

【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17年12月8日(2005.12.8)

【公開番号】特開2000-139455(P2000-139455A)

【公開日】平成12年5月23日(2000.5.23)

【出願番号】特願平11-295808

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 5/06

A 6 1 K 35/39

A 6 1 P 3/10

【F I】

C 1 2 N 5/00 E

A 6 1 K 35/39

A 6 1 P 3/10

【手続補正書】

【提出日】平成17年10月26日(2005.10.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離ランゲルハンス島内分泌細胞を移植に適切なようにインビトロ培養及び増殖させる方法であつて、

インスリン生産細胞に分化し得る細胞を包含する生存可能なランゲルハンス島内分泌細胞を供給し、

血清、ニコチニアミド、マンニトールまたはスーパー・オキシドジスムターゼからなる群から選択される少なくとも1種のラジカルスカベンジャー、インスリントラヌスフェリンセレナイト(ITS)、表皮増殖因子(EGF)、血小板由来増殖因子(PDG F)、トロンビン、リノール酸-B SA、ヒドロコルチゾン及びプロゲステロンからなる群から選択される少なくとも1種の増殖因子及びインスリン様増殖因子-I(IGF1)及び-II(IGF2)、血管性内皮増殖因子(VEGF)からなる群から選択される少なくとも1種の抗壞死または抗アポトーシス因子を補足された基本培地を含む第1培地を供給し、

インスリン生産細胞に分化し得る細胞を包含するランゲルハンス島内分泌細胞を前記第1培地中で約1日の期間培養して、第1培養増殖を生成させ、

前記第1培養増殖を捕集し、抗-インテグリン1抗体を有する、新鮮なダルベッコ変イーグル培地(DMEM)または血清不含基本培地中で室温で45~120分インキュベートして、第2培養増殖を生成させ、

前記第2培養増殖をマトリックス材料中に懸濁させて、3次元培養増殖環境を供給し、前記補足された基本培地を含みさらに少なくとも他の増殖因子を包含する第2培地を加え、次いで、1または2日培養して前記マトリックス材料中に分散した第3培養増殖を供給し、

前記マトリックス材料中で第3培養増殖を培養するための第3培地を供給し、前記第3培地はVEGFを含まない補足された基本培地を含み、もし、前記第3培養増殖の前記島が厚く見え、かつ前記島の中心が暗く見えるなら、前記第3培地に任意に神経増殖因子(NGF)及び肝細胞増殖因子を加え、または、前記島が拡がりすぎるように見えるなら、前記第3培地に任意にN G F及び抗-インテグリン1抗体を加え、約1または2日の期間培養させて第4培養増殖を生成させ

マトリックス材料から前記島を捕集し、前記捕集した島及び任意の接着性ゲルに酵素を加え、約10分間インキュベートして、インキュベート生成物を供給し、そして、

前記インキュベート生成物を前後に多数回吸引して、酵素を作用されたゲルを前記島から除去するようにし、それにより、前記纖維芽細胞を前後への吸引の間に創造された力にさらして、纖維芽細胞が前記島の表面から分離するようにさせて纖維芽細胞のない島を製造することを含む方法。

【請求項2】 血清、インスリン・トランスフェリン・ナトリウムセレナイト(ITS)、リノール酸・BSA、トロンビン、EGF、ニコチニアミド、VegF, IgF-1, IgF-2、スーパー・オキシドジスムター・ゼ及びマンニトールで補足した基本培地を含む第4培地を更に供給し、

前記纖維芽細胞不含の島を約8～12時間培養して第5培養増殖を供給し、

抗・インテグリン1抗体を有するD MEMを含む第5培地を供給し、前記第5培地を室温で45～120分間培養して、第6培養増殖を生成させ、

マトリックス材料中に第6培養増殖を懸濁させて、3次元培養増殖環境を供給し、前記補足された基本培地及び更に少なくとも他の増殖因子を包含する第6培地を加え、次いで1または2日培養させて、前記マトリックス材料中に分散された第7培養増殖を供給し、

前記マトリックス材料中に分散した第7培養増殖を培養するために第7培地を供給し、前記第7培地は、VegF不含の補足された基本培地を含み、もし前記第3培養増殖が厚く見え、前記島の中心が暗く見えたなら、任意に第3培地にNGF及びHGFを加えるか、またはもし前記島が拡がりすぎるように見えたなら、任意に第3培地にNGF及び抗・インテグリン1抗体を加え、約1または2日の期間培養させて第8培養増殖を生成させ、

マトリックス材料から前記島を捕集し、前記捕集した島及び任意の接着性ゲルに酵素を加え、約10分間インキュベートさせて、インキュベート生成物を供給し、そして、

前記インキュベート生成物を前後に多数回吸引して、酵素を作用されたゲルを前記島から除去するようにし、それにより前記纖維芽細胞を前後への吸引の間に創造された力にさらして、纖維芽細胞が前記島の表面から分離するようにさせて、増加した数の纖維芽細胞不含の島を製造することを含む請求項1の方法。

【請求項3】 前記血清がランゲルハンス島と同じ種から得られるものである請求項1の方法。

【請求項4】 前記ランゲルハンス島がラットからのもので、かつ、前記用いられる血清が約10%のラット血清であるか、または前記ランゲルハンス島がヒトからのもので、前記用いられる血清が約10%のヒト血清であるかのいずれかである請求項1の方法。

【請求項5】 前記第2培地に加える増殖因子が下垂体抽出物である請求項1の方法。

。

【請求項6】 前記第6培地に加える増殖因子が下垂体抽出物である請求項2の方法

。

【請求項7】 増殖のためのインスリン生産細胞に分化し得る細胞を包含する生存可能なランゲルハンス島内分泌細胞が自己移植のための患者に由来する請求項1または2の方法。

【請求項8】 インビトロ増殖ランゲルハンス島の表面から生ずる纖維芽細胞を除去する方法であって、

ゲル増殖マトリックス中の多数の増殖した島であって、当該島と共に増殖している纖維芽細胞を有する島を供給し、そして、ゲル増殖マトリックスから前記島を捕集し、

前記捕集された島及び前記捕集された島の表面に接着する任意のゲルに酵素を加え、インキュベートして、インキュベート生成物を供給し、

前記インキュベート生成物の前後を多数回吸引して、ジアパーゼを作用されたゲルを前記島から除去するようにし、それにより前記纖維芽細胞を前後への吸引の間に創造された力にさらして、纖維芽細胞が前記島の表面から分離するようにさせて、纖維芽細胞不含の島を製造することを含む方法。

【請求項9】 前記酵素がジアパーゼである請求項8の方法。

【請求項 10】 請求項 1 または 2 の方法により生産された増殖した纖維芽細胞不含の島の培養産物。

【請求項 11】 請求項 1 または 2 の方法により生産した増殖した纖維芽細胞不含の島の、真正糖尿病にかかっている患者に増殖ランゲルハンス島内分泌細胞を移植することによる、真正糖尿病の治療における使用。

【請求項 12】 請求項 7 の方法により生産した増殖した纖維芽細胞不含の島の、真正糖尿病にかかっている患者に前記増殖したランゲルハンス島内分泌細胞を自己移植することによる、真正糖尿病の治療のため及び島を再生するための使用。