

【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25年4月4日 (2013.4.4)

【公表番号】特表2012-518415(P2012-518415A)

【公表日】平成24年8月16日 (2012.8.16)

【年通号数】公開・登録公報2012-032

【出願番号】特願2011-551266(P2011-551266)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 2 0 2 C

【手続補正書】

【提出日】平成25年2月13日 (2013.2.13)

【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】

ヒト多能性幹細胞を C D 3 4 + 前駆細胞に分化させる方法であって：

a) フィーダー細胞を含まないか、またはフィーダー細胞を本質的に含まず、マトリック成分、ならびに B M P - 4、V E G F および b F G F からなる群より選択される少なくとも 1 種の組換え型増殖因子を含む培養培地で多能性幹細胞を培養する工程；および

b) 前記細胞を 5 . 5 % 未満酸素の低酸素雰囲気下で前記 C D 3 4 + 前駆細胞を得るための期間分化させる工程

を含む、方法。

【請求項 2】

前記多能性幹細胞は胚性幹細胞または誘導胚性幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記低酸素雰囲気は約 0 . 5 % 酸素ガスから約 5 . 5 % 酸素ガスを含み、好ましくは前記低酸素雰囲気は約 1 . 5 % 酸素ガスから約 5 . 3 % 酸素ガスを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 C D 3 4 + 前駆細胞またはその子孫を培養から 8 日から 1 2 日で収集する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記培養培地は B M P - 4 を約 5 n g / m L ~ 約 2 0 0 n g / m L の量で含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記培養培地は V E G F を約 5 n g / m L ~ 約 2 0 0 n g / m L の量で含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記培養培地は b F G F を約 5 n g / m L ~ 約 2 0 0 n g / m L の量で含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記培養培地は血清またはフィーダー細胞を含まないか、あるいは血清またはフィーダー細胞を本質的に含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記方法の少なくとも一部を自動化するためロボットを使用することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

複数の前記多能性幹細胞はバイオリアクターを使用して培養される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

C D 3 4、C D 4 3 および C D 3 1 からなる群の 1 つまたは複数の発現に基づき前記 C D 3 4 + 前駆細胞を分取する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

a) 多能性幹細胞コロニーまたはクローン細胞群を分散させ、分散した本質的に個別の細胞を形成する工程、および

b) 前記分散させた細胞を培養面 1 平方センチメートル当たり約 10,000 幹細胞から培養面 1 平方センチメートル当たり約 70,000 幹細胞の密度で培養培地に播種する工程

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞は生存因子を含む培養培地に分散される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記分散された細胞は培養面 1 平方センチメートル当たり約 10,000 幹細胞から培養面 1 平方センチメートル当たり約 50,000 幹細胞の密度で播種される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記多能性幹細胞は有効量の 1 種または複数種の酵素による処理により分散される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

前記酵素の少なくとも 1 種はトリプシンまたは t r y p L E である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記分化培地は規定された分化培地である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

ヒト多能性幹細胞を C D 3 1 + 前駆細胞に分化させる方法であって：

a) 多能性幹細胞を、フィーダー細胞を含まないか、またはフィーダー細胞を本質的に含まず、マトリックス成分、ならびに B M P - 4、V E G F および b F G F からなる群より選択される少なくとも 1 種の組換え型増殖因子を含む培養培地で培養する工程；および

b) 前記細胞を 5 . 5 % 未満酸素の低酸素雰囲気下で前記 C D 3 1 + 前駆細胞を得るための期間分化させる工程

を含む、方法。

【請求項 19】

ヒト多能性幹細胞を C D 3 1 + 前駆細胞に分化させる方法であって：

a) マトリックス成分；および

b) B M P - 4、V E G F および b F G F からなる群より選択される少なくとも 1 種の組換え型増殖因子を含む分化培地

を含む培地で多能性幹細胞を増殖させる工程を含み、

前記培地は非ヒト動物血清、フィーダー細胞および M a t r i g e l ^{T M} を含まないか、または非ヒト動物血清、フィーダー細胞および M a t r i g e l ^{T M} を本質的に含まない、

方法。

【請求項 20】

前記培地は非ヒト動物血清、フィーダー細胞および M a t r i g e l ^{T M} を含まない、

請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記培地は非ヒト動物のタンパク質を含まないか、または非ヒト動物のタンパク質を本質的に含まない、請求項 19 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0050

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0050】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明により明らかになる。しかし、詳細な説明および個々の例については、本発明の具体的な実施形態を示すものではあるが、この詳細な説明から本発明の精神および範囲内で様々な変更および修正が当業者には明らかになるため、例示のみを目的としたものであることを理解すべきである。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

ヒト多能性幹細胞を CD34 + 前駆細胞に分化させる方法であって：

a) フィーダー細胞を含まないか、またはフィーダー細胞を本質的に含まず、マトリックス成分、ならびに BMP - 4、VEGF および bFGF からなる群より選択される少なくとも 1 種の組換え型増殖因子を含む培養培地で多能性幹細胞を培養する工程；および

b) 前記細胞を 5.5% 未満酸素の低酸素雰囲気下で前記 CD34 + 前駆細胞を得るための期間分化させる工程を含む、方法。

(項目 2)

前記多能性幹細胞は胚性幹細胞または誘導胚性幹細胞である、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記低酸素雰囲気は約 0.5% 酸素ガスから約 5.5% 酸素ガスを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

前記低酸素雰囲気は約 1.5% 酸素ガスから約 5.3% 酸素ガスを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記マトリックス成分はフィブロネクチン、コラーゲンまたは RGD ペプチドを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

前記 CD34 + 前駆細胞またはその子孫を培養から 8 日から 12 日で収集する工程をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

前記 CD34 + 前駆細胞またはその子孫を培養から 6 日から 9 日で収集する工程をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

前記培養培地は BMP - 4、VEGF および bFGF を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

前記培養培地は BMP - 4 を約 5 ng / mL ~ 約 200 ng / mL の量で含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 10)

前記培養培地は VEGF を約 5 ng / mL ~ 約 200 ng / mL の量で含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 11)

前記培養培地は bFGF を約 5 ng / mL ~ 約 200 ng / mL の量で含む、項目 1 に

記載の方法。

(項目12)

前記培養培地は生存因子をさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目13)

前記生存因子はRho関連キナーゼ(ROCK)のインヒビターまたはミオシンIIのインヒビターである、項目12に記載の方法。

(項目14)

前記培養培地は血清またはフィーダー細胞を含まないか、あるいは血清またはフィーダー細胞を本質的に含まない、項目1に記載の方法。

(項目15)

分化の前にTESRを含む第1の培地で前記多能性幹細胞を培養または維持する工程をさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目16)

前記第1の培地はTESR培地および生存因子を含む、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記生存因子はRho関連キナーゼ(ROCK)のインヒビターまたはミオシンIIのインヒビターである、項目16に記載の方法。

(項目18)

前記CD34+前駆細胞を赤血球、マクロファージ、顆粒球、巨核球、樹状細胞、マスト細胞または内皮細胞からなる群の1つまたは複数に分化させる工程をさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目19)

前記さらなる分化はFMS様チロシンキナーゼ3(FLT-3)、幹細胞因子(SCF)、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン3(IL-3)、インターロイキン6(IL-6)およびヘパリンからなる群の1つまたは複数を含む培養培地で起こる、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記さらなる分化はFMS様チロシンキナーゼ3(FLT-3)、幹細胞因子(SCF)、トロンボポエチン(TPO)、インターロイキン3(IL-3)、インターロイキン6(IL-6)およびヘパリンを含む培養培地で起こる、項目18に記載の方法。

(項目21)

前記培養培地は1種または複数種のアミノ酸、抗生物質、ビタミン、塩、ミネラルまたは脂質を含む、項目1に記載の方法。

(項目22)

前記培養培地はBIT9500、BMP4、VEGF、bFGF、L-グルタミン、非必須アミノ酸、モノチオグリセロール、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む、項目1に記載の方法。

(項目23)

前記培養培地はBMP-4、VEGFおよびbFGFからなる群より選択される2種以上の組換え型増殖因子を含む、項目1に記載の方法。

(項目24)

少なくとも一部を自動化するためロボットを使用することを含む、項目1に記載の方法。

(項目25)

複数の前記多能性幹細胞はバイオリアクターを使用して培養される、項目1に記載の方法。

(項目26)

磁気活性化細胞ソーティング(MACS)、フローサイトメトリーまたは蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)を使用して前記CD34+前駆細胞を分取する工程をさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目 2 7)

C D 3 4、C D 4 3 および C D 3 1 からなる群の 1 つまたは複数の発現に基づき前記 C D 3 4 + 前駆細胞を分取する工程をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 8)

a) 多能性幹細胞コロニーまたはクローン細胞群を分散させ、分散した本質的に個別の細胞を形成する工程、および

b) 前記分散させた細胞を培養面 1 平方センチメートル当たり約 1 0 , 0 0 0 幹細胞から培養面 1 平方センチメートル当たり約 7 0 , 0 0 0 幹細胞の密度で培養培地に播種する工程

をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記細胞は生存因子を含む培養培地に分散される、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記分散された細胞は培養面に 1 平方センチメートル当たり約 1 0 , 0 0 0 幹細胞から培養面に 1 平方センチメートル当たり約 5 0 , 0 0 0 幹細胞の密度で播種される、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記多能性幹細胞は有効量の 1 種または複数種の酵素による処理により分散される、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記酵素の少なくとも 1 種はトリプシンまたは t r y p L E である、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記分化培地は規定された分化培地である、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 4)

ヒト多能性幹細胞を C D 4 3 + 前駆細胞に分化させる方法であって：

a) 多能性幹細胞を、フィーダー細胞を含まないか、またはフィーダー細胞を本質的に含まず、マトリックス成分、ならびに B M P - 4、V E G F および b F G F からなる群より選択される少なくとも 1 種の組換え型増殖因子を含む培養培地で培養する工程；および

b) 前記細胞を 5 . 5 % 未満酸素の低酸素雰囲気下で前記 C D 4 3 + 前駆細胞を得るための期間分化させる工程

を含む、方法。

(項目 3 5)

ヒト多能性幹細胞を C D 3 1 + 前駆細胞に分化させる方法であって：

a) 多能性幹細胞を、フィーダー細胞を含まないか、またはフィーダー細胞を本質的に含まず、マトリックス成分、ならびに B M P - 4、V E G F および b F G F からなる群より選択される少なくとも 1 種の組換え型増殖因子を含む培養培地で培養する工程；および

b) 前記細胞を 5 . 5 % 未満酸素の低酸素雰囲気下で前記 C D 3 1 + 前駆細胞を得るための期間分化させる工程

を含む、方法。

(項目 3 6)

ヒト多能性幹細胞を C D 3 1 + 前駆細胞に分化させる方法であって：

a) マトリックス成分；および

b) B M P - 4、V E G F および b F G F からなる群より選択される少なくとも 1 種の組換え型増殖因子を含む分化培地

を含む培地で多能性幹細胞を増殖させる工程を含み、

前記培地は非ヒト動物血清、フィーダー細胞および M a t r i g e l ^{T M} を含まないか、または非ヒト動物血清、フィーダー細胞および M a t r i g e l ^{T M} を本質的に含まない

方法。

(項目 37)

前記培地は非ヒト動物血清、フィーダー細胞およびMatrigelTMを含まない、
項目36に記載の方法。

(項目 38)

前記培地は非ヒト動物のタンパク質を含まないか、または非ヒト動物のタンパク質を本質的に含まない、項目36に記載の方法。

(項目 39)

ヒト多能性幹細胞をCD34 + 前駆細胞に分化させる方法であって：

a) マトリックス成分；および

b) BMP - 4、VEGFおよびbFGFからなる群より選択される少なくとも1種の
組換え型増殖因子を含む分化培地

を含む培地で多能性幹細胞を増殖させる工程を含み、

前記培地は非ヒト動物血清、フィーダー細胞およびMatrigelTMを含まないか、
または非ヒト動物血清、フィーダー細胞およびMatrigelTMを本質的に含まない

方法。

(項目 40)

前記培地は非ヒト動物血清、フィーダー細胞およびMatrigelTMを含まない、
項目39に記載の方法。

(項目 41)

前記培地は非ヒト動物のタンパク質を含まないか、または非ヒト動物のタンパク質を本質的に含まない、項目39に記載の方法。

(項目 42)

ヒト多能性幹細胞をCD31 + 前駆細胞に分化させる方法であって、多能性幹細胞を規定された分化培地で培養する工程を含む、方法。

(項目 43)

ヒト多能性幹細胞をCD34 + 前駆細胞に分化させる方法であって、多能性幹細胞を規定された分化培地で培養する工程を含む、方法。

(項目 44)

ヒト多能性幹細胞をCD43 + 前駆細胞に分化させる方法であって、多能性幹細胞を規定された分化培地で培養する工程を含む、方法。

(項目 45)

BMP - 4、VEGF、bFGFおよびマトリックス成分を含む分化培養培地であって、
前記培地はフィーダー細胞、血清およびMatrigelTMを含まないか、またはフィーダー細胞、血清およびMatrigelTMを本質的に含まない、分化培養培地。

(項目 46)

さらに非ヒト動物増殖因子を含まないか、または非ヒト動物増殖因子を本質的に含まない、項目45に記載の分化培地。

(項目 47)

さらに非ヒト動物のタンパク質を含まないか、または非ヒト動物のタンパク質を本質的に含まない、項目45に記載の分化培地。

(項目 48)

フィーダー細胞、血清およびMatrigelTMを含まない、項目45に記載の分化培地。

(項目 49)

前記マトリックス成分はフィブロネクチン、コラーゲンまたはRGDペプチドを含む、
項目45に記載の分化培地。

(項目 50)

約5 ng / mL ~ 約200 ng / mLの量のBMP - 4を含む、項目45に記載の分化培地。

(項目 5 1)

約 5 n g / m L ~ 約 2 0 0 n g / m L の量の V E G F を含む、項目 4 5 に記載の分化培地。

(項目 5 2)

約 5 n g / m L ~ 約 2 0 0 n g / m L の量の b F G F を含む、項目 4 5 に記載の分化培地。

(項目 5 3)

B I T 9 5 0 0、B M P 4、V E G F、b F G F、L - グルタミン、非必須アミノ酸、モノチオグリセロール、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む、項目 4 5 に記載の分化培地。

(項目 5 4)

1 種または複数種のアミノ酸、抗生物質、ビタミン、塩、ミネラルまたは脂質をさらに含む、項目 4 5 に記載の分化培地。

(項目 5 5)

多能性幹細胞、前駆細胞、C D 3 4 + 前駆細胞、C D 4 3 + 前駆細胞および C D 3 1 + 前駆細胞からなる群より選択される 1 種または複数種の細胞をさらに含む、項目 4 5 に記載の分化培地。

(項目 5 6)

規定された培地である、項目 4 5 に記載の分化培地。

(項目 5 7)

1 つまたは複数の密封バイアルに項目 4 5 に記載の分化培養培地を含む、キット。

(項目 5 8)

細胞をさらに含む、項目 5 7 に記載のキット。

(項目 5 9)

前記細胞は多能性細胞、前駆細胞、C D 3 4 + 前駆細胞、C D 4 3 + 前駆細胞または C D 3 1 + 前駆細胞である、項目 5 7 に記載のキット。

(項目 6 0)

多能性細胞の C D 3 4 + 前駆細胞への分化を促進する能力について候補物質をスクリーニングする方法であって：

a) フィーダー細胞を含まないか、またはフィーダー細胞を本質的に含まない培養培地であって、マトリックス成分と、B M P - 4、V E G F および b F G F からなる群より選択される少なくとも 1 種の組換え型増殖因子と、候補物質とを含む、培地で多能性幹細胞を培養する工程；

b) 前記細胞を 5 . 5 % 未満酸素の低酸素雰囲気下で前記 C D 3 4 + 前駆細胞を得るための期間分化させる工程；および

c) C D 3 4 + 前駆細胞への分化について前記多能性細胞を評価する工程を含む、方法。

(項目 6 1)

評価する工程は前記候補物質の存在下での前記多能性幹細胞の分化と、前記候補物質を使用しない同様の細胞培地での前記多能性幹細胞の分化とを比較する工程を含む、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記候補物質は小分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、抗体フラグメントまたは核酸である、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記分化培地は S C F、T P O、F L T - 3、I L - 3、I L - 6 およびヘパリンからなる群の 1 つまたは複数を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 6 4)

C D 3 4 + 前駆細胞を含むクローン細胞集団であって、前記細胞の少なくとも 5 % は C D 3 4 + または C D 4 3 + 前駆細胞であり、前記細胞集団は血清およびフィーダー細胞を

含まないか、または血清およびフィーダー細胞を本質的に含まない規定された培地中に存在する、クローン細胞集団。

(項目 6 5)

約 10^6 ~ 約 10^{15} 個の CD 3 4 + または CD 4 3 + 前駆細胞を含む、項目 6 4 に記載の細胞集団。

(項目 6 6)

CD 3 1 + 前駆細胞を含むクローン細胞集団であって、前記細胞の少なくとも 20 % は CD 3 1 + または CD 3 4 + 前駆細胞であり、前記細胞集団は血清およびフィーダー細胞を含まないか、または血清およびフィーダー細胞を本質的に含まない規定された培地中に存在する、クローン細胞集団。

(項目 6 7)

約 10^6 ~ 約 10^{15} 個の CD 3 1 + または CD 3 4 + 前駆細胞を含む、項目 6 6 に記載の細胞集団。