

【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 12 N 5/0735 (2010.01)

【F I】

C 12 N 5/00 202 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に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12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5n g / m L ~ 約200n 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5n g / m L ~ 約200n 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5n g / m L ~ 約200n 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1\_2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1\_2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1\_2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trypLEである、請求項1\_5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に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 <sup>TM</sup> 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 <sup>TM</sup> 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 <sup>TM</sup> 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。しかしその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5ng/mL～約200ng/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5ng/mL～約200ng/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5ng/mL～約200ng/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TetS-R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TetS-R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B1T9500、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27)

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28)

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29)

前記細胞は生存因子を含む培養培地に分散される、項目28に記載の方法。

(項目30)

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28に記載の方法。

(項目31)

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28に記載の方法。

(項目32)

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31に記載の方法。

(項目33)

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34)

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に期間分化させる工程

を含む、方法。

(項目35)

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に期間分化させる工程

を含む、方法。

(項目36)

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 <sup>T M</sup> 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 <sup>T M</sup> 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Matrigel<sup>TM</sup>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Matrigel<sup>TM</sup>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Matrigel<sup>TM</sup>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Matrigel<sup>TM</sup>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Matrigel<sup>TM</sup>を含まないか、またはフィーダー細胞、血清およびMatrigel<sup>TM</sup>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Matrigel<sup>TM</sup>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5ng/mL～約200ng/mLの量のBMP-4を含む、項目45に記載の分化培地。

(項目51)

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

(項目52)

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

(項目53)

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45に記載の分化培地。

(項目54)

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45に記載の分化培地。

(項目55)

多能性幹細胞、前駆細胞、CD34+前駆細胞、CD43+前駆細胞およびCD31+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45に記載の分化培地。

(項目56)

規定された培地である、項目45に記載の分化培地。

(項目57)

1つまたは複数の密封バイアルに項目45に記載の分化培養培地を含む、キット。

(項目58)

細胞をさらに含む、項目57に記載のキット。

(項目59)

前記細胞は多能性細胞、前駆細胞、CD34+前駆細胞、CD43+前駆細胞またはCD31+前駆細胞である、項目57に記載のキット。

(項目60)

多能性細胞のCD34+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、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CD34+前駆細胞を得るための期間分化させる工程；および

c) CD34+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61)

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60に記載の方法。

(項目62)

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60に記載の方法。

(項目63)

前記分化培地はSCF、TPO、FLT-3、IL-3、IL-6およびヘパリンからなる群の1つまたは複数をさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目64)

CD34+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CD34+またはCD43+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 65)

約10<sup>6</sup>～約10<sup>15</sup>個のCD34+またはCD43+前駆細胞を含む、項目64に記載の細胞集団。

(項目 66)

CD31+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CD31+またはCD34+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 67)

約10<sup>6</sup>～約10<sup>15</sup>個のCD31+またはCD34+前駆細胞を含む、項目66に記載の細胞集団。