

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 2 年 7 月 27 日 (2020.7.27)

【公表番号】特表 2019-518465 (P2019-518465A)

【公表日】令和 1 年 7 月 4 日 (2019.7.4)

【年通号数】公開・登録公報 2019-026

【出願番号】特願 2018-566957 (P2018-566957)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

【F I】

C 1 2 N 5/071

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 6 月 11 日 (2020.6.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 有効量の T 3 または T 4 ; および

b) 有効量の 5 - アザシチジン (A Z T) 、 3 - デアザネブラノシン A (D E Z A) またはそれらの組み合わせ
を含む培地において未成熟膵臓ベータ細胞を培養し、それにより、インスリンを発現する
機能的ベータ細胞を産生することを含む、機能的ベータ細胞を産生する方法。

【請求項 2】

前記機能的ベータ細胞が、グルコース刺激性インスリン分泌を呈する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記機能的ベータ細胞が、グルコース依存性ミトコンドリア呼吸を呈する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記グルコース刺激性インスリン分泌が、グルコース刺激に応答した二相性インスリン分泌を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記機能的ベータ細胞が、P D X 1 、 N K X 6 . 1 、 M A F A 、 U C N 3 、 及び S L C 2 A 1 を発現する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記培地が、A L K 5 阻害剤を含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記未成熟ベータ細胞が、空気 液体界面において培養される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記未成熟ベータ細胞が、懸濁培養で培養される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記二相性インスリン分泌の第 1 相が、前記機能的ベータ細胞からのインスリンの基礎分泌の 4 倍 ~ 8 倍に増加する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 10】

前記培地が、前記有効量の D E Z A を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記培地が、前記有効量の A Z T を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記培地が、前記有効量の T 3 を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記培地が、前記有効量の T 4 を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 5 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 5 8】

以上、本発明を、様々な具体的な材料、手順及び実施例を参照しながら本明細書に記載及び例示したが、本発明は、その目的のために選択された特定の材料及び手順の組み合わせに限定されない点は理解されるであろう。当業者には理解されるように、このような細部には多くの変更が示唆される可能性がある。本明細書及び実施例はあくまで例示的なものとしてみなされるべきものであり、発明の真の範囲及び趣旨は以下の「特許請求の範囲」によって示されることが意図される。本出願において引用される全ての参考文献、特許及び特許出願は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

また、本発明は以下を提供する。

[1]

臍内胚葉細胞を、P D X 1、N K X 6 . 1、M A F A、U C N 3、及び S L C 2 A 1 を発現する機能的ベータ細胞へと分化させる方法であって、臍内分泌細胞を、U N C 0 6 3 8、U N C 0 6 4 2、U C N 0 6 4 6、T C - E 5 0 0 3、A 3 6 6、P F 0 3 8 1 4 7 3 5、Z M 4 4 7 4 3 9、S B 7 4 7 6 5 1 A、P F I 1、L Y 3 0 3 5 1 1、M S 4 3 6、A Z T、D E Z A、ピロキサミド、C I 9 9 9 4、又は M C 1 5 6 8 のうちの 1 つ又は 2 つ以上が補充された培地中で培養することを含む、方法。

[2]

前記培養培地に、ヘパリン、N - アセチルシステイン、製剤 I、及び T 3、T 4、又はその類似体のうちの 1 つ若しくは 2 つ以上が更に補充される、上記 [1] に記載の方法。

[3]

前記培養培地が A L K 5 阻害剤を欠く、上記 [1] 又は [2] に記載の方法。

[4]

前記培養培地に A L K 5 阻害剤が補充される、上記 [1] 又は [2] に記載の方法。

[5]

前記培地に、Z M 4 4 7 4 3 9、ヘパリン、N - アセチルシステイン、及び T 3、T 4、又はその類似体のうちの 1 つ又は 2 つ以上が補充され、前記培地が A L K 5 阻害剤を含有しない、上記 [1] に記載の方法。

[6]

前記培地に T 3 が補充される、上記 [5] に記載の方法。

[7]

前記培地に A Z T が補充される、上記 [6] に記載の方法。

[8]

前記培地に D E Z A が補充される、上記 [7] に記載の方法。

[9]

前記機能的ベータ細胞が、胚体内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞、初期腸管細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞、前腸内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞、臍内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞、臍内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞、未成熟ベータ細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞、及び機能的

ベータ細胞に特徴的なマーカーを発現する細胞のうちの1つ又は2つ以上の段階的分化によって得られる、上記[1]に記載の方法。

[10]

前記方法が、空気-液体界面で前記細胞を培養することを含む、上記[1]に記載の方法。

[11]

前記方法が、懸濁クラスター中で前記細胞を培養することを含む、上記[1]に記載の方法。

[12]

膵内分泌細胞のインビトロ分化によって得られた、単一ホルモンインスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する機能的ベータ細胞のインビトロ集団。

[13]

前記細胞がUCN3及びSLC2A1も発現する、上記[12]に記載の集団。

[14]

前記細胞が、グルコース刺激性インスリン分泌及びグルコース依存性ミトコンドリア呼吸を呈する、上記[12]に記載の集団。

[15]

前記グルコース刺激性インスリン分泌及びグルコース依存性ミトコンドリア呼吸が、ヒト膵島細胞のものに類似している、上記[14]に記載の集団。

[16]

UNC0638、UNC0642、UCN0646、TC-E5003、A366、PF03814735、ZM447439、SB747651A、PFI1、LY303511、MS436、AZT、DEZA、ピロキサミド、CI9994、又はMC1568のうちの1つ又は2つ以上が補充された培地中で膵内分泌細胞を培養することによって得られる、単一ホルモンインスリン、PDX1、NKX6.1、及びMAFAを発現する膵臓ベータ細胞のインビトロ集団。

[17]

前記培地に、ヘパリン、N-アセチルシステイン、製剤I、及びT3、T4、又はその類似体のうちの1つ又は2つ以上が更に補充される、上記[16]に記載の集団。

[18]

前記培地がALK5阻害剤を欠く、上記[16]又は[17]に記載の集団。

[19]

前記培地にT3が補充される、上記[16]又は[17]に記載の集団。

[20]

前記培地に、ZM447439、ヘパリン、N-アセチルシステイン、製剤I、及びT3、T4、又はその類似体のうちの1つ又は2つ以上が補充され、前記培地がALK5阻害剤を含有しない、上記[16]に記載の集団。

[21]

前記培地にT3が補充される、上記[16]に記載の集団。

[22]

前記培地にAZTが補充される、上記[21]に記載の集団。

[23]

前記培地にDEZAが補充される、上記[22]に記載の集団。

[24]

前記細胞がUCN3及びSLC2A1も発現する、上記[16]に記載の集団。

[25]

前記細胞が、グルコース刺激性インスリン分泌及びグルコース依存性ミトコンドリア呼吸を呈する、上記[16]に記載の集団。

[26]

前記グルコース刺激性インスリン分泌及びグルコース依存性ミトコンドリア呼吸が、膵

島細胞のものに類似している、上記[1 6]に記載の集団。

[2 7]

多能性幹細胞を、P D X 1、N K X 6 . 1、M A F A、U C N 3、及びS L C 2 Aを発現する機能的ベータ細胞へと分化させる方法であって、

a . 多能性幹細胞を未成熟ベータ細胞へと分化させ、かつ

b . U N C 0 6 3 8、U N C 0 6 4 2、U C N 0 6 4 6、T C - E 5 0 0 3、A 3 6 6、P F 0 3 8 1 4 7 3 5、Z M 4 4 7 4 3 9、S B 7 4 7 6 5 1 A、P F I 1、L Y 3 0 3 5 1 1、M S 4 3 6、A Z T、D E Z A、ピロキサミド、C I 9 9 9 4、又はM C 1 5 6 8のうちの1つ又は2つ以上が補充された培地中で前記未成熟ベータ細胞を培養することによって、前記未成熟ベータ細胞を、P D X 1、N K X 6 . 1、M A F A、U C N 3、及びS L C 2 A 1を発現する機能的ベータ細胞へと分化させる、方法。

[2 8]

前記機能的ベータ細胞が、ヒト膵島細胞と類似しているグルコース依存性ミトコンドリア呼吸を有する、上記[2 7]に記載の方法。

[2 9]

前記機能的ベータ細胞が、ヒト膵島細胞に類似しているグルコース刺激性インスリン分泌を有する、上記[2 7]に記載の方法。

[3 0]

前記機能的ベータ細胞が、複数の相においてインスリンを分泌する、上記[2 7]に記載の方法。

[3 1]

前記培養培地に、ヘパリン、N - アセチルシステイン、製剤 I、及びT 3、T 4、又はその類似体のうちの1つ又は2つ以上が更に補充される、上記[2 7]に記載の方法。

[3 2]

前記培養培地がA L K 5 阻害剤を欠く、上記[2 7]又は[3 1]に記載の方法。

[3 3]

前記培養培地にT 3が補充される、上記[2 7]又は[3 1]に記載の方法。

[3 4]

前記培地に、Z M 4 4 7 4 3 9、ヘパリン、N - アセチルシステイン、及びT 3、T 4、又はその類似体のうちの1つ又は2つ以上が補充され、前記培地がA L K 5 阻害剤を含有しない、上記[2 7]に記載の方法。

[3 5]

前記培地にT 3が補充される、上記[3 4]に記載の方法。

[3 6]

前記培地にA Z Tが補充される、上記[3 5]に記載の方法。

[3 7]

前記培地にD E Z Aが補充される、上記[3 6]に記載の方法。

[3 8]

前記方法が、空気 - 液体界面で前記未成熟ベータ細胞を培養することを含む、上記[2 7]に記載の方法。

[3 9]

前記方法が、懸濁クラスター中で前記未成熟ベータ細胞を培養することを含む、上記[2 7]に記載の方法。

[4 0]

多能性幹細胞を分化させる前記工程が、

a . 前記多能性幹細胞を、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」）へと分化させる工程と、

b . 前記ステージ 1 細胞を、初期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」）へと分化させる工程と、

c . 前記ステージ 2 細胞を、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」) へと分化させる工程と、

d . 前記ステージ 3 細胞を、臍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 4 細胞」) へと分化させる工程と、

e . 前記ステージ 4 細胞を、臍内分泌前駆細胞 (「ステージ 5 細胞」) へと分化させる工程と、

f . 前記ステージ 5 細胞を、未成熟ベータ細胞へと分化させる工程と、を含む、上記 [2 7] に記載の方法。

[4 1]

前記工程 e . 及び f . が、前記空気 - 液体界面で培養することを含む、上記 [4 0] に記載の方法。

[4 2]

前記工程 e . 及び f . が、懸濁クラスター中で前記細胞を培養することを含む、上記 [4 0] に記載の方法。

[4 3]

前記方法が、前記多能性幹細胞を M C X 化合物及び G D F - 8 が補充された培地中で培養することによって、多能性幹細胞をステージ 1 細胞へと分化させることを含む、上記 [4 0] に記載の方法。

[4 4]

前記方法が、前記ステージ 1 細胞を F G F 7 及びアスコルビン酸が補充された培地中で培養することによって、前記ステージ 1 細胞をステージ 2 細胞へと分化させることを含む、上記 [4 0] に記載の方法。

[4 5]

前記方法が、前記ステージ 2 細胞を F G F 7、レチノイン酸、S A N T - 1、P K C 活性剤、B M P 阻害剤、及びアスコルビン酸が補充された培地中で培養することによって、前記ステージ 2 細胞をステージ 3 細胞へと分化させることを含む、上記 [4 0] に記載の方法。

[4 6]

前記方法が、前記ステージ 3 細胞を F G F 7、レチノイン酸、S A N T - 1、P K C 活性剤、B M P 阻害剤、及びアスコルビン酸が補充された培地中で培養することによって、前記ステージ 3 細胞をステージ 4 細胞へと分化させることを含む、上記 [4 0] に記載の方法。

[4 7]

前記方法が、前記ステージ 4 細胞を S A N T - 1、P K C 活性剤、B M P 阻害剤、及びアスコルビン酸が補充された培地中で培養することによって、前記ステージ 4 細胞をステージ 5 細胞へと分化させることを含む、上記 [4 0] に記載の方法。

[4 8]

前記培地に、T 3、T 4、又はその類似体のうちの 1 つ又は 2 つ以上が更に補充される、上記 [4 7] に記載の方法。

[4 9]

前記方法が、前記ステージ 5 細胞を B M P 阻害剤、アスコルビン酸、T 3、T 4、又はその類似体のうちの 1 つ又は 2 つ以上が補充された培地中で培養することによって、前記ステージ 5 細胞を未成熟ベータ細胞へと培養することを含む、上記 [4 0] に記載の方法。

[5 0]

前記培地に A L K 5 阻害剤又はガンマセクレターゼ阻害剤が更に補充される、上記 [4 9] に記載の方法。

[5 1]

前記方法が、前記未成熟ベータ細胞を A L K 5 阻害剤を欠き、かつ Z M 4 4 7 4 3 9、A Z T、N - アセチルシステイン、D E Z A、製剤 I、及び T 3、T 4、又はその類似体のうちの 1 つ又は 2 つ以上が補充された培地中で培養することによって、前記未成熟ベータ細胞を P D X 1、N K X 6 . 1、M A F A、U C N 3、及び S L C 2 A を発現している

機能的ベータ細胞へと分化させることを含む、上記[2 7]に記載の方法。

[5 2]

前記グルコース依存性ミトコンドリア呼吸のグルコース刺激後の酸素消費速度応答が、基礎酸素消費速度を約 2 0 % ~ 約 8 0 % 上回る範囲である、上記[1 4]、[2 5]、及び[2 8]に記載の方法。

[5 3]

前記酸素消費速度応答が、グルコース刺激の少なくとも 1 5 分後に生じた、上記[5 2]に記載の方法。

[5 4]

前記グルコース刺激性インスリン分泌が、グルコース刺激に応答した急速な二相インスリン分泌を含む、上記[1 4]、[2 5]、及び[2 8]に記載の方法。

[5 5]

前記二相性インスリン分泌の第 1 相が、基礎分泌の少なくとも 4 倍 ~ 少なくとも 8 倍増加し、第 2 相が、前記基礎分泌の少なくとも 2 倍 ~ 少なくとも 4 倍増加する、上記[5 4]に記載の方法。

[5 6]

前記インスリン分泌が、前記グルコース刺激の少なくとも 5 分 ~ 少なくとも 1 0 分後に生じる、上記[5 4]に記載の方法。

[5 7]

前記機能的ベータ細胞がヒト膵島細胞と類似しているグルコース依存性ミトコンドリア呼吸を有する、上記[5 1]に記載の方法。

[5 8]

前記機能的ベータ細胞が膵島細胞に類似しているグルコース刺激性インスリン分泌を有する、上記[5 1]に記載の方法。

[5 9]

前記グルコース依存性ミトコンドリア呼吸のグルコース刺激後の酸素消費速度応答が、基礎酸素消費速度を約 2 0 % ~ 約 8 0 % 上回る範囲である、上記[5 7]に記載の方法。

[6 0]

前記酸素消費速度応答が、グルコース刺激の少なくとも 1 5 分後に生じた、上記[5 9]に記載の方法。

[6 1]

前記グルコース刺激性インスリン分泌が、グルコース刺激に応答した急速な二相性インスリン分泌を含む、上記[5 8]に記載の方法。

[6 2]

前記二相性インスリン分泌の第 1 相が、基礎分泌の少なくとも 4 倍 ~ 少なくとも 8 倍増加し、第 2 相が、前記基礎分泌の少なくとも 2 倍 ~ 少なくとも 4 倍増加する、上記[6 1]に記載の方法。

[6 3]

前記インスリン分泌が、前記グルコース刺激の少なくとも 5 分 ~ 少なくとも 1 0 分後に生じる、上記[6 1]に記載の方法。

[6 4]

前記ステージ 4 細胞が凍結保存される、上記[4 0]に記載の方法。

[6 5]

前記工程 e が、ステージ 4 凍結保存細胞を培養することを含む、上記[4 0]に記載の方法。

[6 6]

前記 T 3 が 1 n M ~ 1 0 0 n M の範囲である、上記[6]、[2 1]、[3 5]、及び[5 1]に記載の方法。

[6 7]

前記培地に T 3 が補充され、前記 T 3 が 1 n M ~ 1 μ M の範囲である、上記[4 8] ~ [

5 0] に記載の方法。

[6 8]

多能性幹細胞を、P D X 1、N K X 6 . 1、M A F A、U C N 3、及びS L C 2 Aを発現する機能的ベータ細胞へと分化させる方法であって、

a . 前記多能性幹細胞を、前記多能性幹細胞をアクチビン A 及びW N T 3 A が補充された培地中で培養することによって得られた胚体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、

b . 前記胚体内胚葉に特徴的なマーカーを発現する前記細胞を未成熟ベータ細胞へと分化させ、かつ

c . U N C 0 6 3 8、U N C 0 6 4 2、U C N 0 6 4 6、T C - E 5 0 0 3、A 3 6 6、P F 0 3 8 1 4 7 3 5、Z M 4 4 7 4 3 9、S B 7 4 7 6 5 1 A、P F I 1、L Y 3 0 3 5 1 1、M S 4 3 6、A Z T、D E Z A、ピロキサミド、C I 9 9 9 4、又はM C 1 5 6 8 のうちの1 つ又は2 つ以上が補充された培地中で前記未成熟ベータ細胞を培養することによって、前記未成熟ベータ細胞を、P D X 1、N K X 6 . 1、M A F A、U C N 3、及びS L C 2 A 1 を発現する機能的ベータ細胞へと分化させる、方法。

[6 9]

前記機能的ベータ細胞がヒト膵島細胞と類似しているグルコース依存性ミトコンドリア呼吸を有する、上記[6 8]に記載の方法。

[7 0]

前記機能的ベータ細胞がヒト膵島細胞に類似しているグルコース刺激性インスリン分泌を有する、上記[6 8]に記載の方法。

[7 1]

前記機能的ベータ細胞が、複数の相においてインスリンを分泌する、上記[6 8]に記載の方法。

[7 2]

前記培養培地に、ヘパリン、N - アセチルシステイン、製剤 I、及びT 3、T 4、又はその類似体のうちの1 つ又は2 つ以上が更に補充される、上記[6 8]に記載の方法。

[7 3]

前記培養培地がA L K 5 阻害剤を欠く、上記[6 8]又は[7 2]に記載の方法。

[7 4]

前記培養培地にT 3 が補充される、上記[6 8]又は[7 2]に記載の方法。

[7 5]

前記培地に、Z M 4 4 7 4 3 9、ヘパリン、N - アセチルシステイン、及びT 3、T 4、又はその類似体のうちの1 つ又は2 つ以上が補充され、また前記培地がA L K 5 阻害剤を含有しない、上記[6 8]に記載の方法。

[7 6]

前記培地にT 3 が補充される、上記[7 5]に記載の方法。

[7 7]

前記培地にA Z T が補充される、上記[7 6]に記載の方法。

[7 8]

前記培地にD E Z A が補充される、上記[7 7]に記載の方法。

[7 9]

前記方法が、空気 - 液体界面において、懸濁クラスター中で、ローラボトル中で、又はマイクロキャリア上で前記未成熟ベータ細胞を培養することを含む、上記[6 8]に記載の方法。

[8 0]

前記方法が、ローラボトル中で前記未成熟ベータ細胞を培養することを含む、上記[6 8]に記載の方法。

[8 1]

前記方法が、マイクロキャリア上のローラボトル中で前記未成熟ベータ細胞を培養する

ことを含む、上記[8 0]に記載の方法。

[8 2]

多能性幹細胞を分化させる前記工程が、

a . 前記多能性幹細胞をアクチビン A 及び W N T 3 A が補充された培地中で培養することによって、前記多能性幹細胞を前記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」) へと分化させる工程と、

b . 前記ステージ 1 細胞を、初期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」) へと分化させる工程と、

c . 前記ステージ 2 細胞を、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」) へと分化させる工程と、

d . 前記ステージ 3 細胞を、腭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 4 細胞」) へと分化させる工程と、

e . 前記ステージ 4 細胞を、腭内分泌前駆細胞細胞 (「ステージ 5 細胞」) へと分化させる工程と、

f . 前記ステージ 5 細胞を、未成熟ベータ細胞へと分化させる工程と、を含む、上記[6 8]に記載の方法。

[8 3]

前記工程 e . 及び f . が、前記空気 - 液体界面において、懸濁クラスター中で、ローラボトル中で、又はマイクロキャリア上で培養することを含む、上記[8 2]に記載の方法。

[8 4]

前記工程 e . 及び f . が、ローラボトル中で前記細胞を培養することを含む、上記[8 2]に記載の方法。

[8 5]

前記工程 e . 及び f . が、マイクロキャリア上のローラボトル中で前記未成熟ベータ細胞を培養することを含む、上記[8 2]に記載の方法。

[8 6]

前記方法が、前記ステージ 1 細胞を F G F 7 及びアスコルビン酸が補充された培地中で培養することによって、前記ステージ 1 細胞をステージ 2 細胞へと分化させることを含む、上記[8 2]に記載の方法。

[8 7]

前記方法が、前記ステージ 2 細胞を F G F 7、レチノイン酸、S A N T - 1、P K C 活性剤、及びアスコルビン酸が補充された培地中で培養することによって、前記ステージ 2 細胞をステージ 3 細胞へと分化させることを含む、上記[8 2]に記載の方法。

[8 8]

前記培地が B M P 阻害剤を欠く、上記[8 7]に記載の方法。

[8 9]

前記方法が、前記ステージ 3 細胞を F G F 7、レチノイン酸、S A N T - 1、P K C 活性剤、及びアスコルビン酸が補充された培地中で培養することによって、前記ステージ 3 細胞をステージ 4 細胞へと分化させることを含む、上記[8 2]に記載の方法。

[9 0]

前記培地が B M P 阻害剤を欠く、上記[8 9]に記載の方法。

[9 1]

前記方法が、前記ステージ 4 細胞を S A N T - 1、P K C 活性剤、B M P 阻害剤、及びアスコルビン酸が補充された培地中で培養することによって、前記ステージ 4 細胞をステージ 5 細胞へと分化させることを含む、上記[8 2]に記載の方法。

[9 2]

前記培地に、T 3、T 4、又はその類似体のうちの 1 つ又は 2 つ以上が更に補充される、上記[9 1]に記載の方法。

[9 3]

前記方法が、前記ステージ 5 細胞を B M P 阻害剤、アスコルビン酸、T 3、T 4、又は

その類似体のうちの1つ又は2つ以上が補充された培地中で培養することによって、前記ステージ5細胞を未成熟ベータ細胞へと培養することを含む、上記[82]に記載の方法。

[94]

前記培地にALK5阻害剤又はガンマセクレターゼ阻害剤が更に補充される、上記[93]に記載の方法。

[95]

前記方法が、前記未成熟ベータ細胞を、ALK5阻害剤を欠き、かつZM447439、AZT、N-アセチルシステイン、DEZA、製剤I、及びT3、T4、又はその類似体のうちの1つ又は2つ以上が補充された培地中で培養することによって、前記未成熟ベータ細胞を、PDX1、NKX6.1、MAFA、UCN3、及びSLC2Aを発現している機能的ベータ細胞へと分化させることを含む、上記[68]に記載の方法。

[96]

前記多能性幹細胞がヒトH1又はH9細胞である、上記[27]に記載の方法。

[97]

前記多能性幹細胞がヒトCyt49細胞である、上記[68]に記載の方法。