

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和2年11月19日 (2020.11.19)

【公開番号】特開2020-108397(P2020-108397A)

【公開日】令和2年7月16日 (2020.7.16)

【年通号数】公開・登録公報2020-028

【出願番号】特願2020-47981(P2020-47981)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/078 (2010.01)

C 0 7 K 14/475 (2006.01)

C 0 7 K 14/51 (2006.01)

C 0 7 K 14/505 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/078 Z N A

C 0 7 K 14/475

C 0 7 K 14/51

C 0 7 K 14/505

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/12

【手続補正書】

【提出日】令和2年10月9日 (2020.10.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト多能性幹細胞由来の巨核球またはヒト多能性幹細胞由来の血小板を産生する方法であって、

(a) 骨形態形成タンパク質 - 4 (BMP - 4) および血管内皮成長因子 (VEGF) を含む培養培地中でヒト多能性幹細胞を培養し、前記多能性幹細胞の血管芽細胞または非生着血管細胞への分化を誘導する工程、及び

(b) トロンボポエチン (TPO) を含む巨核球 (MK) 培養培地中で前記血管芽細胞または前記非生着血管細胞を培養することにより、前記巨核球または前記血小板に分化させる工程

を含む、方法。

【請求項 2】

前記ヒト多能性幹細胞は、胚幹細胞または胚由来細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ヒト多能性幹細胞は、誘導された多能性幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 ( a ) において、細胞培養の少なくとも最初の 48 時間、前記ヒト多能性幹細胞を B M P - 4 および V E G F を含む培養培地中で培養する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

工程 ( b ) において、前記血管芽細胞または非生着血管細胞を少なくとも 6 ~ 8 日間培養する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記多能性幹細胞の血管芽細胞または非生着血管細胞への前記分化が、  
( i ) 骨形態形成タンパク質 - 4 ( B M P - 4 ) および血管内皮成長因子 ( V E G F ) を含む培養培地中でヒト多能性幹細胞を培養し、前記多能性幹細胞の胚様体への形成を誘導する工程、及び

( i i ) 前記胚様体を半固体培養培地中で培養することにより、血管芽細胞または非生着血管細胞を生成する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

工程 ( i ) の前記胚様体を分割して、分割された胚様体を生成することをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

工程 ( i ) の前記培養培地が、トロンボポエチン ( T P O )、F l t - 3 L ( F L ) または幹細胞因子 ( S C F ) を含まない、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 9】**

工程 ( i ) の前記培養培地が、塩基性線維芽細胞成長因子 ( b F G F )、エリスロポエチン ( E P O )、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ以上の成長因子をさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 10】**

工程 ( i i ) の前記半固体培養培地が、インスリン、トランスフェリン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F )、インターロイキン - 3 ( I L - 3 )、インターロイキン - 6 ( I L - 6 )、顆粒球コロニー刺激因子 ( G - C S F )、幹細胞因子 ( S C F )、トロンボポエチン ( T P O )、F L T 3 ( F L ) およびエリスロポエチン ( E P O ) からなる群から選択される 1 つ以上の成長因子を含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 11】**

工程 ( i i ) の前記半固体培地が、さらにメチルセルロースを含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 12】**

工程 ( i i ) の前記胚様体を少なくとも 10 ~ 13 日間、前記半固体培養培地中で培養する、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 13】**

工程 ( i ) または工程 ( i i ) における前記培養培地が、H O X B 4 およびタンパク質導入ドメイン ( P T D ) を含む融合タンパク質をさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記 H O X B 4 が、哺乳類 H O X B 4 である、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

工程 ( i ) および工程 ( i i ) の前記培養が低付着性条件下で行われる、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 16】**

工程 ( i ) および ( i i ) を通して前記培養培地が、支持細胞フリーである、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 17】**

工程 ( a ) および ( b ) を通して前記培養培地が無血清である、請求項 1 に記載の方法

。

**【請求項 18】**

前記ヒト多能性幹細胞は、分化の前に遺伝子操作される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記血管芽細胞または前記非生着血管細胞は、前記巨核球または前記血小板に分化される前に増幅される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記血管芽細胞または前記非生着血管細胞は、エリスロポイエチン（EPO）、インターロイキン - 3（IL - 3）、および幹細胞因子（SCF）を含む培養培地中で増幅される、請求項 19 に記載の方法。

**【請求項 21】**

請求項 1 の方法によって産生される少なくとも  $1 \times 10^6$  個の巨核球または血小板を含む医薬組成物。