

【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29年7月6日 (2017.7.6)

【公表番号】特表2016-534731(P2016-534731A)

【公表日】平成28年11月10日 (2016.11.10)

【年通号数】公開・登録公報2016-063

【出願番号】特願2016-527338(P2016-527338)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/02 (2006.01)

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/073 (2010.01)

【F I】

C 1 2 N 5/02

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/073

【手続補正書】

【提出日】平成29年5月22日 (2017.5.22)

【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】

動的に攪拌される懸濁培養系内で多能性幹細胞を増殖させ、分化させる方法であって、

a. 平面接着培養で増殖させた多能性幹細胞から多能性幹細胞の凝集集団を作り出す工程、

b. 前記平面接着培養から動的懸濁培養へ前記多能性幹細胞の集団を移植する工程、および

c. 前記動的に攪拌される懸濁培養系内で前記前記多能性幹細胞の集団を分化させることにより膀胱前駆細胞集団、神経前駆細胞集団、又は、心筋前駆細胞集団を生成する工程

、
を含む、方法。

【請求項 2】

前記多能性幹細胞が、誘導型多能性幹細胞、ヒト臍帯組織由来細胞、単為生殖生物、ヒト胚性幹細胞 (h E S)、及び羊水由来細胞からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記工程 c で前記前記多能性幹細胞の集団は M C X 化合物で補充された培地中で培養することにより分化され、かつ膀胱前駆細胞集団が生成される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

β 細胞転写因子を発現する膀胱前駆細胞が生成される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記転写因子が P D X 1 及び／又は N K X 6 . 1 である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記工程 c で前記前記多能性幹細胞の集団は L D N および A l k V i で補充された培地中で培養することにより分化され、かつ神経前駆細胞集団が生成される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】

I T S - X または B - 2 7 で補充された培地で前記細胞を培養する工程をさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記工程 c で前記前記多能性幹細胞の集団は 1 4 - プロパー 2 - エン - 1 - イル - 3 , 5 , 7 , 1 4 , 1 7 , 2 3 , 2 7 - ヘプタアザテトラシクロ [1 9 . 3 . 1 . 1 ~ 2 , 6 ~ . 1 ~ 8 , 1 2 ~] ヘプタコサー 1 (2 5) , 2 (2 7) , 3 , 5 , 8 (2 6) , 9 , 1 1 , 2 1 , 2 3 - ノナエン - 1 6 - オンで補充された培地中で培養し、その後 I W P - 4 で補充された培地で培養することにより分化され、かつ心筋前駆細胞集団が生成される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 9】

B - 2 7 で補充された培地で前記細胞を培養する工程をさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記分化工程は約 0 . 1 % ~ 約 2 % のウシ血清アルブミンを含む環境で行われる、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記分化工程は前記集団がマイクロキャリアに接着させることを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

多能性幹細胞を凝集細胞集団として懸濁培養系で分化させる工程を含む、多能性幹細胞をインスリン産生細胞に分化させる方法。

【請求項 13】

懸濁分化環境は、

(i) ほぼ低酸素から周囲の約 3 0 % の範囲の酸素、

(i i) 0 . 1 % ~ 約 2 % の範囲の脂質、

(i i i) ほぼ低酸素から周囲の約 3 0 % の範囲の酸素、および 0 . 1 % ~ 約 2 % の範囲の脂質の組み合わせ、または

(i v) 1 1 m M 未満のグルコース、

を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

約 0 . 1 % ~ 約 2 % のウシ血清アルブミンを含む環境内の平面接着培養下で、多能性幹細胞を凝集細胞集団に増殖させる工程、

前記平面接着培養から動的懸濁液へ前記凝集細胞集団を移植する工程、および

M C X 及び G D F 8 又は W N T 3 A 及びアクチビン A で補充した培地における動的懸濁液内で前記凝集細胞集団を胚体内胚葉へ分化させる工程、

を含む、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 15】

前記分化工程は C y p 2 6 阻害剤の使用を含む、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 2 7 2

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 2 7 2】

以上、本発明を、様々な特定の材料、手順及び実施例を参照しながら本明細書に説明及び例示したが、本発明は、その目的のために選択された特定の材料及び手順の組み合わせに限定されない点は理解されるであろう。当業者には認識されるように、このような細部には多くの変更を行い得ることが示唆される。本明細書及び実施例はあくまで例示的なものとしてみなされるべきものであり、発明の真の範囲及び趣旨は以下の「特許請求の範囲」によって示されるものである。本出願において引用される参照文献、特許及び特許出願は、いずれもそれらの全容を参照により本明細書に援用するものとする。

本発明は以下を提供する。

[1]

動的に攪拌される懸濁培養系内で多能性幹細胞を増殖させ、分化させる方法であって、多能性幹細胞を平面接着培養下で凝集細胞集団に培養することと、動的攪拌される懸濁培養系内で多能性幹細胞集団を分化させることと、を含み、前記分化の工程がC y p 2 6 阻害剤の使用を含む、方法。

[2]

前記方法が、細胞周期のG 0 / G 1 期の細胞の割合を増加させる、請求項 1 に記載の方法。

[3]

前記培養することが、約 0 . 1 % ~ 約 2 % のウシ血清アルブミンを含む環境を含む、請求項 1 に記載の方法。

[4]

前記環境が、R h o キナーゼ阻害剤を更に含む、請求項 3 に記載の方法。

[5]

前記多能性幹細胞が接着性である、請求項 1 に記載の方法。

[6]

前記細胞周期のG 0 / G 1 期内の細胞の割合を増加させる方法であって、約 0 . 1 % ~ 約 2 % のウシ血清アルブミンを含む環境内の平面接着培養下で、多能性幹細胞を凝集細胞集団に増殖させることと、前記平面接着培養から動的懸濁液へ多能性幹細胞の前記集団を移植することと、小分子及び任意追加的にT G F β ファミリーメンバーを添加した培地において、前記動的懸濁液内で前記細胞を培養することと、を含む、方法。

[7]

前記小分子がM C X であり、前記T G F β ファミリーメンバーがG D F - 8 である、請求項 6 に記載の方法。

[8]

前記増殖させることが、R h o キナーゼ阻害剤を含む環境を含む、請求項 6 に記載の方法。

[9]

多能性幹細胞を胚体内胚葉へ分化させる方法であって、約 0 . 1 % ~ 約 2 % のウシ血清アルブミンを含む環境内の平面接着培養下で、多能性を凝集細胞集団に増殖させることと、前記平面接着培養から動的懸濁液へ多能性幹細胞の前記集団を移植することと、M C X 及びG D F 8 又はW N T 3 A 及びアクチビンAを添加した培地において、前記動的懸濁液内で前記細胞を培養することと、を含む、方法。

[1 0]

前記増殖させることが、R h o キナーゼ阻害剤を含む環境を含む、請求項 9 に記載の方法。

[1 1]

動的に攪拌される懸濁培養系内で多能性幹細胞を増殖させ、分化させる方法であって、多能性幹細胞を平面接着培養下で凝集細胞集団に増殖させることと、前期平面接着培養から動的懸濁液へ多能性幹細胞の前記集団を移植することと、動的攪拌される懸濁培養系内で前記多能性幹細胞集団を分化させることと、を含み、前記細胞を、約 0 . 1 % ~ 約 2 % のウシ血清アルブミンを含む環境内で凝集細胞集団に増殖させる、方法。

[1 2]

前記多能性幹細胞集団が、膵臓前駆細胞集団、神経前駆細胞集団、又は、心筋前駆細胞集団を生成するために分化される、請求項 1 1 に記載の方法。

[1 3]

前記多能性幹細胞が、誘導型多能性幹細胞、ヒト臍帯組織由来細胞、単為生殖生物、ヒト胚性幹細胞（h E S）、及び羊水由来細胞からなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の方法。

[1 4]

請求項 1 1 に記載の方法によって産生される、分化した膵臓前駆細胞の前記集団を含む、移植可能幹細胞由来の細胞産物。

[1 5]

動的に攪拌される懸濁培養系内で多能性幹細胞を増殖させ、分化させる方法であって、
a. 約 0. 1 %～約 2 %のウシ血清アルブミンを含む環境内の平面接着培養下で、前記多能性幹細胞を凝集細胞集団に増殖させることと、
b. 酵素又はキレート剤を使用して、前期平面接着培養から動的懸濁培養へ多能性幹細胞の前記集団を移植することと、
c. 動的に攪拌される懸濁培養系内で前記細胞集団を維持することと、
d. 膵臓前駆細胞集団、神経前駆細胞集団、又は心筋前駆細胞集団を生成するために、動的攪拌される懸濁培養系内で前記多能性幹細胞集団を分化させることと、を含み、
前記分化環境が、ほぼ低酸素から周囲の約 3 0 %の範囲の酸素、0. 1 %～約 2 %の範囲の脂質、又はそれらの組み合わせを含む、方法。

[1 6]

前記幹細胞集団が、C D 9、S S E A 4、T R A - 1 - 6 0、及び T R A - 1 - 8 1 を発現し、C X C R 4 の発現を欠く、請求項 1 5 に記載の方法。

[1 7]

増殖させるための前記環境が R h o キナーゼ阻害剤を更に含む、請求項 1 5 に記載の方法。

[1 8]

前記分化環境が、約 0. 1 %～約 2 %のウシ血清アルブミンを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

[1 9]

前記多能性幹細胞が、誘導型多能性幹細胞、ヒト臍帯組織由来細胞、単為生殖生物、ヒト胚性幹細胞（h E S）、及び羊水由来細胞からなる群から選択される、請求項 1 5 に記載の方法。

[2 0]

前記方法が、β細胞転写因子を発現する膵臓前駆細胞を生成する、請求項 1 5 に記載の方法。

[2 1]

前記転写因子が P D X 1 及び／又は N K X 6. 1 である、請求項 1 5 に記載の方法。