

【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】平成26年1月16日(2014.1.16)

【公表番号】特表2013-512676(P2013-512676A)

【公表日】平成25年4月18日(2013.4.18)

【年通号数】公開・登録公報2013-018

【出願番号】特願2012-542230(P2012-542230)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/078 (2010.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

A 6 1 K 35/14 (2006.01)

A 6 1 P 7/04 (2006.01)

A 6 1 P 7/08 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 2 0 2 J

C 1 2 Q 1/02

A 6 1 K 35/14 Z

A 6 1 P 7/04

A 6 1 P 7/08

【手続補正書】

【提出日】平成25年11月22日(2013.11.22)

【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】

巨核球（MK）を生成する方法であって、
血管芽細胞を準備すること、及び
前記血管芽細胞を培養して、巨核球へと分化させること
を含む方法。

【請求項 2】

前記血管芽細胞が、生体外で多能性幹細胞から分化する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記多能性幹細胞が、ヒト胚性幹細胞（hESC）である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記多能性幹細胞が、誘導多能性幹細胞（iPSC）である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

多能性幹細胞の前記分化が、前記多能性幹細胞を解離すること、並びに BMP-4、VEGF、bFGF、TPO、Flt3 リガンド、SCF、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地で前記多能性幹細胞を培養して、胚様体（EB）を形成することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記培地が、BMP-4 及び VEGF を含み、前記多能性幹細胞の培養が、前記 EB を形成するために約 48 時間にわたる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 BMP-4 の濃度が、50 ng/ml であり、VEGF が、50 ng/ml である

、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記形成された EB を、化学的に及び／又は機械的に解離し、前記培養培地の少なくとも一部を、BMP-4、VEGF、bFGF、TPO、Flt3 リガンド、SCF、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地と交換して、前記血管芽細胞を生成する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 bFGF の濃度が、 20 ng/ml であり、TPO が、 $50 \sim 100 \text{ ng/ml}$ であり、Flt3 リガンドが、 50 ng/ml であり、SCF が、 50 ng/ml である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記解離された EB を、bFGF を含む芽球コロニー増殖培地中で約 3～4 日間培養して、前記血管芽細胞を生成する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記培地が、IL6、エストラジオール、ビタミン B3、1 つ又は複数の細胞外マトリックスタンパク質、又はそれらの組み合わせを更に含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 iPSC が、ヒト由来の体細胞から誘導される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 13】

前記体細胞が、成体組織または胎児（仔）組織に由来する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記血管芽細胞の前記 MK への分化が、TPO、SCF、IL11、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地中で、約 2～8 日間培養することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 TPO の濃度が、 50 ng/ml であり、SCF が、 20 ng/ml であり、IL11 が、 20 ng/ml である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記培養培地の少なくとも一部を、TPO、SCF、IL11、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地と 2～3 日毎に交換して、前記血管芽細胞を前記 MK へと分化させることを更に含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 1～16 に記載の方法のいずれかから生成される、ある量の巨核球。

【請求項 18】

血小板を生成する方法であって、
巨核球（MK）を準備すること、及び
前記 MK を培養して、血小板へと分化させることを含む方法。

【請求項 19】

前記 MK が、血管芽細胞から分化する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記血管芽細胞の前記 MK への分化が、TPO、SCF、IL11、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地中で、約 2～8 日間培養することを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 TPO の濃度が、 50 ng/ml であり、SCF が、 20 ng/ml であり、IL11 が、 20 ng/ml である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記培養培地の少なくとも一部を、TPO、SCF、IL11、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地と 2～3 日毎に交換し

て、前記血管芽細胞を前記MKへと分化させることを更に含む、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記血管芽細胞が、生体外で多能性幹細胞から分化する、請求項19に記載の方法。

【請求項24】

前記多能性幹細胞が、ヒト胚性幹細胞（hESC）である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記多能性幹細胞が、誘導多能性幹細胞（iPSC）である、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記多能性幹細胞の分化が、前記多能性幹細胞を解離すること、並びにBMP-4、VEGF、bFGF、TPO、Flt3リガンド、SCF、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地で前記多能性幹細胞を培養して、胚様体（EB）を形成することを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記培地が、BMP-4及びVEGFを含み、前記多能性幹細胞の培養が、EBを形成するために約48時間にわたる、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記BMP-4の濃度が、50ng/mlであり、VEGFが、50ng/mlである、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

形成された前記EBを、化学的に及び／又は機械的に解離し、前記培養培地の少なくとも一部を、BMP-4、VEGF、bFGF、TPO、Flt3リガンド、SCF、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地と交換して、前記血管芽細胞を生成する、請求項26に記載の方法。

【請求項30】

前記bFGFの濃度が、20ng/mlであり、TPOが、50～100ng/mlであり、Flt3リガンドが、50ng/mlであり、SCFが、50ng/mlである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

解離された前記EBを、bFGFを含む芽球コロニー増殖培地中で約3～4日間養殖して、前記血管芽細胞を生成する、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

前記培地が、IL6、エストラジオール、ビタミンB3、1つ又は複数の細胞外マトリックスタンパク質、又はそれらの組み合わせを更に含む、請求項29に記載の方法。

【請求項33】

前記iPSCが、ヒト由来の体細胞から誘導される、請求項25に記載の方法。

【請求項34】

前記体細胞が、成体組織または胎児（仔）組織に由来する、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記MKを、TPO、SCF、ヘパリンナトリウム、IL11、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地に再懸濁し、少なくとも4日間培養して、前記血小板へと分化させる、請求項18に記載の方法。

【請求項36】

前記TPOの濃度が、100ng/mlであり、SCFが、50ng/mlであり、ヘパリンナトリウムが、25単位/mlであり、IL11が、20ng/mlである、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記少なくとも4日間の前記MK培養後に、GM6001又はIL3を添加することを更に含む、請求項35に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記培地の少なくとも一部を、T P O、S C F、ヘパリンナトリウム、I L 1 1、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地と、少なくとも 2 日毎に交換することを更に含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 M K を解離し、T P O、S C F、ヘパリンナトリウム、I L 1 1、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地中の、有糸分裂的に停止されたフィーダー層上で少なくとも 4 日間培養して、前記血小板へと分化させる、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記フィーダー層が、O P 9 細胞 または C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞 を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記少なくとも 4 日間の前記 M K 培養後に、G M 6 0 0 1 又は I L 3 を添加することを更に含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記培地の少なくとも一部を、T P O、S C F、ヘパリンナトリウム、I L 1 1、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される成長因子又はサイトカインを含む培地と、少なくとも 2 日毎に交換することを更に含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 3】

請求項 1 8 ～ 4 2 に記載の方法のいずれかから生成される、ある量の血小板。

【請求項 4 4】

前記血小板が、前記血小板の 対象体への投与の際に、前記対象体において H L A 同種免疫原性反応に寄与しない溶液中で保存される、請求項 4 3 に記載の血小板。

【請求項 4 5】

前記血小板が、アピラーゼ及び／又は E D T A の存在下で活性化されない、請求項 4 3 に記載の血小板。

【請求項 4 6】

細胞分化の修飾因子をスクリーニングする方法であって、
ある量の巨核球（M K）を準備すること、
前記 M K を試験化合物と接触させること、及び
前記 M K と前記試験化合物との接触に由来する機能的効果の存在又は非存在を決定することを含み、
前記機能的効果の存在が、前記試験化合物が、細胞分化を調節する巨核球形成因子、血小板新生因子、及び／又は造血因子であることを示し、前記機能的効果の非存在が、前記試験化合物が、細胞分化を調節する巨核球形成因子、血小板新生因子、及び／又は造血因子でないことを示す方法。

【請求項 4 7】

血小板輸血を必要とする対象体を治療するための組成物であって、前記組成物は、ある量の生体外で分化した血小板を含み、ここで、
ある量の血管芽細胞が培養されて、巨核球（M K）へと分化 し、そして前記 M K は、生体外で培養されて、血小板へと分化 する、組成物。

【請求項 4 8】

前記生体外で分化した血小板が前記対象体 に適合 されて、免疫媒介性宿主反応が低減又は排除される、請求項 4 7 に記載の組成物。