I862513

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I862513 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 11 月 21 日

(21)申請案號：108133603 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 09 月 18 日

(51)Int. Cl.： *C12N5/071 (2010.01)* *C12N5/16 (2006.01)*
A61K35/12 (2015.01) *A61K35/39 (2015.01)*
A61P1/18 (2006.01)

(30)優先權：2018/09/19 日本 2018-175465

(71)申請人：日商千紙鶴治療公司 (日本) ORIZURU THERAPEUTICS, INC. (JP)
日本

(72)發明人：伊藤亮 ITO, RYO (JP) ；山添則子 YAMAZOE, NORIKO (JP) ；日吉秀行 HIYOSHI, HIDEYUKI (JP) ；持田泰佑 MOCHIDA, TAISUKE (JP) ；上野光 UENO, HIKARU (JP) ；佐久間健介 SAKUMA, KENSUKE (JP) ；山浦順司 YAMAURA, JUNJI (JP) ；松本寬和 MATSUMOTO, HIROKAZU (JP) ；豊田太郎 TOYODA, TARO (JP) ；小長谷周平 KONAGAYA, SHUHEI (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

期刊 Felicia W Pagliuca et al., Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. Cell. 159(2): doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040. 2014 Oct 9; 428-439.

期刊 Yzumi Yamashita-Sugahara et al., An inhibitor of fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) promotes late-stage terminal differentiation from NGN3+ pancreatic endocrine progenitors. Sci Rep. 6:35908. doi: 10.1038/srep35908. 2016 Oct 27: p1-14.

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：9 共 91 頁

(54)名稱

包含胰島素產生細胞之細胞集團、包含該細胞集團之醫藥、其用途及製造方法

(57)摘要

本發明之目的為提供一種能夠自多能性幹細胞有效率地誘導/製造內分泌細胞之新手法。

一種胰島素產生細胞，其係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以超過 15%的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞。

An object of the present invention is to provide a new method that enables efficient induction and production of endocrine cells from pluripotent stem cells.

An insulin-producing cells comprises insulin-positive and NKX6.1-positive cells at a rate of 30% or more, and insulin-positive and NKX6.1-negative cells at a rate of more than 15%.

I862513

公告本

第 108133603 號專利申請案
113 年 3 月 18 日修正替換頁

【發明摘要】

【中文發明名稱】 包含胰島素產生細胞之細胞集團、包含該細胞集團之醫藥、其用途及製造方法

【英文發明名稱】 CELL GROUP CONTAINING INSULIN PRODUCING CELLS, MEDICINES CONTAINING THE PRODUCING CELLS, AND USES AND MANUFACTURING METHODS THEREOF

【中文】

本發明之目的為提供一種能夠自多能性幹細胞有效率地誘導/製造內分泌細胞之新手法。

一種胰島素產生細胞，其係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以超過 15%的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞。

【英文】

An object of the present invention is to provide a new method that enables efficient induction and production of endocrine cells from pluripotent stem cells.

An insulin-producing cells comprises insulin-positive and NKX6.1-positive cells at a rate of 30% or more, and insulin-positive and NKX6.1-negative cells at a rate of more than 15%.

【指定代表圖】 無。

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】 無。

第 108133603 號專利申請案
113 年 3 月 18 日修正替換頁

【發明說明書】

【中文發明名稱】 包含胰島素產生細胞之細胞集團、包含該細胞集團之醫藥、其用途及製造方法

【英文發明名稱】 CELL GROUP CONTAINING INSULIN PRODUCING CELLS, MEDICINES CONTAINING THE PRODUCING CELLS, AND USES AND MANUFACTURING METHODS THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於胰島素產生細胞、其製造法及用途，該胰島素產生細胞能夠有效率地誘導/製造稱為胰β細胞或胰α細胞之進行激素分泌之內分泌細胞。

【先前技術】

【0002】 目前正進行著從人工多能性細胞或胚胎幹細胞(ES 細胞)等多能性幹細胞分化誘導出稱為胰β細胞或胰α細胞之進行激素分泌之內分泌細胞，並將其應用於糖尿病的治療之研究。已知分化誘導多能性幹細胞時，因應分化階段出現具有不同特徵之細胞(WO2009/012428、WO2016/021734)。例如，此分化階段可依相對未分化的順序，大致分類成多能性幹細胞、胚體內胚層細胞、原腸管細胞、後前腸細胞、胰前驅細胞、內分泌前驅細胞、胰島素產生細胞、胰β細胞。

【0003】 迄今為止，已開發並報導從多能性幹細胞分化誘導程包含胰島素陽性細胞之內分泌細胞之手法。例如，在非專利文獻 1 及 2 中，已記載製造從多能性幹細胞分化誘導出胰島素產生細胞之方法，該胰島素產生細胞係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以 15%以下的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞。

【0004】 此外，迄今為止，已報導從多能性幹細胞分化誘導成胰前驅細胞，藉由將其移植至生體內並使其成熟化，而製造內分泌細胞之手法。例如，在非專利文獻 3 中，已記載將從多能性幹細胞所分化誘導出之胰前驅細胞移植至小鼠並使其成熟化，藉此，製造包含胰島素陽性細胞及升糖素陽性細胞之內分泌細胞之方法。

【0005】 然而，上述方法所製造出之內分泌細胞的比率稱不上充分高，在該領域中依然深切期望著從多能性幹細胞有效率地誘導/製造內分泌細胞之方法。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0006】

專利文獻 1：WO2009/012428

專利文獻 2：WO2016/021734

[非專利文獻]

【0007】

非專利文獻 1：Rezania A. et al, Nat Biotechnol. 2014; 32:1121-33.

非專利文獻 2：Felicia W. Pagliuca et al, Cell. 2014 October 9; 159(2):428-439.

非專利文獻 3：Robert T et al, Stem Cell Reports. 2018 Mar 13; 10(3):739-750.

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0008】 本發明之目的為提供能夠自多能性幹細胞有效率地誘導/製造以一定的比率含有胰島素陽性細胞及升糖素陽性細胞之類胰島細胞之新手法。

[解決課題之手段]

【0009】 以往，將焦點著眼於如何提升胰島素陽性且 NKX6.1 陽性細胞的比率，使其成熟化，本發明者等人為了解決上述課題而深入檢討之結果，發現藉由使上述以外之細胞成為既定的比率，則可在生體內有效率地誘導/製造純度較高的類胰島細胞。相較於以往的手法所生成之胰島素產生細胞，分化誘導出未成熟之胰島素產生細胞，具體而言，不表現 MafA 等成熟化指標，並且，包含許多成為升糖素產生細胞起源之細胞之胰島素產生細胞。成熟度較低的細胞係有在移植後獲得純度較低的細胞之疑慮，惟，藉由組合將具有增殖能力之 Ki67 陽性細胞減至極限之手法，已成功地在保有較高的純度下，在生體內使類胰島細胞成熟化。

本發明係可在最低限度的製造期間內，有效率地誘導純度較高的類胰島細胞，因而提供一種在實現胰島的細胞治療上最適合的手法。

【0010】 本發明係基於此等新穎見解者，包括下述發明。

[1] 一種胰島素產生細胞(集團)，其係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以超過 15%的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞。

[2] 如[1]之胰島素產生細胞(集團)，其中，MafA 基因或其基因產物的表現量低於胰島中之 MafA 基因或其基因產物的表現量。

[3] 如[1]或[2]之胰島素產生細胞(集團)，其係以未達 3%的比率含有 Ki67 陽性細胞。

[3-1] 如[1]或[2]之胰島素產生細胞(集團)，其係以未達 1%的比率含有 Ki67 陽性細胞。

[4] 如[1]至[3-1]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係以未達 3%的比率含有升糖素陽性且胰島素陰性的細胞。

[5] 如[1]至[4]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係顯示出葡萄糖刺激性胰島素分泌(GSIS)回應。

[6] 如[1]至[5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係以超過 45%的比率含有染色顆粒素 A(chromogranin A，又稱嗜鉻粒蛋白 A)陽性細胞。

[6-1] 如[1]至[5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係以超過 80%的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

[6-2] 如[1]至[5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係以超過 85%的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

[6-3] 如[1]至[5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係以超過 90%的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

[6-4] 如[1]至[5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係以超過 93%的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

[7] 如[1]至[6-4]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係以未達 0.01%的比率含有鹼性磷酸酶陽性的多能性幹細胞。

[7-1]如[1]至[7]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係於生體內分化為類胰島細胞。

[7-2] 如[7-1]之胰島素產生細胞(集團)，其中，類胰島細胞係以 50%以上的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

[7-2-1] 如[7-1]之胰島素產生細胞(集團)，其中，類胰島細胞係以 95%以上的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

[7-3] 如[7-1]至[7-2-1]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其中，類胰島細胞係以未達 3%的比率含有 Ki67 陽性細胞。

[7-3-1] 如[7-1]至[7-2-1]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其中，類胰島細胞係以未達 1%的比率含有 Ki67 陽性細胞。

[7-4] 如[7-1]至[7-3-1]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其中，類胰島細胞係以 10%以上的比率含有升糖素陽性且胰島素陰性的細胞。

[7-5] 如[7-1]至[7-4]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其中，類胰島細胞具有對低血糖回應之胰島素分泌作用。

[8] 一種醫藥，其包含[1]至[7-5]中任一項之胰島素產生細胞。

[9] 如[8]之醫藥，其中，前述胰島素產生細胞(集團)係收容於器具中。

[10] 如[8]或[9]之醫藥，其中，前述胰島素產生細胞(集團)係分散於水凝膠中。

[11] 如[8]至[10]中任一項之醫藥，其係移植至生體內使用。

[12] 如[8]至[11]中任一項之醫藥，其係進行皮下移植而使用。

[13] 如[8]至[12]中任一項之醫藥，其係用以在糖尿病的治療中使用。

[14] 如[8]至[12]中任一項之醫藥，其係為了改善及/或維持患者的空腹時及餐後葡萄糖水平的控制而使用者。

[15] 如[8]至[12]中任一項之醫藥，其係為了減低糖尿病患者中之低血糖症的危險性。

[16] 如[8]至[12]中任一項之醫藥，其係為了在生體內分化誘導出類胰島細胞(集團)之方法中使用者。

[17] 如[16]之醫藥，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)係以 50%以上的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

[17-1] 如[16]之醫藥，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)係以 95%以上的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

[18] 如[16]至[17-1]中任一項之醫藥，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)係以未達 3%的比率含有 Ki67 陽性細胞。

[18] 如[16]至[17-1]中任一項之醫藥，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)係以未達 1%的比率含有 Ki67 陽性細胞。

[19] 如[16]至[18]中任一項之醫藥，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)係以 10%以上的比率含有升糖素陽性且胰島素陰性的細胞。

[20] 如[16]至[19]中任一項之醫藥，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)具有對低血糖回應之胰島素分泌作用。

[21] 一種胰島素產生細胞(集團)之製造方法，該胰島素產生細胞(集團)係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以超過 15%的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞，

該方法包含：

將多能性幹細胞在低用量的活化素 A 的存在下進行培養，製造胚體內胚層細胞(集團)之步驟；以及

將內分泌前驅細胞在包含 FGFR1 抑制劑之培養基中進行培養，製造前述胰島素產生細胞(集團)之步驟。

[22] 一種類胰島細胞(集團)之生成方法，該方法包含將胰島素產生細胞(集團)移植至生體內，而分化誘導為類胰島細胞(集團)，其中，該胰島素產生細胞(集團)係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以超過 15%的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞。

[23] 一種治療糖尿病之方法，該方法包含將胰島素產生細胞(集團)移植至生體內，而分化誘導為類胰島細胞(集團)，其中，該胰島素產生細胞(集團)係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以超過 15%的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞。

[24] 一種改善及/或維持患者的空腹時及餐後葡萄糖水平的控制之方法，該方法包含將胰島素產生細胞(集團)移植至生體內，而分化誘導為類胰島細胞(集團)，其中，該胰島素產生細胞(集團)係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以超過 15%的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞。

[25] 一種減低糖尿病患者中之低血糖症的危險性之方法，該方法包含將胰島素產生細胞(集團)移植至生體內，而分化誘導為類胰島細胞(集團)，其中，該胰島素產生細胞(集團)係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以超過 15%的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞之。

[26] 如[1]至[7-5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係為了在治療糖尿病之方法中使用者。

[27] 如[1]至[7-5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係為了在改善及/或維持患者的空腹時及餐後葡萄糖水平的控制之方法中使用者。

[28] 如[1]至[7-5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係為了在減低糖尿病患者中之低血糖症的危險性之方法中使用者。

[29] 如[1]至[7-5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係使用於在生體內分化誘導出類胰島細胞(集團)之方法。

[30] 如[26]至[29]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係收容於器具中。

[31] 如[26]至[30]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係分散於水凝膠中。

[32] 如[26]至[31]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係移植至生體內使用。

[33] 如[26]至[32]中任一項之胰島素產生細胞(集團)，其係進行皮下移植而使用。

[34] 如[29]之胰島素產生細胞(集團)，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)係以 50%以上的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

[34-1] 如[29]之胰島素產生細胞(集團)，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)係以 95%以上的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

[35] 如[29]之胰島素產生細胞(集團)，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)係以未達 3%的比率含有 Ki67 陽性細胞。

[35-1] 如[29]之胰島素產生細胞(集團)，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)係以未達 1%的比率含有 Ki67 陽性細胞。

[35-2] 如[29]之胰島素產生細胞(集團)，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)係以 10%以上的比率含有升糖素陽性且胰島素陰性的細胞。

[36] 如[29]之胰島素產生細胞(集團)，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞(集團)具有對低血糖產生回應之胰島素分泌作用。

[37] 一種[1]至[7-5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)之用途，其係用於製造用以治療糖尿病之醫藥。

[38] 一種[1]至[7-5]中任一項之胰島素產生細胞(集團)之用途，其係用於製造用以改善及或維持患者的空腹時及餐後葡萄糖水平的控制之醫藥。

[39] 一種[1]至[7-5]中任一項之胰島素細胞(集團)之用途，其係用於製造減低糖尿病患者中之低血糖症的危險性之醫藥。

本說明書含括屬於本案之優先權基礎之日本特許出願 2018-175465 號之說明書及/或圖式所記載之內容。

將本說明書所引用之所有刊物、專利及專利申請直接作為參考而併入本說明書中。

[發明效果]

【0011】 根據本發明，可提供一種能夠從多能性幹細胞有效率地誘導/製造內分泌細胞之新手法。

【圖式簡單說明】

【0012】

第 1 圖顯示藉由流式細胞儀測定胰島素產生細胞的原型(prototype)、胰島素產生細胞及人類胰島(islet)中之胰島素(INS)、NKX6.1、升糖素(GCG)及 Ki67 的表現之結果。

第 2 圖顯示藉由定量 PCR 法測定胰島素產生細胞的原型、胰島素產生細胞及人類胰島(islet)中之胰島素(INS)、升糖素(GCG)、MafA 及 UCN3 的各基因表現量之結果。

第 3 圖為顯示摻加 30(0.005%)個細胞、6(0.001%)個細胞、0 個細胞的維持未分化狀態之 iPS 細胞所調製出之胰島素產生細胞中之維持未分化狀態之 iPS 細胞的群落數之圖表。

第 4 圖顯示將經凍結保存之胰島素產生細胞解凍後，藉由 3 維培養進行 4 日培養所獲得之細胞凝集體的相位差顯微鏡影像。

第 5 圖顯示藉由流式細胞儀測定凍結保存前之胰島素產生細胞以及凍結保存/解凍後之胰島素產生細胞中之 INS、NKX6.1 及 Ki67 的表現之結果。

第 6 圖顯示經移植胰島素產生細胞之糖尿病小鼠及未經移植胰島素產生細胞之非糖尿病小鼠中，葡萄糖負荷後之血中人類 C-胜肽濃度之測定結果。

第 7 圖顯示經移植胰島素產生細胞之糖尿病小鼠及未經移植胰島素產生細胞之非糖尿病小鼠中，甘精胰島素(glargine)投予後之血中人類 C-胜肽濃度及血中升糖素濃度之測定結果。

第 8 圖顯示藉由流式細胞儀測定經皮下移植之胰島素產生細胞中之胰島素、NKX6.1、升糖素及染色顆粒素 A 的表現之結果。

第 9 圖顯示針對經皮下移植之胰島素產生細胞中之胰島素及升糖素之免疫組織染色之結果。綠：胰島素陽性細胞。紅：升糖素陽性細胞。

【實施方式】

【0013】 1. 用語

以下，針對本說明書中所記載之用語進行說明。

【0014】 在本說明書中，所謂「約」，係表示相對於基準值，各自正或負變動達 25%、20%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或 1%之值。較佳地，「約」或「大約」之用語係表示相對於基準值，各自正或負 15%、10%、5%或 1%的範圍。

在本說明書中，規定本發明之數值範圍即便沒有「約」的記載，亦包含與其下限值及上限值實質上被視為相同之數值。

【0015】 在本說明書中，所謂「包含 (comprise(s)或 comprising)…」或「含有…」，係意指表示包含該詞語所接續之要素，但不限定於此。因此，暗示包含該詞語所接續之要素，但並未暗示排除其他任意的要素。

【0016】 在本說明書中，所謂「由～所組成(consist(s) of 或 consisting of)」，係意指包含該詞語所接續之所有要素，且限定於此。因此，「由～所組成」的詞語係表示所列舉出之要素是所要求或必需的，實質上不存在其他要素。

【0017】 在本說明書中，所謂不「使用餵養細胞」，係意指基本上不含餵養細胞、不使用藉由培養餵養細胞進行過預處理之培養基等。因此，在培養基中不含由餵養細胞所分泌出之生長因子及細胞介素等物質。

【0018】 另外，所謂「餵養細胞」或「餵養物」，係意指與其他種類的細胞進行共培養，支持該細胞，帶來可成長之環境之細胞。餵養細胞可源自與該等所支持之細胞相同的種類，亦可源自不同種類。例如，就人類細胞之餵養物而言，可使用人類皮膚纖維母細胞或人類胚胎幹細胞，亦可使用小鼠胚纖維母細胞之初代培養物及不死化小鼠胚纖維母細胞。餵養細胞可藉由放射線照射或絲裂黴素 C 處理等而去活化。

【0019】 在本說明書中，所謂「接著」係指細胞附著於容器，例如，細胞在適當的培養基的存在下附著於滅菌塑膠(或經塗覆之塑膠)的細胞培養皿或燒瓶。在細胞之中，亦有未接著於細胞培養容器則無法在培養物中維持，或者不成長者。相對於此，非接著性細胞可在未接著於容器下在培養物中加以維持、增殖。

【0020】 在本說明書中，所謂「培養」係指將細胞在活體外(in vitro)環境中加以維持，並使其成長且/或分化。所謂「進行培養」係意指在組織或體外，例如，在細胞培養皿或燒瓶中使細胞持續、增殖(成長)且/或分化。在培養中包含 2 維培養(平面培養)、3 維培養(浮游培養)。

【0021】 在本說明書中，所謂「進行富集(enrich)」及「富集(enrichment)」，係指使細胞的組成物等組成物中之特定的構成成分的量增加，所謂「經富集(enriched)」，在為了說明細胞的組成物，例如細胞集團而使用時，係指相較於進行富集前之細胞集團中之特定的構成成分的比率，

該特定的構成成分的量增加之細胞集團。例如，可將細胞集團等組成物針對標的細胞型進行富集，因此，相較於進行富集前之細胞集團內存在之標的細胞的比率，標的細胞型的比率係增加。細胞集團亦可藉由該技術領域中公知的細胞選擇及選別方法，針對標的細胞型進行富集。細胞集團亦可藉由本說明書所記載之特定的選別或選擇程序進行富集。在本發明之特定的實施形態中，藉由將標的細胞集團進行富集之方法，細胞集團係與標的細胞集團相關的被富集至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或 99%。

【0022】在本說明書中，所謂「進行耗乏(deplete)」及「耗乏(depletion)」，係指使細胞或細胞的組成物等組成物中之特定的構成成分的量減少，所謂「經耗乏(depleted)」，在為了說明細胞或細胞的組成物，例如細胞集團而使用時，係指相較於進行耗乏前之細胞集團中之特定的構成成分的比率，該特定的構成成分的量係減少之細胞集團。例如，可使細胞集團等組成物針對標的細胞型進行耗乏，因此，相較於進行耗乏前之細胞集團內所存在之標的細胞的比率，標的細胞型的比率係減少。細胞集團亦可藉由該技術領域中公知的細胞選擇及選別方法，針對標的細胞型進行耗乏。細胞集團亦可藉由本說明書所記載之特定的選別或選擇程序進行耗乏。在本發明之特定的實施形態中，藉由使標的細胞集團進行耗乏之方法，細胞集團係與標的細胞集團有關的減少(耗乏)至少 50%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或 99%。

【0023】在本說明書中，所謂「進行純化(purify)」及「純化(purification)」，係指除掉細胞的組成物等組成物中之雜質，使其就特定的

構成成分而言成為純粹者，所謂「經純化(purified)」，在為了說明細胞的組成物，例如細胞集團而使用時，係指雜質的量相較於進行純化前之細胞集團中之特定的構成成分的比率，該雜質的量係減少，該特定的構成成分的純度提升之細胞集團。例如，可將細胞集團等組成物針對標的細胞型進行純化，因此，相較於進行純化前之細胞集團內存在之標的細胞的比率，標的細胞型的比率係增加。細胞集團亦可藉由該技術領域中公知的細胞選擇及選別方法，針對標的細胞型進行純化。細胞集團亦可藉由本說明書所記載之特定的選別或選擇程序進行純化。在本發明之特定的實施形態中，藉由將標的細胞集團進行純化之方法，標的細胞集團的純度可成為至少70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%，或成為無法檢測到雜質(包含夾雜細胞)之程度。

【0024】 在本說明書中，所謂「具有 CDK8/19 抑制活性之因子」，係意指具有 CDK8/19 的抑制活性之所有物質。與相同的 CDK 家族之其他蛋白質相對照，CDK8 對細胞增殖而言非必須，CDK8 的抑制在通常的條件下並無大效果。CDK19 與 CDK8 類似，CDK8 抑制通常亦伴隨 CDK19 的抑制。

【0025】 「增殖因子」為促進特定的細胞的分化及/或增殖之內因性蛋白質。「增殖因子」可列舉例如：上皮生長因子(EGF)、酸性纖維母細胞增殖因子(aFGF)、鹼性纖維母細胞增殖因子(bFGF)、肝細胞增殖因子(HGF)、類胰島素增殖因子 1(IGF-1)、類胰島素增殖因子 2(IGF-2)、角質細胞增殖因子(KGF)、神經增殖因子(NGF)、源自血小板之增殖因子(PDGF)、轉形增殖因子 β(TGF-β)、血管內皮細胞增殖因子(VEGF)、運鐵

蛋白、多種介白素(例如，IL-1 至 IL-18)、多種菌落刺激因子(例如，顆粒球/巨噬細胞菌落刺激因子(GM-CSF))、多種干擾素(例如，IFN-γ 等)以及對幹細胞具有效果之其他細胞介素，例如幹細胞因子(SCF)及紅血球生成素(Epo)。

【0026】 在本說明書中，所謂「ROCK 抑制劑」係意指抑制 Rho 激酶(ROCK：Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase)之物質，也可為抑制 ROCK I 及 ROCK II 之任一者之物質。ROCK 抑制劑在具有上述機能之前提下，即無特別限定，可列舉例如：N-(4-吡啶基)-4β-[(R)-1-胺基乙基]環己烷-1α-甲醯胺(有時亦稱為 Y-27632)、法舒地爾(Fasudil)(HA1077)、(2S)-2-甲基-1-[(4-甲基-5-異喹啉基)磺醯基]六氫-1H-1,4-二氮呼(H-1152)、4β-[(1R)-1-胺基乙基]-N-(4-吡啶基)苯-1α-甲醯胺(Wf-536)、N-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基)-4β-[(R)-1-胺基乙基]環己烷-1α-甲醯胺(Y-30141)、N-(3-{[2-(4-胺基-1,2,5-噁二唑-3-基)-1-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-6-基]氧基}苯基)-4-{[2-(4-嗎啉基)乙基]-氧基}苄醯胺(GSK269962A)、N-(6-氟-1H-吲唑-5-基)-6-甲基-2-側氧基-4-[4-(三氟甲基)苯基]-3,4-二氫-1H-吡啶-5-甲醯胺(GSK429286A)。ROCK 抑制劑並不限定於此等，也可使用相對於 ROCK 的 mRNA 之反義寡核苷酸或 siRNA、與 ROCK 結合之抗體、顯性負性 ROCK 變異體等作為 ROCK 抑制劑，可自商業上取得或依據公知的方法合成。

【0027】 在本說明書中，所謂「GSK3β 抑制劑」係具有對 GSK3β(肝醣合成酶激酶 3β)之抑制活性之物質。GSK3(肝醣合成酶激酶 3)為絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶之一種，參與涉及肝醣的產生或細胞凋亡、幹細胞的維持

等之許多訊息路徑。在 GSK3 中存在 α 及 β 二種異型體。本發明所使用之「GSK3β 抑制劑」只要具有 GSK3β 抑制活性，即無特別限定，亦可為合併兼具有 GSK3β 抑制活性及 GSK3α 抑制活性之物質。

【0028】 GSK3β 抑制劑可例示：CHIR98014(2-[[2-[(5-硝基-6-胺基吡啶-2-基)胺基]乙基]胺基]-4-(2,4-二氯苯基)-5-(1H-咪唑-1-基)嘧啶)、CHIR99021(6-[[2-[[4-(2,4-二氯苯基)-5-(4-甲基-1H-咪唑-2-基)-2-嘧啶基]胺基]乙基]胺基]菸鹼甲腈)、TDZD-8(4-苄基-2-甲基-1,2,4-噻二唑啶-3,5-二酮)、SB216763(3-(2,4-二氯苯基)-4-(1-甲基-1H-吲哚-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮)、TWS-119(3-[6-(3-胺基苯基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基氧基]苯酚)、肯帕羅酮(Kenpaullone)、1-氮雜肯帕羅酮(Azakenpaullone)、SB216763(3-(2,4-二氯苯基)-4-(1-甲基-1H-吲哚-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮)、SB415286(3-[(3-氯-4-羥基苯基)胺基]-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮)及 AR-AO144-18、CT99021、CT20026、BIO、BIO-丙酮肟、吡啶并咔唑-環戊二烯基釕複合物、OTDZT、α-4-二溴苯乙酮、鋰等。GSK3β 並不限定於此等，相對於 GSK3β 的 mRNA 之反義寡核苷酸或 siRNA、與 GSK3β 結合之抗體、顯性負性 GSK3β 變異體等亦可使用為 GSK3β 抑制劑，可自商業上取得或依照公知的方法合成。

【0029】 在本說明書中，所謂「血清代替物」可列舉例如：剔除血清代替物(Knockout Serum Replacement)(KSR：Invitrogen)、StemSure 血清代替物(StemSure Serum Replacement)(Wako)、B-27 補充劑、N2 補充劑、白蛋白(例如，富含脂質之白蛋白)、胰島素、運鐵蛋白、脂肪酸、膠原蛋白前驅物、微量元素(例如，鋅、硒(例如，亞硒酸鈉))、2-巰基乙醇、3'-硫醇

基甘油或此等之混合物(例如 ITS-G)。血清代替物較佳為 B-27 補充劑、KSR、StemSure 血清代替物、ITS-G。將血清代替物添加至培養基中時，培養基中之濃度為 0.01 至 10 重量%，較佳為 0.1 至 2 重量%。在本發明中，較佳係使用「血清代替物」代替血清。

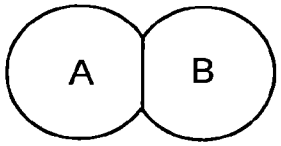
【0030】 在本說明書中，所謂「FGFR1 抑制劑」係具有對纖維母細胞增殖因子受體(FGFR)1 之抑制活性之物質。FGFR1 係作為對屬於生長因子之 FGF1 至 FGF17 具有高親和性之受體，其係 4 次膜貫穿型酪胺酸激酶家族(FGFR1、2、3、4)之成員。FGFR1 抑制劑只要具有 FGFR1 抑制活性即無特別限定，亦可為合併兼具有 FGFR1 抑制活性及其他 FGFR 的抑制活性之物質。在本說明書中，所謂「FGFR1 抑制劑」係包含稍微具有 FGFR1 抑制活性之物質，較佳係指抑制 50%以上 FGFR1 之物質，更佳係指 FGFR1 的 50%抑制濃度(IC_{50})為 1μM 以下，再佳為 100nM 以下之物質。FGFR1 抑制活性之判定方法只要選自公知的方法即可，可列舉例如使用 EnzyChrom 激酶分析套組(EnzyChrom Kinase Assay Kit)(BioAssay Systems 公司)之判定方法等。FGFR1 抑制劑能夠利用以往公知者，可從專利文獻或非專利文獻中尋找。

【0031】 例如，在本說明書中，所謂「FGFR1 抑制劑」係除了下述所示之化合物(化合物群組 D)以外，尚可列舉具有下述通式所示之結構式之化合物中，對 FGFR1 具有抑制活性之化合物(或其鹽)，較佳為具有下述通式所示之結構式之化合物 I 及化合物 II 中，FGFR1 的 50%抑制濃度(IC_{50})為 1μM 以下，更佳為 100nM 以下之化合物(或其鹽)。

【0032】 (化合物 I)

化合物 I 可列舉下述式 1 所示之化合物或其鹽：

[化 1]



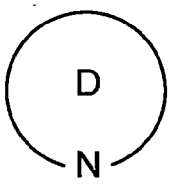
〔式中，環 AB 表示具有 1 個以上取代基之 2 環式雜環，(環 AB 亦可為具有 1 個以上取代基之 3 環式雜環)〕。

較佳地，式中，環 AB 表示具有 3 個取代基之 2 環式含氮雜環。取代基可列舉下述所示之取代基或化合物群組 D 所具有之取代基，較佳係表示化合物群組 D 所具有之取代基。

【0033】 (化合物 II)

化合物 II 可列舉下述式 2 所示之化合物或其鹽：

[化 2]



〔式中，環 D 表示可具有取代基之 5 至 6 員單環式含氮雜環；

表示在環 D 以外包含 1 個以上含氮雜環〕。

較佳地，式中，環 D 表示可具有取代基之包含 1 或 2 個氮之芳香環。

再者，較佳地，環 D 以外之 1 個以上含氮雜環可列舉可具有取代基之哌啉。

取代基可列舉下述所示之取代基或化合物群組 D 所具有之取代基，較佳係表示化合物群組 D 所具有之取代基。

【0034】 在本說明書中，「雜環」可列舉例如除了碳原子以外，各自含有選自氮原子、硫原子及氧原子之 1 至 4 個雜原子作為環構成原子之芳香族雜環及非芳香族雜環。

【0035】 在本說明書中，「芳香族雜環」可列舉例如除了碳原子以外，尚含有選自氮原子、硫原子及氧原子之 1 至 4 個雜原子作為環構成原子之 5 至 14 員(較佳為 5 至 10 員)芳香族雜環。該「芳香族雜環」之較佳例可列舉：噻吩、呋喃、吡咯、咪唑、吡唑、噻唑、異噻唑、噁唑、異噁唑、吡啶、吡啡、嘧啶、嗒啡、1,2,4-噁二唑、1,3,4-噁二唑、1,2,4-噻二唑、1,3,4-噻二唑、三唑、四唑、三啡等 5 至 6 員單環式芳香族雜環；

苯并噻吩、苯并呋喃、苯并咪唑、苯并噁唑、苯并異噁唑、苯并噻唑、苯并異噻唑、苯并三唑、咪唑并吡啶、噻吩并吡啶、呋喃并吡啶、吡咯并吡啶、吡唑并吡啶、噁唑并吡啶、噻唑并吡啶、咪唑并吡啡、咪唑并嘧啶、噻吩并嘧啶、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、吡唑并嘧啶、噁唑并嘧啶、噻唑并嘧啶、吡唑并嘧啶、吡唑并三啡、萘并[2,3-b]噻吩、啡噁噻、吲哚、異吲哚、1H-吲唑、嘌呤、異喹啉、喹啉、呔啡、喘啶、喹噁啉、喹唑啉、噌啉、咔唑、β-咔啉、啡啶、吖啶、啡啡、啡噻啡、啡噁啡等 8 至 14 員縮合多環式(較佳為 2 或 3 環式)芳香族雜環。

【0036】 在本說明書中，「非芳香族雜環」可列舉例如除了碳原子以外，尚含有選自氮原子、硫原子及氧原子之 1 至 4 個雜原子作為環構成原子之 3 至 14 員(較佳為 4 至 10 員)非芳香族雜環。該「非芳香族雜環」之較佳例可列舉：氮雜環丙烷、氧雜環丙烷、硫雜環丙烷、氮雜環丁烷、氧雜環丁烷、硫雜環丁烷、四氫噻吩、四氫呋喃、吡咯啉、吡咯啶、咪唑啉、

咪唑啶、噁唑啉、噁唑啶、吡唑啉、吡唑啶、噻唑啉、噻唑啶、四氫異噻唑、四氫噁唑、四氫異噁唑、哌啶、哌咁、四氫吡啶、二氫吡啶、二氫噻喃、四氫嘧啶、四氫嗒咁、二氫哌喃、四氫哌喃、四氫噻喃、嗎啉、硫代嗎啉、氮雜環庚烷、二氮雜環庚烷、氮雜環庚烯、氮雜環辛烷、二氮雜環辛烷、氧雜環庚烷等 3 至 8 員單環式非芳香族雜環；

二氫苯并呋喃、二氫苯并咪唑、二氫苯并噁唑、二氫苯并噻唑、二氫苯并異噻唑、二氫萘并[2,3-b]噻吩、四氫異喹啉、四氫喹啉、4H-喹啉、吲哚啉、異吲哚啉、四氫噻吩并[2,3-c]吡啶、四氫苯并氮雜環庚烯、四氫喹噁啉、四氫啡啶、六氫啡噻啉、六氫啡噁啉、四氫呫啉、四氫喹啉、四氫喹唑啉、四氫噌啉、四氫咔唑、四氫-β-咔啉、四氫吖啶、四氫啡啉、四氫硫二苯并哌喃、八氫異喹啉等 9 至 14 員縮合多環式(較佳為 2 或 3 環式)非芳香族雜環。

【0037】 在本說明書中，「含氮雜環」可列舉「雜環」中，含有至少 1 個以上氮原子作為環構成原子者。

【0038】 以下，針對本說明書中所使用之各取代基的定義進行詳述。在沒有特別註記之前提下，各取代基具有以下定義。

【0039】 在本說明書中，「鹵素原子」可列舉例如：氟、氯、溴、碘。

【0040】 在本說明書中，「C_{1-6}烷基」可列舉例如：甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、異戊基、新戊基、1-乙基丙基、己基、異己基、1,1-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基、2-乙基丁基。

【0041】 在本說明書中，「可經鹵化之 C_{1-6} 烷基」可舉舉例如可具有 1 至 7 個，較佳為 1 至 5 個鹵素原子之 C_{1-6} 烷基。具體例可列舉：甲基、氯甲基、二氟甲基、三氯甲基、三氟甲基、乙基、2-溴乙基、2,2,2-三氟乙基、四氟乙基、五氟乙基、丙基、2,2-二氟丙基、3,3,3-三氟丙基、異丙基、丁基、4,4,4-三氟丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、異戊基、新戊基、5,5,5-三氟戊基、己基、6,6,6-三氟己基。

【0042】 在本說明書中，「C_{2-6} 烯基」可列舉例如：乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、3-甲基-2-丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、4-甲基-3-戊烯基、1-己烯基、3-己烯基、5-己烯基。

【0043】 在本說明書中，「C_{2-6} 炔基」可列舉例如：乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-戊炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、4-己炔基、5-己炔基、4-甲基-2-戊炔基。

【0044】 在本說明書中，「C_{3-10} 環烷基」可列舉例如：環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基、環辛基、雙環[2.2.1]庚基、雙環[2.2.2]辛基、雙環[3.2.1]辛基、金剛烷基。

【0045】 在本說明書中，「可經鹵化之 C_{3-10} 環烷基」可舉出例如可具有 1 至 7 個，較佳為 1 至 5 個鹵素原子之 C_{3-10} 環烷基。具體例可列舉：環丙基、2,2-二氟環丙基、2,3-二氟環丙基、環丁基、二氟環丁基、環戊基、環己基、環庚基、環辛基。

【0046】 在本說明書中，「C_{3-10}環烯基」可列舉例如：環丙烯基、環丁烯基、環戊烯基、環己烯基、環庚烯基、環辛烯基。

【0047】 在本說明書中，「C_{6-14}芳基」可列舉例如：苯基、1-萘基、2-萘基、1-蒽基、2-蒽基、9-蒽基。

【0048】 在本說明書中，「C_{7-16}芳烷基」可列舉例如：苄基、苯乙基、萘基甲基、苯基丙基。

【0049】 在本說明書中，「C_{1-6}烷氧基」可列舉例如：甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基、丁氧基、異丁氧基、第二丁氧基、第三丁氧基、戊基氧基、己基氧基。

【0050】 在本說明書中，「可經鹵化之 C_{1-6}烷氧基」可舉出例如可具有 1 至 7 個，較佳為 1 至 5 個鹵素原子之 C_{1-6}烷氧基。具體例可列舉：甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基、乙氧基、2,2,2-三氟乙氧基、丙氧基、異丙氧基、丁氧基、4,4,4-三氟丁氧基、異丁氧基、第二丁氧基、戊基氧基、己基氧基。

【0051】 在本說明書中，「C_{3-10}環烷基氧基」可列舉例如：環丙基氧基、環丁基氧基、環戊基氧基、環己基氧基、環庚基氧基、環辛基氧基。

【0052】 在本說明書中，「C_{1-6}烷基硫基」可列舉例如：甲基硫基、乙基硫基、丙基硫基、異丙基硫基、丁基硫基、第二丁基硫基、第三丁基硫基、戊基硫基、己基硫基。

【0053】 在本說明書中，「可經鹵化之 C_{1-6}烷基硫基」可舉出例如：可具有 1 至 7 個，較佳為 1 至 5 個鹵素原子之 C_{1-6}烷基硫基。具體例可列

舉：甲基硫基、二氟甲基硫基、三氟甲基硫基、乙基硫基、丙基硫基、異丙基硫基、丁基硫基、4,4,4-三氟丁基硫基、戊基硫基、己基硫基。

【0054】 在本說明書中，「C_{1-6}烷基-羰基」可列舉例如：乙醯基、丙醯基、丁醯基、2-甲基丙醯基、戊醯基、3-甲基丁醯基、2-甲基丁醯基、2,2-二甲基丙醯基、己醯基、庚醯基。

【0055】 在本說明書中，「可經鹵化之 C_{1-6}烷基-羰基」可舉出例如可具有 1 至 7 個，較佳為 1 至 5 個鹵素原子之 C_{1-6}烷基-羰基。具體例可列舉：乙醯基、氯乙醯基、三氟乙醯基、三氯乙醯基、丙醯基、丁醯基、戊醯基、己醯基。

【0056】 在本說明書中，「C_{1-6}烷氧基-羰基」可列舉例如：甲氧基羰基、乙氧基羰基、丙氧基羰基、異丙氧基羰基、丁氧基羰基、異丁氧基羰基、第二丁氧基羰基、第三丁氧基羰基、戊基氧基羰基、己基氧基羰基。

【0057】 在本說明書中，「C_{6-14}芳基-羰基」可列舉例如：苄醯基、1-萘甲醯基、2-萘甲醯基。

【0058】 在本說明書中，「C_{7-16}芳烷基-羰基」可列舉例如：苯基乙醯基、苯基丙醯基。

【0059】 在本說明書中，「5 至 14 員芳香族雜環羰基」可列舉例如：菸鹼醯基、異菸鹼醯基、噻吩甲醯基、呋喃甲醯基。

【0060】 在本說明書中，「3 至 14 員非芳香族雜環羰基」可列舉例如：嗎啉基羰基、哌啶基羰基、吡咯啶基羰基。

【0061】 在本說明書中，「單-或二-C_{1-6}烷基-胺甲醯基」可列舉例如：甲基胺甲醯基、乙基胺甲醯基、二甲基胺甲醯基、二乙基胺甲醯基、N-乙基-N-甲基胺甲醯基。

【0062】 在本說明書中，「單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺甲醯基」可列舉例如：苄基胺甲醯基、苯乙基胺甲醯基。

【0063】 在本說明書中，「C_{1-6}烷基磺醯基」可列舉例如：甲基磺醯基、乙基磺醯基、丙基磺醯基、異丙基磺醯基、丁基磺醯基、第二丁基磺醯基、第三丁基磺醯基。

【0064】 在本說明書中，「可經鹵化之 C_{1-6}烷基磺醯基」可列舉例如：可具有 1 至 7 個，較佳為 1 至 5 個鹵素原子之 C_{1-6}烷基磺醯基。具體例可列舉：甲基磺醯基、二氟甲基磺醯基、三氟甲基磺醯基、乙基磺醯基、丙基磺醯基、異丙基磺醯基、丁基磺醯基、4,4,4-三氟丁基磺醯基、戊基磺醯基、己基磺醯基。

【0065】 在本說明書中，「C_{6-14}芳基磺醯基」可列舉例如：苯基磺醯基、1-萘基磺醯基、2-萘基磺醯基。

【0066】 在本說明書中，「取代基」可列舉例如：鹵素原子、氰基、硝基、可經取代之烴基、可經取代之雜環基、醯基、可經取代之胺基、可經取代之胺甲醯基、可經取代之胺硫甲醯基、可經取代之胺磺醯基、可經取代之羥基、可經取代之氫硫(SH)基、可經取代之矽烷基。

【0067】 在本說明書中，「烴基」(包含「可經取代之烴基」中之「烴基」)可列舉例如：C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{3-10}環烷基、C_{3-10}環烯基、C_{6-14}芳基、C_{7-16}芳烷基。

【0068】 在本說明書中，「可經取代之烴基」可出舉例如可具有選自下述取代基群組 A 之取代基之烴基。

[取代基群組 A]

(1) 鹵素原子，

(2) 硝基，

(3) 氰基，

(4) 側氧基，

(5) 羥基，

(6) 可經鹵化之 C_{1-6}烷氧基，

(7) C_{6-14}芳基氧基(例如，苯氧基、萘氧基)，

(8) C_{7-16}芳烷基氧基(例如，苄基氧基)，

(9) 5 至 14 員芳香族雜環氧基(例如，吡啶基氧基)，

(10) 3 至 14 員非芳香族雜環氧基(例如，嗎啉基氧基、哌啶基氧基)，

(11) C_{1-6}烷基-羰基氧基(例如，乙醯氧基、丙醯基氧基)，

(12) C_{6-14}芳基-羰基氧基(例如，苄醯基氧基、1-萘甲醯基氧基、2-萘甲醯基氧基)，

(13) C_{1-6}烷氧基-羰基氧基(例如，甲氧基羰基氧基、乙氧基羰基氧基、丙氧基羰基氧基、丁氧基羰基氧基)，

(14) 單-或二-C_{1-6}烷基-胺甲醯基氧基(例如，甲基胺甲醯基氧基、乙基胺甲醯基氧基、二甲基胺甲醯基氧基、二乙基胺甲醯基氧基)，

(15) C_{6-14}芳基-胺甲醯基氧基(例如，苯基胺甲醯基氧基、萘基胺甲醯基氧基)，

(16) 5 至 14 員芳香族雜環羰基氧基(例如，菸鹼醯基氧基)，

(17) 3 至 14 員非芳香族雜環羰基氧基(例如，嗎啉基羰基氧基、哌啶基羰基氧基)，

(18) 可經鹵化之 C_{1-6} 烷基磺醯基氧基(例如，甲基磺醯基氧基、三氟甲基磺醯基氧基)，

(19) 可經 C_{1-6} 烷基取代之 C_{6-14} 芳基磺醯基氧基(例如，苯基磺醯基氧基、甲苯磺醯基氧基)，

(20) 可經鹵化之 C_{1-6} 烷基硫基，

(21) 5 至 14 員芳香族雜環基，

(22) 3 至 14 員非芳香族雜環基，

(23) 甲醯基，

(24) 羧基，

(25) 可經鹵化之 C_{1-6} 烷基-羰基，

(26) C_{6-14} 芳基-羰基，

(27) 5 至 14 員芳香族雜環羰基，

(28) 3 至 14 員非芳香族雜環羰基，

(29) C_{1-6} 烷氧基-羰基，

(30) C_{6-14} 芳基氧基-羰基(例如，苯基氧基羰基、1-萘基氧基羰基、2-萘基氧基羰基)，

(31) C_{7-16} 芳烷基氧基-羰基(例如，苄基氧基羰基、苯乙基氧基羰基)，

(32) 胺甲醯基，

(33) 胺硫甲醯基，

(34) 單-或二-C_{1-6}烷基-胺甲醯基，

(35) C_{6-14}芳基-胺甲醯基(例如，苯基胺甲醯基)，

(36) 5 至 14 員芳香族雜環胺甲醯基(例如，吡啶基胺甲醯基、噻吩基胺甲醯基)，

(37) 3 至 14 員非芳香族雜環胺甲醯基(例如，嗎啉基胺甲醯基、哌啶基胺甲醯基)，

(38) 可經鹵化之 C_{1-6}烷基磺醯基，

(39) C_{6-14}芳基磺醯基，

(40) 5 至 14 員芳香族雜環磺醯基(例如，吡啶基磺醯基、噻吩基磺醯基)，

(41) 可經鹵化之 C_{1-6}烷基亞磺醯基，

(42) C_{6-14}芳基亞磺醯基(例如，苯基亞磺醯基、1-萘基亞磺醯基、2-萘基亞磺醯基)，

(43) 5 至 14 員芳香族雜環亞磺醯基(例如，吡啶基亞磺醯基、噻吩基亞磺醯基)，

(44) 胺基，

(45) 單-或二-C_{1-6}烷基胺基(例如，甲基胺基、乙基胺基、丙基胺基、異丙基胺基、丁基胺基、二甲基胺基、二乙基胺基、二丙基胺基、二丁基胺基、N-乙基-N-甲基胺基)，

(46) 單-或二-C_{6-14}芳基胺基(例如，苯基胺基)，

(47) 5 至 14 員芳香族雜環胺基(例如，吡啶基胺基)，

(48) C_{7-16}芳烷基胺基(例如，苄基胺基)，

(49) 甲醯基胺基，

(50) C_{1-6}烷基-羰基胺基(例如，乙醯基胺基、丙醯基胺基、丁醯基胺基)，

(51) (C_{1-6}烷基)(C_{1-6}烷基-羰基)胺基(例如，N-乙醯基-N-甲基胺基)，

(52) C_{6-14}芳基-羰基胺基(例如，苯基羰基胺基、萘基羰基胺基)，

(53) C_{1-6}烷氧基-羰基胺基(例如，甲氧基羰基胺基、乙氧基羰基胺基、丙氧基羰基胺基、丁氧基羰基胺基、第三丁氧基羰基胺基)，

(54) C_{7-16}芳烷基氧基-羰基胺基(例如，苄基氧基羰基胺基)，

(55) C_{1-6}烷基磺醯基胺基(例如，甲基磺醯基胺基、乙基磺醯基胺基)，

(56) 可經C_{1-6}烷基取代之C_{6-14}芳基磺醯基胺基(例如，苯基磺醯基胺基、甲苯磺醯基胺基)，

(57) 可經鹵化之C_{1-6}烷基，

(58) C_{2-6}烯基，

(59) C_{2-6}炔基，

(60) C_{3-10}環烷基，

(61) C_{3-10}環烯基，以及

(62) C_{6-14}芳基。

【0069】「可經取代之烴基」中之上述取代基的數量係例如為1至5個，較佳為1至3個。在取代基數為2個以上時，各取代基可相同，亦可不同。

【0070】在本說明書中，「雜環基」(包含「可經取代之雜環基」中之「雜環基」)可列舉例如：除了碳原子以外，尚各自含有選自氮原子、硫原

子及氧原子之 1 至 4 個雜原子作為環構成原子之(i)芳香族雜環基、(ii)非芳香族雜環基及(iii)7 至 10 員雜交聯環基。

【0071】 在本說明書中，「芳香族雜環基」(包含「5 至 14 員芳香族雜環基」)可列舉例如：除了碳原子以外，尚含有選自氮原子、硫原子及氧原子之 1 至 4 個雜原子作為環構成原子之 5 至 14 員(較佳為 5 至 10 員)芳香族雜環基。

該「芳香族雜環基」之較佳例可列舉：噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、異噻唑基、噁唑基、異噁唑基、吡啶基、吡哢基、嘧啶基、嗒哢基、1,2,4-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、1,2,4-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、三唑基、四唑基、三哢基等 5 至 6 員單環式芳香族雜環基；

苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并異噁唑基、苯并噻唑基、苯并異噻唑基、苯并三唑基、咪唑并吡啶基、噻吩并吡啶基、呋喃并吡啶基、吡咯并吡啶基、吡唑并吡啶基、噁唑并吡啶基、噻唑并吡啶基、咪唑并吡哢基、咪唑并嘧啶基、噻吩并嘧啶基、呋喃并嘧啶基、吡咯并嘧啶基、吡唑并嘧啶基、噁唑并嘧啶基、噻唑并嘧啶基、吡唑并三哢基、萘并[2,3-b]噻吩基、啡噁噻基、吲哚基、異吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、異喹啉基、喹啉基、呔哢基、喰啶基、喹噁啉基、喹唑啉基、噌啉基、咔唑基、β-咔啉基、啡啶基、吖啶基、啡哢基、啡噻哢基、啡噁哢基等 8 至 14 員縮合多環式(較佳為 2 或 3 環式)芳香族雜環基。

【0072】 在本說明書中，「非芳香族雜環基」(包含「3 至 14 員非芳香族雜環基」)可舉出例如除了碳原子以外，尚含有選自氮原子、硫原子及

氧原子之 1 至 4 個雜原子作為環構成原子之 3 至 14 員(較佳為 4 至 10 員)非芳香族雜環基。

該「非芳香族雜環基」之較佳例可列舉：氮雜環丙基、氧雜環丙基、硫雜環丙基、氮雜環丁基、氧雜環丁基、硫雜環丁基、四氫噻吩基、四氫呋喃、吡咯啉基、吡咯啶基、咪唑啉基、咪唑啶基、噁唑啉基、噁唑啶基、吡唑啉基、吡唑啶基、噻唑啉基、噻唑啶基、四氫異噻唑基、四氫噁唑基、四氫異噁唑基、哌啶基、哌咲基、四氫吡啶基、二氫吡啶基、二氫噻喃基、四氫嘧啶基、四氫嗒咲基、二氫哌喃基、四氫哌喃基、四氫噻喃基、嗎啉基、硫代嗎啉基、氮雜環庚基、二氮雜環庚基、氮雜環庚烯基、氧雜環庚基、氮雜環辛基、二氮雜環辛基等 3 至 8 員單環式非芳香族雜環基；

二氫苯并呋喃基、二氫苯并咪唑基、二氫苯并噁唑基、二氫苯并噻唑基、二氫苯并異噻唑基、二氫萘并[2,3-b]噻吩基、四氫異喹啉基、四氫喹啉基、4H-喹咲基、吲哚啉基、異吲哚啉基、四氫噻吩并[2,3-c]吡啶基、四氫苯并氮雜環庚烯基、四氫喹噁啉基、四氫啡啶基、六氫啡噻咲基、六氫啡噁咲基、四氫呔咲基、四氫嗪啶基、四氫喹唑啉基、四氫噌啉基、四氫咔唑基、四氫-β-咔啉基、四氫吖啶基、四氫啡咲基、四氫硫二苯并哌喃基、八氫異喹啉基等 9 至 14 員縮合多環式(較佳為 2 或 3 環式)非芳香族雜環基。

【0073】 在本說明書中，「7 至 10 員雜交聯環基」之較佳例可列舉：喹噾環基、7-氮雜雙環[2.2.1]庚基。

【0074】 在本說明書中，「含氮雜環基」可舉出「雜環基」中，含有至少 1 個以上氮原子作為環構成原子者。

【0075】 在本說明書中，「可經取代之雜環基」可舉出例如可具有選自前述之取代基群組 A 之取代基之雜環基。

【0076】 「可經取代之雜環基」中之取代基的數量係例如為 1 至 3 個。在取代基數為 2 個以上時，各取代基可相同，亦可不同。

【0077】 在本說明書中，「醯基」可列舉例如：可各自具有「選自可各自具有選自鹵素原子、可經鹵化之 C_{1-6} 烷氧基、羥基、硝基、氰基、胺基及胺甲醯基之 1 至 3 個取代基之 C_{1-6} 烷基、C_{2-6} 烯基、C_{3-10} 環烷基、C_{3-10} 環烯基、C_{6-14} 芳基、C_{7-16} 芳烷基、5 至 14 員芳香族雜環基及 3 至 14 員非芳香族雜環基之 1 或 2 個取代基」之甲醯基、羧基、胺甲醯基、胺硫甲醯基、亞磺酸基、磺酸基、胺磺醯基、膦醯基。

【0078】 再者，「醯基」亦可列舉：烴-磺醯基、雜環-磺醯基、烴-亞磺醯基、雜環-亞磺醯基。

在此，所謂烴-磺醯基係意指與烴基鍵結成之磺醯基，所謂雜環-磺醯基係意指與雜環基鍵結成之磺醯基，所謂烴-亞磺醯基係意指與烴基鍵結成之亞磺醯基，所謂雜環-亞磺醯基係意指與雜環基鍵結成之亞磺醯基。

「醯基」之較佳例可列舉：甲醯基、羧基、C_{1-6} 烷基-羰基、C_{2-6} 烯基-羰基(例如，巴豆醯基)、C_{3-10} 環烷基-羰基(例如，環丁烷羰基、環戊烷羰基、環己烷羰基、環庚烷羰基)、C_{3-10} 環烯基-羰基(例如，2-環己烯羰基)、C_{6-14} 芳基-羰基、C_{7-16} 芳烷基-羰基、5 至 14 員芳香族雜環羰基、3 至 14 員非芳香族雜環羰基、C_{1-6} 烷氧基-羰基、C_{6-14} 芳基氧基-羰基(例如，苯基氧基羰基、萘基氧基羰基)、C_{7-16} 芳烷基氧基-羰基(例如，苄基氧基羰基、苯乙基氧基羰基)、胺甲醯基、單-或二-C_{1-6} 烷基-胺甲醯基、單-或二-C_{2-6} 烯基-胺

甲醯基(例如，二烯丙基胺甲醯基)、單-或二-C_{3-10}環烷基-胺甲醯基(例如，環丙基胺甲醯基)、單-或二-C_{6-14}芳基-胺甲醯基(例如，苯基胺甲醯基)、單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺甲醯基、5至14員芳香族雜環胺甲醯基(例如，吡啶基胺甲醯基)、胺硫甲醯基、單-或二-C_{1-6}烷基-胺硫甲醯基(例如，甲基胺硫甲醯基、N-乙基-N-甲基胺硫甲醯基)、單-或二-C_{2-6}烯基-胺硫甲醯基(例如，二烯丙基胺硫甲醯基)、單-或二-C_{3-10}環烷基-胺硫甲醯基(例如，環丙基胺硫甲醯基、環己基胺硫甲醯基)、單-或二-C_{6-14}芳基-胺硫甲醯基(例如，苯基胺硫甲醯基)、單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺硫甲醯基(例如，苄基胺硫甲醯基、苯乙基胺硫甲醯基)、5至14員芳香族雜環胺硫甲醯基(例如，吡啶基胺硫甲醯基)、亞磺酸基、C_{1-6}烷基亞磺醯基(例如，甲基亞磺醯基、乙基亞磺醯基)、磺酸基、C_{1-6}烷基磺醯基、C_{6-14}芳基磺醯基、膦醯基、單-或二-C_{1-6}烷基膦醯基(例如，二甲基膦醯基、二乙基膦醯基、二異丙基膦醯基、二丁基膦醯基)。

【0079】 在本說明書中，「可經取代之胺基」可列舉例如：可具有「選自可各自具有選自取代基群組A之1至3個取代基之C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}環烷基、C_{6-14}芳基、C_{7-16}芳烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳基-羰基、C_{7-16}芳烷基-羰基、5至14員芳香族雜環羰基、3至14員非芳香族雜環羰基、C_{1-6}烷氧基-羰基、5至14員芳香族雜環基、胺甲醯基、單-或二-C_{1-6}烷基-胺甲醯基、單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺甲醯基、C_{1-6}烷基磺醯基及C_{6-14}芳基磺醯基之1或2個取代基」之胺基。

【0080】 可經取代之胺基之較佳例可列舉：胺基、單-或二-(可經鹵化之C_{1-6}烷基)胺基(例如，甲基胺基、三氟甲基胺基、二甲基胺基、乙基胺

基、二乙基胺基、丙基胺基、二丁基胺基)、單-或二-C_{2-6}烯基胺基(例如，二烯丙基胺基)、單-或二-C_{3-10}環烷基胺基(例如，環丙基胺基、環己基胺基)、單-或二-C_{6-14}芳基胺基(例如，苯基胺基)、單-或二-C_{7-16}芳烷基胺基(例如，苄基胺基、二苄基胺基)、單-或二-(可經鹵化之 C_{1-6}烷基)-羰基胺基(例如，乙醯基胺基、丙醯基胺基)、單-或二-C_{6-14}芳基-羰基胺基(例如，苄醯基胺基)、單-或二-C_{7-16}芳烷基-羰基胺基(例如，苄基羰基胺基)、單-或二-5 至 14 員芳香族雜環羰基胺基(例如，菸鹼醯基胺基、異菸鹼醯基胺基)、單-或二-3 至 14 員非芳香族雜環羰基胺基(例如，哌啶基羰基胺基)、單-或二-C_{1-6}烷氧基-羰基胺基(例如，第三丁氧基羰基胺基)、5 至 14 員芳香族雜環胺基(例如，吡啶基胺基)、胺甲醯基胺基、(單-或二-C_{1-6}烷基-胺甲醯基)胺基(例如，甲基胺甲醯基胺基)、(單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺甲醯基)胺基(例如，苄基胺甲醯基胺基)、C_{1-6}烷基磺醯基胺基(例如，甲基磺醯基胺基、乙基磺醯基胺基)、C_{6-14}芳基磺醯基胺基(例如，苯基磺醯基胺基)、(C_{1-6}烷基)(C_{1-6}烷基-羰基)胺基(例如，N-乙醯基-N-甲基胺基)、(C_{1-6}烷基)(C_{6-14}芳基-羰基)胺基(例如，N-苄醯基-N-甲基胺基)。

【0081】 在本說明書中，「可經取代之胺甲醯基」可列舉例如：可具有「選自可各自具有選自取代基群組 A 之 1 至 3 個取代基之 C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}環烷基、C_{6-14}芳基、C_{7-16}芳烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳基-羰基、C_{7-16}芳烷基-羰基、5 至 14 員芳香族雜環羰基、3 至 14 員非芳香族雜環羰基、C_{1-6}烷氧基-羰基、5 至 14 員芳香族雜環基、胺甲醯基、單-或二-C_{1-6}烷基-胺甲醯基及單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺甲醯基之 1 或 2 個取代基」之胺甲醯基。

【0082】 可經取代之胺甲醯基之較佳例可列舉：胺甲醯基、單-或二-C_{1-6}烷基-胺甲醯基、單-或二-C_{2-6}烯基-胺甲醯基(例如，二烯丙基胺甲醯基)、單-或二-C_{3-10}環烷基-胺甲醯基(例如，環丙基胺甲醯基、環己基胺甲醯基)、單-或二-C_{6-14}芳基-胺甲醯基(例如，苯基胺甲醯基)、單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺甲醯基、單-或二-C_{1-6}烷基-羰基-胺甲醯基(例如，乙醯基胺甲醯基、丙醯基胺甲醯基)、單-或二-C_{6-14}芳基-羰基-胺甲醯基(例如，苄醯基胺甲醯基)、5 至 14 員芳香族雜環胺甲醯基(例如，吡啶基胺甲醯基)。

【0083】 在本說明書中，「可經取代之胺硫甲醯基」可列舉例如：可具有「選自可各自具有選自取代基群組 A 之 1 至 3 個取代基之 C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}環烷基、C_{6-14}芳基、C_{7-16}芳烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳基-羰基、C_{7-16}芳烷基-羰基、5 至 14 員芳香族雜環羰基、3 至 14 員非芳香族雜環羰基、C_{1-6}烷氧基-羰基、5 至 14 員芳香族雜環基、胺甲醯基、單-或二-C_{1-6}烷基-胺甲醯基及單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺甲醯基之 1 或 2 個取代基」之胺硫甲醯基。

【0084】 可經取代之胺硫甲醯基之較佳例可列舉：胺硫甲醯基、單-或二-C_{1-6}烷基-胺硫甲醯基(例如，甲基胺硫甲醯基、乙基胺硫甲醯基、二甲基胺硫甲醯基、二乙基胺硫甲醯基、N-乙基-N-甲基胺硫甲醯基)、單-或二-C_{2-6}烯基-胺硫甲醯基(例如，二烯丙基胺硫甲醯基)、單-或二-C_{3-10}環烷基-胺硫甲醯基(例如，環丙基胺硫甲醯基、環己基胺硫甲醯基)、單-或二-C_{6-14}芳基-胺硫甲醯基(例如，苯基胺硫甲醯基)、單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺硫甲醯基(例如，苄基胺硫甲醯基、苯乙基胺硫甲醯基)、單-或二-C_{1-6}烷基-羰基-胺硫甲醯基(例如，乙醯基胺硫甲醯基、丙醯基胺硫甲醯基)、單-或二-

C_{6-14}芳基-羰基-胺硫甲醯基(例如，苄醯基胺硫甲醯基)、5 至 14 員芳香族雜環胺硫甲醯基(例如，吡啶基胺硫甲醯基)。

【0085】 在本說明書中，「可經取代之胺磺醯基」可列舉例如：可具有「選自可各自具有選自取代基群組 A 之 1 至 3 個取代基之 C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}環烷基、C_{6-14}芳基、C_{7-16}芳烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳基-羰基、C_{7-16}芳烷基-羰基、5 至 14 員芳香族雜環羰基、3 至 14 員非芳香族雜環羰基、C_{1-6}烷氧基-羰基、5 至 14 員芳香族雜環基、胺甲醯基、單-或二-C_{1-6}烷基-胺甲醯基及單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺甲醯基之 1 或 2 個取代基」之胺磺醯基。

【0086】 可經取代之胺磺醯基之較佳例可列舉：胺磺醯基、單-或二-C_{1-6}烷基-胺磺醯基(例如，甲基胺磺醯基、乙基胺磺醯基、二甲基胺磺醯基、二乙基胺磺醯基、N-乙基-N-甲基胺磺醯基)、單-或二-C_{2-6}烯基-胺磺醯基(例如，二烯丙基胺磺醯基)、單-或二-C_{3-10}環烷基-胺磺醯基(例如，環丙基胺磺醯基、環己基胺磺醯基)、單-或二-C_{6-14}芳基-胺磺醯基(例如，苯基胺磺醯基)、單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺磺醯基(例如，苄基胺磺醯基、苯乙基胺磺醯基)、單-或二-C_{1-6}烷基-羰基-胺磺醯基(例如，乙醯基胺磺醯基、丙醯基胺磺醯基)、單-或二-C_{6-14}芳基-羰基-胺磺醯基(例如，苄醯基胺磺醯基)、5 至 14 員芳香族雜環胺磺醯基(例如，吡啶基胺磺醯基)。

【0087】 在本說明書中，「可經取代之羥基」可列舉例如：可具有「選自可各自具有選自取代基群組 A 之 1 至 3 個取代基之 C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}環烷基、C_{6-14}芳基、C_{7-16}芳烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳基-羰基、C_{7-16}芳烷基-羰基、5 至 14 員芳香族雜環羰基、3 至 14 員非芳香族雜環羰

基、C_{1-6}烷氧基-羰基、5至14員芳香族雜環基、胺甲醯基、單-或二-C_{1-6}烷基-胺甲醯基、單-或二-C_{7-16}芳烷基-胺甲醯基、C_{1-6}烷基磺醯基及C_{6-14}芳基磺醯基之取代基」之羥基。

【0088】 可經取代之羥基之較佳例可列舉：羥基、C_{1-6}烷氧基、C_{2-6}烯基氧基(例如，烯丙基氧基、2-丁烯基氧基、2-戊烯基氧基、3-己烯基氧基)、C_{3-10}環烷基氧基(例如，環己基氧基)、C_{6-14}芳基氧基(例如，苯氧基、萘基氧基)、C_{7-16}芳烷基氧基(例如，苄基氧基、苯乙基氧基)、C_{1-6}烷基-羰基氧基(例如，乙醯基氧基、丙醯基氧基、丁醯基氧基、異丁醯基氧基、三甲基乙醯基氧基)、C_{6-14}芳基-羰基氧基(例如，苄醯基氧基)、C_{7-16}芳烷基-羰基氧基(例如，苄基羰基氧基)、5至14員芳香族雜環羰基氧基(例如，菸鹼醯基氧基)、3至14員非芳香族雜環羰基氧基(例如，哌啶基羰基氧基)、C_{1-6}烷氧基-羰基氧基(例如，第三丁氧基羰基氧基)、5至14員芳香族雜環氧基(例如，吡啶基氧基)、胺甲醯基氧基、C_{1-6}烷基-胺甲醯基氧基(例如，甲基胺甲醯基氧基)、C_{7-16}芳烷基-胺甲醯基氧基(例如，苄基胺甲醯基氧基)、C_{1-6}烷基磺醯基氧基(例如，甲基磺醯基氧基、乙基磺醯基氧基)、C_{6-14}芳基磺醯基氧基(例如，苯基磺醯基氧基)。

【0089】 在本說明書中，「可經取代之氫硫基」可列舉例如：可具有「選自可各自具有選自取代基群組A之1至3個取代基之C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{3-10}環烷基、C_{6-14}芳基、C_{7-16}芳烷基、C_{1-6}烷基-羰基、C_{6-14}芳基-羰基及5至14員芳香族雜環基之取代基」之氫硫基、經鹵化之氫硫基。

【0090】 可經取代之氫硫基之較佳例可列舉：氫硫(-SH)基、C_{1-6}烷基硫基、C_{2-6}烯基硫基(例如，烯丙基硫基、2-丁烯基硫基、2-戊烯基硫基、

3-己烯基硫基)、C_{3-10} 環烷基硫基(例如，環己基硫基)、C_{6-14} 芳基硫基(例如，苯基硫基、萘基硫基)、C_{7-16} 芳烷基硫基(例如，苄基硫基、苯乙基硫基)、C_{1-6} 烷基-羰基硫基(例如，乙醯基硫基、丙醯基硫基、丁醯基硫基、異丁醯基硫基、三甲基乙醯基硫基)、C_{6-14} 芳基-羰基硫基(例如，苄醯基硫基)、5 至 14 員芳香族雜環硫基(例如，吡啶基硫基)、鹵化硫基(例如，五氟硫基)。

【0091】 在本說明書中，「可經取代之矽烷基」可列舉例如：可具有「選自可各自具有選自取代基群組 A 之 1 至 3 個取代基之 C_{1-6} 烷基、C_{2-6} 烯基、C_{3-10} 環烷基、C_{6-14} 芳基及 C_{7-16} 芳烷基之 1 至 3 個取代基」之矽烷基。

【0092】 可經取代之矽烷基之較佳例可列舉：三-C_{1-6} 烷基矽烷基(例如，三甲基矽烷基、第三丁基(二甲基)矽烷基)。

【0093】 更具體而言，在本發明中，能夠利用之 FGFR1 抑制劑可例示：PD-166866(1-[2-胺基-6-(3,5-二甲氧基苯基)-吡啶并(2,3-d)嘧啶-7-基]-3-第三丁基脲：CAS No.：192705-79-6)、E-3810(CAS No.：1058137-23-7)、PD-173074(CAS No.：219580-11-7)、FGFR4-IN-1(CAS No.：1708971-72-5)、FGFR-IN-1(CAS No.：1448169-71-8)、FIIN-2(CAS No.：1633044-56-0)、AZD4547 (CAS No.：1035270-39-3)、FIIN-3(CAS No.：1637735-84-2)、NVP-BGJ398(CAS No.：1310746-10-1)、NVP-BGJ398 (CAS No.：872511-34-7)、CH5183284(CAS No.：1265229-25-1)、德拉贊替尼(Derazantinib)(CAS No.：1234356-69-4)、德拉贊替尼消旋體(Derazantinib Racemate)、阿魏酸(Ferulic acid)(CAS No.：1135-24-6)、SSR128129E(CAS No.：848318-25-2)、SSR128129E 自由酸(free acid)

(CAS No.：848463-13-8)、厄達菲替尼(Erdafitinib)(CAS No.：1346242-81-6)、BLU9931(CAS No.：1538604-68-0)、PRN1371(CAS No.：1802929-43-6)、S49076(CAS No.：1265965-22-7)、LY2874455(CAS No.：1254473-64-7)、林西替尼(Linsitinib)(CAS No.：867160-71-2)、多韋替尼(Dovitinib)(CAS No.：405169-16-6)、安洛替尼(Anlotinib)(CAS No.：1058156-90-3)、布里瓦尼(Brivanib)(CAS No.：649735-46-6)、德拉贊替尼(Derazantinib)(CAS No.：1234356-69-4)、安洛替尼二鹽酸鹽(Anlotinib Dihydrochloride)(CAS No.：1360460-82-7)、ACTB-1003(CAS No.：939805-30-8)、BLU-554(CAS No.：1707289-21-1)、羅加替尼(Rogaratinib)(CAS No.：1443530-05-9)、BIBF 1120 esylate(CAS No.：656247-18-6)、TG 100572 鹽酸鹽(CAS No.：867331-64-4)、ENMD-2076(CAS No.：934353-76-1)、布里瓦尼丙胺酸鹽(Brivanib alaninate)(CAS No.：649735-63-7)、TG 100572(CAS No.：867334-05-2)、BIBF 1120(CAS No.：656247-17-5)、ENMD-2076 酒石酸鹽(CAS No.：1291074-87-7)、TSU-68(CAS No.：252916-29-3)、帕那替尼(Ponatinib)(CAS No.：943319-70-8)、舒法替尼(Sulfatinib)(CAS No.：1308672-74-3)、LY2784544(CAS No.：1229236-86-5)、多韋替尼乳酸鹽(Dovitinib lactate)(CAS No.：692737-80-7)、SU 5402(CAS No.：215543-92-3)、FGF-401(CAS No.：1708971-55-4)、酪胺酸激酶(Tyrosine kinase)-IN-1(CAS No.：705946-27-6)、PP58(CAS No.：212391-58-7)、TG 100801 鹽酸鹽(CAS No.：1018069-81-2)、克倫諾尼(Crenolanib)(CAS No.：670220-88-9)、TG 100801(CAS No.：867331-82-6)、帕唑帕尼鹽酸鹽(Pazopanib Hydrochloride)(CAS No.：635702-64-

6)、帕唑帕尼(Pazopanib)(CAS No.：444731-52-6)、PD168393(CAS No.：194423-15-9)、阿帕替尼(Apatinib)(CAS No.：1218779-75-9)、帕博西麗羥乙基磺酸鹽(Palbociclib isethionate)(CAS No.：827022-33-3)、福瑞替尼(Foretinib)(CAS No.：849217-64-7)、倫伐替尼(Lenvatinib)(CAS No.：417716-92-8)、坦度替尼(Tandutinib)(CAS No.：387867-13-2)等或其鹽(將此等化合物作為化合物群組 D)。再者，此等化合物在具有 FGFR1 抑制活性之前提下，較佳係在 FGFR1 的 50%抑制濃度(IC_{50})為 100nM 以下之前提下，可具有選自上述之一個或複數個取代基。

再者，此等化合物在具有 FGFR1 抑制活性之前提下，較佳係在 FGFR1 的 50%抑制濃度(IC_{50})為 100nM 以下之前提下，一部分的部分結構(取代基、環等)亦可進行轉換。

【0094】 較佳地，在本發明中，FGFR1 抑制劑為 CAS192705-79-6(1-[2-胺基-6-(3,5-二甲氧基苯基)-吡啶并(2,3-d)嘧啶-7-基]-3-第三丁基脲：CAS No.：192705-79-6)、E-3810(CAS No.：1058137-23-7)、PD173074(CAS No.：219580-11-7)。

【0095】 FGFR1 抑制劑並不限定於上述所示之化合物，相對於 FGFR1 的 mRNA 之反義寡核苷酸或 siRNA、與 FGFR1 結合之抗體、顯性負性 FGFR1 變異體等亦可使用 FGFR1 抑制劑，可從商業上取得或依照公知的方法合成。

【0096】 在本說明書中，所謂「標記」係意指「標記蛋白質」、「標記基因」等藉由既定的細胞型所特異性性表現之細胞抗原或其基因。較佳

地，標記為細胞表面標記，此時，能夠實施存活細胞的濃縮、單離及/或檢測。標記可為陽性選擇標記或陰性選擇標記。

【0097】 標記蛋白質的檢測可利用使用對該標記蛋白質呈特異性之抗體之免疫學分析，例如 ELISA、免疫染色、流式細胞儀來施行。標記基因的檢測可利用該領域中公知的核酸增幅方法及/或核酸檢測方法，例如 RT-PCR、微陣列、生物晶片等來施行。在本說明書中，所謂標記蛋白質呈「陽性」係意指在流式細胞儀中經檢測為陽性，所謂「陰性」，意指在流式細胞儀中呈檢測極限以下。再者，所謂標記基因呈「陽性」係意指藉由 RT-PCR 進行檢測，所謂「陰性」係意指在 RT-PCR 中呈檢測極限以下。

【0098】 在本說明書中，所謂「表現(expression)」係定義為由細胞內之啟動子所驅動之特定核苷酸序列的轉錄及/或轉譯。

【0099】 在本說明書中，所謂「細胞」在沒有特別註記之前提下，係意指細胞的組成物，亦即，細胞集團。因此，「細胞」不僅是特定的細胞或細胞集團，亦可包含一種或複數種其他的細胞或細胞集團。「細胞」中之特定的細胞可藉由進行富集或純化，或者藉由耗乏一種或複數種其他細胞而提升。

【0100】 在本說明書中，所謂「多能性(pluripotency)」係意指可分化成具有各種不同形態或功能之組織或細胞，且可分化成 3 胚層之任何系統的細胞之能力。「多能性(pluripotency)」無法分化成胚盤，因此，就沒有形成個體之能力之觀點而言係與包含胚盤在內，可分化成生體的所有組織之「全能性(totipotency)」有所區別。

【0101】 在本說明書中，所謂「多能性(multipotency)」係意指可分化成複數種限定數量的系統的細胞之能力。例如，間葉系幹細胞、造血幹細胞、神經幹細胞為多能性(multipotent)，而非多能性(pluripotent)。

【0102】 在本說明書中，所謂「多能性幹細胞(pluripotent stem cell)」係指胚胎幹細胞(ES 細胞)以及潛在地具有與其同樣的分化多能性，亦即，分化成生體的各式各樣組織(內胚層、中胚層、外胚層全部)之能力之細胞。具有與 ES 細胞同樣的分化多能性之細胞，可列舉「人工多能性幹細胞」(本說明書中，有時亦稱為「iPS 細胞」)。較佳地，在本發明中，所謂多能性幹細胞係人類多能性幹細胞。

【0103】 「ES 細胞」，若為小鼠 ES 細胞，能夠利用 inGenious 公司、理研等所樹立之各種小鼠 ES 細胞株，若為人類 ES 細胞，能夠利用 NIH、理研、京都大學、Cellartis 公司所樹立之各種人類 ES 細胞株。例如，ES 細胞株可利用：NIH 之 CHB-1 至 CHB-12 株、RUES1 株、RUES2 株、HUES1 至 HUES28 株等；WisCell Research 之 H1 株、H9 株；理研之 KhES-1 株、KhES-2 株、KhES-3 株、KhES-4 株、KhES-5 株、SSES1 株、SSES2 株、SSES3 株等。

【0104】 所謂「人工多能性幹細胞」係指藉由將特定因子(核初期化因子)導入至哺乳動物體細胞或未分化幹細胞中並進行重編程所獲得之細胞。目前，在「人工多能性幹細胞」中有各式各樣者，亦可使用由山中等人藉由將 Oct3/4、Sox2、Klf4 及 c-Myc 的 4 因子導入至小鼠纖維母細胞中所樹立之 iPS 細胞(Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126:663-676)；除此以外，將同樣的 4 因子導入至人類纖維母細胞中所樹立之源自

人類細胞之 iPS 細胞(Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131:861-872.)；導入上述 4 因子後，以 Nanog 的表現作為指標進行選別所樹立之 Nanog-iPS 細胞(Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.)；以不含 c-Myc 之方法所製作出之 iPS 細胞(Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106))；在無病毒下導入 6 因子所樹立之 iPS 細胞(Okita K et al. Nat. Methods 2011 May; 8(5):409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31(3):458-66.)。此外，亦可使用由 Thomson 等人所製作出之導入 OCT3/4/SOX2/NANOG/LIN28 的 4 因子所樹立之人工多能性幹細胞(Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318:1917-1920.)、由 Daley 等人所製作出之人工多能性幹細胞(Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451:141-146)、由櫻田等人所製作出之人工多能性幹細胞(日本特開 2008-307007 號)等。

【0105】 除此以外，已公開之所有論文(例如，Shi Y.，Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol3, Issue 5, 568-574；Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650；Huangfu D., Melton, A., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797)或專利(例如，日本特開 2008-307007 號、日本特開 2008-283972 號、US2008/2336610、US2009/047263、WO2007/069666、WO2008/118220、WO2008/124133、WO2008/151058、WO2009/006930、WO2009/006997、WO2009/007852)所記載之該領域中公知的人工多能性幹細胞皆可使用。

【0106】 人工多能性細胞株能夠利用 NIH、理化學研究所(理研)、京都大學等所樹立之各種 iPS 細胞株。例如，若為人類 iPS 細胞株，可列舉：理研之 HiPS-RIKEN-1A 株、HiPS-RIKEN-2A 株、HiPS-RIKEN-12A 株、Nips-B2 株；京都大學之 Ff-WJ-18 株、Ff-I01s01 株、Ff-I01s02 株、Ff-I01s04 株、Ff-I01s06 株、Ff-I14s03 株、Ff-I14s04 株、QHJI01s01 株、QHJI01s04 株、QHJI14s03 株、QHJI14s04 株、RWMH15s02 株、Ff-MH15s02 株、253G1 株、201B7 株、409B2 株、454E2 株、606A1 株、610B1 株、648A1 株；CDI 公司之 MyCell iPS Cells(21525.102.10A)株、MyCell iPS Cells(21526.101.10A)株等。

【0107】 在本說明書中，所謂「胚體內胚層細胞」係意指由 SOX17、FOXA2、BMP2、CER 及 CXCR4 中之至少一種標記的表現而賦予特徵之細胞。

【0108】 在本說明書中，所謂「原腸管細胞」係意指由 HNF1B 及 HNF4A 中之至少一種標記的表現而賦予特徵之細胞。

【0109】 在本說明書中，所謂「後方前腸細胞」係意指由 PDX-1、HNF6 及 HLXB9 中之至少一種標記的表現而賦予特徵之細胞。

【0110】 在本說明書中，所謂「胰前驅細胞」係意指由 PDX-1、NKX6.1、PTF-1α、GATA4 及 SOX9 中之至少一種標記的表現而賦予特徵之細胞。

【0111】 在本說明書中，所謂「內分泌前驅細胞」係意指由染色顆粒素 A、NeuroD 及 Ngn3 中之至少一種標記的表現，以及胰相關的激素系統

(例如，胰島素等)的標記不表現而賦予特徵之細胞。內分泌前驅細胞亦可表現 Pax-4、NKX2-2、Islet-1、PDX-1、PTF-1α 等標記。

【0112】 處於各分化階段之細胞的製造可藉由下述所詳述之手法施行。

【0113】 2. 胰島素產生細胞

所謂本發明之「胰島素產生細胞」係意指藉由在活體外(in vitro)分化誘導多能性幹細胞所獲得之胰島素的表現而賦予特徵之細胞。更詳細而言，本發明之「胰島素產生細胞」係由以約 30%以上的比率含有表現出胰島素及 NKX6.1 兩種標記之細胞(亦即，胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞)，且以約超過 15%的比率含有胰島素及 NKX6.1 中僅表現胰島素作為標記之細胞(亦即，胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞，以下，記載為「Ins+NKX-細胞」)而賦予特徵。另外，本說明書中，有時將「胰島素陽性」記載為「Ins+」，將 NKX6.1 陽性記載為「NKX+」，將 NKX6.1 陰性記載為「NKX-」。再者，有時將「胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞」記載為「Ins+NKX+細胞」，將「胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞」記載為「Ins+NKX-細胞」。

【0114】 胰島素產生細胞中之 Ins+NKX+細胞的比率之上限並無特別限定，較佳係可設為約 50%以下。

【0115】 胰島素產生細胞中之 Ins+NKX-細胞的比率較佳係可設為約 20%以上，更佳為約 25%以上，再佳為約 30%以上。再者，胰島素產生細胞中之 Ins+NKX-細胞的比率之上限並無特別限定，較佳係可設為約 40%以下。

【0116】 例如，胰島素產生細胞係以約 30%以上且約 50%以下的比率含有 Ins+NKX+細胞，且以約超過 15%且約 40%以下的比率，較佳為約 20%以上且約 40%以下的比率，更佳為約 25%以上且約 40%以下的比率，再佳為約 30%以上且約 40%以下的比率含有 Ins+NKX-細胞。

【0117】 另外，本說明書中，所謂胰島素產生細胞中之既定細胞的比率，係意指相對於胰島素產生細胞中所包含之所有細胞數之比率。再者，各細胞的比率係表示付諸於向類胰島細胞的分化誘導(即，付諸於對生體內的移植)之胰島素產生細胞中之值。

【0118】 Ins+NKX-細胞常見於未成熟(分化階段較早)之胰島素產生細胞中，故 Ins+NKX-細胞的比率越高，表示屬於更未成熟(分化階段較早)之胰島素產生細胞。

【0119】 胰島素產生細胞可進一步具有選自以下 a.至 f.之一或複數種特徵：

a. MafA 基因或其蛋白質的表現量較低，

b. Ki67 陽性細胞的比率較低，

c. 升糖素陽性且胰島素陰性細胞的比率較低，

d. 顯示出葡萄糖刺激性胰島素分泌回應，

e. 染色顆粒素 A 陽性細胞的比率較高，

f. 鹼性磷酸酶陽性的多能性幹細胞的比率較低。

在此處，所謂「複數」係意指 2、3、4、5 或 6。

【0120】 a. MafA 基因或其基因產物的表現量較低

本發明之胰島素產生細胞之特徵，係相較於胰島中之 MafA 基因或其蛋白質的表現量，MafA 基因或其蛋白質的表現量較低。

【0121】 所謂「胰島」係意指相較於胰島素產生細胞，分化階段更進展之細胞，其係包含已成熟之胰 β 細胞，藉由屬於已成熟之胰 β 細胞的標記之 MafA、UCN3 及 IAPP 中之至少一者的表現而賦予特徵之細胞。胰島可使用單離自健康人者。

【0122】 胰島素產生細胞與胰島間之 MafA 基因或其蛋白質的表現量的比較，係可使用該領域中公知的手法施行，例如，可藉由使用 RT-PCR、微陣列、生物晶片、西方墨點法(Western blot)、ELISA、免疫染色、流式細胞儀等手法而檢測/定量 MafA 基因或其蛋白質的表現量，將該表現量與以內部標準基因或其蛋白質的表現量進行校正所獲得之相對值進行比較而施行。「內部標準基因」並無特別限定，可利用例如 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、β-肌動蛋白、β2-微球蛋白、HPRT 1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)等。

【0123】 胰島素產生細胞中之 MafA 基因或其蛋白質的表現量為胰島中之 MafA 基因或其蛋白質的表現量的約 20%以下，較佳為約 15%以下，更佳為約 10%以下，再佳為約 5%以下，尤佳為約 1%以下。

【0124】 MafA 基因或其蛋白質為已成熟之胰 β 細胞的標記，故本特徵顯示出本發明之胰島素產生細胞處於幾乎不含或以較低的比率含有已成熟之胰 β 細胞之程度的分化階段。

【0125】 b. Ki67 陽性細胞的比率較低

本發明之胰島素產生細胞之特徵為以未達3%的比率含有Ki67陽性細胞。

【0126】 所謂「Ki67 陽性細胞」係意指混合在自多能性幹細胞所分化誘導出之胰島素產生細胞中，藉由 Ki67 的表現作為標記而賦予特徵之增殖性高的細胞。「Ki67」已公知為細胞週期相關核蛋白質，在增殖中之細胞的 G1 期、S 期、G2 期、M 期可確認表現，在停止增殖之 G0 期未確認表現，因而亦已知為細胞增殖及細胞週期的標記。

【0127】 以下，在本說明書中，有時將「Ki67 陽性」記載為「Ki67+」。再者，有時將「Ki67 陽性細胞」記載為「Ki67+細胞」。

【0128】 胰島素產生細胞中之 Ki67+細胞的比率為約未達 3%、約未達 1.5%，較佳為約未達 1%，更佳為約未達 0.8%，再佳為約未達 0.5%。

【0129】 本特徵顯示在本發明之胰島素產生細胞中，Ki67+細胞的混入/殘存係幾乎沒有或呈較低的比率。Ki67+細胞係由於其增殖性較高，故有對接受者之不良影響或對經移植之細胞的長期植活帶來影響之疑慮，有其混入/殘存為不佳之情形。

【0130】 c. 升糖素陽性且胰島素陰性細胞的比率較低

本發明之胰島素產生細胞之特徵為以未達 3%的比率含有升糖素陽性且 Ins-細胞。以下，在本說明書中，有將「升糖素陽性」記載為「Gcg+」之情形。再者，有將「升糖素陽性且胰島素陰性細胞」記載為「Gcg+Ins-細胞」之情形。

【0131】 胰島素產生細胞中之 Gcg+Ins-細胞的比率為約 2.5%以下，較佳為約 2%以下，更佳為約 1%以下，再佳為約 0.5%以下。

【0132】 Gcg+Ins-為已成熟之胰 α 細胞的標記，故本特徵顯示本發明之胰島素產生細胞處於幾乎不含或以較低的比率含有已成熟之胰 α 細胞之程度的分化階段。

【0133】 d. 顯示葡萄糖刺激性胰島素分泌回應

本發明之胰島素產生細胞係顯示葡萄糖刺激性胰島素分泌(GSIS：Glucose Stimulated Insulin Secretion)回應。

胰島素產生細胞中之 GSIS 回應可根據以往公知的手法(例如，美國申請案第 11/773,944 號)施行，例如，可藉由測定培養基中被分泌之 C-胜肽的量而評估。C-胜肽為在胰島素原的成熟化期間，相對於胰島素，以等莫耳量產生之分解產物。測定 C-胜肽的量係可藉由例如使用抗 C-胜肽單株抗體之 ELISA 來施行。

【0134】 e. 染色顆粒素 A 陽性細胞的比率較高

本發明之胰島素產生細胞之特徵為以約超過 45%的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

【0135】 以下，在本說明書中，有將「染色顆粒素 A 陽性」記載為「Chga+」之情形。再者，有將「染色顆粒素 A 陽性細胞」記載為「Chga+細胞」之情形。

【0136】 胰島素產生細胞中之 Chga+細胞的比率較佳係可設為約 50%以上(例如，約 55%以上)，更佳為約 60%以上，更佳為約 70%以上，更佳為約 80%以上，更佳為約 85%以上，尤佳為約 90%以上。胰島素產生細胞中之 Chga+細胞的比率之上限並無特別限定，例如，可設為約未達

95%、約未達 99%。胰島素產生細胞中之 Chga+細胞的比率亦可為約 93%以上。

【0137】 在 Chga+細胞中包含分泌胰島素等激素之細胞(內分泌細胞)，在其中亦包含上述 Ins+NKX+細胞或 Ins+NKX-細胞。因此，本特徵顯示本發明之胰島素產生細胞以較高的比率含有內分泌細胞。

【0138】 f. 鹼性磷酸酶陽性的多能性幹細胞的比率較低

本發明之胰島素產生細胞之特徵為以約未達 0.01%的比率含有鹼性磷酸酶陽性的多能性幹細胞。

【0139】 胰島素產生細胞中之鹼性磷酸酶陽性的多能性幹細胞的比率較佳係可設為約 0.008%以下，更佳為約 0.005%以下，再佳為約 0.001%以下。

【0140】 鹼性磷酸酶為顯示多能性幹細胞的未分化狀態之標記，故本特徵顯示本發明之胰島素產生細胞幾乎不含或以較低的比率含有未經分化誘導之目標外之多能性幹細胞。

【0141】 鹼性磷酸酶陽性的多能性幹細胞亦可進一步表現出顯示多能性之其他標記。顯示多能性幹細胞的多能性之其他標記，可利用選自 Nanog、Sox2、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 等之至少一者。

【0142】 本發明之胰島素產生細胞亦可呈經凍結保存之狀態。經凍結保存之本發明之胰島素產生細胞係進行解凍，與未付諸於凍結保存之新鮮的胰島素產生細胞同樣地，可分化/成熟為類胰島細胞，進行激素分泌。凍結保存及解凍可藉由該領域中通常所使用之手法來施行。

【0143】 本發明之胰島素產生細胞的製造可藉由下述所詳述之手法來施行。

【0144】 3. 類胰島細胞

在本說明書中，所謂「類胰島細胞」係意指分化誘導上述胰島素產生細胞所獲得之成熟細胞，且意指與在生體內之胰發育所獲得之「胰島」同樣地，藉由表現出屬於胰 β 細胞的成熟標記之 MafA、UCN3 及 IAPP 中之至少一種標記，又，表現出屬於胰 α 細胞的成熟標記之升糖素而賦予特徵之細胞。

【0145】 更詳細而言，在本說明書中，「類胰島細胞」可具有選自下列(a)至(d)之一或複數種特徵：

(a) 染色顆粒素 A 陽性細胞(Chga+細胞)的比率較高，

(b) Ki67 陽性細胞(Ki67+細胞)的比率較低，

(c) 升糖素陽性且胰島素陰性細胞(Gcg+Ins-細胞)的比率較高，

(d) 具有對低血糖產生回應之胰島素分泌作用。

在此處，所謂「複數」，係意指 2、3 或 4。

(a)至(d)的特徵之有無可在分化誘導胰島素產生細胞後(例如，移植至生體內後)1 週以後，較佳為 2 週以後進行評估，此期間之上限並無特別限定，可設為 1 年以內。再者，所謂類胰島細胞中之既定細胞的比率，係意指相對於源自於移植片之細胞塊之所有細胞數之比率。

【0146】 (a) Chga+細胞的比率較高

本發明之類胰島細胞之特徵為以約 50%以上的比率含有 Chga+細胞。較佳地，類胰島細胞中之 Chga+細胞的比率為約 60%以上，更佳為約 70%

以上，再佳為約 90%以上，尤佳為約 95%以上(例如，約 97%以上、約 98%以上)。

【0147】 在 Chga+細胞中包含分泌胰島素或升糖素等激素之細胞(內分泌細胞)，本特徵顯示類胰島細胞以較高的比率含有內分泌細胞。

【0148】 (b) Ki67+細胞的比率較低

本發明之類胰島細胞之特徵為以約未達 3%的比率含有 Ki67 陽性細胞。較佳地，類胰島細胞中之 Ki67 陽性細胞的比率為約未達 1%，更佳為約未達 0.8%，再佳為約未達 0.5%。

【0149】 本特徵顯示在類胰島細胞中，其混入/殘存為不佳情形之 Ki67+細胞係幾乎沒有或呈非常低的比率。

【0150】 (c) Gcg+Ins-細胞的比率較高

本發明之類胰島細胞之特徵為以約 10%以上的比率含有 Gcg+Ins-細胞。較佳地，類胰島細胞中之 Gcg+Ins-細胞的比率為約 15%以上，更佳為約 20%以上，再佳為約 25%以上。類胰島細胞中之 Gcg+Ins-細胞的比率之上限並無特別限定，例如，可設為約 50%以下，較佳為約 45%以下，更佳為約 40%以下。

【0151】 Gcg+Ins-為已成熟之胰 α 細胞的標記，故顯示類胰島細胞以高於胰島素產生細胞的比率含有已成熟之胰 α 細胞。顯示類胰島細胞處於相較於胰島素產生細胞而言更成熟之分化階段。

【0152】 (d) 具有對低血糖產生回應之胰島素分泌作用

本發明之類胰島細胞之特徵為具有對低血糖產生回應之胰島素分泌作用。所謂「對低血糖產生回應之胰島素分泌作用」係意指自低血糖時起在

1 小時以內、2 小時以內、3 小時以內、4 小時以內或 5 小時以內，胰島素分泌量增加。所謂「低血糖」係意指血中或培養基中之葡萄糖濃度為約 70mg/dL 以下時。胰島素分泌量的測定可藉由以往公知的任意手段來施行，並無特別限定，可藉由測定血中或培養基中之 C-胜肽量而施行。

【0153】 通常，若在生體內成為低血糖，則會藉由升糖素等的分泌來促進血糖值的上升，同時對升糖素進行拮抗而分泌胰島素，控制血糖值水平。本發明之類胰島細胞同樣地能夠進行對於低血糖之血糖值水平的控制，具有對低血糖產生回應而促進血糖值的上升，同時對其進行拮抗而分泌胰島素之作用。

【0154】 4. 細胞之製造方法

本發明之胰島素產生細胞可自多能性幹細胞進行分化誘導而獲得。自多能性幹細胞向胰島素產生細胞的分化誘導可利用下列分化誘導步驟來施行：

步驟 1) 自多能性幹細胞分化誘導為胚體內胚層細胞；

步驟 2) 自胚體內胚層細胞分化誘導為原腸管細胞；

步驟 3) 自原腸管細胞分化誘導為後方前腸細胞；

步驟 4) 自後方前腸細胞分化誘導為胰前驅細胞；

步驟 5) 自胰前驅細胞分化誘導為內分泌前驅細胞；

步驟 6) 自內分泌前驅細胞分化誘導為胰島素產生細胞。

以下，對各步驟進行說明，但向各細胞的分化誘導並不限定於此等手法。

【0155】 步驟 1) 向胚體內胚層細胞的分化

多能性幹細胞係在包含低用量的活化素 A 之培養基中進行培養，而使其分化成胚體內胚層細胞。

【0156】 本步驟所使用之培養基，可使用 RPMI 培養基、MEM 培養基、iMEM 培養基、DMEM(Dulbecco 改良 Eagle 培養基)培養基、改良之 MEM 鋅選擇(Improved MEM Zinc Option)培養基、改良之(Improved) MEM/1%B-27 補充劑/青黴素鏈黴素(Penisilin Streptomycin)培養基、MCDB131/20mM 葡萄糖/$NaHCO_3$/FAF-BSA/ITS-X/Glutamax/抗壞血酸/青黴素鏈黴素(Penisilin Streptomycin)培養基等哺乳類細胞的培養所使用之基本培養基。

【0157】 活化素 A 可以低用量，例如以 5 至 100ng/mL，較佳為 5 至 50ng/mL，更佳為 5 至 10ng/mL 的量包含在培養基中。

【0158】 在培養基中可進一步添加 ROCK 抑制劑、GSK3β 抑制劑。

【0159】 GSK3β 抑制劑在培養基中之濃度係依據所使用之 GSK3β 抑制劑的種類而適當地設定，例如，使用 CHIR 作為 GSK3β 抑制劑時，濃度通常為 2 至 5μM，較佳為 2 至 4μM，特佳為約 3μM。

【0160】 ROCK 抑制劑在培養基中之濃度係依據所使用之 ROCK 抑制劑的種類而適當地設定，例如，使用 Y27632ROCK 抑制劑時，濃度通常為 5 至 20μM，較佳為 5 至 15μM，特佳為約 10μM。

【0161】 在培養基中可進一步添加胰島素。胰島素可以 0.01 至 20μM，較佳為 0.1 至 10μM，更佳為 0.5 至 5μM 的量包含在培養基中。培養基中之胰島素的濃度可為所添加之 B-27 補充劑中所包含之胰島素的濃度，但不限定於此。

【0162】 培養開始時之細胞數並無特別限定，係 22000 至 150000 細胞/cm^2，較佳為 22000 至 100000 細胞/cm^2，更佳為 22000 至 80000 細胞/cm^2。培養期間為 1 日至 4 日，較佳為 1 日至 3 日，特佳為 3 日。

【0163】 培養溫度並無特別限定，係於 30 至 40℃(例如，37℃)施行。再者，培養容器中之二氧化碳濃度係例如為 5%左右。

【0164】 或者是，在本發明中，胚體內胚層細胞可藉由在低用量的活化素 A 的存在下，將多能性幹細胞在胰島素進行作用之條件下之培養基中施行第 1 培養，繼而，在胰島素不進行作用之條件下之培養基中施行第 2 培養而予以製造。

【0165】 (1) 第 1 培養

所謂「胰島素進行作用之條件」係意指藉由胰島素而產生細胞中之胰島素訊息傳遞路徑的活化之條件。通常，胰島素係與存在於細胞膜表面上之胰島素受器進行結合，使受器固有之酪胺酸激酶活化，將胰島素受器基質蛋白家族(IRS：IRS-1、2、3)進行酪胺酸磷酸化。在本說明書中，將由胰島素與胰島素受器之結合所開始之此等一連串的反應產生稱為「產生胰島素訊息傳遞路徑的活化」。

【0166】 胰島素進行作用之條件可列舉例如：在培養基中包含胰島素之情況。胰島素只要是可將多能性幹細胞中之胰島素訊息傳遞路徑進行活化者即可，可為以重組法所製造而得者，亦可為以固相合成法所合成並製造而得者。胰島素可利用源自於人類、非人類靈長類、豬、牛、馬、羊、山羊、大羊駝、犬、貓、兔、小鼠、豚鼠等者，較佳為人類胰島素。

【0167】 在本發明中，在產生多能性幹細胞中之胰島素訊息傳遞路徑的活化之前提下，亦可使用胰島素變異體、胰島素衍生物或胰島素促效劑作為「胰島素」。所謂「胰島素變異體」可列舉由在胰島素的胺基酸序列中缺失、取代、附加或插入有 1 至 20 個，較佳為 1 至 10 個，更佳為 1 至 5 個胺基酸之胺基酸序列所組成，且能夠產生胰島素訊息傳遞路徑的活化之多肽；或由與胰島素的胺基酸序列具有 80%以上，更佳為 90%以上，再佳為 95%以上，最佳為 99%以上的序列同一性之胺基酸序列所組成，且能夠產生胰島素訊息傳遞路徑的活化之多肽者。胺基酸序列的比較可藉由公知的手法來施行，例如，可使用 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information(美國國立生物學資訊中心之基本區域比對檢索工具))等，例如，以預設的設定來實施。所謂「胰島素衍生物」係意指由胰島素或胰島素變異體之胺基酸殘基的一部分之基經化學性置換(例如，α-甲基化、α-羥基化)、缺失(例如，脫胺基化)或修飾(例如，N-甲基化)而得之胺基酸序列所組成，且能夠產生胰島素訊息傳遞路徑的活化之多肽或具有同樣的作用之物質。所謂「胰島素促效劑」係意指與胰島素的結構無關，能夠與胰島素受器進行結合而產生胰島素訊息傳遞路徑的活化之多肽或具有同樣的作用之物質。

【0168】 在第 1 培養的培養基中，可以 0.01 至 20μM，較佳為 0.1 至 10μM，更佳為 0.5 至 5μM 的量包含胰島素。培養基中之胰島素的濃度可為所添加之 B-27 補充劑中所包含之胰島素的濃度，但不限定於此。

【0169】 在培養基中可進一步包含 ROCK 抑制劑及/或 GSK3β 抑制劑。ROCK 抑制劑在培養基中之濃度係依照所使用之 ROCK 抑制劑的種類

而適當地設定，例如，使用 Y-27632 作為 ROCK 抑制劑時之濃度通常可設為 5 至 20μM，較佳為 5 至 15μM，特佳為約 10μM。GSK3β 抑制劑在培養基中之濃度係依照所使用之 GSK3β 抑制劑的種類而適當地設定，例如，使用 CHIR 作為 GSK3β 抑制劑時之濃度通常可設為 2 至 5μM，較佳為 2 至 4μM，特佳為約 3μM。

【0170】 在培養基中可進一步包含選自由丙酮酸鹽(鈉鹽等)、L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸及葡萄糖所組成之群組之一種以上。丙酮酸鹽可以 10 至 1000mg/L，較佳為 30 至 500mg/L，更佳為 50 至 200mg/L，特佳為約 110mg/L 的量包含在培養基中。L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸可以 50 至 2000mg/L，較佳為 100 至 1500mg/L，更佳為 500 至 1000mg/L，特佳為約 860mg/L 的量包含在培養基中。葡萄糖可以 15mM 以上，較佳為 15 至 30mM，更佳為 15 至 25mM，特佳為約 25mM 的量包含在培養基中。培養基中之丙酮酸鹽、L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸及葡萄糖的濃度可為 DMEM 培養基(DMEM，high glucose，GlutaMAX™，pyruvate(Thermo Fisher Scientific))或其他 DMEM 培養基中所包含之丙酮酸鹽、L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸及葡萄糖的濃度，但不限定於此。

【0171】 培養基可使用以上述基本培養基為基礎，添加有上述成分中之一種或其以上者。基本培養基，較佳為 DMEM 培養基，更佳為以上述的量包含丙酮酸鹽、L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸及葡萄糖之 DMEM 培養基。

【0172】 第 1 培養的培養期可設為選自 6 小時至 48 小時，較佳為 12 至 24 小時之範圍。培養溫度並無特別限定，係於 30 至 40℃(例如，37℃)施行。再者，培養容器中之二氧化碳濃度係例如為 5%左右。培養可以 2 維

培養及 3 維培養中之任一者施行。培養開始時之細胞數並無特別限定，若為 2 維培養，可設為 5 萬至 100 萬個細胞/cm^2，較佳為 15 萬至 30 萬個細胞/cm^2，更佳為約 20 萬個細胞/cm^2。再者，培養開始時之細胞數並無特別限定，若為 3 維培養，可設為 1 萬至 100 萬個細胞/mL，較佳為 10 萬至 50 萬個細胞/mL。

【0173】 (2) 第 2 培養

所謂「胰島素不進行作用之條件」係意指不產生由胰島素所引發之細胞中之胰島素訊息傳遞路徑的活化之條件。所謂「不產生細胞中之胰島素訊息傳遞路徑的活化」，不僅意指該胰島素訊息傳遞路徑的活化完全不產生，亦意指相較於胰島素不存在下之該胰島素訊息傳遞路徑的活化，僅產生未看出顯著差異程度的些微活化時。因此，所謂「胰島素不進行作用之條件」可列舉例如：在培養基中不含胰島素，或者是，即便是在培養基中包含胰島素時，亦以包含其量為僅產生前述之無法確認顯著差異之程度的些微活化之量之條件。或者是，亦意指即便是在培養基中包含胰島素時，藉由一同包含胰島素訊息抑制劑，而不產生前述胰島素訊息傳遞路徑的活化之情況。「胰島素訊息抑制劑」係意指能夠在任一位置阻斷胰島素訊息傳遞路徑之成分。此種胰島素訊息抑制劑可列舉：與胰島素、胰島素受器、作用為訊息傳遞物質之各種蛋白質等結合或競爭，抑制此等因子所參與之分子間之相互作用之多肽或化合物等。例如，此種胰島素訊息抑制劑可列舉：競爭抑制 ATP 結合至 PI3 激酶之觸媒次單元之 LY294002[2-(4-嗎啉基)-8-苯基-4H-1-苯并哌喃-4-酮]等。胰島素訊息抑制劑並不限定於此等，與胰島素、胰島素受器、作用為訊息傳遞物質之各種蛋白質結合之抗體或

該等之顯性負性型變異體、以及相對於胰島素受器或作用為訊息傳遞物質之各種蛋白質的 mRNA 之反義寡核苷酸或 siRNA 等亦可使用胰島素訊息抑制劑。胰島素訊息抑制劑可自商業上取得或依照公知的方法予以合成。

【0174】 在培養基中可進一步包含 ROCK 抑制劑及/或 GSK3β 抑制劑。培養基中之 ROCK 抑制劑及/或 GSK3β 抑制劑的量可選自在上述第 1 培養中所記載之範圍，可為與第 1 培養所使用者相同的量，亦可不同。

【0175】 在培養基中可進一步包含選自丙酮酸鹽、L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸及葡萄糖所組成之群組中之一種以上。培養基中之丙酮酸鹽、L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸及葡萄糖的量可選自在上述第 1 培養中所記載之範圍，可為與第 1 培養所使用者相同的量，亦可不同。

【0176】 第 2 培養所使用之培養基可使用以哺乳類細胞的培養所使用之基本培養基為基礎，添加有上述成分中之一種或其以上者。基本培養基可使用在上述第 1 培養中所記載者，可為與第 1 培養所使用者相同的基本培養基，亦可不同。較佳為 DMEM 培養基，更佳為以上述的量包含丙酮酸鹽、L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸及葡萄糖之 DMEM 培養基。

【0177】 第 2 培養的培養期間可設為選自至少 6 小時，較佳為 6 至 72 小時，更佳為 24 小時至 72 小時之範圍。培養溫度並無特別限定，係於 30 至 40℃(例如，37℃)施行。培養可以 2 維培養及 3 維培養中之任何者來施行。再者，培養容器中之二氧化碳濃度係例如為 5%左右。

在第 1 培養及第 2 培養的培養基中，可以上述低用量包含活化素 A。第 1 培養及第 2 培養的培養基中所包含之活化素 A 的量可為相同的量，亦可不同。

【0178】 在第 1 培養及第 2 培養的培養基中亦可進一步添加二甲基亞碸。

【0179】 藉由將多能性幹細胞在低用量的活化素 A 的存在下施行培養，或者，藉由將多能性幹細胞在低用量的活化素 A 的存在下，在胰島素進行作用之條件下之培養基中施行第 1 培養，繼而，在胰島素不進行作用之條件下之培養基中施行第 2 培養，則可在步驟 6)以後，提升所獲得之內分泌細胞的比率。

【0180】 步驟 2) 向原腸管細胞的分化

將步驟 1)所獲得之胚體內胚層細胞進一步在包含增殖因子之培養基中進行培養而分化誘導成原腸管細胞。培養期為 2 日至 8 日，較佳為約 4 日。

【0181】 培養溫度並無特別限定，係於 30 至 40℃(例如，37℃)施行。再者，培養容器中之二氧化碳濃度係例如為 5%左右。

【0182】 培養基可使用上述步驟 1)所記載之哺乳類細胞的培養所使用之基本培養基。在培養基中，除了增殖因子以外，亦可適當地添加血清代替物、維生素、抗生物質等。

【0183】 增殖因子，較佳為 EGF、KGF、FGF10，更佳為 EGF 及/或 KGF，再佳為 KGF。

【0184】 增殖因子在培養基中之濃度係依所使用之增殖因子的種類而適當地設定，通常為約 0.1nM 至 1000μM，較佳為約 0.1nM 至 100μM。EGF 時，其濃度為約 5 至 2000ng/ml(亦即，約 0.8 至 320nM)，較佳為約 5 至 1000ng/ml(亦即，約 0.8 至 160nM)，更佳為約 10 至 1000ng/ml(亦即，約 1.6 至 160nM)。FGF10 時，其濃度為約 5 至 2000ng/ml(亦即，約

0.3 至 116nM)，較佳為約 10 至 1000ng/ml(亦即，約 0.6 至 58nM)，更佳為約 10 至 1000ng/ml(亦即，約 0.6 至 58nM)。例如，使用 KGF 增殖因子時之濃度通常為 5 至 150ng/mL，較佳為 30 至 100ng/mL，特佳為約 50ng/mL。

【0185】 步驟 3) 向後方前腸細胞的分化

將步驟 2)所獲得之原腸管細胞進一步在包含增殖因子、環巴胺(cyclopamine)、頭蛋白(noggin)等之培養基中進行培養，分化誘導成後方前腸細胞。培養期為 1 日至 5 日，較佳為約 2 日左右。

【0186】 培養溫度並無特別限定，係於 30 至 40℃(例如，37℃)施行。再者，培養容器中之二氧化碳濃度係例如為 5%左右。

【0187】 培養基可使用上述步驟 1)所記載之哺乳類細胞的培養所使用之基本培養基。在培養基中，除了增殖因子以外，亦可適宜添加血清代替物、維生素、抗生物質等。

【0188】 增殖因子較佳為 EGF、KGF、FGF10，更佳為 EGF 及/或 KGF，再佳為 KGF。

【0189】 增殖因子在培養基中之濃度係依所使用之增殖因子的種類而適當地設定，通常為約 0.1nM 至 1000μM，較佳為約 0.1nM 至 100μM。EGF 時，其濃度為約 5 至 2000ng/ml(亦即，約 0.8 至 320nM)，較佳為約 5 至 1000ng/ml(亦即，約 0.8 至 160nM)，更佳為約 10 至 1000ng/ml(亦即，約 1.6 至 160nM)。FGF10 時，其濃度為約 5 至 2000ng/ml(亦即，約 0.3 至 116nM)，較佳為約 10 至 1000ng/ml(亦即，約 0.6 至 58nM)，更佳為約 10 至 1000ng/ml(亦即，約 0.6 至 58nM)。例如，使用 KGF 增殖因子

時之濃度通常為 5 至 150ng/mL，較佳為 30 至 100ng/mL，特佳為約 50ng/mL。

【0190】 環巴胺在培養基中之濃度並無特別限定，通常為 0.5 至 1.5μM，較佳為 0.3 至 1.0μM，特佳為約 0.5μM。

【0191】 頭蛋白在培養基中之濃度並無特別限定，通常為 10 至 200ng/mL，較佳為 50 至 150ng/mL，特佳為約 100ng/mL。

【0192】 再者，在培養基中亦可添加二甲基亞碸。

【0193】 步驟 4)向胰前驅細胞的分化

可將步驟 3)所獲得之後方前腸細胞進一步在包含具有 CDK8/19 抑制活性之因子之培養基，較佳為包含具有 CDK8/19 抑制活性之因子及增殖因子之培養基中進行培養，分化誘導成胰前驅細胞。培養期間為 2 日至 10 日，較佳為約 5 日左右。

【0194】 將步驟 3)所獲得之後方前腸細胞依照既知報導(Toyoda et al., Stem cell Research (2015) 14, 185-197)，以 0.25%胰蛋白酶-EDTA 處理後藉由進行吸量管吸放而加以分散，將 0.25%胰蛋白酶-EDTA 加以離心分離並懸浮後，再接種於步驟 4)之新的培養基。

【0195】 培養基係與步驟 1)同樣地，可使用哺乳類細胞的培養所使用之基本培養基。在培養基中，除了增殖因子以外，亦可適當地添加血清代替物、維生素、抗生物質等。

【0196】 具有 CDK8/19 抑制活性之因子，可使用前述之各種化合物或其鹽，因應所使用之化合物或其鹽，適當地決定向培養基的添加量，通常為約 0.00001μM-5μM，較佳為 0.00001μM-1μM。具有 CDK8/19 抑制

活性之因子在培養基中之濃度，較佳為對 CDK8/19 達到 50%以上的抑制活性之濃度。

【0197】 增殖因子較佳為 EGF、KGF、FGF10，更佳為 KGF 及/或 EGF，再佳為 KGF 及 EGF。

【0198】 增殖因子在培養基中之濃度係依所使用之增殖因子的種類而適當地設定，通常為約 0.1nM 至 1000μM，較佳為約 0.1nM 至 100μM。EGF 時，其濃度為約 5 至 2000ng/ml(亦即，約 0.8 至 320nM)，較佳為約 5 至 1000ng/ml(亦即，約 0.8 至 160nM)，更佳為約 10 至 1000ng/ml(亦即，約 1.6 至 160nM)。FGF10 時，其濃度為約 5 至 2000ng/ml(亦即，約 0.3 至 116nM)，較佳為約 10 至 1000ng/ml(亦即，約 0.6 至 58nM)，更佳為約 10 至 1000ng/ml(亦即，約 0.6 至 58nM)。例如，使用 KGF 及 EGF 增殖因子時之濃度，KGF 通常為 5 至 150ng/mL，較佳為 30 至 100ng/mL，特佳為約 50ng/mL，EGF 通常為 10 至 200ng/mL，較佳為 50 至 150ng/mL，特佳為約 100ng/mL。

【0199】 步驟 4)中之培養的最初 1 日係在 ROCK 抑制劑的存在下施行，以後亦可在不含 ROCK 抑制劑之培養基中進行培養。

【0200】 再者，在培養基中亦可包含 PKC 活化劑。PKC 活化劑係使用 PdBU(PKC activator II)、TPB(PKC activator V)等，但不限於此。活化素 A 的濃度係以約 0.1 至 100ng/ml，較佳為約 1 至 50ng/ml，更佳為約 3 至 10ng/ml 進行添加。

【0201】 再者，在培養基中亦可添加二甲基亞碸。

【0202】 在所有步驟中，在培養基中，除了上述之成分以外，亦可添加血清代替物(例如，B-27 補充劑、ITS-G)。再者，因應所需亦可添加胺基酸、L-麩醯胺酸、GlutaMAX(製品名)、非必需胺基酸、維生素、抗生物質(例如，抗生素-抗黴劑(Antibiotic-Antimycotic，本說明書中，有時稱為AA)、青黴素、鏈黴素或此等之混合物)、抗菌劑(例如，兩性黴素 B)、抗氧化劑、丙酮酸、緩衝劑、無機鹽類等。在將抗生物質添加至培養基中時，其在培養基中之濃度通常為 0.01 至 20 重量%，較佳為 0.1 至 10 重量%。

【0203】 再者，細胞培養並未使用餵養細胞，以接著培養來施行。在培養時，係使用培養皿、燒瓶、微量盤、OptiCell(製品名)(Nunc 公司)等細胞培養片等培養容器。培養容器較佳係以用以提升與細胞之接著性(親水性)之表面處理，或經膠原蛋白、明膠、聚-L-離胺酸、聚-D-離胺酸、層黏連蛋白、纖維黏連蛋白、Matrigel(例：BD Matrigel(日本 Becton Dickinson 公司))、玻璃黏連蛋白等細胞接著用基質塗覆。培養容器較佳為經第一型膠原蛋白(Type I-collagen)、基質膠(Matrigel)、纖維黏連蛋白、玻璃黏連蛋白或聚-D-離胺酸等塗覆之培養容器，更佳為經基質膠(Matrigel)或聚-D-離胺酸塗覆之培養容器。

【0204】 培養溫度並無特別限定，係於 30 至 40℃(例如，37℃)施行。再者，培養容器中之二氧化碳濃度係例如為 5%左右。

【0205】 步驟 5) 向內分泌前驅細胞的分化

將步驟 4)所獲得之胰前驅細胞進一步在包含增殖因子之培養基中進行培養而分化誘導成內分泌前驅細胞。培養期間為 2 日至 3 日，較佳為約 2 日。

【0206】 培養基可使用上述步驟 1)所記載之哺乳類細胞的培養所使用之基本培養基。在培養基中，亦可依照既知報導(Nature Biotechnology 2014; 32:1121-1133)，添加 SANT1、視黃酸、ALK5 抑制劑 II、T3、LDN，並進一步適當地添加 Wnt 抑制藥、ROCK 抑制劑、FGF(較佳為 FGF2)、血清代替物、維生素、抗生物質等。再者，在培養基中亦可添加二甲基亞碸。

【0207】 再者，細胞培養並未使用餵養細胞，以非接著培養來施行。在培養時，係使用培養皿、燒瓶、微量盤、多孔盤(Nunc 公司)等或者生物反應器。培養容器較佳係進行用以降低與細胞之接著性之表面處理。

【0208】 培養溫度並無特別限定，係於 30 至 40℃(例如，37℃)施行。再者，培養容器中之二氧化碳濃度係例如為 5%左右。

【0209】 步驟 6) 向胰島素產生細胞的分化

將步驟 5)所獲得之內分泌前驅細胞進一步在包含 FGFR1 抑制劑之培養基中進行培養而分化誘導成胰島素產生細胞。培養期間為 14 日至 30 日，較佳為約 14 至 20 日。

【0210】 培養基可使用上述步驟 1)所記載之哺乳類細胞的培養所使用之基本培養基。在培養基中，亦可依照既知報導(Nature Biotechnology 2014; 32:1121-1133)，添加 ALK5 抑制劑 II、T3、LDN、γ-分泌酶(secretase)抑制劑 XX、γ-分泌酶抑制劑 RO、N-半胱胺酸、AXL 抑制劑、抗壞血酸，並進一步適當地添加 Wnt 抑制藥、ROCK 抑制劑、FGF(較佳為 FGF2)、血清代替物、維生素、抗生物質等。例如，在培養基中，可添加 ALK5 抑制劑 II、T3、LDN、γ-分泌酶抑制劑 RO 及抗壞血酸，或者亦可添加 T3、ALK5 抑制劑 II、$ZnSO_4$、肝素、N-乙醯基半胱胺酸、Trolox 及 R428。

【0211】 再者，細胞培養並未使用餵養細胞，以非接著培養來施行。在培養時，係使用培養皿、燒瓶、微量盤、多孔盤(Nunc 公司)等或者生物反應器。培養容器較佳係進行用以降低與細胞之接著性之表面處理。

【0212】 培養溫度並無特別限定，係於 30 至 40℃(例如，37℃)施行。再者，培養容器中之二氧化碳濃度係例如為 5%左右。

【0213】 在培養基中，可以能夠抑制 FGFR1 活性之任意量包含 FGFR1 抑制劑，例如以 10μM 以下或 5μM 以下的量，較佳係以未達 5μM、未達 4μM、未達 3μM、未達 2μM 的量包含 FGFR1 抑制劑。FGFR1 抑制劑的添加量之下限並無特別限定，可設為 0.1μM 以上，較佳為 0.5μM 以上。FGFR1 抑制劑的添加量較佳為未達 5μM 且 0.1μM 以上，更佳為未達 5μM 且 0.5μM 以上。在 FGFR1 抑制劑的存在下之培養可施行至少 12 小時，較佳為 24 小時以上、2 日以上、4 日以上、8 日以上、10 日以上或 15 日以上。在 FGFR1 抑制劑的存在下之培養較佳係施行 4 日以上。例如，可針對步驟 6)之最後的約 4 至 15 日，較佳為最後的約 4 至 7 日，施行 FGFR1 抑制劑的存在下之培養。在經由 FGFR1 抑制劑之處理期間中亦能夠進行培養基的更換，可依據培養時程，更換為與經添加 FGFR1 抑制劑之更換前具有相同的組成之培養基或具有不同的組成之培養基。

藉由在包含 FGFR1 抑制劑之培養基中培養細胞，可抑制所獲得之胰島素產生細胞中之 Ki67 陽性細胞的增殖。

【0214】 步驟 6)所獲得之胰島素產生細胞可進行凍結保存直至使用為止。

【0215】 5. 向類胰島細胞的分化

本發明之胰島素產生細胞可藉由移植至動物生體內而分化誘導成類胰島細胞。

【0216】「動物」較佳為哺乳動物可列舉例如：人類、非人類靈長類、豬、牛、馬、羊、山羊、大羊駝、犬、貓、兔、小鼠、豚鼠等，較佳為人類。

【0217】移植較佳係在可將細胞固定在一定的位置之生體內區域施行，例如，可在動物的皮下、腹腔內、腹膜上皮、大網膜、脂肪組織、肌肉組織或胰臟、腎臟等各臟器之被膜下等施行。所移植之細胞數可依據移植對象的年齡、體重、移植部位的大小等因素而變化，並無特別限定，例如，可設為 10×10^4 個細胞至 10×10^{11} 個細胞左右。經移植之細胞可在生體內環境中受到分化誘導，而分化為類胰島細胞。再者，所移植之細胞數可因應移植對象的年齡、體重、移植部位等因素而變化，在移植後 1 週以後，較佳為 2 週以後，經移植之胰島素產生細胞分化/成熟為類胰島細胞。所獲得之類胰島細胞隨後可加以回收，亦可直接留置於生體內。

【0218】6. 用途

本發明之胰島素產生細胞可直接或與藥理學上可容許的載體等進行混合並製成醫藥，藉此，對需要其之患者安全地進行投予。

【0219】「藥理學上可容許的載體」只要是能夠與胰島素產生細胞共同地移植至生體內，經移植之胰島素產生細胞能夠分化/成熟為類胰島細胞者即可，可適當地利用因應所期望的劑型而得者。例如，「藥理學上可容許的載體」之例，可舉出水凝膠。水凝膠較佳為由生體適合性及/或生物分解性的聚合物所組成者，此種水凝膠可利用由選自：海藻酸、纖維黏連蛋

白、明膠、膠原蛋白、蛋白多醣、葡萄糖胺多醣(例如，玻尿酸、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素、硫酸乙醯肝素、肝素、硫酸角質素等)、層黏連蛋白、玻璃黏連蛋白以及此等之鹽或酯中之一或複數種所組成者。例如，可適合地利用使用海藻酸鹽(例如，海藻酸鈉、海藻酸鈣、海藻酸銨等)或海藻酸酯(亦稱為海藻酸丙二醇酯)所調製出之包含海藻酸之凝膠(WO2010/032242、WO2011/154941)作為水凝膠。水凝膠可使胰島素產生細胞分散於該凝膠中而使用。

【0220】 再者，胰島素產生細胞或醫藥可包含在能夠收容此等之器具中。器具只要是能夠與胰島素產生細胞或醫藥共同地移植至生體內，經移植之胰島素產生細胞能夠分化/成熟為類胰島細胞者即可，可利用由任意形狀及材質所組成者。例如，此種器具之例，可利用由生體適合性及/或生物分解性聚合物(例如，聚甘醇酸、聚乳酸等)、陶瓷、金屬(例如，鈦、不銹鋼、鈷或此等之合金等)所組成者。器具的形狀並無特別限定，可設為能夠收容胰島素產生細胞或醫藥之膠囊、袋、室等形狀。器具較佳係具有能夠連通其內部與外部之多孔質部、孔、通路等。

【0221】 本發明之胰島素產生細胞或醫藥可以經凍結保存之形態進行供給，可在使用時加以解凍而使用。

【0222】 本發明之胰島素產生細胞或醫藥可移植至需要其的患者的生體內而使用。移植較佳係在可將細胞固定在一定的位置之生體內區域施行，例如，可在皮下、腹腔內、腹膜上皮、大網膜、脂肪組織、肌肉組織或胰臟、腎臟等各臟器之被膜下等施行。較佳為侵襲度較低的皮下移植。所移植之胰島素產生細胞只要投予治療上有效量即可，可依據移植對象的年

齡、體重、移植部位的大小、疾患的嚴重度等因素而變化，並無特別限定，例如，可設為 10×10^4 個細胞至 10×10^{11} 個細胞左右。

【0223】 經移植之胰島素產生細胞係在生體內分化/成熟而成為類胰島細胞，發揮對治療或預防疾患、障礙或症狀而言為有用之功能。亦即，本發明之胰島素產生細胞或醫藥可利用為前藥。

【0224】 根據本發明之胰島素產生細胞或醫藥，可於患者生體內生成類胰島細胞，藉由類胰島細胞所分泌出之胰島素或升糖素的作用，可改善及/或維持患者中之血糖值(葡萄糖)的水平。

【0225】 因此，本發明之胰島素產生細胞或醫藥可為了治療或預防需要改善及/或維持血糖值的水平之疾患、障礙或症狀而使用。此種疾患、障礙或症狀，可列舉患者，特別是糖尿病患者中之糖尿病、空腹時及餐後葡萄糖水平的不正常、低血糖症(例如，糖尿病患者中之胰島素投予所引發之低血糖症)等，但並不限定於此等。另外，所謂「治療」係意指疾患、障礙或症狀的治療、治癒、防止或緩解改善，或者疾患、障礙或症狀的進行速度減低。再者，所謂「預防」，係意指使疾患、障礙或症狀的發病的可能性、危險性降低，或使疾患、障礙或症狀的發病延遲。

【0226】 患者為哺乳動物(例如，小鼠、大鼠、倉鼠、兔、貓、犬、牛、羊、猴、人類)，較佳為人類。

【0227】 以下，藉由實施例對本發明進行說明，但本發明並不限定於此等實施例。

〔實施例〕

【0228】 實施例 1：胰島素產生細胞的成熟度及增殖性細胞的混入率

1. 方法

(1) 胰島素產生細胞的製作

自 Ff-I14s04 iPS 細胞株向胰島素產生細胞的分化誘導係依據上述步驟 1)至 6)或既知報導(Nature Biotechnology 2014; 32:1121-1133)來實施。

亦即，將 iPS 細胞懸浮於包含 10μM 的 ROCK 抑制劑(Y-27632)之 iPS 細胞培養基中，使用細胞計數裝置 NC200(ChemoMetec 公司)進行計數，調整成 37.5×10^4 細胞/mL，以 2mL/well(75×10^4 細胞/well)接種於經塗覆 iMatrix 之盤。接著，在胰島素進行作用之條件下，亦即，在包含分化誘導因子(GSK3β 抑制劑(3μM CHIR99021)、低用量(10ng/mL)的活化素 A)之培養基(DMEM-高葡萄糖-GlutaMAX-丙酮酸/2%B27(包含胰島素)/青黴素鏈黴素(Penisilin Streptomycin)/1%二甲基亞碸)中施行第 1 培養，繼而，在胰島素不進行作用之條件下，亦即，在包含分化誘導因子(低用量(10ng/mL)的活化素 A)之培養基(DMEM-高葡萄糖-GlutaMAX-丙酮酸/2%B27(不含胰島素)/青黴素鏈黴素(Penisilin Streptomycin)/1%二甲基亞碸)中施行第 2 培養，獲得胚體內胚層細胞。將所獲得之胚體內胚層細胞在包含 50ng/mL KGF 之培養基(改良之 MEM/1%B27(包含胰島素)/青黴素鏈黴素(Penisilin Streptomycin))，接著，包含 50ng/mL KGF、100ng/mL 頭蛋白、0.5μM 環巴胺、10nM TTNPB 及 250μM 維生素 C 之培養基(改良之 MEM/1%B27(包含胰島素)/Penisilin Streptomycin)中進行培養並將所獲得之後方前腸細胞加以回收，懸浮於包含 0.1μM ROCK 抑制劑、100ng/mL KGF、50ng/mL EGF、10mM 菸鹼醯胺及 250μM 維生素 C 之培養基(改良之 MEM/1%B27(包含胰島素)/青黴素鏈黴素(Penisilin Streptomycin))中，

調整成 175×10^4 細胞/mL，以 350×10^4 細胞/well 再接種於經塗覆 iMatrix 之盤並進行培養。再度回收所獲得之細胞，懸浮於包含 0.25μM SANT-1、50nM 視黃酸、10μM ALK5 抑制劑 II、100nM LDN、1μM T3、50ng/mL bFGF、1μM XAV、10μM Y-27632 之培養基(改良之 MEM/1%B27(包含胰島素)/青黴素鏈黴素(Penisilin Streptomycin))中，調整成 20×10^4 細胞/mL，以 3×10^4 細胞/well 再接種於細胞非接著 96 孔盤(住友 Bakelite)並進行培養。

將所獲得之細胞集團在包含 10μM ALK5 抑制劑 II、1μM T3、100μM LDN、1μM γ-分泌酶抑制劑(RO-4929097)、250μM 抗壞血酸及 1μM FGF 受體 1 抑制劑(PD-166866)之培養基(改良之 MEM/1%B27(包含胰島素)/青黴素鏈黴素(Penisilin Streptomycin))中進行培養，而獲得胰島素產生細胞。

【0229】 (2) 蛋白質表現的評估

藉由流式細胞儀測定自 Ff-I14s04 iPS 細胞株所製作出之胰島素產生細胞及單離自健康人之人類胰島(以下，記載為「胰島」)的蛋白質表現(胰島素(INS)、NKX6.1、升糖素(GCG)、Ki67)。再者，對照，亦針對未經 FGF 受體 1 抑制劑(PD-166866)的處置所調製出之胰島素產生細胞的原型(以下，記載為「原型」)同樣地進行測定。

【0230】 (3) 基因表現量的評估

使用從採取自原型、胰島素產生細胞及胰島的各樣品之全 RNA 劃分物所合成出之 cDNA，藉由定量 PCR 法測定已知為胰島素、升糖素及成熟胰 β 細胞標記之 MafA、UCN3 的 mRNA 表現量。藉由對照基因同樣地進行測定之 GAPDH mRNA 的表現量施行標準化。

【0231】 2. 結果

(1) 蛋白質表現的評估

將經由流式細胞儀之測定結果示於第 1 圖。再者，將胰島素陽性/NKX6.1 陽性細胞率、胰島素陽性/NKX6.1 陰性細胞率、染色顆粒素 A 陽性細胞率、Ki67 陽性細胞率示於表 1。胰島素產生細胞係顯示與胰島同等或其以上的胰島素陽性/NKX6.1 陽性細胞率。在另一方面，針對胰島素陽性/NKX6.1 陰性細胞率，可確認相較於胰島，胰島素產生細胞明顯較高。若將胰島素產生細胞與原型進行比較，則在胰島素產生細胞中，胰島素陽性/NKX6.1 陽性細胞率、胰島素陽性/NKX6.1 陰性細胞率及染色顆粒素 A 陽性細胞率係上升，針對 Ki67 陽性細胞率則顯著地減少。

【0232】 [表 1]

細胞株	Ff-I14-s04		
細胞型	原型	胰島素產生細胞	胰島
胰島素陽性/NKX6.1陽性細胞率	30.8 %	37.8 %	31.8 %
嗜鉻粒蛋白 A 陽性細胞率	83.9 %	94.7 %	88.7 %
胰島素陽性/NKX6.1陰性細胞率	21.8 %	28.2 %	2.3 %
Ki67 陽性細胞率	5.5 %	0.4 %	n.d.

n.d.：未測得

【0233】 (2) 基因表現量的評估

將原型、胰島素產生細胞及胰島中之胰島素、升糖素、MafA 及 UCN3 的表現水平示於表 2 及第 2 圖。

與上述經由流式細胞儀而得之胰島素陽性細胞率、升糖素陽性細胞率之結果一致，與原型相比而言，在胰島素產生細胞中可看出胰島素、升糖素表現量的增加，達到胰島的至 50%左右的水平。在另一方面，已判明胰島素產生細胞中之 MafA 及 UCN3 的表現水平與人類胰島相比而言係極低。

【0234】 [表 2]

細胞株	Ff-I14-s04		
細胞型	原型	胰島素產生細胞	胰島
INS 基因	121	162	326
GCG 基因	2.4	6.9	25.7
MafA 基因	0.01	0.01	0.39
UCN3 基因	0.01	0.02	0.44

【0235】 以上結果顯示胰島素產生細胞為包含與胰島相同程度的 β 細胞的比率之細胞凝集塊，但並非尚未完全成熟之胰島。再者，可確認胰島素產生細胞係極少混入具有增殖性之目標外細胞(Ki67 陽性細胞)。

【0236】 實施例 2：胰島素產生細胞中之維持未分化狀態之 iPS 細胞的混入率

1. 方法

維持未分化狀態之 iPS 細胞的高感度檢測(High efficient culture cell assay)

將 Ff-I14s04 iPS 細胞在包含分化誘導因子(GSK3β 抑制劑、ROCK 抑制劑及低用量的活化素 A)之培養基(RPMI/1%B27(包含胰島素)/青黴素鏈黴素(Penisilin Streptomycin)/二甲基亞碸)中進行培養並自所獲得之胚體內胚層細胞分化誘導出胰前驅細胞(胰島素產生細胞生成程序之中間體細胞)，在 6×10^5 個細胞的胰前驅細胞懸浮液中摻加 0、6(0.001%)、30(0.005%)

個細胞的維持未分化狀態之 iPS 細胞，接種於 10cm 培養皿，在對維持未分化狀態之 iPS 細胞而言屬於好條件之 AK03N 培養基及 iMatrix-511 塗覆條件下培養 7 日。再者，亦在相同條件下，培養未摻加 iPS 細胞僅 6×10^5 個細胞的胰前驅細胞。培養結束後，將藉由鹼性磷酸酶染色所生成之維持未分化狀態之 iPS 細胞的菌落視覺化，並計算其數目。

【0237】 2. 結果

將結果示於第 3 圖。在經摻加 6 個細胞及 30 個細胞的維持未分化狀態之 iPS 細胞之胰前驅細胞培養皿中，分別可觀察到平均 3 個及 16 個菌落。另一方面，在未經摻加之胰前驅細胞培養皿中則完全未觀察到菌落。由以上結果顯示，在以目前的分化誘導法所生成之胰前驅細胞及隨後所生成之胰島素產生細胞中，維持未分化狀態之 iPS 細胞的混入為 0.001%以下。

由以上結果可確認，在胰島素產生細胞中沒有或極少地混入維持未分化狀態之 iPS 細胞。

【0238】 實施例 3：由凍結融解所致之對胰島素產生細胞之影響

1. 方法

(1) 胰島素產生細胞的凍結融解後之再凝集

除了將 Ff-I14s04 iPS 細胞在包含分化誘導因子(GSK3β 抑制劑、ROCK 抑制劑及低用量的活化素 A)之培養基(RPMI/1%B27(包含胰島素)/青黴素鏈黴素(Penisilin Streptomycin)/二甲基亞碸)中進行培養而獲得胚體內胚層細胞以外，藉由與實施例 1 所記載之方法相同的方法所製作出胰島素產生細胞，將該胰島素產生細胞藉由利用市售的凍結保存液(CryoStor CS10(BioLifeSolutions 公司))之緩慢凍結法進行凍結。具體而言，將 3×10^6

個細胞懸浮於 1mL 的凍結保存液中，注入至凍結小瓶中。將小瓶放入凍結處理容器(Bicell，日本 Freezer(股))中，於-80℃進行保存。

【0239】 解凍係將凍結小瓶以 ThawSTAR 凍結細胞融解台(Astero Bio 公司)進行加溫，急速地解凍。將經解凍之細胞懸浮液添加至 10mL 的培養液中。藉由離心分離去除上清液後，將細胞懸浮於包含 10μM 的 ROCK 抑制劑(Y-27632)之培養基中，使用細胞計數裝置 NC200 (ChemoMetec 公司)測定解凍後之活細胞數、細胞存活率。再者，藉由將解凍後之細胞接種於多孔盤(Kuraray 公司)，進行 3 維培養而製作出細胞凝集體。

【0240】 (2) 凍結融解後胰島素產生細胞的生體內移植

在凍結融解後將胰島素產生細胞移植至由鏈佐黴素(Streptozotocin)誘發胰島素缺乏性糖尿病之免疫不全 NOD/SCID 小鼠的腎被膜下。移殖後之經過觀察係測定血中人類 C-胜肽濃度及血糖值。

【0241】 2. 結果

(1) 胰島素產生細胞的凍結融解後之再凝集

解凍後立即之細胞存活率為 80.9%。再者，可將注入至凍結小瓶中之細胞的 77.0%的活細胞回收。將藉由 3 維培養進行培養 4 日而得之細胞的相位差顯微鏡影像示於第 4 圖。如第 4 圖所示，得知經施行凍結保存之細胞係存活並保有形成細胞凝集體之能力。

【0242】 將針對凍結保存前及解凍/再培養後之細胞，藉由流式細胞儀測定 INS、NKX6.1 及 Ki67 的表現之結果示於第 5 圖。再者，將胰島素陽性率、Ki67 陽性細胞率示於表 3。如第 5 圖、表 3 所示，在凍結保存前後之胰島素陽性細胞率沒有減少，Ki67 陽性細胞沒有增加。

【0243】 [表 3]

	凍結保存前	解凍／再培養後
胰島素陽性細胞率	52.7 %	85.7 %
Ki67 陽性細胞率	1.3 %	0.3 %

【0244】 (2) 胰島素產生細胞的生體內移植

將移殖後之經過觀察所測定之血中人類 C-胜肽濃度及血糖值之結果示於表 4。經腎被膜下移植之凍結融解後之胰島素產生細胞，係在移植 4 個月後可在血液中確認到人類 C-胜肽分泌，顯示高血糖改善作用。

【0245】 [表 4]

	移植時刻	移植 4 個月後
血中人類 C- 胜肽濃度 (pM)	n.d.	982.4 (N=1)
血糖值 (mg/dL)	500 (N=1)	117 (N=1)

由以上結果可確認，胰島素產生細胞即便加以凍結融解亦保持分化誘導效率。

【0246】 實施例 4：經移植至生體內之胰島素產生細胞

1. 方法

(1) 胰島素產生細胞向生體內的移植

將藉由與實施例 3 同樣的方法所製作出之胰島素產生細胞分別移植至由鏈佐黴素(STZ)誘發糖尿病之免疫不全 NOD/SCID 小鼠的腎被膜下，以

及糖尿病自然發病之具有 Akita 基因變異之 NOD/SCID 小鼠的皮下。在皮下的移植中，係使用 Fibrin 凝膠作為胰島素產生細胞之載體。移植後，測定血液中之人類 C-胜肽(源自胰島素產生細胞之胰島素之指標)的濃度及血糖值，評估胰島素產生細胞的植活。

【0247】 (2) 胰島素產生細胞對葡萄糖負荷或低血糖之回應的評估

使用經移植之胰島素產生細胞已植活之小鼠，為了使血糖值暫時上升而強制經口投予葡萄糖，或者為了誘發低血糖而皮下投予胰島素製劑甘精胰島素，測定血中人類 C-胜肽濃度及血中升糖素濃度而評估隨後之胰島素產生細胞的回應。使用非移植/非糖尿病 NOD/SCID 小鼠作為對照，測定源自內因性胰島之小鼠 C-胜肽或升糖素的血中濃度。

【0248】 2. 結果

(1) 經移植至生體內之胰島素產生細胞的植活評估

將移植後之血中人類 C-胜肽濃度及血糖值之測定結果示於表 5。在所有動物及移植部位中，移植起 3-4 個月後皆在血液中檢測出人類 C-胜肽。在小鼠中，在移植起 3 個月後之前，高血糖獲得改善，血糖值直至 5-6 個月後維持正常水平，顯示經移植之胰島素產生細胞係長期植活。

【0249】 [表 5]

動物－移植部位	血中人類 C-胜肽濃度 (pM)		血糖值 (mg/dL)		
	移植 3-4 個月後	5-6 個月後	移植時點	3 個月後	5-6 個月後
STZ NOD/SCID 小鼠－腎被膜下	898±335 (N=3)	915, 1060 (N=2)	516±33 (N=4)	113±64 (N=3)	117, 91 (N=2)
Akita NOD/SCID 小鼠－皮下	2436±516 (N=4)	2195±882 (N=4)	562±31 (N=4)	83±27 (N=4)	61±7 (N=3)

N=3 以上為平均值 標準偏差，N=2 為個體別數據

【0250】 (2) 胰島素產生細胞對葡萄糖負荷或低血糖之回應的評估

將葡萄糖負荷後之血中人類 C-胜肽濃度示於第 6 圖，將甘精胰島素投予後之血中人類 C-胜肽濃度及血中升糖素濃度示於第 7 圖。在胰島素產生細胞的移植起 3-4.5 個月後，血中人類 C-胜肽濃度係因葡萄糖負荷而暫時上升，另一方面，其在因甘精胰島素投予而誘發低血糖時降低。此等變化係與非移植/非糖尿病小鼠中之內因性小鼠 C-胜肽的血中濃度的變化相同。再者，在胰島素產生細胞的移植小鼠中，相較於非移植/非糖尿病小鼠，血中升糖素濃度係顯示較高值，暗示胰島素產生細胞在血液中釋放出升糖素。

【0251】 由以上結果顯示，經移植至生體內之胰島素產生細胞係長期植活，對血糖值的變動產生回應並發揮類似於內因性胰島之生理性胰島素調節作用。

【0252】 實施例 5：經移植至皮下之胰島素產生細胞

1. 方法

(1) 胰島素產生細胞的生體內移植

將分散於海藻酸水凝膠中之胰島素產生細胞皮下移植至由鏈佐黴素所誘發之胰島素缺乏性糖尿病的免疫不全 NOD/SCID 小鼠。移殖後之經過觀察係藉由測定血中人類 C-胜肽濃度及血糖值而實施。在移植 3 個月後之時刻摘出移植片。

【0253】 (2) 移植片中之蛋白質表現的評估

將所摘出之移植片進行單一細胞化處理後，加以固定，藉由流式細胞儀測定胰島素產生細胞的蛋白質表現(胰島素、NKX6.1、升糖素、染色顆粒素 A)。再者，將所摘出之移植片及移植時刻之胰島素產生細胞加以固定，脫水後，製作凍結切片，藉由免疫組織染色評估目標蛋白質表現(胰島素、升糖素)。

【0254】 2. 結果

(1) 胰島素產生細胞的生體內移植

將作為移殖後之經過觀察之所測定之血中人類 C-胜肽濃度及血糖值之結果示於表 6。經皮下移植之胰島素產生細胞在移植 1-3 個月後在血液中可確認到人類 C-胜肽分泌，顯示高血糖改善作用。

【0255】 [表 6]

	移植時刻	移植 1 個月後	移植 3 個月後
血中人類 C-胜肽濃度 (pM)	n.d.	490.4, 307.6 (N=2)	714.3 (N=1)
血糖值 (mg/dL)	568, 457 (N=2)	238, 196 (N=2)	62 (N=1)

【0256】 (2) 移植片中之蛋白質表現的評估

將胰島素陽性/NKX6.1 陽性細胞率、胰島素陽性/NKX6.1 陰性細胞率、升糖素陽性/胰島素陰性細胞率、染色顆粒素 A 陽性率之測定結果示於表 7、第 8 圖。相較於移植時刻，在移植 3 個月後之移植片中可確認到升糖素陽性/胰島素陰性細胞率的上升及胰島素陽性/NKX6.1 陰性細胞率的減少。再者，可確認到移植 3 個月後之移植片係由較高比率的染色顆粒素 A 陽性的內分泌細胞所構成。將所摘出之移植片的免疫組織染色之結果示於第 9 圖。相較於移植時刻，在移植 3 個月後之移植片中可確認到升糖素單陽性細胞率的上升，暗示在生體內分化為已成熟之類胰島細胞。

【0257】 [表 7]

	移植時刻	移植 3 個月後
胰島素陽性/NKX6.1 陽性細胞率	46.0 %	19.3 %
胰島素陽性/NKX6.1 陰性細胞率	32.0 %	7.6 %
升糖素陽性/胰島素陰性細胞率	0.1%	32.1 %
嗜鉻粒蛋白 A 陽性細胞率	n.d.	96.2 %

【0258】 由以上結果可確認，經移植至糖尿病小鼠的皮下之胰島素產生細胞係維持較高的內分泌細胞的比率，並且，在生體內分化為包含已成熟之 α 細胞之已成熟之類胰島細胞。

再者，可確認在生體內已成熟之類胰島細胞係極少(例如，未達 3%)混入具有增殖性之目標外細胞(Ki67 陽性細胞)。

【符號說明】

無。

第 108133603 號專利申請案
113 年 3 月 18 日修正替換頁

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種包含胰島素產生細胞之細胞集團，其係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以超過 15%的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞，以及

以未達 3%的比率含有 Ki67 陽性細胞，且以 85%以上的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞，並且將多能性幹細胞分化誘導成胰島素產生細胞而獲得者。

【第2項】 如申請專利範圍第 1 項所述之包含胰島素產生細胞之細胞集團，其中，MafA 基因或其基因產物的表現量低於胰島中之 MafA 基因或其基因產物的表現量。

【第3項】 如申請專利範圍第 1 項所述之包含胰島素產生細胞之細胞集團，係以未達 3%的比率含有升糖素陽性且胰島素陰性的細胞。

【第4項】 如申請專利範圍第 1 項所述之包含胰島素產生細胞之細胞集團，係顯示葡萄糖刺激性胰島素分泌(GSIS)回應。

【第5項】 如申請專利範圍第 1 項所述之包含胰島素產生細胞之細胞集團，係以未達 0.01%的比率含有鹼性磷酸酶陽性的多能性幹細胞。

【第6項】 一種醫藥，係包含申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項所述之包含胰島素產生細胞之細胞集團。

【第7項】 如申請專利範圍第 6 項所述之醫藥，其中，前述包含胰島素產生細胞之細胞集團係收容於器具中。

【第8項】 如申請專利範圍第 6 項所述之醫藥，其中，前述包含胰島素產生細胞之細胞集團係分散於水凝膠中。

【第9項】 一種申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項所述之包含胰島素產生細胞之細胞集團之用途，其係用以製造治療糖尿病用之醫藥。

【第10項】 一種申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項所述之包含胰島素產生細胞之細胞集團之用途，其係用以製造改善及/或維持糖尿病患者的空腹時及餐後葡萄糖水平的控制之醫藥。

【第11項】 一種申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項所述之包含胰島素產生細胞之細胞集團之用途，其係用以製造減低糖尿病患者中之低血糖症的危險性之醫藥。

【第12項】 如申請專利範圍第 9 至 11 項中任一項所述之用途，其中，前述醫藥係移植至生體內而使用。

【第13項】 如申請專利範圍第 9 至 11 項中任一項所述之用途，其中，前述醫藥係進行皮下移植而使用。

【第14項】 如申請專利範圍第 9 至 11 項中任一項所述之用途，其中，前述醫藥係使用於在生體內分化誘導類胰島細胞之方法。

【第15項】 如申請專利範圍第 14 項所述之用途，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞係以 50%以上的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞。

【第16項】 如申請專利範圍第 14 項所述之用途，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞係以未達 3%的比率含有 Ki67 陽性細胞。

【第17項】 如申請專利範圍第 14 項所述之用途，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞係以 10%以上的比率含有升糖素陽性且胰島素陰性的細胞。

【第18項】 如申請專利範圍第 14 項所述之用途，其中，於生體內所分化誘導出之類胰島細胞具有回應低血糖之胰島素分泌作用。

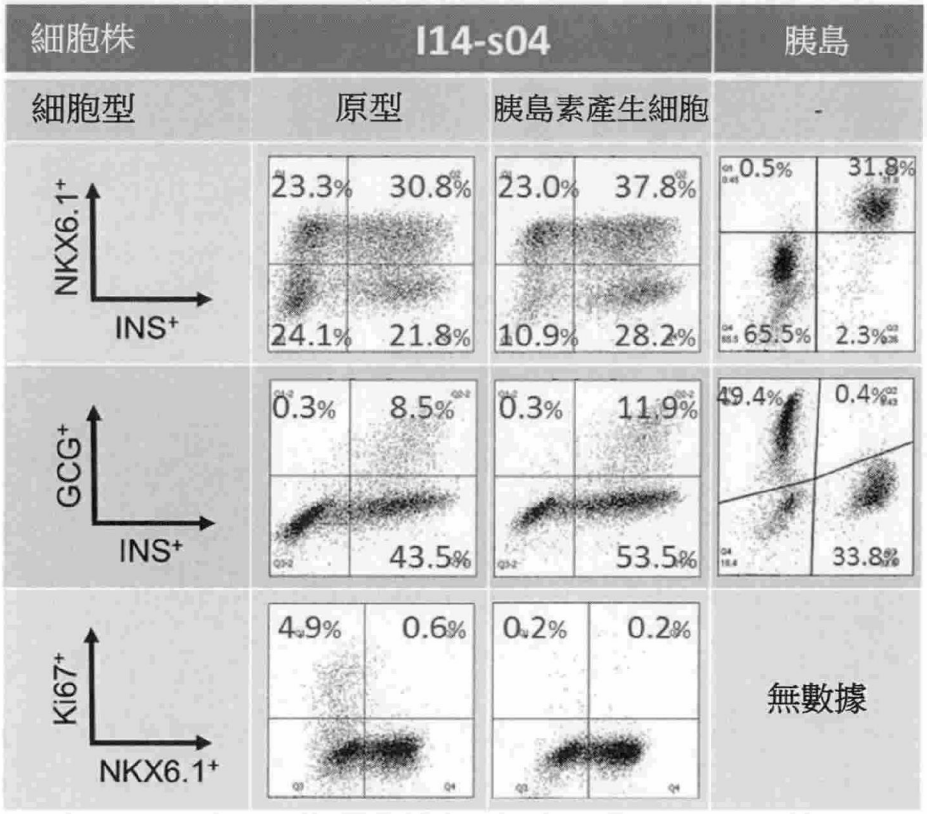
【第19項】 一種胰島素產生細胞集團之製造方法，該胰島素產生細胞集團係以 30%以上的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陽性的細胞，且以超過 15%的比率含有胰島素陽性且 NKX6.1 陰性的細胞，以及以未達 3%的比率含有 Ki67 陽性細胞，且以 85%以上的比率含有染色顆粒素 A 陽性細胞，

該製造方法包含下列步驟：

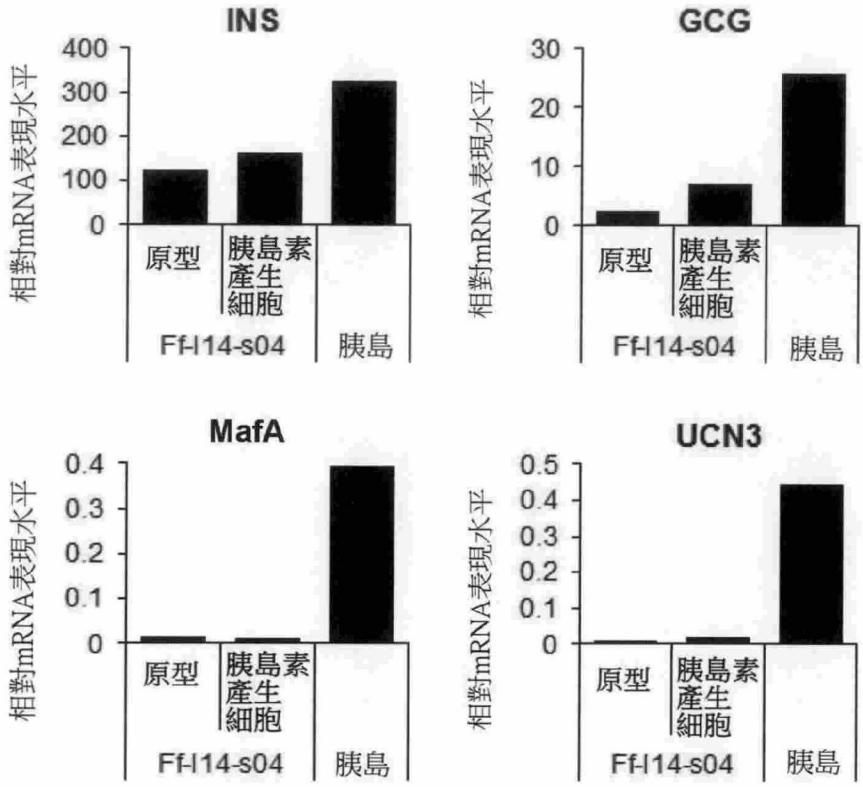
將多能性幹細胞在 5 至 100ng/mL 之量的活化素 A 的存在下施行培養，製造胚體內胚層細胞之步驟；以及

將內分泌前驅細胞在以 10μM 以下之量包含 FGFR1 抑制劑之培養基中進行培養，製造前述胰島素產生細胞集團之步驟。

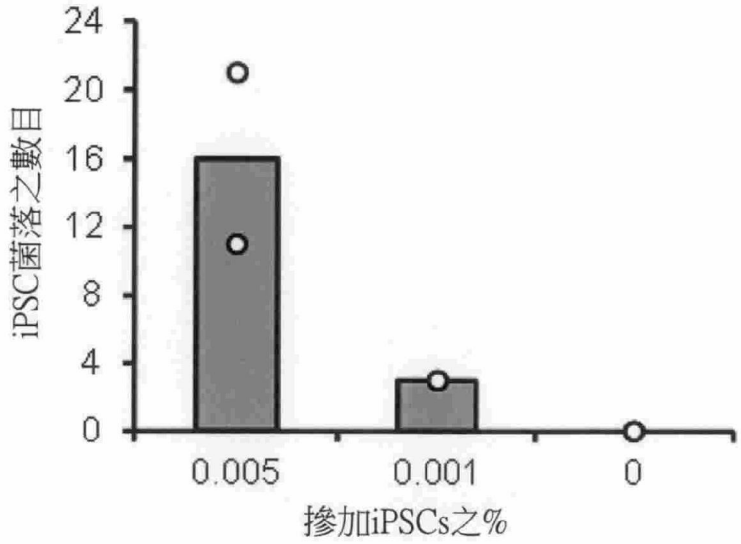
【發明圖式】


細胞株
I14-s04
胰島
細胞型
原型
胰島素產生細胞
-
NKX6.1+
INS+
23.3%
30.8%
24.1%
21.8%
23.0%
37.8%
10.9%
28.2%
0.5%
31.8%
65.5%
2.3%
GCG+
INS+
0.3%
8.5%
43.5%
0.3%
11.9%
53.5%
49.4%
0.4%
33.8%
Ki67+
NKX6.1+
4.9%
0.6%
0.2%
0.2%
無數據

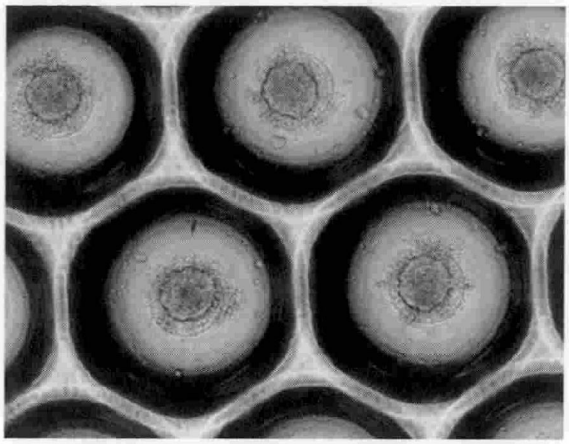
【第1圖】


INS
GCG
MafA
UCN3
相對mRNA表現水平
400
300
200
100
0
30
20
10
0.4
0.3
0.2
0.1
0.5
原型
胰島素產生細胞
Ff-I14-s04
胰島

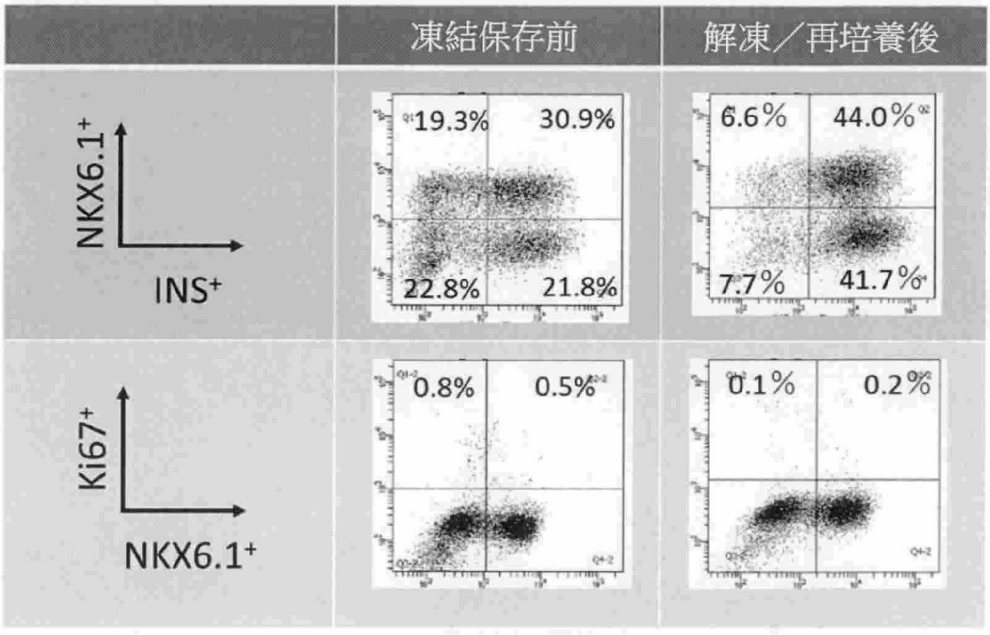
【第2圖】


iPSC菌落之數目
24
20
16
12
8
4
0
0.005
0.001
0
摻加iPSCs之%

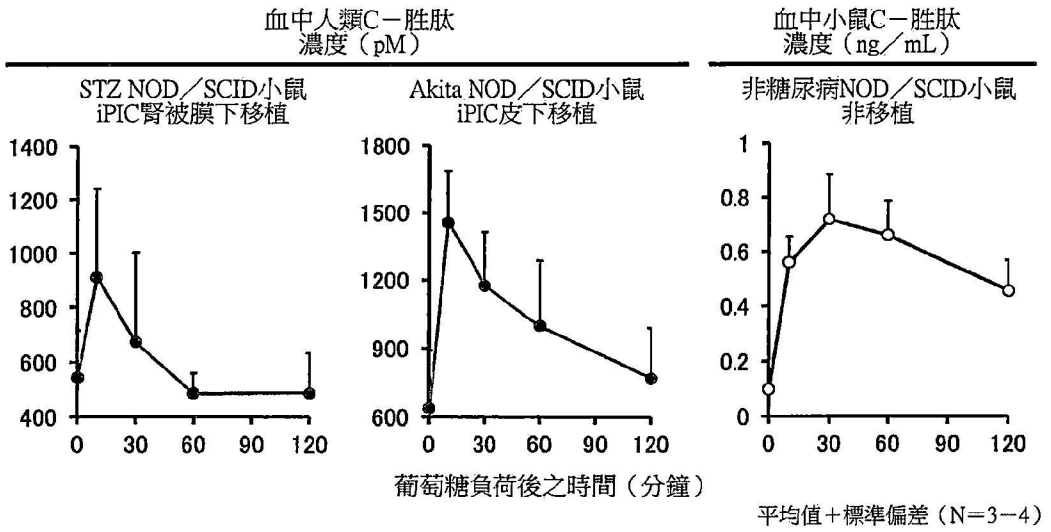
【第3圖】



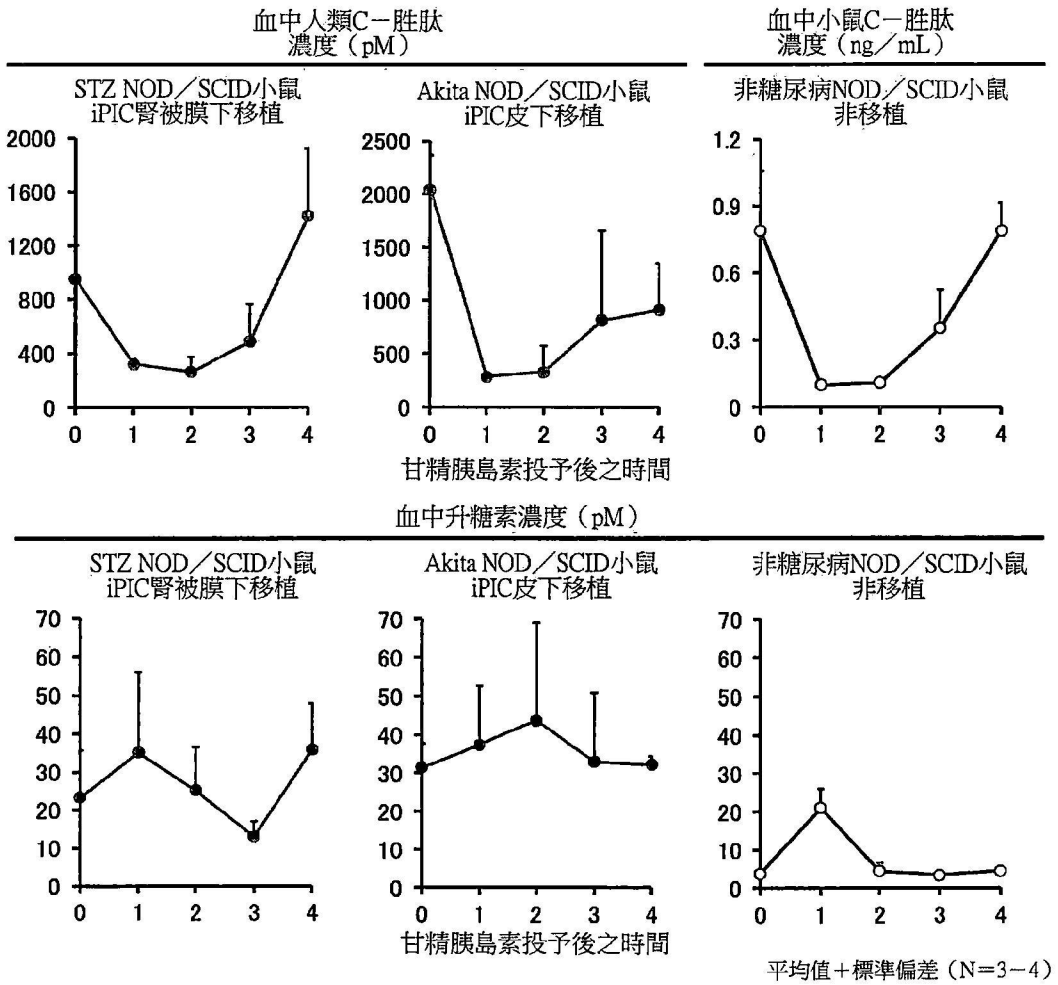
【第4圖】


凍結保存前
解凍／再培養後
NKX6.1+
INS+
19.3%
30.9%
22.8%
21.8%
6.6%
44.0%
7.7%
41.7%
Ki67+
NKX6.1+
0.8%
0.5%
0.1%
0.2%

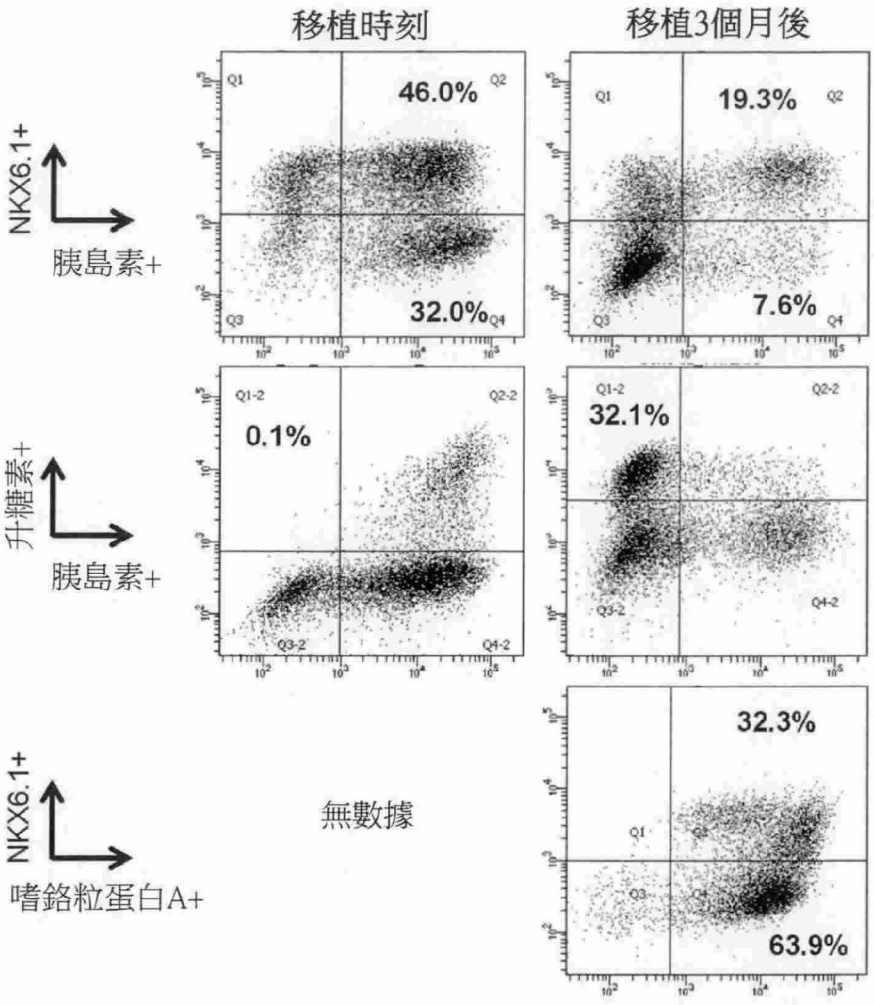
【第5圖】


血中人類C－胜肽
濃度（pM）
血中小鼠C－胜肽
濃度（ng／mL）
STZ NOD／SCID小鼠
iPIC腎被膜下移植
Akita NOD／SCID小鼠
iPIC皮下移植
非糖尿病NOD／SCID小鼠
非移植
葡萄糖負荷後之時間（分鐘）
平均值＋標準偏差（N＝3－4）

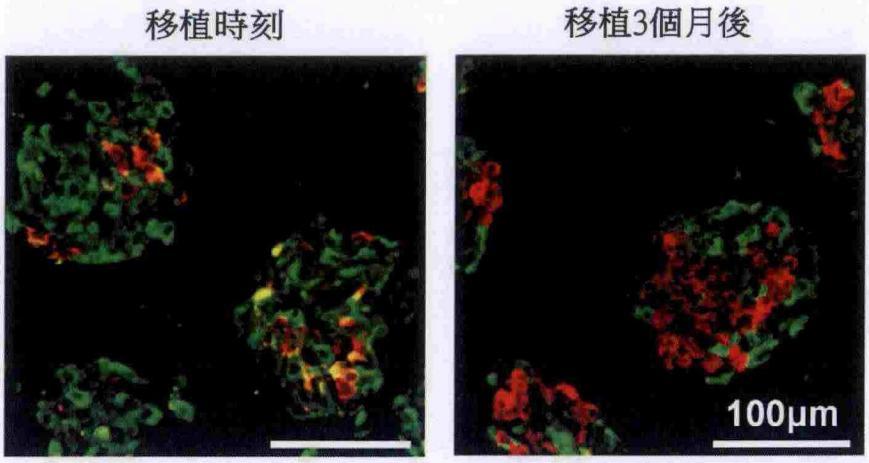
【第6圖】


血中人類C－胜肽
濃度（pM）
血中小鼠C－胜肽
濃度（ng／mL）
STZ NOD／SCID小鼠
iPIC腎被膜下移植
Akita NOD／SCID小鼠
iPIC皮下移植
非糖尿病NOD／SCID小鼠
非移植
甘精胰島素投予後之時間
血中升糖素濃度（pM）
甘精胰島素投予後之時間
平均值＋標準偏差（N＝3－4）

【第7圖】


移植時刻
移植3個月後
NKX6.1+
胰島素+
46.0%
32.0%
19.3%
7.6%
升糖素+
胰島素+
0.1%
32.1%
NKX6.1+
嗜鉻粒蛋白A+
無數據
32.3%
63.9%

【第8圖】



【第9圖】