-10}环烯基”可列举例如:环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基、环辛烯基。

[0139] 本说明书中，“C_{6-14}芳香基”可列举例如：苯基、1-萘基、2-萘基、1-蒽基、2-蒽基、9-蒽基。

[0140] 本说明书中，“C_{7-16}芳香烷基”可列举例如：苄基、苯乙基、萘甲基、苯丙基。

[0141] 本说明书中，“C_{1-6}烷氧基”可列举例如：甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基。

[0142] 本说明书中，“可经卤化的C_{1-6}烷氧基”，可列举例如可具有1至7个、优选地为1至5个卤素原子的C_{1-6}烷氧基。具体例可列举：甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基、乙氧基、2,2,2-三氟乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、4,4,4-三氟丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、戊氧基、己氧基。

[0143] 本说明书中，“C_{3-10}环烷基氧基”可列举例如：环丙氧基、环丁氧基、环戊气基、环己氧基、环庚氧基、环辛氧基。

[0144] 本说明书中，“C_{1-6}烷基硫基”可列举例如：甲硫基、乙硫基、丙硫基、异丙硫基、丁硫基、仲丁硫基、叔丁硫基、戊硫基、己硫基。

[0145] 本说明书中，“可经卤化的C_{1-6}烷基硫基”，可列举例如可具有1至7个、优选地为1至5个卤素原子的C_{1-6}烷基硫基。具体例可列举：甲硫基、二氟甲硫基、三氟甲硫基、乙硫基、丙硫基、异丙硫基、丁硫基、4,4,4-三氟丁硫基、戊硫基、己硫基。

[0146] 本说明书中，“C_{1-6}烷基-羰基”可列举例如：乙酰基、丙酰基、丁酰基、2-甲丙酰基、戊酰基、3-甲丁酰基、2-甲丁酰基、2,2-二甲丙酰基、己酰基、庚酰基。

[0147] 本说明书中，“可经卤化的C_{1-6}烷基-羰基”，可列举例如可具有1至7个、优选地为1至5个卤素原子的C_{1-6}烷基-羰基。具体例可列举：乙酰基、氯乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基、己酰基。

[0148] 本说明书中，“C_{1-6}烷氧基-羰基”可列举例如：甲氧羰基、乙氧羰基、丙氧羰基、异丙氧羰基、丁氧羰基、异丁氧羰基、仲丁氧羰基、叔丁氧羰基、戊氧羰基、己氧羰基。

[0149] 本说明书中，“C_{6-14}芳香基-羰基”可列举例如：苄酰基、1-萘甲酰基、2-萘甲酰基。

[0150] 本说明书中，“C_{7-16}芳香烷基-羰基”可列举例如：苯乙酰基、苯丙酰基。

[0151] 本说明书中，“5至14元芳香族杂环羰基”可列举例如：烟碱酰基、异烟碱酰基、噻吩甲酰基、呋喃甲酰基。

[0152] 本说明书中，“3至14元非芳香族杂环羰基”可列举例如：吗啉基羰基、哌啶基羰基、吡咯啶基羰基。

[0153] 本说明书中，“单-或二-C_{1-6}烷基-氨甲酰基”可列举例如：甲氨基甲酰基、乙氨基甲酰基、二甲氨基甲酰基、二乙氨基甲酰基、N-乙基-N-甲氨基甲酰基。

[0154] 本说明书中，“单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨甲酰基”可列举例如：苄基氨甲酰基、苯基乙胺甲酰基。

[0155] 本说明书中，“C_{1-6}烷基磺酰基”可列举例如：甲磺酰基、乙磺酰基、丙磺酰基、异丙磺酰基、丁磺酰基、仲丁磺酰基、叔丁磺酰基。

[0156] 本说明书中，“可经卤化的C_{1-6}烷基磺酰基”，可列举例如可具有1至7个、优选地为1至5个卤素原子的C_{1-6}烷基磺酰基。具体例可列举：甲磺酰基、二氟甲磺酰基、三氟甲磺酰基、乙磺酰基、丙磺酰基、异丙磺酰基、丁磺酰基、4,4,4-三氟丁磺酰基、戊磺酰基、己磺酰基。

[0157] 本说明书中，“C_{6-14}芳香基磺酰基”可列举例如：苯磺酰基、1-萘磺酰基、2-萘磺酰

基。

[0158] 本说明书中,“取代基”可列举例如:卤素原子、氰基、硝基、可经取代的烃基、可经取代的杂环基、酰基、可经取代的氨基、可经取代的氨甲酰基、可经取代的氨硫甲酰基、可经取代的氨磺酰基、可经取代的羟基、可经取代的氢硫(SH)基、可经取代的甲硅烷基。

[0159] 本说明书中,“烃基”(包含“可经取代的烃基”中的“烃基”)可列举例如:C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{3-10}环烷基、C_{3-10}环烯基、C_{6-14}芳香基、C_{7-16}芳香烷基。

[0160] 本说明书中,“可经取代的烃基”可列举例如可选自下述取代基群组A的取代基的烃基。

[0161] [取代基群组A]

[0162] (1)卤素原子,

[0163] (2)硝基,

[0164] (3)氰基,

[0165] (4)氧代基,

[0166] (5)羟基,

[0167] (6)可经卤化的C_{1-6}烷氧基,

[0168] (7)C_{6-14}芳氧基(例如,苯氧基、萘氧基),

[0169] (8)C_{7-16}芳香烷氧基(例如,苄氧基),

[0170] (9)5至14元芳香族杂环氧基(例如,吡啶氧基),

[0171] (10)3至14元非芳香族杂环氧基(例如,吗啉基氧基,哌啶基氧基),

[0172] (11)C_{1-6}烷基-羰氧基(例如乙酰氧基、丙酰氧基),

[0173] (12)C_{6-14}芳香基-羰氧基(例如,苄氧甲酰基、1-萘氧甲酰基、2-萘氧甲酰基),

[0174] (13)C_{1-6}烷氧基-羰氧基(例如,甲氧基羰氧基、乙氧基羰氧基、丙氧基羰氧基、丁氧基羰氧基),

[0175] (14)单-或二-C_{1-6}烷基-氨基甲酰氧基(例如,甲氨基甲酰氧基、乙氨基甲酰氧基、二甲氨基甲酰氧基、二乙氨基甲酰氧基),

[0176] (15)C_{6-14}芳香基-氨甲酰氧基(例如,苯氨甲酰氧基、萘氨甲酰氧基),

[0177] (16)5至14元芳香族杂环羰氧基(例如,烟碱酰氧基),

[0178] (17)3至14元非芳香族杂环羰氧基(例如,吗啉基羰氧基、哌啶基羰氧基),

[0179] (18)可经卤化的C_{1-6}烷基磺酰氧基(例如,甲磺酰氧基、三氟甲磺酰氧基),

[0180] (19)可由C_{1-6}烷基取代的C_{6-14}芳香基磺酰氧基(例如,苯磺酰氧基、甲苯磺酰氧基),

[0181] (20)可经卤化的C_{1-6}烷基硫基,

[0182] (21)5至14元芳香族杂环基,

[0183] (22)3至14元非芳香族杂环基,

[0184] (23)甲酰基,

[0185] (24)羧基,

[0186] (25)可经卤化的C_{1-6}烷基-羰基,

[0187] (26)C_{6-14}芳香基-羰基,

[0188] (27)5至14元芳香族杂环羰基,

[0189] (28)3至14元非芳香族杂环羰基，

[0190] (29)C_{1-6}烷氧基-羰基，

[0191] (30)C_{6-14}芳氧基-羰基(例如,苯氧基羰基、1-萘氧基羰基、2-萘氧基羰基)，

[0192] (31)C_{7-16}芳香烷氧基-羰基(例如,苄氧基羰基、苯乙氧基羰基)，

[0193] (32)氨甲酰基，

[0194] (33)氨硫甲酰基，

[0195] (34)单或二-C_{1-6}烷基-氨甲酰基，

[0196] (35)C_{6-14}芳香基-氨甲酰基(例如,苯氨基甲酰基)，

[0197] (36)5至14元芳香族杂环氨甲酰基(例如,吡啶基氨甲酰基、噻吩基氨甲酰基)，

[0198] (37)3至14元非芳香族杂环氨甲酰基(例如,吗啉基氨甲酰基、哌啶基氨甲酰基)，

[0199] (38)可经卤化的C_{1-6}烷基磺酰基，

[0200] (39)C_{6-14}芳香基磺酰基，

[0201] (40)5至14元芳香族杂环磺酰基(例如,吡啶磺酰基、噻吩磺酰基)，

[0202] (41)可经卤化的C_{1-6}烷基亚磺酰基，

[0203] (42)C_{6-14}芳香基亚磺酰基(例如,苯亚磺酰基、1-萘亚磺酰基、2-萘亚磺酰基)，

[0204] (43)5至14元芳香族杂环亚磺酰基(例如,吡啶基亚磺酰基、噻吩基亚磺酰基)，

[0205] (44)氨基，

[0206] (45)单-或二-C_{1-6}烷基氨基(例如,甲氨基、乙氨基、丙氨基、异丙氨基、丁氨基、二甲氨基、二乙氨基、二丙氨基、二丁氨基、N-乙基-N-甲氨基)，

[0207] (46)单或二C_{6-14}芳香基氨基(例如,苯氨基)，

[0208] (47)5至14元芳香族杂环氨基(例如,氨基吡啶)，

[0209] (48)C_{7-16}芳香烷氨基(例如,苄氨基)，

[0210] (49)甲酰氨基，

[0211] (50)C_{1-6}烷基-羰基氨基(例如,乙酰氨基、丙酰氨基、丁酰氨基)，

[0212] (51)(C_{1-6}烷基)(C_{1-6}烷基-羰基)氨基(例如,N-乙酰基-N-甲氨基)，

[0213] (52)C_{6-14}芳香基-羰基氨基(例如,苯羰基氨基、萘羰基氨基)，

[0214] (53)C_{1-6}烷氧基-羰基氨基(例如,甲氧基羰基氨基、乙氧基羰基氨基、丙氧基羰基氨基、丁氧基羰基氨基、叔丁氧基羰基氨基)，

[0215] (54)C_{7-16}芳香烷氧基-羰基氨基(例如苄氧羰基氨基)，

[0216] (55)C_{1-6}烷基磺酰氨基(例如,甲磺酰氨基、乙磺酰氨基)，

[0217] (56)可由C_{1-6}烷基取代的C_{6-14}芳香基磺酰氨基(例如,苯磺酰氨基、甲苯磺酰氨基)，

[0218] (57)可经卤化的C_{1-6}烷基，

[0219] (58)C_{2-6}烯基，

[0220] (59)C_{2-6}炔基，

[0221] (60)C_{3-10}环烷基，

[0222] (61)C_{3-10}环烯基,以及

[0223] (62)C_{6-14}芳香基。

[0224] “可经取代的烃基”中的上述取代基的数量是例如为1至5个、优选地为1至3个。在

取代基数为2个以上时,各取代基可以相同或不同。

[0225] 本说明书中,“杂环基”(包含“可经取代的杂环基”中的“杂环基”)可列举例如:除了碳原子以外,还各自包含选自氮原子、硫原子及氧原子的1至4个杂原子作为环构成原子的(i)芳香族杂环基、(ii)非芳香族杂环基及(iii)7至10元复合交联环基。

[0226] 本说明书中,“芳香族杂环基”(包含“5至14元芳香族杂环基”)可列举例如:除了碳原子以外,还包含选自氮原子、硫原子及氧原子的1至4个杂原子作为环构成原子的5至14元(优选地为5至10元)芳香族杂环基。

[0227] 该“芳香族杂环基”的优选例可列举:噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、1,2,4-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、1,2,4-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基等5至6元单环芳香族杂环基;

[0228] 苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并异噁唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并三唑基、咪唑并吡啶基、噻吩并吡啶基、呋喃并吡啶基、吡咯并吡啶基、吡唑并吡啶基、噁唑并吡啶基、噻唑并吡啶基、咪唑并吡嗪基、咪唑并嘧啶基、噻吩并嘧啶基、呋喃并嘧啶基、吡略并嘧啶基、吡唑并嘧啶基、噁唑并嘧啶基、噻唑并嘧啶基、吡唑并三嗪基、萘并[2,3-b]噻吩基、吩噁噻基、吲哚基、异吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、异喹啉基、喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹噁啉基、喹唑啉基、噌啉基、咔唑基、β-咔啉基、吩啶基、吖啶基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基等8至14元缩合多环(优选地为2或3环)芳香族杂环基。

[0229] 本说明书中,“非芳香族杂环基”(包含“3至14元非芳香族杂环基”)可列举例如:除了碳原子以外,还包含选自氮原子、硫原子及氧原子的1至4个杂原子作为环构成原子的3至14元(优选地为4至10元)非芳香族杂环基。

[0230] 该“非芳香族杂环基”的优选例可列举:氮杂环丙基、氧杂环丙基、硫杂环丙基、氮杂环丁基、氧杂环丁基、硫杂环丁基、四氢噻吩基、四氢呋喃、吡咯啉基、吡咯啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、噁唑啉基、噁唑啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、噻唑啉基、噻唑啶基、四氢异噻唑基、四氢噁唑基、四氢异噁唑基、哌啶基、哌嗪基、四氢吡啶基、二氢吡啶基、二氢噻喃基、四氢嘧啶基、四氢哒嗪基、二氢哌喃基、四氢哌喃基、四氢噻喃基、吗啉基、硫代吗啉基、氮杂环庚基、二氮杂环庚基、氮杂环庚烯基、氧杂环庚基、氮杂环辛基、二氮杂环辛基等3至8元单环非芳香族杂环基;

[0231] 二氢苯并呋喃基、二氢苯并咪唑基、二氢苯并噁唑基、二氢苯并噻唑基、二氢苯并异噻唑基、二氢萘并[2,3-b]噻吩基、四氢异喹啉基、四氢喹啉基、4H-喹嗪基、吲哚啉基、异吲哚啉基、四氢噻吩并[2,3-c]吡啶基、四氢苯并氮杂环庚烯基、四氢喹噁啉基、四氢吩啶基、六氢吩噻嗪基、六氢吩噁嗪基、四氢酞嗪基、四氢萘啶基、四氢喹唑啉基、四氢噌啉基、四氢咔唑基、四氢-β-咔啉基、四氢吖啶基、四氢吩嗪基、四氢硫二苯并哌喃基、八氢异喹啉基等9至14元缩合多环(优选地为2或3环)非芳香族杂环基。

[0232] 本说明书中,“7至10元复合交联环基”的优选例可列举:喹宁环基、7-氮杂双环[2.2.1]庚基。

[0233] 本说明书中,“含氮杂环基”可举出“杂环基”中,包含至少1个以上氮原子作为环构成原子。

[0234] 本说明书中,“可经取代的杂环基”可举出例如:可具有选自前述的取代基群组A的

取代基的杂环基。

[0235] “可经取代的杂环基”中的取代基的数量例如为1至3个。在取代基数为2个以上时，各取代基可以相同或不同。

[0236] 本说明书中，“酰基”可列举例如：可各自具有“选自可各自具有选自卤素原子、可经卤化的C_{1-6}烷氧基、羟基、硝基、氰基、氨基及氨甲酰基的1至3个取代基的C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}环烷基、C_{3-10}环烯基、C_{6-14}芳香基、C_{7-16}芳香烷基、5至14元芳香族杂环基及3至14元非芳香族杂环基的1或2个取代基”的甲酰基、羧基、氨甲酰基、氨硫甲酰基、亚磺酸基、磺酸基、氨磺酰基、膦酰基。

[0237] 此外，“酰基”也可列举：烃-磺酰基、杂环-磺酰基、烃-亚磺酰基、杂环-亚磺酰基。

[0238] 此处，烃-磺酰基是指与烃基键结成的磺酰基，杂环-磺酰基是指与杂环基键结成的磺酰基，烃-亚磺酰基是指与烃基键结成的亚磺酰基，杂环-亚磺酰基是指与杂环基键结成的亚磺酰基。

[0239] “酰基”的优选例可列举：甲酰基、羧基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{2-6}烯基-碳基(例如，巴豆酰基)、C_{3-10}环烷基-羰基(例如，环丁烷羰基、环戊烷羰基、环己烷羰基、环庚烷羰基)、C_{3-10}环烯基-羰基(例如，2-环己烯羰基)、C_{6-14}芳香基-羰基、C_{7-16}芳香烷基-羰基、5至14元芳香族杂环羰基、3至14元非芳香族杂环羰基、C_{1-6}烷氧基-羰基、C_{6-14}芳香基氧基-羰基(例如，苯氧基羰基、萘氧基羰基)、C_{7-16}芳香烷基氧基-羰基(例如，苄氧基羰基、苯乙氧基羰基)、氨甲酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-氨甲酰基、单-或二-C_{2-6}烯基-氨甲酰基(例如，二烯丙氨甲酰基)、单-或二-C_{3-10}环烷基-氨甲酰基(例如，环丙氨甲酰基)、单-或二-C_{6-14}芳香基-氨甲酰基(例如，苯氨基甲酰基)、单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨甲酰基、5至14元芳香族杂环氨甲酰基(例如，吡啶基氨甲酰基)、氨硫甲酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-氨硫甲酰基(例如，甲氨硫甲酰基、N-乙基-N-甲氨硫甲酰基)、单-或二-C_{2-6}烯基-氨硫甲酰基(例如，二烯丙氨硫甲酰基)、单-或二-C_{3-10}环烷基-氨硫甲酰基(例如，环丙氨硫甲酰基、环己氨硫甲酰基)、单-或二-C_{6-14}芳香基-氨硫甲酰基(例如，苯氨硫甲酰基)、单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨硫甲酰基(例如，苄氨硫甲酰基、苯乙氨硫甲酰基)、5至14元芳香族杂环氨硫甲酰基(例如，吡啶基氨硫甲酰基)、亚磺酸基、C_{1-6}烷基亚磺酰基(例如，甲基亚磺酰基、乙基亚磺酰基)、磺酸基、C_{1-6}烷基磺酰基、C_{6-14}芳香基磺酰基、膦酰基、单-或二-C_{1-6}烷基膦酰基(例如，二甲基膦酰基、二乙基膦酰基、二异丙基膦酰基、二丁基膦酰基)。

[0240] 本说明书中，“可经取代的氨基”可列举例如：可具有“选自可各自具有选自取代基群组A的1至3个取代基的C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}环烷基、C_{6-14}芳香基、C_{7-16}芳香烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳香基-羰基、C_{7-16}芳香烷基-羰基、5至14元芳香族杂环羰基、3至14元非芳香族杂环羰基、C_{1-6}烷氧基-羰基、5至14元芳香族杂环基、氨甲酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-氨甲酰基、单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨甲酰基、C_{1-6}烷基磺酰基及C_{6-14}芳香基磺酰基的1或2个取代基”的氨基。

[0241] 可经取代的氨基的优选例可列举：氨基、单-或二-(可经卤化的C_{1-6}烷基)氨基(例如，甲氨基、三氟甲氨基、二甲氨基、乙氨基、二乙氨基、丙氨基、二丁氨基)、单-或二-C_{2-6}烯基氨基(例如，二烯丙氨基)、单-或二-C_{3-10})环烷基氨基(例如，环丙氨基、环己氨基)、单-或二-C_{6-14}芳香基氨基(例如，苯氨基)、单-或二-C_{7-16}芳香烷基氨基(例如，苄氨基、二苄氨基)、单-或二-(可经卤化的C_{1-6}烷基)-羰基氨基(例如，乙酰氨基、丙酰氨基)、单-或二-C_{6-14}芳香

基-羰基氨基(例如,氨基苄酰基)、单-或二-C_{7-16}芳香烷基-羰基氨基(例如,苄羰基氨基)、单-或二-5至14元芳香族杂环羰基氨基(例如,烟碱酰基氨基、异烟碱酰基氨基)、单-或二-3至14元非芳香族杂环羰基氨基(例如,哌啶羰基氨基)、单-或二-C_{1-6}烷氧基-羰基氨基(例如,叔丁氧羰基氨基)、5至14元芳香族杂环氨基(例如,氨基吡啶)、氨甲酰氨基、(单-或二-C_{1-6}烷基-氨甲酰基)氨基(例如,甲氨甲酰氨基)、(单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨甲酰基)氨基(例如,苄基氨甲酰基氨基)、C_{1-6}烷基磺酰基氨基(例如,甲磺酰氨基、乙磺酰氨基)、C_{6-14}芳香基磺酰基氨基(例如,苯磺酰氨基)、(C_{1-6}烷基)(C_{1-6}烷基-羰基)氨基(例如,N-乙酰基-N-甲氨基)、(C_{1-6}烷基)(C_{6-14}芳香基-羰基)氨基(例如,N-苄酰基-N-甲氨基)。

[0242] 本说明书中,“可经取代的氨甲酰基”可列举例如:可具有“选自可各自具有选自取代基群组A的1至3个取代基的C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}环烷基、C_{6-14}芳香基、C_{7-16}芳香烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳香基-羰基、C_{7-16}芳香烷基-羰基、5至14元芳香族杂环羰基、3至14元非芳香族杂环羰基、C_{1-6}烷氧基-羰基、5至14元芳香族杂环基、氨甲酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-氨甲酰基及单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨甲酰基的1或2个取代基”的氨甲酰基。

[0243] 可经取代的氨甲酰基的优选例可列举:氨甲酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-氨甲酰基、单-或二-C_{2-6}烯基-氨甲酰基(例如,二烯丙基氨基甲酰基)、单-或二-C_{3-10}环烷基-氨甲酰基(例如,环丙基氨基甲酰基、环己基氨基甲酰基)、单-或二-C_{6-14}芳香基-氨甲酰基(例如,苯氨基甲酰基)、单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨甲酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-羰基-氨甲酰基(例如,乙酰基氨基甲酰基、丙酰基氨基甲酰基)、单-或二-C_{6-14}芳香基-羰基-氨甲酰基(例如,苄基酰基氨甲酰基)、5至14元芳香族杂环氨甲酰基(例如,吡啶基氨甲酰基)。

[0244] 本说明书中,“可经取代的氨硫甲酰基”可列举例如:可具有“选自可各自具有选自取代基群组A的1至3个取代基的C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}环烷基、C_{6-14}芳香基、C_{7-16}芳香烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳香基-羰基、C_{7-16}芳香烷基-羰基、5至14元芳香族杂环羰基、3至14元非芳香族杂环羰基、C_{1-6}烷氧基-羰基、5至14元芳香族杂环基、氨甲酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-氨甲酰基及单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨甲酰基的1或2个取代基”的氨硫甲酰基。

[0245] 可经取代的氨硫甲酰基的优选例可列举:氨硫甲酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-氨硫甲酰基(例如,甲氨基硫甲酰基、乙氨基硫甲酰基、二甲氨基硫甲酰基、二乙氨基硫甲酰基、N-乙基-N-甲氨基硫甲酰基)、单-或二-C_{2-6}烯基-氨硫甲酰基(例如,二烯丙基氨硫甲酰基)、单-或二-C_{3-10}环烷基-氨硫甲酰基(例如,环丙基氨硫甲酰基、环己基氨硫甲酰基)、单-或二-C_{6-14}芳香基-氨硫甲酰基(例如,苯基氨基硫甲酰基)、单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨硫甲酰基(例如,苄基氨硫基甲酰基、苯基乙基氨硫甲酰基)、单-或二-C_{1-6}烷基-羰基-氨硫甲酰基(例如,乙酰基氨基硫甲酰基、丙酰基氨基硫甲酰基)、单-或二-C_{6-14}芳香基-羰基-氨硫甲酰基(例如,苄酰基氨基硫甲酰基)、5至14元芳香族杂环氨硫甲酰基(例如,吡啶基氨基硫甲酰基)。

[0246] 本说明书中,“可经取代的氨磺酰基”可列举例如:可具有“选自可各自具有选自取代基群组A的1至3个取代基的C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}环烷基、C_{6-14}芳香基、C_{7-16}芳香烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳香基-羰基、C_{7-16}芳香烷基-羰基、5至14元芳香族杂环羰基、3至14元非芳香族杂环羰基、C_{1-6}烷氧基-羰基、5至14元芳香族杂环基、氨甲酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-氨甲酰基及单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨甲酰基的1或2个取代基”的氨磺酰基。

[0247] 可经取代的氨磺酰基的优选例可列举:氨磺酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-氨磺酰基(例

如,甲氨磺酰基、乙氨磺酰基、二甲氨磺酰基、二乙氨磺酰基、N-乙基-N-甲氨磺酰基)、单-或二-C_{2-6}烯基-氨磺酰基(例如,二烯丙氨磺酰基)、单-或二-C_{3-10}环烷基-氨磺酰基(例如,环丙氨磺酰基、环已氨磺酰基)、单-或二-C_{6-14}芳香基-氨磺酰基(例如,苯氨磺酰基)、单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨磺酰基(例如,苄氨磺酰基、苯乙氨磺酰基)、单-或二-C_{1-6}烷基-羰基-氨磺酰基(例如,乙酰基氨磺酰基、丙酰基氨磺酰基)、单-或二-C_{6-14}芳香基-羰基-氨磺酰基(例如,苄酰基氨磺酰基)、5至14元芳香族杂环氨磺酰基(例如,吡啶基氨磺酰基)。

[0248] 本说明书中,“可经取代的羟基”可列举例如:可具有“选自可各自具有选自取代基群组A的1至3个取代基的C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}环烷基、C_{6-14}芳香基、C_{7-16}芳香烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳香基-羰基、C_{7-16}芳香烷基-碳基、5至14元芳香族杂环羰基、3至14元非芳香族杂环羰基、C_{1-6}烷氧基-羰基、5至14元芳香族杂环基、氨甲酰基、单-或二-C_{1-6}烷基-氨甲酰基、单-或二-C_{7-16}芳香烷基-氨甲酰基、C_{1-6}烷基磺酰基及C_{6-14}芳香基磺酰基的取代基”的羟基。

[0249] 可经取代的羟基的优选例可列举:羟基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯基氧基(例如,烯丙氧基、2-丁烯基氧基、2-戊烯基氧基、3-已烯基氧基)、C_{3-10}环烷基氧基(例如,环已氧基)、C_{6-14}芳香基氧基(例如,苯氧基、萘氧基)、C_{7-16}芳香烷基氧基(例如,苄氧基、苯乙氧基)、C_{1-6}烷基-羰基氧基(例如,乙酰氧基、丙酰氧基、丁酰氧基、异丁酰氧基、三甲基乙酰氧基)、C_{6-14}芳香基-羰基氧基(例如,苄酰氧基)、C_{7-16}芳香烷基-羰基氧基(例如,苄氧羰基)、5至14元芳香族杂环羰基氧基(例如,烟碱酰基氨基)、3至14元非芳香族杂环羰基氧基(例如,哌啶基羰基氧基)、C_{1-6}烷氧基-羰基氧基(例如,叔丁氧基羰基氧基)、5至14元芳香族杂环氧基(例如,吡啶氧基)、氨甲酰氧基、C_{1-6}烷基-氨甲酰基氧基(例如,甲氨甲酰氧基)、C_{7-16}芳香烷基-氨甲酰基氧基(例如,苄基氨甲酰氧基)、C_{1-6}烷基磺酰基氧基(例如,甲磺酰氧基、乙磺酰氧基)、C_{6-14}芳香基磺酰基氧基(例如,苯磺酰氧基)。

[0250] 本说明书中,“可经取代的氢硫基”可列举例如:可具有“选自可各自具有选自取代基群组A的1至3个取代基的C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}环烷基、C_{6-14}芳香基、C_{7-16}芳香烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳香基-羰基及5至14元芳香族杂环基的取代基”的氢硫基、经卤化的氢硫基。

[0251] 可经取代的氢硫基的优选例可列举:氢硫(-SH)基、C_{1-6}烷基硫基、C_{2-6}烯基硫基(例如,烯丙硫基、2-丁烯硫基、2-戊烯硫基、3-已烯硫基)、C_{3-10}环烷基硫基(例如,烷已硫基)、C_{6-14}芳香基硫基(例如,苯硫基、萘硫基)、C_{7-16}芳香烷基硫基(例如,苄硫基、苯乙硫基)、C_{1-6}烷基-羰基硫基(例如,乙酰硫基、丙酰硫基、丁酰硫基、异丁酰硫基、三甲基乙酰硫基)、C_{6-14}芳香基-羰基硫基(例如,苄酰硫基)、5至14元芳香族杂环硫基(例如,吡啶硫基)、卤化硫基(例如,五氟硫基)。

[0252] 本说明书中,“可经取代的硅烷基”可列举例如:可具有“选自可各自具有选自取代基群组A的1至3个取代基的C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}环烷基、C_{6-14}芳香基及C_{7-16}芳香烷基的1至3个取代基的硅烷基”。

[0253] 可经取代的硅烷基的优选例可列举:三-C_{1-6}烷基硅烷基(例如,三甲基硅烷基、叔丁(二甲基)硅烷基)。

[0254] 更具体而言,在本发明中,能够利用的FGFR1抑制剂可例示:PD-166866(1-[2-氨基-6-(3,5-二甲氧基苯基)-吡啶并(2,3-d)-嘧啶-7-基]-3-叔丁基脲:CAS No.:192705-

79-6)、E-3810(CAS No.:1058137-23-7)、PD-173074(CAS No.:219580-11-7)、FGFR4-IN-1(CAS No.:1708971-72-5)、FGFR-IN-1(CAS No.:1448169-71-8)、FIIN-2(CAS No.:1633044-56-0)、AZD4547(CAS No.:1035270-39-3)、FIIN-3(CAS No.:1637735-84-2)、NVP-BGJ398(CAS No.:1310746-10-1)、NVP-BGJ398(CAS No.:872511-34-7)、CH5183284(CAS No.:1265229-25-1)、Derazantinib(CAS No.:1234356-69-4)、Derazantinib Racemate、Ferulic acid(CAS No.:1135-24-6)、SSR128129E(CAS No.:848318-25-2)、SSR128129E free acid(CAS No.:848463-13-8)、Erdafitinib(CAS No.:1346242-81-6)、BLU9931(CAS No.:1538604-68-0)、PRN1371(CAS No.:1802929-43-6)、S49076(CAS No.:1265965-22-7)、LY2874455(CAS No.:1254473-64-7)、Linsitinib(CAS No.:867160-71-2)、Dovitinib(CAS No.:405169-16-6)、Anlotinib(CAS No.:1058156-90-3)、Brivanib(CAS No.:649735-46-6)、Derazantinib(CAS No.:1234356-69-4)、Anlotinib Dihydrochloride(CAS No.:1360460-82-7)、ACTB-1003(CAS No.:939805-30-8)、BLU-554(CAS No.:1707289-21-1)、Rogaratinib(CAS No.:1443530-05-9)、BIBF 1120esylate(CAS No.:656247-18-6)、TG 100572Hydrochloride(CAS No.:867331-64-4)、ENMD-2076(CAS No.:934353-76-1)、Brivanib alaninate(CAS No.:649735-63-7)、TG 100572(CAS No.:867334-05-2)、BIBF 1120(CAS No.:656247-17-5)、ENMD-2076Tartrate(CAS No.:1291074-87-7)、TSU-68(CAS No.:252916-29-3)、Ponatinib(CAS No.:943319-70-8)、Sulfatinib(CAS No.:1308672-74-3)、LY2784544(CAS No.:1229236-86-5)、Dovitinib lactate(CAS No.:692737-80-7)、SU 5402(CAS No.:215543-92-3)、FGF-401(CAS No.:1708971-55-4)、Tyrosine kinase-IN-1(CAS No.:705946-27-6)、PP58(CAS No.:212391-58-7)、TG 100801Hydrochloride(CAS No.:1018069-81-2)、Crenolanib(CAS No.:670220-88-9)、TG 100801(CAS No.:867331-82-6)、Pazopanib Hydrochloride(CAS No.:635702-64-6)、Pazopanib(CAS No.:444731-52-6)、PD168393(CAS No.:194423-15-9)、Apatinib(CAS No.:1218779-75-9)、Palbociclib isethionate(CAS No.:827022-33-3)、Foretinib(CAS No.:849217-64-7)、Lenvatinib(CAS No.:417716-92-8)、Tandutinib(CAS No.:387867-13-2)、等或其盐(将这些化合物作为化合物群组D)。此外,这些化合物在具有FGFR1抑制活性的前提下,优选地是在FGFR1的50％抑制浓度(IC_{50})为100nM以下的前提下,可具有选自上述的一个或多个取代基。

[0255] 此外,这些化合物在具有FGFR1抑制活性的前提下,优选地是在FGFR1的50％抑制浓度(IC_{50})为100nM以下的前提下,一部分的部分结构(取代基、环等)也可以进行转换。

[0256] 优选地,在本发明中,FGFR1抑制剂为CAS192705-79-6(1-[2-氨基-6-(3,5-二甲氧基苯基)-吡啶并(2,3-d)嘧啶-7-基]-3-叔丁基脲:CAS No.:192705-79-6)、E-3810(CAS No.:1058137-23-7)、PD173074(CAS No.:219580-11-7)。

[0257] FGFR1抑制剂不限于上述所示化合物,也可以将针对FGFR1的mRNA的反义寡核苷酸、siRNA、与FGFR1结合的抗体、显性负FGFR1突变体等用作FGFR1抑制剂,其可商购或可根据公知方法合成。

[0258] 本说明书中,“标记”是指“标记蛋白质”、“标记基因”等由规定的细胞型特异性表达的细胞抗原或其基因。优选地,标记为细胞表面标记,在这种情况下,可以实施生存细胞的浓缩、分离和/或检测。标记可以是阳性选择标记或阴性选择标记。

[0259] 标记蛋白质的检测可以利用使用了针对该标记蛋白质的特异性抗体的免疫测定，例如ELISA、免疫染色、流式细胞术等来进行。标记基因的检测可以利用本领域公知的核酸扩增方法和/或核酸检测方法，例如利用RT-PCR、微阵列、生物芯片等来进行。本说明书中，标记蛋白质为“阳性”是指利用流式细胞术检测为阳性，“阴性”是指利用流式细胞术检测低于检测限界。此外，标记基因为“阳性”是指利用RT-PCR进行检测被检出，“阴性”是指利用RT-PCR检测低于检测限界。

[0260] 本说明书中，“表达(expression)”定义为由细胞内的启动子驱动的特定的核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0261] 本说明书中，“细胞”是指细胞的组合物，即细胞群，除非另有说明。因此，“细胞”不仅是特定的细胞或细胞群，还可以包括一个或多个其他细胞或细胞群。“细胞”中的特定细胞可以通过富集或纯化，或通过耗尽一个或多个其他细胞来提升。

[0262] 本说明书中，“多能(pluripotency)”是指可分化为具备各种不同形态或功能的组织、细胞，且可分化为任何层的三胚层细胞的能力。“多能(pluripotency)”无法分化为胚盘，因此不具有形成个体的能力，就这一点而言，“多能”与可分化为包括胚盘在内的生物体的任何组织的“全能(totipotency)”有所区别。

[0263] 本说明书中，“多潜能(multipotency)”是指能够分化为多个有限数量的层的细胞的能力。例如，间充质干细胞、造血干细胞、神经干细胞是多潜能的而非多能的。

[0264] 本说明书中，“多能干细胞(pluripotent stem cell)”是指胚胎干细胞(ES细胞)及与之相同的分化多能、即潜在地具有分化为活体各种组织(内胚层、中胚层、外胚层全部)的能力的细胞。作为具有与ES细胞相同的分化多能的细胞，可举出“人工多能干细胞”(本说明书中，有时也称为“iPS细胞”)。优选地，在本发明中，多能干细胞是人类多能干细胞。

[0265] 如果是小鼠ES细胞作为“ES细胞”，可以使用由inGenious公司、RIKEN等建立的各种小鼠ES细胞株；如果是人类ES细胞作为“ES细胞”，可以使用由NIH、理研、京都大学、Cellartis建立的各种人类ES细胞株。例如，可以使用NIH的CHB-1-CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1-HUES28株等，WisCell Research的H1株、H9株；理研的KhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等，作为ES细胞株。

[0266] “人工多能干细胞”是指通过将特定因子(核重编程因子)导入哺乳动物体细胞或未分化干细胞以对其重编程而获得的细胞。目前，存在各种类型的“人工多能干细胞”，也可以使用山中等人通过将四种因子Oct3/4Sox2 Klf4c-Myc导入小鼠成纤维细胞中而建立的iPS细胞(Takahashi K,Yamanaka S.,Cell,(2006)126:663-676)；此外，通过将同样的四种因子导入人成纤维细胞中而建立的源自人类细胞的iPS细胞(Takahashi K,Yamanaka S.等人Cell,(2007)131:861-872.)；在导入上述四种因子后，通过将Nanog的表达作为指标进行分选而建立的Nanog-iPS细胞(Okita,K.,Ichisaka,T.,及Yamanaka,S.(2007).Nature 448,313-317.)；通过不包含c-Myc的方法制备的iPS细胞(Nakagawa M,Yamanaka S.,等人,Nature Biotechnology,(2008)26,101-106)；以及通过无病毒导入6种因子而建立的iPS细胞(Okita K.等人,Nat.Methods,2011,5月,8(5):409-12,Okita K.等人,Stem Cells.31(3):458-66.)。此外，还可以使用Thomson等制备的、导入了OCT3/4、SOX2、NANOG、LIN28四种因子而建立的人工多能干细胞(Yu J.,Thomson JA.等人,Science(2007)318:1917-1920.)、Daley等制备的人工多能干细胞(Park IH,Daley GQ.等人,Nature(2007)451:141-

146)、樱田等制作的人工多能干细胞(日本特开第2008-307007号)等。

[0267] 此外,也可以使用所有已公开的论文(例如,Shi Y.,Ding S.等人,Cell Stem Cell,(2008)3卷,5号,568-574;Kim JB.,Scholer HR.等人,Nature,(2008)454,646-650;Huangfu D.,Melton,DA.等人,Nature Biotechnology,(2008)26,第7期,795-797)或专利(例如,日本专利特开2008-307007号、日本专利特开2008-283972号、US 2008/2336610、US 2009/047263、WO 2007/069666、WO 2008/118220、WO 2008/124133、WO 2008/151058、WO 2009/006930、WO 2009/006997、WO 2009/007852)中描述的本领域公知的任何人工多能干细胞。

[0268] 可以使用NIH、理化学研究所(理研)、京都大学等建立的各种iPS细胞株作为人工多能细胞株。例如,若是人类iPS细胞株,可列举例如理研的HiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、京都大学的Ff-WJ-18株、Ff-I01s01株、Ff-I01s02株、Ff-I01s04株、Ff-I01s06株、Ff-I14s03株、Ff-I14s04株、QHJI01s01株、QHJI01s04株、QHJI14s03株、QHJI14s04株、RWMH15s02株、Ff-MH15s02株、253G1株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、CDI公司的MyCell iPS Cells(21525.102.10A)株、MyCell iPS Cells(21526.101.10A)株等。

[0269] 本说明书中,“胚体内胚层细胞”是指由SOX17、FOXA2、BMP2、CER及CXCR4中的至少一种的标记的表达进行表征的细胞。

[0270] 本说明书中,“胃肠道细胞”是指由HNF1B及HNF4A中的至少一种标记的表达进行表征的细胞。

[0271] 本说明书中,“后前肠细胞”是指由PDX-1、HNF6及HLXB9中的至少一种的标记的表达进行表征的细胞。

[0272] 本说明书中,“胰腺前体细胞”是指由PDX-1、NKX6.1、PTF-1α、GATA4及SOX9中的至少一种标记的表达进行表征的细胞。

[0273] 本说明书中,“内分泌前体细胞”是指由嗜铬粒蛋白A、NeuroD和Ngn-3中的至少一种标记的表达,以及胰腺相关的激素系统(例如,胰岛素等)的标记不表达进行表征的细胞。内分泌前体细胞也可以由Pax-4、NKX2-2、Islet-1、PDX-1、PTF-1α等标记表达(而表征)。

[0274] 处于各分化阶段的细胞的制造可通过下面详述的技术进行。

[0275] 2.胰岛素产生细胞

[0276] 本发明的“胰岛素产生细胞”是指通过在活体外(in vitro)分化诱导多能干细胞所获得的胰岛素的表达进行表征的细胞。更详细地说,本发明的“胰岛素产生细胞”是由以约30%以上的比例包含表达胰岛素及NKX6.1两种标记的细胞(即,胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞),且以约超过15%的比例包含胰岛素及NKX6.1中仅表达胰岛素作为标记的细胞(即,胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞,以下,描述为“Ins+NKX-细胞”)而进行表征。另外,本说明书中,有时将“胰岛素阳性”描述为“Ins+”,将NKX6.1阳性描述为“NKX+”,将NKX6.1阴性描述为“NKX-”。此外,有时将“胰岛素阳性且NKX6.1阳性的细胞”描述为“Ins+NKX+细胞”,将胰岛素阳性且NKX6.1阴性的细胞“描述为Ins+NKX-细胞”。

[0277] 胰岛素产生细胞中的Ins+NKX+细胞的比例的上限并无特别限定,优选地可设为约50%以下。

[0278] 胰岛素产生细胞中的Ins+NKX-细胞的比例优选地可设为约20%以上、更优选地为

约25％以上、进一步优选地为约30％以上。此外,胰岛素产生细胞中的Ins+NKX-细胞的比例的上限并无特别限定,优选地可设为约40％以下。

[0279] 例如,胰岛素产生细胞以约30％以上且约50％以下的比例包含Ins+NKX+细胞,且以约超过15％且约40％以下的比例,优选地为约20％以上且约40％以下的比例、更优选地为约25％以上且约40％以下的比例、进一步优选地为约30％以上且约40％以下的比例包含Ins+NKX-细胞。

[0280] 另外,本说明书中,胰岛素产生细胞中规定的细胞的比例是指相对于胰岛素产生细胞中所包含的所有细胞数的比例。此外,各细胞的比例表示进行向胰岛样细胞的分化诱导(即,进行活体内的移植)的胰岛素产生细胞中的值。

[0281] Ins+NKX-细胞常见于未成熟(分化阶段较早)的胰岛素产生细胞中,因此Ins+NKX-细胞的比例越高,表示属于更加不成熟(分化阶段较早)的胰岛素产生细胞。

[0282] 胰岛素产生细胞可进一步具有选自以下a.至f.的一种或多种特征:

[0283] a.MafA基因或其蛋白质的表达现量较低;

[0284] b.Ki67阳性细胞的比例较低;

[0285] c.胰高血糖素阳性且胰岛素阴性细胞的比例较低;

[0286] d.显示出葡萄糖刺激性胰岛素分泌响应;

[0287] e.嗜铬粒蛋白A阳性细胞的比例较高;以及

[0288] f.碱性磷酸酶阳性的多能干细胞的比例较低。

[0289] 此处,“多种”是指2、3、4、5或6。

[0290] a.MafA基因或其基因产物的表达量较低

[0291] 本发明的胰岛素产生细胞的特征在于,与胰岛中的MafA基因或其蛋白质的表达量相比,MafA基因或其蛋白质的表达量较低。

[0292] “胰岛”是指与胰岛素产生细胞相比,分化阶段更进一步的细胞,其包含已成熟的胰岛β细胞,通过属于已成熟的胰岛β细胞的标记的MafA、UCN3及IAPP中的至少一种的表达进行表征的细胞。胰岛可使用分离自健康人的东西。

[0293] 胰岛素产生细胞与胰岛间的MafA基因或其蛋白质的表达量的比较,可使用该领域中公知的技术进行,例如,可通过使用RT-PCR、微阵列、生物芯片、西方墨点法(Western_blot)、ELISA、免疫染色、流式细胞术等技术而检测/定量MafA基因或其蛋白质的表达量,将该表达量与以内部标准基因或其蛋白质的表达量进行校正所获得的相对值进行比较而进行。“内部标准基因”并无特别限定,可利用例如GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase)、β-肌动蛋白、β2-微球蛋白、HPRT 1(hypoxanthinephosphoribosyltransferase 1)等。

[0294] 胰岛素产生细胞中的MafA基因或其蛋白质的表达量为胰岛中的MafA基因或其蛋白质的表达量的约20％以下,优选地为约15％以下、更优选地为约10％以下、进一步优选地为约5％以下,尤其优选地为约1％以下。

[0295] MafA基因或其蛋白质为已成熟的胰岛β细胞的标记,因此本特征显示出本发明的胰岛素产生细胞处于几乎不含或以较低的比例包含已成熟的胰岛β细胞的程度的分化阶段。

[0296] b.Ki67阳性细胞的比例较低

[0297] 本发明的胰岛素产生细胞的特征在于,以小于3%的比例包含Ki67阳性细胞。

[0298] “Ki67阳性细胞”是指混合在从多能干细胞分化诱导出的胰岛素产生细胞中,通过由Ki67的表达作为标记进行表征的增殖性高的细胞。“Ki67”已公知为细胞周期相关核蛋白质,在增殖中的细胞的G1期、S期、G2期、M期可确认表达,在停止增殖的G0期未确认表达,因而也已知为细胞增殖及细胞周期的标记。

[0299] 以下,在本说明书中,有时将“Ki67阳性”描述为“Ki67+”。此外,有时将“Ki67阳性细胞”描述为“Ki67+细胞”。

[0300] 胰岛素产生细胞中的Ki67+细胞的比例为约小于3%、约小于1.5%,优选地为约小于1%、更优选地为约小于0.8%、进一步优选地为约小于0.5%。

[0301] 本特征显示在本发明的胰岛素产生细胞中,Ki67+细胞的混入/残存几乎没有或呈较低的比例。由于Ki67+细胞的增殖性较高,可能对受体有不良影响或对经移植的细胞的长期植活产生影响,有其混入/残存为不佳的情况。

[0302] c.胰高血糖素阳性且胰岛素阴性细胞的比例较低

[0303] 本发明的胰岛素产生细胞的特征在于,以小于3%的比例包含胰高血糖素阳性且Ins-细胞。以下,在本说明书中,有将“胰高血糖素阳性”描述为“Gcg+”的情况。此外,有将“胰高血糖素阳性且胰岛素阴性细胞”描述为“Gcg+Ins-细胞”的情况。

[0304] 胰岛素产生细胞中的Gcg+Ins-细胞的比例为约2.5%以下,优选地为约2%以下、更优选地为约1%以下、进一步优选地为约0.5%以下。

[0305] Gcg+Ins-为已成熟的胰岛α细胞的标记,因此本特征显示本发明的胰岛素产生细胞处于几乎不含或以较低的比例包含已成熟的胰岛α细胞的程度的分化阶段。

[0306] d.显示出葡萄糖刺激性胰岛素分泌响应

[0307] 本发明的胰岛素产生细胞显示出葡萄糖刺激性胰岛素分泌(GSIS:Glucose Stimulated Insulin Secretion)响应。

[0308] 胰岛素产生细胞中的GSIS响应可根据以往公知的技术(例如,美国申请第11/773,944号)进行,例如,可通过测定培养基中被分泌的C肽的量而评估。C肽为在胰岛素原的成熟化期间,相对于胰岛素,以等摩尔量产生的分解产物。测定C肽的量可通过例如使用抗C肽单株抗体的ELISA来进行。

[0309] e.嗜铬粒蛋白A阳性细胞的比例较高

[0310] 本发明的胰岛素产生细胞的特征在于,以约超过45%的比例包含嗜铬粒蛋白A阳性细胞。

[0311] 以下,在本说明书中,有将“嗜铬粒蛋白A阳性”描述为“Chga+”的情况。此外,有将“嗜铬粒蛋白A阳性细胞”描述为“Chga+细胞”的情况。

[0312] 胰岛素产生细胞中的Chga+细胞的比例优选地为可设为约50%以上(例如,约55%以上)、更优选地为约60%以上、再更优选地为约70%以上、还更优选地为约80%以上、仍旧优选地为约85%以上,尤其优选地为约90%以上。胰岛素产生细胞中的Chga+细胞的比例的上限并无特别限定,例如,可设为约小于95%、约小于99%。胰岛素产生细胞中的Chga+细胞的比例也可为约93%以上。

[0313] 在Chga+细胞中包含分泌胰岛素等激素的细胞(内分泌细胞),在其中也包含上述Ins+NKX+细胞或Ins+NKX-细胞。因此,本特征显示本发明的胰岛素产生细胞以较高的比例

包含内分泌细胞。

[0314] f.碱性磷酸酶阳性的多能干细胞的比例较低

[0315] 本发明的胰岛素产生细胞的特征在于,以约小于0.01%的比例包含碱性磷酸酶阳性的多能干细胞。

[0316] 胰岛素产生细胞中的碱性磷酸酶阳性的多能干细胞的比例优选地可设为约0.008%以下、更优选地为约0.005%以下、进一步优选地为约0.001%以下。

[0317] 碱性磷酸酶为显示多能干细胞的未分化状态的标记,因此本特征显示本发明的胰岛素产生细胞几乎不含或以较低的比例包含未经分化诱导的目标外的多能干细胞。

[0318] 碱性磷酸酶阳性的多能干细胞也可进一步表达出显示多能的其他标记。显示多能干细胞的多能的其他标记,可利用选自Nanog、Sox2、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81等的至少一种。

[0319] 本发明的胰岛素产生细胞也可处于经冷冻保存的状态。经冷冻保存的本发明的胰岛素产生细胞进行解冻,与未进行冷冻保存的新鲜的胰岛素产生细胞同样地,可分化/成熟为胰岛样细胞,进行激素分泌。冷冻保存及解冻可通过该领域中通常所使用的技术来进行。

[0320] 本发明的胰岛素产生细胞的制造可通过下面详述的技术进行。

[0321] 3.胰岛样细胞

[0322] 本说明书中,“胰岛样细胞”是指分化诱导上述胰岛素产生细胞所获得的成熟细胞,且指与在活体内的胰发育所获得的“胰岛”同样地,通过表达出属于胰岛β细胞的成熟标记的MafA、UCN3及IAPP中的至少一种标记,且,表达出属于胰岛α细胞的成熟标记的胰高血糖素而进行表征的细胞。

[0323] 更详细地说,本说明书中,“胰岛样细胞”可具有选自下列(a)至(d)的一种或多种特征:

[0324] (a)嗜铬粒蛋白A阳性细胞(Chga+细胞)的比例较高;

[0325] (b)Ki67阳性细胞(Ki67+细胞)的比例较低;

[0326] (c)胰高血糖素阳性且胰岛素阴性细胞(Gcg+Ins-细胞)的比例较高;

[0327] (d)具有响应于低血糖产生的胰岛素分泌作用。

[0328] 在此处,“多种”是指2、3或4。

[0329] (a)至(d)的特征的有无可在分化诱导胰岛素产生细胞后(例如,移植至活体内后)1周以后,优选地为2周以后进行评估,此期间的上限并无特别限定,可设为1年以内。另外,胰岛样细胞中规定的细胞的比例,是指相对于源自于移植片的细胞块的所有细胞数的比例。

[0330] (a)Chga+细胞的比例较高

[0331] 本发明的胰岛样细胞的特征在于,以约50%以上的比例包含Chga+细胞。优选地,胰岛样细胞中的Chga+细胞的比例为约60%以上,更优选地为约70%以上、还更优选地约90%以上、尤其优选地为约95%以上(例如,约97%以上、约98%以上)。

[0332] 在Chga+细胞中包含分泌胰岛素或胰高血糖素等激素的细胞(内分泌细胞),本特征显示胰岛样细胞以较高的比例包含内分泌细胞。

[0333] (b)Ki67+细胞的比例较低

[0334] 本发明的胰岛样细胞的特征在于,以约小于3%的比例包含Ki67阳性细胞。优选

地,胰岛样细胞中的Ki67阳性细胞的比例为约小于1%、更优选地为约小于0.8%、进一步优选地为约小于0.5%。

[0335] 本特征显示在胰岛样细胞中,其混入/残存为不佳的情况的Ki67+细胞几乎没有或呈非常低的比例。

[0336] (c)Gcg+Ins-细胞的比例较高

[0337] 本发明的胰岛样细胞的特征在于,以约10%以上的比例包含Gcg+Ins-细胞。优选地,胰岛样细胞中的Gcg+Ins-细胞的比例为约15%以上,更优选地为约20%以上、还更优选地为约25%以上。胰岛样细胞中的Gcg+Ins-细胞的比例的上限并无特别限定,例如,可设为约50%以下,优选地为约45%以下,更优选地为约40%以下。

[0338] Gcg+Ins-为已成熟的胰岛α细胞的标记,因此显示胰岛样细胞以高于胰岛素产生细胞的比例包含已成熟的胰岛α细胞。显示胰岛样细胞处于与胰岛素产生细胞相比更成熟的分化阶段。

[0339] (d)具有响应于低血糖产生的胰岛素分泌作用

[0340] 本发明的胰岛样细胞的特征在于,具有响应于低血糖的胰岛素分泌作用。"响应于低血糖的胰岛素分泌作用"是指自低血糖时起在1小时以内、2小时以内、3小时以内、4小时以内或5小时以内,胰岛素分泌量增加。"低血糖"是指血中或培养基中的葡萄糖浓度为约70mg/dL以下时。胰岛素分泌量的测定可通过以往公知的任意手段来进行,并无特别限定,但也可通过测定血中或培养基中的C肽量而进行。

[0341] 通常,若在活体内发生低血糖,则会通过胰高血糖素等的分泌来促进血糖值的上升,同时对胰高血糖素进行拮抗而分泌胰岛素,控制血糖值水平。本发明的胰岛样细胞同样地能够进行对于低血糖的血糖值水平的控制,具有响应于低血糖而促进血糖值的上升,同时对其进行拮抗而分泌胰岛素的作用。

[0342] 4.细胞的制造方法

[0343] 本发明的胰岛素产生细胞可通过多能干细胞分化诱导而获得。从多能干细胞向胰岛素产生细胞的分化诱导可以使用以下诱导分化的步骤进行:

[0344] 步骤1)从多能干细胞分化诱导为胚体内胚层细胞;

[0345] 步骤2)从胚体内胚层细胞分化诱导为胃肠道细胞;

[0346] 步骤3)从胃肠道细胞分化诱导为后前肠细胞;

[0347] 步骤4)从后前肠细胞分化诱导为胰腺前体细胞;

[0348] 步骤5)从胰腺前体细胞分化诱导为内分泌前体细胞;以及

[0349] 步骤6)从内分泌前体细胞分化诱导为胰岛素产生细胞。

[0350] 在下文中,将说明每个步骤,但对各细胞的诱导分化不仅限于这些技术。

[0351] 步骤1)分化为胚体内胚层细胞

[0352] 优选地,将多能干细胞在包含低剂量的激活素A的培养基中进行培养,以使其分化为胚体内胚层细胞。

[0353] 本步骤所使用的培养基,可使用RPMI培养基、MEM培养基、iMEM培养基、DMEM(Dulbecco改良Eagle培养基)培养基、改良的MEM锌选择(Improved MEM Zinc Option)培养基、改良的(Improved)MEM/1%B-27补充剂/青霉素链霉素(Penisilin Streptomycin)培养基、MCDB131/20mM葡萄糖/$NaHCO_3$/FAF-BSA/ITS-X/Glutamax/抗坏血酸/青霉素链霉素

(Penisilin Streptomycin)培养基等哺乳类细胞的培养所使用的基本培养基。

[0354] 激活素A可以低剂量例如以5ng/mL至100ng/mL,优选5ng/mL至50ng/mL,更优选5ng/mL至10ng/mL的量包含在培养基中。

[0355] 培养基中可进一步添加ROCK抑制剂和GSK3β抑制剂。

[0356] GSK3β抑制剂在培养基中的浓度根据所使用的GSK3β抑制剂种类适当设定,例如,使用CHIR作为GSK3β抑制剂时,浓度通常可以为2μM至5μM、优选为2μM至4μM、特别优选地为约3μM。

[0357] ROCK抑制剂在培养基中的浓度根据所使用的ROCK抑制剂种类适当设定,例如,使用Y27632作为ROCK抑制剂时,浓度通常为5μM至20μM、优选地为5μM至15μM、特别优选地为10μM。

[0358] 培养基中可进一步添加胰岛素。胰岛素可以0.01μM至20μM,优选地为0.1μM至10μM,更优选地为0.5μM至5μM的量包含在培养基中。培养基中的胰岛素的浓度可为所添加的B-27补充剂中所包含的胰岛素的浓度,但不限定于此。

[0359] 培养开始时的细胞数没有特别限定,为22000个细胞/cm^2至150000个细胞/cm^2、优选地为22000个细胞/cm^2至100000个细胞/cm^2、更优选地为22000个细胞/cm^2至80000个细胞/cm^2。培养时间为1至4天、优选地为1至3天、特别优选地为3天。

[0360] 培养温度没有特别限定,为30℃-40℃(例如,37℃)。此外,培养容器中的二氧化碳浓度为例如约5%。

[0361] 或者是,在本发明中,胚体内胚层细胞可通过在低剂量的激活素A的存在下,将多能干细胞在胰岛素进行作用的条件下的培养基中进行第一培养,继而,在胰岛素不进行作用的条件下的培养基中进行第二培养而制造。

[0362] (1)第一培养

[0363] “胰岛素进行作用的条件”是指通过胰岛素而产生细胞中的胰岛素信号传递路径的活化的条件。通常,胰岛素与存在于细胞膜表面上的胰岛素受体结合,活化存在于受体内部的酪氨酸激酶,使胰岛素受体基质蛋白家族(IRS:IRS-1,2,3)酪氨酸磷酸化。本说明书中,将由胰岛素与胰岛素受体结合而引发的这些一连串的反应称为“产生胰岛素信号传递路径的活化”。

[0364] 胰岛素进行作用的条件,可列举例如:在培养基中包含胰岛素的情况。胰岛素只要是可将多能干细胞中的胰岛素信号传递路径进行活化即可,通过重组法来制造,也可为通过固相合成法进行合成来制造。胰岛素可利用源自于人类、非人类灵长类、猪、牛、马、绵羊、山羊、大羊驼、犬、猫、兔、小鼠、豚鼠等,优选地为人类胰岛素。

[0365] 本发明中,只要能产生多能干细胞中的胰岛素信号传递路径的活化,也可以使用胰岛素变体、胰岛素衍生物或胰岛素激动剂作为“胰岛素”。“胰岛素变体”可列举由在胰岛素的氨基酸序列中删除、取代、加成或者插入了1个至20个、优选为1个至10个、进一步优选为1个至5个氨基酸的氨基酸序列所构成且能够产生胰岛素信号传递路径的活化的多肽,或者由与胰岛素的氨基酸序列的序列同一性为80%以上、更优选为90%以上、进一步优选为95%以上、最优选为99%以上的氨基酸序列所组成且能够产生胰岛素信号传递路径的活化的多肽。氨基酸序列的比较可通过公知的技术来施行,例如,可使用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information(美国

国立生物学信息中心的基本区域比对检索工具))等,例如,以预设的设定来实施。“胰岛素衍生物”是指由胰岛素或胰岛素变体的氨基酸残基的部分基团被化学取代(例如α-甲基化、α-羟基化)、删除(例如脱氨基化)、或者修饰(例如N-甲基化)后的氨基酸序列所组成且能够产生胰岛素信号传递路径的活化的多肽或者具有相同作用的物质。“胰岛素激动剂”是指能够与胰岛素的结构无关地与胰岛素受体结合并产生胰岛素信号传递路径的活化的多肽或者具有相同作用的物质。

[0366] 在第一培养的培养基中,可以0.01μM至20μM、优选地为0.1μM至10μM、更优选地为0.5μM至5μM的量包含胰岛素。培养基中的胰岛素的浓度可为所添加的B-27补充剂中所包含的胰岛素的浓度,但不限定于此。

[0367] 培养基中可进一步包含ROCK抑制剂和/或GSK3β抑制剂。ROCK抑制剂在培养基中的浓度根据所使用的ROCK抑制剂的种类适当设定,例如,使用Y27632作为ROCK抑制剂时,浓度通常为5μM至20μM、优选地为5μM至15μM、特别优选地为10μM。GSK3β抑制剂在培养基中的浓度可根据所使用的GSK3β抑制剂种类适当设定,例如,使用CHIR作为GSK3β抑制剂时,浓度通常可以设为2μM至5μM、优选地为2μM至4μM、特别优选地为约3μM。

[0368] 培养基中还可进一步包含选自由丙酮酸盐(钠盐等)、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺以及葡萄糖所组成的群中的一种或多种。丙酮酸盐可以10mg/L至1000mg/L、优选地为30mg/L至500mg/L、更优选地为50mg/L至200mg/L、特别优选地为约110mg/L的量包含在培养基中。L-丙氨酰-L-谷氨酰胺可以50mg/L至2000mg/L、优选地为100mg/L至1500mg/L、更优选地为500mg/L至1000mg/L、特别优选地为约860mg/L的量包含在培养基中。葡萄糖可以15mM以上、优选地为15mM至30mM、更优选地为15mM至25mM、特别优选地为约25mM的量包含在培养基中。培养基中的丙酮酸盐、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺以及葡萄糖的浓度可以为DMEM培养基(DMEM,高浓度葡萄糖,GlutaMAXTM,丙酮酸(Thermo Fisher Scientific))或者其他DMEM培养基中包含的丙酮酸盐、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺以及葡萄糖的浓度,但不限定于此。

[0369] 培养基可使用以上述基本培养基为基础,并添加了上述成分中的一种或多种。基本培养基,优选地为DMEM培养基、更优选地为以上述的量包含丙酮酸盐、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺及葡萄糖的DMEM培养基。

[0370] 第一培养的培养时间段可以为选自6小时至48小时、优选为12小时至24小时的范围。培养温度没有特别限定,为30℃-40℃(例如,37℃)。此外,培养容器中的二氧化碳浓度为例如约5%。可以通过二维培养和三维培养中的任一种来进行培养。对于培养开始时的细胞数没有特别限定,若是二维培养,则可以为5万至100万个细胞/cm^2、优选为15万至30万个细胞/cm^2、更优选为约20万个细胞/cm^2。此外,对于培养开始时的细胞数没有特别限定,若是三维培养,则可以为1万至100万个细胞/mL、优选为10万至50万个细胞/mL。

[0371] (2)第二培养

[0372] “胰岛素不进行作用的条件”是指不产生由胰岛素所引发的细胞中的胰岛素信号传递路径的活化的条件。“不产生细胞中的胰岛素信号传递路径的活化”不仅是指该胰岛素信号传递路径的活化完全不产生,也指与胰岛素不存在下的该胰岛素信号传递路径的活化相比,仅产生无法确认显著差异程度的轻微活化的情况。因此,“胰岛素不进行作用的条件”可列举例如:在培养基中不含胰岛素,或者是,即便是在培养基中包含胰岛素时,也以包含其量为仅产生前述的无法确认显著差异的程度的轻微活化的量的条件。或者是,指即便是

在培养基中包含胰岛素时,通过一起包含胰岛素信号抑制剂,而不产生前述胰岛素信号传递路径的活化的情况。“胰岛素信号抑制剂”是指能够在任意位置阻断胰岛素信号传递路径的成分。这种胰岛素信号抑制剂可列举:与胰岛素、胰岛素受体、作用为信号传递物质的各种蛋白质等结合或竞争,并抑制这些因子所参与的分子间的相互作用的多肽或化合物等。例如,这种胰岛素信号抑制剂可列举:竞争抑制ATP结合至PI3激酶的催化亚单元的LY294002[2-(4-吗啉基)-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-4-酮)]等。胰岛素信号抑制剂并不限定于此,与胰岛素、胰岛素受体、作用为信号传递物质的各种蛋白质结合的抗体或其显性负性型变异体、以及相对于胰岛素受体或作用为信号传递物质的各种蛋白质的mRNA的反义寡核苷酸或siRNA等也可用作胰岛素信号抑制剂。胰岛素信号抑制剂可商购或可根据公知方法合成。

[0373] 培养基中可进一步包含ROCK抑制剂和/或GSK3β抑制剂。培养基中的ROCK抑制剂及/或GSK3β抑制剂的量可选自在上述第一培养中所描述的范围,可为与第一培养所使用的相同的量,也可不同。

[0374] 培养基中还可进一步包含选自由丙酮酸盐、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺以及葡萄糖所组成的群中的一种或多种。培养基中的丙酮酸盐、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺及葡萄糖的量可选自在上述第一培养中所描述的范围,可为与第一培养所使用的相同的量,也可不同。

[0375] 第二培养所使用的培养基可使用以哺乳类细胞的培养所使用的基本培养基为基础,添加有上述成分中的一种或多种。基本培养基可使用在上述第一培养中所描述的,可为与第一培养所使用的相同的基本培养基,也可不同。优选地为DMEM培养基,更优选地为以上述的量包含丙酮酸盐、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺及葡萄糖的DMEM培养基。

[0376] 第二培养的培养时间段为至少6小时、优选地为选自6小时至72小时、进一步优选地为24小时至72小时的范围。培养温度没有特别限定,为30℃-40℃(例如,37℃)。可以通过二维培养和三维培养中的任一种来进行培养。此外,培养容器中的二氧化碳浓度为例如约5%。

[0377] 第一培养及第二培养的培养基中可以上述低剂量包含激活素A。第一培养及第二培养的培养基中所包含的激活素A的量可为相同的量,也可不同。

[0378] 第一培养及第二培养的培养基中也可进一步添加二甲亚砜。

[0379] 通过将多能干细胞在低剂量的激活素A的存在下进行培养,或者,通过将多能干细胞在低剂量的激活素A的存在下,在胰岛素进行作用的条件下的培养基中进行第一培养,继而,在胰岛素不进行作用的条件下的培养基中进行第二培养,则可在步骤6)以后,提升所获得的内分泌细胞的比例。

[0380] 步骤2)分化为胃肠道细胞

[0381] 进一步地,在包含生长因子的培养基中培养步骤1)中获得的胚体内胚层细胞,以分化诱导为胃肠道细胞。培养时间段为2至8天,优选地为约4天。

[0382] 培养温度没有特别限定,为30℃-40℃(例如,37℃)。此外,培养容器中的二氧化碳浓度为例如约5%。

[0383] 培养基可以使用上述步骤1)中所描述的用于哺乳类细胞培养的基本培养基。培养基中,除生长因子外,还可适当地添加血清替代物、维生素、抗生素等。

[0384] 优选地将EGF、KGF和FGF10作为生长因子、更优选地将EGF和/或KGF作为生长因子、

进一步优选地将KGF作为生长因子。

[0385] 生长因子在培养基中的浓度根据所使用的生长因子的种类适当设定,但通常为约0.1nM至1000μM、优选地为约0.1nM至100μM。在使用EGF的情况下,其浓度为约5ng/ml至2000ng/ml(即,约0.8nM至320nM)、优选地为约5ng/ml至1000ng/ml(即,约0.8nM至160nM)、更优选为约10ng/ml至1000ng/ml(即,约1.6nM至160nM)。在使用FGF10的情况下,其浓度为约5ng/ml至2000ng/ml(即,约0.3nM至116nM)、优选地为约10ng/ml至1000ng/ml(即约0.6nM至58nM)、更优选地为约10ng/ml至1000ng/ml(即约0.6nM至58nM)。例如,当使用KGF作为生长因子时,其浓度通常为5ng/mL至150ng/mL、优选地为30ng/mL至100ng/mL、特别优选地为约50ng/mL。

[0386] 步骤3)分化为后前肠细胞

[0387] 进一步地,在包含生长因子、环巴氨、头蛋白等的培养基中培养步骤2)中获得的胃肠道细胞,以分化诱导为后前肠细胞。培养时间段为1至5天,优选地为约2天。

[0388] 培养温度没有特别限定,为30℃-40℃(例如,37℃)。此外,培养容器中的二氧化碳浓度为例如约5%。

[0389] 培养基可以使用上述步骤1)中所描述的用于哺乳类细胞培养的基本培养基。培养基中,除生长因子外,还可适当地添加血清替代物、维生素、抗生素等。

[0390] 优选地将EGF、KGF和FGF10作为生长因子、更优选地将EGF和/或KGF作为生长因子、进一步优选地将KGF作为生长因子。

[0391] 生长因子在培养基中的浓度根据所使用的生长因子的种类适当设定,但通常为约0.1nM至1000μM、优选地为约0.1nM至100μM。在使用EGF的情况下,其浓度为约5ng/ml至2000ng/ml(即,约0.8nM至320nM)、优选地为约5ng/ml至1000ng/ml(即,约0.8nM至160nM)、更优选为约10ng/ml至1000ng/ml(即,约1.6nM至160nM)。在使用FGF10的情况下,其浓度为约5ng/ml至2000ng/ml(即,约0.3nM至116nM)、优选地为约10ng/ml至1000ng/ml(即约0.6nM至58nM)、更优选地为约10ng/ml至1000ng/ml(即约0.6nM至58nM)。例如,当使用KGF作为生长因子时,其浓度通常为5ng/mL至150ng/mL、优选地为30ng/mL至100ng/mL、特别优选地为约50ng/mL。

[0392] 环巴氨在培养基中的浓度没有特别限定,但通常为0.5μM至1.5μM、优选地为0.3μM至1.0μM、特别优选地为约0.5μM。

[0393] 头蛋白在培养基中的浓度没有特别限定,但通常为10ng/mL至200ng/mL、优选为50ng/mL至150ng/mL、特别优选地为约100ng/mL。

[0394] 此外,培养基中也可添加二甲亚砜、激活素。

[0395] 步骤4)分化为胰腺前体细胞

[0396] 进一步地,在包含具有CDK8/19抑制活性的因子的培养基中培养步骤3)中获得的后前肠细胞,优选地在包含具有CDK8/19抑制活性的因子和生长因子的培养基中培养,以分化诱导为胰腺前体细胞。培养段时间为2至10天,优选地为约5天。

[0397] 步骤3)中获得的后前肠细胞是根据先前的报道制备的(Toyoda等人,Stem cell Research(2015)14,185至197),在经0.25%的胰蛋白酶EDTA处理后,通过移液分散将0.25%的胰蛋白酶EDTA离心分离并悬浮,再重新将其接种到步骤4的新鲜培养基中。

[0398] 可以如步骤1)中那样使用用于培养哺乳动物细胞的基本培养基来作为培养基。培

养基中,除生长因子外,还可适当地添加血清替代物、维生素、抗生素等。

[0399] 可以使用前述各种化合物或其盐作为具有CDK8/19抑制活性的因子,根据所使用的化合物或其盐适当确定对培养基的添加量,通常为约0.00001μM至5μM、优选地为0.00001μM至1μM。培养基中具有CDK8/19抑制活性的因子的浓度优选地为对CDK8/19的抑制活性达到50%以上的浓度。

[0400] 优选地将EGF、KGF和FGF10作为生长因子、更优选地将KGF和/或EGF作为生长因子、进一步优选地将KGF和EGF作为生长因子。

[0401] 生长因子在培养基中的浓度根据所使用的生长因子的种类适当设定,但通常为约0.1nM至1000μM,优选地为约0.1nM至100μM。在使用EGF的情况下,其浓度为约5ng/ml至2000ng/ml(即,约0.8nM至320nM)、优选地为约5ng/ml至1000ng/ml(即,约0.8nM至160nM)、更优选为约10ng/ml至1000ng/ml(即,约1.6nM至160nM)。在使用FGF10的情况下,其浓度为约5ng/ml至2000ng/ml(即,约0.3nM至116nM)、优选地为约10ng/ml至1000ng/ml(即约0.6nM至58nM)、更优选地为约10ng/ml至1000ng/ml(即约0.6nM至58nM)。例如,当使用KGF和EGF作为生长因子时,KGF的浓度通常为5ng/mL至150ng/mL、优选地为30ng/mL至100ng/mL、特别优选地为约50ng/mL;EGF的浓度通常为10ng/mL至200ng/mL、优选地为50ng/mL至150ng/mL、特别优选地为约100ng/mL。

[0402] 对于步骤4)中的培养,第一天可以在ROCK抑制剂的存在下进行,此后,可以在不含ROCK抑制剂的培养基中进行培养。

[0403] 此外,培养基也可包含PKC活化剂。使用PdBU(PKC activator II)、TPB(PKC actovator V)等作为PKC活化剂,但不限于此。激活素A的浓度以约0.1ng/ml至100ng/ml、优选地为约1ng/ml至50ng/ml、更优选地为约3ng/ml至10ng/ml进行添加。

[0404] 此外,培养基中也可添加二甲亚砜、激活素。

[0405] 在任何步骤中,除了上述成分外,培养基中还可添加血清替代物(例如,B-27补充剂、ITS-G)。此外,根据需要,也可以添加氨基酸、L-谷氨酰胺、GlutaMAX(产品名称)、非必需氨基酸、维生素、抗生素(例如,抗生素-抗霉素(在本说明书中称为AA)、青霉素、链霉素、或其混合物)、抗菌剂(例如,两性霉素B)、抗氧化剂、丙酮酸、缓冲剂、无机盐类等。当将抗生素添加到培养基中时,其在培养基中的浓度按重量计通常为0.01%至20%,优选地,按重量计为0.1%至10%。

[0406] 此外,不使用饲养细胞,而通过粘附培养进行细胞培养。培养时,使用培养皿、烧瓶、微板、OptiCell(产品名称)(Nunc公司)等的细胞培养片等培养容器。优选地对培养容器进行表面处理,以改善其对细胞的粘附性(亲水性),将胶原蛋白、明胶、聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸、层粘连蛋白、纤连蛋白、基质胶(例如,BD基质胶(日本贝克顿迪金森公司)、玻连蛋白等用于细胞粘附的基质涂覆其上。优选地将涂覆有I型胶原、基质胶、纤连蛋白、玻连蛋白或聚-D-赖氨酸等的培养容器作为培养容器、更优选地将涂覆有基质胶或聚-D-赖氨酸的培养容器作为培养容器。

[0407] 培养温度没有特别限定,为30℃-40℃(例如,37℃)。此外,培养容器中的二氧化碳浓度为例如约5%。

[0408] 步骤5)分化为内分泌前体细胞

[0409] 进一步地,在包含生长因子的培养基中培养步骤4)中获得的胰腺前体细胞,以分

化诱导为内分泌前体细胞。培养时间段为2至3天,优选地为约2天。

[0410] 培养基可以使用上述步骤1)中所描述的用于哺乳类细胞培养的基本培养基。根据先前的报道(Nature Biotechnology 2014;32:1121-1133),在培养基中添加SANT1、视黄酸、ALK5抑制剂II、T3和LDN,进一步地,培养基中还可适当地添加Wnt抑制剂、ROCK抑制剂、FGF(优选地FGF2)、血清替代物、维生素、抗生素等。此外,培养基中也可添加二甲亚砜、激活素。

[0411] 此外,不使用饲养细胞,而通过非粘附培养进行细胞培养。培养时,使用培养皿、烧瓶、微板、多孔板(Nunc公司)等或生物反应器。优选地对培养容器进行表面处理以减少其对细胞的粘附性。

[0412] 培养温度没有特别限定,为30℃-40℃(例如,37℃)。此外,培养容器中的二氧化碳浓度为例如约5%。

[0413] 步骤6)分化为胰岛素产生细胞

[0414] 进一步地,在包含FGFR1抑制剂的培养基中培养步骤5)中获得的内分泌前体细胞,以分化诱导为胰岛素产生细胞。培养时间段为14天至30天、优选为约14至20天。

[0415] 培养基可以使用上述步骤1)中所描述的用于哺乳类细胞培养的基本培养基。按照以往的报道(Nature Biotechnology 2014;32:1121-1133),在培养基中添加ALK5抑制剂II、T3、LDN、γ-分泌酶抑制剂XX、γ-分泌酶抑制剂RO、N-半胱氨酸、AXL抑制因子、抗坏血酸,进一步地,培养基中还可适当地添加Wnt抑制剂、ROCK抑制剂、FGF(优选为FGF2)、血清替代物、维生素、抗生素等。例如,培养基中可添加ALK5抑制剂II、T3、LDN、γ-分泌酶抑制剂RO及抗坏血酸,或者也可添加T3、ALK5抑制剂II、ZnSO4、肝素、N-乙酰基半胱胺酸、Trolox及R428。

[0416] 此外,不使用饲养细胞,而通过非粘附培养进行细胞培养。培养时,使用培养皿、烧瓶、微板、多孔板(Nunc公司)等或生物反应器。优选地对培养容器进行表面处理以减少其对细胞的粘附性。

[0417] 培养温度没有特别限定,为30℃-40℃(例如,37℃)。此外,培养容器中的二氧化碳浓度为例如约。

[0418] 培养基中,可以能够抑制FGFR1活性的任意量包含FGFR1抑制剂,例如以10μM以下或5μM以下的量、优选地以小于5μM、小于4μM、小于3μM、小于2μM的量包含FGFR1抑制剂。FGFR1抑制剂的添加量的下限并无特别限定,可设为0.1μM以上、优选地为0.5μM以上。FGFR1抑制剂的添加量优选地为小于5μM且0.1μM以上、更优选地为小于5μM且0.5μM以上。在FGFR1抑制剂的存在下的培养可进行至少12小时,优选地为24小时以上、2天以上、4天以上、8天以上、10天以上或15天以上。在FGFR1抑制剂存在下的培养优选地进行4天以上。例如,可针对步骤6)的最后的约4至15天,优选地为最后的约4至7天,进行FGFR1抑制剂的存在下的培养。可以在处理期间用FGFR1抑制剂代替培养基,并且可以根据培养时间表用具有与添加FGFR1抑制剂的替代品之前相同的组成的培养基或具有不同组成的培养基代替。

[0419] 通过在包含FGFR1抑制剂的培养基中培养细胞,可以抑制所得胰岛素产生细胞中Ki67阳性细胞的增殖。

[0420] 可将步骤6)中获得的胰岛素产生细胞冷冻保存直至使用。

[0421] 5.分化为胰岛样细胞

[0422] 本发明的胰岛素产生细胞可通过移植至动物活体内而分化诱导成胰岛样细胞。

[0423] “动物”优选为哺乳动物,列举例如人类、非人类灵长类、猪、牛、马、绵羊、山羊、大羊驼、犬、猫、兔、小鼠、豚鼠等,优选为人类。

[0424] 移植优选地在可将细胞固定在一定的位置的活体内区域施进行,例如,可以在动物的皮下、腹腔内、腹膜上皮、大网膜、脂肪组织、肌肉组织、胰脏、肾脏等各脏器的被膜下等进行。被移植的细胞数可根据被移植移植对象的年龄、体重、移植部位的大小等因素而变化,对此没有特别限定,例如可以为10×10^4个细胞至10×10^{11}个细胞左右。经移植的细胞可在活体内环境中受到分化诱导而分化为胰岛样细胞。此外,所移植的细胞数可根据移植对象的年龄、体重、移植部位等因素而变化,在移植后1周以后、优选地为2周以后,经移植的胰岛素产生细胞分化/成熟为胰岛样细胞。获得的胰岛样细胞随后可加以回收,也可直接留置于活体内。

[0425] 6.用途

[0426] 本发明的胰岛素产生细胞可直接或与药理学上可容许的载体等进行混合并制成药物,由此,对需要其的患者安全地进行投与。

[0427] “药理学上可容许的载体”只要是能够与胰岛素产生细胞共同地移植至活体内,经移植的胰岛素产生细胞能够分化/成熟为胰岛样细胞即可,可适当地利用根据所期望的剂型而获得的。例如,“药理学上可容许的载体”的例子,可举出水凝胶。水凝胶优选地为由活体适合性及/或生物分解性的聚合物所组成的,这种水凝胶可利用由选自:海藻酸、纤连蛋白、明胶、胶原蛋白、蛋白多醣、葡萄糖胺多醣(例如,玻尿酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素、肝素、硫酸角质素等)、层粘连蛋白、玻连蛋白以及此等之盐或酯中的一种或多种所组成者。例如,可适合地利用使用海藻酸盐(例如,海藻酸钠、海藻酸钙、海藻酸铵等)或海藻酸酯(也称为海藻酸丙二醇酯)所制备出的包含海藻酸的凝胶(WO 2010/032242、WO 2011/154941)作为水凝胶。水凝胶可使胰岛素产生细胞分散于该凝胶中而使用。

[0428] 此外,胰岛素产生细胞或药物也可以包含在能够容纳它们的器具中。器具可利用由任意形状及材质所组成,只要其能够与胰岛素产生细胞或药物共同地移植至活体内,经移植的胰岛素产生细胞能够分化/成熟为胰岛样细胞即可。例如,此种器具的例子,可利用由活体适合性及/或生物分解性聚合物(例如,聚甘醇酸、聚乳酸等)、陶瓷、金属(例如,钛、不锈钢、钴或其合金等)所组成的。器具的形状并无特别限定,可设为能够收容胰岛素产生细胞或药物的胶囊、袋、室等形状。器具优选地具有能够连通其内部与外部的多孔质部、孔、通路等。

[0429] 本发明的胰岛素产生细胞或药物可以经冷冻保存的形态进行供给,可在使用时加以解冻而使用。

[0430] 本发明的胰岛素产生细胞或药物可移植至需要其的患者的活体内而使用。移植优选地在可将细胞固定在一定的位置的活体内区域施进行,例如,可以在皮下、腹腔内、腹膜上皮、大网膜、脂肪组织、肌肉组织、胰脏、肾脏等各脏器的被膜下等进行。优选地为侵袭度较低的皮下移植。所移植的胰岛素产生细胞只要投与治疗上有效量即可,可依据移植对象的年龄、体重、移植部位的大小、疾患的严重度等因素而变化,并无特别限定,例如,可设为10×10^4个细胞至10×10^{11}个细胞左右。

[0431] 经移植的胰岛素产生细胞是在活体内分化/成熟而成为胰岛样细胞,发挥对治疗

或预防疾患、障碍或症状而言有用的功能。即,本发明的胰岛素产生细胞或药物可利用为前药。

[0432] 根据本发明的胰岛素产生细胞或药物,可于患者活体内产生胰岛样细胞,通过胰岛样细胞所分泌出的胰岛素或胰高血糖素的作用,可改善及/或维持患者中的血糖值(葡萄糖)的水平。

[0433] 因此,本发明的胰岛素产生细胞或药物可为了治疗或预防需要改善及/或维持血糖值的水平的疾患、障碍或症状而使用。此种疾患、障碍或症状,可列举,患者,特别是糖尿病患者中的糖尿病、空腹时及餐后葡萄糖水平的不正常、低血糖症(例如,糖尿病患者中的胰岛素投与所引发的低血糖症)等,但并不限定于此。另外,“治疗”是指疾患、障碍或症状的治疗、治愈、防止或缓解改善,或者疾患、障碍或症状的进行速度降低。此外,“预防”,是指使疾患、障碍或症状的发病的可能性、危险性降低,或使疾患、障碍或症状的发病延迟。

[0434] 患者为哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猫、犬、牛、羊、猴、人类),优选地为人类。

[0435] 以下,通过实施例对本发明进行说明,但本发明并不限定于这些实施例。

[0436] 实施例

[0437] 实施例1:胰岛素产生细胞的成熟度及增殖性细胞的混入率

[0438] 1.方法

[0439] (1)胰岛素产生细胞的制备

[0440] 根据上述步骤1)至6)以及先前的报道(Nature Biotechnology 2014;32:1121-1133)来实施从Ff-I14s04 iPS细胞株向胰岛素产生细胞的诱导分化。

[0441] 即,将iPS细胞悬浮在包含10μM的ROCK抑制剂(Y-27632)的iPS细胞培养基中,并使用细胞计数装置NC200(ChemoMetec公司)进行计数,调整至37.5×10^4细胞/mL,以2mL/孔(75×10^4细胞/孔)接种至涂覆有iMatrix的板上并孵育。然后,胰岛素进行作用的条件下,即包含分化诱导因子(GSK3β抑制剂(3μM CHIR99021)、低剂量(10ng/mL)激活素A)的培养基(DMEM-高葡萄糖-GlutaMAX-丙酮酸/2%B27(包含胰岛素)/青霉素链霉素/1%二甲亚砜)中进行第一培养,然后在胰岛素不起作用条件下、即在包含分化诱导因子(低剂量(10ng/mL激活素A))的培养基(DMEM-高葡萄糖-GlutaMAX-丙酮酸/2%B27(不含胰岛素)/青霉素链霉素/1%二甲亚砜)中进行第二培养,以获得胚体内胚层细胞。将获得的胚体内胚层细胞置于包含50ng/mL的KGF(改良的MEM/1%B27(含胰岛素)/青霉素链霉素)的培养基中;

[0442] 然后回收在包含50ng/mL KGF、100ng/mL头蛋白、0.5μM环巴氨、10nM的TTNPB和250μM维生素C的培养基(改良的MEM/1%B27(含胰岛素)/青霉素链霉素)中培养获得的后前肠细胞;

[0443] 将其悬浮在包含0.1μM ROCK抑制剂、100ng/mL的KGF、50ng/mL的EGF、10mM烟酰氨和250μM维生素C的培养基(改良的MEM/1%B27(含胰岛素)/青霉素链霉素)中,调整至175×10^4细胞/mL;以350×10^4细胞/孔再接种至涂覆有iMatrix的板上进行培养。

[0444] 再度回收获得的细胞,悬浮在包含0.25μM SANT-1、50nM视黄酸、10μM ALK5抑制剂II、100nM LDN、1μM T3、50ng/mL bFGF、1μM XAV、10μM Y-27632的培养基(改良的MEM/1%B27(包含胰岛素)/青霉素链霉素(Penisilin Streptomycin))中,调整至20×10^4细胞/mL,以3×10^4细胞/孔,再接种至细胞非粘附96孔盘(住友Bakelite)进行培养。将获得的细胞群

在包含10μM ALK5抑制剂II、1μM T3、100μM LDN、1μM γ-分泌酶抑制剂(RO-4929097)、250μM抗坏血酸和1μM FGF受体1抑制剂(PD-1666866)的培养基(改良的MEM/1%B27(含胰岛素)/青霉素链霉素)中培养,以获得胰岛素产生细胞。

[0445] (2)蛋白质表达的评估

[0446] 通过流式细胞术测定从Ff-I14s04 iPS细胞株制备的胰岛素产生细胞的和从健康个体分离出的人类胰岛(以下称为"islet")的蛋白质表达(胰岛素(INS)、NKX6.1、胰高血糖素(GCG)、Ki67)。此外,作为对照,还以相同的方式测定未经FGF受体1抑制剂(PD-166866)处理所制备的胰岛素产生细胞的原型(以下称为"原型")。

[0447] (3)基因表达量的评估

[0448] 使用从采取自原型、胰岛素产生细胞及胰岛(islet)的各样品的全RNA划分物所合成出的cDNA,通过定量PCR法测定已知为胰岛素、胰高血糖素及成熟胰岛β细胞标记的MafA、UCN3的mRNA表达量。通过以与对照基因相同的方式测定的GAPDH mRNA的表达量进行归一化。

[0449] 2.结果

[0450] (1)蛋白质表达的评估

[0451] 将通过流式细胞术的测定结果示于图1。此外,将胰岛素阳性/NKX6.1阳性细胞率、胰岛素阳性/NKX6.1阴性细胞率、嗜铬粒蛋白A阳性细胞率、Ki67阳性细胞率示于表1。胰岛素产生细胞显示与胰岛同等或其以上的胰岛素阳性/NKX6.1阳性细胞率。另一方面,针对胰岛素阳性/NKX6.1阴性细胞率,可确认相较于胰岛,胰岛素产生细胞明显较高。若将胰岛素产生细胞与原型进行比较,则在胰岛素产生细胞中,胰岛素阳性/NKX6.1阳性细胞率、胰岛素阳性/NKX6.1阴性细胞率及嗜铬粒蛋白A阳性细胞率上升,针对Ki67阳性细胞率则显著地减少。

[0452] [表1]

[0453]

细胞株	Ff-I14-s04		
细胞类型	原型	胰岛素产生细胞	胰岛
胰岛素阳性/NKX6.1阳性细胞率	30.8 %	37.8 %	31.8 %
嗜铬粒蛋白A阳性细胞率	83.9 %	94.7 %	88.7 %
胰岛素阳性/NKX6.1阴性细胞率	21.8 %	28.2 %	2.3 %
Ki67阳性细胞率	5.5 %	0.4 %	n.d.

[0454] n.d.,未确定

[0455] (2)基因表达量的评估

[0456] 原型、胰岛素产生细胞及胰岛中的胰岛素、胰高血糖素、MafA及UCN3的表达水平示于表2及图2。

[0457] 与上述通过流式细胞术得到的胰岛素阳性细胞率、胰高血糖素阳性细胞率的结果一致,与原型相比而言,在胰岛素产生细胞中可看出胰岛素、胰高血糖素表达量增加,达到胰岛的至50%左右的水平。在另一方面,已判明胰岛素产生细胞中的MafA及UCN3的表达水

平与人类胰岛相比极低。

[0458] [表2.]

[0459]

细胞株	Ff-I14-s04		
细胞类型	原型	胰岛素产生细胞	胰岛
INS基因	121	162	326
GCG基因	2.4	6.9	25.7
MafA基因	0.01	0.01	0.39
UCN3基因	0.01	0.02	0.44

[0460] 以上结果显示,胰岛素产生细胞是包含与胰岛相似的β细胞比例的细胞凝集体,但并非尚未完全成熟的胰岛。此外,可确认,胰岛素产生细胞极少混入具有增殖性非靶细胞(Ki67阳性细胞)。

[0461] 实施例2:在胰岛素产生细胞中维持未分化状态的iPS细胞的混入率

[0462] 1.方法

[0463] 维持未分化状态的iPS细胞的高效培养细胞检测(High efficient culture cell assay)

[0464] 将Ff-I14s04 iPS细胞在包含分化诱导因子(GSK3β抑制剂、ROCK抑制剂和低剂量的激活素A)的培养基(RPMI/1%B27(含胰岛素)/青霉素链霉素/二甲亚砜)中进行培养、获得的胚体内胚层细胞分化诱导为胰腺前体细胞(胰岛素产生细胞产生过程的中间体细胞),在6×10^5个细胞的胰腺前体细胞悬浊液中掺加0个、6(0.001%)个、30(0.005%)个细胞的维持未分化状态的iPS细胞,接种至10cm的培养皿上,在对维持未分化状态的iPS细胞而言属有利条件的AK03N培养基上及iMatrix-511涂覆条件下培养7天。此外,在相同条件下,还培养了未掺加iPS细胞的6×10^5个细胞的胰腺前体细胞。培养完成后,将通过碱性磷酸酶染色产生的维持未分化状态的iPS细胞的菌落可视化并计数。

[0465] 2.结果

[0466] 结果示于图3。在掺加有6个细胞及30个细胞的维持未分化状态的iPS细胞的胰腺前体细胞培养皿中,分别可观察到平均3个及16个菌落。另一方面,在未掺加的胰腺前体细胞培养皿中则完全未观察到菌落。由以上结果可知,在通过当前的分化诱导方法产生的胰腺前体细胞和随后产生的胰岛素产生细胞中,维持未分化状态的iPS细胞的混入为0.001%以下。

[0467] 由以上结果可确认,在胰岛素产生细胞中没有或极少地混入了维持未分化状态的iPS细胞。

[0468] 实施例3:冻结融解对胰岛素产生细胞的影响

[0469] 1.方法

[0470] (1)胰岛素产生细胞的冻结融解后的再凝集

[0471] 除了将Ff-I14s04 iPS细胞在包含分化诱导因子(GSK3β抑制剂、ROCK抑制剂及低剂量的激活素A)的培养基(RPMI/1%B27(含胰岛素)/青霉素链霉素/二甲亚砜)中进行培养而获得胚体内胚层细胞以外,通过与实施例1所描述的方法相同的方法所制备出胰岛素产生细胞,将该胰岛素产生细胞通过利用市售的冷冻保存液(CryoStor CS10

(BioLifeSolutions公司))的缓慢冷冻法进行冷冻。具体地,将3×10^6个细胞悬浮在1mL的冷冻保存溶液中,并注入到冷冻小瓶中。将小瓶置于冷冻处理容器(Buysell,日本冷冻机株式会社)中,并在-80℃下保存。

[0472] 解冻是将冷冻小瓶在ThawSTAR冷冻细胞融解台(Astero Bio公司)加热并迅速解冻。将经解冻的细胞悬浮液添加至10mL的培养液中。通过离心分离除去上清液后,将细胞悬浮于包含10μM的ROCK抑制剂(Y-27632)的培养基中,使用细胞计数装置NC200(ChemoMetec公司)测定解冻后的活细胞数、细胞存活率。此外,将解冻后的细胞接种至多孔板(Kuraray公司)上,并进行三维培养以制备细胞凝集体。

[0473] (2)冻结融解后胰岛素产生细胞的活体内移植

[0474] 在冻结融解后将胰岛素产生细胞移植至由链脲佐菌素(Streptozotocin)诱发胰岛素缺乏性糖尿病的免疫不全NOD/SCID小鼠的肾被膜下。移植后的过程观察测定血中人类C肽浓度及血糖值。

[0475] 2.结果

[0476] (1)胰岛素产生细胞的冻结融解后的再凝集

[0477] 解冻后即刻的细胞存活率为80.9%。此外,可将注入至冷冻小瓶中的细胞的77.0%的活细胞回收。通过三维培养进行培养4天得到的细胞的相位差显微镜图像示于图4。如图4所示,很明显,进行了冷冻保存的细胞存活并保持形成细胞凝集体的能力。

[0478] 针对冷冻保存前及解冻/再培养后的细胞,通过流式细胞术测定INS、NKX6.1及Ki67的表达的结果示于图5。此外,胰岛素阳性率、Ki67阳性细胞率示于表3。如图5、表3所示,冷冻保存前/后的胰岛素阳性细胞率没有降低,Ki67阳性细胞没有增加。

[0479] [表3]

[0480]

	冷冻保存前	解冻/再培养后
胰岛素阳性细胞率	52.7%	85.7%
Ki67阳性细胞率	1.3%	0.3%

[0481] (2)胰岛素产生细胞的活体内移植

[0482] 移植后经过观察所测定的血中人类C肽浓度及血糖值的结果示于表4。经肾被膜下移植的冻结融解后的胰岛素产生细胞,在移植4个月后可在血液中确认到人类C肽的分泌,显示高血糖改善作用。

[0483] [表4]

[0484]

	移植时	**移植4个月后**
血中人类C肽浓度(pM)	**n.d**	**982.4(N=1)**
血糖值(mg/dL)	**500(N=1)**	**117(N=1)**

[0485] 由以上结果可确认,胰岛素产生细胞即便加以冻结融解仍保持分化诱导效率。

[0486] 实施例4:移植至活体内的胰岛素产生细胞

[0487] 1.方法

[0488] (1)胰岛素产生细胞向活体内的移植

[0489] 将通过与实施例3同样的方法制备的胰岛素产生细胞分别移植至由链脲佐菌素(STZ)诱发糖尿病的免疫不全的NOD/SCID小鼠的肾被膜下,以及具有Akita基因变异的糖尿病自然发病的NOD/SCID小鼠的皮下。在皮下的移植中,使用Fibrin凝胶作为胰岛素产生细胞的载体。移植后,测定血液中的人类C肽(源自胰岛素产生细胞的胰岛素的指标)的浓度及血糖值,评估胰岛素产生细胞的植活情况。

[0490] (2)胰岛素产生细胞对葡萄糖负荷或低血糖的响应的评估

[0491] 使用经移植的胰岛素产生细胞已植活的小鼠,为了使血糖值暂时上升而强制口服投与葡萄糖,或者为了诱发低血糖而皮下投与胰岛素制剂甘精胰岛素,测定血中人类C肽浓度及血中胰高血糖素浓度而评估随后的胰岛素产生细胞的响应。使用未移植/非糖尿病NOD/SCID小鼠作为对照,测定源自内因性胰岛的小鼠C肽或胰高血糖素的血中浓度。

[0492] 2.结果

[0493] (1)移植至活体内的胰岛素产生细胞的植活评估

[0494] 移植后的血中人类C肽浓度及血糖值的测定结果示于表5。在所有动物和移植部位,移植3-4个月后均在血液中检测到了人类C肽。在小鼠中,自移植起3个月后,高血糖有所改善,血糖值直至移植5-6个月后维持在正常水平,这显示经移植的胰岛素产生细胞已长期植活。

[0495] [表5]

[0496]

动物—移植部位	血中人类C肽浓度(pM)		血糖值(mg/dL)		
	移植3-4个月后	5-6个月后	移植时	3个月后	5-6个月后
STZ NOD/SCID 小鼠—肾被膜下	898±335 (N=3)	915、1060 (N=2)	516±33 (N=4)	113±64 (N=3)	117、91 (N=2)
Akita NOD/SCID 小鼠皮下	2436±516 (N=4)	2195±882 (N=4)	562±31 (N=4)	83±27 (N=4)	61±7 (N=3)

[0497] N=3以上的平均值±标准偏差,N=2为个别数据

[0498] (2)胰岛素产生细胞对葡萄糖负荷或低血糖的响应的评估

[0499] 葡萄糖负荷后的血中人类C肽浓度示于图6,甘精胰岛素投与后的血中人类C肽浓度及血中胰高血糖素浓度示于图7。在胰岛素产生细胞的移植起3-4.5个月后,血中人类C肽浓度由于葡萄糖负荷而暂时上升,另一方面,其在因甘精胰岛素投与而诱发低血糖时降低。这些变化与未移植/非糖尿病小鼠中的内因性小鼠C肽的血中浓度的变化相同。此外,在胰岛素产生细胞的移植小鼠中,相较于未移植/非糖尿病小鼠,血中胰高血糖素浓度显示出较高值,表明胰岛素产生细胞将胰高血糖素释放到血液中。

[0500] 由以上结果可知,移植至活体内的胰岛素产生细胞可长期植活,并且响应于血糖值的波动,发挥类似于内因性胰岛的生理性胰岛素调节作用。

[0501] 实施例5:移植至皮下的胰岛素产生细胞

[0502] 1.方法

[0503] (1)胰岛素产生细胞的活体内移植

[0504] 将分散于水凝胶藻酸盐中的胰岛素产生细胞皮下移植至由链脲佐菌素所诱发的胰岛素缺乏性糖尿病的免疫不全NOD/SCID小鼠中。移植后的过程观察通过测定血中人类C肽浓度及血糖值而实施。移植3个月后,取出移植片。

[0505] (2)移植片中的蛋白质表达的评估

[0506] 将取出的移植片进行单一细胞化处理后,加以固定,通过流式细胞术测定胰岛素产生细胞的蛋白质表达(胰岛素、NKX6.1、胰高血糖素、嗜铬粒蛋白A)。此外,将取出的移植片及移植时的胰岛素产生细胞加以固定,脱水后,制备冷冻切片,通过免疫组织染色评估靶蛋白质的表达(胰岛素、胰高血糖素)。

[0507] 2.结果

[0508] (1)胰岛素产生细胞的活体内移植

[0509] 移植后经过观察所测定的血中人类C肽浓度及血糖值的结果示于表6。皮下移植的胰岛素产生细胞在移植后的1-3个月内可确认到人类C肽的分泌,显示出改善高血糖改善作用。

[0510] [表6]

[0511]

	移植时	移植1个月后	移植3个月后
血中人类C肽浓度 (pM)	n.d	490.4、307.6 (N=2)	714.3 (N=1)
血糖值 (mg/dL)	568、457 (N=2)	238、196 (N=2)	62 (N=1)

[0512] (2)移植片中的蛋白质表达的评估

[0513] 胰岛素阳性/NKX6.1阳性细胞率、胰岛素阳性/NKX6.1阴性细胞率、胰高血糖素阳性/胰岛素阴性细胞率、嗜铬粒蛋白A阳性率的测定结果示于表7、图8。与移植时相比,移植3个月后的移植片中可确认到胰高血糖素阳性/胰岛素阴性细胞率的上升及胰岛素阳性/NKX6.1阴性细胞率的降低。此外,可确认到移植3个月后的移植片由较高比例的嗜铬粒蛋白A阳性的内分泌细胞构成。取出的移植片的免疫组织染色结果示于图9。与移植时相比,在移植3个月后的移植片中可确认到胰高血糖素单阳性细胞率的上升,表明在活体内分化为成熟的胰岛样细胞。

[0514] [表7]

[0515]

	移植时	移植3个月后
胰岛素阳性/NKX6.1阳性细胞率	46.0 %	19.3 %
胰岛素阳性/NKX6.1阴性细胞率	32.0 %	7.6 %
胰高血糖素阳性/胰岛素阴性细胞率	0.1%	32.1 %
嗜铬粒蛋白A阳性细胞率	n.d.	96.2 %

[0516] 由以上结果可确认,移植至糖尿病小鼠的皮下的胰岛素产生细胞维持较高的内分泌细胞的比例,并在活体内分化为包含成熟的α细胞的成熟的胰岛样细胞。

[0517] 此外,可确认在活体内成熟的胰岛样细胞极少(例如,小于3%)混入具有增殖性的非靶细胞(Ki67阳性细胞)。

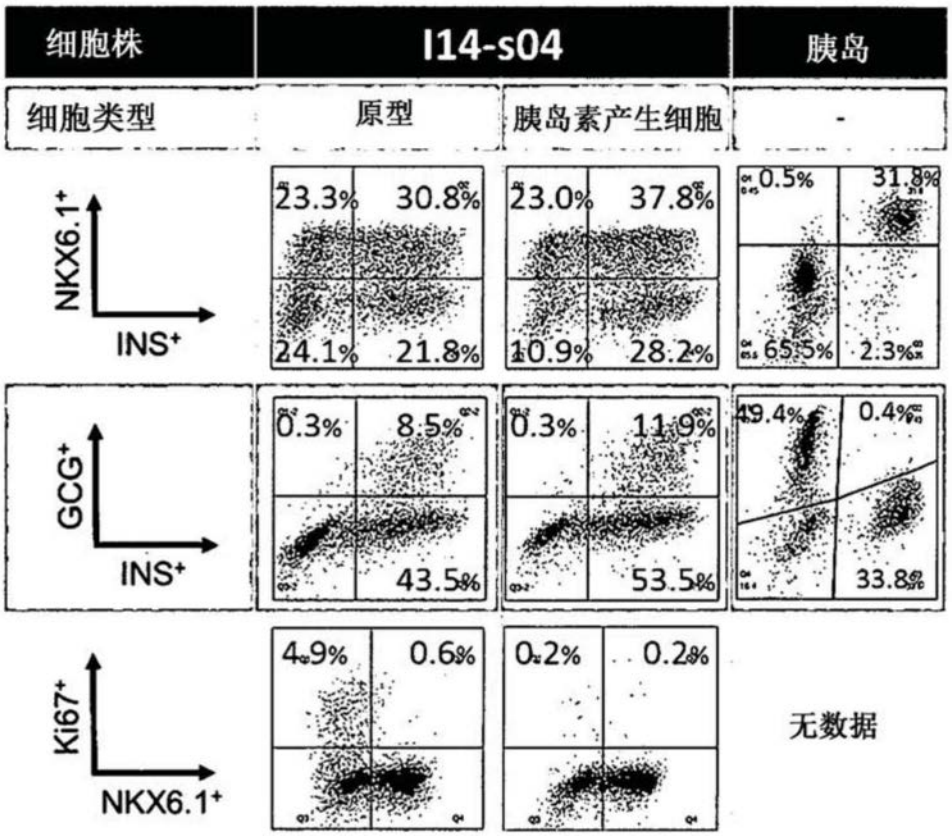

细胞株
I14-s04
胰岛
细胞类型
原型
胰岛素产生细胞
-
NKX6.1+
INS+
23.3%
30.8%
24.1%
21.8%
23.0%
37.8%
10.9%
28.2%
0.5%
31.8%
65.5%
2.3%
GCG+
INS+
0.3%
8.5%
43.5%
0.3%
11.9%
53.5%
49.4%
0.4%
33.8%
Ki67+
NKX6.1+
4.9%
0.6%
0.2%
0.2%
无数据

图1

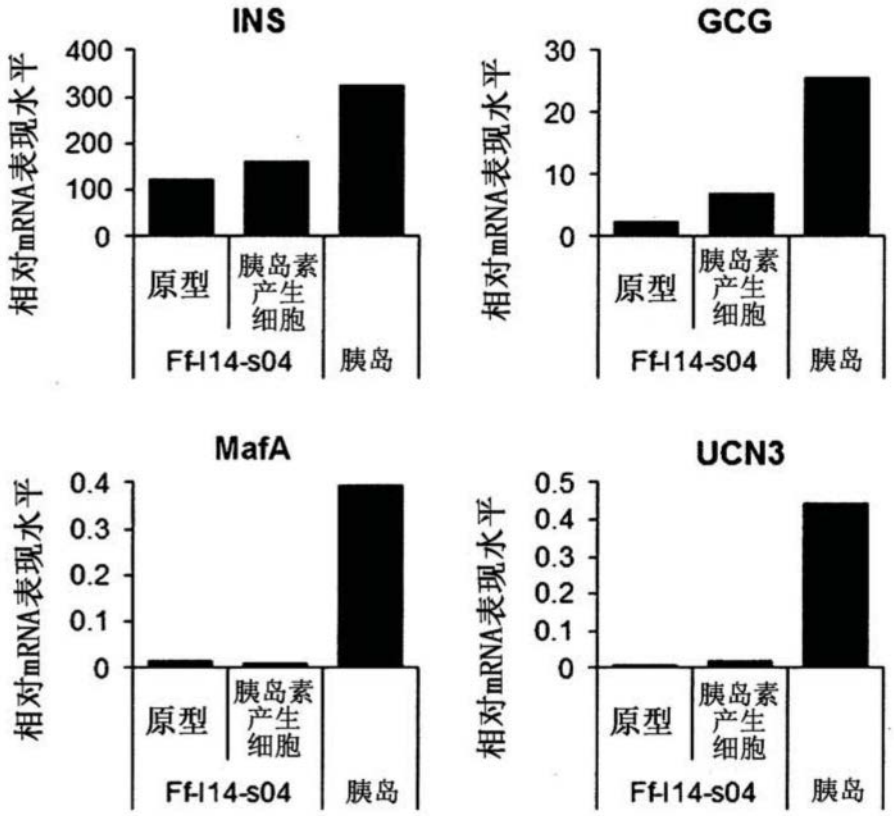

INS
GCG
MafA
UCN3
相对mRNA表现水平
400
300
200
100
0
30
20
10
0.4
0.3
0.2
0.1
0.5
原型
胰岛素产生细胞
FH14-s04
胰岛

图2

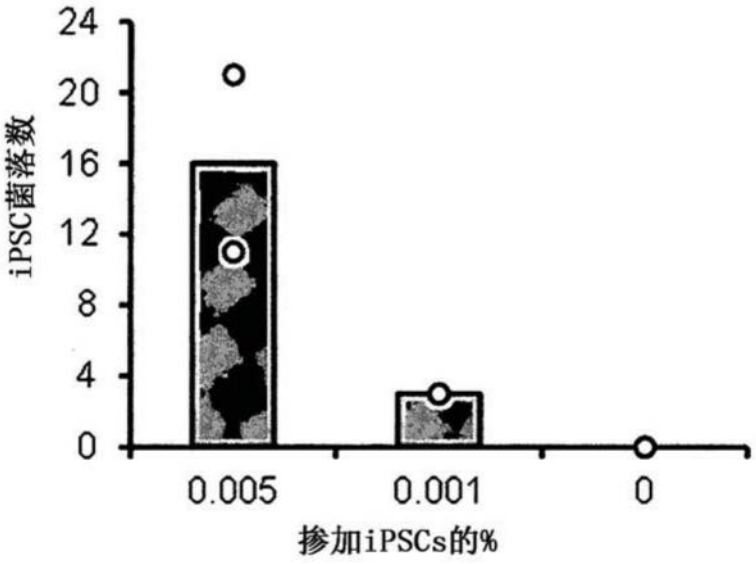

iPSC菌落数
24
20
16
12
8
4
0
0.005
0.001
0
掺加iPSCs的%

图3

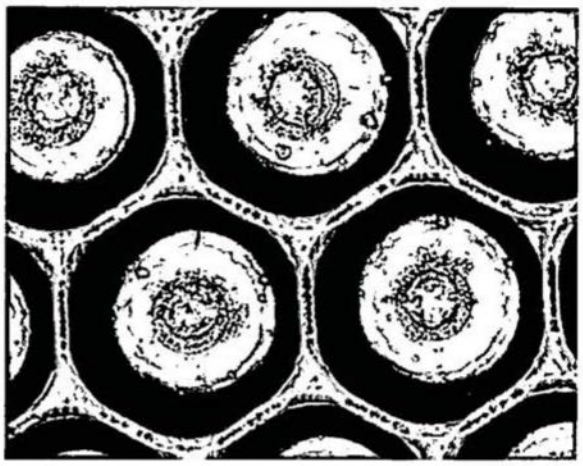


图4

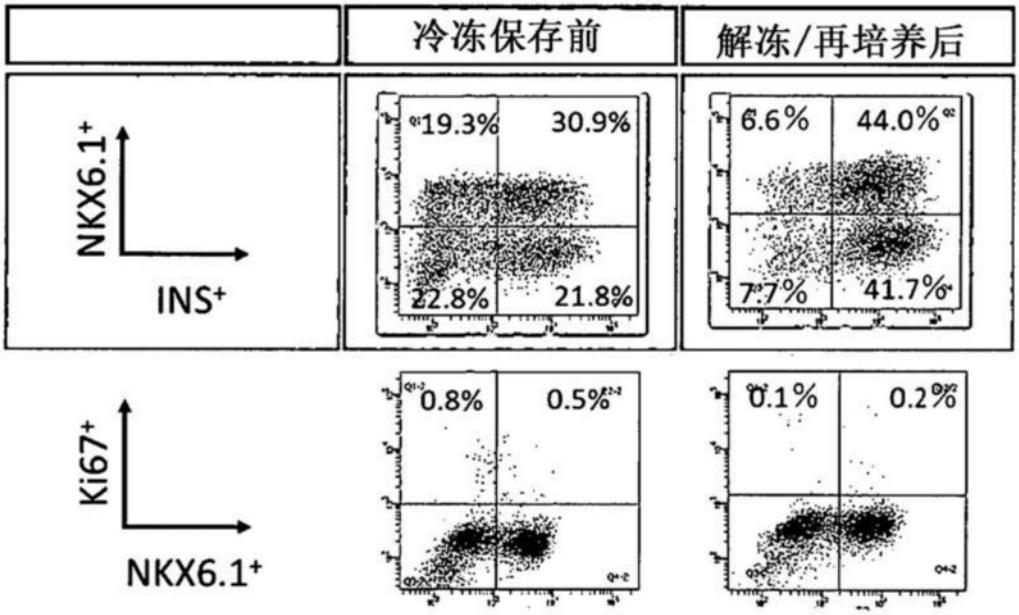

冷冻保存前
解冻/再培养后
NKX6.1+
INS+
19.3%
30.9%
22.8%
21.8%
6.6%
44.0%
7.7%
41.7%
Ki67+
NKX6.1+
0.8%
0.5%
0.1%
0.2%

图5

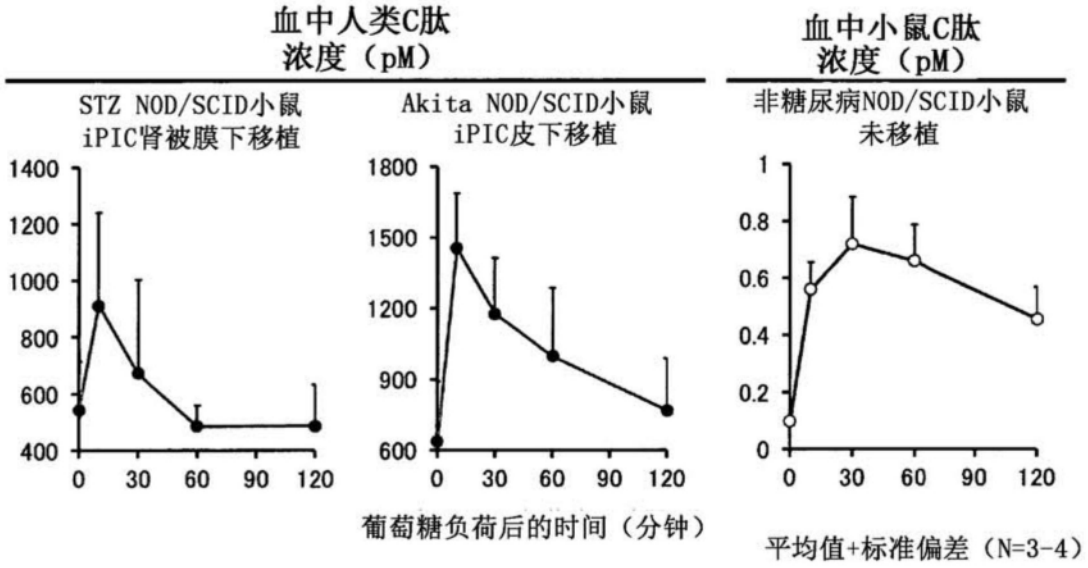

血中人类C肽
浓度（pM）
STZ NOD/SCID小鼠
iPIC肾被膜下移植
Akita NOD/SCID小鼠
iPIC皮下移植
血中小鼠C肽
浓度（pM）
非糖尿病NOD/SCID小鼠
未移植
1400
1200
1000
800
600
400
1800
1500
1200
900
600
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 30 60 90 120
葡萄糖负荷后的时间（分钟）
平均值+标准偏差（N=3-4）

图6

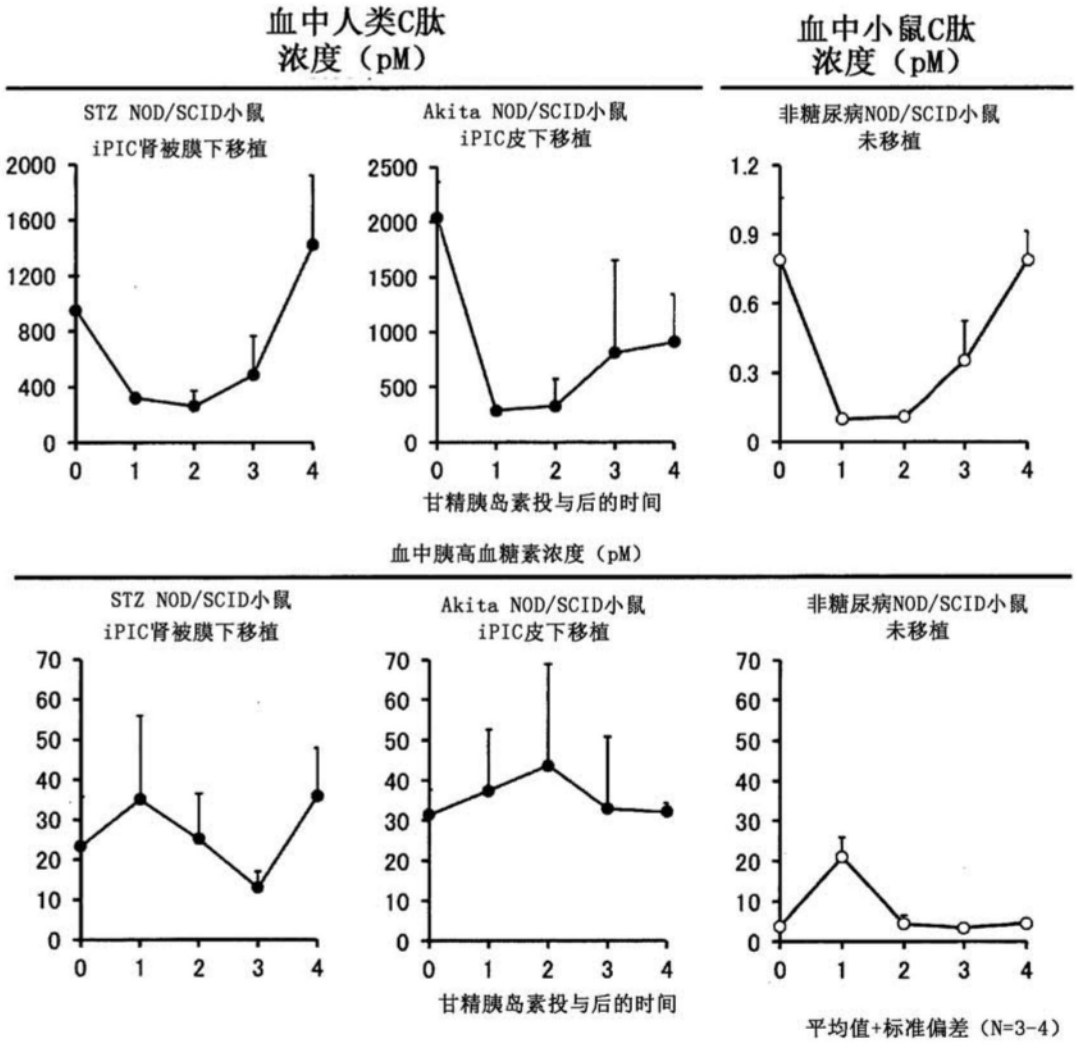

血中人类C肽
浓度（pM）
STZ NOD/SCID小鼠
iPIC肾被膜下移植
Akita NOD/SCID小鼠
iPIC皮下移植
血中小鼠C肽
浓度（pM）
非糖尿病NOD/SCID小鼠
未移植
甘精胰岛素投与后的时间
血中胰高血糖素浓度（pM）
STZ NOD/SCID小鼠
iPIC肾被膜下移植
Akita NOD/SCID小鼠
iPIC皮下移植
非糖尿病NOD/SCID小鼠
未移植
甘精胰岛素投与后的时间
平均值+标准偏差（N=3-4）

图7

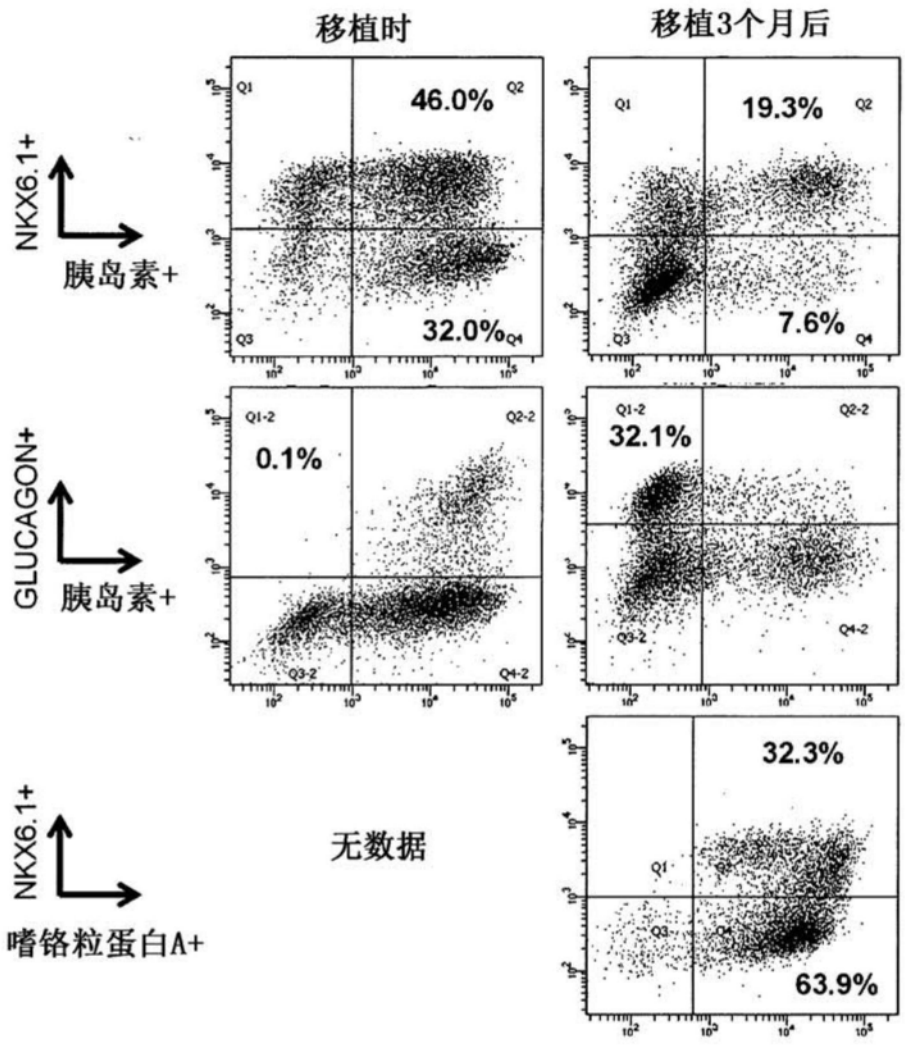

移植时
移植3个月后
NKX6.1+
胰岛素+
46.0%
32.0%
19.3%
7.6%
GLUCAGON+
胰岛素+
0.1%
32.1%
NKX6.1+
嗜铬粒蛋白A+
无数据
32.3%
63.9%

图8

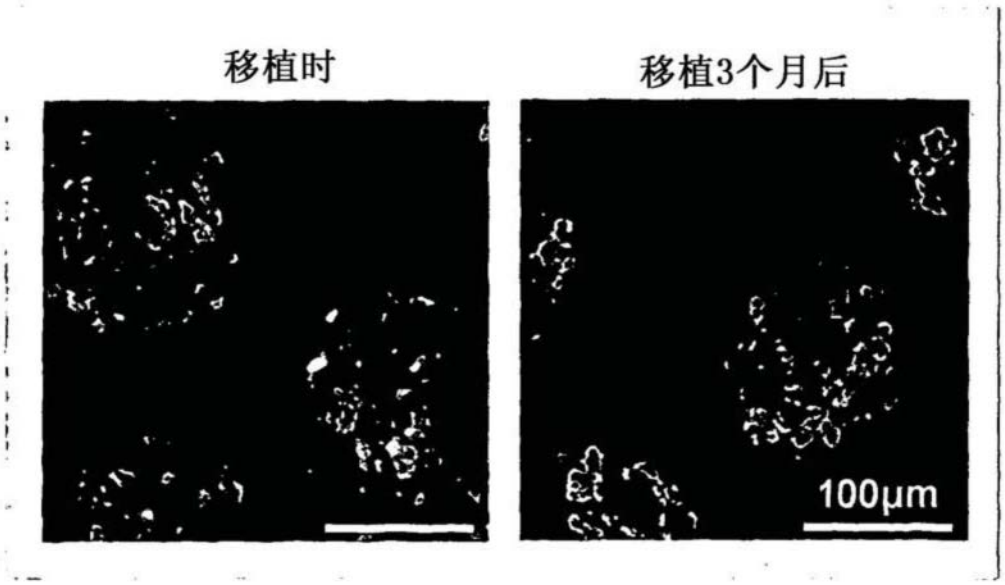


图9