

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-533319

(P2013-533319A)

(43) 公表日 **平成25年8月22日 (2013. 8. 22)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/39 (2006.01)	A 6 1 K 35/39	4 C 0 7 6
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 7
A 6 1 K 9/48 (2006.01)	A 6 1 K 9/48	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

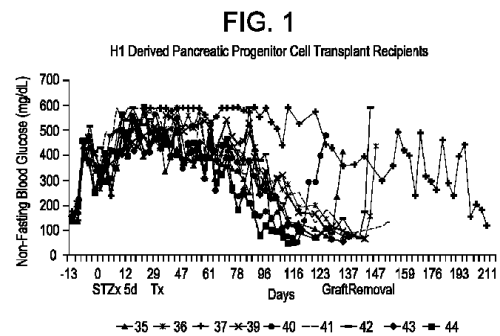
(21) 出願番号	特願2013-524228 (P2013-524228)	(71) 出願人	509087759 ヤンセン バイオテック, インコーポレーテッド アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 4 4 ホーシヤム・リッジビュードライブ 8 0 0 / 8 5 0
(86) (22) 出願日	平成23年8月11日 (2011. 8. 11)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(85) 翻訳文提出日	平成25年3月13日 (2013. 3. 13)	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/047410	(74) 代理人	100093676 弁理士 小林 純子
(87) 国際公開番号	W02012/021698	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(87) 国際公開日	平成24年2月16日 (2012. 2. 16)		
(31) 優先権主張番号	61/373, 109		
(32) 優先日	平成22年8月12日 (2010. 8. 12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵内分泌腺前駆体細胞による糖尿病の治療

(57) 【要約】

本発明は、膵内分泌前駆細胞の集団を動物に移植することにより、動物の血糖値を低下させる方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カプセル化した膵内分泌前駆細胞の集団を動物に移植することにより、動物の血糖値を低下させる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2010年8月12日に出願された、米国特許仮出願第61/373,109号の利益を主張するものであり、当該出願を本明細書にその全容において、かつあらゆる目的について援用するものである。

10

【0002】

(発明の分野)

本発明は、膵内分泌前駆細胞の集団を動物に移植することにより、動物の血糖値を低下させる方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

I型糖尿病の細胞置換療法の進歩及び移植可能なランゲルハンス島の不足により、生着に適したインスリン産生細胞、すなわち細胞の供給源の開発に注目が集まっている。1つの手法として、例えば、胚性幹細胞のような多能性幹細胞から機能性の細胞を生成することがある。

20

【0004】

脊椎動物の胚発生において、多能性細胞は、原腸形成として知られているプロセスで3つの胚葉(外胚葉、中胚葉、及び内胚葉)を含む細胞のグループを生じる。例えば、甲状腺、胸腺、膵臓、腸、及び肝臓等の組織は、内胚葉から中間段階を経て発現する。このプロセスにおける中間段階は、胚体内胚葉の形成である。胚体内胚葉細胞は、例えばHNF3、GATA4、MIXL1、CXCR4及びSOX17などの多くのマーカーを発現する。

【0005】

膵臓の形成は、胚体内胚葉の膵臓内胚葉への分化により起こる。膵臓内胚葉の細胞は膵臓-十二指腸ホメオボックス遺伝子、PDX1を発現する。PDX1が存在しない場合、膵臓は、腹側芽及び背側芽の形成を越えて発育しない。したがって、PDX1の発現は、膵臓器官形成において重要な工程を印している。成熟した膵臓は、他の細胞型の中でも、外分泌組織及び内分泌組織を含む。外分泌組織及び内分泌組織は、膵臓内胚葉の分化によって生じる。

30

【0006】

島細胞の特徴を保持する細胞がマウスの胚細胞から誘導されたことが報告されている。例えば、Lumelskyら(Science 292:1389, 2001)は、マウスの胚幹細胞の、膵島と同様のインスリン分泌構造への分化を報告している。Soriaら(Diabetes 49:157, 2000)は、ストレプトゾトシン糖尿病のマウスにおいて、マウスの胚幹細胞から誘導されたインスリン分泌細胞が糖血症を正常化することを報告している。

40

【0007】

一例において、ホリ(Hori)ら(PNAS 99:16105, 2002)は、ホスホイノシチド3-キナーゼ(LY294002)の阻害剤でマウス胚性幹細胞を処理することにより、細胞に類似した細胞が生じたことを開示している。

【0008】

別の例では、Blyszczukら(PNAS 100:998, 2003)が、Pax4を構成的に発現しているマウス胚幹細胞からのインスリン産生細胞の生成を報告している。

50

【0009】

Micallefらは、レチノイン酸が、胚幹細胞のPDX1陽性膵臓内胚葉の形成に対する関与を調整することができることを報告している。レチノイン酸は、胚における原腸形成の終了時に該当する期間中、胚性幹細胞分化の4日目に培養液に添加すると、PDX1発現の誘導に最も効果的である(Diabetes 54:301, 2005)。

【0010】

Miyazakiらは、PDX1を過剰発現しているマウス胚幹細胞株を報告している。彼らの結果は、外因性のPDX1発現が、得られた分化細胞内でインスリン、ソマトスタチン、グルコキナーゼ、ニューロゲニン3、p48、Pax6、及びHnf6遺伝子の発現を明らかに増加させたことを示している(Diabetes 53:1030, 2004)。

10

【0011】

Skoudyらは、アクチビンA(TGF-スーパー族の構成員)が、マウス胚性幹細胞中で膵臓外分泌遺伝子(p48及びアミラーゼ)、並びに内分泌遺伝子(PDX1、インスリン及びグルカゴン)の発現を上方制御することを報告している。最大の効果は、1nMアクチビンAを使用して観察された。また、インスリン及びPDX1のmRNA発現レベルはレチノイン酸に影響されないが、3nM FGF7処理により、PDX1の転写物量が増加する結果となることが認められた(Biochem. J. 379:749, 2004)。

【0012】

Shirakiらは、胚幹細胞のPDX1陽性細胞への分化を特異的に高める増殖因子の効果の研究した。Shirakiらは、TGF-2によってPDX1陽性細胞がより高い比率で再現性よく得られたことを観察している(Genes Cells. 2005 Jun; 10(6):503~16)。

20

【0013】

Gordonらは、血清が存在せず、かつWntシグナル伝達阻害剤と共にアクチビンが存在する条件下で、マウス胚性幹細胞からの短尾奇形[陽性]/HNF-3 [陽性]内胚葉細胞への誘導を示した(米国特許出願公開第2006/0003446(A1)号)。

【0014】

Gordonら(PNAS, Vol 103, 16806ページ, 2006)は、「Wnt及びTGF- /ノードル/アクチビンシグナル伝達は、前側原始線条の生成のために同時に必要である」と述べている。

30

【0015】

しかしながら、胚幹細胞発育のマウスモデルは、例えば、ヒト等のより高等な哺乳動物内の発育プログラムを正確に模倣しない恐れがある。

【0016】

Thomsonらは、ヒト胚盤胞から胚幹細胞を単離した(Science 282:114, 1998)。同時に、Gearhart及び共同研究者は、胎児腺組織から、ヒト胚性生殖細胞(hEG)株を誘導した(Shamblootら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998)。単に白血病抑制因子(LIF)と共に培養することにより分化しないようにすることができるマウス胚幹細胞とは異なり、ヒト胚幹細胞は、非常に特殊な条件下で維持する必要がある(米国特許第6,200,806号、国際公開第99/20741号;国際公開第01/51616号)。

40

【0017】

D'Amourらは、高濃度のアクチビン及び低濃度の血清の存在下でのヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉の濃縮化された培養物の作製を述べている(Nature Biotechnology 2005)。これらの細胞をマウスの腎臓皮膜下で移植することにより、いくつかの内胚葉性器官の特徴を有する、より成熟した細胞への分化が見られた。ヒト胚幹細胞誘導による胚体内胚葉細胞は、FGF-10の添加後、PDX1陽性細胞に

50

更に分化することができる（米国特許出願公開第2005/0266554（A1）号）。

【0018】

D'Amourら（Nature Biotechnology - 24, 1392~1401（2006））は、「ヒト胚性幹（hES）細胞を、膵臓ホルモンインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵臓ポリペプチド及びグレリンを合成できる内分泌細胞へと変換する分化プロセスを開発した」と述べている。このプロセスは、内分泌ホルモンを発現する細胞経路で類胚体内胚葉、腸管内胚葉、膵臓内胚葉及び内分泌前駆体に類似する段階に細胞を向わせることにより、インビボでの膵臓器官形成を模倣する。

【0019】

別の例では、Fiskらは、ヒト胚幹細胞から膵島細胞を産生する系を報告している（米国特許出願公開第2006/0040387（A1）号）。この場合、分化経路を3つの段階に分割した。先ず、ヒト胚性幹細胞を、酪酸ナトリウムとアクチビンAの組み合わせを用いて内胚葉に分化した。次いで、細胞を、ノギンなどのTGF-アンタゴニストとEGF又はベータセルリンとの組み合わせで培養して、PDX1陽性細胞を生成する。最終分化をニコチンアミドにより誘発させた。

【0020】

一例では、Benvenistryらは、「我々は、PDX1の過剰発現が、膵臓に多く見られる遺伝子の発現を増強させたことを結論し、インスリン発現の誘導には、インビボでのみ存在する更なるシグナルを必要とする可能性がある。」と述べている（Benvenistryら、Stem Cells 2006; 24: 1923~1930）。

【0021】

別の例では、米国特許出願公開第2008/0241107（A1）号は、a）インスリンを生産していない細胞を得る工程；及びb）高濃度のグルコースを含有し、細胞はインスリンを分泌する培地と共に細胞をインキュベートする工程を含む、インスリンを分泌する細胞の製造方法を請求する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

したがって、膵臓内分泌細胞、膵臓ホルモン発現細胞、又は膵臓ホルモン分泌細胞に分化する可能性を維持する一方で、現在の临床上の必要性に対処するように拡張可能な、多能性幹細胞株を確立するための条件を開発する著しい必要性がなお存在する。本発明者らは、膵臓内分泌細胞まで進むヒト胚幹細胞の分化の効率を改善する代替的な手法を採用した。

【課題を解決するための手段】

【0023】

一実施形態では、本発明は、膵内分泌前駆細胞の集団を動物に移植することにより、動物の血糖値を低下させる方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】ストレプトゾトシンの5回注射により糖尿病状態にされ、次いで腎臓カプセル下で分化したヒトES細胞を移植（段階4）した、SCIDマウス中の0日目の血糖値。続く数か月の血糖を追跡することによって、高血糖が前糖尿病レベルまで徐々に減少したことが明らかになった。以降の腎臓除去は、糖尿病の急速な再発を招いた。

【図2】血糖値の低下と比例して漸次的に増加することを示している、移植後の表示した週での血漿サンプル中のヒトC-ペプチド測定値。

【図3】腎臓カプセル下で又はTheraCyt器具内で皮下移植された細胞のレシピエントにおいて得られる比較可能なC-ペプチド値。

【発明を実施するための形態】

【0025】

10

20

30

40

50

開示を分かりやすくするため、限定の目的ではなく、本発明の詳細の説明を、本発明のしかるべき特徴、実施形態又は適用を説明又は例示する下記の小項目に分割する。

【0026】

定義

幹細胞は、単独の細胞レベルで自己複製及び分化して、自己複製前駆細胞、非再生前駆細胞、及び最終分化細胞を含む、後代細胞を生成する能力で定義される未分化細胞である。幹細胞は、また、インビトロで複数の胚葉層（内胚葉、中胚葉及び外胚葉）から様々な細胞系の機能的細胞へと分化する能力によって、並びに移植後に複数の胚葉層の組織を生じ、胚盤胞への注入後、全部ではないが殆どの組織に寄与する能力によって特徴付けられる。

10

【0027】

幹細胞は、発生上の能力によって、（１）全ての胚性又は胚体外細胞のタイプを生ずる能力を有することを意味する、分化全能性、（２）全ての胚性細胞のタイプを生ずる能力を有することを意味する、分化万能性、（３）特定の組織、臓器、又は生理学的な系内で全ての細胞系統のサブセットを生ずる能力を有する、分化多能性（例えば、造血幹細胞（HSC）は、HSC（自己再生性）、血球限定的寡能性前駆細胞、及び、血液の通常成分である全ての細胞種及び要素（例えば、血小板）を生じうる）、（４）多能性幹細胞よりも限定された細胞系統のサブセットを生ずる能力を有することを意味する、分化寡能性、及び（５）単一の細胞系統（例えば、精原幹細胞）を生ずる能力を有することを意味する、分化単一性に分類される。

20

【0028】

分化は、特殊化されていない（「分化決定していない」）又は比較的特殊化されていない細胞が、例えば、神経細胞又は筋細胞などの特殊された細胞の特徴を獲得するプロセスである。分化細胞又は分化を誘導された細胞は、細胞系内でより特殊化された（「分化決定した」）立場を選んだ細胞である。用語「分化決定した」は、分化プロセスに適用されるとき、通常的环境下で特定の細胞型又は細胞型の小集合に分化し続ける地点まで分化経路において進行してしまっており、通常的环境下で異なる細胞型に分化することができないか、又は低分化細胞型に戻ることができない細胞を指す。脱分化は、細胞が細胞系統内でさほど特殊化されて（又は分化決定した）いない立場に戻るプロセスを指す。本明細書で使用されるとき、細胞系統は、細胞の遺伝、すなわちその細胞がどの細胞から来たか、またどの細胞を生じ得るかを規定する。ある細胞系は、その細胞を発生及び分化の遺伝スキーム内に位置付ける。系統特異的マーカーは、対象とする系統の細胞の表現型と特異的に関連した特徴を指し、分化決定されていない細胞の、対象とする系統への分化を評価するために使用することができる。

30

【0029】

本明細書で使用するとき、「胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞」、又は「段階１細胞」、又は「段階１」は、以下のマーカー：SOX-17、GATA4、HNF-3、GSC、CER1、Nodal、FGF8、Brachyury、Mix様ホメオボックスタンパク質、FGF4、CD48、eomesodermin（EOMES）、DKK4、FGF17、GATA6、CXCR4、C-Kit、CD99又はOTX2のうちの少なくとも1つを発現している細胞を指す。胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞としては、原始線条前駆体細胞、原始線条細胞、中内胚葉細胞及び胚体内胚葉細胞が挙げられる。

40

【0030】

本明細書で使用するとき、「膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞」は、以下のマーカー：PDX1、HNF-1、PTF1、HNF6、又はHB9のうちの少なくとも1つを発現している細胞を指す。膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞としては、膵臓内胚葉細胞、原腸管細胞、後部前腸細胞が挙げられる。

【0031】

本明細書で使用するとき、「膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞」は、

50

以下のマーカー、すなわち、NEUROD、ISL1、PDX1、NKX6.1、MAFB、インスリン、グルカゴン又はソマトスタチンのうちの少なくとも1つを発現している細胞を指す。膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞としては、膵臓内分泌細胞、膵臓ホルモン発現細胞、及び膵臓ホルモン分泌細胞、並びに - 細胞系の細胞を含む。

【0032】

本明細書で使用する時、「胚体内胚葉」は、原腸形成中、胚盤葉上層から生じ、胃腸管及びその誘導体を形成する細胞の特徴を保持する細胞を指す。胚体内胚葉細胞は、以下のマーカー：HNF3、GATA4、SOX17、Cerberus、OTX2、gooseoid、C-Kit、CD99、及びMIXL1を発現する。

10

【0033】

本明細書で言うところの「マーカー」は、対象とする細胞で差別的に発現される核酸又はポリペプチド分子である。この文脈において、差別的な発現は、陽性マーカーのレベルの増大及び陰性マーカーのレベルの減少を意味する。マーカー核酸又はポリペプチドの検出可能なレベルは、他の細胞と比較して対象とする細胞において十分に高いか又は低いことから、当該技術分野において知られる各種の方法のいずれを用いても対象とする細胞を他の細胞から同定及び区別可能である。

【0034】

本明細書で使用する時、「膵内分泌細胞」又は「膵臓ホルモン発現細胞」は、以下のホルモン：インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドのうちの少なくとも1つを発現することができる細胞を指す。

20

【0035】

本明細書で使用する時、「膵内分泌前駆細胞」は、NGN3を発現し、かつ内分泌系の細胞（限定するものではないが膵島ホルモン発現細胞が挙げられる）へと更に分化し得る胚体内胚葉系の多能性細胞を指す。内分泌前駆細胞は、PDX1陽性膵臓内胚葉細胞などの低分化の胚体内胚葉系細胞と比較して、多くの異なる細胞、組織及び/又は器官型へと分化することはできない。

【0036】

本明細書で使用する時、「膵臓ホルモン産生細胞」は、以下のホルモン：インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドのうちの少なくとも1つを産生することができる細胞を指す。

30

【0037】

本明細書で言うところの「膵臓ホルモン分泌細胞」は、以下のホルモン：インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドの内の少なくとも1つを分泌することが可能な細胞を指す。

【0038】

多能性幹細胞の単離、増殖及び培養

多能性幹細胞の特徴付け

多能性幹細胞は、段階特異的胚抗原（SSEA）3及び4、並びにTra-1-60及びTra-1-81と呼ばれる抗体によって検出可能なマーカーのうちの1つ以上を発現する（Thomsonら、Science 282:1145, 1998）。インビトロで多能性幹細胞を分化させると、SSEA-4、Tra-1-60、及びTra-1-81の発現が消失し（存在する場合）、SSEA-1の発現が増大する。未分化多能性幹細胞は、典型的には、アルカリホスファターゼ活性を有し、製造業者（Vector Laboratories, Burlingame, Calif.）により説明されるように、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、基質としてVector Redを使用して展開することにより検出可能である。未分化の多能性幹細胞は、典型的には、RT-PCRによって検出されるOct-4及びTERTも発現する。

40

【0039】

増殖させた多能性幹細胞の別の望ましい表現型は、3つの胚葉の全て、すなわち、内胚

50

葉、中胚葉、及び外胚葉組織の細胞に分化する能性である。多能性幹細胞の多能性は、例えば細胞を重症複合型免疫不全症（SCID）マウスに注入し、4%パラホルムアルデヒドを使用して、形成された奇形腫を固定した後、次いでそれらを3つの胚葉からの細胞型の痕跡に関して組織学的に検査することにより確認することができる。あるいは、多能性は、胚様体を形成し、この胚様体を3つの胚葉に関連したマーカーの存在に関して評価することにより決定され得る。

【0040】

増殖させた多能性幹細胞株は、標準的なGバンド法を使用し、対応する霊長類種の発表されている核型と比較することで、核型決定され得る。細胞は「正常な核型」を有することが望ましく、「正常な核型」とは、細胞が正倍数体であり、ヒト染色体が全て揃っておりかつ目立った変質のないことを意味する。

10

【0041】

多能性幹細胞の供給源

使用してもよい多能性幹細胞の種類としては、妊娠期間中の任意の時期（必須ではないが、典型的には妊娠約10～12週よりも前）に採取した前胚性組織（例えば胚盤胞など）、胚性組織、又は胎児組織を含む、妊娠後に形成される組織に由来する多能性細胞の株化細胞系が挙げられる。非限定的な例は、例えばヒト胚性幹細胞株H1、H7及びH9（WiCell）などのヒト胚性幹細胞又はヒト胚生殖細胞の株化細胞系である。また、こうした細胞の初期の株化又は安定化の際に本開示の組成物を使用することも考えられるが、その場合には、供給源となる細胞は供給源の組織から直接採取される1次多能性細胞である。フィーダー細胞の不在下で既に培養された多能性幹細胞集団から採取した細胞も好適である。例えば、BG01v（BresaGen, Athens, GA）などの変異型ヒト胚幹細胞株も好適である。

20

【0042】

一実施形態では、ヒト胚幹細胞は、Thomsonら（米国特許第5,843,780号、Science 282:1145, 1998、Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844, 1995）に記載されているように調製される。

【0043】

多能性幹細胞の培養

一実施形態では、多能性幹細胞は、典型的には、多能性幹細胞を様々な方法で支持する、フィーダー細胞の層上で培養される。あるいは、多能性幹細胞は、本質的にフィーダー細胞を含まないが、それにも拘わらず、実質的な分化を受けないで多能性幹細胞の増殖を支持する培養系中で培養される。無フィーダー培養液中での多能性幹細胞の無分化での増殖は、別の細胞型で以前に培養することによって馴化された培地を使用して支持される。あるいは、無フィーダー培養液中での多能性幹細胞の無分化での増殖は、合成培地を使用して支持される。

30

【0044】

例えば、Reubinoffら（Nature Biotechnology 18:399～404（2000））及びThompsonら（Science 6 November 1998:vol. 282, no. 5391, pp. 1145～1147）は、マウス胚性線維芽細胞のフィーダー細胞層を用いたヒト胚盤胞からの多能性幹細胞株の培養について開示している。

40

【0045】

Richardsら（Stem Cells 21:546～556, 2003）は、11種類の異なるヒト成人、胎児、及び新生児フィーダー細胞層についてヒト多能性幹細胞の培養を支持する能力の評価を行っている。Richardsらは、「成人の皮膚線維芽フィーダー細胞上で培養したヒト胚性幹細胞系は、ヒト胚性幹細胞の形態を有し、多能性を維持する」と述べている。

【0046】

50

米国特許出願公開第20020072117号は、無フィーダー培養液中で霊長類多能性幹細胞の増殖を支持する培地を生成する細胞株を開示している。使用される細胞株は、胚組織から得た又は胚幹細胞から分化した間葉系細胞株、及び繊維芽細胞様細胞株である。米国特許出願公開第20020072117号は、また、一次フィーダー細胞層としての細胞株の使用も開示している。

【0047】

別の例で、Wangら(Stem Cells 23:1221~1227, 2005)は、ヒト胚性幹細胞由来のフィーダー細胞層上でのヒト多能性幹細胞の長期間増殖のための方法を開示している。

【0048】

別の例で、Stojkovicら(Stem Cells 2005 23:306~314, 2005)は、ヒト胚性幹細胞の自発的分化に由来するフィーダー細胞システムを開示している。

【0049】

更なる例で、Miyamotoら(Stem Cells 22:433~440, 2004)は、ヒト胎盤から得たフィーダー細胞源を開示している。

【0050】

Amitら(Biol. Reprod 68:2150~2156, 2003年)は、ヒト包皮に由来するフィーダー細胞層を開示している。

【0051】

別の例で、Inzunzaら(Stem Cells 23:544~549, 2005)は、ヒト出生後包皮線維芽細胞からのフィーダー細胞層を開示している。

【0052】

米国特許第6642048号は、無フィーダー培養液中で、霊長類多能性幹(pPS)細胞の増殖を支持する培地、及びそのような培地の作製に有用な細胞を開示している。米国特許第6642048号は、「本発明は、胚性組織から得られるか、あるいは胚性幹細胞から分化した間葉系及び線維芽細胞様の細胞系を含む。本開示では、こうした細胞系を誘導し、培地を調整し、この馴化培地を用いて幹細胞を増殖させるための方法を説明及び図示する」と述べている。

【0053】

別の例で、国際特許出願公開第WO2005014799号は、哺乳動物細胞の維持、増殖及び分化のための馴化培地を開示している。国際公開第2005014799号は、「本発明に従って作製される培地は、マウス細胞、特にMMH(Metマウス肝細胞)と呼ばれる分化かつ不死化したトランスジェニック肝細胞の細胞分泌活性によって馴化される」と述べている。

【0054】

別の例で、Xuら(Stem Cells 22:972~980, 2004)は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素を過剰発現するように遺伝子改変されたヒト胚性幹細胞由来細胞誘導體から得られた馴化培地を開示している。

【0055】

別の例で、米国特許出願公開第20070010011号は、多能性幹細胞を維持するための合成培地を開示している。

【0056】

代替的な培養システムは、胚幹細胞の増殖を促進することができる増殖因子で補足された無血清培地を使用する。例えば、Cheonら(BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870, 2005年10月19日)は、無フィーダー、無血清培養システムを開示し、ここで胚幹細胞は、胚幹細胞の自己複製を誘発することができる異なる増殖因子で補足された非血清代替(SR)培地中で維持される。

【0057】

10

20

30

40

50

別の例で、Levensteinら (Stem Cells 24:568~574、2006) は、繊維芽細胞又は馴化培地の不在下で、bFGFで補足された培地を使用して、胚幹細胞を長期間培養する方法を開示している。

【0058】

別の例で、米国特許出願公開第20050148070号は、血清及び繊維芽細胞フィーダー細胞を含まない合成培地中でのヒト胚性幹細胞の培養方法であって、この方法が、アルブミン、アミノ酸、ビタミン、ミネラル、少なくとも1つのトランスフェリン又はトランスフェリン代用物質、少なくとも1つのインスリン又はインスリン代用物質を含有する培地中で幹細胞を培養する工程を含み、この培地が、哺乳動物胎児血清を本質的に含有せず、繊維芽細胞フィーダー層以外の供給源からも供給され、繊維芽細胞増殖因子シグナル伝達受容体を活性化することが可能な少なくとも約100ng/mLの繊維芽細胞増殖因子を含有し、この培地がフィーダー細胞又は馴化培地なしで未分化状態の幹細胞の増殖を支持するものを開示している。

10

【0059】

別の例で、米国特許出願公開第20050233446号は、未分化の霊長類始原幹細胞を含む幹細胞の培養に有用な合成培地を開示している。溶液中で培地は、培養されている幹細胞と比較して実質的に等張である。所定の培養において、特定の培地は、基本培地、並びに実質的に未分化の始原幹細胞の増殖の支持に必要な、ある量のbFGF、インスリン、及びアスコルビン酸の各々を含有する。

【0060】

20

別の例で、米国特許第6800480号は、「一実施形態で、霊長類由来の始原幹細胞の増殖を支持するうえで有効な低浸透圧、低内毒素の基本培地を含む、実質的に未分化状態の霊長類由来の始原幹細胞を増殖させるための細胞培地が提供される。この基本培地は、霊長類由来の始原幹細胞の増殖を支持するうえで有効な栄養血清、並びにフィーダー細胞及びフィーダー細胞由来の細胞外マトリクス成分からなる群より選択される基質と組み合わせられる。培地は、非必須アミノ酸、抗酸化剤、並びにヌクレオシド及びビルビン酸塩からなる群から選択される第1の増殖因子を更に含む」と述べている。

【0061】

別の例で、米国特許出願公開第20050244962号は、「一態様で本発明は、霊長類の胚性幹細胞を培養する方法を提供する。基本的に哺乳動物胎児血清を含まない(基本的にいかなる動物血清も含まないことが好ましい)培養液中で、繊維芽細胞フィーダー層以外の供給源から供給された繊維芽細胞増殖因子の存在下で幹細胞を培養する。好ましい形態では、十分な量の繊維芽細胞増殖因子を添加することによって、幹細胞の培養を維持するために従来必要とされていた繊維芽細胞フィーダー層の必要性がなくなる」と述べている。

30

【0062】

更なる例で、国際公開第2005065354号は、フィーダー及び血清を本質的に含まない合成等張培地であって、この培地が、a.基本培地、b.実質的に未分化の哺乳類幹細胞の増殖を支持するのに十分な量のbFGF、c.実質的に未分化の哺乳類幹細胞の増殖を支持するのに十分な量のインスリン、d.実質的に未分化の哺乳類幹細胞の増殖を支持するのに十分な量のアスコルビン酸を含む合成等張培地を開示している。

40

【0063】

別の例で、国際公開第2005086845号は、未分化の幹細胞を維持するための方法であって、この方法が、幹細胞をトランスフォーミング増殖因子(TGF-)族タンパク質の構成員、繊維芽細胞増殖因子(FGF)族タンパク質の構成員、又はニコチンアミド(NIC)に、所望の結果を得るのに十分な時間細胞を未分化な状態に維持するのに十分な量で、曝露することを含む、方法を開示している。

【0064】

多能性幹細胞を、好適な培養基質上に播いてもよい。一実施形態で、好適な培養基質は、例えば基底膜から誘導されたもの、又は接着分子受容体-リガンド結合の一部を形成し

50

得るもの等の細胞外マトリクス成分である。一実施形態で、好適な培養基材は、M A T R I G E L (登録商標) (Becton Dickinson) である。M A T R I G E L (登録商標) は、Engelbreth-Holm Swarm 腫瘍細胞からの可溶性製剤であり、室温でゲル化して再構成基底膜を形成する。

【0065】

他の細胞外マトリクス成分及び成分混合物は代替物として好適である。増殖させる細胞型に応じて、これは、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、エンタクチン、ヘパラン硫酸、及び同様物を、単独で又は様々な組み合わせで含んでもよい。

【0066】

多能性幹細胞を、細胞の生存、増殖、及び所望の特徴の維持を促進する培地の存在下、及び好適な分布で基質上に播いてもよい。この特徴の全部は、播種分布に細心の注意を払うことによりメリットが得られるものであり、当業者ならば容易に決定することができる。

10

【0067】

好適な培地を、以下の成分、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M)、G i b c o # 1 1 9 6 5 - 0 9 2 ; ノックアウトダルベッコ改変イーグル培地 (K O D M E M)、G i b c o # 1 0 8 2 9 - 0 1 8 ; ハム F 1 2 / 5 0 % D M E M 基本培地 ; 2 0 0 m M L - グルタミン、G i b c o # 1 5 0 3 9 - 0 2 7 ; 非必須アミノ酸溶液、G i b c o # 1 1 1 4 0 - 0 5 0 ; -メルカプトエタノール、S i g m a # M 7 5 2 2 ; ヒト組み換え塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F)、G i b c o # 1 3 2 5 6 - 0 2 9 等から調製することもできる。

20

【0068】

膵内分泌前駆細胞の形成

一実施形態では、本発明は、膵内分泌前駆細胞を産生する方法であって：

- a . 多能性幹細胞を培養する工程、
- b . 多能性幹細胞を、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化させる工程、
- c . 胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞を、膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化させる工程、
- d . 胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を、膵内分泌前駆細胞へと分化させる工程を含む方法を提供する。

30

【0069】

本発明で用いるのに好適な多能性幹細胞としては、例えば、ヒト胚性幹細胞株 H 9 (N I Hコード : W A 0 9)、ヒト胚性幹細胞株 H 1 (N I Hコード : W A 0 1)、ヒト胚性幹細胞株 H 7 (N I Hコード : W A 0 7)、及びヒト胚性幹細胞株 S A 0 0 2 (C e l l a r t i s, S w e d e n) が挙げられる。多能性細胞に特徴的な以下のマ - カ - : A B C G 2、C R I P T O、C D 9、F O X D 3、コネキシン 4 3、コネキシン 4 5、O C T 4、S O X 2、N a n o g、h T E R T、U T F - 1、Z F P 4 2、S S E A - 3、S S E A - 4、T r a 1 - 6 0 又は T r a 1 - 8 1 のうちの少なくとも 1 つを発現する細胞も本発明での使用に適している。

40

【0070】

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーは、S O X 1 7、G A T A 4、H N F 3、G S C、C E R 1、N o d a l、F G F 8、短尾奇形、M i x - 様ホメオボックスタンパク質、F G F 4、C D 4 8、エオメソダーミン (E O M E S)、D K K 4、F G F 1 7、G A T A 6、C X C R 4、C - K i t、C D 9 9、及び O T X 2 からなる群から選択される。胚体内胚葉系に特徴的なマーカーのうちの少なくとも 1 つを発現している細胞は本発明での使用に好適である。本発明の一態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、原始線条前駆細胞である。別の態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、中内胚葉細胞である。別の態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、胚体内胚葉細胞である。

50

【0071】

膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーは、PDX1、HNF1、HNF6、HB9及びPROX1からなる群から選択される。膵内胚葉系に特徴的なこれらのマーカーのうちの少なくとも1つを発現する細胞が本発明における使用に適している。本発明の一態様では、膵内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、膵内胚葉細胞である。

【0072】

膵内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーは、NGN3、NKX6.1、NeuroD、ISL1、PDX1、PAX4、NKX2.2、又はARXからなる群から選択される。本発明で使用するのに好適な細胞は、膵内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーを少なくとも1つ発現している細胞である。

10

【0073】

胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成

多能性幹細胞は、当該技術分野における任意の方法、又は本発明で提案される任意の方法により、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化され得る。

【0074】

例えば、多能性幹細胞は、ダムール(D'Amour)らにより開示される方法に従って胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化させることができる(D'Amourら, Nature Biotechnology 23, 1534~1541(2005))。

【0075】

例えば、多能性幹細胞は、ShinozakiらDevelopment 131, 1651~1662(2004)に開示されている方法に従って、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞に分化され得る。

20

【0076】

例えば、多能性幹細胞は、McLeanら, Stem Cells 25, 29~38(2007)に開示されている方法に従って、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞に分化され得る。

【0077】

例えば、多能性幹細胞は、ダムール(D'Amour)らにより開示される方法に従って胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化させることができる(D'Amourら, Nature Biotechnology 24, 1392~1401(2006))。

30

【0078】

例えば、多能性幹細胞は、多能性幹細胞を、血清の不在下、アクチビンAを含有する培地中で培養し、次いで細胞をアクチビンA及び血清と共に培養し、次いで細胞を異なる濃度のアクチビンA及び血清と共に培養することにより、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化され得る。この方法の例は、Nature Biotechnology 23, 1534~1541(2005)に開示されている。

【0079】

例えば、多能性幹細胞は、多能性幹細胞を、血清の不在下、アクチビンAを含有する培地中で培養し、次に細胞を、別の濃度の、血清を含むアクチビンAと共に培養することにより、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化され得る。この方法の例は、D'AmourらによるNature Biotechnology, 2005に開示されている。

40

【0080】

例えば、多能性幹細胞は、多能性幹細胞を、血清の不在下、アクチビンA及びWntリガンドを含有する培地中で培養し、次にWntリガンドを除去し、細胞を血清を含むアクチビンAと共に培養することにより、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化され得る。この方法の例は、Nature Biotechnology 24, 1392~1401(2006)に開示されている。

50

【0081】

例えば、多能性幹細胞は、LifeScan, Inc. に譲渡された米国特許出願第 1 / 736, 908 号に開示される方法に従って、多能性幹細胞を処理することによって、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。

【0082】

例えば、多能性幹細胞は、LifeScan, Inc. に譲渡された米国特許出願第 1 / 779, 311 号に開示される方法に従って、多能性幹細胞を処理することによって、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。

【0083】

例えば、多能性幹細胞は、米国特許出願第 60 / 990, 529 号に開示される方法に従って、多能性幹細胞を処理することによって、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。

10

【0084】

例えば、多能性幹細胞は、米国特許出願第 61 / 076, 889 号に開示される方法に従って、多能性幹細胞を処理することによって、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。

【0085】

例えば、多能性幹細胞は、米国特許出願第 61 / 076, 900 号に開示される方法に従って、多能性幹細胞を処理することによって、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。

20

【0086】

例えば、多能性幹細胞は、米国特許出願第 61 / 076, 908 号に開示される方法に従って、多能性幹細胞を処理することによって、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。

【0087】

例えば、多能性幹細胞は、米国特許出願第 61 / 076, 915 号に開示される方法に従って、多能性幹細胞を処理することによって、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。

【0088】

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞のキャラクタリゼーション

30

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成は、以下の特定のプロトコルの前後に、マーカーの存在に関して試験することにより判定することができる。多能性幹細胞は、典型的には、そのようなマーカーを発現しない。したがって、多能性細胞の分化は、細胞がそれらの発現を開始した際に検出される。

【0089】

分化の効率は、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤（例えば、抗体等）に、処理した細胞集団を暴露することにより測定され得る。

【0090】

培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカーの発現を評価する方法は、当該技術分野における標準である。これらの方法としては、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ノーザンブロット、インシチュハイブリダイゼーション（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編集, 2001増刊号 (supplement)) 参照)、並びにイムノアッセイ、例えば切片材料の免疫組織化学的分析、ウェスタンブロッティング、及び完全細胞で利用できるマーカーについてのフローサイトメトリー分析（FACS）（例えば、Harlow及びLane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998) 参照）が挙げられる。

40

【0091】

50

多能性幹細胞の特徴は当業者に周知であり、多能性幹細胞の更なる特徴は、継続して同定され続けている。多能性幹細胞のマーカーとして、例えば、以下のもの：A B C G 2、c r i p t o、F O X D 3、C O N N E X I N 4 3、C O N N E X I N 4 5、O C T 4、S O X 2、N a n o g、h T E R T、U T F 1、Z F P 4 2、S S E A - 3、S S E A - 4、T r a 1 - 6 0、T r a 1 - 8 1の1つ以上の発現が挙げられる。

【0092】

多能性幹細胞を本発明の方法で処理した後、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞により発現される、例えばC X C R 4等のタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤（例えば、抗体等）に処理した細胞集団を暴露することにより、分化した細胞を精製することができる。

10

【0093】

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞から膀胱内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成

胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、当該技術分野の任意の方法、又は本発明で提案する任意の方法により、膀胱内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞に分化され得る。

【0094】

例えば、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、D ' A m o u r s、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 4 , 1 3 9 2 ~ 1 4 0 1 (2 0 0 6) に開示されている方法に従って、膀胱内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化することができる。

20

【0095】

例えば、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤K A A D - シクロパミンで処理した後、繊維芽細胞増殖因子及びK A A D - シクロパミンを含有する培地を除去し、続いて細胞をレチノイン酸、繊維芽細胞増殖因子及びK A A D - シクロパミンを含有する培地中で培養することにより、膀胱内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に更に分化される。この方法の例は、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 4 , 1 3 9 2 ~ 1 4 0 1 (2 0 0 6) に開示されている。

30

【0096】

本発明の一態様では、L i f e S c a n , I n c . に譲渡された米国特許出願第11 / 7 3 6 , 9 0 8 号に従って、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞をレチノイン酸及び少なくとも1種類の線維芽細胞増殖因子で所定の時間処理することによって、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞を膀胱内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に更に分化させる。

【0097】

本発明の一態様では、L i f e S c a n , I n c . に譲渡された米国特許出願第11 / 7 7 9 , 3 1 1 号に従って、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞をレチノイン酸及び少なくとも1種類の線維芽細胞増殖因子で所定の時間処理することによって、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞を膀胱内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に更に分化させる。

40

【0098】

本発明の1つの態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を米国特許出願第60 / 9 9 0 , 5 2 9 号に記載の方法に従って処理することにより、膀胱内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を更に分化させる。

【0099】

膀胱内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞のキャラクタリゼーション

膀胱内胚葉系統に特徴的なマーカーは、当業者に周知であり、膀胱内胚葉系統の特徴を

50

示す追加のマーカ―が、継続して同定されている。これらのマーカ―を、本発明に従って処理された細胞が分化して膵臓内胚葉系統の特徴を示す性質を獲得したことを確認するために使用することができる。膵臓内胚葉系に特異的なマーカ―としては、例えば、HLXB9、PTF-1、PDX1、HNF6、HNF-1などの転写因子の1つ以上のものの発現が挙げられる。

【0100】

分化の効率は、膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカ―を発現している細胞により発現されたタンパク質マーカ―を特異的に認識する薬剤（例えば、抗体等）に、処理した細胞集団を暴露することにより測定することができる。

【0101】

培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカ―の発現を評価する方法は、当該技術分野における標準である。これらには、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ノーザンブロット、インシチュハイブリダイゼーション（例えば、Current Protocols in Molecular Biology（Ausubelら編集，2001増刊号（supplement）参照）、並びにイムノアッセイ、例えば切片材料の免疫組織化学的分析、ウェスタンブロットティング、及び完全細胞で利用できるマーカ―についてのフローサイトメトリー分析（FACS）（例えば、Harlow及びLane，Using Antibodies：A Laboratory Manual，New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press（1998）参照）が挙げられる。

【0102】

膵内分泌系に特徴的なマーカ―を発現する細胞からの膵内分泌前駆細胞の形成

本発明の一態様では、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカ―を発現している細胞は、BMP阻害能を持つ因子及びTGF-受容体Iキナーゼ阻害剤を添加した培地で膵臓内胚葉系に特徴的なマーカ―を発現している細胞を培養することにより、膵内分泌前駆細胞に分化される。

【0103】

一実施形態では、BMP阻害能を持つ因子はノギンである。ノギンは、約100pg/mL～約500µg/mLの濃度で使用することができる。一実施形態では、ノギンは100ng/mLの濃度で使用される。

【0104】

一実施形態では、TGF-受容体Iキナーゼ阻害剤は、ALK5阻害剤II（Calbiochem，Ca）である。ALK5阻害剤IIを約0.1µM～約10µMの濃度で使用してもよい。一実施形態では、ALK5阻害剤IIは濃度1µMで使用される。

【0105】

一実施形態では、培地は4500mg/Lのグルコースと1%のB27を含有しているDMEMである。

【0106】

一実施形態では、細胞は培地で4日間にわたって培養される。

【0107】

分化効率は、被処理細胞集団を、膵内分泌前駆細胞により発現されたタンパク質マーカ―を特異的に認識する剤（例えば抗体）に曝露することにより決定することができる。

【0108】

培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカ―の発現を評価する方法は、当該技術分野における標準である。これら方法としては、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ノーザンブロット、インシチュハイブリダイゼーション（例えば、Current Protocols in Molecular Biology（Ausubelら編集，2001増刊号（supplement）参照）、並びにイムノアッセイ、例えば切片材料の免疫組織化学的分析、ウェスタンブロットティング、及び完全細胞で利用できるマーカ―についてのフローサイトメトリー分析（FACS）（例えば、Har

10

20

30

40

50

low及びLane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998) 参照) が挙げられる。

【0109】

多能性幹細胞の特徴は当業者に周知であり、多能性幹細胞の更なる特徴は、継続して同定されている。多能性幹細胞のマーカーとして、例えば、以下のもの：ABC G2、cripto、FOX D3、CONNEXIN 43、CONNEXIN 45、OCT 4、SOX 2、Nanog、hTERT、UTF 1、ZFP 42、SSEA - 3、SSEA - 4、Tra 1 - 60、Tra 1 - 81の1つ以上の発現が挙げられる。

【0110】

多能性幹細胞を本発明の方法で処理した後、処理した細胞集団を、臍内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞により発現されるタンパク質マーカー（例えばCXCR 4など）を特異的に認識する薬剤（抗体など）に曝露することにより、分化した細胞を精製することができる。

【0111】

臍内胚葉系に特徴的なマーカーは、PDX 1、HNF - 1、PTF 1、HNF 6、HB 9及びPROX 1からなる群から選択される。臍内胚葉系に特徴的なこれらのマーカーのうち少なくとも1つを発現する細胞が本発明における使用に適している。本発明の一態様では、臍内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、臍内胚葉細胞である。

【0112】

臍内分泌前駆細胞に特徴的なマーカーは、NGN 3、NKX 6 . 1、NEUROD、ISL 1、PDX 1、PAX 4、NKX 2 . 2、PAX 6又はARXからなる群から選択される。

【0113】

臍内分泌前駆細胞からの臍内分泌系に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成
一実施形態では、本発明の方法により産生した臍内分泌前駆細胞を、臍内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させてもよい。

【0114】

臍内分泌前駆細胞は、当該技術分野の任意の方法、又は本発明で提案する任意の方法により、臍内分泌系に特徴的なマーカーを発現する細胞へと分化させることができる。

【0115】

例えば、本発明の方法に従って得られる、臍内分泌前駆細胞を、エキセンディン 4 を含有している培地で臍内分泌前駆細胞を培養し、次にエキセンディン 4 を含有している培地を除去し、エキセンディン 1、IGF - 1 及びHGFを含有している培地で培養することにより、臍内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させる。この方法の例は、D'AmourらのNature Biotechnology, 2006に開示されている。

【0116】

例えば、本発明の方法に従って得られる臍内分泌前駆細胞を、DAPT (Sigma - Aldrich, MO) 及びエキセンディン 4 を含有している培地で臍内分泌前駆細胞を培養することにより、臍内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させる。この方法の例は、D'AmourらのNature Biotechnology, 2006に開示されている。

【0117】

例えば、本発明の方法に従って得られる臍内分泌前駆細胞を、エキセンディン 4 を含有している培地で臍内分泌前駆細胞を培養することにより、臍内分泌系に特徴的なマーカーを発現する細胞へと更に分化させる。この方法の例は、D'AmourらのNature Biotechnology, 2006に開示されている。

【0118】

10

20

30

40

50

例えば、本発明の方法に従って得られる膵内分泌前駆細胞を、米国特許出願第11/736,908号(LifeScan, Inc.に譲渡)に開示された方法に従って、Notchシグナル経路を阻害する因子で膵内分泌前駆細胞を処理することにより、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させる。

【0119】

例えば、本発明の方法に従って得られる膵内分泌前駆細胞を、米国特許出願第11/779,311号(LifeScan, Inc.に譲渡)に開示された方法に従って、Notchシグナル経路を阻害する因子で膵内分泌前駆細胞を処理することにより、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させる。

【0120】

例えば、本発明の方法に従って得られる膵内分泌前駆細胞を、米国特許出願第60/953,178号(LifeScan, Inc.に譲渡)に開示された方法に従って、Notchシグナル経路を阻害する因子で膵内分泌前駆細胞を処理することにより、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させる。

【0121】

例えば、本発明の方法に従って得られる膵内分泌前駆細胞を、米国特許出願第60/990,529号(LifeScan, Inc.に譲渡)に開示された方法に従って、Notchシグナル経路を阻害する因子で膵内分泌前駆細胞を処理することにより、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させる。

【0122】

膵内分泌系に特徴的なマーカーは、NEUROD、ISL1、PDX1、NKX6.1、PAX4、PAX6、NGN3及びNKX2.2からなる群から選択される。一実施形態では、膵内分泌細胞は、以下のホルモン：インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドのうち少なくとも1つを発現することができる。本発明で使用するに好適なものは、膵内分泌系の特徴を示すマーカーを少なくとも1つ発現する細胞である。本発明の一態様において、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現する細胞は、膵内分泌細胞である。膵内分泌細胞は、膵臓ホルモン発現細胞であってよい。また、膵内分泌細胞は膵臓ホルモン分泌細胞であってよい。

【0123】

本発明の一態様では、膵内分泌細胞は、細胞系に特徴的なマーカーを発現する細胞である。細胞系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、PDX1、並びに以下の転写因子：NGN3、NKX2.2、NKX6.1、NEUROD、ISL1、HNF3、MAFA、PAX4、及びPAX6のうち少なくとも1つを発現する。本発明の一態様では、細胞系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、細胞である。

【0124】

治療

一態様では、本発明は、I型糖尿病に罹患しているかあるいはI型糖尿病を発症するリスクを有する患者を治療する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、多能性幹細胞を培養すること、多能性幹細胞をインビトロで細胞系に分化させること、及び細胞系の細胞を患者に移植することを包含する。代替的な実施形態では、本方法は、多能性幹細胞を培養すること、多能性幹細胞をインビトロで膵内分泌前駆細胞に分化させること、及び膵内分泌前駆細胞を患者に移植することを包含する。

【0125】

更に別の態様では、本発明は、II型糖尿病に罹患しているかあるいはII型糖尿病を発症するリスクを有する患者を治療する方法を提供する。一実施形態では、本方法は、多能性幹細胞を培養すること、多能性幹細胞をインビトロで細胞系に分化させること、及び細胞系の細胞を患者に移植することを包含する。代替的な実施形態では、本方法は、多能性幹細胞を培養すること、多能性幹細胞をインビトロで膵内分泌前駆細胞に分化させること、及び膵内分泌前駆細胞を患者に移植することを包含する。

【0126】

10

20

30

40

50

適切であるならば、患者を、移植した細胞の生存及び機能を亢進する医薬品又は生理活性物質により更に治療してもよい。それらの薬剤は、例えば特に、インスリン、TGF-1、2、及び3を含むTGF-族の構成員、骨形成タンパク質(BMP-2、-3、-4、-5、-6、-7、-11、-12、及び-13)、繊維芽細胞増殖因子-1及び-2、血小板由来増殖因子-AA及び-BB、多血小板血漿、インスリン増殖因子(IGF-I、II)、増殖分化因子(GDF-5、-6、-7、-8、-10、-15)、血管内皮由来増殖因子(VEGF)、プレオトロフィン、エンドセリンを含んでもよい。他の医薬化合物としては、例えば、ニコチンアミド、グルカゴン様ペプチド-I(GLP-1)及びII、GLP-1及び2模倣体、エキセンディン-4、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン、例えば米国特許出願公開第2004/0209901号及び同第2004/0132729号に開示される化合物のようなMAPK阻害剤などが挙げられる。

10

【0127】

多能性幹細胞を、レシピエントに移植する前にインスリン産生細胞に分化させてもよい。特別な実施形態では、多能性幹細胞を、レシピエントに移植する前に細胞へと完全に分化させる。あるいは多能性幹細胞は、未分化又は一部が分化した状態でレシピエントに移植してもよい。更なる分化をレシピエント内で行ってもよい。

【0128】

胚体内胚葉細胞、又はあるいは臍臓内胚葉細胞、又はあるいは細胞を、分散された細胞として埋め込んでもよく、又は肝門静脈内に注入され得るクラスターとして形成してもよい。あるいは、細胞を、生体適合性の分解性ポリマー支持体、多孔性の非分解性デバイス内に提供してもよく、又は宿主免疫応答から保護されるよう封入してもよい。埋め込み部位としては、例えば肝臓、天然の臍臓、腎被膜下空間、網、腹膜、漿膜下空間、腸、胃、又は皮下ポケットが挙げられる。

20

【0129】

埋め込まれた細胞の更なる分化、生存又は活性を向上するために、増殖因子、抗酸化剤又は抗炎症剤などの追加の因子を、細胞の投与前に、投与と同時に、又は投与後に投与してもよい。しかるべき実施形態で、増殖因子を、投与された細胞をインビボで分化させるように使用する。これらの因子を、内在性細胞により分泌し、投与された細胞にその場で(in situ)で曝露してもよい。埋め込まれた細胞には、当該技術分野で既知の内因性及び外因性の増殖因子の任意の組み合わせにより、分化を誘発させることもできる。

30

【0130】

埋め込みに使用する細胞の量は、患者の状態及び治療に対する応答を含む、多数のさまざまな要因に基き、当業者により決定され得る。

【0131】

一態様では、本発明は糖尿病に罹患しているかあるいは糖尿病を発症するリスクを有する患者を治療する方法を提供する。本方法は、多能性幹細胞を培養し、培養した細胞をインビトロで細胞系に分化させ、この細胞を3次元支持体に埋め込むことを含む。細胞を、患者に埋め込む前に、この支持体上にインビトロで維持してもよい。あるいは細胞を含む支持体を、インビトロで更に培養することなく直接患者に埋め込んでもよい。支持体は、場合により、埋め込まれた細胞の生存及び機能を亢進する少なくとも1つの医薬品を組み込んでもよい。

40

【0132】

本発明の目的のために使用するのに好適な支持体材料には、組織修復に有用な組織鋳型、導管、バリア及びリザーバが挙げられる。より詳細には、発泡体、スポンジ、ゲル、ヒドロゲル、織物、及び不織構造の形態を有する合成及び天然材料であって、インビトロ及びインビボで使用されて、生物組織を再構築又は再生し、また走化性薬剤を送達して組織増殖を誘発する材料が、本発明の方法の実施における使用に適切である。例えば、米国特許第5,770,417号、同第6,022,743号、同第5,567,612号、同第5,759,830号、同第6,626,950号、同第6,534,084号、同第6,306,424号、同第6,365,149号、同第6,599,323号、同第6

50

、656、488号、米国特許出願公開第2004/0062753(A1)号、米国特許第4、557、264号及び同第6、333、029号に開示されている材料を参照されたい。

【0133】

医薬品が組み込まれた支持体を形成するために、支持体を形成するのに先立ち、薬剤をポリマー溶液と混合することもできる。あるいは加工された支持体上に、医薬品を好ましくは医薬担体の存在下で被覆してもよい。医薬品は、液体、超微粒子状固体、又は任意の他の適切な物理的形態として存在し得る。あるいは医薬品の放出速度を変更するために、支持体に賦形剤を加えてもよい。別の実施形態では、抗炎症性化合物である少なくとも1種の医薬化合物(例えば米国特許第6、509、369号に開示される化合物)を支持体に組み込む。

10

【0134】

支持体を、抗アポトーシス化合物である少なくとも1種の医薬化合物、例えば米国特許第6、793、945号に開示されている化合物と共に組み込んでもよい。

【0135】

支持体を、線維症阻害剤である少なくとも1種の医薬化合物、例えば米国特許第6、331、298号に開示されている化合物と共に組み込んでもよい。

【0136】

支持体を、血管新生を促進させることができる少なくとも1種の医薬化合物、例えば米国特許出願公開第2004/0220393号及び同第2004/0209901号に開示されている化合物と共に組み込んでもよい。

20

【0137】

支持体を、免疫抑制化合物である少なくとも1種の医薬化合物、例えば、米国特許出願公開第2004/0171623号に開示されている化合物と共に組み込んでもよい。

【0138】

支持体を、例えば、なかんずく、TGF-1、2、及び3を含むTGF-族の構成員、骨形成タンパク質(BMP-2、-3、-4、-5、-6、-7、-11、-12、及び-13)、繊維芽細胞増殖因子-1及び-2、血小板由来増殖因子-AA及び-BB、多血小板血漿、インスリン増殖因子(IGF-I、II)、増殖分化因子(GDF-5、-6、-8、-10、-15)、血管内皮増殖因子(VEGF)、プレイオトロフィン、エンドセリンなどの増殖因子である、少なくとも1種の医薬化合物と共に組み込んでもよい。他の医薬化合物としては、例えばニコチンアミド、低酸素誘導因子1-、グルカゴン様ペプチド-I(GLP-I)、GLP-1及びGLP-2疑似体、並びにII、エキセンディン4、ノーダル、ノギン、NGF、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン、テネイシン-C、トロポエラスチン、トロニン由来ペプチド、カテリシジン、デフェンシン、ラミニン、フィブロネクチン及びピトロネクチンなどの接着性細胞外マトリックスタンパク質の細胞-及びヘパリン-結合ドメインを含む生物ペプチド、例えば米国特許出願公開第2004/0209901号及び同第2004/0132729号に開示されている化合物などのMAPK阻害剤を挙げることができる。

30

【0139】

スキャフォールドの中への本発明の細胞の組み込みは、スキャフォールド上に細胞を単に沈着させることにより達成できる。細胞は、単に拡散により骨格内に入ることができる(J. Pediatr. Surg. 23(1 Pt 2): 3~9(1988))。細胞播種の効率を向上させるために、いくつかの他の手法が開発されている。例えば、軟骨細胞をポリグリコール酸骨格上に播種する際に、スピナーフラスコが使用された(Bio-technol. Prog. 14(2): 193~202(1998))。細胞播種のための他の手法は遠心法の使用であり、これは播種する細胞に与えるストレスを最小にし、かつ播種効率を高める。例えば、Yangらは、遠心分離細胞固定法(CCI)と呼ばれる細胞播種方法を開発した(J. Biomed. Mater. Res. 55(3): 379~86(2001))。

40

50

【0140】

本発明を以下の実施例によって更に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0141】

参考文献

Karvonen, M. et al., 「Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide.」 (Diabetes Mondiale (Diamond) Project Group. Diabetes Care 23, 1516~26 (2000)).

【0142】

Mathis, D., Vence, L. 及び Benoist, L., 「C. Beta-cell death during progression to diabetes」 (Nature 414, 792~8 (2001)).

【0143】

Ryan, E. A. et al., 「Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol」 (Diabetes 50, 710~9 (2001)).

【0144】

Shapiro, A. M. et al., 「Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen」 (N Engl J Med 343, 230~8 (2000)).

【0145】

Cure, P. et al., 「Improved Metabolic Control and Quality of Life in Seven Patients With Type 1 Diabetes Following Islet After Kidney transplantation」 (Transplantation 85, 801~812 (2008)).

【0146】

Fung, M. A. et al., 「The effect of medical therapy and islet cell transplantation on diabetic nephropathy: an interim report」 (Transplantation 84, 17~22 (2007)).

【0147】

Brown, L. 及び Edelman, E. R., 「Optimal control of blood glucose: the diabetic patient or the machine?」 (Sci Transl Med 2, 27 ps18 (2010)).

【0148】

Guo, T. 及び Hebrok, M., 「Stem cells to pancreatic beta-cells: new sources for diabetes cell therapy」 (Endocr Rev 30, 214~27 (2009)).

【0149】

Ricordi, C. 及び Edlund, H., 「Toward a renewable source of pancreatic beta-cells」 (Nat Biotechnol 26, 397~8 (2008)).

【0150】

10

20

30

40

50

Rajagopal, J., Anderson, W. J., Kume, S., Martinez, O. I. 及び Melton, D. A. 「Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake」(Science 299, 363 (2003)).

【0151】

Kroon, E. 「Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo」(Nat Biotechnol 26, 443~52 (2008)).

10

【0152】

D'Amour, K. A. 「Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells」(Nat Biotechnol 24, 1392~401 (2006)).

【0153】

D'Amour, K. A. 「Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm」(Nat Biotechnol 23, 1534~41 (2005)).

20

【0154】

Matveyenko AV, Georgia S, Bhushan A, Butler PC. 「Inconsistent formation and non function of insulin positive cells from pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells in athymic nude rats」(Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010 Jun 29.) [出版前にオンラインで先行公開]。

【0155】

Lee SH, Hao E, Savinov AY, Geron I, Strongin AY, Itkin-Ansari P. 「Human beta-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunoisolation device: implications for diabetes cell therapies」(Transplantation 2009 Apr 15; 87(7): 983~91)。

30

【0156】

Yang Z, Chen M, Fialkow LB, Ellett JD, Wu R, Nadler JL. 「Survival of pancreatic islet xenografts in NOD mice with the therapy te device」(Transplantation Proc. 2002 Dec; 34(8): 3349~50)。

40

【0157】

Panepinto LM and Phillips RW. 「The Yucatan miniature pig: characterization and utilization in biomedical research」(Lab Anim Sci 36: 344~347, 1986)。

【0158】

Larsen MO and Rolin B. 「Use of the Göttingen minipig as a model of diabetes, with

50

special focus on type 1 diabetes research」(Ilar J 45:303~313, 2004)。

【0159】

Miller ER and Ullrey DE. 「The pig as a model for human nutrition」(Annu Rev Nutr 7:361~382, 1987)。

【0160】

Vodicka P、Smetana K, Jr.、Dvorankova B、Emeric T、Xu YZ、Ourednik J、Ourednik V、及びMottlik J. 「The miniature pig as an animal model in biomedical research」(Ann N Y Acad Sci 1049:161~171, 2005)。

10

【0161】

Kurihara-Bergstrom T、Woodworth M、Feisullin S、及びBeall P. 「Characterization of the Yucatan miniature pig skin and small intestine for pharmaceutical applications」(Lab Anim Sci 36:396~399, 1986)。

【0162】

Swindle MM、Smith AC、Laber-Laird K、及びDungan L. 「Swine in Biomedical Research: Management and Models」(Ilar J 36:1~5, 1994)。

20

【0163】

Bellinger DA、Merricks EP、及びNichols TC. 「Swine models of type 2 diabetes mellitus: insulin resistance, glucose tolerance, and cardiovascular complications」(Ilar J 47:243~258, 2006)。

【0164】

Hainsworth DP、Katz ML、Sanders DA、Sanders DN、Wright EJ、及びSturek M. 「Retinal capillary basement membrane thickening in a porcine model of diabetes mellitus」(Comp Med 52:523~529, 2002)。

30

【0165】

Marshall M、Oberhofer H、及びStaubesand J. 「Early micro- and macro-angiopathy in the streptozotocin diabetic minipig」(Res Exp Med (Berl) 177:145~158, 1980)。

【0166】

Phillips RW、Panepinto LM、Will DH、及びCase GL. 「The effects of alloxan diabetes on Yucatan miniature swine and their progeny」(Metabolism 29:40~45, 1980)。

40

【0167】

Eventov-Friedman S、Tchorsh D、Katchman H、Shezen E、Aronovich A、Hecht G、Dekel B、Rechavi G、Blazar BR、Feine I、Tal O、Freud E、Reisner Y. 「Embryonic pig pancreatic tissue transplantation for the treatment of

50

diabetes」(PLOS Med. 2006 Jul; 3(7): e215)。

【0168】

Castaing M、Peault B、Basmaciogullari A、Casal I、Czernichow P、Scharfmann R。「Blood glucose normalization upon transplantation ofヒトembryonic pancreas into beta-cell-deficient SCID mice」(Diabetologia. 2001 Nov; 44(11): 2066~76)。

【0169】

Larsen MO、Rolin B、Raun K、Bjerre Knudsen L、Gotfredsen CF、Bock T。「Evaluation of beta-cell mass and function in the Göttingen minipig」(Diabetes Obes Metab Suppl 2: 170~9, 2007)。

【0170】

van der Windt DJ、Echeverri GJ、Ijzermans JN、Cooper DK。「The choice of anatomical site for islet transplantation」(Cell Transplantation 2008; 17(9): 1005~14)。

【実施例】

【0171】

ヒト胚性幹細胞株H1細胞を、MATRIGEL(1:30希釈)をコートしたプレート上で培養し、以下のプロトコルを使用して膵内分泌前駆細胞へと分化させた:

a. 2%のBSA(カタログ# 152401, MP Biomedical, Ohio)、100ng/mLのアクチピンA(R & D Systems, MN)、20ng/mLのWNT-3a(カタログ# 1324-WN-002, R & D Systems, MN)及び8ng/mLのbFGF(カタログ# 100-18B, Pepro Tech, NJ)を添加したRPMI培地(カタログ# 22400, Invitrogen, Ca)で1日培養した後に、2%のBSA、100ng/mLのアクチピンA、8ng/mLのbFGFを添加したRPMI培地で更に2日間にわたって処理し(段階1)、

次いで
b. 2%のBSA及び50ng/mLのFGF7を添加したDMEM/F12(カタログ番号11330, Invitrogen, Ca)で3日間にわたって培養し(段階2)、

次いで
c. 1%のB27(#17504-044, Invitrogen, CA)、50ng/mLのFGF7、0.25µMのシクロパミン-KAAD(#239804, Calbiochem, CA)、2µMのレチノイン酸(RA)(Sigma, MO)及び100ng/mLのノギン(R & D Systems, MN)を添加した表1に記載の異なる基本培地を使用して4日間にわたって培養し(段階3)、

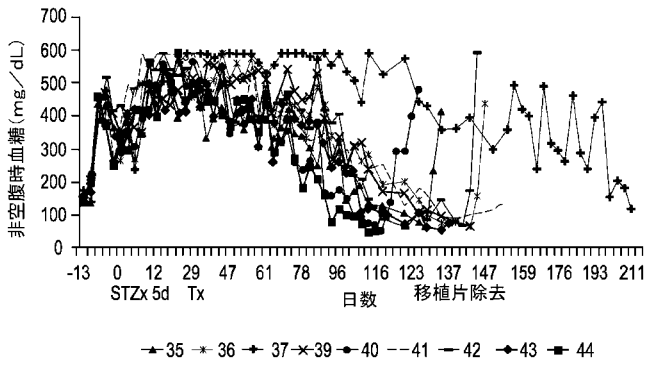
次いで
d. 1%のB27(Invitrogen, CA)、100ng/mLのノギン及び1µMのALK5阻害剤II(カタログ# 616452, Calbiochem, Ca)を添加した、表1に記載の異なる基本培地を使用して3日間にわたって培養した(段階4)。

【0172】

本明細書の全体を通じて引用した刊行物は、その全体を参照により本明細書に組み込むものとする。以上、本発明の様々な態様を実施例及び好ましい実施形態を参照して説明したが、本発明の範囲は、上記の説明文によってではなく、特許法の原則の下で適宜解釈される以下の特許請求の範囲によって定義されるものである点は認識されるであろう。

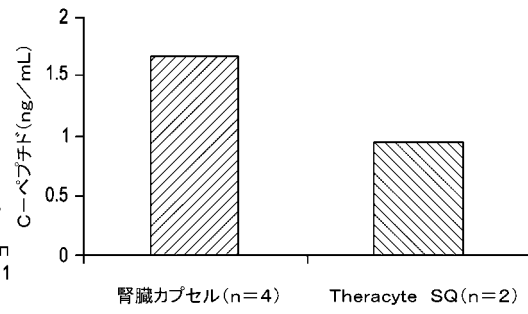
【 図 1 】

H1由来の膵臓前駆細胞移植レシピエント



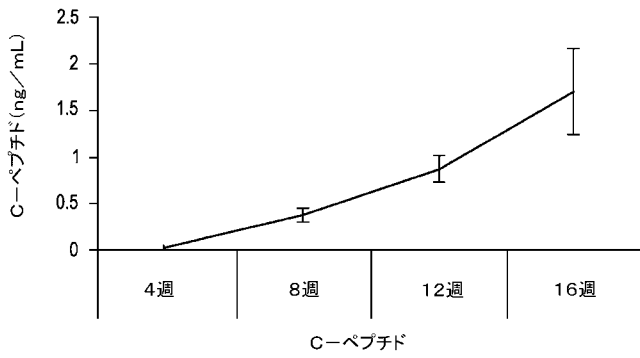
【 図 3 】

12週におけるTheracyte器具の機能





【 図 2 】

膵臓前駆細胞移植レシピエントにおけるC-ペプチド



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2011/047410
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 35/12(2006.01); A61K 38/18(2006.01); A61K 38/22(2006.01); A61P 3/10(2006.01);</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 35/12; C12N 5/06; C12N 5/08; C07K 14/62; C12P 21/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: blood glucose, pancreatic endocrine precursor cells, encapsulation, diabetes		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DONG-QI TANG et al. 'Reprogramming liver-stem WB cells into functional insulin-producing cells by persistent expression of Pdx1- and Pdx1-VP16 mediated by lentiviral vectors' Laboratory Investigation, 2006, Vol. 86, No. 1, pp. 83-93, ISSN 0023-6837. see abstract; p. 84, left-column; discussion.	1
A	US 2007-0154981 A1 (YUICHI HORI et al.) 05 July 2007 see paragraph [0099]; claims 18 and 27.	1
A	US 2004-0121460 A1 (NADYA L. LUMELSKY et al.) 24 June 2004 see paragraphs [0010], [0029], and [0114]; claim 27.	1
A	J. MOVASSAT et al. 'Keratinocyte growth factor and beta-cell differentiation in human fetal pancreatic endocrine precursor cells' Diabetologia, 2003, Vol. 46, No. 6, pp. 822-829, ISSN 0012-186x. see abstract; results.	1
A	YAIR REISNER. 'Growing organs for transplantation from embryonic precursor tissues' Immunol. Res., 2007, Vol. 38, No. 1/3, pp. 261-273, ISSN 0257-277x. see pp. 265-270.	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 MARCH 2012 (22.03.2012)		Date of mailing of the international search report 23 MARCH 2012 (23.03.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Choi Sung Hee  Telephone No. 82-42-481-8740

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/047410

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007-0154981 A1	05.07.2007	WO 2005-045001 A2	19.05.2005
US 2004-0121460 A1	24.06.2004	CA 2435826 A1	01.08.2002
		EP 1366148 A2	03.12.2003
		JP 2005-503759 A	10.02.2005
		WO 02-059278 A2	01.08.2002

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM

(72)発明者 スー, ジャン

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08558, スキルマン, グランドビュー ロード 199

Fターム(参考) 4C076 AA53 BB32 CC21 FF68

4C087 AA01 AA02 BB51 BB64 MA67 NA14 ZC35