

【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24年5月24日(2012.5.24)

【公表番号】特表2011-517563(P2011-517563A)

【公表日】平成23年6月16日(2011.6.16)

【年通号数】公開・登録公報2011-024

【出願番号】特願2011-502014(P2011-502014)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/077 (2010.01)

A 0 1 N 1/02 (2006.01)

A 6 1 K 35/34 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 L 27/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 2 0 2 G

A 0 1 N 1/02

A 6 1 K 35/34

A 6 1 P 9/00

A 6 1 L 27/00 Q

【手続補正書】

【提出日】平成24年3月26日(2012.3.26)

【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】

ヒト心血管前駆細胞の単離された集団であって、前記前駆細胞は K D R を発現するが C - K I T を発現しないヒト心血管前駆細胞の集団。

【請求項 2】

前記前駆細胞が、心筋細胞、内皮細胞、及び血管平滑筋細胞の前駆細胞である、請求項 1 に記載のヒト心血管前駆細胞の単離された集団。

【請求項 3】

ヒト胚様体をアクチビン及び B M P の存在下で無血清培地中において培養する工程と、その後前記培養に W n t の阻害剤を加える工程とによって得られる、請求項 1 に記載のヒト心血管前駆細胞の単離された集団。

【請求項 4】

前記アクチビンが、アクチビン A である請求項 3 に記載のヒト心血管前駆細胞の単離された集団。

【請求項 5】

前記 B M P が、B M P 4 である請求項 3 に記載のヒト心血管前駆細胞の単離された集団。

【請求項 6】

前記 W n t の阻害剤が、D K K - 1 である請求項 3 に記載のヒト心血管前駆細胞の単離された集団。

【請求項 7】

ヒト心血管前駆細胞を産生するための方法であって、

(a) ヒト胚様体をアクチビン及びBMPの存在下で無血清培地中において培養する工程、及び

(b) 前記培地へWntの阻害剤を加え、ヒト心血管前駆細胞の集団を提供するために培養する工程を含む方法。

【請求項8】

(c) 収集した細胞集団を提供するために前記ヒト心血管前駆細胞を培養から収集する工程をさらに含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

(d) 前記収集した細胞集団を心血管前駆細胞に濃縮する工程をさらに含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記アクチビンが、アクチビンAである請求項7に記載の方法。

【請求項11】

前記BMPが、BMP4である請求項7に記載の方法。

【請求項12】

前記Wntの阻害剤が、DKK1である請求項7に記載の方法。

【請求項13】

前記工程(a)が、bFGFの存在をさらに含む請求項7に記載の方法。

【請求項14】

前記工程(b)が、VEGFを加える工程をさらに含む請求項7に記載の方法。

【請求項15】

ヒト心血管前駆細胞を産生するための方法であって、

(a) ヒト胚様体を約1～4日間にわたりアクチビンA及びBMP4の存在下で無血清培地中において培養する工程、

(b) DKK1を前記無血清培地へ加え、約1～2日間にわたり培養する工程、及び、

(c) ヒト心血管前駆細胞の集団を収集する工程を含む方法。

【請求項16】

前記工程(a)が、bFGFの存在をさらに含む請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記工程(b)が、VEGFを加える工程をさらに含む請求項15に記載の方法。

【請求項18】

前記アクチビンAの濃度が、約0.5 ng/ml～約30 ng/mlである請求項15に記載の方法。

【請求項19】

前記BMP4の濃度が、約1.0 ng/ml～約20 ng/mlである請求項15に記載の方法。

【請求項20】

bFGFの濃度が、約1.0 ng/ml～約10 ng/mlである請求項15に記載の方法。

【請求項21】

前記DKK1の濃度が、約100 ng/ml～約200 ng/mlである請求項15に記載の方法。

【請求項22】

前記VEGFの濃度が、約1.0 ng/ml～約50.0 ng/mlである請求項17に記載の方法。

【請求項23】

ヒト心血管前駆細胞を産生するための方法であって、

(a) ヒト胚様体を約4日間にわたり約3.0 ng/mlのアクチビンA、約10.0 ng/mlのBMP4及び約5.0 ng/mlのbFGFの存在下にて無血清培地中で培養する工程、及び

(b) 約 150 ng/ml の DKK1 及び約 10.0 ng/ml の VEGF を無血清培地へ加え、心血管前駆細胞を生成するために約 1 ~ 2 日間にわたり培養する工程を含む方法。

【請求項 24】

(c) KDR を発現するが C - KIT を発現しない細胞を選別する工程をさらに含む請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記選別が、免疫選択による請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記選別が、フローサイトメトリーによる請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

ヒト心筋細胞の集団を発生する方法であって、KDR を発現するが C - KIT を発現しないヒト心血管前駆細胞の集団を約 7 ~ 約 10 日間にわたり Wnt の阻害剤の存在下で培養する工程と、ヒト心筋細胞の集団を収集する工程とを含む方法。

【請求項 28】

前記ヒト心血管前駆細胞を VEGF 及び Wnt の阻害剤の存在下で培養する工程を含む請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 Wnt の阻害剤が、DKK1 である請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 VEGF の濃度が、約 1.0 ng/ml ~ 約 50.0 ng/ml である請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

DKK2 の濃度が、約 100 ng/ml ~ 約 200 ng/ml である請求項 27 に記載の方法。

【請求項 32】

前記ヒト心血管前駆細胞が、単層として培養される請求項 27 に記載の方法。

【請求項 33】

前記ヒト心血管前駆細胞が、凝集体として培養される請求項 27 に記載の方法。

【請求項 34】

心筋細胞、内皮細胞及び血管平滑筋細胞を含有する心血管コロニーを発生する方法であって、ヒト心血管前駆細胞を約 3 ~ 約 7 日間にわたり VEGF、bFGF、及び Wnt の阻害剤の存在下で培養する工程を含む方法。

【請求項 35】

前記 Wnt の阻害剤が、DKK1 である請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記 DKK1 の濃度が、約 100 ng/ml ~ 約 200 ng/ml である請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 VEGF の濃度が、約 1.0 ng/ml ~ 約 50.0 ng/ml である請求項 34 に記載の方法。

【請求項 38】

前記 bFGF の濃度が、約 1.0 ng/ml ~ 約 10.0 ng/ml である請求項 34 に記載の方法。

【請求項 39】

ヒト心血管前駆細胞の 単離された 集団を含む組成物。

【請求項 40】

請求項 34 の方法によって産出されたヒト心血管コロニーの集団を含む組成物。

【請求項 41】

心筋細胞を置換する方法であって、当該置換を必要とする被験者に請求項 27 に記載の

方法によって産生されたヒト心筋細胞を含む組成物を投与する工程を含む方法。

【請求項 4 2】

心機能不全を特徴とする障害を治療する方法であって、前記治療を必要とする被験者にヒト心血管前駆細胞を含む組成物を投与する工程を含む方法。

【手続補正 2】

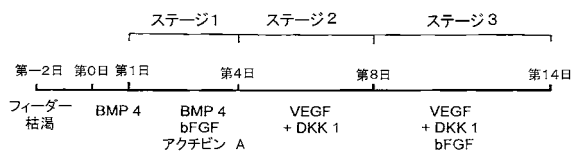
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

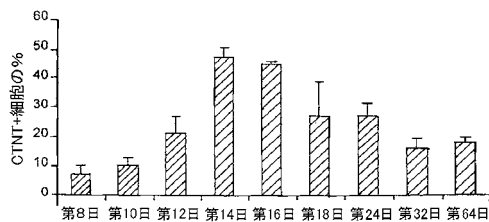
【補正方法】変更

【補正の内容】

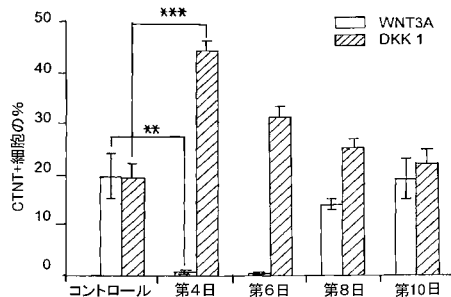
【図 1】



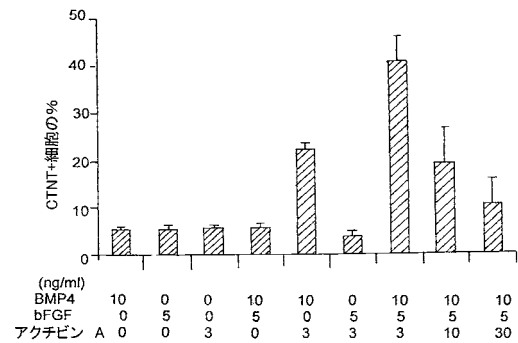
【図 2】



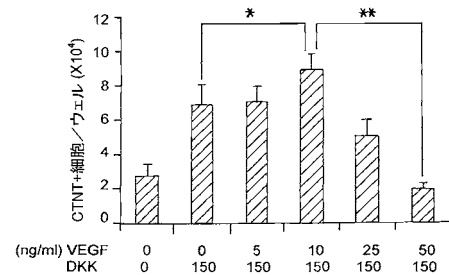
【図 3】



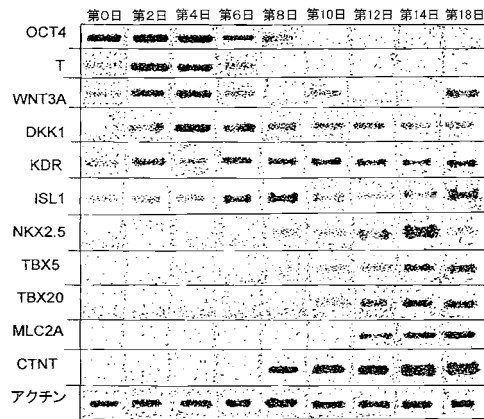
【図 4】



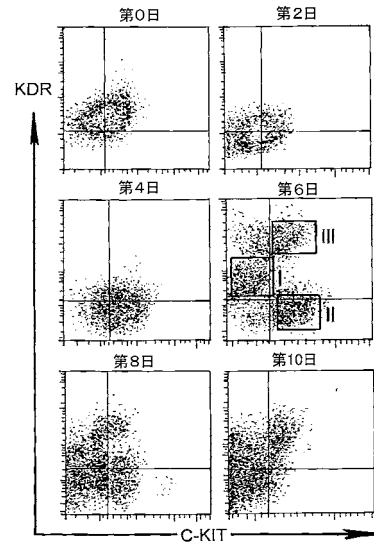
【図 5】



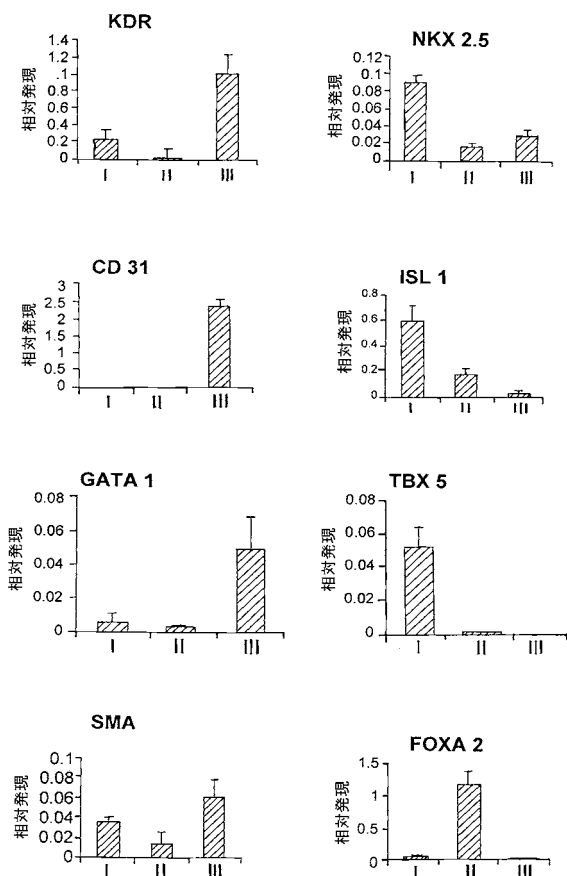
【図 6】



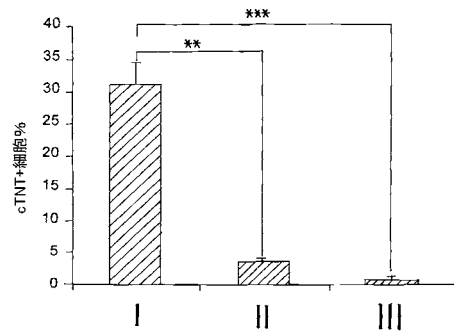
【図 7】



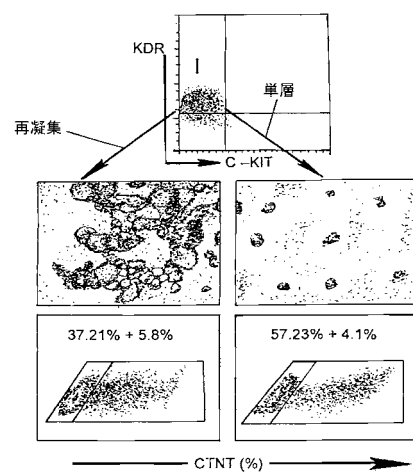
【図 8】



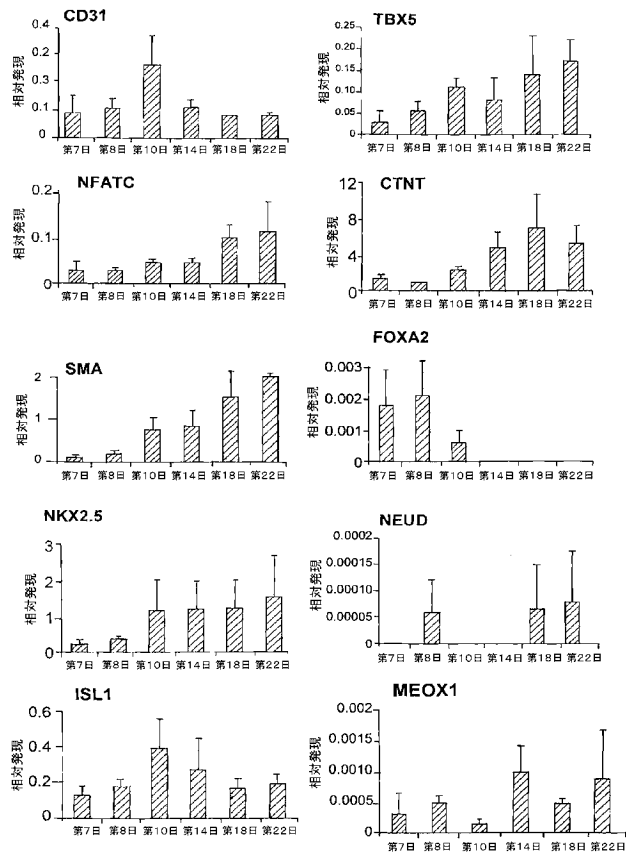
【図 9】



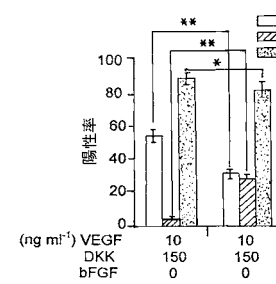
【図 10】



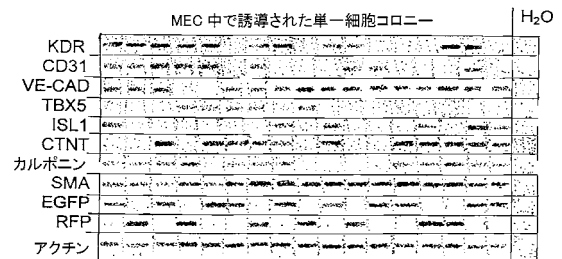
【図 1 1】



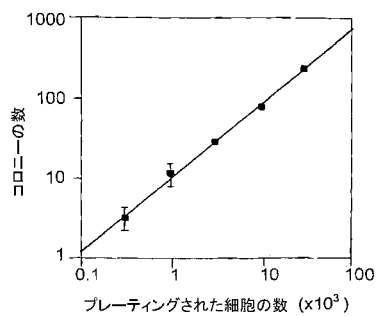
【図 1 2】



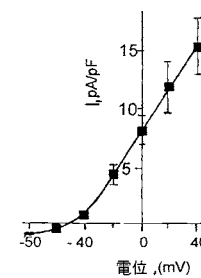
【図 1 3】



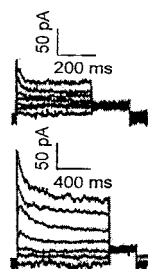
【図 1 4】



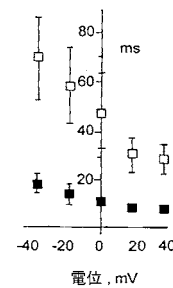
【図 1 6】



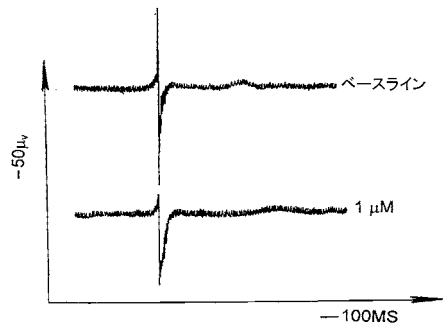
【図 1 5】



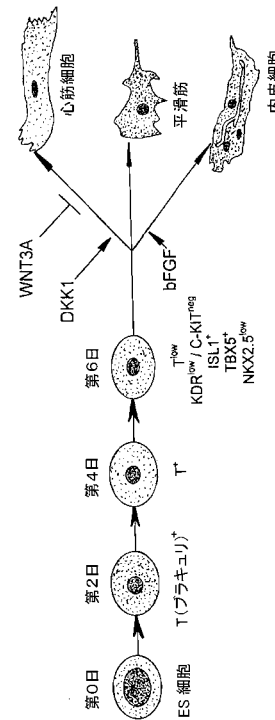
【図 1 7】



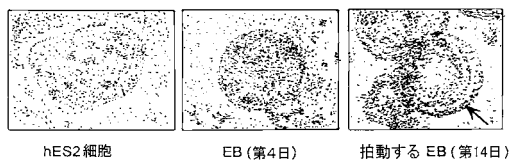
【図 18】



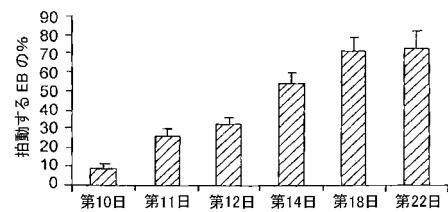
【図 19】



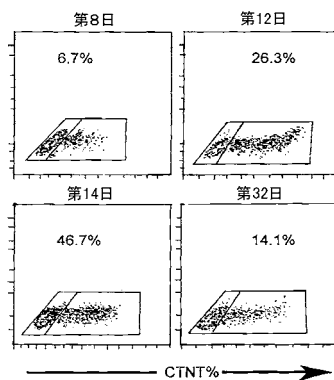
【図 20】



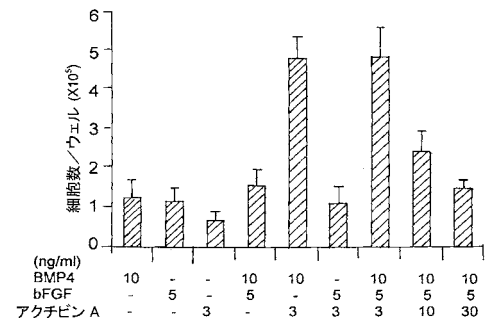
【図 22】



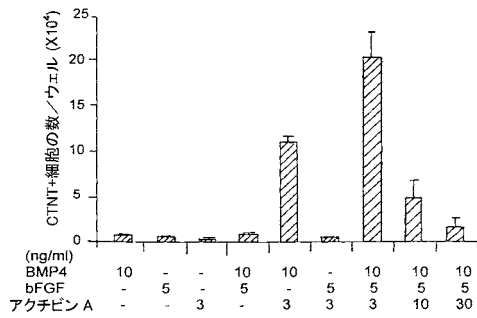
【図 21】



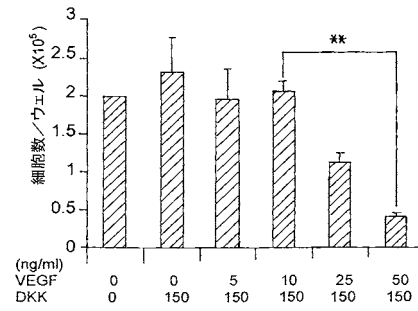
【図 23】



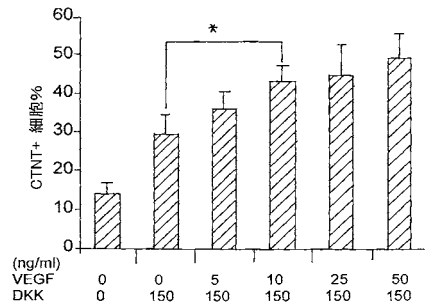
【図 2 4】



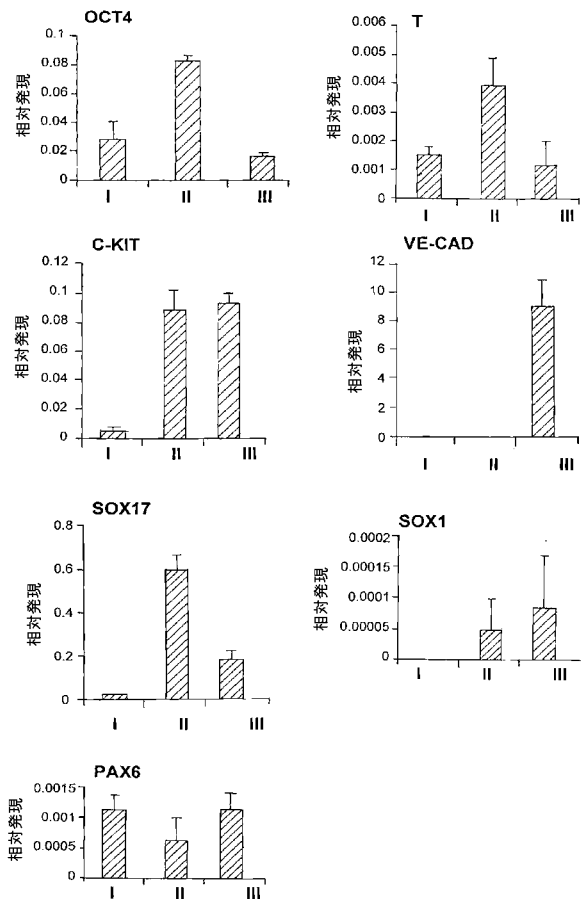
【図 2 6】



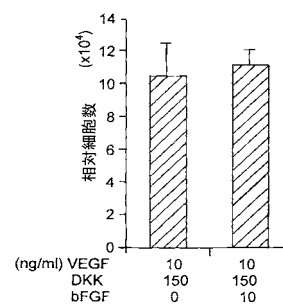
【図 2 5】



【図 2 7】



【図 2 8】



【図 2 9】

