

【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4年2月15日(2022.2.15)

【国際公開番号】WO2019/156216

【出願番号】特願2019-571167(P2019-571167)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/077(2010.01)

C 1 2 N 9/99(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 Q 1/02(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 5/077

C 1 2 N 9/99

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/02

【手続補正書】

【提出日】令和4年2月4日(2022.2.4)

【手続補正1】

20

【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】

レチノイン酸受容体アゴニスト、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)阻害剤及びイソクエン酸デヒドロゲナーゼ1(IDH1)阻害剤からなる群より選択される、細胞周期活性化作用を有する化合物を有効成分として含む、心筋細胞増殖促進剤。

【請求項2】

30

レチノイン酸受容体アゴニストがAM80である、請求項1に記載の心筋細胞増殖促進剤。

【請求項3】

請求項1または2に記載の心筋細胞増殖促進剤を含有する培地で心筋細胞を培養する工程を含む、心筋細胞の増殖方法。

【請求項4】

心筋細胞がヒト心筋細胞である、請求項3に記載の心筋細胞の増殖方法。

【請求項5】

心筋細胞が多能性幹細胞から分化された心筋細胞である、請求項3または4に記載の心筋細胞の増殖方法。

【請求項6】

40

多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項5に記載の心筋細胞の増殖方法。

【請求項7】

請求項3～6のいずれか一項に記載の方法によって増殖され、移植生着能が向上した心筋細胞。

【請求項8】

心筋細胞と、請求項1または2に記載の心筋細胞増殖促進剤を含む、心筋細胞培養キット。

【請求項9】

請求項1または2に記載の心筋細胞増殖促進剤を含む、心筋細胞用培地。

【請求項10】

50

インビトロで心筋細胞を被検物質と接触させる工程、当該心筋細胞の細胞周期の進行を測定する工程、および細胞周期の進行を促進する化合物を選択する工程を含む、心筋細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

【請求項 1 1】

心筋細胞が細胞周期のG1/G0期からS/G2/M期への移行に関連する遺伝子を発現する心筋細胞

であり、当該遺伝子の発現をモニターすることにより細胞周期の進行を測定する、請求項 1 0 に記載の心筋細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

【請求項 1 2】

前記遺伝子がFucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) 遺伝子

10

である請求項 1 1 に記載の心筋細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 7】

すなわち、本発明の要旨は以下のとおりである。

20

[1] 細胞周期活性化作用を有する化合物からなる心筋細胞増殖促進剤。

[2] 細胞周期活性化作用を有する化合物が、レチノイン酸受容体アゴニスト、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) 阻害剤またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1 (IDH1) 阻害剤である、[1] に記載の心筋細胞増殖促進剤。

[3] レチノイン酸受容体アゴニストがAM80である、[2] に記載の心筋細胞増殖促進剤。

[4] [1] ~ [3] のいずれかに記載の心筋細胞増殖促進剤を含有する培地で心筋細胞を培養する工程を含む、心筋細胞の増殖方法。

[5] 心筋細胞がヒト心筋細胞である、[4] に記載の心筋細胞の増殖方法。

[6] 心筋細胞が多能性幹細胞から分化された心筋細胞である、[4] または [5] に記載の心筋細胞の増殖方法。

30

[7] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、[6] に記載の心筋細胞の増殖方法。

[8] [4] ~ [7] のいずれかに記載の方法によって増殖され、移植生着能が向上した心筋細胞。

[9] 心筋細胞と、[1] ~ [3] のいずれかに記載の心筋細胞増殖促進剤を含む、心筋細胞培養キット。

[1 0] [1] ~ [3] のいずれかに記載の心筋細胞増殖促進剤を含む、心筋細胞用培地。

[1 1] インビトロで心筋細胞を被検物質と接触させる工程、当該心筋細胞の細胞周期の進行を測定する工程、および細胞周期の進行を促進する化合物を選択する工程を含む、心筋細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

40

[1 2] 心筋細胞が細胞周期のG1/G0期からS/G2/M期への移行に関連する遺伝子を発現す

る心筋細胞であり、当該遺伝子の発現をモニターすることにより細胞周期の進行を測定する、[1 1] に記載の心筋細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

[1 3] 前記遺伝子がFucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) 遺伝子である、[1 2] に記載の心筋細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 0

50

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

< 心筋細胞増殖促進剤の具体例 >

細胞周期活性化作用を有する化合物を有効成分とする心筋細胞増殖促進剤の種類は特に限定はされないが、具体例としては、レチノイン酸受容体アゴニスト、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) 阻害剤またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ1 (IDH1) 阻害剤が挙げられる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

10

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

本発明の心筋細胞増殖促進剤を含む培地で心筋細胞を培養する工程は、心筋細胞増殖促進剤を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、適した培地 (例えば、約5~20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、alpha MEM、RPMI1640培地、199培地、F12培地など) 中に、増殖効果を発揮できる濃度で心筋細胞増殖促進剤を添加して、心筋細胞を一定期間培養することにより実施することができる。心筋細胞増殖促進剤の濃度は用いる物質の種類によって異なるが、例えば、Am80などのレチノイン酸受容体アゴニストの場合、10nM~10μMが好ましく、100nM~5μMがより好ましく、PI3K阻害剤の場合、10nM~10μMが好ましく、100nM~5μMがより好ましく、IDH1阻害剤の場合、5nM~5μMが好ましく、50nM~2μMがより好ましい。培養期間は対象細胞が増殖するために十分な時間であれば特に制限はないが、例えば、1日から10日の範囲で適宜選択される。なお、多能性幹細胞から分化誘導された心筋細胞を増殖させる場合、心筋細胞がすでに存在していれば分化工程の途中で心筋細胞増殖促進剤を添加してもよい。例えば、分化誘導開始後15~25日目に心筋細胞増殖促進剤を添加してもよい。

20

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

30

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

本発明の心筋細胞増殖促進剤を使用して増殖された心筋細胞は、心筋組織に移植されたときに移植生着能が向上するという優れた特性を有しているため、心筋細胞の移植を必要とする患者に対して移植されるための細胞製剤として好適に使用される。心筋細胞の移植を必要とする患者としては、心筋炎や心筋梗塞や心筋損傷などの心筋細胞の欠損によって生じる疾患患者が例示されるが、これらには限定されない。移植される細胞の量は、疾患の種類や程度によって適宜選択され、移植の回数も1回または複数回でありうる。移植の方法も限定されず、疾患部位への注射であってもよいし、心筋細胞シートを作製して疾患部位に適用してもよい。

40

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

< 細胞周期活性化に基づく心筋細胞増殖促進剤のスクリーニング >

健常人由来iPS細胞株にPiggyBacトランスポゾンベクターシステム (System Bioscience

50

nces

社)を用いてFucci遺伝子(Cell. 2008 Feb 8;132(3):487-98.)をCAGプロモーター下に恒常的に発現させた。

10

20

30

40

50