

【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31年2月7日(2019.2.7)

【公表番号】特表2017-537649(P2017-537649A)
 【公表日】平成29年12月21日(2017.12.21)
 【年通号数】公開・登録公報2017-049
 【出願番号】特願2017-532641(P2017-532641)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 1/00 B

C 1 2 Q 1/04

【手続補正書】

【提出日】平成30年12月21日(2018.12.21)

【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】

前腸内胚葉細胞を腭内胚葉細胞に分化させるための方法であって、腭臓転写因子1サブユニット (P T F 1 A)、NeuroG3 (N G N 3)、又はP T F 1 AとN G N 3との両方の発現を防止又は阻害するのに十分な条件下で少なくとも約24時間、懸濁培養において前記前腸内胚葉細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項2】

約1,500,000細胞/mL以上の細胞濃度を有する培養下で前記前腸内胚葉細胞を培養することを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

約2,000,000細胞/mL以上の細胞濃度を有する培養下で前記前腸内胚葉細胞を培養することを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記腭内胚葉細胞が、P T F 1 A及びN G N 3の発現に対して実質的に陰性である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

P T F 1 A及びN G N 3の発現に対して実質的に陰性である前記腭内胚葉細胞を、P D X 1及びN K X 6 . 1の共発現に対して陽性であり、かつP T F 1 Aの発現に対して陽性である細胞を約96%以上有する腭内胚葉細胞の集団に富化させることを更に含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

P T F 1 A及びN G N 3の発現に対して実質的に陰性である前記腭内胚葉細胞を、P T F 1 A発現に対して陽性の細胞が産生される分化ステージを含まずに腭内分泌腺細胞に分化させることを更に含む、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

P T F 1 A、N G N 3、又はP T F 1 AとN G N 3との両方の発現を防止又は阻害する

のに十分な前記条件が、前記前腸内胚葉細胞を約7.0～約7.2のpHで培養することを含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前腸内胚葉細胞を膵内胚葉細胞に分化させるための方法であって、膵臓転写因子1サブユニット（PTF1A）、NeuroG3（NGN3）、又はPTF1AとNGN3との両方の発現を防止又は阻害するのに十分な条件下で少なくとも約24時間、懸濁培養において前腸内胚葉細胞を培養する工程を含み、

前記培養が、約1,500,000細胞/mL以上の細胞濃度、及び約0.5～約1.0µMのレチノイド濃度を含むものであり、

前記培養する工程が、TGF-シグナル伝達及びBMPシグナル伝達の阻害、ブロック、活性化、又は刺激のうち1つ又は2つ以上を行う成分がないとき、かつソニックヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤がないときに実行される、方法。

【請求項9】

PTF1A、NGN3、又はPTF1AとNGN3との両方の発現を防止又は阻害するのに十分な前記条件が、前記前腸内胚葉細胞を約7.0～約7.2のpHで培養することを含む、請求項8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】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

本明細書で使用するとき、「膵内分泌細胞」とは、以下のホルモンのうちの少なくとも1つを発現することが可能な細胞を指す。インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、及び膵臓ポリペプチド。これらのホルモンに加え、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーは、NGN3、NeuroD1、ISL1、PDX1、NKX6.1、PAX4、ARX、NKX2.2、及びPAX6のうち1つ又は2つ以上を含む。細胞に特徴的なマーカーを発現する膵内分泌細胞は、インスリン及び以下の転写因子の少なくとも1つによって特徴付けられ得る。PDX1、NKX2.2、NKX6.1、NEUROD1、ISL1、HNF3、MAFA、PAX4、及びPAX6。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0254

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0254】

上記の開示に基づく発明の例として、以下のものが挙げられる。

[1] ヒト多能性細胞の分化の方法であって、約7.2～約7.0のpHで少なくとも約24時間、動的懸濁培養において前腸内胚葉細胞を培養することによって、前腸内胚葉細胞を膵内胚葉細胞に分化させる工程を含む、方法。

[2] 約1,500,000細胞/mL以上の細胞濃度を有する培養下で前記前腸内胚葉細胞を培養することを更に含む、[1]に記載の方法。

[3] 約2,000,000細胞/mL以上の細胞濃度を有する培養下で前記前腸内胚葉細胞を培養することを更に含む、[1]に記載の方法。

[4] 前記膵内胚葉細胞が、PTF1A及びNGN3の発現に対して実質的に陰性である、[1]に記載の方法。

[5] PTF1A及びNGN3の発現に対して実質的に陰性である前記膵内胚葉細胞を、PDX1及びNKX6.1の共発現に対して陽性であり、かつPTF1Aの発現に対して陽性である細胞を約96%以上有する膵内胚葉細胞の集団に富化させる(enriching)ことを更に含む、[4]に記載の方法。

[6] P T F 1 A 及び N G N 3 の発現に対して実質的に陰性である前記膵内胚葉細胞を、P T F 1 A 発現に対して陽性の細胞が産生される分化ステージを含まずに膵内分泌腺細胞に分化させることを更に含む、[4] に記載の方法。

[7] ヒト多能性細胞の分化の方法であって、約 7 . 2 ~ 約 7 . 0 の p H、少なくとも約 2 4 時間、約 1 , 5 0 0 , 0 0 0 細胞 / m L 以上の細胞濃度、及び約 0 . 5 ~ 約 1 . 0 μ M のレチノイド濃度で、動的懸濁培養において前腸内胚葉細胞を培養することによって、前記前腸内胚葉細胞を膵内胚葉細胞に分化させる工程を含み、

前記培養が、T G F - シグナル伝達及び B M P シグナル伝達の阻害、ブロック、活性化、又は刺激のうち 1 つ又は 2 つ以上を行う成分がないとき、かつソニックヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤がないときに実行される、方法。

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考文献、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。