

【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28年12月1日 (2016.12.1)

【公表番号】特表2016-508726(P2016-508726A)

【公表日】平成28年3月24日 (2016.3.24)

【年通号数】公開・登録公報2016-018

【出願番号】特願2015-558982(P2015-558982)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 N 5/0775 (2010.01)

C 1 2 N 5/0789 (2010.01)

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/22 (2006.01)

A 6 1 K 35/407 (2015.01)

A 6 1 P 1/16 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/071

C 1 2 N 5/0775

C 1 2 N 5/0789

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 5/22

A 6 1 K 35/407

A 6 1 P 1/16

【手続補正書】

【提出日】平成28年10月11日 (2016.10.11)

【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】

幹細胞のフォワードプログラミングにより肝細胞を産生する方法であって、前記方法は、( a ) F O X A 2、G A T A 4、H H E X、H N F I A および T B X 3 をコードする肝細胞プログラミング因子遺伝子を含む少なくとも 1 つの外因性発現カセットで前記幹細胞をトランスフェクトする工程、および ( b ) 前記肝細胞またはその子孫細胞を懸濁培養物として培養する工程を含み、それにより前記幹細胞のフォワードプログラミングから肝細胞を産生する、方法。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの外因性発現カセットが、外部から誘導可能な転写制御エレメントに作動可能に連結されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記幹細胞を M E K 阻害剤および / または A L K 5 阻害剤に接触させる工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記 MEK 阻害剤が PD 0 3 2 5 9 0 1 である、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記 ALK 5 阻害剤が A 8 3 - 0 1 である、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記幹細胞をサイクリック AMP アナログに接触させる工程をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記サイクリック AMP アナログが 8 - Br - c AMP である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記幹細胞が間葉系幹細胞、造血幹細胞、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記幹細胞またはその子孫細胞が、レポーター遺伝子に作動可能に連結された肝細胞特異的転写制御エレメントを含むレポーター発現カセットをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記肝細胞特異的転写制御エレメントが、アルブミン、 $\alpha$ -1-抗トリプシン (AAT)、シトクロム p 4 5 0 3 A 4 (CYP 3 A 4)、アポリポタンパク質 A - I または APOE のプロモーターである、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記肝細胞が、以下：

(i) グルコース - 6 - ホスファターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -1-抗トリプシン (AAT)、サイトケラチン 8 (CK 8)、サイトケラチン 1 8 (CK 1 8)、アシアロ糖タンパク質レセプター (ASGR)、アルコールデヒドロゲナーゼ 1、I 型アルギナーゼ、シトクロム p 4 5 0 3 A 4 (CYP 3 A 4)、肝臓特異的有機アニオントランスポーター (LST - 1) またはそれらの組み合わせを含む 1 つ以上の肝細胞マーカーの発現；

(ii) グルコース - 6 - ホスファターゼ、CYP 3 A 4、胆汁の産生もしくは分泌、尿素の産生、または生体異物の解毒の活性；

(iii) 肝細胞の形態学的特徴；または

(iv) 免疫不全被験体におけるインビボでの肝臓の生着を含む肝細胞の特性のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記肝細胞の特性がアルブミン発現である、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

肝細胞について選択または濃縮する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記幹細胞またはその子孫細胞が、オンコスタチン M (OSM) を含む 1 つ以上の成長因子を含む培地中で培養される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記懸濁培養物がスピナーフラスコにおいて維持される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記スピナーフラスコが約 4 0 ~ 7 0 r p m で作動される、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記懸濁培養物が静置懸濁培養物として維持される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記条件における培養後に 1 5 日未満または約 1 5 日で前記肝細胞を得る工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記条件における培養後に10日未満または約10日で前記肝細胞を得る工程を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

肝細胞に対する薬理的または毒性学的効果について化合物を評価する方法であって、前記方法は：

(a) 請求項1による方法により提供された肝細胞を前記化合物に接触させる工程、および

(b) 前記肝細胞に対する前記化合物の薬理的または毒性学的効果を評価する工程を含む、方法。

【請求項21】

(a) FOXA2、GATA4、HHEX、HNF1AおよびTBX3を含む1つ以上の外因性発現カセット、ならびに

(b) レポーター遺伝子に作動可能に連結された肝細胞特異的プロモーターを含むレポーター発現カセットを含む、肝細胞または幹細胞。

【請求項22】

1つ以上の外因性発現カセットを含む肝細胞または幹細胞であって、

1つ以上の前記外因性発現カセットは、FOXA2、GATA4、HHEX、HNF1AおよびTBX3を含み、前記外因性発現カセットのうちの少なくとも1つは、外部から誘導可能な転写制御エレメントに作動可能に連結されている、肝細胞または幹細胞。

【請求項23】

肝細胞を含む細胞集団であって、前記肝細胞の少なくとも80%は、FOXA2、GATA4、HHEX、HNF1AおよびTBX3をコードする遺伝子を含む1つ以上の外因性発現カセットを含む、細胞集団。

【請求項24】

幹細胞から肝細胞を産生する方法であって、前記方法は：

(a) FOXA2、GATA4、HHEX、HNF1AおよびTBX3をコードする少なくとも肝細胞プログラミング因子遺伝子を含む少なくとも1つの外因性誘導発現カセットで前記幹細胞をトランスフェクトする工程、

(b) 少なくとも1つの前記外因性誘導発現カセットの発現を誘導する工程、

(c) 前記幹細胞をMEK阻害剤および/またはALK5阻害剤に接触させる工程、

(d) 前記幹細胞をサイクリックAMPアナログに接触させ、それにより幹細胞から肝細胞を産生する工程、ならびに

(e) 前記幹細胞またはその子孫細胞を懸濁培養物として培養し、それにより幹細胞から肝細胞を産生する工程

を含む、方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるだろう。しかしながら、この詳細な説明から、本発明の精神内および範囲内の様々な変更および改変が当業者に明らかになるだろうという理由で、詳細な説明および特定の例が、本発明の好本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

幹細胞のフォワードプログラミングにより肝細胞を産生する方法であって、前記方法は

、 F O X A 2、 G A T A 4、 H H E X、 H N F I A および T B X 3 をコードする肝細胞プログラミング因子遺伝子を含む少なくとも 1 つの外因性発現カセットで前記幹細胞をトランスフェクトし、それにより前記幹細胞のフォワードプログラミングから肝細胞を産生する工程を含む、方法。

( 項目 2 )

前記少なくとも 1 つの外因性発現カセットが、外部から誘導可能な転写制御エレメントに作動可能に連結されている、項目 1 に記載の方法。

( 項目 3 )

前記幹細胞を M E K 阻害剤および / または A L K 5 阻害剤に接触させる工程をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

( 項目 4 )

前記 M E K 阻害剤が P D 0 3 2 5 9 0 1 である、項目 3 に記載の方法。

( 項目 5 )

前記 A L K 5 阻害剤が A 8 3 - 0 1 である、項目 3 に記載の方法。

( 項目 6 )

前記幹細胞をサイクリック A M P アナログに接触させる工程をさらに含む、項目 3 に記載の方法。

( 項目 7 )

前記サイクリック A M P アナログが 8 - B r - c A M P である、項目 6 に記載の方法。

( 項目 8 )

前記幹細胞が間葉系幹細胞、造血幹細胞、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞である、項目 1 に記載の方法。

( 項目 9 )

前記幹細胞またはその子孫細胞が、レポーター遺伝子に作動可能に連結された肝細胞特異的転写制御エレメントを含むレポーター発現カセットをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 0 )

前記肝細胞特異的転写制御エレメントが、アルブミン、 - 1 - 抗トリプシン ( A A T )、シトクロム p 4 5 0 3 A 4 ( C Y P 3 A 4 )、アポリポタンパク質 A - I または A P O E のプロモーターである、項目 9 に記載の方法。

( 項目 1 1 )

前記肝細胞が、以下：

( i ) グルコース - 6 - ホスファターゼ、アルブミン、 - 1 - 抗トリプシン ( A A T )、サイトケラチン 8 ( C K 8 )、サイトケラチン 1 8 ( C K 1 8 )、アシアロ糖タンパク質レセプター ( A S G R )、アルコールデヒドロゲナーゼ 1、I 型アルギナーゼ、シトクロム p 4 5 0 3 A 4 ( C Y P 3 A 4 )、肝臓特異的有機アニオントランスポーター ( L S T - 1 ) またはそれらの組み合わせを含む 1 つ以上の肝細胞マーカーの発現；

( i i ) グルコース - 6 - ホスファターゼ、C Y P 3 A 4、胆汁の産生もしくは分泌、尿素の産生、または生体異物の解毒の活性；

( i i i ) 肝細胞の形態学的特徴；または

( i v ) 免疫不全被験体におけるインビボでの肝臓の生着を含む肝細胞の特性のうちの 1 つ以上を含む、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 2 )

前記肝細胞の特性がアルブミン発現である、項目 1 1 に記載の方法。

( 項目 1 3 )

肝細胞について選択または濃縮する工程をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 4 )

前記幹細胞またはその子孫細胞が、オンコスタチン M ( O S M ) を含む 1 つ以上の成長因子を含む培地中で培養される、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 5 )

前記肝細胞またはその子孫細胞を懸濁培養物として培養する工程をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 16)

前記懸濁培養物がスピナーフラスコにおいて維持される、項目 15 に記載の方法。

(項目 17)

前記スピナーフラスコが約 40 ~ 70 rpm で作動される、項目 16 に記載の方法。

(項目 18)

前記懸濁培養物が静置懸濁培養物として維持される、項目 15 に記載の方法。

(項目 19)

前記条件における培養後に 15 日未満または約 15 日で前記肝細胞を得る工程を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 20)

前記条件における培養後に 10 日未満または約 10 日で前記肝細胞を得る工程を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

肝細胞に対する薬理学的または毒性学的効果について化合物を評価する方法であって、前記方法は：

(a) 項目 1 による方法により提供された肝細胞を前記化合物に接触させる工程、および

(b) 前記肝細胞に対する前記化合物の薬理学的または毒性学的効果を評価する工程を含む、方法。

(項目 22)

(a) FOXA2、GATA4、HHEX、HNF1A および TBX3 を含む 1 つ以上の外因性発現カセット、ならびに

(b) レポーター遺伝子に作動可能に連結された肝細胞特異的プロモーターを含むレポーター発現カセットを含む、肝細胞または幹細胞。

(項目 23)

1 つ以上の外因性発現カセットを含む肝細胞または幹細胞であって、

1 つ以上の前記外因性発現カセットは、FOXA2、GATA4、HHEX、HNF1A および TBX3 を含み、前記外因性発現カセットのうちの少なくとも 1 つは、外部から誘導可能な転写制御エレメントに作動可能に連結されている、肝細胞または幹細胞。

(項目 24)

肝細胞を含む細胞集団であって、前記肝細胞の少なくとも 80 % は、FOXA2、GATA4、HHEX、HNF1A および TBX3 をコードする遺伝子を含む 1 つ以上の外因性発現カセットを含む、細胞集団。

(項目 25)

幹細胞から肝細胞を産生する方法であって、前記方法は：

(a) FOXA2、GATA4、HHEX、HNF1A および TBX3 をコードする少なくとも肝細胞プログラミング因子遺伝子を含む少なくとも 1 つの外因性誘導発現カセットで前記幹細胞をトランスフェクトする工程、

(b) 少なくとも 1 つの前記外因性誘導発現カセットの発現を誘導する工程、

(c) 前記幹細胞を MEK 阻害剤および / または ALK5 阻害剤に接触させる工程、ならびに

(d) 前記幹細胞をサイクリック AMP アナログに接触させ、それにより幹細胞から肝細胞を産生する工程を含む、方法。

(項目 26)

前記幹細胞またはその子孫細胞を懸濁培養物として培養する工程をさらに含む、項目 25 に記載の方法。