

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6301316号  
(P6301316)

(45) 発行日 平成30年3月28日(2018.3.28)

(24) 登録日 平成30年3月9日(2018.3.9)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 5/077 (2010.01)

C 1 2 N 5/077

A 6 1 K 35/39 (2015.01)

A 6 1 K 35/39

A 6 1 K 35/407 (2015.01)

A 6 1 K 35/407

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 5/074 (2010.01)

C 1 2 N 5/074

請求項の数 12 (全 132 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-513134 (P2015-513134)  
 (86) (22) 出願日 平成25年5月21日(2013.5.21)  
 (65) 公表番号 特表2015-523063 (P2015-523063A)  
 (43) 公表日 平成27年8月13日(2015.8.13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/060372  
 (87) 国際公開番号 W02013/174794  
 (87) 国際公開日 平成25年11月28日(2013.11.28)  
 審査請求日 平成27年1月14日(2015.1.14)  
 審判番号 不服2017-952 (P2017-952/J1)  
 審判請求日 平成29年1月24日(2017.1.24)  
 (31) 優先権主張番号 61/650,762  
 (32) 優先日 平成24年5月23日(2012.5.23)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCH  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・  
 グレンツアーヘルストラツセ１２４  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内胚葉細胞および肝実質細胞の組成物ならびにそれらの細胞を入手および使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、肝実質細胞の集団を入手する方法：

PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と共に幹細胞の集団を培養し、内胚葉細胞の集団を生産する工程、ならびに、

該肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該内胚葉細胞を培養する工程、ここで、該肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件が、有効量のアクチビンAを含有しておりかつ他の増殖因子を欠いている培地において内胚葉細胞を培養することを含む。

【請求項 2】

以下の段階を含む、肝実質細胞の集団を入手する方法：

PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と共に幹細胞の集団を培養し、内胚葉細胞の集団を生産する工程、ならびに、

該肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該内胚葉細胞を培養する工程、ここで、該肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件が、有効量のアクチビンAを含有しておりかつFGF2、FGF4、BMP2、およびBMP4からなる群より選択される他の増殖因子を欠いている培地において内胚葉細胞を培養することを含む。

【請求項 3】

該内胚葉細胞の集団が、該集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現することを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

10

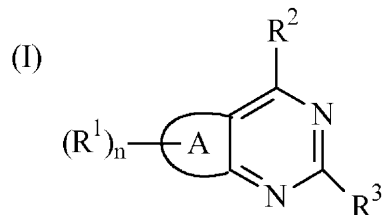
20

## 【請求項4】

前記肝実質細胞の集団内の肝実質細胞の少なくとも56%がAFPを発現する、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項5】

前記PI3Kの選択的阻害物質が、式(1)の縮合ピリミジンである化合物、またはその薬学的に許容される塩である、請求項1乃至4のいずれか一項に記載の方法：



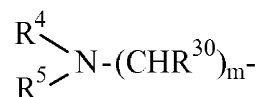
10

式中、

Aは、チオフェン環またはフラン環を表し；

nは、1または2であり；

R<sup>1</sup>は、式：



の基であり、

20

式中、

mは、0または1であり；

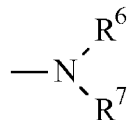
R<sup>30</sup>は、HまたはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルであり；

R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は、それらが結合しているN原子と一緒に、5員もしくは6員の飽和N含有複素環基を形成し、該飽和N含有複素環基が、N、S、およびOより選択される付加的なヘテロ原子を0個もしくは1個含み、ベンゼン環と縮合していてもよく、かつ、置換されていないかもしくは置換されているか；または、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>の一方が、アルキルであり、かつ他方が、上記で定義された5員もしくは6員の飽和N含有複素環基、もしくは上記で定義された5員もしくは6員の飽和N含有複素環基によって置換されているアルキル基であり；

R<sup>2</sup>は、

30

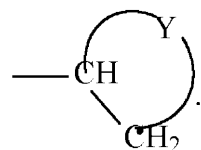
(a) R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>が、それらが結合している窒素原子と一緒に、モルホリン基、チオモルホリン基、ピペリジン基、ピペラジン基、オキサゼパン基、またはチアゼパン基を形成し、該モルホリン基、該チオモルホリン基、該ピペリジン基、該ピペラジン基、該オキサゼパン基、または該チアゼパン基が置換されていないかまたは置換されている、



、ならびに

(b) YがC<sub>2</sub>～C<sub>4</sub>アルキレン鎖であり、該C<sub>2</sub>～C<sub>4</sub>アルキレン鎖が、該鎖の構成炭素原子の間にかつ/または該鎖の一端もしくは両端にO、N、およびSより選択されるヘテロ原子を1個または2個含有しており、かつ、置換されていないかまたは置換されている、

40



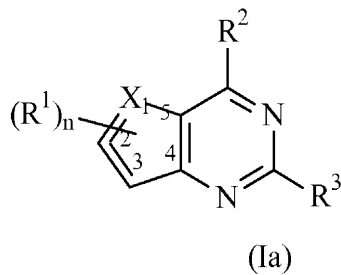
より選択され；

かつ、R<sup>3</sup>は、置換されていないかまたは置換されているインダゾール基である。

## 【請求項6】

前記縮合ピリミジンが式(1a)である、請求項5に記載の方法：

50

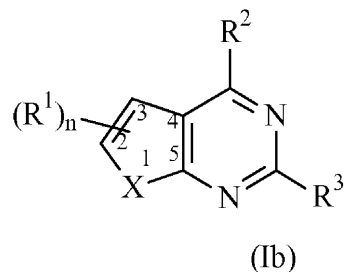


式中、XはSまたはOであり、かつ、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびnは、請求項5に定義された通りである。

10

【請求項 7】

前記縮合ピリミジンが式 (Ib) である、請求項5に記載の方法：



20

式中、XはSまたはOであり、かつ、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびnは、請求項5に定義された通りである。

【請求項 8】

前記PI3K の選択的阻害物質が、4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[(4-メチルスルホニルピペラジン-1-イル)メチル]チエノ[3,2-d]ピリミジン-4-イル]モルホリンである、請求項5に記載の方法。

【請求項 9】

前記PI3K の選択的阻害物質が、PI3K の阻害物質でもある、請求項1乃至8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

30

前記PI3K の選択的阻害物質の有効量が、少なくとも300nM、少なくとも400nM、少なくとも500nM、少なくとも600nM、少なくとも700nM、少なくとも800nM、または少なくとも900nMである、請求項1乃至9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記PI3K の選択的阻害物質の有効量が550nMまたは750nMである、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記アクチビンAの有効量が培地1ml当たり100ngである、請求項1乃至10のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2012年5月23日に出願された米国仮特許出願第61/650,762号に基づく優先権を主張するものであり、その内容は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、幹細胞、内胚葉細胞、腭前駆細胞、肝実質細胞、および内胚葉細胞に由来するその他の細胞の分野におけるものである。全体として、本発明は、内胚葉細胞、腭前駆細胞、肝実質細胞、および/または、内胚葉細胞に由来するその他の細胞の組成物に関し

50

、かつ、内胚葉細胞、腓前駆細胞、肝実質細胞、および／または、内胚葉細胞に由来するその他の細胞を作製および使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

幹細胞を細胞治療適用に比類なく適したものにしている二つの特性は、多能性、および、長期間にわたり培養物中にこれらの細胞を維持する能力である。多能性は、三つの主要な胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）全ての派生物へ分化し、次に、胚外組織（例えば、胎盤）および生殖細胞に加えて、成熟生物の全ての体細胞型を形成する幹細胞の能力によって定義される。しかしながら、幹細胞の多能性は、これらの細胞およびそれらの派生物の研究および操作にとって独特の障壁にもなる。分化中の幹細胞培養物において発生し得る細胞型の大きな多様性のため、細胞型の大部分が極めて低い効率で作製される。

10

【0004】

研究および治療において有用な細胞の集団を生成するための出発材料として幹細胞を使用するためには、所望の最終集団への変換の量および変換の速度に関する作製効率の問題を克服することが有利であると考えられる。例えば、増加した増殖速度で獲得され得かつ／または培養物中に維持され得る、中内胚葉細胞、内胚葉細胞、および肝実質細胞のような細胞型の集団を生成し、それによって、より豊富でより低コストの細胞の供給を提供するための方法を同定することが、有用であると考えられる。さらに、様々な細胞（例えば、肝実質細胞）の集団を治療目的に使用するためには、よりよい治療的可能性を提供するため、成熟などの改善された特性を有する細胞の集団を有することが有益であると考えられ。従って、必要とされているのは、頑強な内胚葉細胞の集団および肝実質細胞の集団、ならびに幹細胞のこれらの細胞型への効率的な定方向分化を達成するための方法である。本明細書に開示された組成物および方法は、これらの必要性に応え付加的な利益も提供する。

20

【0005】

本明細書に開示された参照、刊行物、特許、および特許出願は全て、参照によってそれらの全体が本明細書に組み入れられる。

【発明の概要】

【0006】

本発明は特に、独特の特性を有する、内胚葉細胞、腓前駆細胞、肝実質細胞、および内胚葉細胞に由来するその他の細胞、ならびにそれらの細胞を作製するための組成物（例えば、集団）ならびに方法を提供する。これらの細胞の集団は、様々なスクリーニングおよび／または治療において使用するために有用である。

30

【0007】

従って、一つの局面において、本発明は内胚葉細胞の単離された集団を提供し、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の内胚葉細胞の単離された集団による（例えば、該集団に適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現する。上記の内胚葉細胞の単離された集団による（例えば、該集団に適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の内胚葉細胞の単離された集団による（例えば、該集団に適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の内胚葉細胞の単離された集団による（例えば、該集団に適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の内胚葉細胞の単離された集団による（例えば、該集団に適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞は、肝実質細胞、腓臓細胞、腓前駆細胞、肝臓細胞、または肺上皮細胞になる能力を有する。

40

【0008】

50



別の局面において、本発明は、内胚葉細胞の一つまたは複数の集団を含む、安定な内胚葉細胞のバンクを提供し、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ/または該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現し、該集団がこの表現型を少なくとも10回の継代の間維持する。上記の安定な内胚葉細胞のバンクによる（例えば、該バンクに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞は、肝実質細胞、膵臓細胞、膵前駆細胞、肝臓細胞、または肺上皮細胞になる能力を有する。

#### 【0009】

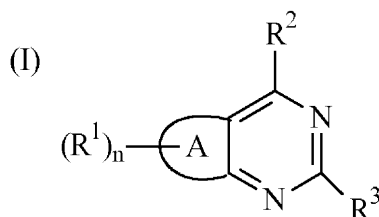
別の局面において、本発明は、内胚葉細胞の集団を入手する方法を提供し、該方法は、PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞の集団を接触させる工程、ならびに、該内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程を含む。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の83%がSOX17を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞は、肝実質細胞、膵臓細胞、膵前駆細胞、肝臓細胞、または肺上皮細胞になる能力を有する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞は、PI3K の選択的阻害物質およびアクチビンAと接触させられていない幹細胞と比較してより高い生存率および/またはより多い増殖を有する。

#### 【0010】

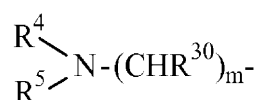
上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、幹細胞は、成体幹細胞、胚性幹細胞、または誘導多能性幹細胞である。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、幹細胞は最適化マトリゲルにおいて培養される。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、幹細胞は懸濁液中で培養される。

#### 【0011】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質は、式（I）：



の縮合ピリミジンである化合物、またはその薬学的に許容される塩であり、式中、Aは、チオフェン環またはフラン環を表し；nは、1または2であり；R<sup>1</sup>は、式：



10

20

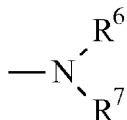
30

40

50

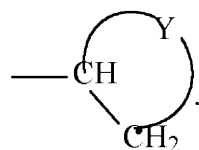
の基であり、式中、 $m$ は、0または1であり； $R^{30}$ は、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり； $R^4$ および $R^5$ は、それらが結合しているN原子と一緒に、5員もしくは6員の飽和N含有複素環基を形成し、該飽和N含有複素環基が、N、S、およびOより選択される付加的なヘテロ原子を0個もしくは1個含み、ベンゼン環と縮合していてもよく、かつ、置換されていないかもしくは置換されているか；または、 $R^4$ および $R^5$ の一方が、アルキルであり、かつ他方が、上記で定義された5員もしくは6員の飽和N含有複素環基、もしくは上記で定義された5員もしくは6員の飽和N含有複素環基によって置換されているアルキル基であり； $R^2$ は、

(a)  $R^6$ および $R^7$ が、それらが結合している窒素原子と一緒に、モルホリン基、チオモルホリン基、ピペリジン基、ピペラジン基、オキサゼパン基、またはチアゼパン基を形成し、該モルホリン基、該チオモルホリン基、該ピペリジン基、該ピペラジン基、該オキサゼパン基、または該チアゼパン基が置換されていないかまたは置換されている、



、ならびに

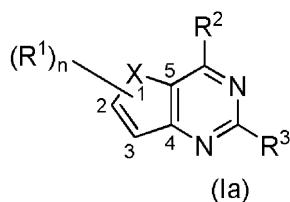
(b) Yが $C_2 \sim C_4$ アルキレン鎖であり、該 $C_2 \sim C_4$ アルキレン鎖が、該鎖の構成炭素原子の間にかつ／または該鎖の一端もしくは両端にO、N、およびSより選択されるヘテロ原子を1個または2個含有しており、かつ、置換されていないかまたは置換されている、



より選択され；かつ、 $R^3$ は、置換されていないかまたは置換されているインダゾール基である。

#### 【0012】

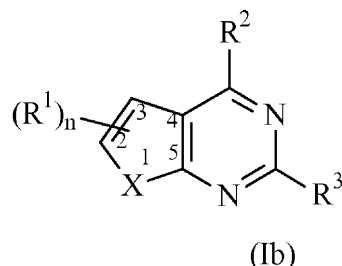
上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、縮合ピリミジン、式(1a)であり、



式中、Xは、SまたはOであり、かつ、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、および $n$ は、上記で定義された通りである。

#### 【0013】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、縮合ピリミジン、式(1b)であり、



式中、Xは、SまたはOであり、かつ、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、および $n$ は、上記で定義された通りである。

#### 【0014】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつか

10

20

30

40

50

の態様において、化合物は、以下より選択される：2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-スルホン酸ジメチルアミド；{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-モルホリン-4-イル-メタノン；4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-カルボン酸(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミド；{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-N,N-ジメチル-アセトアミド；4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-カルボン酸ジメチルアミド；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(3-モルホリン-4-イル-プロパン-1-スルホニル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン；(3-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-スルホニル}-プロピル)-ジメチル-アミン；2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-プロパン-1-オール；1'-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-[1,4']ビペリジニル；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-モルホリン-4-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリミジン-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；1-(2-ヒドロキシ-エチル)-4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-2-オン；6-(4-シクロプロピルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(2,2,2-トリフルオロ-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(6-フルオロ-1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(5-メチル-フラン-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸アミド；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-1,1-ジメチル-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[(3R,5S)-4-(2-メトキシ-エチル)-3,5-ジメチル-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミド；1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸ジメチルアミド；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-3-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸メチルアミド；2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-N-メチル-イソブチルアミド；2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ

10

20

30

40

50

[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-1-ピロリジン-1-イル-  
 プロパン-1-オン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(1-メチル-1H-イミダゾール-2-イル  
 ルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(5-メチル-イソキサゾール-3-イルメチル)-ピペラジ  
 ン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 1-{4-[2-(1H-インダ  
 ザール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラ  
 ジン-1-イル}-2-メチル-プロパン-2-オール ; シクロプロピルメチル-{1-[2-(1H-インダ  
 ザール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジ  
 ン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-アミン ; 6-[4-(1-エチル-1-メトキシメチル-プロピル)  
 -ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[  
 3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(1-メトキシメチル-シクロプロピ  
 ル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-  
 (1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチ  
 ル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-(2,2,2-トリフルオロ-エチル)-アミン ; 2-  
 (1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モ  
 ルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホ  
 リン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-メタノール  
 ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-4-イルメチル-ピペ  
 ラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(6  
 -メチル-ピリジン-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエ  
 ノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(4-メチル-チアゾール-2-イル  
 メチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1  
 -[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イル  
 メチル]-ピペリジン-4-イル}-ピリジン-2-イル-アミン ; N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イ  
 ル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}  
 -2-メトキシ-N-メチル-アセトアミド ; N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン  
 -4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-N-メチル-メタン  
 スルホンアミド ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]  
 ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(3-メトキシ-プロピル)-メチル-アミン  
 ; 6-((3S,5R)-3,5-ジメチル-4-ピリジン-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H  
 -インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダ  
 ザール-4-イル)-6-(4-メトキシメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-  
 チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエ  
 ノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-チアゾ  
 ール-2-イルメチル-アミン ; 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエ  
 ノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-4-ピリジン-2-イルメチル-ピペリジン-4-オール ; {  
 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イル  
 メチル]-ピペリジン-4-イル}-イソプロピル-(2-メトキシ-エチル)-アミン ; 2-(1H-インダ  
 ザール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(ピリジン-2-イルオキシ)-ピペリジン-1-イ  
 ルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン  
 -4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-N-(2-メトキシ-  
 エチル)-メタンスルホンアミド ; 2-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イ  
 ル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-プロパン-2-オール ; 2-  
 (1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(1-オキシ-ピリジン-3-イルメチ  
 ル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)  
 -4-モルホリン-4-イル-6-(4-モルホリン-4-イルメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-チエ  
 ノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3  
 ,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イルメチル}-(2-メトキシ-エチル)-メチ  
 ル-アミン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリ  
 ミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イルメチル}-ジメチル-アミン ; {1-[2-(1H-インダ

10

20

30

40

50

ゴール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリ  
 ジン-3-イル}-(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン；1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-  
 モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-カルボン酸  
 メチルアミド；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(3-メトキシメチル-ピペリジン-1-イルメ  
 チル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-  
 モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イルメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-  
 -d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-エトキシ)-ピペリジン-  
 1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；6-((3R,5S)-3,5-ジメチ  
 ル-4-チアゾール-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)  
 -4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モル  
 ホリン-4-イル-6-[4-(1-オキシ-ピリジン-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チ  
 エノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-エチル)-ピペ  
 リジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾ  
 ール-4-イル)-6-(4-メタンスルホニル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-  
 チエノ[3,2-d]ピリミジン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエ  
 ノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(3-メタンスルホニル-プロピ  
 ル)-メチル-アミン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(3-メトキシ-プロパン-1-スルホ  
 ニル)-ピペリジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；(R)-  
 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イル  
 メチル]-ピペリジン-3-カルボン酸メチルアミド；(S)-1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-  
 -モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-カルボン酸  
 メチルアミド；6-(4-イミダゾール-1-イルメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-2-(1H-イン  
 ダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール  
 -4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-モルホリン-4-イルメチル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(3-メチル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-  
 イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル  
 -チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-イル}-メタノール；2-{1-[2-(  
 1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル  
 ]-ピペリジン-4-イル}-エタノール；1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル  
 -チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-4-チアゾール-2-イル-ピペリジン-4-オール  
 ；2-(1-メチル-1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モ  
 ルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(2-メチル-2H-インダゾール-4-イル)-6-(  
 4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-  
 -(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-4-イルメチル-ピペ  
 ラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；1-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-  
 -モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-3-フ  
 エノキシ-プロパン-2-オール；6-[4-(1H-イミダゾール-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イル  
 メチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン  
 ；6-[4-(3H-イミダゾール-4-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール  
 -4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)  
 -4-モルホリン-4-イル-6-((2S,6R)-2,4,6-トリメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チ  
 エノ[3,2-d]ピリミジン；{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ  
 [3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-1-メタンスルホニル-ピペラジン-2-イル}-メタノール  
 ；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メタンスルホニル-3-メトキシメチル-ピペラジン-1  
 -イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；および上記の遊離化合物  
 の薬学的に許容される塩。

【0015】

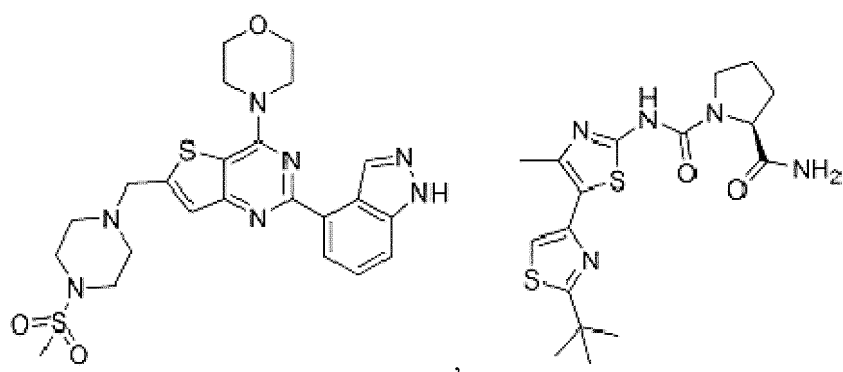
上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつか  
 の態様において、PI3K の選択的阻害物質は、以下の化合物より選択される：

10

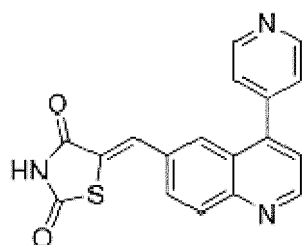
20

30

40



10

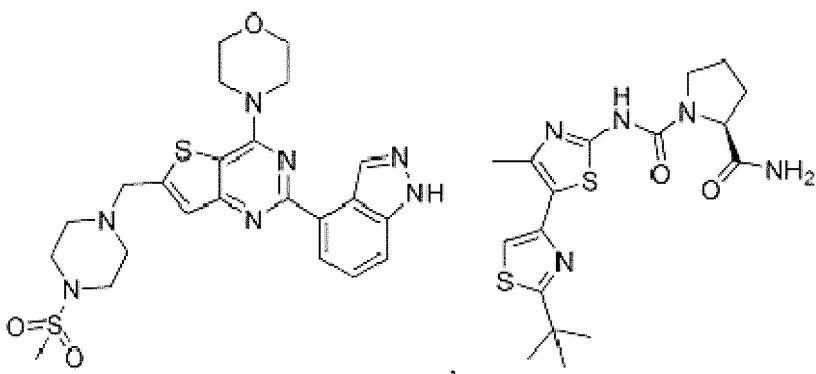


、INK1117、およびBYL719。

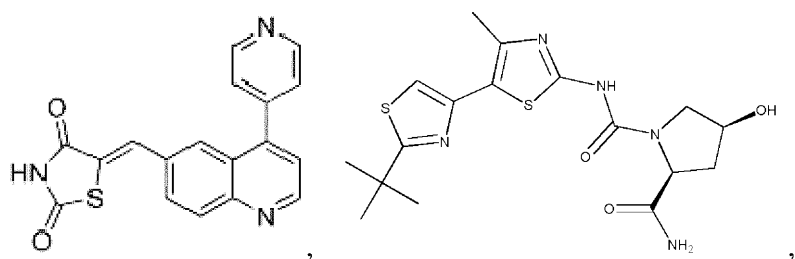
【 0 0 1 6 】

20

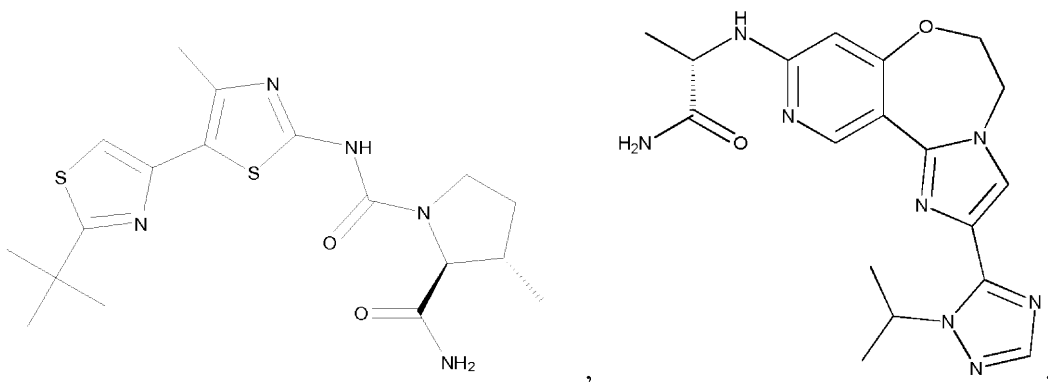
上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質は、以下より選択される：



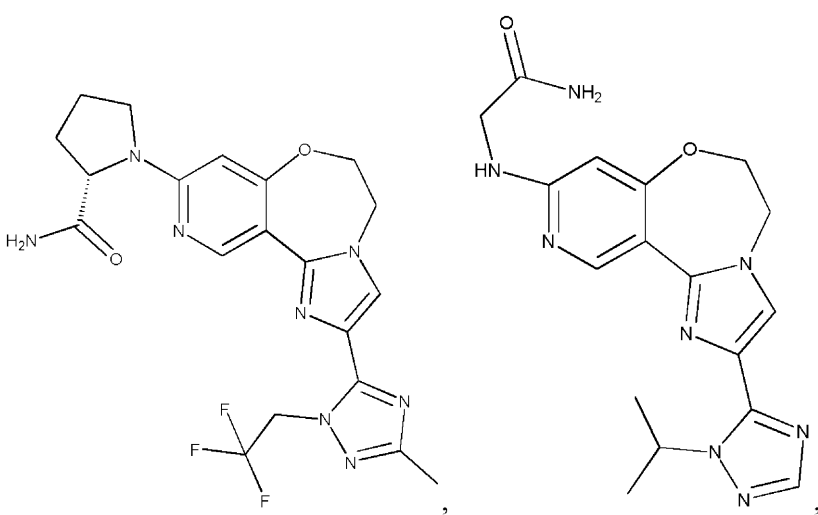
30



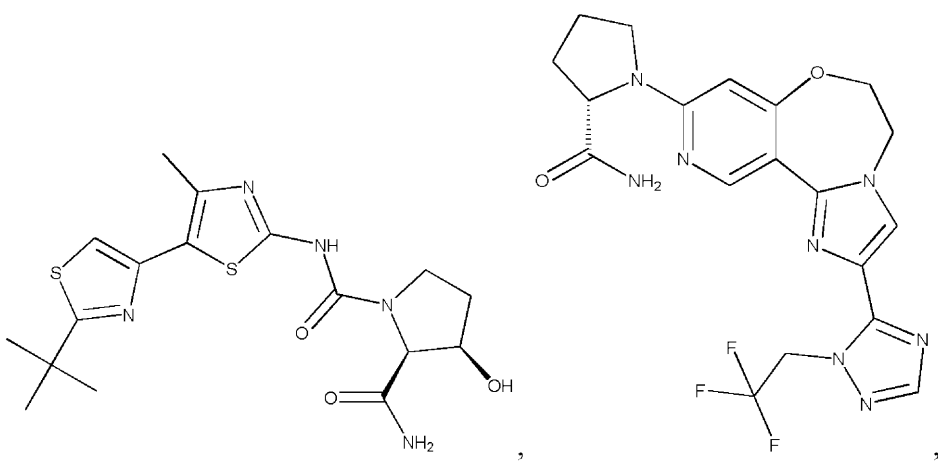
10



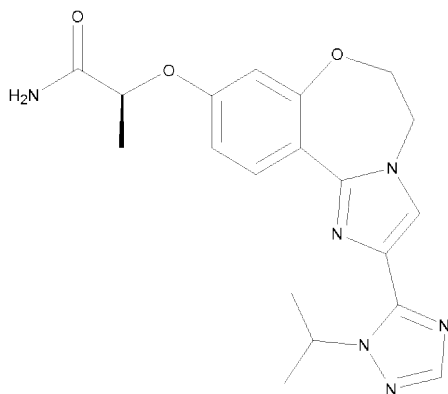
20



30



40



10

、INK1117、およびBYL719。

【 0 0 1 7 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質は、4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[(4-メチルスルホニルピペラジン-1-イル)メチル]チエノ[3,2-d]ピリミジン-4-イル]モルホリンである。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質はPI3K の阻害物質でもある。

【 0 0 1 8 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質の有効量は750nMである。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、アクチピンAの有効量は培地1ml当たり100ngである。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で細胞を培養する工程は、Wnt3aの非存在下で細胞を培養することを含む。

20

【 0 0 1 9 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、方法は、幹細胞の集団をmTOR阻害物質の有効量と接触させる工程をさらに含む。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、方法は、幹細胞の集団をPI3K の選択的阻害物質と接触させる工程をさらに含む。

30

【 0 0 2 0 】

別の局面において、本発明は、上記の方法のいずれかを使用して入手された内胚葉細胞の集団を提供する。

【 0 0 2 1 】

別の局面において、本発明は、内胚葉細胞の集団を入手する方法を提供し、該方法は、mTORの阻害物質の有効量およびアクチピンAの有効量と幹細胞の集団を接触させる工程、ならびに、該内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程を含む。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも61%がSOX17を発現するか、または内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも40%がFoxA2を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも61%がSOX17を発現し、かつ内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも40%がFoxA2を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞は、肝実質細胞、膵臓細胞、膵前駆細胞、肝臓細胞、または肺上皮細胞になる能力を有する。

40

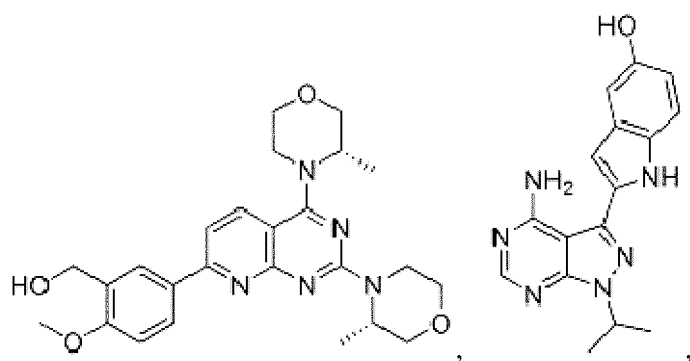
【 0 0 2 2 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、mTORの阻害物質は、siRNAまたは低分子である。上記の方法のいずれか

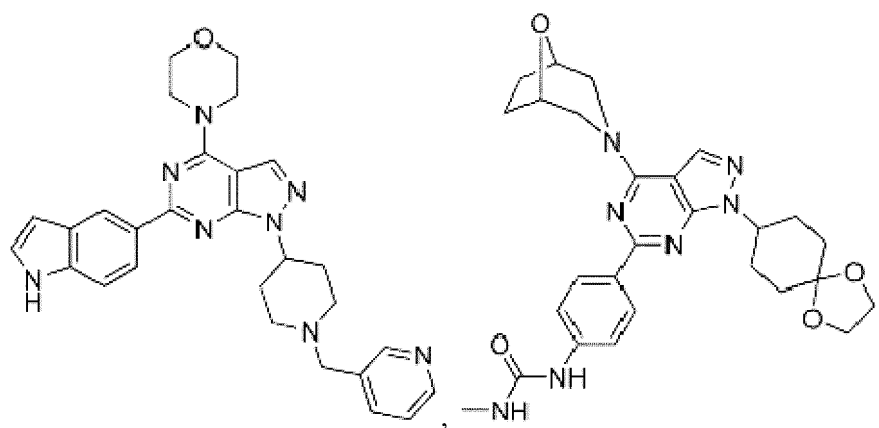
50



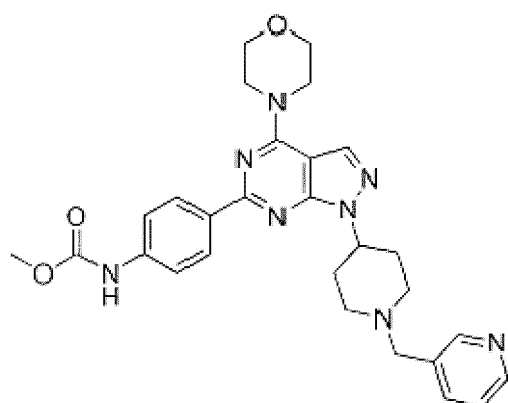
による（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、低分子は、以下からなる群より選択される：



10



20



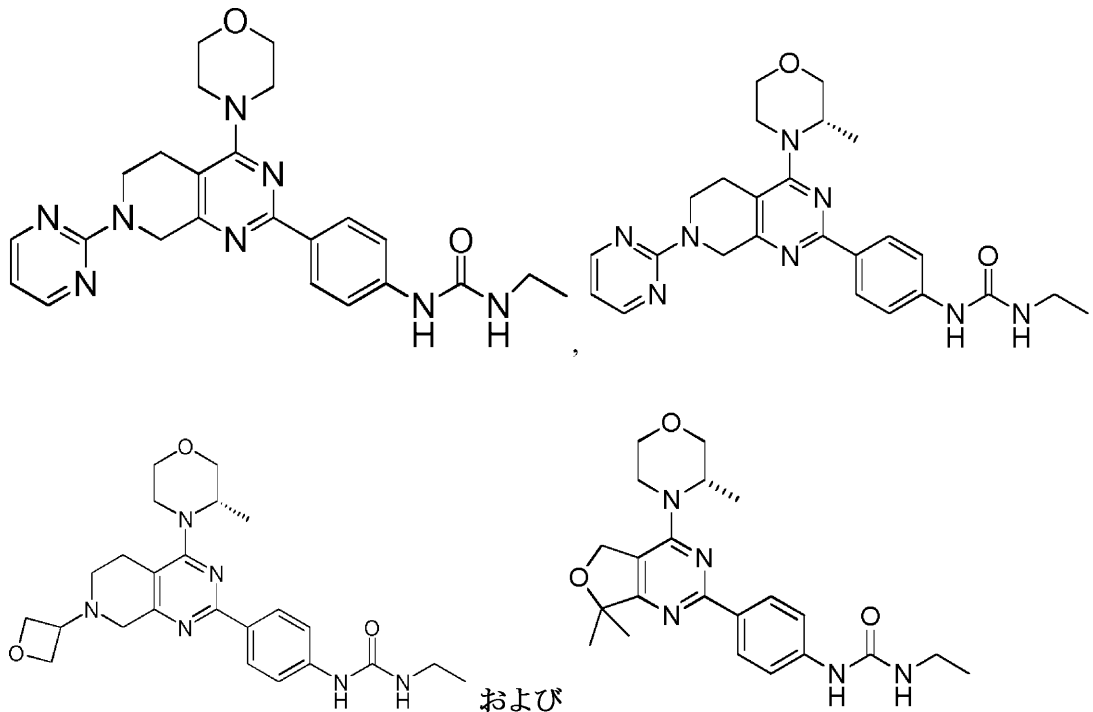
30

、AP23573、トーリセル、INK128、AZD80555、AZD2012、CC-223、KU-0063794、OSI-027、シロリムス ラパマイシン、およびエペロリムス。

40

【 0 0 2 3 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、低分子は、以下からなる群より選択される：



10

。

20

## 【 0 0 2 4 】

上記の方法のいずれかを使用して入手された内胚葉細胞の集団も本発明によって提供される。

## 【 0 0 2 5 】

別の局面において、本発明は、関心対象の細胞型への内胚葉細胞の分化を促進する因子を同定するための方法を提供し、該方法は、内胚葉細胞の集団を該因子と接触させる工程であって、該集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、工程、該関心対象の細胞型への分化について該内胚葉細胞の集団をモニタリングし、それによって、関心対象の細胞型への内胚葉細胞の分化を促進する因子を同定する工程を含む。

30

## 【 0 0 2 6 】

別の局面において、本発明は、内胚葉細胞の分化を阻害する因子を同定するための方法を提供し、該方法は、内胚葉細胞の集団を該因子と接触させる工程であって、該集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、工程、分化について細胞をモニタリングし、それによって、内胚葉細胞の分化を阻害する因子を同定する工程。

## 【 0 0 2 7 】

別の局面において、本発明は、毒性について薬物候補をスクリーニングするための方法を提供し、該方法は、内胚葉細胞の集団を該薬物と接触させる工程であって、該集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、工程、および、毒性について該細胞をモニタリングし、それによって、該薬物候補が毒性であるかどうかを同定する工程を含む。

40

## 【 0 0 2 8 】

別の局面において、本発明は、それを必要とする患者へ細胞に基づく治療を提供する方法を提供し、該方法は、内胚葉細胞の集団を該患者へ投与する工程であって、該集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、工程を含む。

50

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、患者は、肝線維症、肝硬変、肝不全、肝臓癌および膵臓癌、膵不全、腸組織交換酵素（replacement enzyme）欠損、クローン病、炎症性腸症候群、ならびに腸癌に罹患している。

【0029】

別の局面において、本発明は、肝実質細胞の集団を入手する方法を提供し、該方法は、肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で内胚葉細胞の集団を培養する工程であって、該集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、工程を含む。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、肝実質細胞の集団内の肝実質細胞の少なくとも56%がAFPを発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞の集団を接触させ、かつ、肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養することによって、内胚葉細胞は入手される。

10

【0030】

別の局面において、本発明は、肝実質細胞の集団を入手する方法を提供し、該方法は、PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と共に幹細胞の集団を培養する工程、ならびに、該肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程を含む。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件は、有効量のアクチビンAを含有しておりかつ他の増殖因子を欠いている培地において内胚葉細胞を培養することを含む。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、他の増殖因子は、FGF2、FGF4、BMP2、およびBMP4からなる群より選択される。

20

【0031】

別の局面において、本発明は、上記の方法のいずれかを使用して入手された肝実質細胞の集団を提供する。

【0032】

別の局面において、本発明は、肝実質細胞の単離された集団を提供し、以下の1つまたは複数である：肝実質細胞が、アルブミン、A1AT、またはアルブミンおよびA1ATを分泌すること；CYP1A1/2活性が誘導可能であること；ならびに、肝実質細胞が、AFM、AFP、AGXT、ALB、CEBPA、CYP2C19、CYP2C9、CYP3A4、CYP3A7、CYP7A1、CABP1、FOXA1、FOXA2、GSTA1、HNF1A、HNF1B、HNF4a、IL6R、SERPINA1、SERPINA3、SERPINA7、SLC02B1、TAT、VCAM1、またはそれらの組み合わせを発現すること。

30

【0033】

別の局面において、本発明はそれを必要とする患者へ細胞に基づく治療を提供する方法を提供し、該方法は上記の肝実質細胞の集団の有効量を該患者へ投与する工程を含む。

【0034】

別の局面において、本発明は、毒性について薬物候補をスクリーニングする方法を提供し、該方法は、本明細書に記載された方法のいずれかによって入手された肝実質細胞の集団を、薬物候補と接触させる工程、肝実質細胞を毒性についてモニタリングし、それによって、該薬物候補が毒性であるかどうかを同定する工程を含む。

40

【0035】

別の局面において、本発明は、膵前駆細胞を入手する方法を提供し、該方法は、有効量の（1）mTOR阻害物質および有効量のアクチビンA、または（2）PI3K の選択的阻害物質および有効量のアクチビンA、または（3）mTOR阻害物質、PI3K の選択的阻害物質、および有効量のアクチビンAのいずれかと共に幹細胞の集団を培養し、かつ、内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程；ならびに、膵前駆細胞への内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な条件の下で該内胚葉細胞を培養する工程を含む。

50

## 【0036】

別の局面において、本発明は、膵前駆細胞を入手する方法を提供し、該方法は、膵前駆細胞への内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な条件の下で上記の内胚葉細胞の出発集団を培養する工程を含む。

## 【0037】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、膵前駆細胞は、膵内分泌細胞、膵外分泌細胞、および膵管細胞へ分化することができる。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、膵内分泌細胞は、細胞、細胞、細胞、および細胞からなる群より選択される。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、膵内分泌細胞は、グルカゴン、インスリン、ソマトスタチン、および膵ポリペプチドのうちの1種または複数種を産生することができる。

10

## 【0038】

別の局面において、本発明は、分化した膵臓細胞を入手する方法を提供し、該方法は、分化した膵臓細胞への膵前駆細胞の分化を促進するのに十分な条件の下で、上記の方法のいずれかによって作製された膵前駆細胞を培養する工程を含む。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、分化した膵臓細胞は、膵内分泌細胞、膵外分泌細胞、および膵管細胞からなる群より選択される。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、分化した膵臓細胞は、グルカゴン、インスリン、ソマトスタチン、および膵ポリペプチドのうちの1種または複数種を産生することができる。

20

## 【0039】

別の局面において、本発明は、上記の方法によって作製された膵前駆細胞の単離された集団を提供する。別の局面において、本発明は、Pdx1、Cペプチド、ARX、GLIS3、HNF1a、HNF1b、HNF4a、KRT19、MNX1、RFX6、SERPINA3、ONECUT1、NKX2-2、またはそれらの任意の組み合わせを発現する膵前駆細胞の単離された集団を提供する。別の局面において、本発明は、上記の方法によって作製された分化した膵臓細胞の単離された集団を提供する。別の局面において、本発明は、分化した膵臓細胞の単離された集団を提供し、該膵臓細胞は、懸濁液中でクラスタを形成し、かつ、懸濁液中で生存可能である。

30

## 【0040】

別の局面において、本発明は、それを必要とする患者へ細胞に基づく治療を提供する方法を提供し、該方法は、上記の膵前駆細胞の集団の有効量を該患者へ投与する工程を含む。別の局面において、本発明は、それを必要とする患者へ細胞に基づく治療を提供する方法を提供し、該方法は、上記の分化した膵臓細胞の集団の有効量を該患者へ投与する工程を含む。別の局面において、本発明は、毒性について薬物候補をスクリーニングする方法を提供し、該方法は、上記の方法のいずれかによって入手された膵臓細胞の集団を、薬物候補と接触させる工程、毒性について膵臓細胞をモニタリングし、それによって、該薬物候補が毒性であるかどうかを同定する工程を含む。

## 【0041】

40

別の局面において、本発明は、内胚葉細胞の単離された集団を含む集団を提供し、該細胞の少なくとも75%がSOX17を発現するか、該細胞の少なくとも75%がFoxA2を発現するか、または該細胞の少なくとも75%がCXCR4を発現する。上記の集団のいずれかによる（例えば、上記の集団のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の集団のいずれかによる（例えば、上記の集団のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現する。上記の集団のいずれかによる（例えば、上記の集団のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の集団のいずれ

50

かによる（例えば、上記の集団のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の集団のいずれかによる（例えば、上記の集団のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。本明細書に記載された内胚葉細胞の単離された集団の態様のいずれかにおいて、内胚葉細胞は、肝実質細胞になる能力を有する。

#### 【0042】

別の局面において、本発明は、内胚葉細胞の一つまたは複数の集団を含む内胚葉細胞のバンクを提供し、該細胞の少なくとも75%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも75%がFoxA2を発現し、かつ/または該細胞の少なくとも75%がCXCR4を発現し、該集団が低温貯蔵される。上記のバンクのいずれかによる（例えば、上記のバンクのいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞のバンクは、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ/または細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現し、集団が低温貯蔵される、内胚葉細胞の一つまたは複数の集団を含む。上記のバンクのいずれかによる（例えば、上記のバンクのいずれかに適用される）いくつかの態様において、バンク内の内胚葉細胞は、肝実質細胞になる能力を有する。

#### 【0043】

別の局面において、本発明は、PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞の集団を接触させる段階、ならびに、内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する段階によって、該内胚葉細胞の集団を入手する方法を提供する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも75%がSOX17を発現するか、内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも75%がFoxA2を発現するか、または内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも75%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、本明細書に記載された方法によって入手された内胚葉細胞は、肝実質細胞になる能力を有する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞は、PI3K の選択的阻害物質およびアクチビンAと接触させられていない幹細胞と比較してより高い生存率および/またはより多い増殖を有する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、内胚葉細胞は、PI3K の選択的阻害物質と接触させられていない対照と比較してより高い生存率および/またはより多い増殖を有する。

#### 【0044】

様々な態様において、方法において使用される幹細胞は、成体幹細胞、胚性幹細胞、または誘導多能性幹細胞である。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、幹細胞は、最適化マトリゲル、ゼラチン、

10

20

30

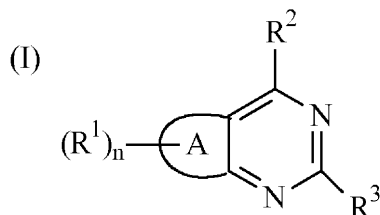
40

50

またはコラーゲンにおいて培養される。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、幹細胞は懸濁液中で培養される。

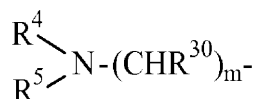
【 0 0 4 5 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質は、式（I）の縮合ピリミジンである化合物、またはその薬学的に許容される塩であり、



10

式中、Aは、チオフェン環またはフラン環を表し；nは、1または2であり；R<sup>1</sup>は、式：

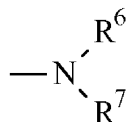


の基であり、式中、mは、0または1であり；R<sup>30</sup>は、HまたはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルであり；R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は、それらが結合しているN原子と一緒に、5員もしくは6員の飽和N含有複素環基を形成し、該飽和N含有複素環基が、N、S、およびOより選択される付加的なヘテロ原子を0個もしくは1個含み、ベンゼン環と縮合していてもよく、かつ、置換されていないか

20

もしくは置換されているか；または、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>の一方が、アルキルであり、他方が、上記で定義された5員もしくは6員の飽和N含有複素環基、もしくは上記で定義された5員もしくは6員の飽和N含有複素環基によって置換されているアルキル基であり；R<sup>2</sup>は、

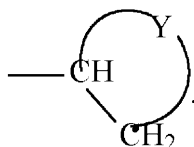
(a) R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>が、それらが結合している窒素原子と一緒に、モルホリン基、チオモルホリン基、ピペリジン基、ピペラジン基、オキサゼパン基、またはチアゼパン基を形成し、該モルホリン基、該チオモルホリン基、該ピペリジン基、該ピペラジン基、該オキサゼパン基、または該チアゼパン基が置換されていないかまたは置換されている、



30

、ならびに

(b) YがC<sub>2</sub>～C<sub>4</sub>アルキレン鎖であり、該C<sub>2</sub>～C<sub>4</sub>アルキレン鎖が、該鎖の構成炭素原子の間にかつ／または該鎖の一端もしくは両端にO、N、およびSより選択されるヘテロ原子を1個または2個含有しており、かつ、置換されていないかまたは置換されている、

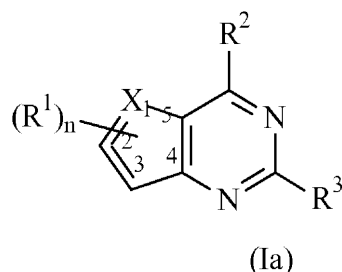


より選択され；かつ、R<sup>3</sup>が、置換されていないかまたは置換されているインダゾール基である。

40

【 0 0 4 6 】

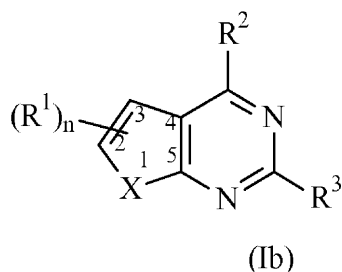
上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質の縮合ピリミジンは、式（Ia）であり、



式中、XはSまたはOであり、かつ、R¹、R²、R³、およびnは上記で定義した通りである。

【 0 0 4 7 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質の縮合ピリミジンは、式（Ib）であり、



式中、XはSまたはOであり、かつ、R¹、R²、R³、およびnは上記で定義した通りである。

【 0 0 4 8 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質は、以下より選択される化合物または化合物の組み合わせである：2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-スルホン酸ジメチルアミド；{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-モルホリン-4-イル-メタノン；4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-カルボン酸(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミド；{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-N,N-ジメチル-アセトアミド；4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-カルボン酸ジメチルアミド；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(3-モルホリン-4-イル-プロパン-1-スルホニル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン；(3-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-スルホニル}-プロピル)-ジメチル-アミン；2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-プロパン-1-オール；1'-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-[1,4']ビペリジニル；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-モルホリン-4-イル-ピペリジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリミジン-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；1-(2-ヒドロキシ-エチル)-4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-2-オン；6-(4-シクロプロピルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエ

10

20

30

40

50

ノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(2,2,2-トリフルオロ-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(6-フルオロ-1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(5-メチル-フラン-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸アミド ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-1,1-ジメチル-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[(3R,5S)-4-(2-メトキシ-エチル)-3,5-ジメチル-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミド ; 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸ジメチルアミド ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-3-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸メチルアミド ; 2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-N-メチル-イソブチルアミド ; 2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-1-ピロリジン-1-イル-プロパン-1-オン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(1-メチル-1H-イミダゾール-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(5-メチル-イソキサゾール-3-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 1-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-プロパン-2-オール ; シクロプロピルメチル-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-アミン ; 6-[4-(1-エチル-1-メトキシメチル-プロピル)-ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(1-メトキシメチル-シクロプロピル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-(2,2,2-トリフルオロ-エチル)-アミン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-メタノール ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-4-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(6-メチル-ピリジン-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(4-メチル-チアゾール-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-ピリジン-2-イル-アミン ; N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-2-メトキシ-N-メチル-アセトアミド ; N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピ



リミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-N-メチル-メタンスルホンアミド；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(3-メトキシ-プロピル)-メチル-アミン；6-((3S,5R)-3,5-ジメチル-4-ピリジン-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メトキシメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-チアゾール-2-イルメチル-アミン；1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-4-ピリジン-2-イルメチル-ピペリジン-4-オール；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-イソプロピル-(2-メトキシ-エチル)-アミン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(ピリジン-2-イルオキシ)-ピペリジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン；N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-N-(2-メトキシ-エチル)-メタンスルホンアミド；2-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-プロパン-2-オール；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(1-オキシ-ピリジン-3-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-モルホリン-4-イルメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イルメチル}-(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イルメチル}-ジメチル-アミン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-イル}-(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン；1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-カルボン酸メチルアミド；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(3-メトキシメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イルメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-エトキシ)-ピペリジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；6-((3R,5S)-3,5-ジメチル-4-チアゾール-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(1-オキシ-ピリジン-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-エチル)-ピペリジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メタンスルホニル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(3-メタンスルホニル-プロピル)-メチル-アミン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(3-メトキシ-プロパン-1-スルホニル)-ピペリジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；(R)-1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-カルボン酸メチルアミド；(S)-1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-カルボン酸メチルアミド；6-(4-イミダゾール-1-イルメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-モルホリン-4-イルメチル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(3-メチル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジ

10

20

30

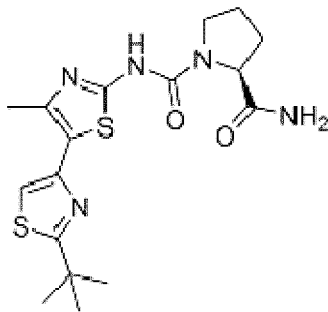
40

50

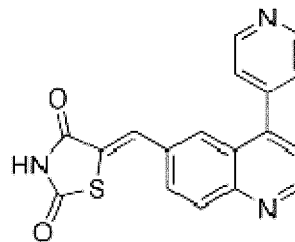
ン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-イル}-メタノール；2-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-エタノール；1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-4-チアゾール-2-イル-ピペリジン-4-オール；2-(1-メチル-1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(2-メチル-2H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-4-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；1-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-3-フェノキシ-プロパン-2-オール；6-[4-(1H-イミダゾール-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；6-[4-(3H-イミダゾール-4-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-((2S,6R)-2,4,6-トリメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-1-メタンスルホニル-ピペラジン-2-イル}-メタノール；および2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メタンスルホニル-3-メトキシメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；ならびに上記の遊離化合物の薬学的に許容される塩。

【 0 0 4 9 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質は、以下より選択される化合物または化合物の組み合わせである：



A66

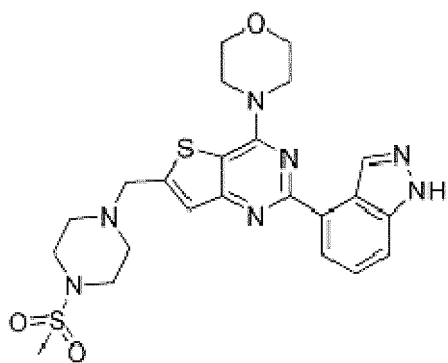


GSK1059615

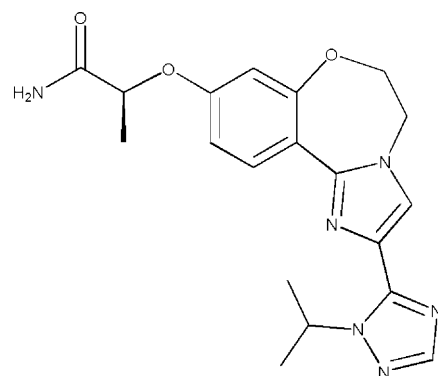
10

20

30

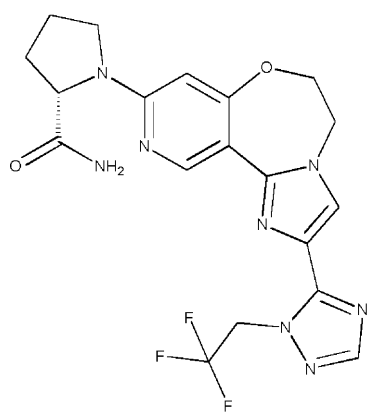


化合物 A

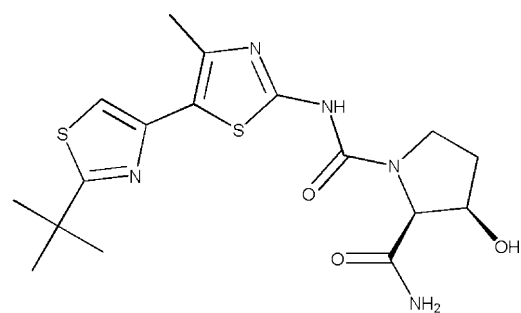


化合物 B

10

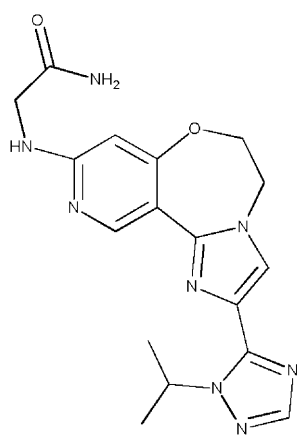


化合物 C

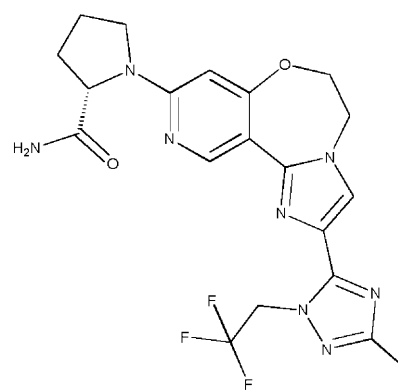


化合物 D

20



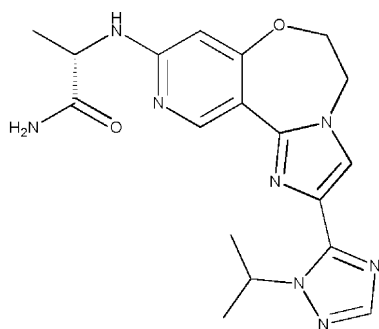
化合物 E



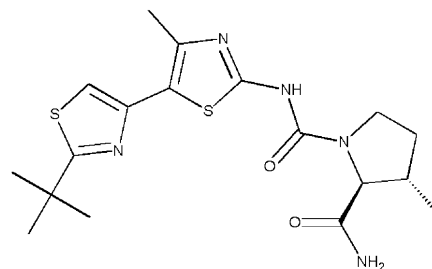
化合物 F

30

40

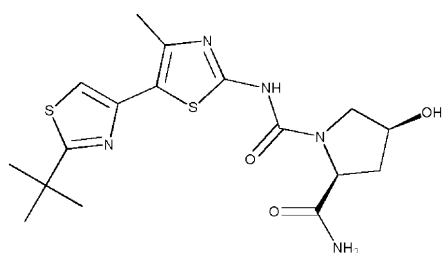


化合物 G

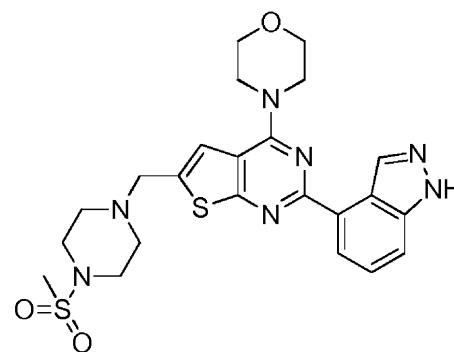


化合物 H

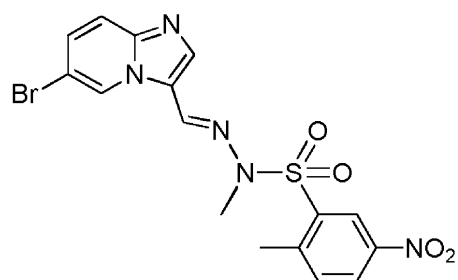
10



化合物 I



20



30

PIK-75

、INK1117、およびBYL7。

【 0 0 5 0 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質は、4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[(4-メチルスルホニルピペラジン-1-イル)メチル]チエノ[3,2-d]ピリミジン-4-イル]モルホリンである。

40

【 0 0 5 1 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質は、PI3K の阻害物質でもある。

【 0 0 5 2 】

上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質の有効量は750nMである。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、アクチビンAの有効量は培地1ml当たり100ngである。上記の方法のいずれかによる（例えば、

50

上記の方法のいずれかに適用される)いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で細胞を培養する工程は、Wnt3aの非存在下で細胞を培養することを含む。

【0053】

上記の方法のいずれかによる(例えば、上記の方法のいずれかに適用される)いくつかの態様において、方法は、幹細胞の集団をmTOR阻害物質の有効量と接触させる工程をさらに含む。上記の方法のいずれかによる(例えば、上記の方法のいずれかに適用される)いくつかの態様において、P13Kの選択的阻害物質は、mTORキナーゼの選択的阻害物質でもある。上記の方法のいずれかによる(例えば、上記の方法のいずれかに適用される)いくつかの態様において、方法は、幹細胞の集団をPI3Kの選択的阻害物質と接触させる工程をさらに含む。

10

【0054】

上記の方法のいずれかによる(例えば、上記の方法のいずれかに適用される)いくつかの態様において、本発明は、本明細書に開示された方法のいずれかを使用することによって入手された内胚葉細胞の集団を提供する。

【0055】

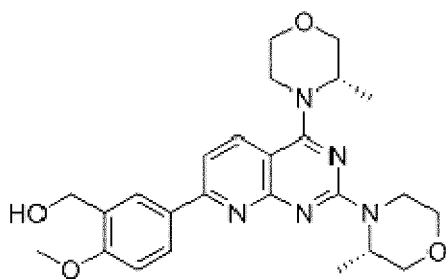
別の局面において、本発明は、内胚葉細胞の集団を入手する方法を提供し、該方法は、mTORの阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞の集団を接触させる工程、ならびに、該内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程を含む。上記の方法のいずれかによる(例えば、上記の方法のいずれかに適用される)いくつかの態様において、入手される内胚葉細胞の集団は、内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも61%がSOX17を発現するか、または内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも40%がFoxA2を発現する集団である。上記の方法のいずれかによる(例えば、上記の方法のいずれかに適用される)いくつかの態様において、入手される内胚葉細胞の集団は、内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも61%がSOX17を発現し、かつ内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも40%がFoxA2を発現する集団である。上記の方法のいずれかによる(例えば、上記の方法のいずれかに適用される)いくつかの態様において、入手される内胚葉細胞の集団は、内胚葉細胞が肝実質細胞になる能力を有する集団である。

20

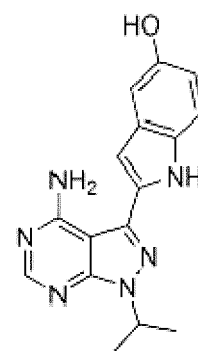
【0056】

上記の方法のいずれかによる(例えば、上記の方法のいずれかに適用される)いくつかの態様において、方法は、siRNAまたは低分子であるmTORの阻害物質の有効量、およびアクチビンAの有効量と、幹細胞の集団を接触させる工程を含む。上記の方法のいずれかによる(例えば、上記の方法のいずれかに適用される)いくつかの態様において、mTORの阻害物質は、以下からなる群より選択される低分子である：

30

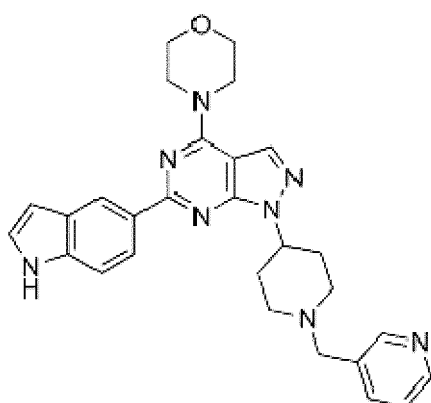


AZD-8055

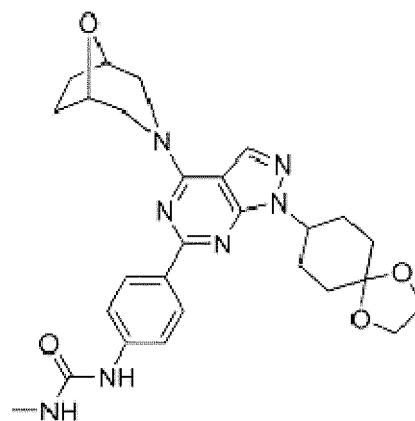


PP242

10

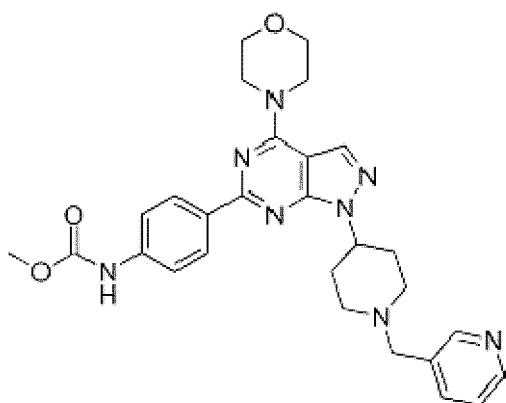


WAY-600

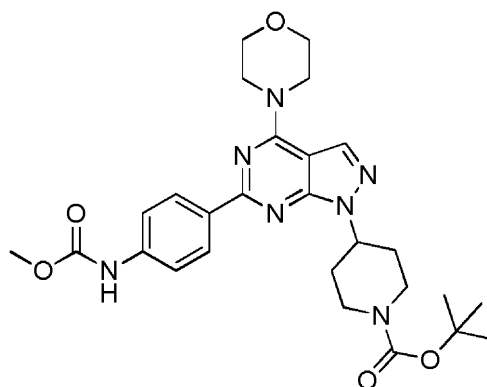


WYE-125132

20



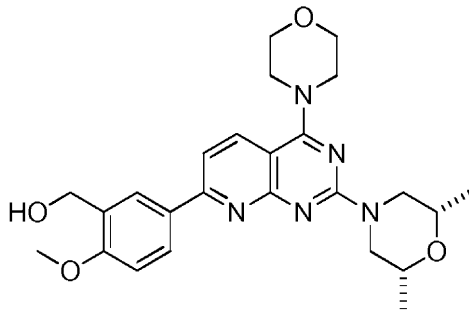
WYE-687



WYE-354

30

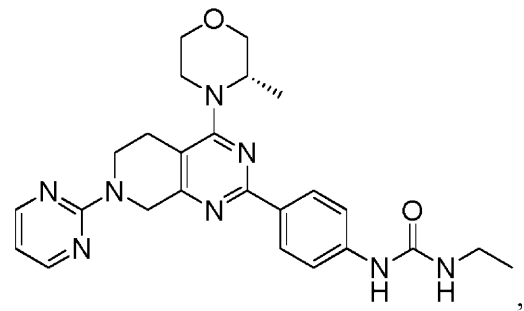
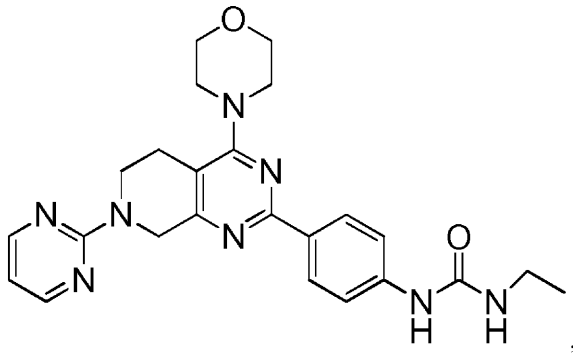
40



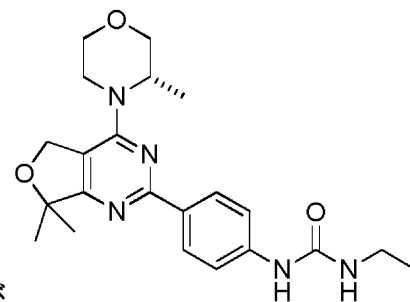
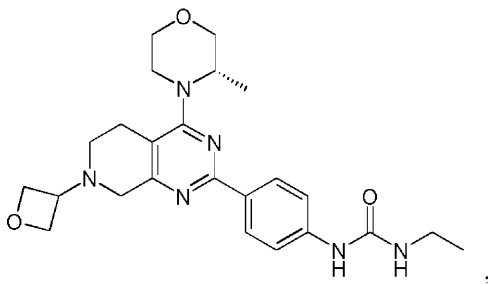
KU-0063794

10

、AP23573（リダフォロリムスまたはデフォロリムスとしても公知）、トーリセル（テムシロリムスまたはCI-779としても公知）、INK128、AZD2012、CC-223、OSI-027、シロリムス（ラパマイシン）、およびエベロリムス。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、mTORの阻害物質は、以下からなる群より選択される低分子である：



20



30

および

。

## 【 0 0 5 7 】

別の局面において、本発明は、内胚葉細胞の集団を、関心対象の細胞型への内胚葉細胞の分化を促進する因子と接触させる工程であって、該集団内の細胞の少なくとも75%がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも75%がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも75%がCXCR4を発現する、工程、該関心対象の細胞型への分化について内胚葉細胞の集団をモニタリングし、それによって、関心対象の細胞型への内胚葉細胞の分化を促進する因子を同定する工程によって、該因子を同定するための方法を提供する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。

40

## 【 0 0 5 8 】

本発明は、内胚葉細胞の集団を、内胚葉細胞の分化を阻害する因子と接触させる工程であって、該集団内の細胞の少なくとも75%がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少な

50

くとも75%がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも75%がCXCR4を発現する、工程、分化について細胞をモニタリングし、それによって、内胚葉細胞の分化を阻害する因子を同定する工程によって、該因子を同定するための方法も提供する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。

【0059】

本発明は、内胚葉細胞の集団を薬物と接触させる工程、毒性について該細胞をモニタリングし、それによって、薬物候補が毒性であるかどうかを同定する工程であって、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、工程によって、毒性について薬物候補をスクリーニングするための方法も提供する。

10

【0060】

本発明は、それを必要とする患者へ内胚葉細胞の集団を投与する工程によって、該患者へ細胞に基づく治療を提供する方法も提供し、該集団内の細胞の少なくとも75%がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも75%がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも75%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、投与される内胚葉細胞の集団は、集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する集団である。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、患者は、肝線維症、肝硬変、肝不全、糖尿病、肝臓癌および膵臓癌、膵不全、腸組織交換酵素欠損、クローン病、炎症性腸症候群、および腸癌を含む腸障害に罹患している。

20

【0061】

別の局面において、本発明は、肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で内胚葉細胞の集団を培養する工程によって、肝実質細胞の集団を入手する方法を提供し、該集団内の細胞の少なくとも75%がSOX17を発現するか、上記の方法のいずれか集団内の細胞の少なくとも75%がFoxA2を発現するか、または上記の方法のいずれか集団内の細胞の少なくとも75%がCXCR4を発現する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、肝実質細胞を入手するのに十分な条件の下で培養される内胚葉細胞の集団は、集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する集団である。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、幹細胞の集団をPI3Kの選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と接触させ、かつ該細胞を、肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で培養することによって、内胚葉細胞は入手される。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件は、有効量のアクチビンAを含有しておりかつ他の増殖因子を欠いている培地において内胚葉細胞を培養することを含む。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、他の増殖因子は、以下からなる群より選択される：HGF、レチノイン酸、FGF8、FGF1、DMSO、FGF7、FGF10、OSM、デキサメタゾン、FGF2、FGF4、BMP2、およびBMP4。

30

40

【0062】

本発明は、幹細胞の集団をPI3Kの選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と共に培養する工程、ならびに、肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程によって、該肝実質細胞の集団を入手する方法も提供する。上記の方法のいずれかによる（例えば、上記の方法のいずれかに適用される）いくつかの態様において、本明細書に記載された方法によって入手された肝実質の集団によるAFPの分泌は

50



経時的に減少する。

【0063】

本発明は、方法のいずれかを使用して入手された肝実質細胞の集団も提供する。上記の集団のいずれかによる（例えば、上記の集団のいずれかに適用される）いくつかの態様において、集団内の肝実質細胞によるAFPの分泌は、経時的に減少する。

【0064】

本発明は、それを必要とする患者へ、本明細書に記載された方法のいずれかを使用することによって入手された肝実質細胞の集団の有効量を投与する段階によって、該患者へ細胞に基づく治療を提供する方法を提供する。

【0065】

本発明は、本明細書に記載された方法のいずれかによって入手された肝実質細胞の集団を、薬物候補と接触させる段階、毒性について肝実質細胞をモニタリングし、それによって、該薬物候補が毒性であるかどうかを同定する段階によって、毒性について薬物候補をスクリーニングする方法も提供する。

[本発明1001]

内胚葉細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、該内胚葉細胞の単離された集団。

[本発明1002]

前記細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現する、本発明1001の内胚葉細胞の単離された集団。

[本発明1003]

前記細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、本発明1001または1002の内胚葉細胞の単離された集団。

[本発明1004]

前記細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、前記本発明のいずれかの内胚葉細胞の単離された集団。

[本発明1005]

前記細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、前記本発明のいずれかの内胚葉細胞の単離された集団。

[本発明1006]

前記内胚葉細胞が、肝実質細胞、膵臓細胞、膵前駆細胞、肝臓細胞、肺細胞、気道前駆細胞、または肺上皮細胞になる能力を有する、前記本発明のいずれかの内胚葉細胞の単離された集団。

[本発明1007]

内胚葉細胞の一つまたは複数の集団を含む、安定な内胚葉細胞のバンクであって、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ/または該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現し、該集団がこの表現型を少なくとも10回の継代の間維持する、安定な内胚葉細胞のバンク。

[本発明1008]

前記内胚葉細胞が、肝実質細胞、膵臓細胞、膵前駆細胞、肝臓細胞、肺細胞、気道前駆細胞、または肺上皮細胞になる能力を有する、本発明1007のバンク。

[本発明1009]

以下の工程を含む、内胚葉細胞の集団を入手する方法：PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞の集団を接触させる工程、ならびに、該内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程。

[本発明1010]

前記内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該内胚葉細胞の集団内の

10

20

30

40

50

細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、本発明1009の方法。

[本発明1011]

前記細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現する、本発明1010の方法。

[本発明1012]

前記細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、本発明1010または1011の方法。

[本発明1013]

前記細胞の83%がSOX17を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、本発明1010～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

前記細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、本発明1010～1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

前記内胚葉細胞が、肝実質細胞、膵臓細胞、膵前駆細胞、肝臓細胞、または肺上皮細胞になる能力を有する、本発明1009～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

前記内胚葉細胞が、PI3K の選択的阻害物質およびアクチビンAと接触させられていない幹細胞と比較してより高い生存率および/またはより多い増殖を有する、本発明1009～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

前記幹細胞が、成体幹細胞、胚性幹細胞、または誘導多能性幹細胞である、本発明1009～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

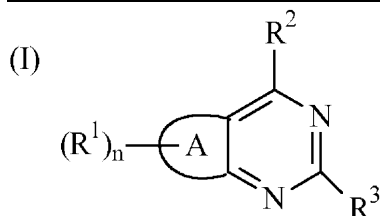
前記幹細胞が最適化マトリゲルにおいて培養される、本発明1009～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

前記幹細胞が懸濁液中で培養される、本発明1009～1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

前記PI3K の選択的阻害物質が、式(I)の縮合ピリミジンである化合物、またはその薬学的に許容される塩である、本発明1009～1019のいずれかの方法：

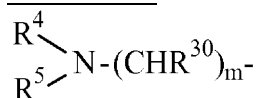


式中、

Aは、チオフェン環またはフラン環を表し；

nは、1または2であり；

R<sup>1</sup>は、式：



の基であり、

式中、

mは、0または1であり；

R<sup>30</sup>は、HまたはC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルであり；

R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は、それらが結合しているN原子と一緒に、5員もしくは6員の飽和N含有

10

20

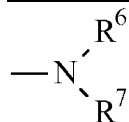
30

40

50

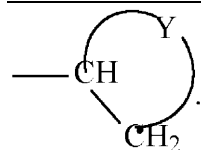
複素環基を形成し、該飽和N含有複素環基が、N、S、およびOより選択される付加的なヘテロ原子を0個もしくは1個含み、ベンゼン環と縮合していてもよく、かつ、置換されていないかもしくは置換されているか；または、 $R^4$ および $R^5$ の一方が、アルキルであり、かつ他方が、上記で定義された5員もしくは6員の飽和N含有複素環基、もしくは上記で定義された5員もしくは6員の飽和N含有複素環基によって置換されているアルキル基であり； $R^2$ は、

(a)  $R^6$ および $R^7$ が、それらが結合している窒素原子と一緒に、モルホリン基、チオモルホリン基、ピペリジン基、ピペラジン基、オキサゼパン基、またはチアゼパン基を形成し、該モルホリン基、該チオモルホリン基、該ピペリジン基、該ピペラジン基、該オキサゼパン基、または該チアゼパン基が置換されていないかまたは置換されている、



、ならびに

(b) Yが $C_2 \sim C_4$ アルキレン鎖であり、該 $C_2 \sim C_4$ アルキレン鎖が、該鎖の構成炭素原子の間にかつ/または該鎖の一端もしくは両端にO、N、およびSより選択されるヘテロ原子を1個または2個含有しており、かつ、置換されていないかまたは置換されている、

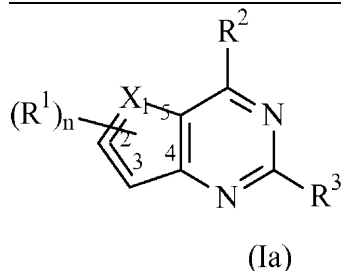


より選択され；

かつ、 $R^3$ は、置換されていないかまたは置換されているインダゾール基である。

[本発明1021]

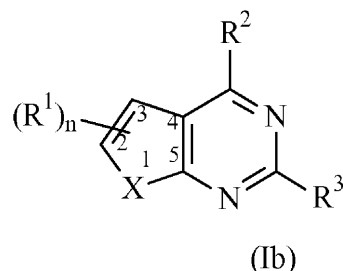
前記縮合ピリミジンが式(Ia)である、本発明1020の方法：



式中、XはSまたはOであり、かつ、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、およびnは、本発明1020に定義された通りである。

[本発明1022]

前記縮合ピリミジンが式(Ib)である、本発明1020の方法：



式中、XはSまたはOであり、かつ、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、およびnは、本発明1020に定義された通りである。

[本発明1023]

前記化合物が以下より選択される、本発明1020の方法：

2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-スルホン酸ジメチルアミド ;  
{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-モルホリン-4-イル-メタノン ;  
4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-カルボン酸(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミド ;  
{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-N,N-ジメチル-アセトアミド ;  
4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-カルボン酸ジメチルアミド ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(3-モルホリン-4-イル-プロパン-1-スルホニル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン ;  
(3-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-スルホニル}-プロピル)-ジメチル-アミン ;  
2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-プロパン-1-オール ;  
1'-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-[1,4']ピピペリジニル ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-モルホリン-4-イル-ピペリジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリミジン-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
1-(2-ヒドロキシ-エチル)-4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-2-オン ;  
6-(4-シクロプロピルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(2,2,2-トリフルオロ-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
2-(6-フルオロ-1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(5-メチル-フラン-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸アミド ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-1,1-ジメチル-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[(3R,5S)-4-(2-メトキシ-エチル)-3,5-ジメチル-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;

10

20

30

40

50

1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミド；  
1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸ジメチルアミド；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-3-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸メチルアミド；  
2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-N-メチル-イソブチルアミド；  
2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-1-ピロリジン-1-イル-プロパン-1-オン；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(1-メチル-1H-イミダゾール-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(5-メチル-イソキサゾール-3-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
1-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-プロパン-2-オール；  
シクロプロピルメチル-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-アミン；  
6-[4-(1-エチル-1-メトキシメチル-プロピル)-ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(1-メトキシメチル-シクロプロピル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-(2,2,2-トリフルオロ-エチル)-アミン；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-メタノール；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-4-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(6-メチル-ピリジン-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(4-メチル-チアゾール-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-ピリジン-2-イル-アミン；  
N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-2-メトキシ-N-メチル-アセトアミド；  
N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-N-メチル-メタンスルホンアミド；  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(3-メトキシ-プロピル)-メチル-アミン；  
6-((3S,5R)-3,5-ジメチル-4-ピリジン-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メトキシメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イ

10

20

30

40

50

ルメチル}-ピペリジン-4-イル)-(2-メトキシ-エチル)-チアゾール-2-イルメチル-アミン  
;  
1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イル  
メチル]-4-ピリジン-2-イルメチル-ピペリジン-4-オール;  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イ  
ルメチル]-ピペリジン-4-イル}-イソプロピル-(2-メトキシ-エチル)-アミン;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(ピリジン-2-イルオキシ)-ピペ  
リジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-  
イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-N-(2-メトキシ-エチル)-メタンスルホンアミド;  
2-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-  
イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-プロパン-2-オール;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(1-オキシ-ピリジン-3-イルメ  
チル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-モルホリン-4-イルメチル-ピペ  
リジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イ  
ルメチル]-ピペリジン-4-イルメチル}-(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン;  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イ  
ルメチル]-ピペリジン-4-イルメチル}-ジメチル-アミン;  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イ  
ルメチル]-ピペリジン-3-イル}-(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン;  
1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イル  
メチル]-ピペリジン-3-カルボン酸メチルアミド;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(3-メトキシメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホ  
リン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イルメチル-ピペリ  
ジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-エトキシ)-ピペリジン-1-イルメチル]-4  
-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
6-((3R,5S)-3,5-ジメチル-4-チアゾール-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H  
-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(1-オキシ-ピリジン-2-イルメ  
チル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-エチル)-ピペリジン-1-イルメチル]-4-  
モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メタンスルホニル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モル  
ホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イ  
ルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(3-メタンスルホニル-プロピル)-メチル-アミン;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(3-メトキシ-プロパン-1-スルホニル)-ピペリジン-1-  
イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
(R)-1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-  
イルメチル]-ピペリジン-3-カルボン酸メチルアミド;  
(S)-1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-  
イルメチル]-ピペリジン-3-カルボン酸メチルアミド;  
6-(4-イミダゾール-1-イルメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イ  
ル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン;  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-モルホリン-4-イルメチル-チエノ[  
3,2-d]ピリミジン;

10

20

30

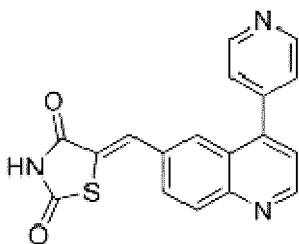
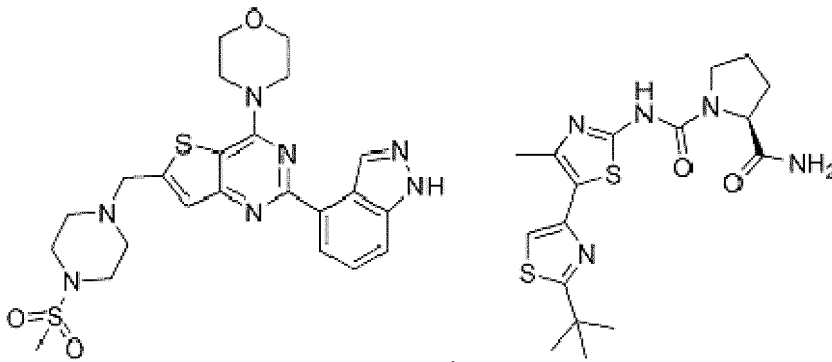
40

50

2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(3-メチル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-イル}-メタノール；  
2-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-エタノール；  
1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-4-チアゾール-2-イル-ピペリジン-4-オール；  
2-(1-メチル-1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
2-(2-メチル-2H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-4-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
1-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-3-フェノキシ-プロパン-2-オール；  
6-[4-(1H-イミダゾール-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
6-[4-(3H-イミダゾール-4-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-((2S,6R)-2,4,6-トリメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；  
{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-1-メタンスルホニル-ピペラジン-2-イル}-メタノール；および  
2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メタンスルホニル-3-メトキシメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；ならびに  
上記の遊離化合物の薬学的に許容される塩。

[本発明1024]

前記PI3K の選択的阻害物質が、以下の化合物より選択される、本発明1020の方法：



、INK1117、およびBYL719。

[本発明1025]

前記PI3K の選択的阻害物質が以下より選択される、本発明1020の方法：

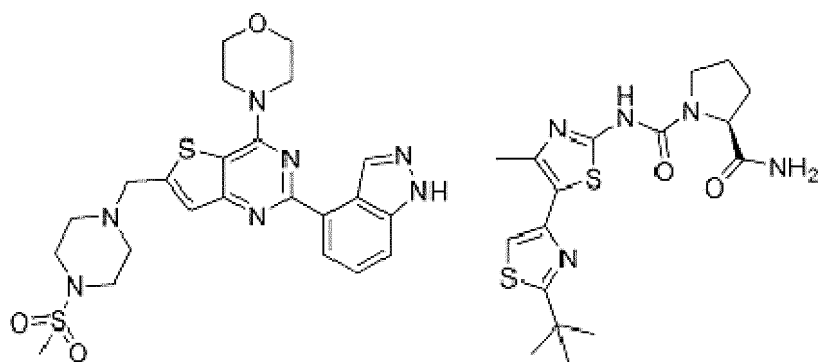
10

20

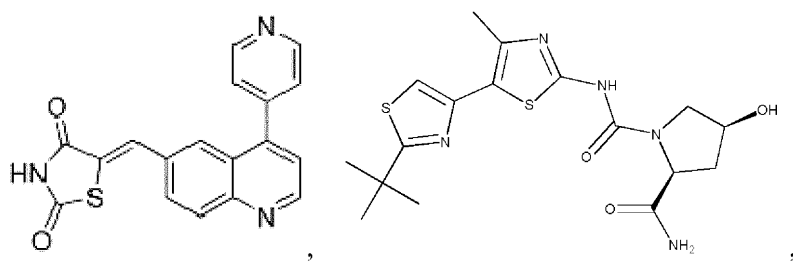
30

40

50

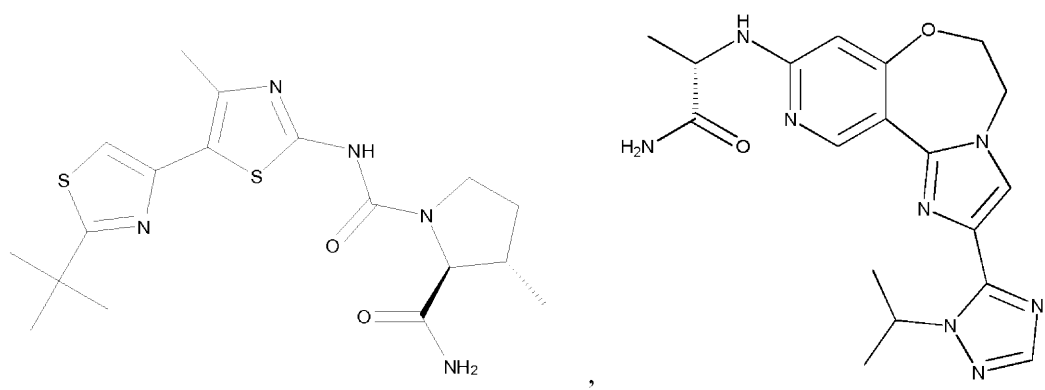


10

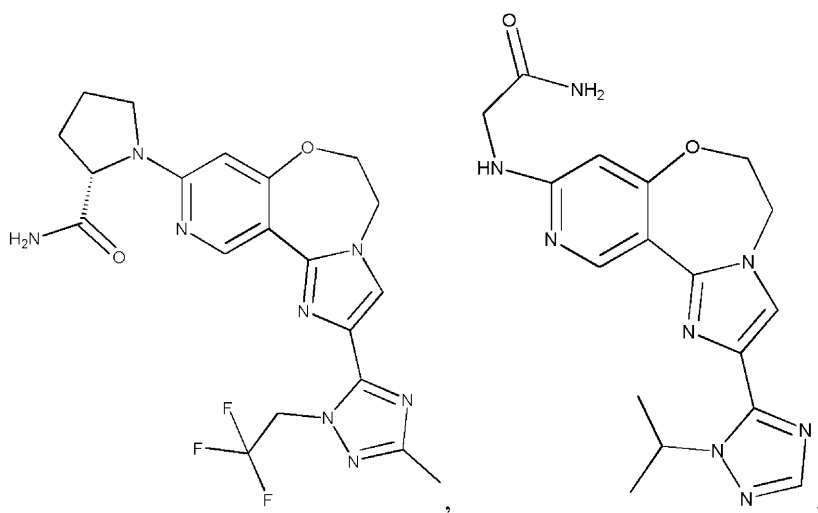


20

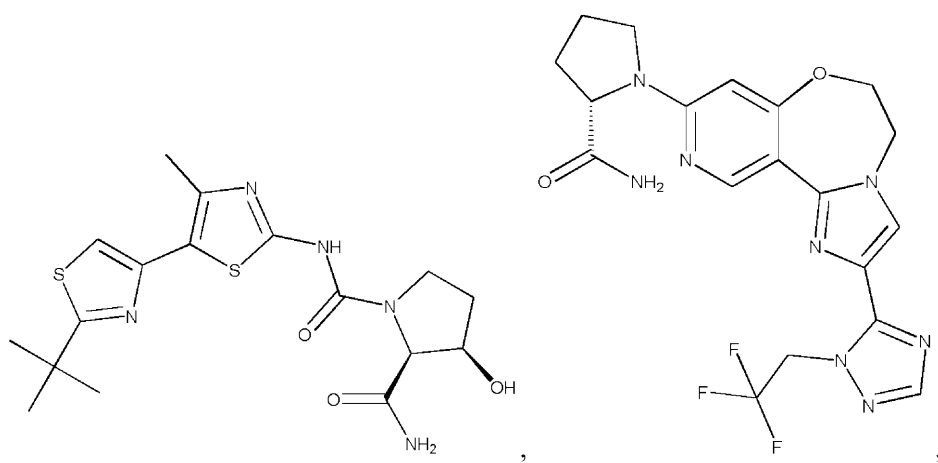




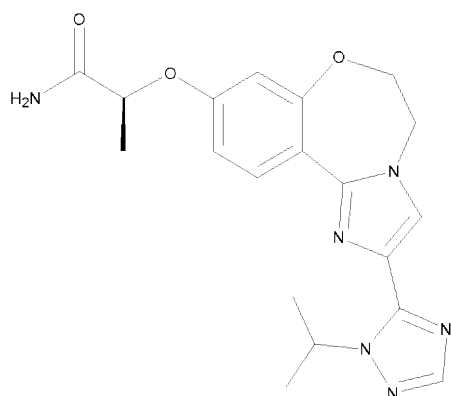
10



20



30



40

[本発明1026]

前記PI3K の選択的阻害物質が、4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[(4-メチルスルホニルピペラジン-1-イル)メチル]チエノ[3,2-d]ピリミジン-4-イル]モルホリンである、本発明1020の方法。

[本発明1027]

前記PI3K の選択的阻害物質が、PI3K の阻害物質でもある、本発明1009～1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

前記PI3K の選択的阻害物質の有効量が750nMである、本発明1009～1027のいずれかの方法。

10

[本発明1029]

前記アクチビンAの有効量が培地1ml当たり100ngである、本発明1009～1028のいずれかの方法。

[本発明1030]

前記内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で前記細胞を培養する工程が、Wnt3aの非存在下で該細胞を培養することを含む、本発明1009～1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

前記幹細胞の集団をmTOR阻害物質の有効量と接触させる工程をさらに含む、本発明1009～1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

前記幹細胞の集団をPI3K の選択的阻害物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1009～1031のいずれかの方法。

20

[本発明1033]

本発明1009～1032のいずれかの方法を使用して入手された、内胚葉細胞の集団。

[本発明1034]

以下の工程を含む、内胚葉細胞の集団を入手する方法：mTORの阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞の集団を接触させる工程、ならびに、該内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程。

[本発明1035]

前記内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも61%がSOX17を発現するか、または該内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも40%がFoxA2を発現する、本発明1034の方法。

30

[本発明1036]

前記内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも61%がSOX17を発現し、かつ該内胚葉細胞の集団内の細胞の少なくとも40%がFoxA2を発現する、本発明1034または1035の方法。

[本発明1037]

前記内胚葉細胞が、肝実質細胞、膵臓細胞、膵前駆細胞、肝臓細胞、または肺上皮細胞になる能力を有する、本発明1034～1036のいずれかの方法。

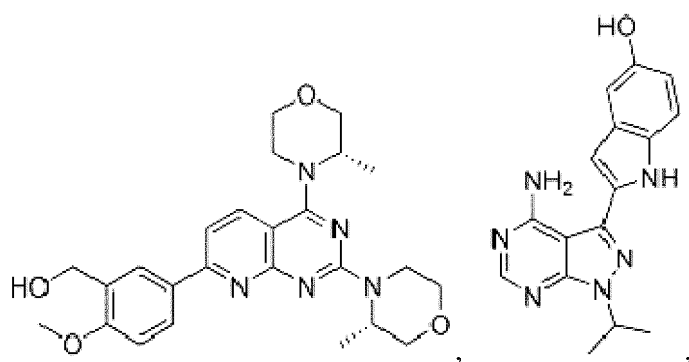
[本発明1038]

前記mTORの阻害物質がsiRNAまたは低分子である、本発明1034～1037のいずれかの方法。

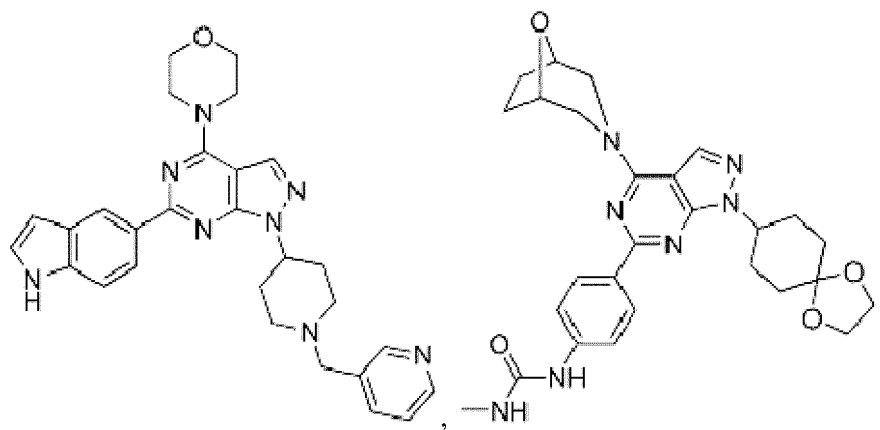
40

[本発明1039]

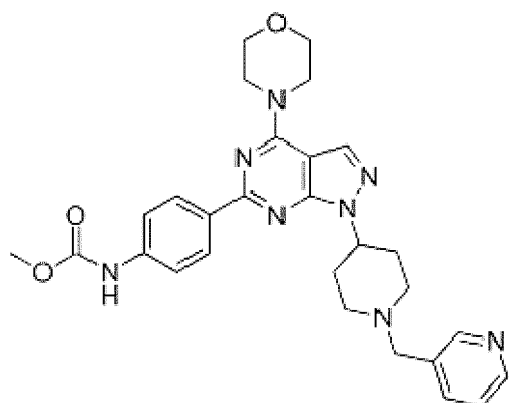
前記低分子が、以下からなる群より選択される、本発明1038の方法：



10



20

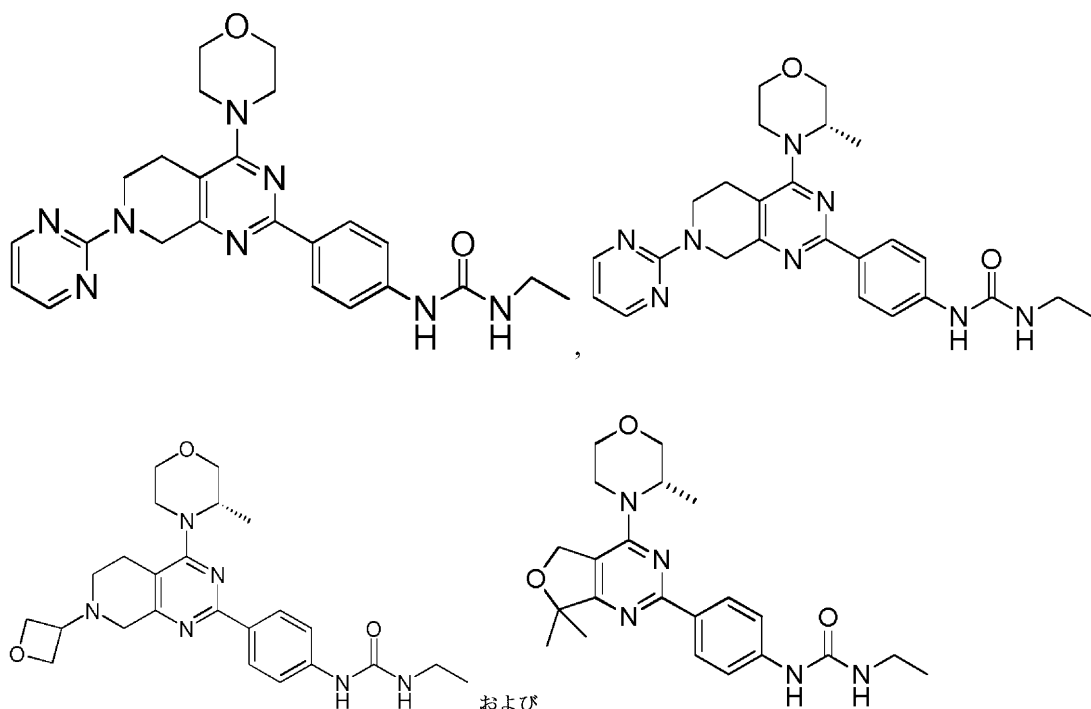


30

、AP23573、トーリセル、INK128、AZD80555、AZD2012、CC-223、KU-0063794、OSI-027、シロリムス ラパマイシン、およびエベロリムス。

[本発明1040]

前記低分子が、以下からなる群より選択される、本発明1038の方法：



10

20

。 [本発明1041]

本発明1034～1040のいずれかの方法を使用して入手された、内胚葉細胞の集団。

[本発明1042]

以下の工程を含む、関心対象の細胞型への内胚葉細胞の分化を促進する因子を同定するための方法：内胚葉細胞の集団を該因子と接触させる工程であって、該集団内の細胞の少なくとも83％がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77％がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76％がCXCR4を発現する、工程、該関心対象の細胞型への分化について該内胚葉細胞の集団をモニタリングし、それによって、関心対象の細胞型への内胚葉細胞の分化を促進する因子を同定する工程。

[本発明1043]

以下の工程を含む、内胚葉細胞の分化を阻害する因子を同定するための方法：内胚葉細胞の集団を該因子と接触させる工程であって、該集団内の細胞の少なくとも83％がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77％がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76％がCXCR4を発現する、工程、分化について該細胞をモニタリングし、それによって、内胚葉細胞の分化を阻害する因子を同定する工程。

30

[本発明1044]

以下の工程を含む、毒性について薬物候補をスクリーニングするための方法：内胚葉細胞の集団を該薬物と接触させる工程であって、該集団内の細胞の少なくとも83％がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77％がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76％がCXCR4を発現する、工程、および、毒性について該細胞をモニタリングし、それによって、該薬物候補が毒性であるかどうかを同定する工程。

40

[本発明1045]

以下の工程を含む、それを必要とする患者へ細胞に基づく治療を提供する方法：内胚葉細胞の集団を該患者へ投与する工程であって、該集団内の細胞の少なくとも83％がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77％がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76％がCXCR4を発現する、工程。

[本発明1046]

前記患者が、肝線維症、肝硬変、肝不全、肝臓癌および膵臓癌、膵不全、腸組織交換酵素（replacement enzyme）欠損、クローン病、炎症性腸症候群、ならびに腸癌に罹患している、本発明1045の方法。

50

[本発明1047]

以下の段階を含む、肝実質細胞の集団を入手する方法：肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で内胚葉細胞の集団を培養する工程であって、該集団内の細胞の少なくとも83%がSOX17を発現するか、該集団内の細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現するか、または該集団内の細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する、工程。

[本発明1048]

前記肝実質細胞の集団内の肝実質細胞の少なくとも56%がAFPを発現する、本発明1047の方法。

[本発明1049]

PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞の集団を接触させ、かつ、肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養することによって、前記内胚葉細胞が入手される、本発明1047または1048の方法。

[本発明1050]

以下の段階を含む、肝実質細胞の集団を入手する方法：PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と共に幹細胞の集団を培養する工程、ならびに、該肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程。

[本発明1051]

前記肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件が、有効量のアクチビンAを含有しておりかつ他の増殖因子を欠いている培地において内胚葉細胞を培養することを含む、本発明1050の方法。

[本発明1052]

前記他の増殖因子が、FGF2、FGF4、BMP2、およびBMP4からなる群より選択される、本発明1050または1051の方法。

[本発明1053]

本発明1037～1052のいずれかの方法を使用して入手された、肝実質細胞の集団。

[本発明1054]

肝実質細胞が、以下の特性のうちの一つまたは複数を有する、該肝実質細胞の単離された集団：該肝実質細胞が、アルブミン、A1AT、もしくはアルブミンおよびA1ATを分泌すること；CYP1A1/2活性が誘導可能であること；または該肝実質細胞が、AFM、AFP、AGXT、ALB、CEBPA、CYP2C19、CYP2C9、CYP3A4、CYP3A7、CYP7A1、CABP1、FOXA1、FOXA2、GSTA1、HNF1A、HNF1B、HNF4a、IL6R、SERPINA1、SERPINA3、SERPINA7、SLCO2B1、TAT、VCAM1、もしくはそれらの組み合わせを発現すること。

[本発明1055]

以下の工程を含む、それを必要とする患者へ細胞に基づく治療を提供する方法：本発明1053または1054の肝実質細胞の集団の有効量を該患者へ投与する工程。

[本発明1056]

以下の工程を含む、毒性について薬物候補をスクリーニングする方法：本発明1047～1052のいずれかの方法によって入手された肝実質細胞の集団を薬物候補と接触させる工程、該肝実質細胞を毒性についてモニタリングし、それによって、該薬物候補が毒性であるかどうかを同定する工程。

[本発明1057]

以下の工程を含む、臍前駆細胞を入手するための方法：(A) 有効量の(1) mTOR阻害物質および有効量のアクチビンA、または(2) PI3K の選択的阻害物質および有効量のアクチビンA、または(3) mTOR阻害物質、PI3K の選択的阻害物質、および有効量のアクチビンAのいずれかと共に幹細胞の集団を培養し、かつ、内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程；ならびに

(B) 臍前駆細胞への内胚葉細胞の分化を促進するのに十分な条件の下で該内胚葉細胞を培養する工程。

[本発明1058]

以下の工程を含む、臍前駆細胞を入手するための方法：臍前駆細胞への内胚葉細胞の分

10

20

30

40

50

化を促進するのに十分な条件の下で、本発明1001～1005、1033、または1041のいずれかの内胚葉細胞の出発集団を培養する工程。

[本発明1059]

前記膵前駆細胞が、膵内分泌細胞、膵外分泌細胞、および膵管細胞へ分化することができる、本発明1057または本発明1058の方法。

[本発明1060]

前記膵内分泌細胞が、細胞、細胞、細胞、および細胞からなる群より選択される、本発明1059の方法。

[本発明1061]

前記膵内分泌細胞が、グルカゴン、インスリン、ソマトスタチン、および膵ポリペプチドのうちの1種または複数種を産生することができる、本発明1059または1060の方法。

10

[本発明1062]

以下の工程を含む、分化した膵臓細胞を入手するための方法：分化した膵臓細胞への膵前駆細胞の分化を促進するのに十分な条件の下で、本発明1057または1058のいずれかの方法によって作製された膵前駆細胞を培養する工程。

[本発明1063]

前記分化した膵臓細胞が、膵内分泌細胞、膵外分泌細胞、および膵管細胞からなる群より選択される、本発明1062の方法。

[本発明1064]

前記分化した膵臓細胞が、グルカゴン、インスリン、ソマトスタチン、および膵ポリペプチドのうちの1種または複数種を産生することができる、本発明1062または1063の方法。

20

[本発明1065]

本発明1057～1061のいずれかの方法によって作製された膵前駆細胞の単離された集団。

[本発明1066]

膵前駆細胞が、以下のマーカーのうちの1種または複数種を発現する、該膵前駆細胞の単離された集団：Pdx1、Cペプチド、ARX、GLIS3、HNF1a、HNF1b、HNF4a、KRT19、MNX1、RFX6、SERPINA3、ONECUT1、NKX2-2、またはそれらの任意の組み合わせ。

[本発明1067]

本発明1062～1064のいずれかの方法によって作製された分化した膵臓細胞の単離された集団。

30

[本発明1068]

分化した膵臓細胞が、懸濁液中でクラスタを形成し、かつ、懸濁液中で生存可能である、該分化した膵細胞の単離された集団。

[本発明1069]

以下の工程を含む、それを必要とする患者へ細胞に基づく治療を提供する方法：本発明1065または1066の膵前駆細胞の集団の有効量を該患者へ投与する工程。

[本発明1070]

以下の工程を含む、それを必要とする患者へ細胞に基づく治療を提供する方法：本発明1067または1068の分化した膵臓細胞の集団の有効量を該患者へ投与する工程。

40

[本発明1071]

以下の工程を含む、毒性について薬物候補をスクリーニングする方法：本発明1057、1058、または1062のいずれかの方法によって入手された膵臓細胞の集団を、薬物候補と接触させる工程、毒性について該膵臓細胞をモニタリングし、それによって、該薬物候補が毒性であるかどうかを同定する工程。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】幹細胞の集団をPI3K阻害物質と接触させることによって、内胚葉細胞の集団が入手されたことを示す。

【図2】幹細胞の集団を、PI3Kの選択的阻害物質でもあるPI3Kの選択的阻害物質、化

50

合物Aと接触させることによって、内胚葉細胞の集団が入手されたことを示す。

【図3】化合物Aの内胚葉分化に対する効果が培養培地に依存しなかったことを示す。

【図4】多様なアイソフォーム特異的PI3K阻害物質の内胚葉分化に対する効果を示す。

【図5】PI3Kの阻害が、PI3K、または、およびの阻害の効果と比較して、内胚葉分化を有意に増加させたことを示す。

【図6】時間経過実験の結果を提供する。

【図7】用量応答実験の結果を提供する。

【図8】本発明の方法によって入手された内胚葉細胞の増殖を、他の方法を使用して入手された内胚葉細胞と比較した、増殖/生存率アッセイ法の結果を提供する。

【図9】アクチビンAおよび様々な用量のPI3K阻害物質と幹細胞を接触させることによって入手された内胚葉細胞の代謝活性を、幹細胞、および幹細胞をアクチビンA単独と接触させることによって入手された内胚葉細胞と比較した、ATP定量化の結果を提供する。

【図10】内胚葉分化に対する多様なmTOR阻害物質およびAkt阻害物質の効果を示す。

【図11】多様なmTOR阻害物質（エベロリムス、KU 0063794、およびWYE-354）ならびにAkt阻害物質（GSK 690693）の内胚葉分化に対する効果を示す。

【図12】mTORの阻害は内胚葉分化を増加させるが、Aktの阻害は増加させないことを示す。

【図13】mTORおよびPI3Kの同時阻害が、mTORまたはPI3Kのいずれか単独の阻害より効率的に内胚葉形成を増加させたことを示す。

【図14】幹細胞の集団をPI3K阻害物質と接触させることによって入手された内胚葉細胞が、BMP2およびFGF4の非存在下で肝実質細胞へ変換され得たことを示す。

【図15】本発明の方法によって入手された肝実質細胞が経時的に胎児タンパク質（AFP）産生の漸減を示すことを示す。

【図16】AFPレベルを測定した実験の結果を示す。0日目～3日目：アクチビンAまたはアクチビンA+PI3K阻害物質。4日目～10日目 - DMEM/F12 + Glutamax + B27。分化の10日目に培地を交換する。24時間後に、（範囲内になるよう）培地を1/500に希釈し、AlphaLisaによって分析する。PI3K阻害物質を内胚葉段階で使用しない場合、AFPレベルは極めて低く、それは、肝実質細胞レベルが低いことを示す。PI3K阻害物質を内胚葉段階で使用する場合、AFPの発現倍率は（1/500に希釈された試料について）ほぼ100倍であり、それは、肝実質細胞レベルが高いことを示す。倍率でのデータの表現は、異なる試料/実験の比較を可能にする。倍率 = 細胞と接触した培地のシグナル / 細胞と接触していない未処理培地のシグナル。

【図17】20日目の幹細胞由来肝実質細胞におけるアルブミンおよびHNF4aを測定した結果を示す。20日目の幹細胞由来肝実質細胞集団：0日目～3日目：アクチビンA+PI3K阻害物質（化合物A）。3日目～20日目：基本培地（DMEM/F12 + glutamax + B27）。

【図18】様々な程度のmTOR阻害およびPI3K阻害の、1日培養後の細胞における中内胚葉マーカー遺伝子の発現に対する効果を判定するために実施された用量応答行列実験の結果を示す。

【図19】様々な程度のmTOR阻害およびPI3K阻害の、1日培養後の細胞における付加的中内胚葉マーカー遺伝子の発現に対する効果を判定するために実施された用量応答行列実験の結果を示す。

【図20】様々な程度のmTOR阻害およびPI3K阻害の、2日培養後の細胞における内胚葉マーカー遺伝子の発現に対する効果を判定するために実施された用量応答行列実験の結果を示す。

【図21】様々な程度のmTOR阻害およびPI3K阻害の、2日培養後の細胞における中胚葉マーカー遺伝子の発現に対する効果を判定するために実施された用量応答行列実験の結果を示す。

【図22】低い細胞毒性で高レベルのSOX17発現を誘導する低分子化合物の濃度を決定するために実施された実験の結果を示す。

【図23】本発明の方法において使用され得る多様な低分子化合物のキナーゼプロファイ

10

20

30

40

50

ルを示す。

【図24】多様な低分子化合物の内胚葉分化に対する効果を判定するために実施された実験の結果を示す。

【図25】多様な低分子化合物の内胚葉マーカー遺伝子の発現に対する効果を判定するために実施された実験の結果を示す。

【図26】本発明の方法を使用して入手された内胚葉細胞の維持および増殖に対するBMPの効果判定のために実施された実験の結果を示す。

【図27】本発明の方法を使用して入手された内胚葉細胞における内胚葉マーカー遺伝子の発現に対する様々な細胞培養培地の効果を判定するために実施された実験の結果を示す。

10

【図28】本発明の方法によって入手された内胚葉細胞の維持および増殖をアッセイするために実施された実験の結果を示す。

【図29】9回継代された本発明の方法によって入手された内胚葉細胞における内胚葉マーカー遺伝子発現の程度を査定するために実施された実験の結果を示す。

【図30】図30Aは、本発明の方法によって入手された膵前駆細胞の懸濁液中で培養された場合の生存率を、他の方法によって入手された膵前駆細胞の懸濁液中で培養された場合の生存率と比較するために実施された実験の結果を示す。図30Bは、本発明の方法によって入手された膵前駆細胞と、他の方法によって入手された膵前駆細胞との13日目のPdx発現レベルの比較を示す。

【図31】AP膵臓細胞およびAA膵臓細胞における膵臓マーカー遺伝子の発現レベルを比較するために実施された実験の結果を示す。

20

【図32】AP膵臓細胞およびAA膵臓細胞における内胚葉マーカー遺伝子の発現を比較するために実施された実験の結果を示す。

【図33】AP肝細胞およびAA肝細胞によるAFPの分泌を比較するために実施された実験の結果を示す。

【図34】AP肝細胞およびAA肝細胞によるアルブミンの分泌を比較するために実施された実験の結果を示す。

【図35】AP肝細胞およびAA肝細胞によるA1ATの分泌を比較するために実施された実験の結果を示す。

【図36】AP肝細胞およびAA肝細胞における内胚葉マーカー遺伝子の発現を比較するために実施された実験の結果を示す。

30

【図37】AP肝細胞およびAA肝細胞における肝臓マーカー遺伝子の発現レベルを比較するために実施された実験の結果を示す。

【図38】AP肝細胞およびAA肝細胞におけるCYP活性を比較するために実施された実験の結果を示す。

【図39】AP肝細胞およびAA肝細胞においてCYP活性が誘導され得るかどうかを判定するために実施された実験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0067】

発明の詳細な説明

40

本発明は、とりわけ、内胚葉細胞、膵前駆細胞、肝実質細胞、内胚葉細胞に由来するその他の分化細胞（例えば、腸前駆細胞、腸細胞、肺前駆細胞、肺細胞等）への出発細胞集団（例えば、幹細胞）の効率的な変換の方法、これらの細胞の集団および中間細胞集団、これらの細胞を含む組成物、ならびに本明細書に記載される様々な細胞集団および/または成分を含む組成物、ならびにそれらの使用を提供する。さらに、本発明は、内胚葉細胞の単離された集団、膵前駆細胞の単離された集団、肝実質細胞前駆細胞の単離された集団、肝実質細胞の単離された集団、内胚葉に由来する複能性細胞の単離された集団、およびそれらの使用法を提供する。本明細書に記載された方法は、出発細胞集団を、内胚葉細胞、膵臓細胞、および/または肝実質細胞の高度に均質な集団へ、高い効率で変換することができる。膵臓細胞には、膵前駆細胞、ならびに、例えば、膵管細胞および膵外分泌細胞

50



を含むさらに分化した細胞が含まれるが、これらに限定されないことが理解される。肝実質細胞には、肝実質細胞前駆細胞、および、例えば、肝細胞を含むさらに分化した細胞が含まれるが、これらに限定されないことも理解される。

#### 【 0 0 6 8 】

本発明の内胚葉細胞の集団は、集団内の細胞の有意な割合が、SOX17、FoxA2、およびCXCR4のような内胚葉マーカーを発現するという点で、他の内胚葉細胞の集団と区別される。従って、内胚葉細胞の高度に均質な集団が作製され得る。さらに、本発明の方法によって作製された内胚葉細胞の集団は、他の方法によって作製された内胚葉細胞の集団より表現型的に安定しており増殖性である。さらに、本明細書に記載された内胚葉細胞の集団は、付加的な増殖因子の非存在下で、高い効率で、肝実質細胞へ分化することが観察される

10

。本発明の肝実質細胞は、肝実質細胞の有意な割合が、肝実質細胞の成熟を示す減少した胎児タンパク質（AFP）を有するという点で、他の肝実質細胞の集団と区別される。さらに、本明細書に記載された内胚葉細胞の集団は、膵前駆細胞または内胚葉細胞に由来するその他の分化細胞（例えば、腸前駆細胞、腸細胞、肺前駆細胞、肺細胞等）へ分化することが観察される。本発明の膵前駆細胞は、膵前駆細胞の有意な割合が、膵臓マーカー遺伝子の増加した発現を示すという点で、他の膵前駆細胞の集団と区別される。さらに、本発明の膵前駆細胞は、インスリンおよびグルカゴンを発現する三次元細胞クラスタを形成することができるという点で、他の集団と形態学的に区別される。

#### 【 0 0 6 9 】

本明細書に記載された細胞の集団の言及は単離された集団を企図しかつ含むことが理解される。

20

#### 【 0 0 7 0 】

##### 一般的な方法

本発明の実施は、他に示されない限り、当技術分野の技術の範囲内にある、幹細胞生物学、細胞培養、（組換え技術を含む）分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の従来技術を用い得る。そのような技術は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook et al., 2001) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (P. Herdewijn, ed., 2004); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991) Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999), Embryonic Stem Cells: A Practical Approach (Notaranni et al. eds., Oxford University Press 2006); Essentials of Stem Cell Biology (R. Lanza, ed., Elsevier Academic Press 2006); Stem Cell Assays (Methods in Molecular Biology) (Mohan C. Vemuri, Ed., Humana Press; first edition (August 10, 2007); Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, Bruce A. Bunnell, Eds., first edition (March 7, 2008); Handbook of Stem Cells (Robert Lanza, et al., Eds., Academic Press (September 14, 2004); Stem Cell Culture Vol 86: Methods in Cell Biology (Jennie P. Mather, Ed., Academic Press, first edition (May 15, 2008); Practical Hematopoietic Stem Cell Transplantation (Andrew J. Cant, et al. Eds., Wiley-Blackwell, first edition (January 22, 2007); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Kevin D. Bunting, Ed., Humana Press, 2nd edition (January 31, 2008); Bone Marrow and Stem Cell Transplantation (Methods in Molecular Medicine) (Meral Beksac, Ed., Humana Press; first edition (May 3, 2007); Stem Cell Therapy and Tissue Engineering for Cardiovascular Repair: From Basic Research to Clinical Applications (Nabil Dib, et al., Eds., Springer, first edition (November 16, 2005); Blood And Marrow Stem Cell Transplantation: Principles, Practice, And Nursing Insights (Kim Schmit-Pokorny (Author) and Susan Ezzone (Editor), Jones & Ba

30

40

50

rtlett Publishers;third edition(May 22,2006)) ; Hematopoietic Stem Cell Protocols (Christopher A.Klug and Craig T.Jordan,Eds.,Humana Press;first edition(December 15,2001)) ; およびClinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation(Kerry Atkinson,et al.,Eds.,Cambridge University Press;third edition(December 8,2003)) などの文献に十分に説明されている。

【 0 0 7 1 】

他に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語は全て、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じの意味を有する。

【 0 0 7 2 】

定義

10

本明細書において使用される場合、「PI3K の選択的阻害物質」という用語は、p110 触媒サブユニットを有するクラスI PI3K (PI3キナーゼ) の活性を、少なくとも1種または複数種の他のクラスI PI3Kアイソフォーム、例えば、p110 、p110 、またはp110 触媒サブユニットを有するPI3Kより選択的に減少させる(即ち、より多く活性を減少させる) 任意の分子または化合物をさす。

【 0 0 7 3 】

本明細書において使用される場合、「PI3K の選択的阻害物質」という用語は、p110 触媒サブユニットを有するクラスI PI3K (PI3キナーゼ) の活性を、少なくとも1種または複数種の他のクラスI PI3Kアイソフォーム、例えば、p110 、p110 、またはp110 触媒サブユニットを有するPI3Kより選択的に減少させる(即ち、より多く活性を減少させる) 任意の分子または化合物をさす。

20

【 0 0 7 4 】

本明細書において使用される場合、mTOR阻害物質とは、mTORを含むタンパク質複合体の活性を減少させる任意の分子または化合物をさす。いくつかの態様において、mTOR阻害物質は、選択的mTOR阻害物質である、即ち、mTORの上流のPI3Kシグナリング経路の成分にも影響しないし、mTORの下流の基質にも影響しない。

【 0 0 7 5 】

本明細書において使用される場合、内胚葉細胞(または肝実質細胞、膵前駆細胞、もしくは腸前駆細胞、腸細胞、肺前駆細胞、肺細胞等を含むが、これらに限定されない内胚葉細胞に由来するその他の分化細胞)の「単離された集団」という用語は、付加的な成分(例えば、細胞片)を実質的に含まない細胞の調製物を提供するために操作された一つまたは複数の内胚葉細胞または肝実質細胞の集団をさす。単離された集団の様々な局面が、本明細書に記載される。

30

【 0 0 7 6 】

本明細書において使用される場合、内胚葉細胞の「均質な集団」という用語は、集団の有意な部分が内胚葉細胞である細胞の集団をさす。均質性の程度を含む、均質性を反映する様々な態様が、本明細書に記載される。

【 0 0 7 7 】

本明細書において使用される場合、肝実質細胞または肝実質細胞の「均質な集団」という用語は、集団の有意な部分が肝実質細胞である細胞の集団をさす。

40

【 0 0 7 8 】

本明細書において使用される場合、膵前駆細胞(および/または膵臓細胞)の「均質な集団」という用語は、集団の有意な部分が膵前駆細胞(および/または膵臓細胞)である細胞の集団をさす。

【 0 0 7 9 】

本明細書において使用される場合、「有効量」とは、本明細書に記載された方法のいずれかの目標(例えば、所望の結果)を達成するのに有効な量をさす。

【 0 0 8 0 】

本明細書において使用される場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という単数形には、他に示されない限り複数の言及が含まれる。

50

## 【0081】

本明細書において、「約」の付く値またはパラメーターの言及は、当技術分野の当業者に容易に公知のそれぞれの値についての通常の誤差範囲をさす。本明細書において、「約」の付く値またはパラメーターの言及は、その値またはパラメーター自体に関する局面を含む（記載する）。例えば、「約X」との説明には、「X」の説明が含まれる。

## 【0082】

本明細書に記載された局面および本発明の局面には、「～を含む」、「～からなる」、および「～から本質的になる」という局面ならびに局面が含まれることが理解される。

## 【0083】

中内胚葉細胞

中内胚葉細胞は、中胚葉系統および内胚葉系統の共通の前駆細胞である。従って、中内胚葉細胞への幹細胞の分化は、内胚葉細胞の効率的な作製における重要な中間工程である。本出願人は、さらに詳細に後述されるように、中内胚葉特異的マーカー遺伝子、内胚葉特異的マーカー遺伝子、および中胚葉特異的マーカー遺伝子の発現レベルによって示されるように、中内胚葉への幹細胞の分化、および内胚葉への中内胚葉の分化において、mTOR阻害が、PI3K 阻害とは別個の役割を果たすことを発見した。中内胚葉分化のためには、mTOR阻害が重要である。さらに詳細に後述されるように、最適な内胚葉細胞集団を入手するためには、mTOR阻害とPI3K 阻害との間の適切な均衡が必要である。

## 【0084】

従って、本発明は、中内胚葉細胞の集団を提供するのみならず、mTORの阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞の集団を接触させる段階、ならびに、中内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する段階によって、該中内胚葉細胞の集団を入手する方法も提供する。これらの方法は、本明細書に記載されたmTOR阻害物質のうちの1種または任意の組み合わせを使用して実施され得ることが理解される。このようにして入手された中内胚葉細胞は、内胚葉細胞の集団、例えば、本明細書に記載された内胚葉細胞の集団へ分化し得ることも理解される。

## 【0085】

方法のいくつかの態様において、有効量のmTOR阻害物質は、以下の値の中間の任意の範囲を含めて、6時間の培養の後に、8時間の培養の後に、10時間の培養の後に、12時間の培養の後に、14時間の培養の後に、16時間の培養の後に、18時間の培養の後に、20時間の培養の後に、22時間の培養の後に、24時間の培養の後に、または24時間超の培養の後に（例えば、26時間、28時間、30時間、32時間、34時間、36時間、38時間、40時間、42時間、44時間、46時間、48時間、50時間、52時間、56時間、58時間、60時間、もしくは60時間超の培養の後に）、細胞における中内胚葉マーカー遺伝子の発現を上方制御する。いくつかの態様において、上方制御される中内胚葉マーカー遺伝子は、DKK1、EOMES、FGF17、FGF8、GATA6、MIXL1、T（ブラキュリ）、WNT3A、GSC、LHX1、TBX6、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、上方制御される中内胚葉マーカー遺伝子は、DKK1、FGF17、MIXL1、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、DKK1、FGF17、MIXL1、またはそれらの任意の組み合わせの発現は、1日の培養の後に上方制御される。いくつかの態様において、mTOR阻害物質はsiRNAである。いくつかの態様において、mTOR siRNAの有効量は、0.2nM、2nM、または20nMである。

## 【0086】

方法のいくつかの態様において、有効量のmTOR阻害物質は、以下の値の中間の任意の範囲を含めて、6時間の培養の後に、8時間の培養の後に、10時間の培養の後に、12時間の培養の後に、14時間の培養の後に、16時間の培養の後に、18時間の培養の後に、20時間の培養の後に、22時間の培養の後に、24時間の培養の後に、または24時間超の培養の後に（例えば、26時間、28時間、30時間、32時間、34時間、36時間、38時間、40時間、42時間、44時間、46時間、48時間、50時間、52時間、56時間、58時間、60時間、もしくは60時間超の培養の後に）、細胞における内胚葉マーカー遺伝子の発現を上方制御する。いくつかの態様において、1日の培養の後に細胞において上方制御される内胚葉マーカー遺伝子は、CDH

10

20

30

40

50

2、CER1、CXCR4、FGF17、FoxA2、GATA4、GATA6、HHEX、HNF1B、KIT、SOX17、TDGF1、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、mTOR阻害物質はsiRNAである。いくつかの態様において、mTOR siRNAの有効量は、0.2nM、2nM、または20nMである。

【0087】

方法のいくつかの態様において、有効量のmTOR阻害物質は、以下の値の中間の任意の範囲を含めて、6時間の培養の後に、8時間の培養の後に、10時間の培養の後に、12時間の培養の後に、14時間の培養の後に、16時間の培養の後に、18時間の培養の後に、20時間の培養の後に、22時間の培養の後に、24時間の培養の後に、または24時間超の培養の後に（例えば、26時間、28時間、30時間、32時間、34時間、36時間、38時間、40時間、42時間、44時間、46時間、48時間、50時間、52時間、56時間、58時間、60時間、もしくは60時間超の培養の後に）、細胞における中胚葉マーカー遺伝子の発現を下方制御する。いくつかの態様において、2日の培養の後に細胞において下方制御される中胚葉マーカー遺伝子は、PDGFRα、BMP4、GATA4、HAND1、ISL1、NCAM1、NKX2-5、TBX6、T（ブラキユリ）、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、mTOR阻害物質はsiRNAである。いくつかの態様において、mTOR siRNAの有効量は、0.2nM、2nM、または20nMである。

【0088】

上述のように、本出願人らは、mTOR阻害およびPI3K阻害が中内胚葉形成のために相乗作用を示すことも見出した。従って、中内胚葉細胞の集団は、中内胚葉細胞の集団を生成するため、ある期間、mTORおよび/またはPI3Kの1種または複数種の阻害物質と、出発細胞起源（例えば、成体幹細胞、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞）を接触させることによって入手され得る。本明細書に記載された中内胚葉細胞の集団は、本明細書に記載されたmTOR阻害物質および/またはPI3K阻害物質の任意の組み合わせを使用することによって入手され得ることが理解される。あるいは、二重mTOR/PI3K阻害物質、例えば、本明細書に記載された二重mTOR/PI3K阻害物質（例えば、NVPBKM120、GDC0941-PC）を、本発明の中内胚葉細胞の集団を入手するために使用することができる。このようにして入手された中内胚葉細胞は、内胚葉細胞の集団、例えば、本明細書に記載された内胚葉細胞の集団へ分化し得ることも理解される。

【0089】

方法のいくつかの態様において、有効量のmTOR阻害物質および/または有効量のPI3K阻害物質は、以下の値の中間の任意の範囲を含めて、6時間の培養の後に、8時間の培養の後に、10時間の培養の後に、12時間の培養の後に、14時間の培養の後に、16時間の培養の後に、18時間の培養の後に、20時間の培養の後に、22時間の培養の後に、24時間培養後に、または24時間超の培養の後に（例えば、26時間、28時間、30時間、32時間、34時間、36時間、38時間、40時間、42時間、44時間、46時間、48時間、50時間、52時間、56時間、58時間、60時間、もしくは60時間超の培養の後に）、細胞における中内胚葉マーカー遺伝子の発現を上方制御する。いくつかの態様において、上方制御される中内胚葉マーカー遺伝子は、DKK1、EOMES、FGF17、FGF8、GATA6、MIXL1、T（ブラキユリ）、WNT3A、GSC、LHX1、TBX6、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、上方制御される中内胚葉マーカー遺伝子は、LHX1、GATA6、EOMES、GSC、およびTBX6、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、LHX1、GATA6、EOMES、GSC、およびTBX6、またはそれらの任意の組み合わせの発現は、1日の培養の後に上方制御される。いくつかの態様において、mTOR阻害物質はsiRNAである。いくつかの態様において、mTOR siRNAの有効量は、0.2nM、2nM、または20nMである。いくつかの態様において、PI3K阻害物質はsiRNAである。いくつかの態様において、PI3K siRNAの有効量は、0.2nM、2nM、または20nMである。いくつかの態様において、mTOR siRNAの有効量は、20nMであり、PI3K siRNAの有効量は、2nMである。

【0090】

方法のいくつかの態様において、有効量のmTOR阻害物質および/または有効量のPI3K阻害物質は、以下の値の中間の任意の範囲を含めて、6時間の培養の後に、8時間の培養の

後に、10時間の培養の後に、12時間の培養の後に、14時間の培養の後に、16時間の培養の後に、18時間の培養の後に、20時間の培養の後に、22時間の培養の後に、24時間の培養の後に、または24時間超の培養の後に（例えば、26時間、28時間、30時間、32時間、34時間、36時間、38時間、40時間、42時間、44時間、46時間、48時間、50時間、52時間、56時間、58時間、60時間、もしくは60時間超の培養の後に）、細胞における内胚葉マーカー遺伝子の発現を上方制御する。いくつかの態様において、上方制御される内胚葉マーカー遺伝子は、CDH2、CER1、CXCR4、FGF17、FoxA2、GATA4、GATA6、HHEX、HNF1B、KIT、SOX17、TGF1、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、上方制御される内胚葉マーカーは、CER1、HhexおよびFGF17、ならびにCXCR4である。いくつかの態様において、CER1、HhexおよびFGF17、ならびにCXCR4、またはそれらの任意の組み合わせの発現は、2日の培養の後に上方制御される。いくつかの態様において、mTOR阻害物質はsiRNAである。いくつかの態様において、mTOR siRNAの有効量は、0.2nM、2nM、または20nMである。いくつかの態様において、PI3K 阻害物質はsiRNAである。いくつかの態様において、PI3K siRNAの有効量は、0.2nM、2nM、または20nMである。いくつかの態様において、mTOR siRNAの有効量は20nMであり、PI3K siRNAの有効量は2nMである。

10

#### 【0091】

方法のいくつかの態様において、有効量のmTOR阻害物質および/または有効量のPI3K 阻害物質は、以下の値の中間の任意の範囲を含めて、6時間の培養の後に、8時間の培養の後に、10時間の培養の後に、12時間の培養の後に、14時間の培養の後に、16時間の培養の後に、18時間の培養の後に、20時間の培養の後に、22時間の培養の後に、24時間の培養の後に、または24時間超の培養の後に（例えば、26時間、28時間、30時間、32時間、34時間、36時間、もしくは36時間超の培養の後に）、細胞における中胚葉マーカー遺伝子の発現を下方制御する。いくつかの態様において、2日の培養の後に細胞において下方制御される中胚葉マーカー遺伝子は、PDGFRa、BMP4、GATA4、HAND1、ISL1、NCAM1、NKX2-5、TBX6、T（ブラキユリ）、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、下方制御される中胚葉マーカー遺伝子は、CER1、HhexおよびFGF17、ならびにCXCR4、またはそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様において、CER1、HhexおよびFGF17、ならびにCXCR4、またはそれらの任意の組み合わせの発現は、2日の培養の後に下方制御される。いくつかの態様において、mTOR阻害物質はsiRNAである。いくつかの態様において、mTOR siRNAの有効量は、0.2nM、2nM、または20nMである。いくつかの態様において、PI3K 阻害物質はsiRNAである。いくつかの態様において、PI3K siRNAの有効量は、0.2nM、2nM、または20nMである。いくつかの態様において、mTOR siRNAの有効量は、20nMであり、PI3K siRNAの有効量は、20nMである。いくつかの態様において、mTOR siRNAの有効量は、20nMであり、PI3K siRNAの有効量は、0.2~2nMである。

20

30

#### 【0092】

本出願人らは、中内胚葉および内胚葉の形成におけるmTORおよびPI3K の阻害の別個の役割を確認した。mTORの阻害およびPI3K の阻害は、各々、中内胚葉マーカー遺伝子、内胚葉マーカー遺伝子、および中胚葉マーカー遺伝子の発現に特異的に寄与し得る。中内胚葉形成のためには、mTOR阻害が重要である。この段階で、高度のPI3K 阻害の寄与は、mTOR阻害の効果の増強を支援する。高度のPI3K 阻害は、LHX1のような、mTOR阻害によって比較的影

40

#### 【0093】

##### 内胚葉細胞

中内胚葉細胞への幹細胞の分化、および内胚葉細胞へのさらなる分化は、研究および再生医学において使用するための、有用な量の細胞、例えば、肝実質細胞、膵前駆細胞、膵臓細胞、または腸前駆細胞、腸細胞、肺前駆細胞、肺細胞等のような内胚葉細胞に由来するその他の分化細胞の効率的な作製における重要な工程である。しかしながら、分化中の

50

幹細胞培養物において発生し得る細胞型の大きな多様性のため、細胞型の大部分が極めて低い効率で作製される。さらに、インピトロの幹細胞分化は極めて非同期性である。そのため、ある細胞の群が原腸陥入に関連した遺伝子を発現している一方で、別の群が最終分化を始めているという可能性がある。混合型の非同期性の幹細胞分化の上述の問題に対処するための有効な手段として、本発明者らは、独特の特性を有する内胚葉細胞の集団を生成するための新規の方法を発見した。さらに詳細に後述されるように、本明細書に記載された方法および/またはプロトコールは、細胞の集団の有意な部分が内胚葉細胞であるような内胚葉細胞の集団を効率的に作製するために使用され得る。これらの内胚葉細胞の集団は、急速に、肝実質細胞、膵前駆細胞、膵臓細胞、または腸前駆細胞、腸細胞、肺前駆細胞、肺細胞等のような内胚葉細胞に由来するその他の分化細胞の均質な集団が生成されるよう、例えば、肝実質細胞、膵前駆細胞、膵臓細胞、または腸前駆細胞、腸細胞、肺前駆細胞、肺細胞等のような内胚葉細胞に由来するその他の分化細胞へ効率的に変換され得る。

10

#### 【0094】

内胚葉細胞の集団は、内胚葉細胞の集団を生成するため、数日（例えば、1～5日）の期間、1種または複数種のPI3K の選択的阻害物質およびアクチビンAと共に出発細胞起源を培養することによって作製され得る。内胚葉細胞の集団は、内胚葉細胞の集団を生成するため、数日（例えば、1～5日）の期間、1種または複数種のPI3K の選択的阻害物質およびアクチビンAと共に出発細胞起源を培養することによっても作製され得る。あるいは、1種または複数種のPI3K および/またはPI3K の選択的阻害物質を、アクチビンAと組み

20

#### 【0095】

本発明の方法は、胚性幹細胞（例えば、ヒト胚性幹細胞）、成体幹細胞、および誘導多能性幹細胞を含む、様々な型の幹細胞を使用して実施され得る。本発明の方法は、任意の公知の幹細胞株で実施され得る。幹細胞とは、単細胞レベルで、自己再生し、かつ分化して、自己再生性前駆細胞、非再生性前駆細胞、および高分化細胞を含む、子孫細胞を作製する能力によって定義される未分化細胞である。そのような幹細胞の起源には、胚または胎児の一次組織、臍帯組織、胎盤組織、体細胞、骨髄、血液、およびその他の細胞型が含まれる。胚性幹細胞、成体幹細胞、および/または誘導多能性幹細胞の起源、調製、および培養に関するさらなる詳細は、例えば、USP 7,326,572 ; USP 8,057,789 ; USP 7,259,011 ; USP 7,015,037 ; USP 7,659,118 ; USP 8,058,065 ; USP 8,048,675、および米国特許出願公開番号US2007/0281355に記載されており、これらの内容は、参照によってその全体が明示的に本明細書に組み入れられる。全ての場合に、本明細書に記載された方法および組成物のための幹細胞を入手する過程において、ヒト胚は破壊されない。多数の幹細胞は、ヒト胚の先の破壊によって入手されない。

30

#### 【0096】

本明細書に記載された内胚葉細胞の集団を作製するいくつかの方法において、幹細胞は支持細胞層上で維持される。そのような方法において、幹細胞が多能性状態に維持されることを可能にする任意の支持細胞層が使用され得る。ヒト胚性幹細胞の培養のための一般的に使用されている支持細胞層は、マウス繊維芽細胞の層である。さらに最近、幹細胞の培養において使用するためのヒト繊維芽細胞支持細胞層が開発された（米国特許出願公開番号US 2002/0072117および同US 2010/0028307を参照のこと。これらの開示は参照によってその全体が本明細書に組み入れられる）。内胚葉細胞の集団を作製するための本発明の代替的な方法は、支持細胞層を使用しない、多能性幹細胞、例えば、ヒト胚性幹細胞の維持を可能にする。支持細胞なしの条件の下で幹細胞を維持する方法は、米国特許出願公開番号US 2003/0175956に記載されており、この開示は参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

40

#### 【0097】

方法のある種の態様において、幹細胞は、最適化MATRIGEL（登録商標）（Becton Dickinson）の層上で維持される。MATRIGEL（登録商標）は、室温でゲル化して、再構成された

50

基底膜を形成する、エンゲルブレスホルムスワム (Engelbreth-Holm-Swarm) 腫瘍細胞由来の可溶性調製物である。本発明の方法は、ゼラチン (Sigma) 上でも実施され得る。本明細書に記載された方法において使用するのに適した付加的な培養基質は、米国特許出願公開番号US 2010/0028307に詳述されている。方法のある種の態様において、幹細胞はコラーゲンの層上で維持される。

#### 【0098】

本明細書中の方法において使用される幹細胞は、血清を含む培養物または血清を含まない培養物のいずれかにおいて維持され得る。いくつかの胚性幹細胞維持手法において、血清交換が使用される。他の手法において、米国特許出願公開番号2003/0190748に記載されたものなどの無血清培養技術が使用され、この開示は参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

10

#### 【0099】

本明細書に記載された方法のある種の態様において、本明細書に記載された内胚葉細胞の単離された集団は、懸濁液中で培養された幹細胞から入手される。このような幹細胞の培養法は、当技術分野において公知であり、例えば、Amit et al.(2011)Nature Protocols 6:572-579; Zweigerdt et al.(2011)Nature Protocols 6:689-700; Singh et al.(2010)Stem Cell Res 4:165-170; Kehoe et al.(2010)Tissue Eng Part A.16:405-21; およびOmer et al.(2011)Stem Cell Research 5:51-64に記載されている。幹細胞を懸濁液中で培養する付加的な方法は、USP 8,008,075; USP 7,790,456; およびUSP 5,491,090に記載されており、各々の内容は参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。幹細胞を懸濁液中で培養する別の方法は、下記実施例1に記載される。

20

#### 【0100】

本発明は、内胚葉細胞の集団を入手する方法を記載するため、上記および本明細書中の他の場所に記載される全ての任意のパラメーターの任意の組み合わせを企図する。

#### 【0101】

##### 内胚葉細胞を作製する方法

内胚葉細胞は、幹細胞 (例えば、成体幹細胞、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞) のような出発細胞起源を、以下の選択肢のいずれかと接触させた場合に入手され得る。(1) PI3K の選択的阻害物質およびアクチビンA; (2) PI3K の選択的阻害物質およびアクチビンA、ならびに(3) PI3K および/またはPI3K の1種または複数種の選択的阻害物質ならびにアクチビンA。さらに詳細に後述されるように、内胚葉細胞の集団を作製するため、様々な型の化合物またはクラスの化合物を、アクチビンAと共に使用することができる。さらに、内胚葉細胞の効率的な作製のため、mTORの阻害物質を、PI3K および/またはPI3K の選択的阻害物質ならびにアクチビンAと共に使用することができる。

30

#### 【0102】

内胚葉は、幹細胞 (例えば、成体幹細胞、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞) のような出発細胞起源を、mTOR阻害物質と接触させた場合にも入手され得る。

#### 【0103】

##### mTORキナーゼ阻害物質

mTORキナーゼ阻害物質は、中内胚葉細胞、内胚葉細胞、および内胚葉細胞から得られた分化細胞 (例えば、腸前駆細胞、腸細胞、肺前駆細胞、肺細胞、肝実質細胞、膵臓細胞等) を作製するため、単独で、または他の化合物 (例えば、PI3K 阻害物質) と組み合わせで使用され得る。ある種の態様において、内胚葉細胞は、(アクチビンAのような) TGFファミリーのメンバーの有効量、ならびにmTORキナーゼの阻害物質またはPI3KおよびmTORキナーゼの両方の選択的二重阻害物質の有効量、ならびにある種の態様ではPI3K 選択的阻害物質およびmTORキナーゼ阻害物質の二重阻害物質の有効量と、幹細胞の集団を接触させることによって作製され得る。mTORは、ホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K) 脂質キナーゼの触媒ドメインとの有意な配列相同性を有するカルボキシル末端キナーゼドメインを含有しているため、ホスホイノシチド-3-キナーゼ様キナーゼ (PIKK) ファミリーのメンバーと見なされる、289kDaセリン/トレオニンキナーゼである。C末端の触媒ドメインに

40

50

加えて、mTORキナーゼは、C末端付近の推定リプレッサードメインであるFKBP12-ラパマイシン結合 (FRB) ドメイン、N末端の20個までのHEATモチーフのタンデムリピート、ならびにFRAP-ATM-TRRAP (FAT) およびFAT C末端ドメインも含有している。Huang and Houghton, Current Opinion in Pharmacology, 2003, 3, 371-377を参照のこと。文献中、mTORキナーゼは、FRAP (FKBP12 and rapamycin associated protein)、RAFT1 (rapamycin and FKBP 12 target 1)、RAPT1 (rapamycin target 1) とも呼ばれている。

#### 【 0 1 0 4 】

mTORキナーゼは、PI3K-Akt経路を通して増殖因子によって、または栄養素の欠乏もしくは低酸素のような細胞ストレスによって活性化され得る。mTORキナーゼの活性化は、翻訳、転写、mRNAターンオーバー、タンパク質安定性、アクチン細胞骨格再編成、およびオートファジーを含む、広範囲の細胞機能を介して、細胞増殖および細胞生存の調節において中心的な役割を果たすと考えられている。mTOR細胞シグナリング生物学の詳細な総説、およびmTORシグナリング相互作用のモジュレーションの可能性のある治療効果については、Sabatini, D.M. and Guertin, D.A. (2005) An Expanding Role for mTOR in Cancer TRENDS in Molecular Medicine, 11, 353-361; Chiang, G.C. and Abraham, R.T. (2007) Targeting the mTOR signaling network in cancer TRENDS 13, 433-442; Jacinto and Hall (2005) Tor signaling in bugs, brain and brawn Nature Reviews Molecular and Cell Biology, 4, 117-126; およびSabatini, D.M. and Guertin, D.A. (2007) Defining the Role of mTOR in Cancer Cell, 12, 9-22を参照のこと。

#### 【 0 1 0 5 】

例えば、mTORキナーゼの上流にあるPI3K-AKTシグナリング経路は、癌細胞において高頻度に過剰活性化されており、その後、mTORキナーゼのような下流標的の過剰活性化をもたらすことを示す証拠が存在する。より具体的には、種々のヒト腫瘍において変異しているPI3K-AKT経路の成分には、増殖因子受容体の活性化変異ならびにPI3KおよびAKTの増幅および過剰発現が含まれる。さらに、膠芽腫、肝細胞癌、肺癌、黒色腫、子宮内膜癌、および前立腺癌を含む多くの腫瘍型が、やはりmTORキナーゼの過剰活性シグナリングをもたらす、第10染色体で欠失しているホスファターゼ・テンシン類似体 (PTEN) および結節性硬化症複合体 (TSC1/TSC2) のようなPI3K-AKT経路の負の調節因子の機能喪失型の変異を含有することを示す証拠が存在する。上記のことは、mTORキナーゼの阻害物質が、少なくとも一部分、mTORキナーゼシグナリングの過剰活性によって引き起こされた疾患の処置のための効果的な治療薬であり得ることを示唆する。

#### 【 0 1 0 6 】

mTORキナーゼは、2種の物理的にも機能的にも別個のシグナリング複合体 (即ち、mTORC1およびmTORC2) として存在する。低分子阻害物質ラパマイシンに結合し、それによって阻害されるため、「mTOR-Raptor複合体」または「ラパマイシン感受性複合体」としても公知のmTORC1。mTORC1は、タンパク質mTOR、Raptor、およびmLST8の存在によって定義される。ラパマイシン自体は、マクロライドであり、mTORキナーゼの最初の低分子阻害物質として発見された。生物学的に活性であるために、ラパマイシンは、mTOR、および集合的にイムノフィリンと呼ばれるサイトゾル結合タンパク質であるFKBP12と共に、三元複合体を形成する。ラパマイシンは、mTORおよびFKBP12の二量化を誘導するよう作用する。ラパマイシン-FKBP12複合体の形成は、複合体がmTORに直接結合し、mTORの機能を阻害するため、機能獲得をもたらす。

#### 【 0 1 0 7 】

第二のより最近発見されたmTORC複合体、mTORC2は、タンパク質mTOR、Rictor、Protor-1、mLST8、およびmSIN1の存在を特徴とする。mTORC2は、ラパマイシンに結合しないため、「mTOR-Rictor複合体」または「ラパマイシン非感受性」複合体とも呼ばれる。

#### 【 0 1 0 8 】

いずれのmTOR複合体も、細胞の成長および増殖および生存に影響する細胞内シグナリング経路において重要な役割を果たす。例えば、mTORC1の下流標的タンパク質には、細胞におけるタンパク質翻訳の重要な調節因子である、リボソームS6キナーゼ (例えば、S6K1、

10

20

30

40

50



S6K2) および真核生物開始因子4E結合タンパク質(4E-BP1)が含まれる。また、mTORC2は、AKT(S473)のリン酸化を担っており;研究は、AKTの過剰活性化によって制御されない細胞増殖が、数種の癌型の最大の特徴であることを示した。

【0109】

いくつかの態様において、アクチビンAの有効量の存在下で培養された幹細胞におけるmTORの活性の阻害は、内胚葉分化を増強する。従って、本発明は、mTORの阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞の集団を接触させる段階、ならびに、内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する段階によって、該内胚葉細胞の集団を入手する方法を提供する。いくつかの態様において、Akt阻害物質、即ち、PI3Kシグナリング経路のmTORの上流の成分の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞を接

10

【0110】

mTORの阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞を接触させることによって入手された内胚葉細胞の集団は、例えば、細胞の少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、または40%超、例えば、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、もしくは75%超がFoxA2を発現する集団であり得る。ある種の局面において、mTORの阻害物質およびアクチビンAと幹細胞を接触させることによって入手された内胚葉細胞の集団は、例えば、細胞の少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、または40%超、例えば、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、もしくは75%超、例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、もしくは90%超がFoxA2を発現する集団であり得る。mTORの阻害物質と幹細胞を接触させる工程を含む方法によって入手された内胚葉細胞の集団は、例えば、細胞の少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、または40%超、例えば、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、もしくは75%超がCXCR4を発現する集団であり得る。いくつかの態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、内胚葉形成に適した培地(例えば、実施例参照)における少なくとも約1日、2日、または3日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、少なくとも約4日または5日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、5日超の培養の後に入手される。

20

30

【0111】

方法によって入手された内胚葉細胞の集団は、例えば、細胞の少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、または40%超、例えば、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、もしくは75%超がSOX17およびFoxA2を発現する集団であり得る。例えば、方法は、細胞の少なくとも約40%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも61%がSOX17を発現する幹細胞の集団を入手するために使用され得る。ある種の局面において、有効量のmTOR阻害物質および有効量のアクチビンAと幹細胞を接触させることによって作製された内胚葉細胞の集団において、例えば、細胞の少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、または約75%超が、SOX17およびCXCR4を発現する。mTOR阻害物質と幹細胞の集団を接触させることによって入手された内胚葉細胞の集団は、例えば、細胞の少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、または40%超、例えば、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、もしくは75%超がCXCR4およびFoxA2を発現する集団であり得る。mTORの阻害物質と幹細胞の集団を接触させる工程を含む本発明の方法は、例えば、細胞の少なくとも約30%、少なくとも約35

40

50

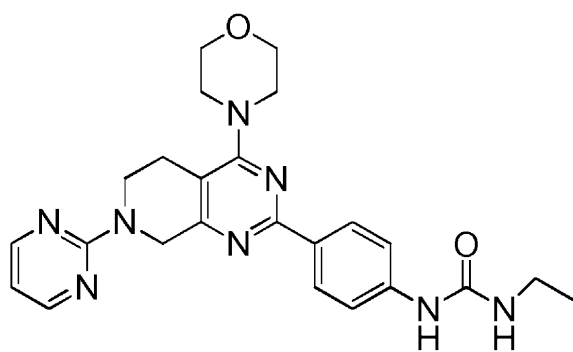
%、少なくとも約40%、または40%超、例えば、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、もしくは75%超がSOX17、FoxA2、およびCXCR4を発現する細胞の集団を作製するために使用され得る。いくつかの態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、内胚葉形成に適した培地（例えば、実施例参照）における少なくとも約1日、2日、または3日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、少なくとも約4日または5日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、5日超の培養の後に入手される。

【0112】

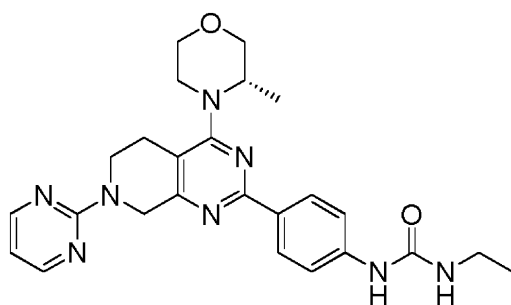
mTOR阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と幹細胞を接触させる工程を含む本発明の方法は、mTOR遺伝子から転写されたmRNAを特異的に不活化するsiRNAと幹細胞を接触させる工程を包含する。これらの態様において、方法は、少なくとも5nM、少なくとも6nM、少なくとも7nM、少なくとも8nM、少なくとも9nM、少なくとも10nM、または10nM超のsiRNAと幹細胞を接触させる工程を包含する。

【0113】

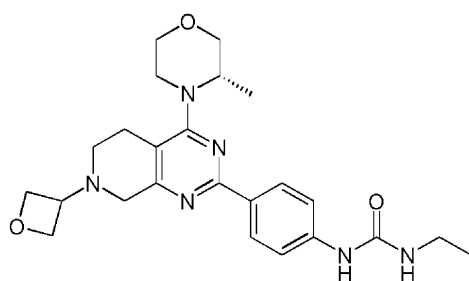
方法とともに使用されるmTOR阻害物質は低分子であり得る。例えば、以下に図示またはリストされる低分子のいずれかまたは組み合わせを方法において使用することができる：



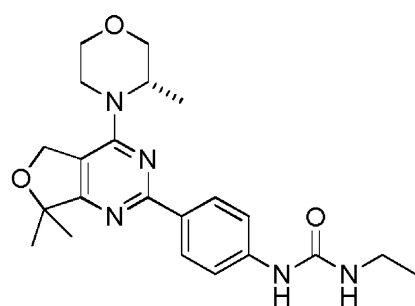
10



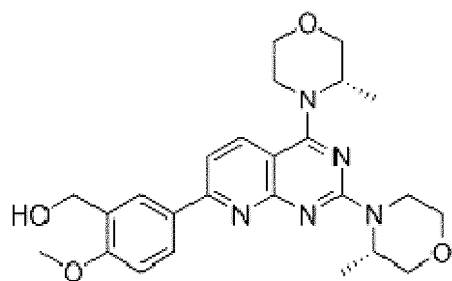
20



30

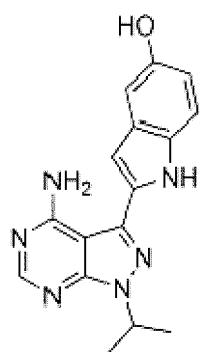


40



AZD-8055,

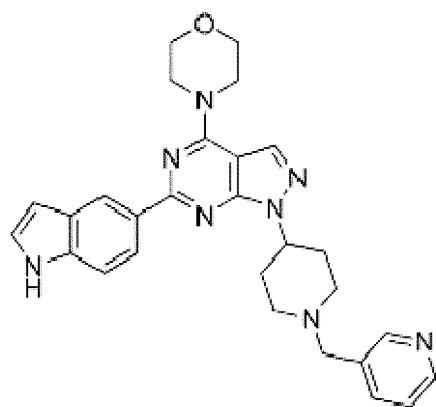
10



20

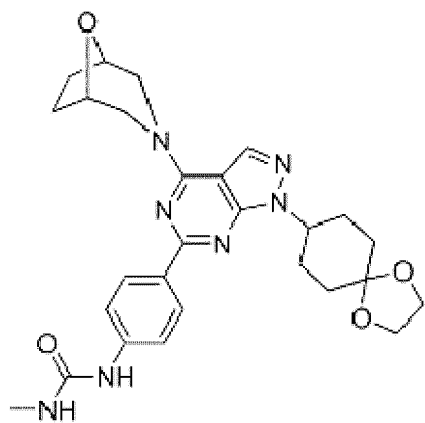
PP242,

30



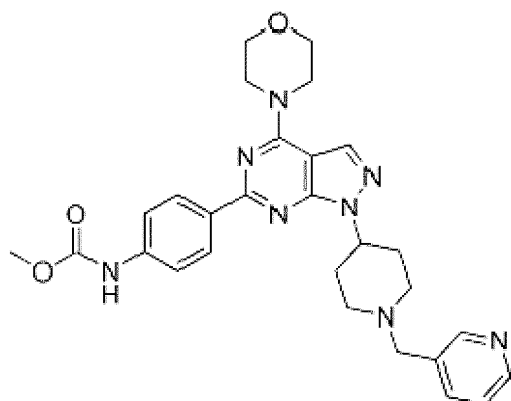
40

WAY-600,



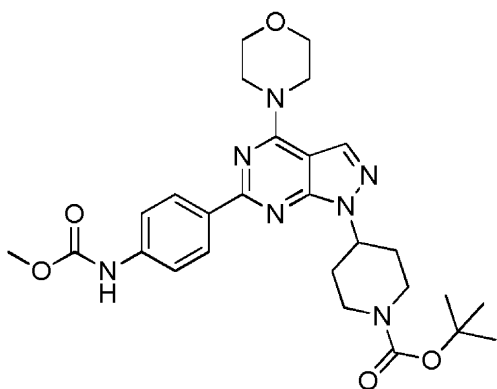
10

WYE-125132,



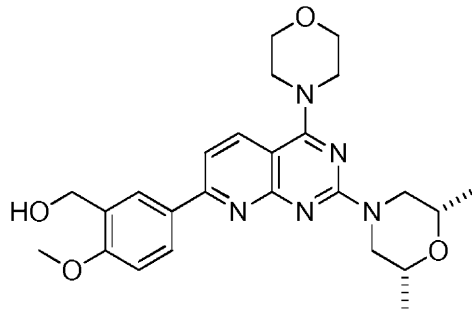
20

WYE-687,



40

WYE-354,



KU-0063794

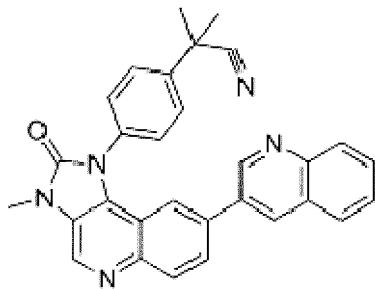
10

、MerckのAP23573（リダフォロリムスまたはデフォロリムスとしても公知）、Pfizerのトーリセル（テムシロリムスまたはCI-779としても公知）、IntellikineのINK128、AstraZenecaのAZD2012、CelgeneのCC-223、KU-0063794、OSIのOSI-027、シロリムス（ラパマイシン）、およびエベロリムス。トリン（Torin）1も使用することができる。

## 【 0 1 1 4 】

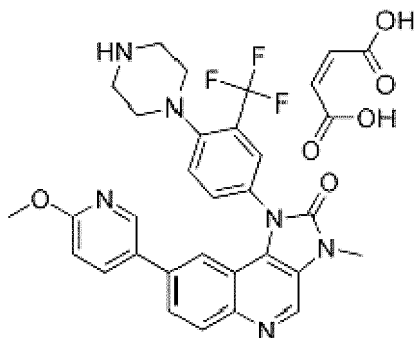
方法において使用されるPI3KおよびmTORの二重阻害物質、ある種の態様において、PI3KおよびmTORの二重阻害物質は、低分子であり得る。例えば、以下に図示またはリストされる低分子のいずれかまたは組み合わせを方法において使用することができる：

20



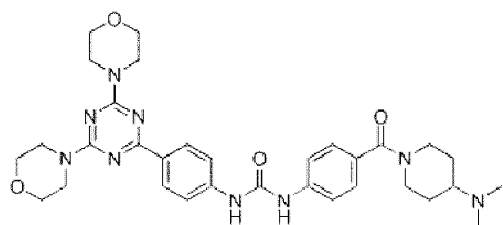
NVP-BEZ235,

30



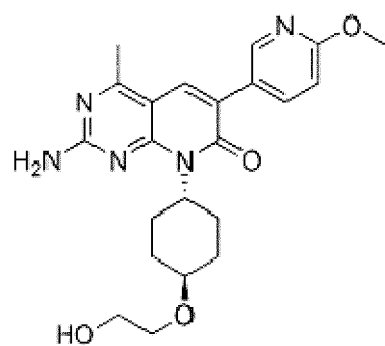
NVP-BGT226,

40



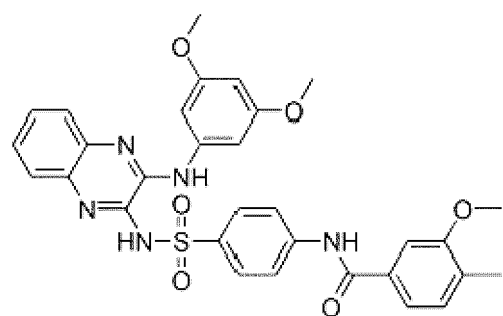
PKI-587,

10



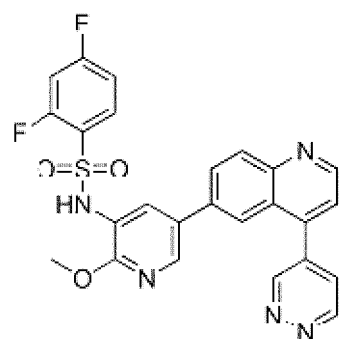
PF-04691502,

20



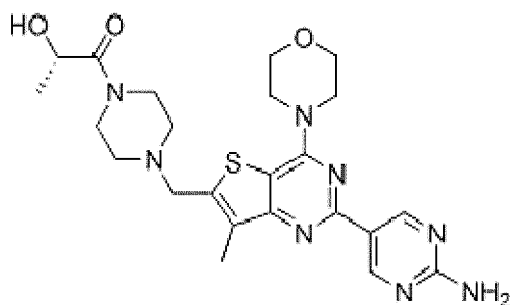
30

XL765,



40

GSK2126458,



GDC-0980

10

。

## 【 0 1 1 5 】

mTOR阻害物質の有効量と幹細胞の集団を接触させる工程を含む本発明の方法は、mTOR阻害物質またはPI3K（例えば、PI3K 阻害物質）およびmTORキナーゼの二重阻害物質の有効量と幹細胞を接触させる工程を包含する。ある種の態様において、mTOR阻害物質は、ラパマイシンまたはラパマイシン類似体（例えば、エベロリムス、テムシロリムス）、KU0063794、またはWYE-354である。これらのmTOR阻害物質のいずれかまたは組み合わせの有効量は、例えば、約1nM～約1 $\mu$ M、約10nM～約950nM、約25nM～約900nM、約50nM～約800nM、またはおよそ750nMであり得る。

20

## 【 0 1 1 6 】

PI3K およびmTORの二重阻害物質の有効量は、例えば、約1nM～約1 $\mu$ M、約10nM～約950nM、約25nM～約900nM、約50nM～約800nM、またはおよそ750nMであり得る。

## 【 0 1 1 7 】

有益には、アクチビンAおよびmTORの阻害物質と幹細胞と接触させる工程を含む方法によって入手された内胚葉細胞の集団は、肝実質細胞、膵臓細胞、および腸細胞へ分化する能力を有する。内胚葉細胞は、肺上皮細胞および気道前駆細胞のような肺細胞へ分化する能力も有する。

## 【 0 1 1 8 】

mTOR阻害物質と幹細胞の集団を接触させる工程を含む方法は、US 2010/0069357、US 2010/0331305、US 2011/0086840、US 2011/0086841、US 7,902,189B2、US 77/50003B2、US 2009/0270390A1、US 2009/0233926A1、US 2009/0018134A1、WO 2008/032077A1、WO 2008/032089A1、WO 2008/032091A1、WO 2008/032086A1、WO 2008/032072A1、WO 2008/032027A1、US 2010/0022534A1、WO 2008/032033A1、WO 2008/032036A1、WO 2008/032041A1、WO 2008/032060A1、WO 2006/051270A1、USP 5536729、USP 5665772、US 81/01602B2、US 75/04397B2、US 80/39469B2、US 81/29371B2、US 81/29371B2、US 2010/0068204A1、US 2010/061982A1、US 2010/0041692A1、US 2010/0015141A1、US 2010/0003250A1、US 2009/0311217A1、US 2009/0298820A1、US 2009/0227575A1、US 2009/0192147A1、US 2009/0192176A1、US 2009/0181963A1、US 2009/0149458A1、US 2009/0149458A1、US 2008/0233127A1、US 2008/0234262A1、US 2010/0069357A1、US 2010/0331305A1、US 2011/0086840A1、US 2011/0086841A1、およびShuttleworth et al.(2011)Current Medicinal Chemistry 18:2686-2714に記載されたmTOR阻害物質のいずれかまたは組み合わせと幹細胞を接触させる工程を包含し、これらの内容は、参照によってその全体が明示的に本明細書に組み入れられる。

30

40

## 【 0 1 1 9 】

本明細書に記載されるように、内胚葉細胞の集団の入手のある種の態様は、mTOR阻害物質の有効量およびPI3K の選択的阻害物質の有効量と幹細胞の集団を接触させることを要する。方法は、本明細書に示されたPI3K 阻害物質のいずれかまたは組み合わせを、本明細書に記載されたmTOR阻害物質のいずれかまたは組み合わせと共に使用する工程を包含することが認識されるであると考えられる。

## 【 0 1 2 0 】

50



### ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ

ホスファチジルイノシトール (PI) は、細胞内シグナル伝達に關与する細胞膜に見出される多数のリン脂質のうちの1種である。3'-リン酸化ホスホイノシチドを介した細胞シグナリングは、多様な細胞過程、例えば、悪性形質転換、増殖因子シグナリング、炎症、および免疫に關連付けられている (Rameh et al.(1999)J.Biol.Chem.274:8347-8350)。これらのリン酸化シグナリング生成物の生成を担っている酵素、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3-キナーゼまたはPI3Kとも呼ばれる) は、ホスファチジルイノシトール (PI) およびそのリン酸化誘導体をイノシトール環の3'-ヒドロキシルにおいてリン酸化するウイルスオンコプロテインおよび増殖因子受容体チロシンキナーゼに關連した活性として最初に同定された (Panayotou et al(1992)Trends Cell Biol 2:358-60)。ホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K) は、イノシトール環の3-ヒドロキシル残基において脂質をリン酸化する脂質キナーゼである (Whitman et al(1988)Nature,332:664)。PI3-キナーゼによって生成された3-リン酸化リン脂質 (PIP3) は、AktおよびPDK1つまりホスホイノシチド依存性キナーゼ1のような (プレクストリン相同 (PH) 領域を含む) 脂質結合ドメインを含むキナーゼを動員するセカンドメッセンジャーとして作用する (Vivanco et al(2002)Nature Rev.Cancer 2:489; Phillips et al(1998)Cancer 83:41)。

#### 【0121】

PI3キナーゼファミリーは、構造的相同性によって細分類される少なくとも15種の異なる酵素を含み、配列相同性および酵素触媒作用によって形成される生成物に基づき三つのクラスへ分けられる。クラスI PI3キナーゼは、2個のサブユニット: 110kd触媒サブユニットおよび85kd調節サブユニットから構成される (Otsu et al(1991)Cell 65:91-104; Hiles et al(1992)Cell 70:419-29)。調節サブユニットは、SH2ドメインを含有しており、チロシンキナーゼ活性を有する増殖因子受容体または癌遺伝子産物によってリン酸化されたチロシン残基に結合し、それによって、その脂質基質をリン酸化するp110触媒サブユニットのPI3K活性を誘導する。クラスI PI3キナーゼは、サイトカイン、インテグリン、増殖因子、および免疫受容体の下流の重要なシグナル伝達イベントに關与しており、このことは、この経路の制御が、細胞増殖および発癌のモジュレーションのような重要な治療効果に至る可能性を示唆している。クラスI PI3Kは、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルイノシトール-4-リン酸、およびホスファチジルイノシトール-4,5-ニリン酸 (PIP2) をリン酸化して、それぞれ、ホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PIP)、ホスファチジルイノシトール-3,4-ニリン酸、およびホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸を生ずることができる。クラスII PI3Kは、PIおよびホスファチジルイノシトール-4-リン酸をリン酸化する。クラスIII PI3Kは、PIのみをリン酸化することができる。癌における重要なPI3-キナーゼアイソフォームは、p110 の反復的な発癌性変異によって示されるように、クラスI PI3-キナーゼ、p110 である (Samuels et al(2004)Science 304:554) (米国特許第5,824,492号; 米国特許第5,846,824号; 米国特許第6,274,327号)。その他のアイソフォームも、癌において重要であり得、心血管疾患および免疫炎症性疾患にも關連付けられている (Workman P(2004)Biochem Soc Trans 32:393-396; Patel et al(2004)Proc.Am.Assoc.of Cancer Res.(Abstract LB-247)95th Annual Meeting,March 27-31,Orlando,Fla.,USA; Ahmadi K and Waterfield M D(2004)"Phosphoinositide 3-Kinase:Function and Mechanisms"Encyclopedia of Biological Chemistry(Lennarz W J,Lane M D eds)Elsevier/Academic Press)。p110 の発癌性変異は、有意な頻度で、結腸、乳房、脳、肝臓、卵巣、胃、肺、および頭頸部の固形腫瘍において見出される。PTEN異常は、膠芽腫、黒色腫、前立腺癌、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、頭頸部癌、肝細胞癌、および甲状腺癌において見出される。

#### 【0122】

各々別個の110kDa触媒サブユニットおよび調節サブユニットからなる4種の別個のクラスI PI3Kが、同定され、PI3K $\alpha$ 、PI3K $\beta$ 、PI3K $\gamma$ 、およびPI3K $\delta$ と名付けられている。触媒サブユニットのうちの3種、即ち、p110 $\alpha$ 、p110 $\beta$ 、およびp110 $\gamma$  は、各々、同一の調節サブユニット、p85と相互作用し; p110 $\delta$  は別個の調節サブユニット、p101と相互作用する。ヒトの

細胞および組織におけるこれらのPI3Kの各々の発現のパターンは、区別される。PI3K、およびサブタイプの各々において、p85サブユニットは、標的タンパク質内の（適切な配列前後関係で存在する）リン酸化チロシン残基とのSH2ドメインの相互作用によって、PI3キナーゼを細胞膜へ局在化するように作用する（Rameh et al(1995)Cell,83:821-30; Volinia et al(1992)Oncogene,7:789-93）。

#### 【0123】

TGFファミリーのメンバーであるアクチビンAは、PI3Kシグナリングが抑制された場合、内胚葉分化を誘導することが、以前に証明された（McLean et al.(2007)Stem Cells 25:29; Ramasamy et al.(2010)Differentiation 80:S25）。例えば、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる「Compositions and Methods For Self-Renewal and Differentiation in Human Embryonic Stem Cells」という名称のUS 2007/0281335も参照のこと。多様なPI3K阻害物質が、幹細胞の集団から内胚葉細胞の集団を分化させるために使用されているが（例えば、Knight(2010)Current Topics in Microbiology and Immunology 247:263-277; McNamara et al.(2011)Future Med Chem 3:549-565を参照のこと）、これらの所見は、（幹細胞のような）細胞起源の出発集団の、内胚葉細胞、肝実質細胞、または瞬前駆細胞への効率的な変換を与えていない。

#### 【0124】

本出願人らは、p110の活性を特異的に阻害することによって、p110、p110、またはp110の活性を阻害するより効率的に、頑強に、内胚葉分化が増強されることを発見した。従って、本発明は、内胚葉細胞の集団、例えば、本明細書に記載された集団の特徴のうちの一つまたは複数を有する内胚葉細胞の集団を入手する方法を提供する。方法は、アクチビンAの有効量およびPI3Kアイソフォームの選択的阻害物質の有効量と幹細胞の集団を接触させる工程、ならびに、内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で幹細胞を培養する工程を含む。一つの態様において、PI3Kの選択的阻害物質は、p110触媒サブユニットを有するクラスI PI3Kを特異的に阻害する。いくつかの態様において、それは、p110、もしくはサブユニットを含むクラスI PI3K；クラスII PI3K；またはクラスIII PI3Kの活性には影響しない。

#### 【0125】

そのような方法において、いくつかの態様において、PI3Kの選択的阻害物質の有効量は、少なくとも約1  $\mu$ M、少なくとも約750nM、少なくとも約500nM、少なくとも約250nM、少なくとも約100nM、少なくとも約50nM、少なくとも約25nM、少なくとも約10nM、少なくとも約5nM、または少なくとも約1nMの効力（IC<sub>50</sub>）でPI3Kを阻害するものである。

#### 【0126】

そのような方法において、PI3Kの選択的阻害物質は、少なくとも1種の他のPI3Kアイソフォームの少なくとも1000倍の選択性で、少なくとも1種の他のPI3Kアイソフォームの少なくとも750倍の選択性で、少なくとも1種の他のPI3Kアイソフォームの少なくとも500倍の選択性で、少なくとも1種の他のPI3Kアイソフォームの少なくとも250倍の選択性で、少なくとも1種の他のPI3Kアイソフォームの少なくとも100倍の選択性で、他のPI3Kアイソフォームに対して少なくとも50倍の選択性で、他のPI3Kアイソフォームに対して少なくとも25倍の選択性で、少なくとも1種の他のPI3Kアイソフォームに対して少なくとも10倍の選択性で、少なくとも1種の他のPI3Kアイソフォームに対して少なくとも5倍の選択性で、または少なくとも1種の他のPI3Kアイソフォームに対して少なくとも2倍の選択性で、PI3Kを阻害するもの（IC<sub>50</sub>）である。

#### 【0127】

従って、本発明の方法は、内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、または少なくとも約83%がSOX17を発現する。方法は、内胚葉細胞の集団を入手するためにも使用され得、内胚葉細胞の単離された集団内の細胞の83%超、例えば、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少

なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または99%超がSOX17を発現する。一つの態様において、内胚葉細胞の単離された集団内の細胞の100%がSOX17を発現する。いくつかの態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、内胚葉形成に適した培地（例えば、実施例を参照のこと）における少なくとも約1日、2日、または3日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、少なくとも約4日または5日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、5日超の培養の後に入手される。

【0128】

さらに、本発明の方法は、内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、または少なくとも約77%がFoxA2を発現する。さらに、方法は、内胚葉細胞の集団を作製することができ、該細胞の約77%超、例えば、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、約90%超、約93%超、約95%超、約97%超、または約99%超がFoxA2を発現する。一つの態様において、内胚葉細胞の単離された集団内の細胞の100%がFoxA2を発現する。いくつかの態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、内胚葉形成に適した培地（例えば、実施例を参照のこと）における少なくとも約1日、2日、または3日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、少なくとも約4日または5日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、5日超の培養の後に入手される。

【0129】

いくつかの局面において、本発明は、内胚葉細胞の集団を入手するための方法を提供し、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、または少なくとも約76%がCXCR4を発現する。本明細書に提供された方法によって入手された内胚葉細胞の集団は、該細胞の76%超、例えば、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、85%超、86%超、87%超、88%超、少なくとも約89%、少なくとも約90%、約90%超、約93%超、約95%超、約97%超、または約99%超がCXCR4を発現する集団であり得る。一つの態様において、内胚葉細胞の単離された集団内の細胞の100%がCXCR4を発現する。いくつかの態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、内胚葉形成に適した培地（例えば、実施例を参照のこと）における少なくとも約1日、2日、または3日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、少なくとも約4日または5日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、5日超の培養の後に入手される。

【0130】

従って、本発明は、内胚葉細胞の集団を入手する方法を提供し、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、または約75%超がSox17およびFoxA2の両方を発現する。本発明の内胚葉細胞の集団は、例えば、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現する集団であり得る。いくつかの態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、内胚葉形成に適した培地（例えば、実施例を参照のこと）における少なくとも約1日、2日、または3日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、少なくとも約4日または5日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、5日超の培養の後に入手される。

【0131】

本発明の方法は、内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得、該細胞の少なくとも

10

20

30

40

50

約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、または少なくとも約75%がSOX17およびCXCR4の両方を発現する。ある種の局面において、方法は、細胞の集団を入手するために使用され得、該細胞の75%超、例えば、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、または少なくとも約83%がSOX17およびCXCR4の両方を発現する。例えば、本発明は、内胚葉細胞の集団を入手するための方法を提供し、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。いくつかの態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、内胚葉形成に適した培地（例えば、実施例を参照のこと）における少なくとも約1日、2日、または3日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、少なくとも約4日または5日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、5日超の培養の後に入手される。

10

#### 【0132】

さらに、本発明の方法によって作製された内胚葉細胞の集団は、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または約75%超がFoxA2およびCXCR4の両方を発現する集団であり得る。例えば、本発明は、細胞の少なくとも約77%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも約76%がCXCR4を発現する内胚葉細胞の集団を入手する方法を提供する。いくつかの態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、内胚葉形成に適した培地（例えば、実施例を参照のこと）における少なくとも約1日、2日、または3日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、少なくとも約4日または5日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、5日超の培養の後に入手される。

20

#### 【0133】

本発明によって提供される方法は、集団を入手するために使用され得、細胞の約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、または75%超、例えば、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、もしくは83%超がSOX17、FoxA2、およびCXCR4を発現する。例えば、本発明によって提供される方法は、集団を入手するために使用され得、細胞の少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または99%超がSOX17、FoxA2、およびCXCR4を発現する。一つの態様において、内胚葉細胞の単離された集団内の細胞の100%がSOX17、FoxA2、およびCXCR4を発現する。ある種の局面において、本明細書に提供された方法は、内胚葉細胞の単離された集団を入手するために使用され得、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。ある種の局面において、本明細書に提供された方法は、内胚葉細胞の単離された集団を入手するために使用され得、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。いくつかの態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、内胚葉形成に適した培地（例えば、実施例を参照のこと）における少なくとも約1日、2日、または3日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、少なくとも約4日または5日の培養の後に入手される。他の態様において、これらの内胚葉細胞の集団は、5日超の培養の後に入手される。

30

40

#### 【0134】

本発明によって提供される方法は、内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得、有効量のアクチピンAおよび有効量のPI3K阻害物質と共に2日間培養した後に、該細胞の少なくとも62%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも50%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも35%がCXCR4を発現する。ある種の態様において、本発明の方法は、内胚葉細胞

50

の集団を入手するために使用され得、有効量のアクチビンAおよび有効量のPI3K阻害物質と共に3日間培養した後に、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。本発明の方法は、内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得、有効量のアクチビンAおよび有効量のPI3K阻害物質と共に4日間培養した後に、該細胞の少なくとも88%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも82%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも75%がCXCR4を発現する。別の態様において、本発明の方法は、内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得、有効量のアクチビンAおよび有効量のPI3K阻害物質と共に5日間培養した後に、該細胞の少なくとも91%がSOX17を発現し、該細胞の少なくとも87%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも82%がCXCR4を発現する。

10

**【 0 1 3 5 】**

別の態様において、本発明の方法は、内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得、有効量のアクチビンAおよび有効量のPI3K阻害物質と共に5日間培養した後に、該細胞の91%超、例えば、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または99%超がSOX17を発現し、該細胞の87%超、例えば、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または99%超がFoxA2を発現し、かつ該細胞の82%超、例えば、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または99%超がCXCR4を発現する。一つの態様において、有効量のアクチビンAおよび有効量のPI3K阻害物質と共に培養された場合、内胚葉細胞の単離された集団内の細胞の100%が、SOX17、FoxA2、およびCXCR4を発現する。いくつかの態様において、これらの集団は、1日、2日、3日、または4日の培養の後に入手される。

20

**【 0 1 3 6 】**

いくつかの態様において、細胞集団（例えば、内胚葉細胞の集団）は、本明細書に記載された1種または複数種のマーカー（例えば、SOX17、FOXA2、CXCR4）の記載された下限と、本明細書に記載された1種または複数種のマーカーの上限との対を有する。本発明は、本明細書に記述された数値の下限および上限の割合の両方を包含する範囲を企図する。例えば、一つの態様は、集団内の内胚葉細胞の約50%～約90%がSOX17を発現する内胚葉細胞の集団を企図する。さらなる例として、いくつかの態様において、割合の上限は以下のうちのいずれかであり得る：約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または約99%。

30

**【 0 1 3 7 】**

従って、本発明の方法は、高い効率で、内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得る。有利に、内胚葉細胞の集団は、下流の適用において使用する前に、細胞を分取する（即ち、内胚葉細胞について集団を濃縮する）必要が省略される、均質な集団である。有益に、本発明の方法は、肝実質細胞、膵臓細胞、および腸細胞のうちの1種または複数種へ分化する能力を有する内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得る。

40

**【 0 1 3 8 】**

方法のある種の態様において、幹細胞は、PI3K の選択的阻害物質およびTGF ファミリーのメンバーと接触させられる。方法は、Nodal、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB、TGF 、BMP2、BMP4、およびそれらのうちの2種またはそれ以上の混合物からなる群より選択されるTGF ファミリーのメンバーと、幹細胞を接触させる工程を含み得る。本発明の方法において、TGF ファミリーのメンバーの有効量は、約1ng/ml～約1mg/ml、約5ng/ml～約600ng/ml、約10ng/ml～約500ng/ml、約25ng/ml～約250ng/ml、約50ng/ml～約200ng/ml、またはおおよそ100ng/mlであり得る。本発明のいくつかの態様において、幹細胞は有効量のアクチビンAと接触させられる。これらの方法において、アクチビンAの有効量は、約25ng/ml、約50ng/ml、約75ng/ml、約100ng/ml、約100ng/ml、約150ng/ml、また

50

は約200ng/mlである。本発明の他の態様において、幹細胞は、約1ng/ml～600ng/ml、5ng/ml～500ng/ml、約10ng/ml～400ng/ml、約25ng/ml～200ng/ml、約25ng/ml～150ng/ml、または約25ng/ml～100ng/mlの有効量のアクチビンAと接触させられる。

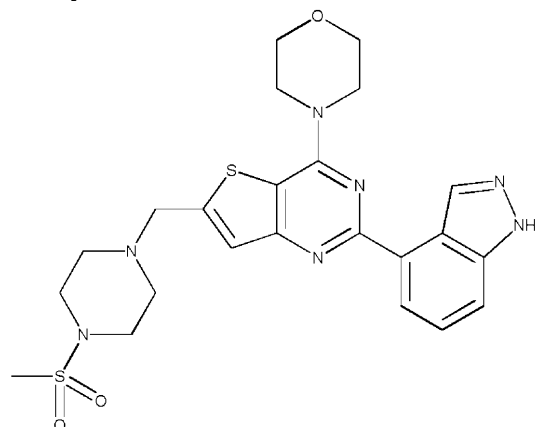
【0139】

本発明のある種の方法は、(アクチビンAのような)TGFファミリーのメンバーの有効量、PI3Kの選択的阻害物質、およびmTOR阻害物質の有効量と、幹細胞の集団をさらに接触させる工程を包含する。いくつかの態様において、方法は、PI3Kの選択的阻害物質の有効量およびmTOR阻害物質の有効量と、幹細胞の集団を接触させる工程を含む。他の局面において、本発明の方法は、PI3KおよびmTORキナーゼに対して選択的な二重阻害物質の有効量と、幹細胞の集団を接触させる工程を含み得る。他の局面において、本発明の方法は、PI3Kの選択的阻害物質の有効量およびPI3Kの選択的阻害物質の有効量と、幹細胞の集団を接触させる工程を含み得る。

10

【0140】

ある種の局面において、本発明の方法は、アクチビンAの有効量、およびPI3Kの選択的阻害物質でもあることが証明されたPI3Kの選択的阻害物質、例えば、化合物Aの有効量と、幹細胞の集団を接触させる工程を包含する。化合物Aは、4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[(4-メチルスルホニルピペラジン-1-イル)メチル]チエノ[3,2-d]ピリミジン-4-イル]モルホリンであり、その構造は以下に提供される：



20

30

。

【0141】

そのような方法において、PI3Kの選択的阻害物質でもあることが証明されたPI3Kの選択的阻害物質の有効量は、例えば、少なくとも300nM、少なくとも400nM、少なくとも500nM、または500nM超、例えば、550nM、少なくとも600nM、少なくとも650nM、少なくとも700nM、もしくは少なくとも750nMであり得る。ある種の局面において、方法において使用され得る、PI3Kの選択的阻害物質でもあることが証明されたPI3Kの選択的阻害物質の有効量は、例えば、750nM超、少なくとも800nM、少なくとも850nM、少なくとも900nM、少なくとも950nM、または950nM超であり得る。

【0142】

40

方法のある種の局面において、内胚葉細胞の集団、例えば、本明細書に記載された集団を作製するのに十分な条件の下で幹細胞を培養する工程は、アクチビンAの有効量およびPI3Kの選択的阻害物質の有効量を含有している培地において、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、または7日超にわたり幹細胞を培養することを含み得る。

【0143】

本発明の別の局面は、アクチビンAの有効量およびPI3Kの選択的阻害物質の有効量と幹細胞を接触させ、かつ、Wnt3aの非存在下で幹細胞を培養することによって、内胚葉細胞の集団が入手され得ることである。従って、上記および本明細書中の他の場所に記載された方法のいずれかは、Wnt3aの非存在下で実施され得る。さらに、方法は、幹細胞が培

50

養される培地によって限定されない。一つの局面において、方法は、例えば、既知組成培地または条件培地において実施され得る。例えば、幹細胞は、例えば、DMEM/F12、RPMI、または当業者に公知のその他の任意の幹細胞培養培地において培養され得る。いくつかの態様において、汎PI3Kキナーゼは使用されない。使用されない汎PI3Kの非限定的な例は、Ly294002である。

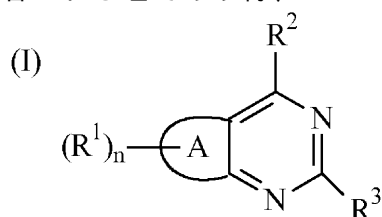
#### 【 0 1 4 4 】

さらに、当技術分野において公知の他の方法を使用して入手された内胚葉細胞の集団と比較して、即ち、PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と接触させられていない幹細胞から入手された内胚葉細胞の集団と比較して、より高い生存率および/またはより多い増殖を示す内胚葉細胞の集団を入手するために、上記方法のいずれかは使用され得る。方法によって入手された内胚葉細胞は、他の方法によって、例えば、PI3K の選択的阻害物質の有効量およびアクチビンAの有効量と接触させられていない幹細胞から入手された内胚葉細胞より、大きい表現型的安定性を示し、より増殖性である。例えば、本発明の方法は、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも8日、少なくとも9日、少なくとも10日、または10日超の培養（例えば、11日超、12日超、13日超、14日超、もしくは15日超の培養）の後に、生存可能であり増殖性である内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得る。本発明の方法は、2回の継代の後に、3回の継代の後に、4回の継代の後に、5回の継代の後に、6回の継代の後に、7回の継代の後に、8回の継代の後に、9回の継代の後に、10回までの継代の間、または10回超の継代（例えば、11回の継代または12回の継代）の後に、表現型的に安定しており増殖性である内胚葉細胞の集団を入手するために使用され得る。方法のいくつかの態様において、これらの内胚葉の集団は、支持細胞層（例えば、MATRIGEL層またはコラーゲン層）の非存在下で培養された場合、表現型的に安定しており増殖性のままである。方法のいくつかの態様において、これらの内胚葉の集団は、TesR2培地 + 30% マウス胚性繊維芽細胞条件培地（MEF）において培養された場合、表現型的に安定しており増殖性のままである。方法のいくつかの態様において、これらの内胚葉の集団は、BMP4の存在下でTesR2培地 + 30% MEFにおいて培養された場合、表現型的に安定しており増殖性のままである。方法のいくつかの態様において、これらの内胚葉の集団は、BMP4、ならびにFGF2、VEGF、および/またはEGFの任意の組み合わせの存在下でTesR2培地 + 30% MEFにおいて培養された場合、表現型的に安定しており増殖性のままである。さらに、本明細書に記載された方法のいずれかによって入手された内胚葉細胞の集団は、本発明の範囲内で企図される。有益に、アクチビンAの有効量およびPI3K の選択的阻害物質の有効量と幹細胞を接触させる工程を含む方法によって入手された内胚葉細胞の集団は、肝実質細胞、膵臓細胞、および腸細胞へ分化する能力を有する。

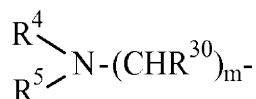
#### 【 0 1 4 5 】

##### PI3K の選択的阻害物質

上記方法のある種の態様において、PI3K の選択的阻害物質は、米国特許出願番号US 2008/0207611で開示される式（I）の縮合ピリミジンである化合物、またはその薬学的に許容される塩であり得、



式中、Aは、チオフェン環またはフラン環を表し；nは、1または2であり；R<sup>1</sup>は、式：

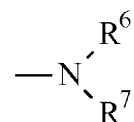


の基であり、式中、 $m$ は、0または1であり； $R^{30}$ は、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり； $R^4$ および $R^5$ は、それらが結合しているN原子と一緒に、5員もしくは6員の飽和N含有複素環基を形成し、該飽和N含有複素環基が、N、S、およびOより選択される付加的なヘテロ原子を0個もしくは1個含み、ベンゼン環と縮合していてもよく、かつ、置換されていないかもしくは置換されているか；または $R^4$ および $R^5$ の一方が、アルキルであり、かつ他方が、上記で定義された5員もしくは6員の飽和N含有複素環基、もしくは、上記で定義された5員もしくは6員の飽和N含有複素環基によって置換されているアルキル基であり；

10

$R^2$ は、

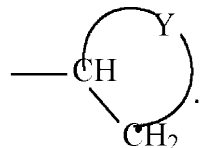
(a)  $R^6$ および $R^7$ が、それらが結合している窒素原子と一緒に、モルホリン基、チオモルホリン基、ピペリジン基、ピペラジン基、オキサゼパン基、またはチアゼパン基を形成し、該モルホリン基、該チオモルホリン基、該ピペリジン基、該ピペラジン基、該オキサゼパン基、または該チアゼパン基が置換されていないかまたは置換されている、



、ならびに

20

(b) Yは $C_2 \sim C_4$ アルキレン鎖であり、該 $C_2 \sim C_4$ アルキレン鎖が、該鎖の構成炭素原子の間にかつ／または鎖の一端もしくは両端にO、N、およびSより選択されるヘテロ原子を1個または2個含有しており、かつ、置換されていないかまたは置換されている、

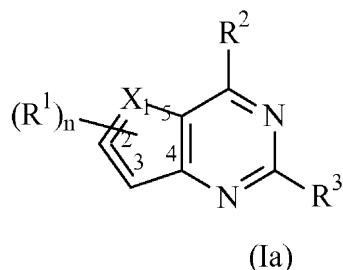


より選択され；かつ、 $R^3$ は、置換されていないかまたは置換されているインダゾール基である。

30

【 0 1 4 6 】

方法に対するある種の態様において、PI3K 阻害物質は、米国特許出願番号US 2008/02 07611に開示される式 (Ia) の縮合ピリミジン環である化合物であり得、



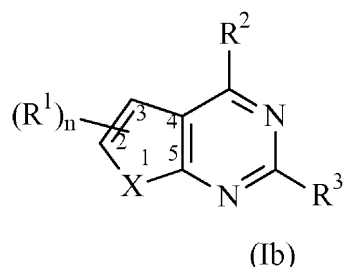
40

式中、Xは、SまたはOであり、かつ、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、および $n$ は、上記で定義された通りである。

【 0 1 4 7 】

さらに、本明細書に記載された方法において使用されるPI3K 阻害物質は、式 (Ib) の縮合ピリミジン環である化合物であり得、





式中、Xは、SまたはOであり、かつ、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、およびnは、上記で定義された通りである。

【 0 1 4 8 】

式(1)、式(1a)、または式Ibにおいて、基R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>30</sup>、A、Y、X、添字mは、そのような基が式(1)、式(1a)、または式Ibに出現する場合、事実上参照によって本明細書に組み入れられるUS2008/0207611に開示されたような意味を有する。

【 0 1 4 9 】

ある種の態様において、内胚葉を入手する方法において使用される選択的PI3K 阻害物質は、以下の化合物のいずれかまたは以下の化合物の組み合わせであり得る：2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-スルホン酸ジメチルアミド；{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-モルホリン-4-イル-メタノン；4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-カルボン酸(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミド；{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-N,N-ジメチル-アセトアミド；4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-カルボン酸ジメチルアミド；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(3-モルホリン-4-イル-プロパン-1-スルホニル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン；{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン；(3-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-スルホニル}-プロピル)-ジメチル-アミン；2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-プロパン-1-オール；1'-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-[1,4']ビペリジニル；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-モルホリン-4-イル-ビペリジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；1-(2-ヒドロキシ-エチル)-4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-2-オン；6-(4-シクロプロピルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(2,2,2-トリフルオロ-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-2-イル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(6-フルオロ-1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミ

10

20

30

40

50

ジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(5-メチル-フラン-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸アミド ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-1,1-ジメチル-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[(3R,5S)-4-(2-メトキシ-エチル)-3,5-ジメチル-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミド ; 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸ジメチルアミド ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-3-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボン酸メチルアミド ; 2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-N-メチル-イソブチルアミド ; 2-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-1-ピロリジン-1-イル-プロパン-1-オン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(1-メチル-1H-インダゾール-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(5-メチル-イソキサゾール-3-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 1-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-2-メチル-プロパン-2-オール ; シクロプロピルメチル-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-アミン ; 6-[4-(1-エチル-1-メトキシメチル-プロピル)-ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(1-メトキシメチル-シクロプロピル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(2-メトキシ-エチル)-(2,2,2-トリフルオロ-エチル)-アミン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(2-メトキシ-エチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-メタノール ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-4-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(6-メチル-ピリジン-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-(4-メチル-チアゾール-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-ピリジン-2-イル-アミン ; N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-2-メトキシ-N-メチル-アセトアミド ; N-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-N-メチル-メタンスルホンアミド ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-(3-メトキシ-プロピル)-メチル-アミン ; 6-((3S,5R)-3,5-ジメチル-4-ピリジン-2-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メトキシメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-

10

20

30

40

50

イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-  
 (2-メトキシ-エチル)-チアゾール-2-イルメチル-アミン ; 1-[2-(1H-インダゾール-4-  
 イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-4-ピリジン-2-イル  
 メチル-ピペリジン-4-オール ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル  
 -チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-イソプロピル-(2-メトキ  
 シ-エチル)-アミン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(ピリジン  
 -2-イルオキシ)-ピペリジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; N-{1-[2-(1H-イン  
 ダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピ  
 ペリジン-4-イル}-N-(2-メトキシ-エチル)-メタンスルホンアミド ; 2-{1-[2-(1H-インダ  
 ザール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリ  
 ジン-4-イル}-プロパン-2-オール ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6  
 -[4-(1-オキシ-ピリジン-3-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリ  
 ミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-モルホリン-4-イルメ  
 チル-ピペリジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-  
 イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル  
 メチル}-(2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モ  
 ルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イルメチル}-  
 ジメチル-アミン ; {1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]  
 ]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-イル}-  
 (2-メトキシ-エチル)-メチル-アミン ;  
 1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イル  
 メチル]-ピペリジン-3-カルボン酸メチルアミド ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(3-メ  
 トキシメチル-ピペリジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジ  
 ン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-ピリジン-2-イルメチル-ピ  
 ペリジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[4-  
 (2-メトキシ-エトキシ)-ピペリジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]  
 ピリミジン ; 6-((3R,5S)-3,5-ジメチル-4-チアゾール-2-イルメチル-ピペラジン-1-イル  
 メチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ;  
 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-[4-(1-オキシ-ピリジン-2-イルメ  
 チル)-ピペラジン-1-イルメチル]-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イ  
 ル)-6-[4-(2-メトキシ-エチル)-ピペリジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イル-チエノ  
 [3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メタンスルホニル-ピペリジン-1  
 -イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダゾール  
 -4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-  
 イル}-  
 (3-メタンスルホニル-プロピル)-メチル-アミン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-  
 [4-(3-メトキシ-プロパン-1-スルホニル)-ピペリジン-1-イルメチル]-4-モルホリン-4-イ  
 ル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; (R)-1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イ  
 ル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-3-カルボン酸メチルアミド ; (S  
 )-1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イ  
 ルメチル]-ピペリジン-3-カルボン酸メチルアミド ; 6-(4-イミダゾール-1-イルメチル-ピ  
 ペリジン-1-イルメチル)-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2  
 -d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-モルホリン-4-イ  
 ルメチル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(3-メチル-ピペリ  
 ジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; {1-[2-(1H-インダ  
 ザール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリ  
 ジン-3-イル}-メタノール ; 2-{1-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チ  
 エノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペリジン-4-イル}-エタノール ; 1-[2-(1H-イン  
 ダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-4-チ  
 アゾール-2-イル-ピペリジン-4-オール ; 2-(1-メチル-1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メ  
 チル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン ; 2-(2-  
 メチル-2H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン

10

20

30

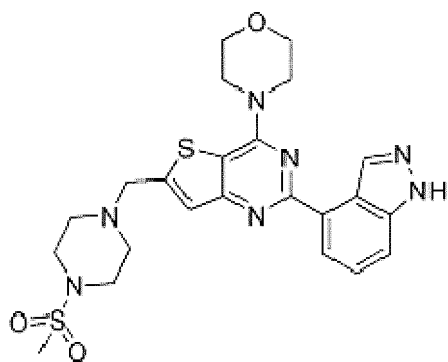
40

50

-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-(4-チアゾール-4-イルメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；1-{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-ピペラジン-1-イル}-3-フェノキシ-プロパン-2-オール；6-[4-(1H-イミダゾール-2-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；6-[4-(3H-イミダゾール-4-イルメチル)-ピペラジン-1-イルメチル]-2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-6-((2S,6R)-2,4,6-トリメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-チエノ[3,2-d]ピリミジン；{4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン-6-イルメチル]-1-メタンスルホニル-ピペラジン-2-イル}-メタノール；および2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-(4-メタンスルホニル-3-メトキシメチル-ピペラジン-1-イルメチル)-4-モルホリン-4-イル-チエノ[3,2-d]ピリミジン；ならびに上記の遊離化合物の薬学的に許容される塩。本明細書に開示された態様には、それらの塩が含まれることが理解される。

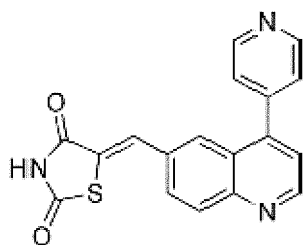
【 0 1 5 0 】

いくつかの態様において、方法において使用される選択的PI3K 阻害物質は、以下の選択的PI3K 阻害物質のいずれかもしくは組み合わせ、または以下のPI3K 阻害物質と、PI3K経路の別の選択的阻害物質、例えば、別のPI3K 阻害物質、PI3K 阻害物質、もしくはmTOR阻害物質との組み合わせであり得る：



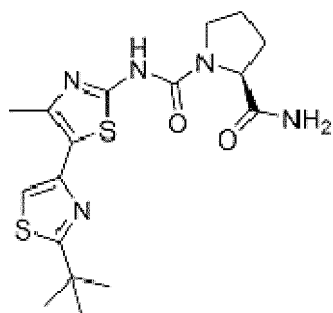
10

化合物 A,



20

GSK1059615,



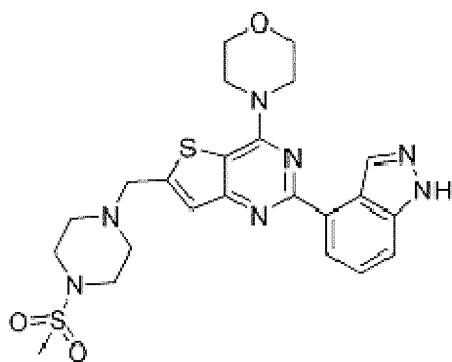
30

A66

、IntellikineのINK1117、D106669、またはNovartisのBYL719。

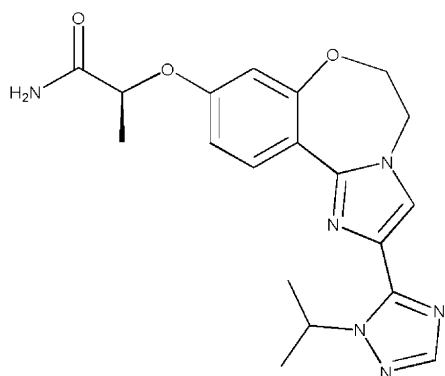
【 0 1 5 1 】

本発明の方法は、以下のPI3K 阻害物質のいずれかもしくは組み合わせ、または以下のPI3K 阻害物質と、PI3K経路の別の選択的阻害物質、例えば、別のPI3K 阻害物質、PI3K 阻害物質、mTOR阻害物質との組み合わせを使用することもできる：



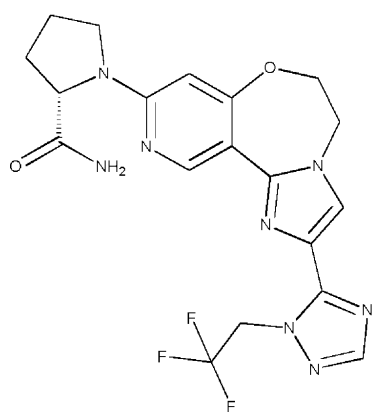
化合物 A,

10



化合物 B,

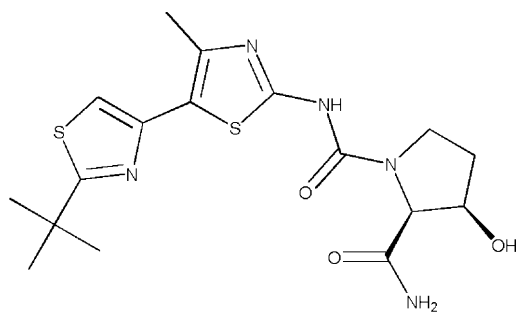
20



化合物 C,

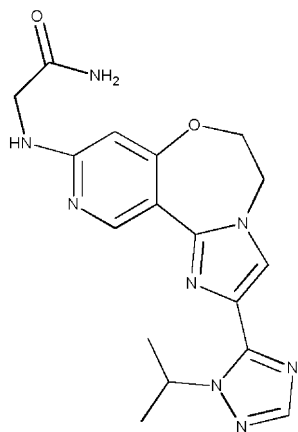
30

40



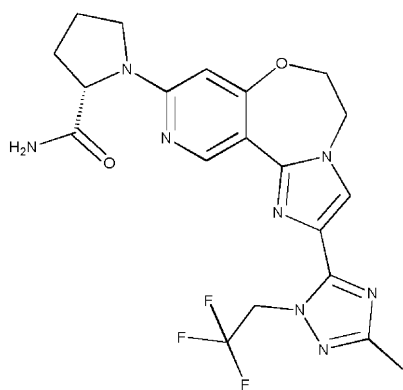
化合物 D,

10



20

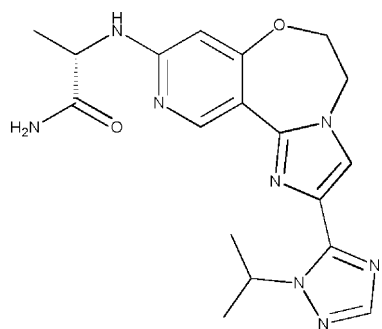
化合物 E,



30

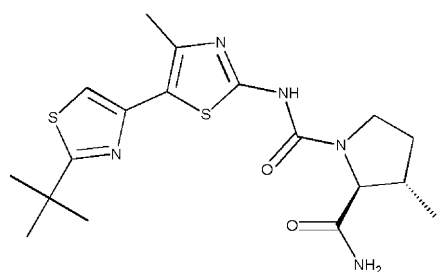
化合物 F,

40



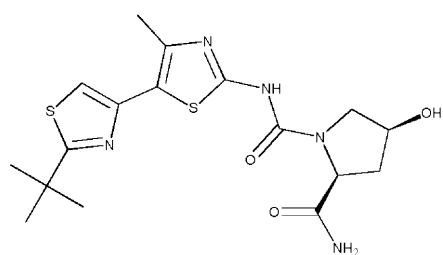
化合物 G,

10



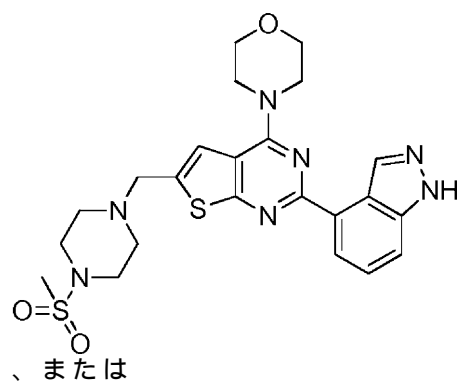
化合物 H,

20



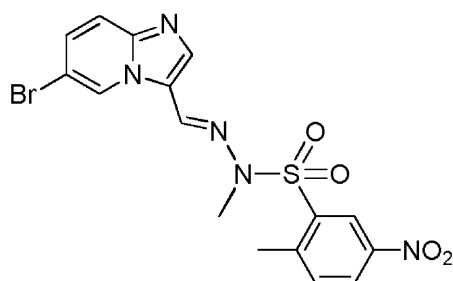
化合物 I,

30



40





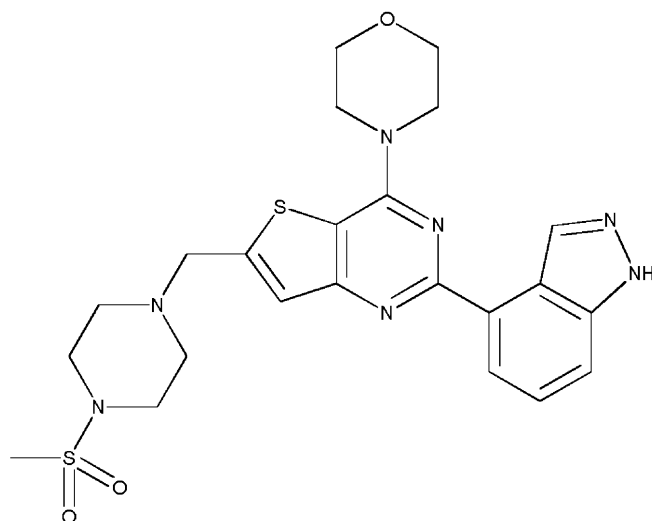
PIK-75

10

。

## 【 0 1 5 2 】

いくつかの態様において、PI3K の選択的阻害物質は、（本明細書において「化合物A」とも呼ばれる）4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[(4-メチルスルホニルピペラジン-1-イル)メチル]チエノ[3,2-d]ピリミジン-4-イル]モルホリンである。その構造を以下に提供する：



20

。

## 【 0 1 5 3 】

本発明によって提供される方法において使用され得る付加的なPI3K 阻害物質は、US 2 005/014771A1、US 2010/013758A1、WO 2006/046040、US 2009/0156601、US 2008/003945 9、US 2011/0105461、US 2008/0076768 (US7781433)、WO 2007/132171、US 2008/026921 0、US 2009/0118275、WO 2009/066084、US 2011/0172216、US 2009/0247567、US 2009/03 18411、WO 2010/059788、US 2010/0233164、US 2011/007629、US 2011/0251202A1、US 20 11/0003786A1、US 2011/0003818A1、US 2010/0298286A1、US 2010/0249126A1、US 2010/0 105711A1、US 2010/0075965A1、US 2010/0311729A1、US 2010/0048547A1、US 2009/01634 69A1、US 2009/0318410A1、US 2009/0286779A1、US 2009/0258882A1、US 2009/0318410A1 40、US 2009/0131457A1、US 2012/0059000A1、US 2011/0124641A1、US 2011/0172228A1、US 2011/0160232A1、US 2011/0281866A1、US 2011/0046165A1、US 2011/0077268A1、US 201 1/0269779A1、US 2010/0184760A1、US 2010/0190749A1、US 2009/0312319A1、WO 2011/14 9937A1、WO 2011/022439A1、およびWO 2010/129816A2、US 2008/0207611、USP 7781433、US 2008/0076758、US20080242665、およびUS 2011/0076291にも記載されており、これらの 各々の内容は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

## 【 0 1 5 4 】

本発明の方法において使用するために企図される付加的なPI3K 阻害物質は、US 2005/ 014771、US 2010/013758、US 2008/0207611、WO2006/046040、US 2009/0156601、US 2008 /0039459、US 2011/0105461、US 2008/0076768、US 2008/0076758、WO 2007/132171、US 50

2008/0269210、US 2008/0242665、US 2009/0118275、WO 2009/066084、US 2011/0172216、US 2009/0247567、US 2009/0318411、WO 2010/059788、US 2010/0233164、US 2011/007629、US 2011/007629、およびShuttleworth et al.(2011)Current Medicinal Chemistry 18:2686-2714に記載されており、これらの内容は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。本発明の方法において使用され得る別のPI3K 阻害物質はPI103である。

#### 【0155】

上記の参照に記載されたPI3K の選択的阻害物質の任意の組み合わせ（2種、3種、4種、またはそれ以上）が、内胚葉細胞の集団を作製するための本明細書に提供された方法において使用されてもよいことが理解される。

#### 【0156】

##### PI3K の阻害物質

ある種の態様において、内胚葉細胞は、PI3K の選択的阻害物質およびPI3K の選択的阻害物質の有効量と、幹細胞の集団を接触させることによって作製され得る。これらは、PI3K の選択的阻害物質のいずれかと共に、本明細書に記載されたPI3K の選択的阻害物質のいずれかまたは組み合わせと、幹細胞を接触させることによって、内胚葉細胞の集団を入手する工程を包含する。

#### 【0157】

本発明によって提供される方法において使用され得る付加的なPI3K 阻害物質は、US 2009/0131429、US 2009/0042884、US 2010/0016306、WO 2008/125839、WO 2008/125833、WO 2008/125835、US 2010/0190769、WO 2008/152387、WO 2008/152394、US 2011/0021496、WO 2009/053716、US 2010/0305096、US 2010/0305084、US 2011/0207713、US 2009/0131429、US 2009/0042884、US 2010/0016306、WO 2008/125839、WO2008/125833、WO 2008/125835、US 2010/0190769、WO 2008/152387、WO 2008/152394、US2011/0021496、WO 2009/053716、US 2010/0305096、US 2010/0305084、US 2011/0207713に記載されており、これらの内容は、参照によってその全体が明示的に本明細書に組み入れられる。

#### 【0158】

##### 内胚葉細胞の集団

本発明は、本明細書に記載された方法から得られた内胚葉細胞の集団を提供する。本発明は、方法によって作製された集団のみならず集団自体も企図し包含することが理解される。他の関連する態様は、下記および本明細書中に記載されるようにさらに提供される。

#### 【0159】

##### 内胚葉細胞の表現型

本発明によって提供される内胚葉細胞の集団または単離された集団は、以下の生物学的マーカーのうちの1種または複数種の発現に関連する様々な表現型によって記載され得る：SOX17、CXCR4、FoxA1、FoxA2、FoxA3、CD55（またはDAF1）、Cer1（ケルペロス1）、HNF1a、HNF1b、HNF4a、Gata3、Gata4、Gata6、Hhex、およびLHX1。

#### 【0160】

これらのマーカーのうちの1種または複数種の存在および/または発現レベルは、内胚葉分化の公知の方法を使用して入手された内胚葉細胞の集団から、本発明によって提供される内胚葉細胞の集団を区別する。これらのマーカーは、免疫組織化学、フローサイトメトリー、および蛍光イメージング分析を含むが、これらに限定されない、当技術分野において公知の標準的な方法によって検出され得る。そのような技術の詳細は、実施例1に見出され得る。本明細書に記載されたマーカーは、内胚葉細胞の培養の異なる時点で、例えば、アクチビンAおよびPI3K の選択的阻害物質を添加し、任意で、PI3K の選択的阻害物質またはmTORキナーゼ阻害物質を添加した後、1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、6日目、7日目、8日目、9日目、10日目、またはそれ以降に測定され得る。

#### 【0161】

本発明は、内胚葉細胞の集団を提供し、該集団内の該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、または少なくとも約83%がSOX17を発現する

10

20

30

40

50

。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、約1日、2日、3日、4日、5日、またはそれ以上の培養の後にこれらの量のSOX17を有する。

【0162】

本発明は、内胚葉細胞の集団も提供し、内胚葉細胞の単離された集団内の細胞の83%超、例えば、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または99%超がSOX17を発現する。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、約1日、2日、3日、4日、5日、またはそれ以上の培養の後にこれらの量のSOX17を有する。

10

【0163】

さらに、本発明は、内胚葉細胞の集団を提供し、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、または少なくとも約77%がFoxA2を発現する。本発明の内胚葉細胞の集団は、該細胞の約77%超、例えば、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、約90%超、約93%超、約95%超、約97%超、または約99%超がFoxA2を発現する集団であり得る。

20

【0164】

いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、約1日、2日、3日、4日、5日、またはそれ以上の培養の後にこれらの量を有する。

【0165】

いくつかの局面において、本発明は、内胚葉細胞の集団を提供し、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、または少なくとも約76%がCXCR4を発現する。本発明の内胚葉細胞の集団は、該細胞の76%超、例えば、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、約90%超、約93%超、約95%超、約97%超、または約99%超がCXCR4を発現する集団であり得る。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、約1日、2日、3日、4日、5日、またはそれ以上の培養の後にこれらの量を有する。

30

【0166】

本発明の内胚葉細胞の集団を特徴付けるためのさらに別の手段は、それらが発現するマーカーの組み合わせによる。従って、本発明は、内胚葉細胞の集団を提供し、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約65%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、または約75%超がSox17およびFoxA2の両方を発現する。本発明の内胚葉細胞の集団は、例えば、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ該細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現する集団であり得る。

40

【0167】

本発明の内胚葉細胞の集団は、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、または少なくとも約75%がSOX17およびCXCR4の両方を発現する集団であり得る。ある種の局面において、本発明の内胚葉細胞の集団は、該細胞の75%超、例えば、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、または少なくとも約83%がSOX17およびCXCR4の両方を発現する細胞の集団であり得る。例えば、本発明は、内胚葉細胞の集団を提供し、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、かつ該細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する。いくつかの態様において、内胚葉

50

細胞の集団は、約1日、2日、3日、4日、5日、またはそれ以上の培養の後にこれらの量を有する。

【0168】

さらに、本発明の内胚葉細胞の集団は、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または約75%超がFoxA2およびCXCR4の両方を発現する集団であり得る。例えば、本発明は、内胚葉細胞の集団を提供し、該細胞の少なくとも約77%がFoxA2を発現し、かつ該細胞の少なくとも約76%がCXCR4を発現する。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、約1日、2日、3日、4日、5日、またはそれ以上の培養の後にこれらの量を有する。

【0169】

本発明の内胚葉細胞の集団は、該細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、または75%超、例えば、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、もしくは83%超、例えば、少なくとも約85%、少なくとも約87%、もしくは87%超がSOX17、FoxA2、およびCXCR4を発現する集団であり得る。さらなる態様において、内胚葉細胞の単離された集団は、該細胞の少なくとも83%がSOX17を発現し、細胞の少なくとも77%がFoxA2を発現し、かつ細胞の少なくとも76%がCXCR4を発現する集団であり得る。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、約1日、2日、3日、4日、5日、またはそれ以上の培養の後にこれらの量を有する。

【0170】

安定な内胚葉

本発明によって提供される内胚葉細胞は、培養物中で複数回の継代を通して複能性細胞として表現型的に安定したままである能力、およびこの表現型を保持しながら増殖する（即ち、分裂する）能力によっても記載され得る。複能性状態で維持され得る安定な内胚葉細胞は、インビトロで内胚葉の発達および分化を研究するために使用され得る。本発明の安定な内胚葉細胞集団を特徴付ける別の手段は、その表現型を保持しながら、培養物中で複数回の継代を通して増殖性（即ち、細胞分裂可能）のままである能力による。拡張可能な内胚葉細胞の集団は、細胞治療適用のための臨床的な必要を満たすため、例えば、肝細胞、肝実質前駆細胞(hepatocyte precursor cell)、膵前駆細胞、膵臓細胞、肝実質細胞、または内胚葉細胞に由来するその他の分化細胞（例えば、腸前駆細胞、腸細胞、肺前駆細胞、肺細胞等）を入手するための大量の前駆細胞を提供することができる。安定している拡張可能な内胚葉の作製は、ヒト細胞（Seguin, et al. (2008) "Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells." Cell Stem Cell, 3(2):182-19; Cheng, et al. (2012). "Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells." Cell Stem Cell, 10(4):371-384）およびマウス細胞（Morrison, et al. (2008). "Anterior definitive endoderm from ESCs reveals a role for FGF signaling." Cell Stem Cell, 3(4):402-415）において試みられてきた。しかしながら、これらの方法は、CXCR4+細胞を入手するための分取工程をまだ含んでいる。本発明の表現型的に安定している増殖性の内胚葉細胞の集団は、分取工程を含まない方法を使用して入手され得る。

【0171】

従って、本発明の内胚葉細胞の集団は、ある期間、例えば、以下の値の中間の任意の範囲を含めて、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも8日、少なくとも9日、少なくとも10日、または10日超の培養の間、例えば、11日超、12日超、13日超、14日超、15日超の培養、16日超の培養、17日超の培養、18日超の培養、19日超の培養、20日超の培養、21日超の培養、22日超の培養、23日超の培養、もしくは24日超の培養の間、SOX17、CXCR4、FoxA1、FoxA2、FoxA3、CD55（またはDAF1）、Cer1（ケルペロス1）、HNF1a、HNF1b、HNF4a、Gata3、Gata4、Gata6、Hhex、およびLHX1のうちの1種または複数種の発現に関連した上記の表現型のいずれかを維持する能力

を特徴とする集団であり得る。いくつかの態様において、本発明の内胚葉細胞の集団は、以下の値の中間の任意の範囲を含めて、少なくとも約2回の継代、少なくとも約3回の継代、少なくとも約4回の継代、少なくとも約5回の継代、少なくとも約6回の継代、少なくとも約7回の継代、少なくとも約8回の継代、少なくとも約9回の継代、10回までの継代、または少なくとも約10回超の継代（例えば、11回の継代もしくは12回の継代）の間、SOX17、CXCR4、FoxA1、FoxA2、FoxA3、CD55（またはDAF1）、Cer1（ケルペロス1）、HNF1a、HNF1b、HNF4a、Gata3、Gata4、Gata6、Hhex、およびLHX1のうちの1種または複数種の発現に関連した上記の表現型のいずれかを維持する能力を特徴とする、表現型的に安定している集団であり得る。

【0172】

いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、支持細胞層（例えば、MATRIGEL層またはコラーゲン層）の非存在下で培養された場合、SOX17、CXCR4、FoxA1、FoxA2、FoxA3、CD55（またはDAF1）、Cer1（ケルペロス1）、HNF1a、HNF1b、HNF4a、Gata3、Gata4、Gata6、Hhex、およびLHX1のうちの1種または複数種の発現に関連した上記の表現型のいずれかを維持する能力を特徴とする、複能性細胞として表現型的に安定したままであり得る集団である。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、TesR2培地 + 30% マウス胚性繊維芽細胞条件培地（MEF）において培養された場合、SOX17、CXCR4、FoxA1、FoxA2、FoxA3、CD55（またはDAF1）、Cer1（ケルペロス1）、HNF1a、HNF1b、HNF4a、Gata3、Gata4、Gata6、Hhex、およびLHX1のうちの1種または複数種の発現に関連した上記の表現型のいずれかを維持する能力を特徴とする、複能性細胞として表現型的に安定したままであり得る集団である。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、BMP4の存在下でTesR2培地 + 30% MEFにおいて培養された場合、SOX17、CXCR4、FoxA1、FoxA2、FoxA3、CD55（またはDAF1）、Cer1（ケルペロス1）、HNF1a、HNF1b、HNF4a、Gata3、Gata4、Gata6、Hhex、およびLHX1のうちの1種または複数種の発現に関連した上記の表現型のいずれかを維持する能力を特徴とする、複能性細胞として表現型的に安定したままであり得る集団である。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、BMP4、FGF2、VEGF、およびEGFの存在下でTesR2培地 + 30% MEFにおいて培養された場合、SOX17、CXCR4、FoxA1、FoxA2、FoxA3、CD55（またはDAF1）、Cer1（ケルペロス1）、HNF1a、HNF1b、HNF4a、Gata3、Gata4、Gata6、Hhex、およびLHX1のうちの1種または複数種の発現に関連した上記の表現型のいずれかを維持する能力を特徴とする、複能性細胞として表現型的に安定したままであり得る集団である。

【0173】

本発明の内胚葉細胞の集団は、ある期間、以下の値の中間の任意の範囲を含めて、例えば、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも8日、少なくとも9日、少なくとも10日、または10日超の培養、例えば、11日超、12日超、13日超、14日超、15日超の培養、16日超の培養、17日超の培養、18日超の培養、19日超の培養、20日超の培養、21日超の培養、22日超の培養、23日超の培養、もしくは24日超の培養の間、増殖性のままである集団であり得る。いくつかの態様において、本発明の内胚葉細胞の集団は、以下の値の中間の任意の範囲を含めて、少なくとも約2回の継代、少なくとも約3回の継代、少なくとも約4回の継代、少なくとも約5回の継代、少なくとも約6回の継代、少なくとも約7回の継代、少なくとも約8回の継代、少なくとも約9回の継代、10回までの継代、または少なくとも約10回超の継代（例えば、11回の継代もしくは12回の継代）の間、増殖性のままである集団であり得る。

【0174】

いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、支持細胞層（例えば、MATRIGEL層またはコラーゲン層）の非存在下で培養された場合、増殖性のままであり得る集団である。い

10

20

30

40

50

くつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、TesR2培地 + 30% マウス胚性繊維芽細胞条件培地 (MEF) において培養された場合、増殖性のままであり得る集団である。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、BMP4の存在下で、TesR2培地 + 30% MEFにおいて培養された場合、増殖性のままであり得る集団である。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、BMP4、FGF2、VEGF、およびEGFの存在下で、TesR2培地 + 30% MEFにおいて培養された場合、増殖性のままであり得る集団である。いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団は、分取工程を含まない方法を使用して入手された場合、増殖性のままであり得る集団である。

【0175】

本発明の一つの局面は、内胚葉細胞の集団、例えば、表現型的に安定しておりかつ / または増殖性である集団が、内胚葉細胞のバンクの形態で低温貯蔵され得ることである。そのようなバンクは、将来の治療的または実験的な使用のために解凍され得る。表現型的に安定しておりかつ / または増殖性である内胚葉細胞のバンクは、当業者に公知の方法を使用して低温貯蔵され得る。

10

【0176】

いくつかの態様において、内胚葉細胞の単離された集団 (例えば、本明細書に記載された内胚葉細胞の集団のいずれか) は、付加的な成分 (例えば、細胞片) を実質的に含まない細胞の調製物を提供するために操作される。いくつかの態様において、細胞調製物は、細胞が作製される時または培養される場合に存在する他の成分を、重量、体積、または数で少なくとも約60% 含まない。様々な局面において、細胞は、重量、体積、または数で少なくとも約75%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99% 純粋である。いくつかの局面において、割合は、細胞培養物または細胞集団の中の内胚葉細胞または肝実質細胞の割合をさす。例えば、内胚葉細胞または肝実質細胞の集団または単離された集団は、例えば、機械的もしくは物理的もしくは化学的な抽出による、天然起源からの精製、蛍光標示式細胞分取、または当業者に公知のその他の技術によって入手され得る。純度は、蛍光標示式細胞分取 (FACS) または視覚的検査のような適切な方法によってアッセイされ得る。

20

【0177】

いくつかの態様において、内胚葉細胞の均質な集団が、本明細書に記載されるように作製され得る。内胚葉細胞の均質な集団とは、集団の有意な部分が内胚葉細胞である細胞の集団である。有意な部分とは、集団内の細胞の約50% 超、55% 超、60% 超、65% 超、70% 超、75% 超、80% 超、85% 超、90% 超、91% 超、92% 超、93% 超、94% 超、95% 超、96% 超、97% 超、98% 超、または99% 超であり、該細胞が内胚葉細胞である。

30

【0178】

本発明の内胚葉細胞の集団は、肝実質細胞、脾臓細胞、および腸細胞のうちの1種または複数種へ分化する能力を有する。従って、上記の特徴のいずれかを有する内胚葉細胞の集団は、純粋な組織型または細胞型の開発において有益に使用され得る。

【0179】

本発明の一つの局面は、内胚葉細胞の集団、例えば、上記の集団の特徴のいずれかを有する集団が、内胚葉細胞のバンクの形態で低温貯蔵され得ることである。そのようなバンクは、将来の治療的または実験的な使用のために解凍され得る。内胚葉細胞のバンクは、当業者に公知の方法を使用して、低温貯蔵され得る。

40

【0180】

本発明の別の局面は、有効量のアクチビンAおよび有効量のPI3K 阻害物質を含む培地におけるインビトロ細胞培養物であり、細胞には、幹細胞、内胚葉細胞、および / または幹細胞から分化した細胞、即ち、多様な内胚葉前駆細胞のいずれかが含まれる。本発明は、幹細胞の集団からの本明細書に記載された内胚葉細胞の集団のいずれかの形成に至る経路における任意の中間細胞型を企図し包含する。

【0181】

50

本発明は、内胚葉細胞、肝実質細胞、および任意の中間細胞を備える製品（例えば、装置、医療装置、植え込み装置、器機、細胞培養容器、細胞培養プレート、足場材料）も企図する。

#### 【0182】

本発明は、内胚葉細胞の集団を記載し特徴付けるため、上記および本明細書中の他の場所に記載される全ての任意のパラメーターの任意の組み合わせを企図する。

#### 【0183】

##### 内胚葉細胞を使用する方法

本発明は、多様な研究および治療的適用において使用され得る内胚葉細胞を提供する。例えば、本明細書に記載された集団からの内胚葉細胞は、細胞および組織の分化における研究を促進するために使用され得る。内胚葉細胞は、新薬候補を試験するための毒性アッセイ法においても使用され得る。さらに、肝実質細胞、膵臓細胞、および腸細胞を含む内胚葉細胞派生物は、再生医学および治療的使用のために使用され得る。

#### 【0184】

##### 関心対象の細胞型への内胚葉細胞の分化を促進する因子を同定するための方法

本発明は、発達シグナリング経路の研究のような研究適用のための内胚葉細胞の容易な起源を提供する。従って、本発明は、関心対象の細胞型、例えば、肝実質細胞、膵臓細胞、または腸細胞への内胚葉細胞の集団の分化を促進する強化剤について因子をスクリーニングするための方法を提供する。方法は、内胚葉細胞の集団、例えば、本発明によって提供される集団または本発明によって提供される方法のいずれかを使用して入手された集団を、因子と接触させる工程、および細胞への分化について内胚葉細胞の集団をモニタリングする工程を含む。

#### 【0185】

そのような因子と内胚葉細胞を接触させる効果は、因子と接触させられていない内胚葉細胞の集団と比較して、内胚葉細胞の試験集団の、例えば、発現された表現型の比、細胞生存率、および遺伝子発現の改変をモニタリングすることによって同定され得る。これらの細胞の集団の表現型をモニタリングしかつ比較する方法は、当業者に周知である。例えば、細胞の物理的特徴は、顕微鏡法によって細胞の形態学および成長を観察することで分析され得る。細胞型特異的な酵素、受容体、およびその他の細胞表面分子のようなタンパク質のレベルの増加または減少は、そのような分子のレベルの改変を同定することができる。当技術分野において公知の任意の技術によって分析され得る。これらの技術には、そのような分子に対する抗体を使用した免疫組織化学、または生化学的分析が含まれる。そのような生化学的分析には、タンパク質アッセイ法、酵素アッセイ法、受容体結合アッセイ法、酵素連結免疫吸着アッセイ法（ELISA）、電気泳動分析、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）による分析、ウエスタンブロット、およびラジオイムノアッセイ法（RIA）が含まれる。ノーザンブロット、S1マッピング、プライマー伸張、およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような核酸分析が、これらの分子またはこれらの分子を合成する酵素をコードするmRNAのレベルを調査するために使用され得る。

#### 【0186】

##### 内胚葉細胞の分化を阻害する因子を同定するための方法

発達シグナリング経路の研究において、内胚葉細胞の集団が分化するのを阻害する因子を同定することも、同様に重要であり得る。そのような因子を同定するための本発明によって提供される方法は、内胚葉細胞の集団、例えば、本発明によって提供される集団または本発明によって提供される方法のいずれかを使用して入手された集団を、因子と接触させる工程、および細胞への分化について内胚葉細胞の集団をモニタリングする工程を含む。そのような因子と内胚葉細胞を接触させる効果は、因子と接触させられていない内胚葉細胞の集団と比較して、内胚葉細胞の試験集団の表現型、細胞生存率、および遺伝子発現の改変をモニタリングすることによって同定され得る。試験集団の表現型は、上記のようにモニタリングされ得る。

#### 【0187】

## 細胞に基づく治療

別の局面において、本発明は、例えば、本明細書に記載された集団由来の、本明細書に記載された方法から入手された集団由来の、または内胚葉細胞の一つもしくは複数の集団のバンク由来の内胚葉細胞を、それを必要とする患者へ投与する段階によって、多様な障害を処置するための方法を提供する。内胚葉細胞の高度に均質な集団は、肝臓のような部位において対象へ直接投与され得、内胚葉細胞は肝実質細胞へ分化することができる。細胞治療のため、細胞は、有害な医学的状态を処置するため、対象へ直接投与され得る。そのような状態には、例えば、肝線維症、肝硬変、肝不全および肝臓癌、膵臓癌、膵不全、組織交換酵素欠損、クローン病、炎症性腸症候群、ならびに腸癌を含む腸障害が含まれ得る。

10

### 【0188】

本発明の内胚葉細胞は、例えば、自家移植片、同系移植片、同種移植片、および異種移植片として投与され得る。レシピエントにおける非自己細胞の移入に関連した拒絶またはその他の問題が発生した場合には、移植片拒絶の分野の当業者に公知の、そのような拒絶に対処する組成物および方法が使用され得る。さらに、本発明の内胚葉細胞は、細胞が送達されるべき解剖学的部位に依って、例えば、血管内に、頭蓋内に、脳内に、筋肉内に、皮内に、静脈内に、眼内に、経口的に、経鼻的に、局所的に、または開放性外科的手技によって、患者へ投与され得る。

### 【0189】

本発明の細胞は、単離されて患者へ投与されてもよいし、または細胞と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物に含まれて患者へ投与されてもよい。本明細書において使用される場合、薬学的に許容される担体には、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤等が含まれる。薬学的組成物は、薬学的に有用な組成物を調製するための公知の方法に従って製剤化され得る。製剤は、当業者に周知で、容易に入手可能な多数の情報源に記載されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Science(Martin E.W., Easton Pa., Mack Publishing Company, 19th ed.)は、本発明に関して使用され得る製剤を記載している。例えば、非経口投与に適した製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする溶質を含有していてもよい水性の無菌の注射溶液；ならびに懸濁化剤および増粘剤を含んでいてもよい水性および非水性の無菌の懸濁液が含まれる。具体的に上に挙げられた要素に加えて、本発明の製剤は、当該の製剤の型および投与ルートを検討して、当技術分野において慣習的な他の剤を含んでいてもよいことが理解されるべきである。

20

30

### 【0190】

#### 肝実質細胞を作製する方法

肝実質細胞の独特の集団、例えば、本明細書に記載された集団のいずれかは、本明細書に記載された本発明の方法を使用することによって、効率的に迅速に作製され得る。特に、肝実質細胞集団は、増殖因子を使用することなく作製され得る。肝実質細胞の集団は、肝実質細胞のより高い成熟度を示す肝実質細胞の表現型（例えば、より低いAFPレベル、アルブミンレベルの増加、および/またはA1ATレベルの増加）によって、他の肝実質細胞集団と異なっている。

40

### 【0191】

アクチビンAおよび有効量の、PI3K の阻害物質（例えば、化合物A）と、出発細胞起源（例えば、幹細胞）を接触させ、かつ、肝実質細胞へ効率的に分化し得る内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該出発細胞を培養することによって、肝実質細胞は入手され得る。内胚葉細胞の集団を培養する方法は、以下に記載される。そのような内胚葉細胞の集団、または本発明の方法を使用することによって入手された内胚葉細胞の集団は、プラスチック培養皿もしくはマルチウェルプレートのような1種もしくは複数種の任意の型の培養容器に播種され、かつ/または増殖培地もしくは肝実質細胞培地において支持細胞層上で維持され得る。肝実質細胞培地は、DMEM/F12、GlutaMAX（商標）（Life Technologies）もしくはLグルタミン、およびB-27（登録商標）サプリメント（Life Technolog

50



ies) ; デキサメタゾンを含むかもしくは含まないウイリアムスE (Life Technologies, CM 6000) およびPrimary Hepatocyte Maintenance Supplements (Life Technologies, CM4000) ; RPMI、GlutaMAX (商標) もしくはLグルタミン、およびB-27 (登録商標) サプリメント ; DMEM、GlutaMAX (商標) もしくはLグルタミン、およびB-27 (登録商標) サプリメント ; (B-27 (登録商標) を欠く) DMEM/F12および血清 ; (B-27 (登録商標) を欠く) DMEM および血清 ; (B-27 (登録商標) を欠く) RPMIおよび血清 ; (B-27 (登録商標) を欠く) ウイリアムスEおよび血清 ; DMEM/F12およびKOSR、DMEMおよびKOSR、RPMIおよびKOSR、またはウイリアムスEおよびKOSRであり得る。

#### 【0192】

いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団内の細胞の有意な部分が、肝実質細胞へ分化する。いくつかの局面において、内胚葉細胞集団内の細胞の少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上が、肝実質細胞へ分化する。いくつかの局面において、分化は、内胚葉細胞が肝実質細胞培地において培養された後、少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、またはそれ以上で起こる。理論によって拘束されないが、内胚葉細胞の集団が肝実質細胞培地において長く培養されるほど、内胚葉集団内のより多量の細胞が肝実質細胞へ分化すると考えられる。少なくとも5日間内胚葉培地 (実施例セクションに記載された例示的な内胚葉培地) において培養された内胚葉細胞の使用は、肝実質細胞の高度に均質な集団の作製を可能にする。分化は、FGFのような増殖因子の非存在下で起こり得る。

#### 【0193】

従って、一つの態様において、肝実質細胞の集団を入手する方法は、アクチビンAの有効量およびPI3K の阻害物質 (例えば、化合物A) の有効量と、幹細胞 (例えば、胚性幹細胞、成体幹細胞、誘導多能性幹細胞) の集団を接触させる工程、ならびに肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該幹細胞を培養する工程を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載される内胚葉細胞の集団は、約1日、2日、3日、4日、または5日の培養の後に入手される。他の態様において、内胚葉細胞の集団は、内胚葉培地から除去され、次いで、より低いAFPレベルおよび増加したアルブミンレベルによって示されるような、成熟した肝実質細胞の集団を作製するため、増殖因子またはPI3K阻害物質を含まない (実施例に記載される) 肝実質細胞培地において培養される。

#### 【0194】

実施例において示されるように、PI3K阻害物質 (例えば、PI3K またはPI3K の阻害物質) が内胚葉段階で使用されない場合、AFPレベルは低い。対照的に、PI3K阻害物質 (例えば、PI3K またはPI3K の阻害物質) が内胚葉段階で使用される場合には、AFPレベルがより高くなり得る (例えば、ほぼ100倍)。従って、当業者は、PI3K阻害物質の使用によって、肝実質細胞の成熟度のレベルを調整することができる。

#### 【0195】

ある種の態様において、肝実質細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で内胚葉細胞を培養する工程は、以下のうちの1種または複数種の非存在下で内胚葉細胞を培養することを含み得る: HGF、レチノイン酸、FGF8、FGF1、DMSO、FGF7、FGF10、OSM、デキサメタゾン、FGF2、FGF4、BMP2、およびBMP4。

#### 【0196】

従って、上記の方法のいずれかによって入手された肝実質細胞の集団も、本発明の特色である。有益に、肝実質細胞の集団が入手された後、それは増殖因子の非存在下で培地中に維持され得る。従って、本明細書中の方法に従って入手された肝実質細胞は、下流の適用において使用するために特に有利である。

#### 【0197】

### 肝実質細胞の組成物

本発明の肝実質細胞は、表現型に関して他の肝実質細胞と異なり独特である。本発明に

10

20

30

40

50

よって提供される肝実質細胞の集団は、生物学的マーカーの発現に関する様々な表現型によって記載され得る。これらのマーカーは、免疫組織化学、フローサイトメトリー、および蛍光イメージング分析を含むが、これらに限定されない、当技術分野において公知の標準的な方法によって検出され得る。そのような技術の詳細は、実施例13に見出され得る。使用され得るマーカーの非限定的な例には、下記のうちの1種または複数種が含まれる。

CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	10
CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	
CYP3A7	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	
CYP2C8	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	
CYP2D6	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6	
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	
CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9	20
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	
CYP3A5	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	
CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	
CYP7A1	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	
TAT	Hs00910225_m1	30
SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	
ADH1A	alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide	
CEL	carboxyl ester lipase (bile salt-stimulated lipase)	
SERPINA3	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	
SERPINA7	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7	
SDS	serine dehydratase	40
AGXT	alanine-glyoxylate aminotransferase	
NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	
G6P	glucose-6-phosphatase	
KRT18	keratin 18	
KRT19	keratin 19	
UGT1A1	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1	50

UGT1A4	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A4
UGT1A3	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A3
UGT2B4	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4
GSTM4	glutathione S-transferase mu 4
SULT2A1	sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1
SULT1A1;SULT1A2	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1;sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 2
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4
EGFR	epidermal growth factor receptor
ASGPR	asialoglycoprotein receptor
AFP	alpha-fetoprotein
ALB	albumin
AFM	afamin
TAT	tyrosine aminotransferase
SERPINA1	thyroxine binding globulin
FOXA1	forkhead box A1
FOXA2	forkhead box A2
FOXA3	forkhead box A3
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha
HNF1A	HNF1 homeobox A
HNF1B	HNF1 homeobox B
ONECUT1	one cut homeobox 1
HHEX	hematopoietically expressed homeobox
GATA4	GATA binding protein 4
GATA6	GATA binding protein 6
TBX3	T-box 3

10

20

30

40

CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	
SLCO1B1	solute carrier organic anion transporter family, member 1B1	
SLCO1B3	solute carrier organic anion transporter family, member 1B3	
SLCO2B1	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1	
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	10
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	
ABCB11	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11	
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	
ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	
ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	
ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	20
A1AT	Alpha1-antitrypsin	
CK18	Cytokeratin 18	
GSTA1	Glutathione-S-Transferase 1	
FABP1	Fatty acid-binding protein 1	
IL6R	Interleukin-6 receptor	
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	30

# 【 0 1 9 8 】

一つの態様において、本発明の方法によって作製された肝実質細胞は、HepG2細胞と比較して減少したAFPレベルを有する。実施例において示される別の態様において、肝実質細胞は、初期には、HepG2細胞において検出されるAFP発現レベルと比較可能なAFP産生の増加を示す。この後に、AFP産生レベルの減少が起こる（図15および下記実施例14を参照のこと）。AFP産生レベルの減少は、肝実質細胞の成熟を示す。図16によって例示される一つの態様は、PI3K阻害物質が内胚葉段階で使用される場合、PI3K 選択的阻害物質が添加されない対照と比較して、AFPレベルがほぼ100倍であることを示す。図17によって例示される別の態様は、幹細胞由来肝実質細胞が、20日目に、肝実質細胞への形質転換を示す、アルブミンおよびHNF4aのマーカーの発現を示すことである。従って、いくつかの態様において、本発明は、集団内の細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、または少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、99%超、または100%が、減少したAFPレベルを有する肝実質細胞または肝実質細胞の集団（例えば、均質な集団）を包含する。AFPレベルの減少は

10

20

30

40

50

、PI3K 選択的阻害物質が添加されない対照と比較して、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、105倍、110倍、115倍、120倍、125倍、130倍、135倍、140倍、145倍、150倍、155倍、160倍、165倍、170倍、175倍、180倍、185倍、190倍、195倍、200倍、またはそれ以上高くなり得る。AFPレベルの減少は、実施例および図面に示されるように、減少率によっても測定され得る。

【0199】

本発明の別の局面は、増殖因子を含まない培地の中に細胞を含むインビトロ細胞培養物であり、細胞には、内胚葉細胞、肝実質細胞、および内胚葉細胞から分化した細胞、即ち、多様な肝実質前駆細胞のいずれかが含まれる。例えば、培地は、DMEM/F12、GlutaMAX (商標) (Life Technologies) もしくはLグルタミン、およびB-27 (登録商標) サプリメント (Life Technologies) ; デキサメタゾンを含むかもしくは含まないウイリアムスE (Life Technologies, CM6000) およびPrimary Hepatocyte Maintenance Supplements (Life Technologies, CM4000) ; RPMI、GlutaMAX (商標) もしくはLグルタミン、およびB-27 (登録商標) Supplement ; DMEM, GlutaMAX (商標) もしくはLグルタミン、およびB-27 (登録商標) サプリメント ; (B-27 (登録商標) を欠く) DMEM/F12および血清 ; (B-27 (登録商標) を欠く) DMEMおよび血清 ; (B-27 (登録商標) を欠く) RPMIおよび血清 ; (B-27 (登録商標) を欠く) ウイリアムスEおよび血清 ; DMEM/F12およびKOSR、DMEMおよびKOSR、RPMI およびKOSR、またはウイリアムスEおよびKOSRであり得る。

【0200】

本発明は、集団内の細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、または少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、99%超、または100%が本明細書に記載される肝実質細胞マーカーのうちの1種または複数種 (例えば、2種、3種、4種、5種、6種、7種、またはそれ以上) を発現する肝実質細胞または肝実質細胞の集団 (例えば、均質な集団) を提供する。いくつかの態様において、これらの肝実質細胞マーカーの出現は、約1日、2日、3日、4日、5日、またはそれ以上の培養 (例えば、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、またはそれ以上の培養) の後に測定される。

【0201】

本発明は、集団内の細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、または少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、99%超、または100%がアルブミンを分泌する肝実質細胞または肝実質細胞の集団 (例えば、均質な集団) を提供する。分泌されるアルブミンのレベルは、PI3K 選択的阻害物質が添加されない対照と比較して、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、105倍、110倍、115倍、120倍、125倍、130倍、135倍、140倍、145倍、150倍、155倍、160倍、165倍、170倍、175倍、180倍、185倍、190倍、195倍、200倍、またはそれ以上高くなり得る。

## 【0202】

本発明は、集団内の細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、または少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、99%超、または100%がA1ATを分泌する肝実質細胞または肝実質細胞の集団（例えば、均質な集団）を提供する。分泌されるA1ATのレベルは、PI3K 選択的阻害物質が添加されない対照と比較して、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、105倍、110倍、115倍、120倍、125倍、130倍、135倍、140倍、145倍、150倍、155倍、160倍、165倍、170倍、175倍、180倍、185倍、190倍、195倍、200倍、またはそれ以上高くなり得る。

10

## 【0203】

本発明は、肝実質細胞（または肝実質細胞）の均質な集団を包含する。いくつかの態様において、肝実質細胞（または肝実質細胞）の均質な集団は、集団の有意な部分が肝実質細胞である細胞の集団であり得る。有意な部分とは、集団内の細胞の約50%超、55%超、60%超、65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、91%超、92%超、93%超、94%超、95%超、96%超、97%超、98%超、または99%超であり、該細胞が肝実質細胞である。

20

## 【0204】

いくつかの態様において、細胞集団（例えば、肝実質細胞の集団）は、本明細書に記載された1種または複数種のマーカー（例えば、AFPおよび上記表中のマーカー）の記載された下限と、本明細書に記載された1種または複数種のマーカーの上限との対を有する。本発明は、本明細書に記述された数値のいずれかの下限および上限の割合の両方を包含する範囲を企図する。例えば、一つの態様は、集団内の肝実質細胞の約50%～約90%が減少したAFPを有する内胚葉細胞の集団を企図する。さらなる例として、いくつかの態様において、割合の上限は、以下のうちのいずれかであり得る：約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または約99%。いくつかの態様において、マーカーはAFPである。

30

## 【0205】

いくつかの態様において、CYP酵素活性が、本明細書に記載された肝実質細胞集団において誘導され得る。いくつかの態様において、CYP活性は質量分析によって検出される。いくつかの態様において、CYP2B6、CYP3A4/5、CYP1A1/2、およびアルデヒドオキシダーゼ（AO）のうちの1種または複数種の活性が誘導され得る。いくつかの態様において、CYP酵素活性および/またはアルデヒドオキシダーゼ（AO）活性は、10  $\mu$ Mリファンピシン、1mMフェノバルビタール、および1  $\mu$ M 3-メチルコラントレン（3MC）によって誘導される。

## 【0206】

本発明は、内胚葉細胞の集団からの本明細書に記載された肝実質細胞の集団のいずれかの形成に至る経路の任意の中間細胞型を含む培養物を企図し包含する。（本明細書に開示された方法によって作製されたものを含む）肝実質細胞、および肝実質細胞の集団のいずれかの形成に至る経路の任意の中間細胞型の単離された集団も、本発明によって包含される。

40

## 【0207】

肝実質細胞を使用する方法

本発明によって提供される内胚葉細胞の集団に由来する肝実質細胞は、例えば、吸収、分布、代謝、排泄、および毒性の研究、ならびに治療的肝臓再生を含む、多様な研究および臨床的適用において有利に使用され得る。本発明は、変性肝疾患または遺伝性の肝機能欠損を処置するために使用され得る肝実質細胞の集団を提供する。肝臓は薬物（例えば、

50

低分子薬物)のクリアランスおよび代謝を制御するため、本発明によって提供される肝実質細胞は、インビボの肝臓細胞に対する候補薬物の効果を評価しかつ/またはモデル化するためにも使用され得る。

【0208】

#### 細胞に基づく治療

肝炎および肝硬変のような肝疾患は、開発途上国における最も一般的な死因のうちの一つになりつつあり、肝臓移植がしばしば唯一の利用可能な処置である。しかしながら、適切なドナー肝臓の不足が存在する。治療的肝臓再生のための肝実質細胞の使用は、肝疾患の処置のためにドナー肝臓に由来する細胞を利用している現在の細胞治療手技と比べて莫大な改善を提示すると考えられる。本発明は、そのような処置のために開発され得る肝実質細胞の起源を提供する。

10

【0209】

従って、ある種の局面において、本発明は、それを必要とする患者へ、集団のいずれかから入手された肝実質細胞または本明細書に記載された方法のいずれかを使用することによって入手された肝実質細胞を投与する段階によって、該患者へ細胞に基づく治療を提供する方法を提供する。

【0210】

肝実質細胞は、循環へ適切に到達する任意の部位、典型的には、腹腔内に投与され得る。代謝機能および解毒機能のためには、細胞が胆管に到達することが有利である。従って、細胞は、(例えば、慢性肝疾患の処置において)肝臓または(例えば、劇症肝不全の処置において)脾臓の付近に投与され得る。一つの方法において、細胞は、留置カテーテルによる注入によって、肝動脈または門脈のいずれかを通して、肝循環へ投与される。門脈内カテーテルは、細胞が、主に、脾臓もしくは肝臓または両方の組み合わせへ流入するように操作され得る。

20

【0211】

別の方法において、細胞は、典型的には、ポータスを適所に維持する賦形剤またはマトリックスで、標的器官付近の腔内にポータスを置くことによって投与され得る。別の方法において、細胞は、肝臓または脾臓の葉へ直接注射され得る。

【0212】

そのような治療が適切であり得るヒトの状態には、任意の原因による肝不全、ウイルス性肝炎、薬物によって誘導された肝損傷、肝硬変、(ウィルソン病、ギルバート症候群、または $\alpha_1$ -アンチトリプシン欠損のような)遺伝性肝機能不全、肝胆道癌、(自己免疫性慢性肝炎または原発性胆汁性肝硬変のような)自己免疫性肝疾患、および肝機能の障害をもたらすその他の状態が含まれる。ヒトの治療のため、用量は、対象の体重、疾病の性質および重症度、ならびに投与される細胞の複製能についての調整を考慮に入れるべきである。医師または担当臨床医が、処置のモードおよび適切な用量を決定し得る。

30

【0213】

#### 毒性について薬物候補をスクリーニングするための方法

薬物の代謝およびその毒性を研究することは、新規薬学的化合物の開発における必要な工程である。新規薬剤の対費用効果の高い開発は、細胞に基づくアッセイ法において薬物候補をプレスクリーニングする能力に依ることができる。肝実質細胞は、薬物代謝酵素の大半を発現し、酵素誘導剤に応答し、インビボで入手され得る代謝プロファイルに類似したインビトロ代謝プロファイルを生成することができるため、参照の細胞モデルと見なされている。本発明の組成物および方法は、薬物候補の毒性を試験するための試薬として使用され得る肝実質細胞の起源を提供する。従って、本発明は、肝実質細胞の集団、例えば、本発明によって提供される集団、または本発明によって提供される方法のいずれかを使用して入手された集団を、薬物候補と接触させる工程、および毒性について肝実質細胞の集団をモニタリングする工程を含む、毒性について候補薬物をスクリーニングするための方法を提供する。

40

【0214】

50

候補薬学的化合物の活性の査定は、本発明の肝実質細胞を候補化合物と組み合わせること、（未処理の細胞または不活性化合物によって処理された細胞と比較して）化合物に起因する化合物の形態学、マーカー表現型、または代謝活性における変化を判定すること、および、次いで、化合物の効果を観察された変化と関連させることを一般に含む。スクリーニングは、化合物が肝臓細胞に対する薬理学的効果を有するよう設計されているため、または他の効果を有するよう設計された化合物が意図されない肝臓副作用を有する可能性があるため、実施され得る。2種またはそれ以上の薬物が、可能性のある薬物間相互作用効果を検出するため、組み合わせて（同時にまたは連続的に細胞と組み合わせることによって）試験されてもよい。

#### 【0215】

10

細胞毒性は、第一に、細胞の生存率、生存時間、形態学、および培養培地への酵素の漏出に対する効果によって判定され得る。より詳細な分析は、化合物が、毒性を引き起こすことなく、（糖新生、尿素形成、および血漿タンパク質合成のような）細胞機能に影響するかどうかを判定するために実施される。乳酸脱水素酵素（LDH）は、肝臓アイソザイム（V型）が、培養条件において安定しており、12～24時間のインキュベーションの後に培養上清における再現性のある測定を可能にするため、優れたマーカーである。ミトコンドリアグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼおよびグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼのような酵素の漏出も使用され得る。

#### 【0216】

肝毒性を評価するためのその他の現在の方法には、アルブミン、コレステロール、およびリポタンパク質の合成および分泌；抱合胆汁酸およびビリルビンの輸送；尿素形成；チトクロムp450のレベルおよび活性；グルタチオンレベル；グルタチオンS-トランスフェラーゼの放出；ATP、ADP、およびAMPの代謝；細胞内のK<sup>+</sup>およびCa<sup>2+</sup>の濃度；核マトリックスタンパク質またはオリゴヌクレオソームの放出；ならびに（細胞球状化、クロマチンの凝縮、および核断片化によって示される）アポトーシスの誘導の判定が含まれる。DNA合成は、[<sup>3</sup>H]-チミジンまたはBrdUの取り込みとして測定され得る。DNAの合成または構造に対する薬物の効果は、DNAの合成または修復を測定することによって判定され得る。[<sup>3</sup>H]-チミジンまたはBrdUの取り込み、特に、細胞周期中の予定外の時点におけるもの、または細胞複製に必要なレベルを超えたものは、薬物効果と一致する。さらに精巧には、望まれない効果には、中期伸展標本によって決定される姉妹染色分体交換の異常な速度も含まれ得る（例えば、A.Vickers(pp 375-410 in *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997)を参照のこと）。可能性のある肝毒性について薬物候補をスクリーニングするためのさらなる方法は、Castell et al., *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997に記載されている。

20

30

#### 【0217】

##### 臍前駆細胞を作製するための方法

臍前駆細胞の独特の集団、例えば、本明細書に記載された集団のいずれかは、本明細書に記載された本発明の方法を使用することによって効率的に迅速に作製され得る。臍前駆細胞の集団は、臍前駆細胞のより高い成熟度を示す臍前駆細胞の表現型（例えば、臍臓系統マーカー遺伝子の増加した発現、細胞クラスタを形成する増強された能力、懸濁液中で培養される能力）によって、他の臍前駆細胞集団と異なっている。

40

#### 【0218】

アクチビンAおよび有効量の、PI3Kの阻害物質、例えば、化合物Aと、出発細胞起源（例えば、幹細胞）を接触させ、かつ臍前駆細胞へ効率的に分化し得る内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該出発細胞を培養することによって、臍前駆細胞は入手され得る。内胚葉細胞の集団を培養する方法は、以下に記載される。そのような内胚葉細胞の集団、または本発明の方法を使用することによって入手された内胚葉細胞の集団は、プラスチック培養皿もしくはマルチウェルプレートのような1種もしくは複数種の任意の型の培養容器に播種され得、かつ/または増殖培地において支持細胞層上で維持され得る。

#### 【0219】

50



膵前駆細胞は、本明細書に記載された内胚葉細胞の集団を、50ng/ml FGF10、20ng/ml FGF7、100ng/ml ノギン、およびヘッジホッグ阻害物質が補足された培地において、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、または3日超にわたり培養し、次いで、2μM レチノイン酸 (Sigma) がさらに補足された同カクテルにおいて、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、または4日超にわたり細胞を培養することによって入手され得る。50ng/ml FGF10、20ng/ml FGF7、100ng/ml ノギン、ヘッジホッグ阻害物質、および2μM レチノイン酸の存在下での少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも8日、少なくとも9日、少なくとも10日、または10日超の培養の後、次いで、細胞を、1μM ノッチ阻害物質DAPT、10mM ニコチンアミド、および50ng/ml エキセンディン4と共に、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、または3日超にわたり培養することができる。成熟のためには、50ng/ml エキセンディン4、50ng/ml EGF、および50ng/ml IGF1において、さらに少なくとも4日、さらに少なくとも5日、さらに少なくとも6日、さらに少なくとも7日、またはさらに7日超にわたり、細胞を培養することができる。膵臓細胞への多能性幹細胞の分化は、様々な基本培地において実施され得ることが理解される。

#### 【0220】

ある種の態様において、膵前駆細胞を入手する方法は、(-)-インドラクタムV、KAADシクロパミン、セルリン、HGF、フォリスタチン、SU5402 (FGFR特異的チロシンキナーゼ阻害物質)、FGF4、FGF2、BMP4、またはそれらの任意の組み合わせと共に内胚葉細胞を培養する工程を含み得る。

#### 【0221】

いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団内の細胞の有意な部分が、膵前駆細胞へ分化する。いくつかの局面において、内胚葉細胞集団内の細胞の少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上が、膵前駆細胞へ分化する。いくつかの局面において、分化は、内胚葉細胞が上記の方法に従って培養された後、少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、またはそれ以上で起こる。本明細書に記載された方法に従って培養された内胚葉細胞の使用は、膵前駆細胞の高度に均質な集団の作製を可能にする。

#### 【0222】

他の態様において、本明細書に記載された方法に従って培養された内胚葉細胞の集団は、成熟した膵前駆細胞の集団を作製することができる。実施例において示され、さらに詳細に以下に記載されるように、PI3K阻害物質 (例えば、化合物AのようなPI3K またはPI3K の阻害物質) が内胚葉段階で使用される場合、PI3K 選択的阻害物質が添加されない対照と比較して、得られる膵前駆細胞における膵臓系統マーカー遺伝子の発現がより高くなり得、細胞によって形成されるクラスターがより大きく、より多数になり得、細胞が懸濁液中でより生存可能になり得る。従って、当業者は、PI3K阻害物質の使用によって、膵前駆細胞の成熟度のレベルを調整することができる。

#### 【0223】

本明細書に記載された方法によって入手された膵前駆細胞は、膵外分泌細胞へさらに分化することができる。ある種の態様において、膵外分泌細胞が形成されるよう、膵前駆細胞を、グルカゴン様ペプチド1 (GLP1)、デキサメタゾン、ドルソモルフィン、またはそれらの任意の組み合わせの存在下で培養することができる。ある種の態様において、膵外分泌細胞が形成されるよう、膵前駆細胞を、Delaspre, et al. (2013). "Directed pancreatic acinar differentiation of mouse embryonic stem cells via embryonic signaling molecules and exocrine transcription factors." PLoS One, 8(1), e54243に記載されるように培養することができる。ある種の態様において、膵外分泌細胞の集団が形成されるよう、膵前駆細胞を、Shirasawa, et al. (2011). "A novel stepwise differentiation of functional pancreatic exocrine cells from embryonic stem cells." Stem Cells Dev, 20(6), 1071-1078に記載されるように培養することができる。

## 【 0 2 2 4 】

本明細書に記載された方法によって入手された膵前駆細胞は、さらに膵管細胞へ分化することができる。ある種の態様において、膵管細胞の集団が形成されるよう、膵前駆細胞を、EGF、FGF10、PDGF-AA、またはそれらの任意の組み合わせの存在下で培養することができる。ある種の態様において、膵管細胞の集団が形成されるよう、膵前駆細胞を、Rhodes, et al. (2012). "Induction of mouse pancreatic ductal differentiation, an in vitro assay." *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 48(10), 641-649に記載されるように培養することができる。

## 【 0 2 2 5 】

従って、上記の方法のいずれかによって入手された膵前駆細胞、膵外分泌細胞の集団、および/または膵管細胞の集団も本発明の特色である。

## 【 0 2 2 6 】

膵前駆細胞の組成物

本発明の膵前駆細胞は、表現型に関して他の膵前駆細胞と異なる。本発明によって提供される膵前駆細胞の集団は、生物学的マーカーの発現に関する様々な表現型によって記載され得る。これらのマーカーは、免疫組織化学、フローサイトメトリー、および蛍光イメージング分析を含むが、これらに限定されない、当技術分野において公知の標準的な方法によって検出され得る。使用され得るマーカーの非限定的な例には、Pdx1、ARX、GCG、GLIS3、HNF1A、HNF1B、HNF4a、INS、KRT19、MXN1、NEUROD1、NKX202、ONECUT1、RFX6、SERPINA3、SST、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。

## 【 0 2 2 7 】

従って、いくつかの態様において、本発明は、集団内の細胞の少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、または少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、99%超、または100%がPdx1、ARX、GCG、GLIS3、HNF1A、HNF1B、HNF4a、INS、KRT19、MXN1、NEUROD1、NKX202、ONECUT1、RFX6、SERPINA3、SST、Cペプチド、またはそれらの任意の組み合わせを発現する膵前駆細胞の集団（例えば、均質な集団）を包含する。Pdx1、ARX、GCG、GLIS3、HNF1A、HNF1B、HNF4a、INS、KRT19、MXN1、NEUROD1、NKX202、ONECUT1、RFX6、SERPINA3、SST、Cペプチド、またはそれらの任意の組み合わせの発現レベルは、PI3K 選択的阻害物質が添加されない対照と比較して、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、105倍、110倍、115倍、120倍、125倍、130倍、135倍、140倍、145倍、150倍、155倍、160倍、165倍、170倍、175倍、180倍、185倍、190倍、195倍、200倍、またはそれ以上高くなり得る。Pdx1、ARX、GCG、GLIS3、HNF1A、HNF1B、HNF4a、INS、KRT19、MXN1、NEUROD1、NKX202、ONECUT1、RFX6、SERPINA3、SST、Cペプチド、またはそれらの任意の組み合わせの発現レベルは、7日、8日、9日、10日、11日、12日、または12日超（例えば、13日超、14日超、15日超、16日超、17日超、18日超）の分化の後に検出され得る。

## 【 0 2 2 8 】

本発明によって提供される膵前駆細胞の集団は、細胞形態学に関する様々な表現型、例えば、三次元細胞クラスターの形成によって記載され得る。特に、PI3K阻害物質（例えば、化合物AのようなPI3K またはPI3K の阻害物質）が内胚葉段階で使用される場合、得られる膵前駆細胞によって形成される三次元クラスターは、PI3K 選択的阻害物質（例えば、化合物A）が添加されない対照と比較して、より大きく、より多数になり得る。そのようなクラスターの形成は、視覚的に（例えば、顕微鏡を使用して）モニタリングされ得る。あ

る種の態様において、提供される膵前駆細胞は、3日目、4日目、5日目、6日目、7日目、8日目、9日目、10日目、11日目、12日目、13日目、14日目、15日目、16日目、17日目、18日目、19日目、20日目の後、または21日目の後に、PI3K 選択的阻害物質が添加されない対照と比較して、より大きく、より多数の細胞クラスタを形成することができる。

【0229】

さらに、本発明の膵前駆細胞は、インスリン、グルカゴン、およびCペプチドを発現することができ、懸濁液中で増殖することができ、かつ、PI3K 選択的阻害物質（例えば、化合物A）が添加されない場合と比較して、より長く懸濁液中で生存可能である。いくつかの態様において、本明細書に提供される膵前駆細胞は、懸濁液中で、1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、7日後、8日後、9日後、10日後、11日後、12日後、13日後、14日後、15日後、16日後、17日後、18日後、19日後、20日後、または20日超の後に生存可能なままである。

10

【0230】

本発明は、内胚葉細胞の集団からの本明細書に記載された膵前駆細胞の集団のいずれかの形成に至る経路の任意の中間細胞型を含む培養物を企図し包含する。（本明細書に開示された方法によって作製されたものを含む）膵前駆細胞、および膵前駆細胞の集団のいずれかの形成に至る経路の任意の中間細胞型の単離された集団も、本発明によって包含される。

【0231】

膵前駆細胞を使用する方法

20

本発明によって提供される内胚葉細胞の集団に由来する膵前駆細胞、膵管細胞、膵内分泌細胞、および膵外分泌細胞は、例えば、細胞に基づく治療を含む、多様な研究および臨床的適用において有利に使用され得る。本発明は、膵疾患、例えば、糖尿病、または遺伝性の膵機能欠損、例えば、嚢胞性繊維症もしくはシュワックマン・ダイヤモンド症候群に関連した膵外分泌機能不全を処置するために使用され得る膵前駆細胞の集団を提供する。

【0232】

細胞に基づく治療

膵炎および糖尿病のような、慢性の膵臓の疾患および障害は、開発途上国において有病率が増加中である。膵臓移植は、生活の質および量の両方を有意に改善し得るが、ドナー器官の不足が主要な障壁のままとなっている。治療的膵臓再生のための膵前駆細胞の使用は、膵疾患の処置のためにドナー膵臓に由来する細胞を利用している現在の細胞治療手技と比べて莫大な改善を提示すると考えられる。本発明は、そのような処置のために開発され得る膵前駆細胞の起源を提供する。

30

【0233】

従って、ある種の局面において、本発明は、それを必要とする患者へ、膵前駆細胞を含む集団、または本明細書に記載された方法のいずれかを使用することによって入手された集団を投与する段階によって、該患者へ細胞に基づく治療を提供する方法を提供する。

【0234】

膵前駆細胞は、循環へ適切に到達する任意の部位、典型的には、腹腔内に投与され得る。従って、細胞は、（例えば、慢性膵疾患の処置において）膵臓付近に投与され得る。一つの方法において、細胞は、留置カテーテルによる注入によって、肝臓の門脈を通して投与されてもよいし、または腹部の小さな切開を通して投与されてもよい。門脈内カテーテルは、細胞が主に肝臓へ流入するよう操作され得る。

40

【0235】

別の方法において、細胞は、典型的には、ボーラスを適所に維持する賦形剤またはマトリックスで、標的器官付近の腔内にボーラスを置くことによって投与され得る。別の方法において、細胞は、膵臓へ直接注射され得る。

【0236】

そのような治療が適切であり得るヒトの状態には、膵臓の損傷、（例えば、嚢胞性繊維症、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、慢性膵炎、または膵管閉塞に起因する）膵外

50

分泌機能不全、膵臓腺癌、島細胞神経内分泌系腫瘍、（自己免疫性膵炎またはI型糖尿病のような）自己免疫性膵疾患、II型糖尿病、および膵機能障害をもたらすその他の任意の状態を含む、任意の原因が含まれる。ヒトの治療のため、用量は、対象の体重、疾病の性質および重症度、ならびに投与される細胞の複製能についての調整を考慮に入れるべきである。医師または担当臨床医が、処置のモードおよび適切な用量を決定し得る。

#### 【0237】

##### 毒性について薬物候補をスクリーニングするための方法

上述のように、薬物の代謝およびその毒性を研究することは、新規薬学的化合物の開発における必要な工程である。新規薬剤の対費用効果の高い開発は、細胞に基づくアッセイ法において薬物候補をプレスクリーニングする能力に依ることができる。本発明の組成物および方法は、薬物候補の毒性を試験するための試薬として使用され得る膵前駆細胞および/または膵臓細胞の起源を提供する。従って、本発明は、毒性について候補薬物をスクリーニングするための方法を提供し、該方法は、膵前駆細胞および/または膵臓細胞の集団、例えば、本発明によって提供される集団、または本発明によって提供される方法のいずれかを使用して入手された集団を、該薬物候補と接触させる工程、ならびに毒性について該膵前駆細胞および/または該膵臓細胞の集団をモニタリングする工程を含む。

#### 【0238】

候補薬学的化合物の活性の査定は一般的には、本発明の膵前駆細胞および/または膵臓細胞を候補化合物と組み合わせること、（未処理の細胞または不活性化化合物によって処理された細胞と比較して）化合物に起因する化合物の形態学、マーカー表現型、または代謝活性における変化を判定すること、ならびに、次いで、化合物の効果を観察された変化と関連させることを含む。スクリーニングは、化合物が膵前駆細胞および/もしくは膵臓細胞に対する薬理学的効果を有するよう設計されているため、または他の効果を有するよう設計された化合物が意図されない肝臓副作用を有する可能性があるため、実施され得る。2種またはそれ以上の薬物が、可能性のある薬物間相互作用効果を検出するため、組み合わせ（同時にまたは連続的に細胞と組み合わせることによって）試験されてもよい。

#### 【0239】

細胞毒性は、第一に、細胞の生存率、生存時間、形態学、および培養培地への酵素の漏出に対する効果によって判定され得る。化合物が、毒性を引き起こすことなく、（糖新生、尿素形成、および血漿タンパク質合成のような）細胞機能に影響するかどうかを判定するため、より詳細な分析は実施される。

#### 【0240】

毒性を評価するためのその他の現在の方法には、ATP、ADP、およびAMPの代謝；細胞内の $K^+$ および $Ca^{2+}$ の濃度；核マトリックスタンパク質またはオリゴヌクレオソームの放出；ならびに（細胞球状化、クロマチンの凝縮、および核断片化によって示される）アポトーシスの誘導が含まれる。DNA合成は、 $[^3H]$ -チミジンまたはBrdUの取り込みとして測定され得る。DNAの合成または構造に対する薬物の効果は、DNAの合成または修復を測定することによって判定され得る。 $[^3H]$ -チミジンまたはBrdUの取り込み、特に、細胞周期中の予定外の時点におけるもの、または細胞複製に必要なレベルを超えたものは、薬物効果と一致する。さらに精巧には、望まれない効果には、中期伸展標本によって決定される姉妹染色分体交換の異常な速度も含まれ得る（例えば、A.Vickers(pp 375-410 in *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997)を参照のこと）。可能性のある毒性について薬物候補をスクリーニングするためのさらなる方法は、Castell et al., *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997に記載されている。

#### 【0241】

##### 肺細胞、甲状腺細胞、および気道前駆細胞を作製する方法

本明細書に記載された本発明の方法を使用することによって、肺細胞、甲状腺細胞、および/または気道前駆細胞の集団を効率的に迅速に作製することができる。アクチビンAおよび有効量のPI3Kの阻害物質、例えば、化合物Aと、出発細胞起源（例えば、幹細胞）を接触させ、かつ、肺細胞、甲状腺細胞、または気道前駆細胞へ効率的に分化し得る

内胚葉細胞の集団を入手するのに十分な条件の下で該出発細胞を培養することによって、肺細胞、甲状腺細胞、および/または気道前駆細胞は入手され得る。内胚葉細胞の集団を培養する方法は、以下に記載される。そのような内胚葉細胞の集団、または本発明の方法を使用することによって入手された内胚葉細胞の集団は、プラスチック培養皿もしくはマルチウェルプレートのような1種もしくは複数種の任意の型の培養容器に播種され得、かつ/または増殖培地において支持細胞層上で維持され得る。

#### 【0242】

肺細胞および/または甲状腺細胞は、100ng/ml ノギンおよび10mM SB431542 (TGF 阻害物質) が補足された基本培地において、本明細書に記載された内胚葉細胞の集団を培養することによって入手され得る。24時間後、培地を、Nkx2-1誘導培地: 100ng/ml mWnt3a、10ng/ml mKGF、10ng/ml hFGF10、10ng/ml mBMP4、20ng/ml hEGF、500ng/ml mFGF2、および100ng/ml ヘパリンナトリウム塩 (Sigma) が補足されたcSFDMと交換することができる。次いで、細胞を、mFGF2 (500ng/ml)、hFGF10 (100ng/ml)、および100ng/ml ヘパリンナトリウム塩 (Sigma) が補足されたcSFDMにおいて7日間培養することができる。22日目に、細胞を、肺成熟培地: Ham's F12培地 + 15mM HEPES (pH7.4) + 0.8mM CaCl<sub>2</sub> + 0.25% BSA + 5mg/ml インスリン + 5mg/ml トランスフェリン + 5ng/ml 亜セレン酸Na + 50nM デキサメタゾン + 0.1mM 8-Br-cAMP + 0.1mM IBMX + 10ng/ml KGFにおいて培養することができる。いくつかの態様において、内胚葉細胞を、Longmire, et al. (2012). "Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells." Cell Stem Cell, 10(4), 398-411に記載されるように培養することができる。

#### 【0243】

あるいは、肺細胞および/または気道前駆細胞を作製するため、分化の3日目に、本明細書に記載された内胚葉細胞の集団を、4μM ドルソモルフィン (BMP阻害物質) または20ng/ml BMP4を含むかまたは含まない500nM A-83-01 (TGF 阻害物質) へ、2日まで、3日、4日、または4日超にわたり曝すことができる。次いで、細胞を、10ng/ml BMP4、20ng/ml FGF2 + 10nM GSK3iXVへ、少なくとも2日、少なくとも3日、または3日超にわたり曝すことができる。次いで、気道前駆細胞を入手するため、細胞を、20ng/ml BMP7、20ng/ml FGF7、100nM IWR-1 (WNTアンタゴニスト)、および1mM PD98059へ、少なくとも1日、少なくとも2日、または2日超にわたり曝すことができる。いくつかの態様において、本明細書に記載された内胚葉細胞の集団を、Mou, et al. (2012). "Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs." Cell Stem Cell, 10(4), 385-397に記載されるように培養することができる。

#### 【0244】

いくつかの態様において、内胚葉細胞の集団内の細胞の有意な部分が、肺細胞、甲状腺細胞、および/または気道前駆細胞へ分化する。いくつかの局面において、内胚葉細胞集団内の細胞の少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上が、肺細胞、甲状腺細胞、および/または気道前駆細胞へ分化する。いくつかの局面において、分化は、内胚葉細胞が本明細書に記載された方法に従って培養された後、少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、またはそれ以上で起こる。

#### 【0245】

##### 肺細胞、甲状腺細胞、および気道前駆細胞の使用

本発明によって提供される内胚葉細胞の集団に由来する肺細胞、甲状腺細胞、および気道前駆細胞は、例えば、細胞に基づく治療を含む、多様な研究および臨床的適用において有利に使用され得る。本発明は、肺損傷、呼吸器疾患、例えば、急性呼吸窮迫症候群、肺気腫、中皮腫等、および甲状腺疾患、例えば、甲状腺癌、橋本慢性リンパ球性甲状腺炎等を処置するために使用され得る肺細胞、甲状腺細胞、および気道前駆細胞の集団を提供する。

#### 【0246】

### 細胞に基づく治療

肺移植は、肺損傷または肺疾患を有する患者のため、生活の質および量の両方を有意に改善し得るが、ドナー器官の不足が主要な障壁のままとなっている。治療的な肺または甲状腺の再生のための肺細胞、甲状腺細胞、および気道前駆細胞の使用は、肺または甲状腺の疾患の処置のために現在の治療と比べて莫大な改善を提示すると考えられる。本発明は、そのような処置のために開発され得る肺細胞、甲状腺細胞、および気道前駆細胞の起源を提供する。

#### 【0247】

従って、ある種の局面において、本発明は、それを必要とする患者へ、本明細書に記載された方法のいずれかを使用することによって入手された複数の集団または1つの集団のいずれかから入手された肺細胞、甲状腺細胞、および気道前駆細胞を含む集団を該患者へ投与する段階によって、細胞に基づく治療を提供する方法を提供する。

10

#### 【0248】

肺細胞、甲状腺細胞、および気道前駆細胞は、循環へ適切に到達する任意の部位に投与され得る。従って、細胞は、（例えば、肺疾患の処置において）肺もしくはその付近、または（例えば、甲状腺疾患の処置において）頸部もしくはその付近の動脈に投与され得る。一つの方法において、細胞は、吸入を介して、留置カテーテルによる注入によって、または肺もしくは甲状腺の小さな切開を通して投与され得る。

#### 【0249】

別の方法において、細胞は、典型的には、ボラスを適所に維持する賦形剤またはマトリックスで、標的器官付近の腔内にボラスを置くことによって投与され得る。別の方法において、細胞は、肺または甲状腺へ直接注射され得る。

20

#### 【0250】

そのような治療が適切であり得るヒトの状態には、（線維性損傷のような）肺の損傷、（中皮腫等のような）肺癌、肺気腫、喘息、嚢胞性線維症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、間質性肺疾患、甲状腺損傷、甲状腺癌、クローン病、グレーブス病、橋本慢性リンパ球性甲状腺炎等を含む任意の原因が含まれる。ヒトの治療のため、用量は、対象の体重、疾病の性質および重症度、ならびに投与される細胞の複製能についての調整を考慮に入れるべきである。医師または担当臨床医が、処置のモードおよび適切な用量を決定し得る。

#### 【0251】

30

### 腸細胞の使用

本発明によって提供される内胚葉細胞の集団に由来する腸細胞は、例えば、細胞に基づく治療を含む、多様な研究および臨床的適用において有利に使用され得る。本発明は、炎症性腸疾患（IBD）、セリアック病、クローン病、潰瘍、潰瘍性大腸炎、腸癌等に対して使用され得る腸細胞の集団を提供する。

#### 【0252】

### 細胞に基づく治療

治療的再生のための腸細胞の使用は、腸疾患の処置のための現在の治療と比べて莫大な改善を提示すると考えられる。本発明は、そのような処置のために開発され得る腸細胞の起源を提供する。

40

#### 【0253】

従って、ある種の局面において、本発明は、それを必要とする患者へ、集団のいずれかから入手された腸細胞、または本明細書に記載された方法のいずれかを使用することによって入手された腸細胞を投与する段階によって、該患者へ細胞に基づく治療を提供する方法を提供する。

#### 【0254】

腸細胞は、循環へ適切に到達する任意の部位に投与され得る。従って、細胞は、腹部またはその付近の動脈に投与され得る。一つの方法において、細胞は、留置カテーテルによる注入によって、または腹部の小さな切開を通して投与され得る。別の方法において、細胞は、典型的には、ボラスを適所に維持する賦形剤またはマトリックスで、標的器官付

50

近の腔内にボラスを置くことによって投与され得る。別の方法において、細胞は、腹部へ直接注射され得る。

【0255】

そのような治療が適切であり得るヒトの状態には、腸の損傷、腸癌、炎症性腸症候群、セリアック病、クローン病、腸管損傷、潰瘍、血管形成異常、腸の吸収または分泌の障害等を含む、任意の原因が含まれる。ヒトの治療のため、用量は、対象の体重、疾病の性質および重症度、ならびに投与される細胞の複製能についての調整を考慮に入れるべきである。医師または担当臨床医が、処置のモードおよび適切な用量を決定し得る。

【0256】

以下の実施例は、例示目的のために提供され、本発明の範囲をいかなる形においても限定するものではない。

【実施例】

【0257】

#### 実施例1：内胚葉分化のための方法および材料

##### 内胚葉マーカー

下記のフローサイトメトリー実験、蛍光イメージング実験、およびイムノアッセイ実験において、内胚葉細胞への幹細胞の分化をモニタリングするため、多様な細胞型特異的マーカーを使用した。内胚葉変換を検出するために、hESC由来細胞試料を、SOX17タンパク質、FoxA2タンパク質、およびCXCR4タンパク質の発現について染色した。SOX17、FoxA2、およびCXCR4は、内胚葉細胞によって発現されるが幹細胞によっては発現されないタンパク質である。幹細胞を検出するためには、幹細胞によって発現されるが、内胚葉細胞によって発現されないタンパク質OCT4の発現について、細胞試料を染色した。

【0258】

##### hESCおよびマトリゲルを使用した内胚葉分化プロトコール

未分化ヒト胚性幹細胞 (hES) を、TesR (商標) 2培地 (STEMCELL (商標) Technologies #05860) において、最適化マトリゲル (BD、#354277) 上で、40,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で維持した。培養物を週2回手動で継代した。内胚葉分化の準備をするため、hESC細胞をTesR (商標) 2培地へ一晩継代した。翌日、TesR (商標) 2培地を、基本培地 (B27 (Invitrogen、#17504-044) が補足されたDMEM/F12 + Glutamax (Invitrogen、#10565)) と交換した。これらの方法のための幹細胞を入手する過程において、ヒト胚は破壊されなかった。さらに、多数の幹細胞が、ヒト胚の先の破壊によって入手されない。

【0259】

他に示されない限り、基本培地には、100 μg/ml ヒトアクチビンA (Peprotech、#120-14) が補足された。示された場合、基本培地には、例えば、50 μg/ml ヒトWnt3a (R&D、#5036-WN-010) のような有効量の増殖因子、アイソフォーム特異的P13K阻害物質、またはmTOR阻害物質が補足された。3日の処理の後、hES由来細胞を採集し、標識し、フローサイトメトリー、イメージング、またはAlphaLISAによって分析した。

【0260】

##### hESCおよび懸濁液を使用した内胚葉分化プロトコール

内胚葉分化プロトコールを、懸濁液中で培養されたhESCを使用して実施する。最適化マトリゲル上で培養されたコンフルエントの未分化hESCを、細胞がプレートから解離するまで、TrypLE (Life Technologies、#12563-029) とのインキュベーションによって解離させる。次いで、細胞をDMEM:F12 (50:50) で希釈し、円錐管に収集し、300 × gで8分間遠心分離する。上清を吸引した後、ペレット化された細胞を全て単細胞懸濁液へ再懸濁させ、血球計数器を使用して計数する。20mlの4 × 10<sup>4</sup>細胞/mLを、10 μM ROCK阻害物質Y-26732およびPen/Strep溶液が補足されたTeSR2培地で、T75 Corning Low Attachment Flaskに播種する。懸濁した細胞を収集し、円錐管において沈殿させ、古い培地をピペットで温和に除去することによって、培地を隔日交換する。細胞は、球状の中心から外側へ拡大するクラスタを形成し始める。明確な球の端を有する緊密なクラスタは、多能性保持を意味し、単細胞または不明確な境界領域を有するクラスタは、典型的には、自然分化および/または

10

20

30

40

50

細胞死を意味する。各フラスコに培地を収集し、細胞クラスタを沈殿させることによって、3~4日間隔で細胞を継代する。上記のように、古い培地をピペットで温和に除去し、TrypLEを使用して、クラスタを単細胞へ解離させる。次いで、解離した細胞を上記のように播種する、即ち、20mlの $4 \times 10^4$ 細胞/mLを、 $10 \mu\text{M}$  ROCK阻害物質Y-26732およびPen/Strep溶液が補足されたTeSR2培地で、T75 Corning Low Attachment Flaskに播種する。

#### 【0261】

内胚葉分化の準備をするため、懸濁液中で培養されたhESC細胞を、TesR（商標）2培地でプレートへ一晩継代する。翌日、TesR（商標）2培地を、基本培地（B27（Invitrogen、#17504-044）が補足されたDMEM/F12 + Glutamax（Invitrogen、#10565））と交換する。細胞を上記のように内胚葉へ分化させる。

10

#### 【0262】

特記しない限り、基本培地には、 $100 \mu\text{g/ml}$  ヒトアクチビンA（Peprotech、#120-14）を補足した。示された場合には、基本培地に、例えば、 $50 \mu\text{g/ml}$  ヒトWnt3a（R&D、#5036-WN-010）のような有効量の増殖因子、アイソフォーム特異的P13K阻害物質、またはmTOR阻害物質も補足した。3日の処理の後、hES由来細胞を採集し、標識し、フローサイトメトリ、イメージング、またはAlphaLISAによって分析した。

#### 【0263】

##### 非胚性幹細胞およびマトリゲルを使用した内胚葉分化プロトコール

非胚性幹細胞（成体幹細胞または誘導多能性幹（iPS）細胞）を、TesR（商標）2培地（STEMCELL（商標）Technologies #05860）で、最適化マトリゲル（BD、#354277）上で、 $40,000$ 細胞/ $\text{cm}^2$ の密度で維持する。培養物を週2回手動で継代する。内胚葉分化の準備をするため、成体幹細胞またはiPS細胞をTesR（商標）2培地へ一晩継代する。翌日、TesR（商標）2培地を、基本培地（B27（Invitrogen、#17504-044）が補足されたDMEM/F12 + Glutamax（Invitrogen、#10565））と交換する。iPS細胞の培養のための別の選択肢は、TesR2とマウス胚性繊維芽細胞（MEF）条件培地（R&D Systems、#AR005）との混合物を使用することである。次いで、細胞を上記のように内胚葉へ分化させる。

20

#### 【0264】

##### 非胚性幹細胞および懸濁液を使用した内胚葉分化

本実施例は、懸濁液中で培養された非胚性幹細胞（成体幹細胞または誘導多能性幹（iPS）細胞）を使用した内胚葉分化プロトコールを記載する。最適化マトリゲル上で培養されたコンフルエントの未分化成体幹細胞または誘導多能性幹（iPS）細胞を、細胞がプレートから解離するまで、TrypLE（Life Technologies、#12563-029）とのインキュベーションによって解離させる。次いで、細胞を、DMEM:F12（50:50）で希釈し、円錐管へ収集し、 $300 \times g$ で8分間遠心分離する。上清を吸引した後、ペレット化された細胞を全て単細胞懸濁液へ再懸濁させ、血球計数器を使用して計数する。 $20\text{ml}$ の $4 \times 10^4$ 細胞/mLを、 $10 \mu\text{M}$  ROCK阻害物質Y-26732およびPen/Strep溶液が補足されたTeSR2培地で、T75 Corning Low Attachment Flaskへ播種する。懸濁した細胞を収集し、円錐管で沈殿させ、古い培地をピペットで温和に除去することによって、培地を隔日交換する。細胞は、球状の中心から外側へ拡大するクラスタを形成し始める。明確な球の端を有する緊密なクラスタは、多能性保持を意味し、単細胞または不明確な境界領域を有するクラスタは、典型的には、自然分化および/または細胞死を意味する。各フラスコへ培地を収集し、細胞クラスタを沈殿させることによって、3~4日間隔で細胞を継代する。上記のように、古い培地をピペットで温和に除去し、TrypLEを使用して、クラスタを単細胞へ解離させる。次いで、上記のように、解離した細胞を上記のように播種する、即ち、 $20\text{ml}$ の $4 \times 10^4$ 細胞/mLを、 $10 \mu\text{M}$  ROCK阻害物質Y-26732およびPen/Strep溶液が補足されたTeSR2で、T75 Corning Low Attachment Flaskに播種する。

30

40

#### 【0265】

内胚葉分化の準備をするため、懸濁液中で培養された成体幹細胞またはiPS細胞を、TesR（商標）2培地でプレートへ一晩継代する。翌日、TesR（商標）2培地を、基本培地（B27（Invitrogen、#17504-044）が補足されたDMEM/F12 + Glutamax（Invitrogen、#10565）

50



）と交換する。iPS細胞の培養のための別の選択肢は、TesR2とマウス胚性繊維芽細胞（MEF）条件培地（R&D Systems、#AR005）との混合物を使用することである。次いで、細胞を上記のように内胚葉へ分化させる。

#### 【0266】

#### フローサイトメトリープロトコール

フローサイトメトリーのための細胞を調製するため、内胚葉分化条件下で培養されたhESC由来細胞を、Accutase（Innovative Cell technologies、#AT-104）を使用して解離させた。簡単に説明すると、細胞を、PBSで1回洗浄し、室温で10分間Accutaseと共にインキュベートし、ペレット化し、冷PBSで洗浄した。Accutaseによって解離させられたhESC由来細胞試料を、抗CXC4抗体、抗SOX17抗体、または抗FoxA2抗体によって染色した。付加的な細胞試料を、アイソタイプ対照抗体（例えば、IgG1またはIgG2）によって染色した。

10

#### 【0267】

抗CXC4抗体によって染色すべき細胞を、冷DPBSで1回洗浄し、次いで、4℃で1時間、マウス抗ヒトCD184（CXC4）-IgG2-PE（BD、#555974）によって直接染色した。抗SOX17抗体または抗FoxA2抗体によって染色すべき細胞を、固定緩衝液（BD、#554655）中4℃で25分間まず固定し、氷上でPerm Buffer III（BD、#554656）中で30分間透過処理した。抗SOX17染色を、室温で30分間、マウス抗SOX17 IgG1-PE抗体（BD、#561591）を使用して実施した。抗FoxA2染色を、同一条件下でマウス抗ヒトFoxA2 IgG1（BD、#561589）を使用して実施した。対照細胞試料を、上記のように固定し、抗IgG1-PE抗体（BD、#554680）によって室温で30分間、または抗IgG2-PE抗体（BD、#55574）によって4℃で1時間、染色した。

20

#### 【0268】

次いで、抗体によって染色されたhESC由来細胞を、BD LSRFortessa（商標）セルアナライザーを使用したフローサイトメトリーによって分析した。閾値パラメーターを15,000に設定し；SSCおよびFSCのパラメーターを設定し、SSCを、細胞の集団全体が記録されるデータの範囲内に適合するように設定し；電圧を、未染色の細胞またはアイソタイプ対照抗体によって染色された細胞が $10^3$ 未満の蛍光を有するように設定した。各試料およそ $1 \times 10^6$ 個の細胞を分析した。

#### 【0269】

#### イメージングプロトコール

免疫蛍光イメージングの前に、hESC由来細胞をPBSで室温において3回洗浄し、PBSで希釈された4%メタノール不含ホルムアルデヒドで20分間固定した。次いで、細胞試料を、PBSで室温において3回濯ぎ、ブロッキング緩衝液（ $1 \times$  PBS中0.3%トリトンX-100および5%ヤギ血清）で室温において1時間ブロッキングした。ブロッキング工程の後、細胞試料をPBSで再び3回濯いだ。SOX17発現が検出された細胞試料を、ブロッキング緩衝液中の $2 \mu\text{g/ml}$ マウス抗SOX17クローンP7969一次抗体（BD、#561590）と共に室温で2時間インキュベートした。FoxA2発現が検出された細胞試料を、ブロッキング緩衝液中のウサギ抗FoxA2一次抗体（CS、#3143）の1:500希釈物において室温で2時間インキュベートした。あるいは、これらのインキュベーションは、4℃で一晩実施されてもよい。

30

#### 【0270】

二次抗体による染色の前に、細胞試料をPBSで3回濯いだ。次いで、抗SOX17抗体によって染色された細胞を、 $2 \mu\text{g/ml}$ ヤギ抗マウス-Alexa488二次抗体（Invitrogen、#A11029）と共に室温で1時間インキュベートした。次いで、抗FoxA2抗体によって染色された細胞を、同インキュベーション条件下で、 $2 \mu\text{g/ml}$ ヤギ抗ウサギ-Alexa594二次抗体（Invitrogen、#A11037）と共にインキュベートした。

40

#### 【0271】

二次抗体による染色の後に核染色を実施した。簡単に説明すると、細胞試料を、PBSで3回洗浄し、PBSで $1/10000$ に希釈されたHoechst 33258（Invitrogen、#H3569）によって室温で10分間染色した。インキュベーション後、細胞をPBSで再び洗浄した。次いで、Hoechstによって染色された細胞を、標準的な蛍光顕微鏡技術を使用してZeiss顕微鏡またはPer

50

kin Elmer Operetta系を使用して画像化した。

#### 【0272】

##### AlphaLISAプロトコール

OCT4を検出するためには、細胞をPBSで3回洗浄し、50ul AlphaLISA Lysis Buffer (Perkin Elmer、#AL003C) によって溶解した。溶解緩衝液を各細胞試料へ添加し、細胞と5回混合した。次いで、細胞試料を室温で15分間プレートシェーカーにおいてインキュベートした。次いで、各試料からの5μlの溶解物を、384穴OptiPlate (Perkin Elmer、#6005629) へ移した。5μlの10ug/ml抗ウサギアクセプタービーズ (Perkin Elmer、#AL104M)、および5μlの0.2nMのウサギ抗OCT4抗体 (Cell Signaling、#2890) を各ウェルへ添加し、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、5μlの0.5nMマウス抗OCT4抗体 (BD、#611203) および5μlの0.5nMビオチン化ヤギ抗マウス抗体 (Invitrogen、#B2763) を各ウェルへ添加し、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、10μlのストレプトアビジンドナービーズ (Perkin Elmer、#6760002B) を各ウェルへ添加し、30分間インキュベートした。次いで、Envision Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer、#2104-0010) を使用して、OptiPlatesを分析した。全てのビーズおよび抗体を、必要に応じて、IAB Buffer (Perkin Elmer、#AL000C) + 50mM NaClで希釈した。4つ組のアッセイ法を実施した。

10

#### 【0273】

SOX17を検出するためには、細胞を、PBSで3回洗浄し、50ulのRoche Complete Lysis Buffer (Roche、#04719956001) によって溶解した。溶解緩衝液を各細胞試料へ添加し、細胞と5回混合した。次いで、細胞試料を室温で15分間プレートシェーカーにおいてインキュベートした。次いで、各試料からの5μlの溶解物を、384穴OptiPlate (Perkin Elmer、#6005629) へ移した。5μlの10ug/ml抗ウサギアクセプタービーズ (Perkin Elmer、#AL104M)、および5μlの1nMのウサギ抗SOX17抗体 (Sigma、#AV33271) を各ウェルへ添加し、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、5μlの0.5nMマウス抗SOX抗体 (Sigma、#SAB3300093) および5μlの0.5nMビオチン化ヤギ抗マウス抗体 (Invitrogen、#B2763) を各ウェルへ添加し、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、10μlのストレプトアビジンドナービーズ (Perkin Elmer、#6760002B) を各ウェルへ添加し、30分間インキュベートした。次いで、Envision Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer、#2104-0010) を使用して、OptiPlateを分析した。全てのビーズおよび抗体を、必要に応じて、IAB緩衝液 (Perkin Elmer、#AL000C) で希釈した。4つ組のアッセイ法を実施した。

20

30

#### 【0274】

##### siRNAノックダウンプロトコール

hESC細胞試料を上記のように調製し、アクチビンA単独が補足された基本培地において分化させた。基本培地への継代の際に、脂質ベースのトランスフェクション系 (Lipofectamine RNAimax、Invitrogen、#133778-150) を使用して、下記表3または表4にリストされる適切なsiRNAによって、細胞をトランスフェクトした。細胞をsiRNAと共に20時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を交換し、アクチビンA単独が補足された培地と交換した。PI3Kノックダウン実験の結果は、下記実施例2に示される。AktおよびmTORのノックダウン実験の結果は、下記実施例8に示される。

40

#### 【0275】

##### 実施例2：hESCを使用した内胚葉分化

多様な市販のPI3K阻害物質の内胚葉分化に対する効果を比較した。hESC細胞試料を上記のように調製し、基本培地、またはアクチビンA；アクチビンAおよび50μg/mlヒトWnt3a (R&D、#5036-WN-010)；もしくはアクチビンA、Wnt3A、および下記表1にリストされるPI3K阻害物質のうちの1種が補足された基本培地において分化させた。

#### 【0276】

【表 1】

PI3K 阻害物質	実施例2において用いた濃度
化合物 A	500 nM
ワートマニン	250 nM
PIK90	500 nM
LY294002	5 $\mu$ M

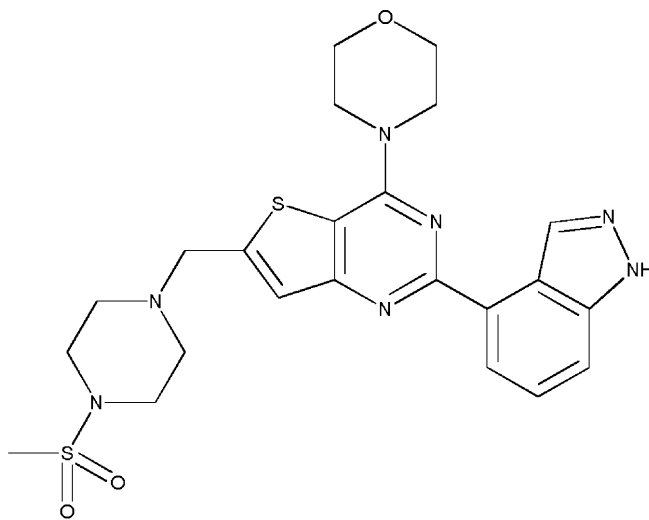
10

## 【 0 2 7 7 】

化合物Aを除き、表1に示される化合物はアイソフォーム選択的PI3K阻害物質ではない。

## 【 0 2 7 8 】

化合物Aの構造は以下に提供される：



20

## 【 0 2 7 9 】

3日の処理の後、フローサイトメトリー分析の準備のため、細胞を採集し、上記のように抗SOX17抗体によって染色した。フローサイトメトリー分析の結果は図1に示される。アクチビンA、Wnt3A、および表1にリストされたP13K阻害物質と共に培養された細胞は、内胚葉への増強された変換を示した。選択的PI3K 阻害物質、化合物Aと共に培養されたhESC細胞は、内胚葉への最も増強された変換を示し、hESC由来細胞の約93.5～93.9%（例えば、93.88%）がSOX17マーカを発現していた。これは、LY294002を含む、試験された他の非アイソフォーム選択的PI3K阻害物質より優れている。

30

## 【 0 2 8 0 】

## 実施例3：Wnt3aは内胚葉への分化に必要なでなかった

増殖因子Wnt3aが内胚葉分化に必要なかどうかを判定するための実験を実施した。hESC細胞試料を上記のように調製し、基本培地；アクチビンA、50  $\mu$ g/ml Wnt3a、および化合物Aが補足された基本培地、またはアクチビンAおよび750nM化合物A単独を含む基本培地において分化させた。3日の処理の後、フローサイトメトリー分析の準備のため、細胞を採集し、上記のように抗SOX17抗体によって染色した。フローサイトメトリー分析の結果は図2に示される。これらの結果は、Wnt3aの非存在下で化合物AおよびアクチビンAと共に培養されたhESC由来細胞が、化合物A、アクチビンA、およびWnt3aと共に培養された細胞よりわずかに低い比較可能な効率で、内胚葉へ変換されたことを示す。図3に示されるように、この効果は、使用された基本培地に依存しなかった。

40

## 【 0 2 8 1 】

## 実施例4：アイソフォーム特異的PI3K阻害物質

50

アイソフォーム特異的（例えば、アイソフォーム選択的）PI3K阻害物質の内胚葉分化に対する効果を比較した。hESC細胞試料を上記のように調製し、下記表2に示されるアイソフォーム特異的PI3K阻害物質および増殖因子が補足された基本培地において分化させた。

【 0 2 8 2 】

【表 2】

PI3K 阻害物質	処理	アイソタイプ
LY294002	AW	通常
化合物 L	AW	$\delta$
化合物 M	AW	$\delta$
化合物 N	AW	$\delta$
化合物 R	AW	$\delta$
化合物 B	A	$\alpha$
化合物 C	A	$\alpha$
化合物 D	A	$\alpha$
化合物 E	A	$\alpha$
化合物 F	A	$\alpha$
化合物 G	A	$\alpha$
化合物 H	A	$\alpha$
化合物 I	A	$\alpha$
化合物 J	A	$\alpha/\delta$
化合物 O	A	$\delta$
化合物 P	AW	$\delta$
化合物 Q	AW	$\delta$
化合物 S	A	$\gamma$
化合物 A	A	$\alpha/\delta$
化合物 K	A	$\beta/\delta$

AW = アクチビンA + Wnt3a

A = アクチビンA単独

10

20

30

40

50

## 【 0 2 8 3 】

3日の処理の後、フローサイトメトリー分析の準備のため、細胞を採集し、上記のように抗SOX17抗体によって染色した。分析の結果は図4に示される。これらの結果は、PI3Kアイソフォーム、またはPI3K アイソフォームおよびPI3K アイソフォームの両方に特異的に影響するPI3K阻害物質が、他のPI3Kアイソフォームの阻害物質より効果的に、内胚葉分化を増強することを示している。内胚葉分化に対して最も顕著な効果を示す阻害物質は、PI3K アイソフォームおよび アイソフォームの両方を阻害する化合物Aおよび化合物Jであった。化合物Jと共に培養されたhESC由来細胞の約69.15%、および化合物Aと共に培養されたhESC由来細胞の約77.35%が、内胚葉特異的マーカーSOX17を発現した。

## 【 0 2 8 4 】

siRNAを使用して特異的なPI3Kアイソフォームの発現を阻害するノックダウン実験において、これらの結果を確認した。簡単に説明すると、基本培地への継代の際に、20nMの陰性対照siRNA、20nMのPI3K 特異的siRNA (即ち、10nM s10520および10nM s10521)、20nMのPI3K 特異的siRNA (即ち、10nM s10524および10nM s10525)、20nMのPI3K 特異的siRNA (即ち、10nM s10529および10nM s10530)、または各20nMのPI3K 特異的siRNA、PI3K 特異的siRNA、およびPI3K 特異的siRNA (即ち、各10nMのs10520、s10521、s10524、s10525、s10529、およびs10530)によってhESCをトランスフェクトした。前記のsiRNAは、Life Technologiesから市販されており、下記表3に示される。細胞をsiRNAと共に20時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を交換し、100ng/mlアクチビンAが補足された培地と交換した。750nMのPI3K阻害物質、化合物Aが補足されたアクチビンAを含む基本培地においてhESC細胞を分化させる対照試料を調製した。

## 【 0 2 8 5 】

【表 3】

条件	siRNA ID	濃度
PI3K $\alpha$	s10521	10nM
	s10520	10nM
PI3KD	S10530	10nM
	S10529	10nM
PI3KB	S10524	10nM
	S10525	10nM
PI3K ALPHA + PI3KB + PI3KD	s10521	10nM
	s10520	10nM
	S10530	10nM
	S10529	10nM
	S10524	10nM
	S10525	10nM
陰性対照	陰性対照#1	20 nM

## 【 0 2 8 6 】

3日の処理の後、フローサイトメトリー分析の準備のため、細胞を採集し、上記のように抗SOX17抗体または抗FoxA2抗体によって染色した。この分析の結果は図5に示される。P

13K 特異的siRNAと共に培養されたhESC由来細胞は、高い内胚葉変換率を示し、細胞の68%がSOX17を発現し、かつ細胞の62%がFoxA2を発現していた。対照的に、PI3K 特異的siRNA、PI3K 特異的siRNA、またはPI3K 特異的siRNAおよびPI3K 特異的siRNAの両方と共に培養されたhESC由来細胞は、低い内胚葉変換率を示し、細胞の約25%がSOX17を発現し、かつ細胞のおよそ10%がFoxA2を発現していた。PI3K アイソフォームに特異的なsiRNAは、内胚葉変換を増加させるが、PI3K アイソフォームおよびPI3K アイソフォームに特異的なsiRNAは、そうでないことが見出された。

【0287】

#### 実施例5：内胚葉分化についての時間経過

10  
アクチビンAおよび化合物Aが補足された基本培地において培養されたhESC由来細胞の変換効率および分化効率を決定するため、時間経過実験を実施した。hESC細胞を上記のように培養し、Wnt3aを欠き、アクチビンAおよび750nM化合物Aが補足された基本培地において分化させた。6個の細胞試料を調製した。化合物A+アクチビンAによる処理の24時間後に開始して、6日間、1日1個の細胞試料を採集した。hESC由来細胞試料を、フローサイトメトリー分析の準備のため、抗SOX17抗体、抗FoxA2抗体、または抗CXCR4抗体によって染色した。

【0288】

図6に示されるように、変換効率は、3日目に高くなりプラトーに達し始める。分化効率は、hESC由来細胞の91%がSOX17を発現し、87%がFoxA2を発現し、かつ82%がCXCR4を発現する、5日目に最も高かった。これらの結果は、アクチビンA+化合物Aによって処理されたhESC細胞の内胚葉分化が、時間依存性であることを示す。

【0289】

#### 実施例6：用量応答

内胚葉分化を最も効果的に増強する化合物Aの濃度を決定するため、用量応答実験を実施した。hESC細胞を上記のように培養し、Wnt3aを欠き、アクチビンAおよび0nM、100nM、250nM、500nM、750nM、または1000nM化合物Aが補足された基本培地において分化させた。未分化ヒト胚性幹細胞を上記のように維持した。3日の処理の後、フローサイトメトリー分析の準備のため、細胞を採集し、上記のように抗SOX17抗体によって染色した。

【0290】

30  
用量応答実験の結果は図7に示される。SOX17発現は、化合物Aの濃度の増加と共に増加する。アクチビンAおよび750nM化合物Aが補足された基本培地において培養されたhESC細胞は、最も増強された内胚葉分化を示し、hESC由来細胞の84%がSOX17を発現していた。これらの結果は、SOX17およびFoxA2の発現をモニタリングするイメージング実験において確認された。

【0291】

抗SOX17抗体および抗OCT4抗体を使用して上記のように実施されたイムノアッセイ法（AlphaLISA（登録商標）、Perkin Elmer）は、750nMまで、化合物Aの濃度の増加と共に、hESC由来細胞におけるSOX17発現が増加し、幹細胞マーカーOCT4の発現が減少することを確認した。これは、内胚葉分化が幹細胞多能性の減少と同時発生することを示す。

【0292】

#### 実施例7：生存率および増殖

40  
アクチビンAおよび化合物Aによる処理によって入手された内胚葉細胞の生存率および増殖をモニタリングするため、時間経過を実施した。多様な培養条件を試験した。hESC細胞を上記のように培養し、Wnt3aを欠き、アクチビンAおよび750nM化合物Aが補足された基本培地において；TesR（商標）2において；基本培地単独において；またはアクチビンA、Wnt3a、および5μM LY294002が補足された基本培地において分化させた。各条件下で培養されたhESC由来細胞を、標準的なプロトコールに従って、RocheのxCELLigence Systemを使用して、培地交換なしに、12日間、1日1回、増殖および生存率についてアッセイした。

【0293】

xCELLigenceは、インピーダンスシグナルの関数として増殖および生存率を測定した。

50

高いインピーダンスシグナルは、増加した増殖に関連している、培養皿の表面への細胞付着を示した。対照的に低いインピーダンスシグナルは、細胞死に関連している、培養皿の表面からの細胞の剥離を示した。図8に示されるように、アクチビンAおよび化合物Aによる処理によって入手された内胚葉細胞は、4日目を過ぎても生存可能で増殖性のままである。対照的に、幹細胞、ならびにアクチビンA、Wnt3a、およびLY294002による処理によって入手された内胚葉細胞は、4日目に細胞死を示し始める。図8に結果が示される実験は、2つ組で実施された。従って、各条件について2本の曲線が存在する。

#### 【0294】

これらの結果を、標準的なプロトコールに従って、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega、#G7571) を使用して確認し、Perkin ElmerからのEnVision (登録商標) Multilabel Readerを使用して分析した。このアッセイ法において、試験された各試料の中の代謝的に活性な細胞を、試料によって産生されたATPレベルの関数として定量化した。簡単に説明すると、幹細胞、自然分化によって入手された内胚葉細胞、アクチビンA処理によって入手された内胚葉細胞、ならびにアクチビンおよび10nM、25nM、50nM、100nM、250nM、500nM、750nM、1  $\mu$ M、または1.5  $\mu$ Mのいずれかの化合物Aによる処理によって入手された内胚葉細胞を、処理の開始から3日後および7日後にCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assayを使用して試験した。図9に示されるように、アクチビンAおよび100nM、250、500、750、1  $\mu$ M、または1.5  $\mu$ Mの化合物Aによる処理によって入手された内胚葉細胞は、7日目に、他の条件の下で培養された細胞より高い生存率を示した。

#### 【0295】

#### 実施例8：安定な内胚葉

表現型的に安定しておりかつ拡張可能である（即ち、増殖性である）内胚葉の作製は、ヒト細胞 (Seguin, et al. (2008) "Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells." Cell Stem Cell, 3(2):182-19; Cheng, et al. (2012). "Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells." Cell Stem Cell, 10(4):371-384) およびマウス細胞 (Morrison, et al. (2008). "Anterior definitive endoderm from ESCs reveals a role for FGF signaling." Cell Stem Cell, 3(4):402-415) によって以前に試みられている。ある種の内胚葉分化プロトコールは、CXCR4<sup>+</sup>細胞を入手するための高コストで労働集約的な分取工程を含む。（例えば、異なるレポーター株および異なる増殖因子を使用した）異なる戦略が、安定な内胚葉を開発するために使用されたが、これらの戦略は再現性のある結果に至っていない。

#### 【0296】

上記実施例5における時間経過実験は、アクチビンAおよび化合物Aが補足された基本培地においてhESC由来細胞を培養した場合、6日間、内胚葉のマーカーの発現が維持されたことを示している（図6）。これらのデータに基づき、6日を超えて、特に継代の間、この内胚葉集団の安定性が拡張され得るかどうかを判定するため、さらなる実験を実施した。

#### 【0297】

AA細胞およびAP細胞の増殖および維持を比較した。

AA細胞：幹細胞（アクチビンA） 内胚葉

AP細胞：幹細胞（アクチビンA+化合物A） 内胚葉

#### 【0298】

上記のフローチャートに示されるように、hESC細胞を実施例5に記載されたように培養し、Wnt3aを欠き、アクチビンA単独（AA細胞）またはアクチビンAおよび750nM化合物A（AP細胞）が補足された基本培地において分化させた。

#### 【0299】

3日目に、分取することなく、AP細胞を、マトリゲルまたはコラーゲンによってコーティングされたフラスコへ直接継代した。Cheng et al. (2012). "Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells." Cell Stem Cell, 10(4), 371-384に記載された以前の研究に基づき、4種の増殖因子、BMP4、FGF2、VEGF、およ



びEGFのカクテルにおいて、AP細胞を維持した。BMP4はSOX17発現を維持するのに必要であった。BMP4なしでは、SOX17発現が急速に減少し、4回目または5回目の継代で失われた（図26を参照のこと）。FGF2、VEGF、およびEGFも、内胚葉増殖にとって重要であることが見出された。これらの因子なしでは、AP細胞は4回目の継代で増殖を中止した。基本培地の選択も重要であった。本発明者らの系においては支持細胞層を使用しなかったため、増殖を改善するために30%MEF条件培地を添加した。図27に示されるように、30%マウス胚性繊維芽細胞（MEF）条件培地が補足されたTesR2培地において、これらの因子と共にAP内胚葉集団を維持することによって、3日目に最高レベルのSOX17発現細胞が作製された。図27のデータは、2回継代された内胚葉細胞から入手された。

#### 【0300】

AP細胞は、10回の継代の間、高度に増殖性であり、これらの最適化された条件の下で、3.5日の倍化時間を有していた（図28を参照のこと）。AA細胞（即ち、アクチビンAのみによって分化したhESC由来幹細胞）も、同一のプロトコールによって維持され得た。しかしながら、AA集団の極一部分（約20%）のみがCXCR4およびFoxA2について陽性であり、AA細胞は4回の継代の後に増殖を中止した。hESC由来幹細胞分化の最初の3日間に、基本培地＋アクチビンAへ化合物Aを添加することにより、分取工程なしに、10回を越える継代の間、増殖性のままである、内胚葉細胞のほぼ純粋な集団の維持（即ち、表現型の維持）が可能となった。化合物Aを基本培地へ添加した場合、AP細胞の集団は、最初の3回の継代の間、Sox17およびFoxA2について陽性の70%を越える細胞を提示した。4回目の継代の後、AP集団はほぼ純粋なままであり、細胞の80～90%がSOX17、CXCR4、およびFoxA2を発現していた。この状況においても、基本培地の選択は重要であった。DMEM/F12＋20%KOSR＋30%MEFにおいて培養された細胞は、2回継代された後に増殖しなかった。

#### 【0301】

SOX17、CXCR4、およびFoxA2の発現を、フローサイトメトリーによってモニタリングし、免疫蛍光および遺伝子発現によって確認した（図29を参照のこと）。免疫蛍光実験は、12回目の継代時に、SOX17がAP細胞によって発現されていることを確認した。AFP発現をモニタリングするために実施された付加的な免疫蛍光実験は、AP内胚葉細胞が12回目の継代時に肝実質細胞様細胞への分化の兆候を示さないことを示した。これらのデータは、基本培地、アクチビンA、および化合物Aにおいて培養された幹細胞に由来するAP細胞集団が、分取工程なし、支持細胞層の使用なしに、10回の継代の間、均質な増殖性の内胚葉集団として安定していたことを示す。

#### 【0302】

##### 実施例9：Akt阻害またはmTOR阻害による内胚葉の作製

PI3K阻害物質は、一般に、AktキナーゼおよびmTORによって媒介されるシグナリングを阻害する。Akt経路またはmTOR経路の直接阻害が効果的な内胚葉作製をもたらすかどうかを調査するため、下記表4にリストされた多様な市販のAkt阻害物質またはmTOR阻害物質のうちの1種が補足された基本培地において、hESC細胞を培養した。hESC細胞を上記のように培養し、Wnt3aを欠き、アクチビンAおよび750nMの表4にリストされた阻害物質のうちの1種が補足された基本培地において分化させた。3日の処理の後、AlphaLISA分析の準備のため、細胞を採集し、上記のように抗SOX17抗体によって染色した。

#### 【0303】

10

20

30

40

【表 4】

標的	名称
mTOR	エベロリムス
mTOR	ピメクロリムス
mTOR	ラパマイシン
mTOR	テムシロリムス
AKT	エンザスタウリン、 遊離塩基
AKT	PKC412
mTOR	AZD 8055
PI3K $\beta$	TGX 221
AKT	GSK 690693
mTOR	PP242

10

20

## 【 0 3 0 4 】

分析の結果は図10に示される。mTOR阻害物質であるエベロリムス、KU0063794、またはWYE-354によって処理されたhESC細胞は、アクチビンA単独において培養された細胞またはAkt阻害物質と共に培養された細胞より良好な内胚葉変換を示した。例えば、エベロリムス、KU0063794、またはWYE-354によって処理された細胞の内胚葉変換は、Akt阻害物質GSK690693によって処理された細胞の内胚葉変換より効率的であった。

## 【 0 3 0 5 】

これらの結果は、フローサイトメトリー実験において繰り返された。hESC細胞を上記のように培養し、Wnt3aを欠き、アクチビンAおよび750nMのエベロリムス、KU00633794、WTE-354、またはGSK690639が補足された基本培地において分化させた。3日の処理の後、フローサイトメトリー分析の準備のため、細胞を採集し、抗SOX17抗体、抗FoxA2抗体、または抗CXCR4抗体によって染色した。この分析の結果は図11に示される。エベロリムス、KU00633794、WTE-354、またはGSK690639によって処理されたhESC細胞は、より高度の内胚葉変換を示す。対照的に、アクチビンA単独において培養されたhESC由来細胞の20%のみがSOX17を発現した。

30

## 【 0 3 0 6 】

これらの結果を、Akt1、Akt2、Akt3、またはmTORに特異的なsiRNAを使用したノックダウン実験において確認した。AKTまたはmTORに特異的なsiRNAを使用して、上記のように、ノックダウン実験を実施した。これらのsiRNAは、Life Technologiesから市販されており、下記表5に示される。細胞をsiRNAと共に20時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を交換し、アクチビンA単独が補足された培地と交換した。750nMのPI3K阻害物質、化合物Aが補足されたアクチビンAを含む基本培地においてhESC細胞を分化させる対照試料を調製した。

40

## 【 0 3 0 7 】

【表 5】

siRNA ID	遺伝子記号
s659	AKT1
s660	AKT1
s1216	AKT2
s1217	AKT2
s19429	AKT3
s19427	AKT3
s603	MTOR
s604	MTOR

10

## 【0308】

図12に示されるように、mTOR発現の阻害は、内胚葉変換を増加させ（hESC由来細胞の約61%がSOX17を発現し、かつ細胞の約40%がFoxA2を発現していた）、PI3K 発現の阻害も同様であった（hESC由来細胞の約57%がSOX17を発現し、かつ細胞の約38%がFoxA2を発現していた）。Akt1、Akt2、またはAkt3の発現の阻害は、mTORの阻害ほど有意に内胚葉変換を増加させない。

20

## 【0309】

実施例10：PI3K およびmTORの阻害の相加的または相乗的な効果

PI3K およびmTORの発現の同時ノックダウンが内胚葉分化に対して相加的または相乗的な効果を有するかどうかを判定するため、ノックダウン実験を実施した。基本培地への継代の際に、20nMの陰性対照siRNA、20nMのPI3K 特異的siRNA、20nMのmTOR特異的siRNA、または各20nMのPI3K 特異的siRNAおよびmTOR特異的siRNAのいずれかによって細胞をトランスフェクトした。細胞をsiRNAと共に20時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を交換し、アクチビンAおよび750nMのPI3K阻害物質、化合物Aが補足された基本培地、またはアクチビンA単独が補足された基本培地と交換した。3日後、フローサイトメトリー分析の準備のため、細胞試料を採集し、抗SOX17抗体または抗FoxA2抗体によって染色した。

30

## 【0310】

分析の結果は図13に示される。PI3K 発現およびmTOR発現の同時ノックダウンは、PIK 発現単独（hESC由来細胞の33%がSOX17を発現し、かつ細胞の39%がFoxA2を発現していた）またはmTOR発現単独（hESC由来細胞の76%がSOX17を発現し、かつ細胞の69%がFoxA2を発現していた）のいずれかのノックダウンより高いレベルの内胚葉変換を促進する（hESC由来細胞の86%がSOX17を発現し、かつ細胞の85%がFoxA2を発現していた）。PI3K およびmTORの発現の非存在下での内胚葉変換率は、PI3K 阻害物質のものと比較可能であった。

40

## 【0311】

実施例11：中内胚葉、内胚葉、および中胚葉のマーカー遺伝子の発現に対する様々な濃度のmTOR阻害物質およびPI3K 阻害物質の組み合わせの効果のモニタリング

上記のように、mTOR阻害およびPI3K阻害の組み合わせ効果は、mTOR阻害単独またはPI3K 阻害単独と比べてより高いレベルの内胚葉変換を促進した。次いで、個々の内胚葉マーカー遺伝子の発現に対するmTOR阻害およびPI3K阻害の組み合わせ効果を評価するため、様々な濃度のmTOR siRNA（0、0.2nM、2nM、および20nM）および様々な濃度のPI3K siRNA（0、0.2nM、2nM、および20nM）を使用して、4×4用量応答行列実験を実施した。上記のよ

50

うに、幹細胞分化をアクチビンAの存在下で実施し、中内胚葉マーカー遺伝子DKK1、EOMES、FGF17、FGF8、GATA6、MIXL1、ブラキュリ(T)、WNT3a、GSC、LHX1、およびTBX6、ならびに内胚葉マーカー遺伝子CDH2、CER1、CXCR4、FGF17、FoxA2、GATA4、GATA6、HHEX、HNF1B、KIT、SOX17、およびTDGF1の発現を、1日目および2日目に分析した。

#### 【0312】

より高い濃度のmTOR siRNAを使用した場合、1日目に、大部分の中内胚葉遺伝子が明白に上方制御され、このことから、中内胚葉形成におけるmTORの優勢な役割が確認された(図18および19)。マーカー遺伝子発現に対するPI3K 阻害の効果は、分析されたマーカー遺伝子に依って変動した。DKK1、FGF17、MIXL1のようないくつかのマーカーについて、mTOR阻害は、PI3K 阻害なしですら、発現に対する強力な効果を有した。LHX1、GATA6、EOMES、GSC、およびTBX6のようなその他のマーカーについては、最大発現に達するためにPI3K 阻害が必要であった(図18および19)。

10

#### 【0313】

2日目、内胚葉マーカーの大部分が、最高発現レベルに達するために、PI3K およびmTORの両方の阻害を必要とした(図20)。いくつかのマーカー、例えば、FoxA2については、発現レベルに対するmTORおよびPI3K の阻害の等価な寄与が存在した。他のマーカー、例えば、CER1、Hhex、およびFGF17については、PI3K 阻害が内胚葉遺伝子発現を強く上方制御したが、それは、mTOR阻害が既に遺伝子発現をあるレベルにまで上昇させていた時のみであった。マーカーCXCR4については、mTOR単独では発現を上方制御するのに十分でなく、PI3K 阻害が必要とされた。

20

#### 【0314】

異なる程度のmTOR阻害およびPI3K 阻害の、中胚葉マーカー遺伝子PDGFRα、BMP4、GATA4、HAND1、ISL1、NCAM1、NKX2-5、TBX6、およびT(ブラキュリ)の発現に対する効果を分析するため、上記のように、4×4用量応答行列実験を実施し分析した(図21)。PI3K 阻害は、中胚葉マーカーに対して独特の効果を有した(図21)。低濃度のPI3K siRNAですら、mTOR阻害によって典型的に引き起こされる中胚葉マーカーISL1、NKX2-5、および外胚葉マーカーNCAM1の高い発現を防止した。mTOR siRNAの濃度の増加は、中胚葉マーカー遺伝子の発現の増加と相関した。さらに、PI3K siRNAの濃度の増加が、このmTOR阻害の効果に対抗するのに必要であった。重要な中胚葉マーカーBMP4については、高度のPI3K 阻害のみが、その上方制御を防止した。興味深いことに、中胚葉マーカー、ブラキュリを下方制御するためには、mTORおよびPI3K の両方の阻害が必要とされた。

30

#### 【0315】

用量行列実験は、中内胚葉、内胚葉、および中胚葉のマーカー遺伝子の発現におけるmTOR阻害およびPI3K 阻害の別個の役割を確認した。さらに、異なるレベルのmTOR阻害およびPI3K 阻害は、マーカー遺伝子の発現に対して特別な効果を有した。中内胚葉形成のためには、mTOR阻害が重要である。この段階で、高度のPI3K 阻害の寄与は、mTOR阻害効果の増強にあるが、PI3K 阻害は、mTOR阻害によってより少ない影響を受けるマーカー(例えば、LHX1)に寄与する重要な因子でもあり得る。中内胚葉の内胚葉へのさらなる分化については、PI3K およびmTORの両方の阻害が、内胚葉マーカー遺伝子の最高発現を得るために必要とされる。PI3K 阻害は、他の系統、特に、中胚葉が形成されるのを防止するため、この段階において不可欠である。

40

#### 【0316】

##### 実施例12：内胚葉分化を促進する低分子阻害物質の特徴決定

上記のsiRNA用量応答行列実験は、その阻害が内胚葉形成に必要である重要な標的、PI3K およびmTORを同定し、中内胚葉、内胚葉、および中胚葉のマーカー遺伝子の発現におけるmTOR阻害およびPI3K 阻害の別個の役割を調査するために実施された。従って、低分子阻害物質が、内胚葉形成を促進する能力についてスクリーニングされた。しかしながら、特異的な標的に対する異なる低分子が、さらに異なる効力およびアイソフォーム特異性を有する可能性がある。さらに、そのような化合物は、しばしば、分化に影響し得るオフターゲット効果も有し、化合物は、高濃度で細胞に対して毒性である場合がある。内胚葉

50

分化を促進するための（例えば、4×4用量応答行列実験において同定される）PI3K およびmTORの阻害の最適な均衡を提供する化合物を同定するために実験を実施した。

【0317】

特徴決定の拡張を容易にするため、後の実験において使用するための化合物の各々の最適濃度を決定することが必要であった。各化合物の最適濃度は、内胚葉分化の最も高い効率および低い毒性という2個のパラメーターに基づき決定された。各化合物を用量応答様式でアクチビンAを用いて試験した。対照と比較して30%を超える細胞死を引き起こすことなく、3日目に、最も高いSOX17発現細胞%を与える濃度を、各化合物について決定した。この分析の結果は図22に示される。分化の収率は3日目に4%～81% SOX17+細胞になった。

10

【0318】

これらの化合物を、内胚葉形成およびPI3K/AKT/MTOR経路に対する効果に関してさらに特徴決定し、これらの結果を、上記の用量行列実験からの所見と比較した。PI3K/AKT/MTOR経路に対する各化合物の効果を、二つの手段で、つまり、キナーゼプロファイル（図23）およびホスホイメーキングアッセイ法（即ち、mTORまたはAKTのリン酸化型に特異的な抗体を使用した免疫蛍光アッセイ法）によって評価した。インビトロキナーゼプロファイル決定は、PI3K細胞シグナリング経路内の多数の標的についての阻害率を提供し、細胞に基づくイメージングアッセイ法は、分化のために使用された細胞系におけるリン酸化Aktおよびリン酸化mTORに対する各化合物の効果を直接可視化するために実施された。図23に示されるように、D1066、PKC、およびPalomid 529は、mTORまたはAktのリン酸化の低下を示さなかった。さらに、これらの化合物は、細胞に基づくイメージングアッセイ法において、AktまたはmTORのリン酸化に対する効果を示さなかった。PKC412は、リン酸化の強力な低下を示したが、毒性である可能性がある。これらのアッセイ法に基づき、化合物を、AKT阻害物質、MTORC1阻害物質、MTORC1/2阻害物質、および2重PI3K/MTOR阻害物質の4つのカテゴリへ類別した（下記表6）。

20

【0319】

【表6】

化合物ID	PI3K $\alpha$ _MTOR スコア	平均(平均 (リン酸化MTOR_ 60m_C% スポット#))	最大(平均 (リン酸化AKT_ 60分_強度))	グループ
AT7867	PI3K $\alpha$ _MTOR-	73.59	122.15	AKT
AZD 8055	PI3K $\alpha$ _MTOR+++	15.8	89.81	MTORC1/2
エベロリムス	PI3K $\alpha$ +_MTOR+	36.46	99.76	MTORC1
G-00049594.23-1	PI3K $\alpha$ _MTOR-	62.47	114.75	AKT
GDC0941 - PC	PI3K $\alpha$ +++ _MTOR++	17.71	85.7	二重 PI3K/MTOR
GDC0980	PI3K $\alpha$ +++ _MTOR+++	9.99	87.61	二重 PI3K/MTOR

30

40

化合物ID	PI3K $\alpha$ _MTOR スコア	平均(平均 (リン酸化MTOR_ 60m_C% スポット#))	最大(平均 (リン酸化AKT_ 60分_強度))	グループ
GSK2126458	PI3K $\alpha$ +++_MTOR+++	15.55	86.8	二重 PI3K/MTOR
KU0063794	PI3K $\alpha$ +_MTOR+++	25.83	91.25	MTORC1/2
NVPBEZ235	PI3K $\alpha$ +_MTOR++	43.44	88.3	二重 PI3K/MTOR
NVPBKM120	PI3K $\alpha$ +++_MTOR+++	60.28	91.48	二重 PI3K/MTOR
PI103	PI3K $\alpha$ +++_MTOR+++	5.59	83.58	二重 PI3K/MTOR
PIK90	PI3K $\alpha$ +++_MTOR++	42.17	86.72	二重 PI3K/MTOR
PKI 587	PI3K $\alpha$ +_MTOR+++	77.99	91.07	二重 PI3K/MTOR
ラパマイシン	PI3K $\alpha$ +_MTOR+	57.77	99.75	MTORC1
テムシロリムス	PI3K $\alpha$ _MTOR-	42.12	95.21	MTORC1
トリン1	PI3K $\alpha$ +_MTOR+++	66.6	89.48	MTORC1/2
ワートマニン	PI3K $\alpha$ +++_MTOR+	10.47	89.77	PI3K
WYE - 354	PI3K $\alpha$ ++_MTOR+++	10.49	89.35	二重 PI3K/MTOR
WYE-125132	PI3K $\alpha$ _ _MTOR+++	17.55	86.7	MTORC1/2
WYE-687	PI3K $\alpha$ +_MTOR+++	12.81	86.65	MTORC1/2

## 【 0 3 2 0 】

表6のカラム2において、PI3K \_MTORスコアは、化合物のPI3K およびmTORのリン酸化を阻害する能力を反映しており、+は最小の阻害、+++は最大の阻害を示す。表6のカラム3において、スコアは、化合物によって処理された細胞における（蛍光強度によって測定される）リン酸化mTORと、化合物によって処理されなかった細胞における（蛍光強度によって測定される）リン酸化mTORとの比を示す。表6のカラム4において、スコアは、化合物によって処理された細胞における（蛍光強度によって測定される）リン酸化AKTと、化合物によって処理されなかった細胞における（蛍光強度によって測定される）リン酸化AKTとの比を示す。AKT阻害物質の報告されている効果は、リン酸化AKTの増加である。

## 【 0 3 2 1 】

10

20

30

40

50

内胚葉分化に対する各化合物の効果を、多数の関連する系統マーカーの発現をランク付けることによって評価した。各化合物に、試験された他の化合物と比べた、単一マーカー発現に対する効果についてのスコアを与え、中内胚葉、内胚葉、および中胚葉の形成についての総合スコアを得た。より高いスコアは、特異的な系統（例えば、中内胚葉、内胚葉、または中胚葉）からのマーカー遺伝子が高度に発現されていることを示した。各化合物についてのスコアを、以下の通りに決定した：特定の化合物＋アクチビンAの存在下で培養された細胞と、アクチビンA単独において培養された細胞との間で、マーカー遺伝子発現を比較した。発現レベルの比が<1であった場合、そのマーカー遺伝子には0のスコアを与えた。発現レベルの比が、1～全化合物の中央発現レベルの間にあった場合、そのマーカー遺伝子には1のスコアを与えた。発現レベルの比が、中央発現レベル～全化合物の最大発現レベルの70%の間にあった場合、そのマーカー遺伝子には2のスコアを与えた。発現レベルの比が、全化合物の最大発現レベルの70%～全化合物の最大発現レベルの間にあった場合、そのマーカー遺伝子には3のスコアを与えた。モニタリングされた内胚葉マーカー遺伝子は、CER1、CXCR4、FGF17、FoxA2、HNF1B、SOX17であり；モニタリングされた中胚葉マーカー遺伝子は、BMP4、ISL1、KDR、HAND1であり；モニタリングされた中内胚葉マーカー遺伝子は、DKK1、EOMES、MIXL1、GATA4、GATA6、LHX1、WNT3a、T、GSC、TBX6であった。

10

#### 【0322】

この分析の結果は図24に示される。MTORC1阻害物質および二重PI3K/MTOR阻害物質は、中内胚葉マーカーの最も高い発現を誘導した。MTORC1/2阻害物質およびAKT阻害物質は、二重PI3K/MTOR阻害物質と比較して、中内胚葉形成に対して強力な効果を示さなかった。二重PI3K/MTOR阻害物質は、内胚葉マーカーの最も高い発現を誘導した。しかしながら、実施例10において既に示されたように、異なるPI3K/MTOR阻害物質は、各内胚葉マーカー遺伝子の発現レベルに対して異なる効果を有し、二重PI3K/MTOR阻害物質とmTORC1との差は、マーカーに依って有意性が異なっていた。

20

#### 【0323】

図25に示されるように、各内胚葉マーカーの発現レベルは、試験された各化合物によって異なる影響を受ける。興味深いことに、MTORC1阻害物質は、SOX17およびFOXA2のような重要な内胚葉遺伝子の発現を増加させることができたが、その発現がMTORC1阻害物質によって増加しなかった他の重要な内胚葉マーカー遺伝子の中にCXCR4があった。MTORC1阻害物質は、いくつかの二重PI3K/MTOR阻害物質と比較可能なレベルで、基線と比較してSOX17およびFoxA2の発現を増加させた。しかしながら、MTORC1阻害物質はCXCR4発現を増加させず、そのことから、実施例10において示されたCXCR4発現のためのPI3K阻害の重要性が確認された。中胚葉マーカー遺伝子発現については、MTORC1阻害物質が、二重PI3K/MTOR阻害物質よりはるかに高いスコアを示した。興味深いことに、MTORC1阻害物質は、内胚葉マーカー遺伝子SOX17およびFOXA2の発現を上方制御することができたが、内胚葉マーカー遺伝子CXCR4の発現は上方制御しなかった。

30

#### 【0324】

これらの結果は実施例10からの観察と関連する：mTOR阻害は、中内胚葉形成のため、1日目に重要な役割を有していた。2日目には、PI3KおよびmTORの両方の阻害が、内胚葉形成のために重要であり、PI3K阻害が、中胚葉が形成されるのを防止するために特に重要である。

40

#### 【0325】

#### 実施例13：肝実質細胞分化

#### 肝実質細胞マーカー

下記のフローサイトメトリー実験および蛍光イメージング実験において、肝実質細胞への内胚葉細胞の分化をモニタリングするため、多様な細胞型特異的マーカーを使用した。内胚葉変換を検出するため、内胚葉由来細胞試料を、肝実質細胞によって発現されるが内胚葉細胞によっては発現されないAFPタンパク質またはHNF4aタンパク質の発現について染色した。

50

## 【 0 3 2 6 】

肝実質細胞分化プロトコール

未分化ヒト胚性幹細胞 (hESC) を、TesR (商標) 2培地 (STEMCELL (商標) Technologies #05860) において、最適化マトリゲル支持細胞層 (BD、#354277) 上で、40,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で維持した。培養物を週2回手動で継代した。内胚葉分化の準備をするため、hESC細胞を、TesR (商標) 2培地へ一晩継代した。翌日、TesR (商標) 2培地を、基本培地 (B27 (Invitrogen、#17504-044) が補足されたDMEM/F12 + Glutamax (Invitrogen、#10565)) と交換した。基本培地には、100 µg/ml ヒトアクチビンA (Peprotech、#120-14) および750nM化合物Aが補足されていた。3日の処理の後、hES由来内胚葉細胞を、肝芽細胞培地 (B27 (Invitrogen、#17504-044) が補足されたDMEM/F12 + Glutamax (Invitrogen、#10565)) において分化させた。示された場合には、肝芽細胞培地に、10ng/ml、20ng/ml、もしくは40ng/mlの組換えヒトFGF2 (Peprotech、#AF-100-18B) ; 10ng/ml、20ng/ml、もしくは40ng/mlの組換えヒトFGF4 (Peprotech、#AF-100-31) ; 20ng/ml、40ng/ml、もしくは60ng/mlの組換えヒトBMP2 (Peprotech、#AF-120-02) ; 20ng/ml、40ng/ml、もしくは60ng/mlの組換えヒトBMP4 (Peprotech、#AF-120-05) ; または0.25%もしくは0.5% DMSOを補足した。10日の処理の後、内胚葉由来細胞をTrypLEを使用して採集した。簡単に説明すると、細胞を、PBSで1回洗浄し、37 °Cで5分間TrypLEと共にインキュベートした。次いで、インキュベートされた細胞をPBSで10倍希釈し、ペレット化し、さらなる分析のために準備した。

10

## 【 0 3 2 7 】

20

フローサイトメトリープロトコール

フローサイトメトリー分析の前に、Accutaseによって解離させた内胚葉由来細胞試料を、抗AFP一次抗体によって染色し、続いて、二次抗体によって染色した。

## 【 0 3 2 8 】

採集された内胚葉由来細胞を、冷DPBSによって洗浄した。次いで、細胞を、4 °Cで25分間、固定緩衝液 (BD、#554655) で固定し、サポニンベースのPerm/Wash Buffer I (BD、#557885) によって15分間透過処理し、透過処理緩衝液中のマウスモノクローナル抗AFP Clone C3 IgG2a (Sigma、#A8452) の1:500希釈物によって染色した。室温での30分のインキュベーションの後、細胞を、透過処理 / 洗浄緩衝液で2回洗浄し、次いで、20 µlのラット抗マウスIgG2a-PE二次抗体 (BD、#340269) によって室温で25分間染色した。細胞を、フローサイトメトリー分析前に透過処理 / 洗浄緩衝液でさらに3回洗浄した。

30

## 【 0 3 2 9 】

さらに、アクチビンAおよび化合物Aが補足された基本培地において培養された内胚葉細胞を、陰性対照として染色した。高分化肝細胞癌に由来するHepG2細胞も、陽性対照として染色した。細胞を上記のようなフローサイトメトリーによって分析した。1試料当たりおよそ $1.5 \times 10^6$ 個の細胞を分析した。

## 【 0 3 3 0 】

イメージングプロトコール

免疫蛍光イメージングの前に、AFP発現を検出するため、内胚葉由来細胞試料を染色した。まず、内胚葉分化について上記の方法および材料に記載されたように、細胞試料を抗体染色のために準備した。AFP発現を検出すべき細胞試料を、ブロッキング緩衝液中のマウス抗AFPクローンC3一次抗体 (Sigma、#A8452) の1:500希釈物において4 °Cで一晩インキュベートした。HNF4a発現を検出すべき細胞試料を、ブロッキング緩衝液中のウサギモノクローナル抗HNF4aクローンC11F12 (Cell Signaling、#3113) の1:100希釈物において4 °Cで一晩インキュベートした。次いで、抗AFP抗体によって染色された細胞を、室温で1時間、2 µg/ml ヤギ抗マウス-Alexa488二次抗体 (Invitrogen、#A11029) と共にインキュベートした。次いで、抗HNF4a抗体によって染色された細胞を、同インキュベーション条件下で、2 µg/ml ヤギ抗ウサギ-Alexa594二次抗体 (Invitrogen、#A11037) と共にインキュベートした。

40

## 【 0 3 3 1 】

50



次いで、染色された細胞を、内胚葉細胞について上に記載されたように画像化した。

【0332】

実施例14：増殖因子の非存在下での肝実質細胞分化

内胚葉細胞を、増殖因子の異なる組み合わせによって処理し、肝実質細胞へ分化する能力について試験した。hESCを、上記のように、内胚葉細胞へ分化させた。アクチビンAおよび化合物Aが補足された基本培地において3日培養した後、内胚葉細胞を肝芽細胞培地においてマトリゲル上で培養した。培地には、10ng/ml、20ng/ml、もしくは40ng/mlの組換えヒトFGF2；10ng/ml、20ng/ml、もしくは40ng/mlの組換えヒトFGF4；20ng/ml、40ng/ml、もしくは60ng/mlの組換えヒトBMP2；20ng/ml、40ng/ml、もしくは60ng/mlの組換えヒトBMP4；または0.25%もしくは0.5%DMSOを補足した。アクチビンAおよび化合物Aとの3日の培養によって入手された内胚葉細胞の対照試料を、付加的な増殖因子の非存在下で、肝芽細胞培地においてさらに培養した。10日の処理の後、内胚葉由来細胞を、上記のようにフローサイトメトリーおよびイメージング分析のために準備した。幹細胞を除き、上記の全ての条件の下で培養された内胚葉細胞が、肝実質細胞へ分化した。

10

【0333】

アクチビンAおよび化合物Aによる処理によって入手された内胚葉細胞が肝実質細胞へ分化し得ることを確認するため、上記の実験を繰り返した。アクチビンA単独との培養によって入手された内胚葉細胞を、付加的な増殖因子の非存在下で、肝芽細胞培地において培養する、付加的な対照試料を調製した。各培養物中の培地を2日毎に交換し、フローサイトメトリー分析の準備のため、細胞を採集し、染色した。

20

【0334】

この分析の結果は図14に示される。アクチビンA単独による処理によって入手された内胚葉細胞を、その後、FGF4およびBMP2の非存在下で肝芽細胞培地において培養したものは、低い肝実質細胞分化を示し、内胚葉由来細胞の7.65%のみがAFPを発現していた。対照的に、アクチビンAおよび化合物Aの存在下での培養によって入手された内胚葉細胞を、その後、FGF4およびBMP2の非存在下で肝芽細胞培地において培養したものは、増加した肝実質細胞分化を示した（細胞の56.79%がAFPを発現していた）。これは、内胚葉分化中のPI3K 阻害物質、化合物Aの添加が、肝実質細胞変換を大いに増強することを示す。

【0335】

アクチビンAおよび化合物Aの存在下での培養によって入手された内胚葉細胞（細胞の53.49%（約53%）がAFPを発現していた）を、その後、FGF4およびBMP2を含有している肝芽細胞培地において培養したものに由来する肝実質細胞と比較して、アクチビンAおよび化合物Aによって処理されてFGF4およびBMP2による処理なしで分化させられた内胚葉細胞に由来する肝実質細胞は、増加した肝実質細胞変換を示し、細胞の56.79%（約56%）がAFPを発現していた。アクチビンAおよび化合物Aの存在下での培養によって入手された内胚葉細胞を、その後、付加的な増殖因子なしで培養したものに由来する肝実質細胞におけるAFP発現のレベルは、HepG2細胞の集団におけるAFP発現のレベルと比較可能であった。これらの結果は、アクチビンAおよび化合物Aによる処理によって入手された内胚葉が、増殖因子の添加なしですら、高い効率で肝実質細胞へ分化し得ることを示している。

30

【0336】

実施例15：肝実質細胞の特徴決定

hESC由来肝実質細胞のAFPの発現を経時的に判定するため、時間経過実験を実施した。簡単に説明すると、hESCを、上記のように、内胚葉細胞へ分化させた。アクチビンAおよび化合物Aが補足された基本培地において3日培養した後、内胚葉細胞を、肝芽細胞培地（B27（Invitrogen、#17504-044）が補足されたDMEM/F12 + Glutamax（Invitrogen、#10565））においてマトリゲル上で培養した。培地を隔日交換した。2個の細胞試料を調製した。1個の細胞試料は、10日目に採集され、上記のように、フローサイトメトリー分析の準備のため、抗AFPによって染色された。第2の細胞試料は、20日目に採集され、フローサイトメトリーのために準備された。図15に示されるように、幹細胞由来肝実質細胞の集団内のAFPを発現している細胞は、10日目（即ち、60%）より20日目（即ち、30%）の方が少

40

50

なかった。これらの結果は、hESC由来肝実質細胞の成熟を示す。

#### 【0337】

図16は、AFPレベルを測定した実験の結果を示す。0日目～3日目：アクチビンAまたはアクチビンA+PI3K阻害物質。4日目～10日目 - DMEM/F12 + Glutamax + B27。分化の10日目に、培地を交換する。24時間後、培地を（範囲内になるよう）1/500に希釈し、Alphalisaによって分析する。PI3K阻害物質を内胚葉段階で使用しない場合、AFPレベルは極めて低い。PI3K阻害物質を内胚葉段階で使用する場合、（1/500に希釈された試料について）倍率はほぼ100倍である。倍率でのデータの表現は、異なる試料/実験の比較を可能にする。倍率 = 細胞と接触した培地のシグナル / 細胞と接触していない未加工培地のシグナル。

#### 【0338】

図17は、20日目の幹細胞由来肝実質細胞上のアルブミンおよびHNF4aを測定した結果を示す。20日目の幹細胞由来肝実質細胞集団：0日目～3日目：アクチビンA+PI3K阻害物質（化合物A）。3日目～20日目：基本培地（DMEM/F12 + glutamax + B27）。

#### 【0339】

さらに、下記のフローチャートに示されるように、AA細胞およびAP細胞が肝実質前駆細胞へ変換される能力を評価した。

AA細胞：幹細胞（アクチビンA） 内胚葉 肝実質細胞

AP細胞：幹細胞（アクチビンA+化合物A） 内胚葉 肝実質細胞

#### 【0340】

特異的な胎児肝臓マーカーであるAFP (Roelandt, et al. (2010). "Human embryonic and rat adult stem cells with primitive endoderm-like phenotype can be fated to definitive endoderm, and finally hepatocyte-like cells." PLoS One, 5(8):e12101) の発現を、肝実質前駆細胞を同定するために使用した。アルブミン、A1AT、およびCK18 (Miki, T. (2011). Hepatic differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. M. Kallos (Ed.), Embryonic Stem cells - Differentiation and pluripotent alternatives (pp. 303-320). InTech.) のような成熟肝実質細胞マーカー遺伝子の発現レベルも、さらに分化した細胞を同定するためにモニタリングした。これらのマーカーは、いずれも、AA内胚葉細胞またはAP内胚葉細胞において3日目に免疫蛍光によって検出されなかった。分化の13日目、AA集団およびAP集団は、異なるレベルのマーカー発現を示した。フローサイトメトリーによる分析は、AA細胞においてはFoxA2およびAFPの発現が検出されず、AP細胞は、60%のFoxA2発現細胞およびほぼ50%のAFP発現細胞を含むことを示した（下記表7を参照のこと）。

#### 【0341】

##### 【表7】

条件	AFP発現細胞%	FoxA2発現細胞%
AA 細胞	3%	7%
AP 細胞	45%	60%

#### 【0342】

培地へのAFPおよびアルブミンの分泌を、Alphalisaアッセイ法によって、異なる時点で検出した（図33および34）。AFP分泌は、AA細胞およびAP細胞の両方について早くも10日目に増加し始め、14日目にプラトーに達した。AP細胞のAFP分泌は、14日目および20日目にほぼ8,000ng/ml/日であり、それはAA細胞より13倍高かった。成熟肝実質細胞のマーカーであるアルブミンは、分化の後期に培地中に検出された。AA細胞について、アルブミン分泌の増加が20日目に検出された。AP細胞によるアルブミン分泌は、早くも14日目に検出され、20日目、分泌されたアルブミンのレベルは、AA細胞と比較して有意に増加していた。AP細胞のアルブミン分泌は、ほぼ3,000ng/mlに達し、それは、同時点でのAA細胞より15

10

20

30

40

50

倍高かった。類似した時間経過を、AlphaLisaによって、A1AT分泌について行った。AA細胞について、分泌されたA1ATのレベルは、試験された全ての時点で検出限界未満であった。対照的に、AP細胞においては、A1AT分泌が、早くも10日目に検出可能であり、20日目に6000ng/ml/日に達した（図35）。20日目のAA細胞とAP細胞との間のこれらの有意差は、免疫蛍光によっても見られた。20日目、AA細胞はAFPを発現していたが、細胞の極一部分のみが残りのマーカーを発現していた。AP細胞の大多数が、20日目に、FoxA2、HNF4a、AFP、アルブミン、A1AT、およびCK18を発現していた。アルブミン、A1AT、およびCK18の高い発現は、AP肝実質細胞様細胞がより成熟した表現型を有することを示す。遺伝子発現分析は、AP細胞におけるAFP、アルブミン、およびA1ATの発現、ならびに経時的に増加するこれらの発現を確認した（図38）。内胚葉マーカーSOX17およびCXCR4は、10日目から、AP細胞において下方制御された（図36）。遺伝子発現分析は、AP肝実質細胞様細胞における付加的な肝臓マーカーの発現も示した：肝臓特異的マーカーAFMおよびAGTX、CYP2C19、CYP2C9、CYP3A4、CYP3A7、CYP7A1を含むCYP酵素、GSTA1のような第II相代謝酵素、SERPINA1、SERPINA3、SERPINA7、TAT、FABP1、転写因子、HNF4a、HNF1B、C/EBPα、HNF1A、FOXA2、FOX A1のような分泌タンパク質、SLC02B1のようなトランスポーター、ならびにIL6RおよびVCAM1のような表面タンパク質（図37）。肝臓マーカーの発現は、AA分化細胞よりAP肝実質細胞様細胞の方が高かった（図37）。

#### 【0343】

CYP活性を質量分析によっても分析した。AP細胞は、24日目に、AA細胞より高いCYP1A1/2、CYP2B6、CYP3A4/5の活性、およびアルデヒドオキシダーゼ（AO）活性を有していた（図38）。さらに、CYP1A1/2活性は、10 μMリファンピシン + 1mMフェノバルビタール + 1 μM 3-メチルコラントレン（3MC）によって、APにおいて誘導可能であった（図39）。

#### 【0344】

従って、AP内胚葉細胞は、複能性であり、系統特異的マーカーを発現する肝実質細胞へ分化することができた。

#### 【0345】

#### 実施例16：臍前駆細胞および/または臍臓細胞への内胚葉細胞分化

複能性内胚葉細胞は、例えば、肝実質細胞、肺細胞、腸細胞、臍前駆細胞、および臍臓細胞を含む、多様な細胞系統へ分化することができる。上記のように作製された内胚葉細胞を、増殖因子の異なる組み合わせによって処理し、臍前駆細胞へ分化する能力について試験する実験を実施した。

#### 【0346】

アクチビンAおよび化合物Aの存在下で、上記のように、幹細胞を培養した。3日の内胚葉分化の後、細胞をさらに臍臓細胞へ分化させた。内胚葉細胞を、50ng/ml FGF10（Pepro tech）、20ng/ml FGF7（Pepro tech）、100ng/ml ノギン（Pepro tech）、およびヘッジホッグ阻害物質と共に3日間培養した。2μMレチノイン酸（Sigma）が添加された同カクテルにおいてさらに4日間、細胞を培養した。この段階で、臍前駆細胞（10日目）を、1μM ノッチ阻害物質DAPT（Sigma）、10mM ニコチンアミド（Sigma）、および50ng/ml エキセンディン4（Tocris）と共に3日間培養した。成熟のため、細胞を、50ng/ml エキセンディン4、50ng/ml EGF（R&D）、および50ng/ml IGF1（R&D）においてさらに7日間培養した。

#### 【0347】

下記のフローチャートに示されるように、AA細胞およびAP細胞の臍前駆細胞へ変換される能力を評価した。

AA細胞：幹細胞 （アクチビンA） 内胚葉 臍前駆細胞

AP細胞：幹細胞 （アクチビンA + 化合物A） 内胚葉 臍前駆細胞

#### 【0348】

分化の12日目、AA細胞とAP細胞との間に、細胞形態学の有意な差が既に認められた。例えば、12日目に、AA細胞およびAP細胞の両方が、クラスタを形成中であった。しかしながら、AP細胞に由来するクラスタは、AA細胞に由来するクラスタより、数が多く、大きかった。臍臓系統へコミットされた分化細胞を同定するため、特異的な臍臓マーカーPdx1の発

現を使用した。遺伝子発現分析の結果は、13日目のAP細胞とAA細胞との間のPdx1発現レベルの有意差を示し、AP細胞におけるPdx1発現は、AA細胞と比較してAP細胞では15倍高かった(図30B)。さらなる成熟の後(20日目)、AP細胞の複数のクラスタにおいて、免疫蛍光によって、インスリンおよびグルカゴンの発現が検出された。対照的に、ほとんどのAA由来細胞が、インスリンまたはグルカゴンの染色を示さなかった。AP集団に由来する膵前駆細胞のクラスタは、新たなインスリン産生を示す、Cペプチド染色についても陽性であった。対照的に、AA集団内のほとんどの細胞がCペプチドを発現していなかった。遺伝子発現データ(図31)は、インスリンおよびグルカゴンが、AP由来膵臓細胞において、AA由来膵臓細胞より高度に発現されていることを確認した。ARX、GLIS3、HNF1a、HNF1b、HNF4a、KRT19、MXN1、RFX6、SERPINA3、ONECUT1、NKX2-2を含む付加的な膵臓マーカーの発現レベルも、AP由来膵臓細胞およびAA由来膵臓細胞においてモニタリングされ、図31に示されるように、これらのマーカーの発現は、AP由来細胞においてAA由来細胞より高かった。内胚葉遺伝子マーカーSOX17およびCXCR4は10日目から下方制御され、FoxA2は分化を通して維持された(図32)。前腸発生についての遺伝子マーカーHNF4aおよびHNF1b(Naujok, et al.(2011). "Insulin-producing Surrogate -cells From Embryonic Stem Cells: Are We There Yet?" *Molecular Therapy*, 19(10), 1759-1768; Kroon et al.(2008). "Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo." *Nat Biotechnol*, 26(4), 443~452; およびD'Amour et al.(2006). "Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol*, 24(11), 1392-1401)は、分化の初期に発現された。後側前腸マーカーMXN1(=HLXB9)(Naujok et al.; Kroon et al.; およびD'Amour et al.)は、10日目にピークに達した。NKX2.2(Naujok et al.; Kroon et al.; およびD'Amour et al.)およびONECUT1(=HNF6)のような膵内胚葉マーカーは、14日目に最高発現に達した。最後に、ホルモン細胞マーカーINS、GLC、およびSSTの発現は、14日目に検出され始めた。特異的な膵臓系統マーカーの発現は、AP細胞が膵臓細胞へ分化し得ることを確認した。

#### 【0349】

三次元培養の可能性を調査するため、AA内胚葉細胞およびAP内胚葉細胞をさらに懸濁液中で分化させた。AA内胚葉細胞およびAP内胚葉細胞は、この過渡期の後に極めて異なる挙動を示した。AA内胚葉細胞は懸濁液中で単細胞のままであったが、AP細胞は早くも6日目にクラスタを形成した。細胞生存率アッセイ法(図30Aを参照のこと)は、AA内胚葉細胞が分化の6日目に懸濁液中で低い生存率を有することを示した。しかしながら、AP内胚葉細胞は、クラスタ内で生存可能であった。AP由来クラスタは、13日目にPdx1発現について陽性であり、細胞が膵臓系統へと発達のコミットされていることを示した(図30B)。さらに、膵臓細胞へ分化中の細胞のみが、クラスタを形成することによって、懸濁液中で生存可能のままでいると考えられる。

#### 【0350】

#### 実施例17: 膵前駆細胞からの膵臓外分泌細胞および膵管細胞の分化

上記のように、膵前駆細胞を作製する。増殖因子、例えば、Shirasawa, S. et al.(2011). "A novel stepwise differentiation of functional pancreatic exocrine cells from embryonic stem cells." *Stem Cells Dev*, 20(6):1071-1078に記載されたようなグルカゴン様ペプチド1(GLP1)、Delaspre, et al.(2013). "Directed pancreatic acinar differentiation of mouse embryonic stem cells via embryonic signaling molecules and exocrine transcription factors." *PLoS One*, 8(1), e54243に記載されたようなデキサメタゾンおよびドルソモルフィンのような化合物、ならびに/またはそれらの組み合わせを、膵外分泌細胞が形成されるよう、膵前駆細胞の培養物へ添加する。

#### 【0351】

膵管細胞を作製するためには、上記のように作製された膵前駆細胞を、Rhodes, J.A., Criscimanna, A., and Esni, F.(2012). "Induction of mouse pancreatic ductal differentiation, an in vitro assay." *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 48(10), 641-649に記載された

ように、EGF、FGF10、PDGF-AAと共に培養する。

【 0 3 5 2 】

実施例18：内胚葉からの肺前駆細胞、甲状腺前駆細胞、および気道前駆細胞の分化

上記のように、内胚葉細胞を作製する。Longmire,et al.(2012). "Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells." Cell Stem Cell, 10(4), 398-411に記載されるように、基本培地に、100ng/ml ノギンおよび10mM SB431542 (TGF 阻害物質) を補足する。24時間後、培地をNkx2-1誘導培地：100ng/ml mWnt3a、10ng/ml mKGF、10ng/ml hFGF10、10ng/ml mBMP4、20ng/ml hEGF、500ng/ml mFGF2、および100ng/ml ヘパリンナトリウム塩 (Sigma) が補足されたcSFDMと交換する。次いで、細胞を、mFGF2 (500ng/ml)、hFGF10 (100ng/ml)、および100ng/ml ヘパリンナトリウム塩 (Sigma) が補足されたcSFDMにおいて7日間培養する。22日目、細胞を、肺成熟培地：Ham's F12培地 + 15mM HEPES (pH7.4) + 0.8mM CaCl<sub>2</sub> + 0.25% BSA + 5mg/ml インスリン + 5mg/ml トランスフェリン + 5ng/ml 亜セレン酸Na + 50nM デキサメタゾン + 0.1mM 8-Br cAMP + 0.1mM IBMX + 10ng/ml KGFにおいて培養する。

10

【 0 3 5 3 】

あるいは、上記のように、内胚葉細胞を作製し、次いで、Mou,et al.(2012). "Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs." Cell Stem Cell, 10(4), 385-397に記載されたように処理する。簡単に説明すると、内胚葉分化の3日目、4μM ドルソモルフィン (BMP阻害物質) または20ng/ml BMP4を含むかまたは含まない500nM A-83-01 (TGF 阻害物質) に、3日間、細胞を曝す。次いで、10ng/ml BMP4、20ng/ml FGF2 + 10nM GSK3i XVに、2~3日間、細胞を曝す。気道前駆細胞を入手するため、20ng/ml BMP7、20ng/ml FGF7、100nM IWR-1 (WNTアンタゴニスト)、および1mM PD98059において、2日間細胞を培養する。

20

【 0 3 5 4 】

実施例19：内胚葉からの腸前駆細胞の分化

上記のように、内胚葉細胞を作製する。Spence,et al.(2010). "Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro." Nature, 470(7332), 105-109に記載されるように、500ng/ml FGF4、500ng/ml Wnt3aによって、最長4日間、内胚葉細胞を処理する。この期間に形成された細胞コロニーを、500ng/ml R-スポンジン1、100ng/ml ノギン + 50ng/ml EGFが補足されたマトリゲルへ移す。

30

【 0 3 5 5 】

あるいは、内胚葉細胞を上記のように作製し、次いで、Cheng,et al.(2012). "Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells." Cell Stem Cell, 10(4), 371-384に記載されたように処理する。簡単に説明すると、分化の3日目、コロニーが形成されるよう、BMP4 (500ng/ml) およびFGF4 (500ng/ml) によって、2日間、内胚葉細胞を処理する。次いで、37℃での1時間のコラゲナーゼB処理によってマトリゲルを消化することによって、コロニーを採集する。次いで、コロニーを、FGF4 (50ng/ml)、Wnt3a (100ng/ml)、R-スポンジン1 (500ng/ml)、EGF (50ng/ml)、およびノギン (100ng/ml) が補足された未希釈マトリゲル (BD) と混合する。

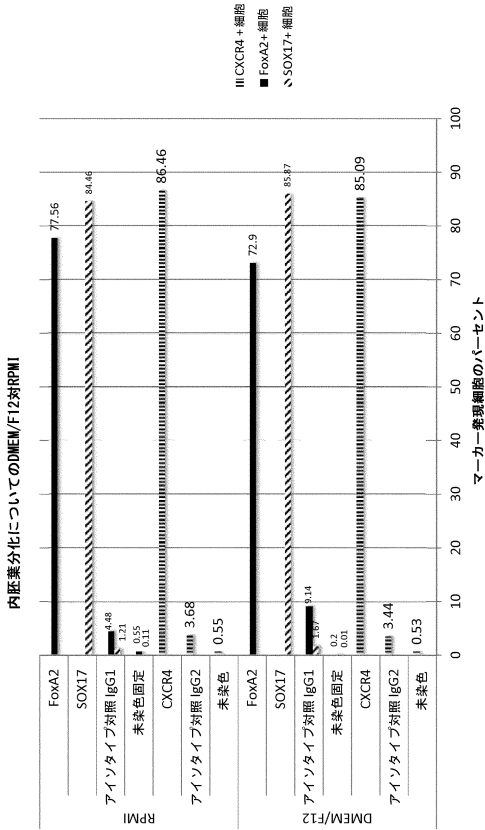
【図 1】

細胞／条件	SOX17発現細胞%
幹細胞	0.16
基本培地のみ	0.18
アクチビン A	22
アクチビン A + Wnt3a (=AW)	35
AW +LY294002	51.62
AW +ワートマニン	73.08
AW+ PIK90	80.64
AW+化合物 A	93.88

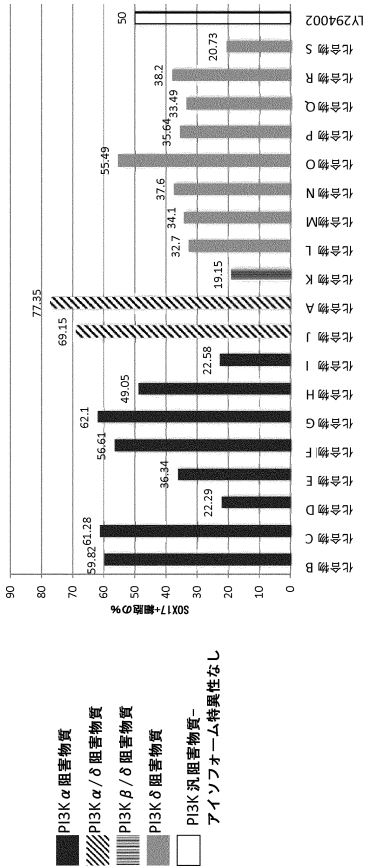
【図 2】

試料	SOX17+細胞のパーセント
幹細胞	0.52
基本培地のみ	1.15
アクチビンA+化合物A	93
アクチビンa+Wnt3a+化合物A	96.85

【図 3】

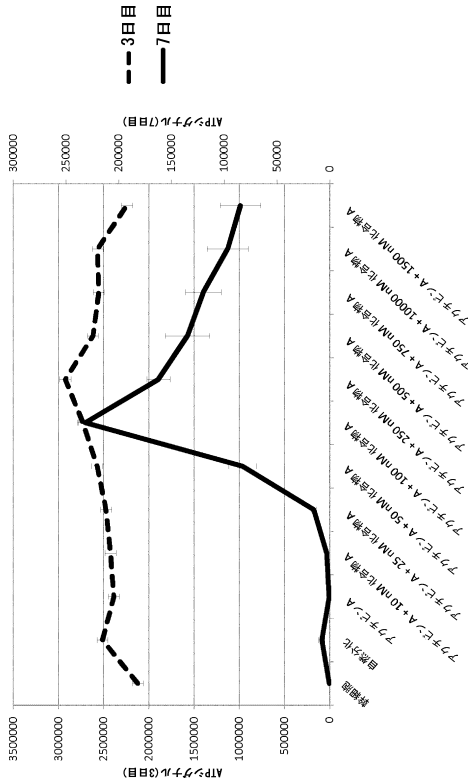


【図 4】

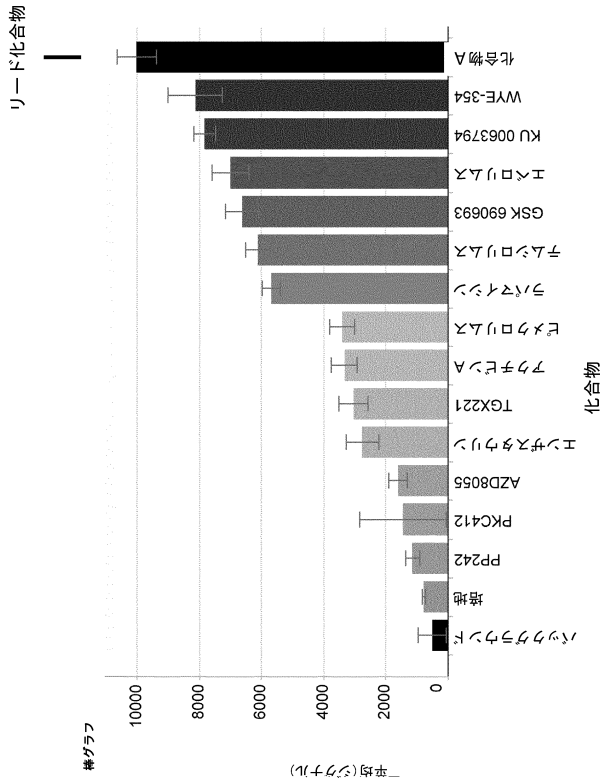




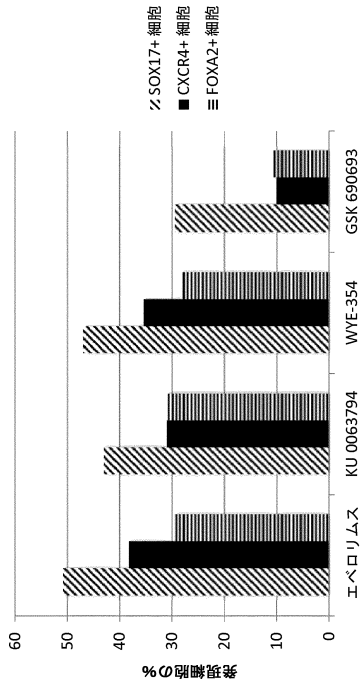
【図 9】



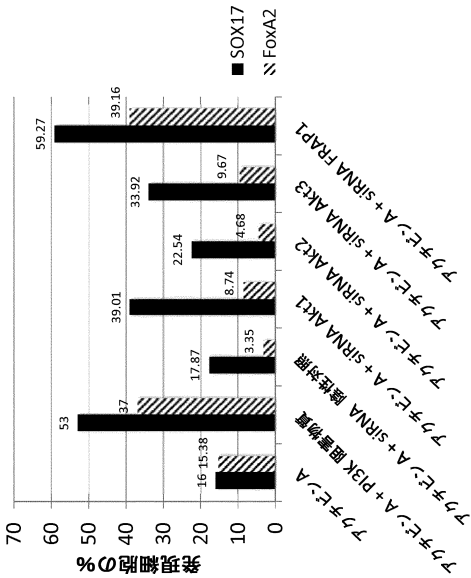
【図 10】



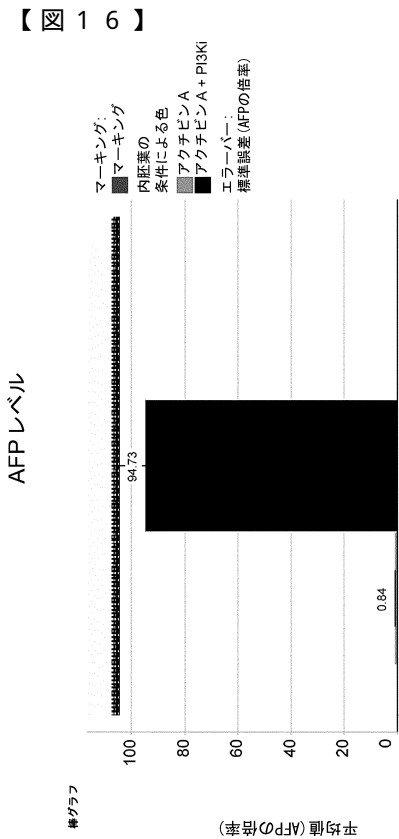
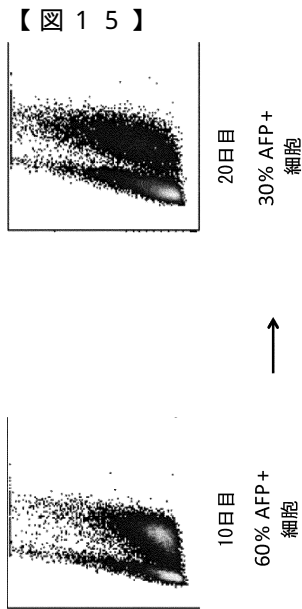
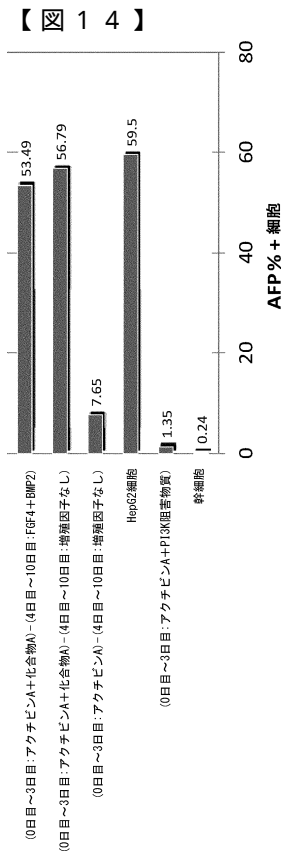
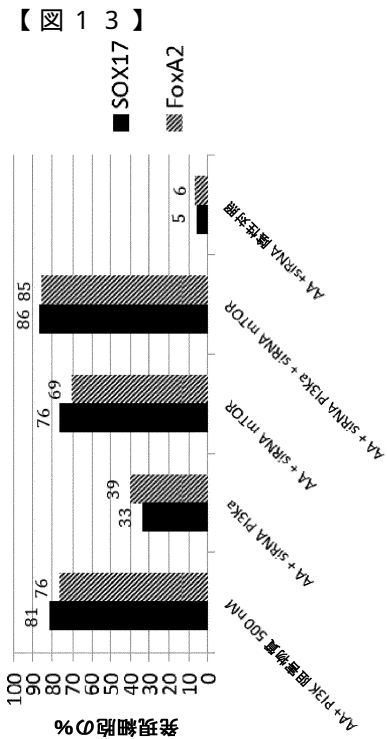
【図 11】

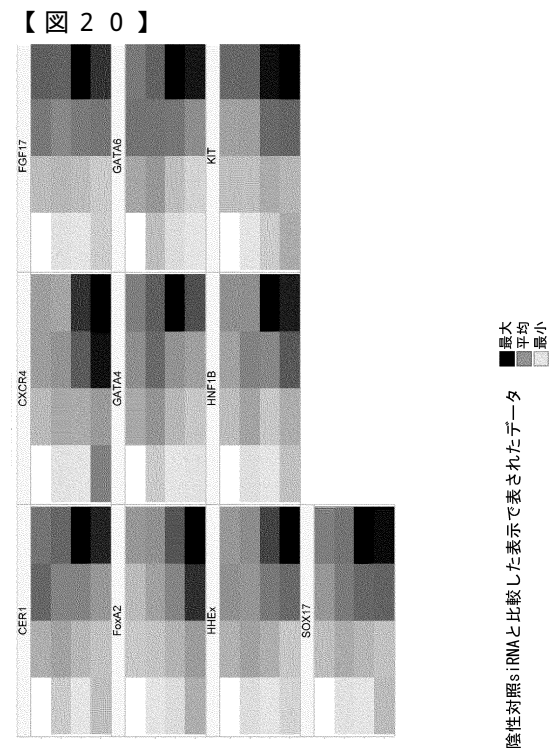
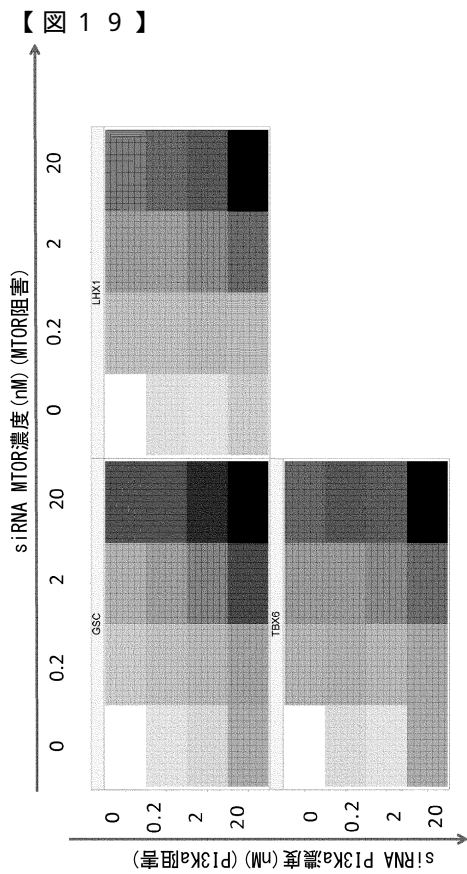
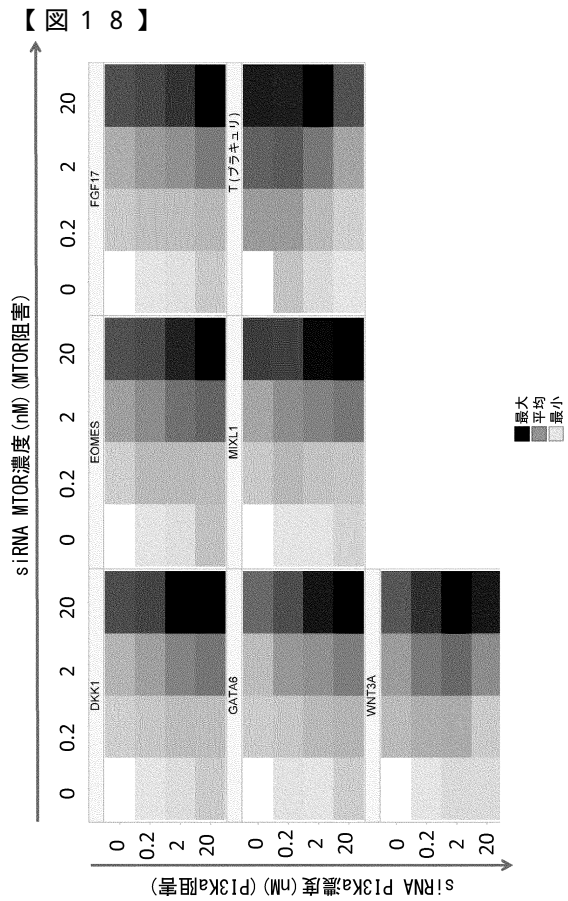
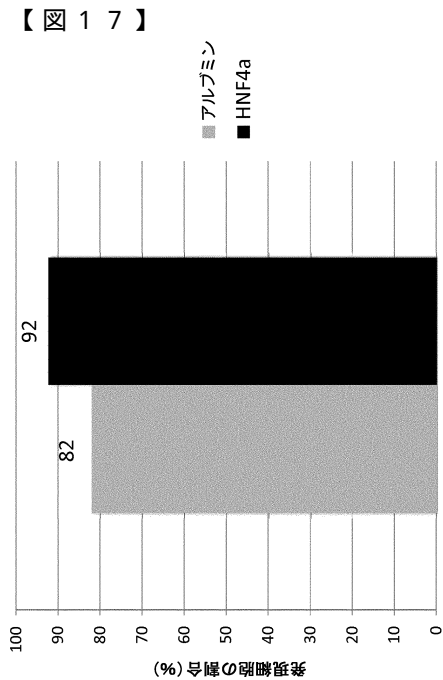


【図 12】





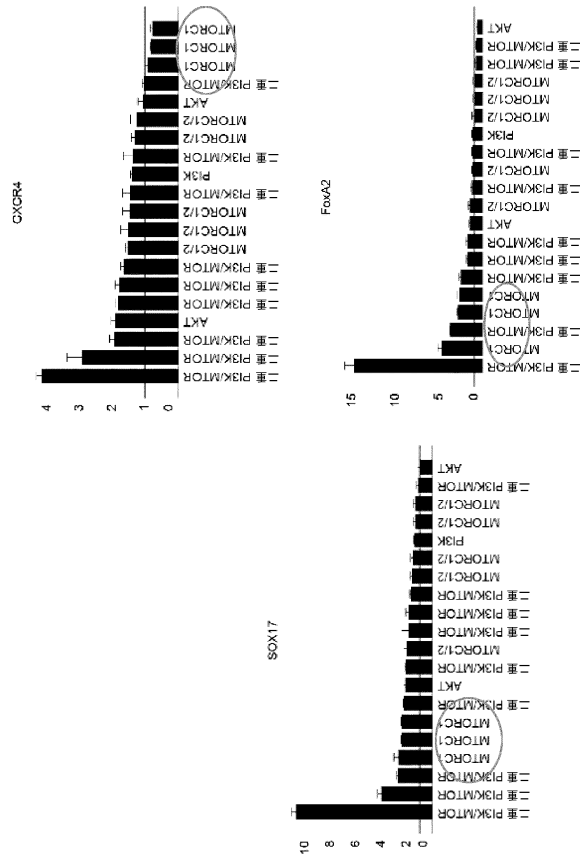




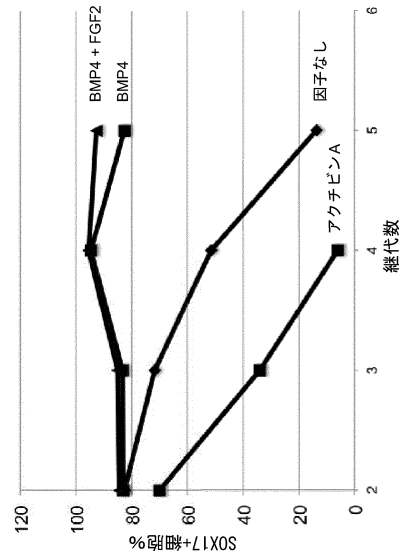
陰性対照siRNAと比較した表示で表されたデータ



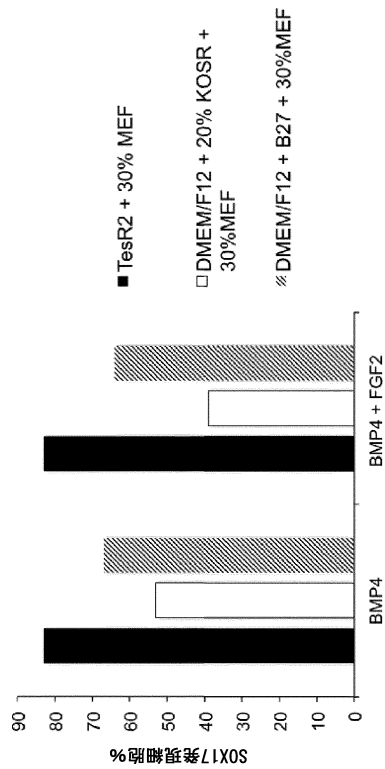
【図 25】



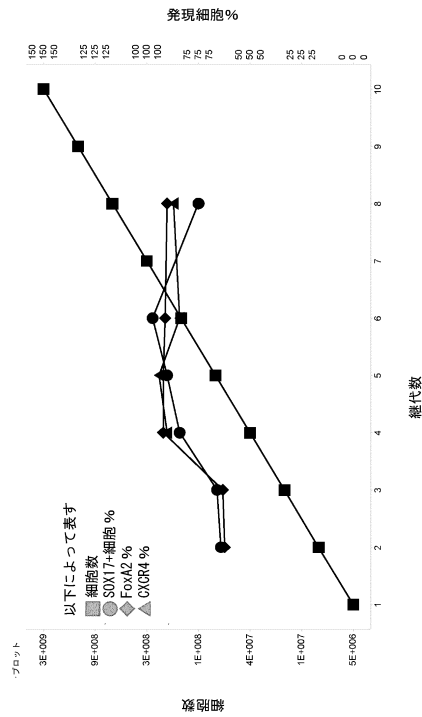
【図 26】

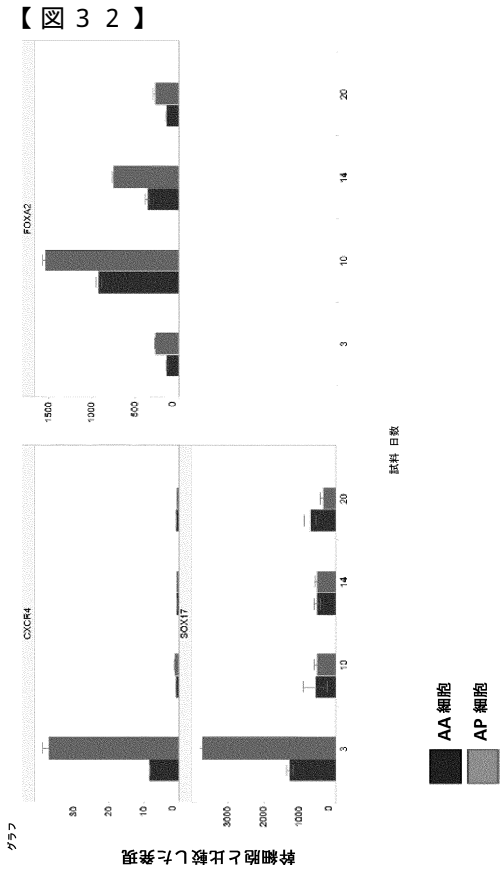
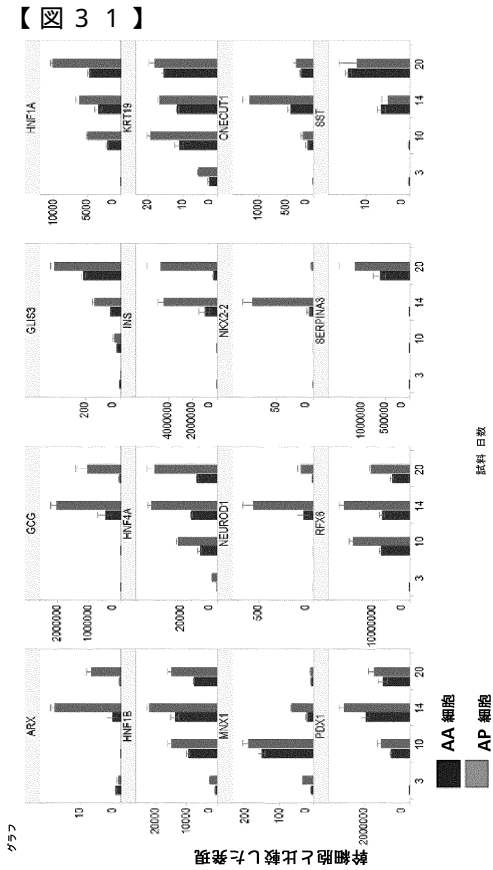
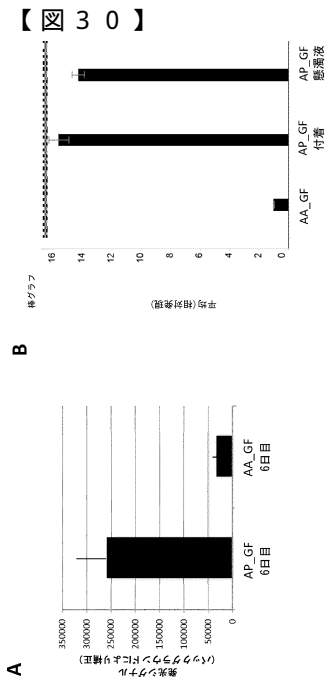
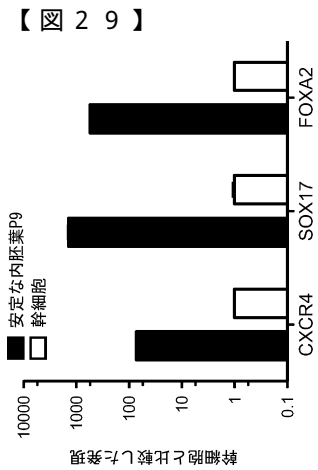


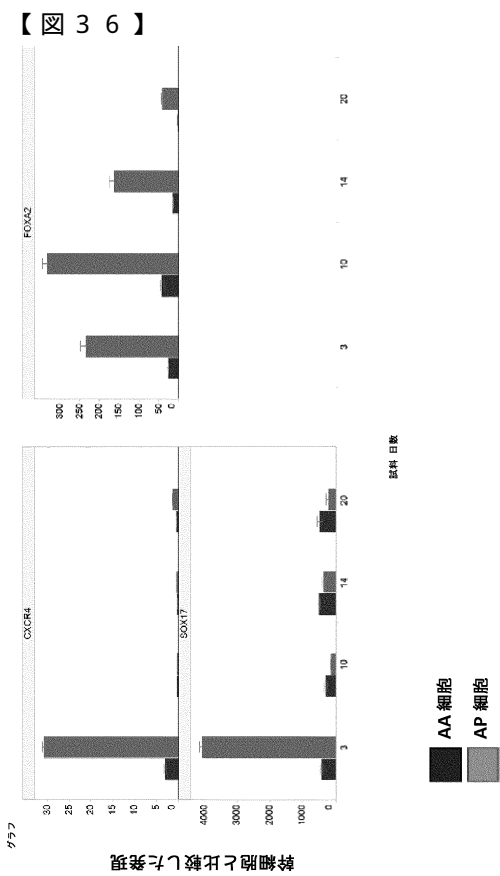
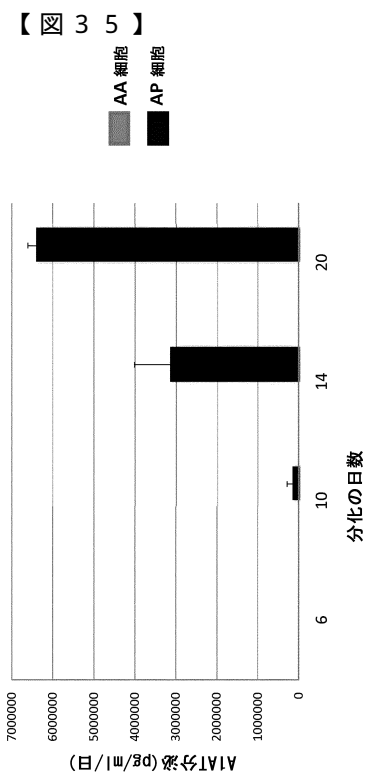
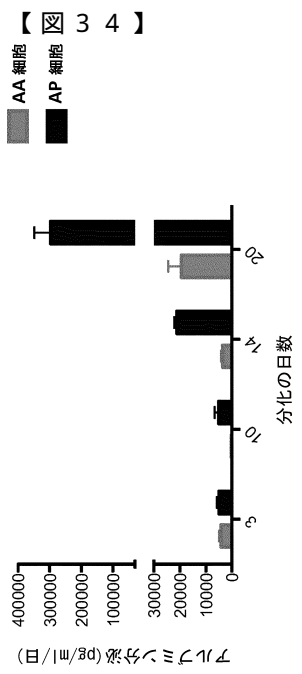
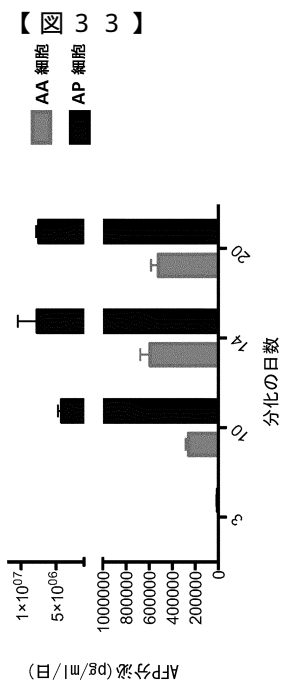
【図 27】



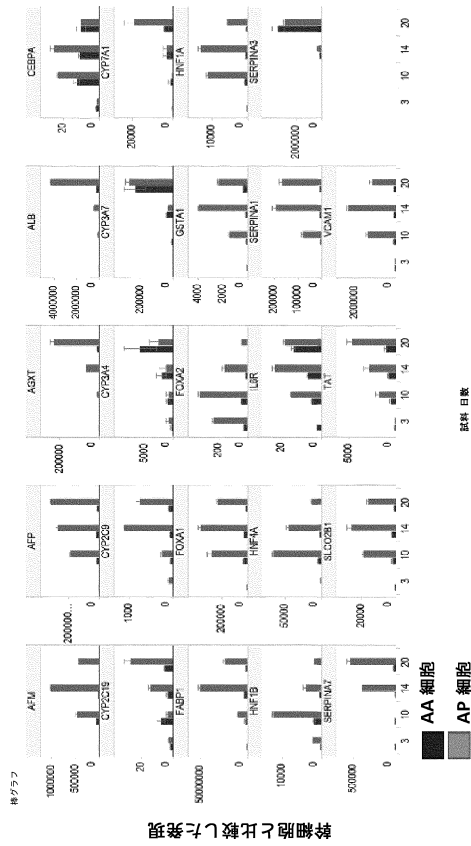
【図 28】



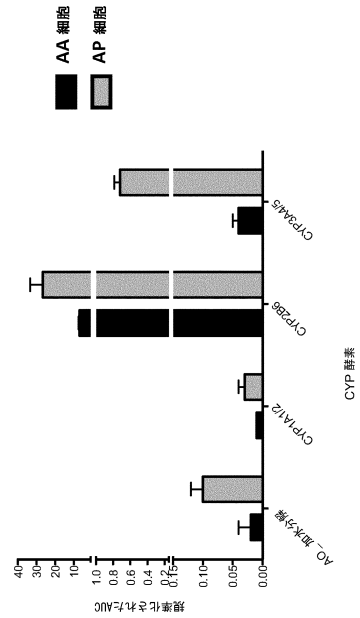




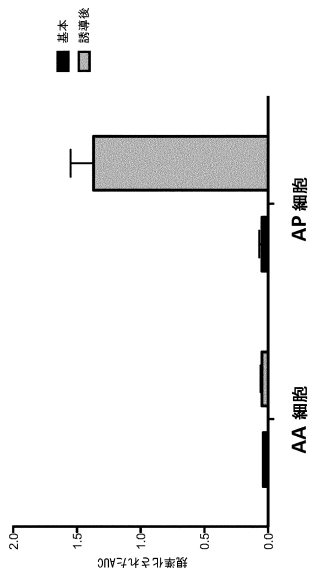
【 図 3 7 】



【 図 3 8 】



## 【 図 3 9 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/0775 (2010.01)</b>	<b>C 1 2 N 5/0775</b>
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/02 (2006.01)</b>	<b>C 1 2 Q 1/02</b>
<b>C 4 0 B</b>	<b>40/02 (2006.01)</b>	<b>C 4 0 B 40/02</b>

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 デュードメント エステル  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1  
ジェネンテック, インコーポレイテッド内

(72)発明者 アパル ハーデッシュ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1  
ジェネンテック, インコーポレイテッド内

## 合議体

審判長 田村 明照

審判官 松田 芳子

審判官 長井 啓子

(56)参考文献 国際公開第2011/016485(WO, A1)  
国際公開第2011/064309(WO, A1)  
国際公開第2011/009294(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00

C12N 5/00

MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)