

【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 12 N	5/071	(2010.01)
C 12 N	5/0775	(2010.01)
C 12 N	5/0789	(2010.01)
C 12 N	5/0735	(2010.01)
C 12 Q	1/04	(2006.01)
C 12 N	15/09	(2006.01)
C 12 N	5/22	(2006.01)
A 61 K	35/407	(2015.01)
A 61 P	1/16	(2006.01)

【F I】

C 12 N	5/071	
C 12 N	5/0775	
C 12 N	5/0789	
C 12 N	5/0735	
C 12 Q	1/04	
C 12 N	15/00	A
C 12 N	5/22	
A 61 K	35/407	
A 61 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つて、前記方法は、(a) FOXA2、GATA4、HHEX、HNF1AおよびTBX3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MEK阻害剤および/またはALK5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 M E K 阻害剤が P D 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 A L K 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 A M P 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 A M P アナログが 8 - B r - c A M P 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力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、 - 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、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、 - 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 18 ( C K 18 ) 、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 、胆汁の產生もしくは分泌、尿素の產生、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、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 ( 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、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 1 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学的または毒性学的效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学的または毒性学的效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力セット、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力セット

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力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力セットは、FOXA2、GATA4、HHEX、HNF1A および TBX3 を含み、前記外因性発現力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力セットを含む、細胞集団。

【請求項 24】

幹細胞から肝細胞を產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 1 つの外因性誘導発現力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力セットの発現を誘導する工程、

(c) 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、

(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產生する工程、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產生する工程

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產生する方法であって、前記方法は

、FOXA2、GATA4、HHEX、HNFIAおよびTBX3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つの外因性発現力セットで前記幹細胞をトランسف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產生する工程を含む、方法。

(項目2)

前記少なくとも1つの外因性発現力セットが、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MEK阻害剤および/またはALK5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MEK阻害剤がP0325901である、項目3に記載の方法。

(項目5)

前記ALK5阻害剤がA83-01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AMP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AMPアナログが8-Br-cAMP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力セットをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目10)

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(AAT)、シトクロムp4503A4(CYP3A4)、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、項目9に記載の方法。

(項目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、-1-抗トリプシン(AAT)、サイトケラチン8(CK8)、サイトケラチン18(CK18)、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p4503A4(CYP3A4)、肝臓特異的有機アニオントrans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、CYP3A4、胆汁の产生もしくは分泌、尿素の产生、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、項目1に記載の方法。

(項目12)

前記肝細胞の特性がアルブミン発現である、項目11に記載の方法。

(項目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、項目1に記載の方法。

(項目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の中で培養される、項目1に記載の方法。

(項目15)

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40～70rpm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效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效果を評価する工程を含む、方法。

(項目22)

(a) F O X A 2、G A T A 4、H H E X、H N F 1 A およびT B X 3を含む1つ以上の外因性発現力セット、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力セット

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力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力セットは、F O X A 2、G A T A 4、H H E X、H N F 1 A およびT B X 3を含み、前記外因性発現力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、F O X A 2、G A T A 4、H H E X、H N F 1 A およびT B X 3をコードする遺伝子を含む1つ以上の外因性発現力セットを含む、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) F O X A 2、G A T A 4、H H E X、H N F 1 A およびT B X 3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力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力セットの発現を誘導する工程、

(c) 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、ならびに

(d) 前記幹細胞をサイクリックA M P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。