

【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30年3月15日(2018.3.15)

【公表番号】特表2018-502574(P2018-502574A)

【公表日】平成30年2月1日(2018.2.1)

【年通号数】公開・登録公報2018-004

【出願番号】特願2017-535829(P2017-535829)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 35/407 (2015.01)

A 6 1 P 1/18 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/071 Z N A

C 1 2 N 5/10

A 6 1 K 35/407

A 6 1 P 1/18

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成29年12月27日(2017.12.27)

【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】

ヒトインスリン産生細胞の集団の製造方法であって、

(a) 成体ヒト組織を得るステップと、

(b) 前記成体ヒト組織を処理して、一次成体ヒト細胞を回収するステップと、

(c) 前記一次成体ヒト細胞を、既定数の細胞に増殖及び増幅させるステップと、

(d) 前記増幅した細胞を分化転換させるステップであって、前記分化転換は、

(1) 前記増幅した細胞に、第 1 の期間において、少なくとも 1 つの発現ベクターを感染させることであって、

(i) 前記少なくとも 1 つの発現ベクターが、PDX - 1 ポリペプチドをコードする核酸を含むアデノウイルスベクター、及び第 2 のヒト腭転写因子ポリペプチドをコードする核酸を含むアデノウイルスベクターを含み、前記アデノウイルスベクターの感染が同時に発生する、該感染させること、または

(i i) 前記少なくとも 1 つの発現ベクターが、ヒト PDX - 1 ポリペプチド、及び第 2 の腭転写因子ポリペプチドをコードする核酸を含むアデノウイルスベクターを含む、該感染させること、及び

(2) (1) の前記増幅した細胞に、Maf A ポリペプチドをコードする核酸を含むアデノウイルスベクターを感染させることであって、前記感染は第 2 の期間に発生し、前記第 2 の期間は前記第 1 の期間の後である、該感染させることを含む、該ステップと、

(e) 前記分化転換した細胞を採取するステップと、を含み、

それにより、前記ヒトインスリン産生細胞の集団を製造し、

前記一次成体ヒト細胞は、胚性特徴を有するステージを経ることがなく、

前記ヒトインスリン産生細胞は、対照非分化一次成体ヒト細胞と比較して、感染後の PDX-1、NeuroD1 及び MafA 転写因子の短期の異所性発現、グルカゴンの発現及び産生、増加したインスリン含有量、増加したグルコース調節インスリン分泌、増加した C-ペプチド分泌、または増加した内因性 Nkx6.1 転写因子、あるいはこれらの任意の組み合わせを含み、

前記インスリン産生細胞は、胚性特徴を発現しない、前記方法。

【請求項 2】

前記増殖及び増幅が、バイオリアクターの使用を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ヒトインスリン産生細胞の集団の製造方法であって、

(a) ヒト組織を得るステップと、

(b) 前記ヒト組織を処理して、一次成体ヒト細胞の集団を回収するステップと、

(c) 前記一次成体ヒト細胞の集団を規定数の細胞に増殖及び増幅させ、前記増殖がバイオリアクターの使用を含むステップと、

(d) 前記増幅した細胞の集団を分化転換させるステップであって、前記分化転換は、

(1) 前記増幅した細胞の集団に、第 1 の期間において、少なくとも 1 つの発現ベクターを感染させることであって、前記少なくとも 1 つの発現ベクターは、PDX-1 ポリペプチドをコードする核酸を含むアデノウイルスベクターを含む、該感染させること、

(2) (1) の前記増幅した細胞の集団に、第 2 の期間において、少なくとも 1 つの更なる発現ベクターを感染させることであって、前記少なくとも 1 つの更なる発現ベクターは、第 2 の隣転写因子を含むアデノウイルスベクターを含む、該感染させること、及び

(3) (2) の前記増幅した細胞の集団に、第 3 の期間において、少なくとも 1 つの更に別の発現ベクターを感染させることであって、前記少なくとも 1 つの更に別の発現ベクターは、MafA ポリペプチドをコードする核酸を含むアデノウイルスベクターを含む、該感染させることを含む、該ステップと、

(e) 前記分化転換した前記増幅した細胞の集団を採取するステップとを含み、

それにより、前記ヒトインスリン産生細胞の集団を製造し、

前記一次成体ヒト細胞は、胚性特徴を有するステージを経ることがなく、

前記ヒトインスリン産生細胞は、対照非分化一次成体ヒト細胞と比較して、感染後の PDX-1、NeuroD1 及び MafA 転写因子の短期の異所性発現、グルカゴンの発現及び産生、増加したインスリン含有量、増加したグルコース調節インスリン分泌、増加した C-ペプチド分泌、または増加した内因性 Nkx6.1 転写因子、あるいはこれらの任意の組み合わせを含み、

前記インスリン産生細胞は、胚性特徴を発現しない、前記方法。

【請求項 4】

ステップ (a) において、前記ヒト組織が、

(a) 膵臓障害、またはインスリン依存性糖尿病に罹患している対象から入手される組織、あるいは

(b) 肝組織、脂肪組織、骨髓、皮膚、胎盤、臍帯、ウォートンゼリーまたは臍帯血、あるいは

(a) 及び (b) の任意の組み合わせを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記一次ヒト細胞が、内皮細胞、上皮細胞、繊維芽細胞、肝細胞 (liver cells)、骨髓細胞、筋細胞、脾臓細胞、腎細胞、血液細胞、皮膚細胞、膵臓細胞、中心周囲肝細胞、非膵細胞、非膵細胞、肝実質細胞 (hepatocytes)、造血幹細胞、肝幹細胞、間葉系幹細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞、胎盤幹細胞、神経幹細胞、または胎児肝細胞を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

(a) 前記バイオリアクターシステムが、単一のバイオリアクターまたは複数のバイオ

リアクターを含む、あるいは

(b) 前記バイオリアクターが、単回使用バイオリアクター、複数回使用バイオリアクター、閉鎖系バイオリアクター、もしくは開放系バイオリアクター、またはそれらの任意の組み合わせを含む、あるいは

(a) 及び (b) の任意の組合せを含む、請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (d) において、前記増幅した細胞の前記分化転換が、一連のバイオリアクターシステムを通じた分化転換を含む、請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 2 の脾転写因子が、NeuroD1 及び Pax4 から選択される、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

分化転換の素因がある細胞に関して、前記一次成体ヒト細胞を富化するステップをさらに含み、前記富化するステップが、前記分化転換に先行するか前記分化転換と同時に起きる、またはその両者である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記素因がある細胞が、

(a) 活性Wntシグナル伝達経路、

(b) グルタミン合成酵素応答要素 (GSR) を活性化する能力、

(c) HOMER1、LAMP3、BMPR2、ITGA6、DCBLD2、THBS1、もしくはVAMP4、またはこれらの細胞が肝細胞を含む場合に、これらの任意の組み合わせの増加した発現、

(d) ABCB1、ITGA4、ABCB4、もしくはPRNP、またはこれらの細胞が肝細胞を含む場合に、これらの任意の組み合わせの減少した発現、あるいは

これらの任意の組み合わせを含む細胞を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記一次成体ヒト細胞において、Wntシグナルの活性化を増加させるステップを更に含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記活性化の誘導が、前記一次成体ヒト細胞をリチウムでインキュベートすることを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記規定数の細胞が、約 10 億 ～ 20 億個の細胞を含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記増幅した細胞の集団の少なくとも 90 % が、ステップ (d) に先行して、CD73、CD90、CD105、またはCD44、あるいはこれらの任意の組み合わせを発現する、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。