

【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】令和 1 年 9 月 12 日 (2019.9.12)

【公開番号】特開 2019-22496 (P2019-22496A)

【公開日】平成 31 年 2 月 14 日 (2019.2.14)

【年通号数】公開・登録公報 2019-006

【出願番号】特願 2018-169154 (P2018-169154)

【国際特許分類】

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 M 1/00 Z

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 5/10

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 7 月 31 日 (2019.7.31)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 9】

P E C の細胞構成は、出願人の先行特許と非特許出願に記載されているように、完全にキャラクタライズされている。たとえば K r o o n ら、2 0 0 8 N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 6 : 4 4 3 - 5 2 , および米国特許 N o . 7 , 5 3 4 , 6 0 8 ; 7 , 6 9 5 , 9 6 5 ; および 7 , 9 9 3 , 9 2 0 ; 発明の名称は生体内インシュリンの製造方法 ; および 8 , 2 7 8 , 1 0 6 、発明の名称はヒト多能性幹細胞から誘導される膵性細胞のカプセル化。流動細胞計測法を使用して、P E C の 1 0 以上の異なった発達ロットからの 2 0 個以上のサンプルの定量化は以下のタイプの細胞を示した。細胞混合物の約 5 0 % (3 3 - 6 0 % の範囲) は、N K X 6 _ . 1 を発現するがクロモグラニン (C H G A) を発現しない細胞から成る。約 4 4 % (3 3 - 6 2 % の範囲) のポリ _ ホルモン性内分泌細胞は C H G A を発現する。C H G A 陽性細胞は、生体内の移植に続いて、グルカゴン発現細胞を発達させ、成熟することが示された。約 7 % (1 . 3 - 1 3 % の範囲) は P D X 1 を発現し、同時に C H G A および N K X 6 _ . 1 を発現しない (P D X 1 だけが存在する) 。非常に小さい細胞群、混合物または集合体における約 1 % (0 . 2 7 - 6 . 9 % の範囲) は上記のマーカー ; P D X 1 、 N K X 6 _ . 1 、 C H G A のいずれも (または、トリプルネガティブ細胞) 発現しない。したがって、P E C またはその同等物は、細胞のこの集合体または混合物をいう。また、P E C 組成物または集合体は、さらに詳細に実施例 2 7 と表 1 2 に記載されている。クルーン他、2 0 0 8 、上掲、シュルツ他、2 0 1 2 、上掲 (その開示は本明細書中に参考としてそれらの全体のすべてを援用する) 。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 5】

【図 1】図 1 は規定された条件 (8 n g / m L F G F 2 、 1 0 0 n g / m L L R - I

G F 1、1 ng / mL アクチビン A (A c t i v i n A) における、B G 0 1 v 中の、A D A M 1 9、ニューレグリン 1、および E r b B 1 - 3 のリアルタイムの R T P C R 発現解析について示す。G A P D H と O C T 4 コントロール反応を示す。

【図 2】図 2 は、A G 8 7 9 を使用した、B G 0 1 v 細胞の増殖抑制について示す。B G 0 1 v 細胞は、6 - ウェルのトレー中にプレーティングされて、プレーティング後、D M S O (A)、5 0 n M - 2 0 マイクロ M A G 1 4 7 8 (B)、または 1 0 0 m M - 2 0 マイクロ M A G 8 7 9 (C) に 2 4 時間暴露された。培養 5 日後に、培養物は、アルカリホスファターゼ活性のために固定され、染色された。A G 1 4 7 8 は、これらの濃度 (B に示された 2 0 マイクロ M) では増殖に影響するようには見えなかったが、A G 8 7 9 は 5 マイクロ M (C) で実質的に細胞成育を遅くした。

【図 3】図 3 は 1 0 n g / mL H R G - 、1 0 n g / mL アクチビン A、2 0 0 n g / mL L R - I G F 1、および 8 n g / mL F G F 2 を含む定義された培養液である D C - H A I F 中で培養された B G 0 1 v 細胞のモルホロジー (A および B) について示す。また 1 0 n g / mL H R G - 、1 0 n g / mL アクチビン A、および 2 0 0 n g / mL L R - I G F 1 を含む定義された培養液で培養された B G 0 1 v 細胞のモルホロジー (C および D) について示す。

【図 4】図 4 はマウス胚性幹細胞 (A) と M E F s (B) 中の R T P C R による A D A M 1 9、ニューレグリン 1、および E r b B 1 - 4 の発現について示す。

【図 5】図 5 はマウス胚性幹細胞中での E r b B 1 と E r b B 2 シグナリングの抑制について示す。2 × 1 0 ⁵ M o u s e R 1 E S 細胞が、1 0 % の F B S 中 1 : 1 0 0 0 の M A T R I G E L (登録商標)、1 0 % の K S R と 1 0 0 0 U / mL マウス L I F (E S G R O) 上にプレーティングされた。翌日、D M S O (対照キャリア)、1 - 5 0 マイクロ M の A G 1 4 7 8、または 1 - 5 0 マイクロ M の A G 8 7 9 が新鮮な培地と共に加えられた。培地は、8 日目に固定されて、アルカリホスファターゼ活性のために染色された。D M S O (A) および 1 - 5 0 マイクロ M の A G 1 4 7 8 (B および C) は増殖を明白に抑制しなかった。A G 8 7 9 は 5 0 マイクロ M のときに実質的に細胞成育を禁止して (D および F の比較)、2 0 マイクロ M (E) で増殖を遅くしたかもしれない。

【図 6 A】図 6 はコンディショニングされた培地 (C M) 中で育てられた B G 0 2 細胞の増殖抑制について示す。(A) 5 0 マイクロ M の A G 8 2 5 は、C M 中で育てられた B G 0 2 h E S C s の増殖を禁止した。(B) A G 8 2 5 は h E S C s 中の E r b B 2 Y 1 2 4 8 リン酸化を抑制する。(C) 増殖因子の異なった併用における C y T 4 9 h E S C s の連続継代のコロニー計数。(D) B G 0 2 細胞を使用する h E S C 増殖における I G F 1 および H R G の役割の細胞計数分析 (左)。(E) 繰返し実験の O C T 4 / D A P I 免疫染色は、A c t A / F G F 2 条件と比べて、I G F 1 と H R G が O C T 4 + 細胞の割合をかなり増加させたことを示した。(F) 一夜増殖因子のない飢餓状態で、次いで 1 5 分、D C - H A I F でパルスされた B G 0 1 D C - H A I F h E S C s の R T K プロテオミクス分析。または、定常状態培養物が示される (左)。規格化された相対強度の平均と範囲がプロットされた (右)。

【図 6 B】図 6 の続き。

【図 6 C】図 6 の続き。

【図 6 D】図 6 の続き。

【図 6 E】図 6 の続き。

【図 6 F】図 6 の続き。

【図 7】図 7 は異なった増殖因子の組み合わせに従って規定された条件で育てられたマウス E S 細胞について示す。(A) 2 × 1 0 ⁵ 細胞が 8 日間異なった増殖因子の組み合わせで育てられた後の、A P + コロニーのスコアを示している。(B - G) 異なった増殖因子の組み合わせで育てられた A P + コロニーの 4 倍イメージを示す。

【図 8 A】図 8 は D C - H A I F 培地中で維持されるヒト胚性幹細胞のキャラクタリゼーションについて示す。(A) B G 0 2 D C - H A I F p 2 5 細胞からの奇形腫の分析は外胚葉、中胚葉および内胚葉への多分化能分化能を示した。(B) 分化した 1 5 % F C

S / 5 % K S R 中で培養された B G 0 2 細胞の免疫染色。(C) C M 中 (6 4 継代) または D C - H A I F (規定された培地内で 1 0 または 3 2 継代) で維持された B G 0 2 細胞中の 4 7 , 2 9 6 の転写プロンプを含む高密度イルミナ セントリックス ヒューマン - 6 エクスプレッション ビードチップス (I l l u m i n a S e n t r i x H u m a n - 6 E x p r e s s i o n B e a d c h i p s) を使用して調査された転写の分配のベン図。(D) B G 0 2 D C - H A I F p 3 2 細胞の転写プロファイルが、C M 中で維持された B G 0 2 細胞のものと非常に類似し (上部) 、D C - H A I F での初期および終期の継代培養と実質的に変化されなかった (下部) ことを示すスキャッタープロット分析。(E) ビードスタジオ (B e a d s t u d i o) ソフトウェアを使用することで作られた異なったポピュレーションにおける相対遺伝子表現の階層的な菌株群形成樹状図。

【図 8 B】図 8 の続き。

【図 8 C】図 8 の続き。

【図 8 D】図 8 の続き。

【図 9】図 9 は D C - H A I F 媒地の存在下で、ヒト化細胞外マトリックス (E C M s) 上で培養された細胞のモルホロジーについて示す。(A) 増殖因子の減少された M A T R I G E L (登録商標) (1 : 2 0 0 に希釈) 上で成長された C y T 4 9 細胞 (1 : 2 0 0 に希釈) 。C y T 4 9 細胞はまた、(B) 全ヒト血清、(C) ヒトフィブロネクチン、および (D) V I T R O G R O (登録商標) でコーティングされた組織培養皿で成長された。

【図 1 0】図 1 0 はヒト胚性幹細胞の単独細胞継代について示す。(A - D) A C C U T A S E (登録商標) での継代および 6 0 m m の培養ざら中のおよそ 5×10^5 の細胞のプレーティングの後の、ステージごとの B G 0 2 細胞のイメージ。(A) 初期の平板培養の 1 . 5 時間後、生存細胞が皿に接着していることを示す。(B) 平板培養後 2 0 時間では、細胞の大多数は集合し、小さいコロニーを形成した。これらのコロニーは、平板培養後 4 日まで、増殖して拡大し (C) 、5 - 6 日間の経過で皿全体を覆いながら上皮のような単分子層を形成する (D) 。(E) D C - H A I F 中で A C C U T A S E (登録商標) とともに 1 9 回継代した B G 0 2 培養で示された正常な男性核型。

【図 1 1】図 1 1 は、(A) A C C U T A S E (登録商標) 、(B) 0 . 2 5 % トリプシン (T r y p s i n) / E D T A 、(C) T r y p L E 、または (D) バーシーン (V e r s e n e) を使用したヒト胚性幹細胞の単独細胞継代の後の細胞モルホロジーを示す。

【図 1 2】図 1 2 は D C - H A I F 中で培養されたヒト胚性幹細胞の大規模な成長について示す。(A) $> 10^{10}$ の細胞へのエキスパンションの後の B G 0 2 細胞のフローサイトメトリー解析。 $> 85\%$ の細胞は O C T 4 、C D 9 、S S E A - 4 、T R A - 1 - 8 1 を発現した。(B) O C T 4 、N A N O G 、R E X 1 、S O X 2 、U T F 1 、C R I P T O 、F O X D 3 、T E R T 、および D P P A 5 の多分化能マーカーの発現の R T P C R 分析。分化型リネッジ (d i f f e r e n t i a t e d l i n e a g e s) のマーカー、- フェトプロテイン (A F P) 、M S X 1 、および H A N D 1 は検出されなかった。(C) ヒト染色体特異性反復配列 (h u m a n c h r o m o s o m e - s p e c i f i c r e p e a t s) を使用する蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション (F I S H) が、h C h r 1 2 、1 7 、X および Y の標準のコピー数の維持を示した。

【図 1 3】図 1 3 は、7 代または 2 カ月より長い期間、F G F 2 の非存在下で、H R G - と I G F 1 を含む規定された培地中で成長された h E S C B G 0 2 細胞のモルホロジー (A) と正常核型 (B) について示す。

【図 1 4】図 1 4 は、D C - H A I F (3 2 代) または D C - H A I (1 0 代) 中で維持された h E S C s (B G 0 2) からの転写のスキャッタープロット分析について示す。大部分の転写の発現が両方のサンプルで検出された。そして、転写性は、外因の F G F 2 が非存在下での h E S C s の培養によっては、実質的に変化されなかった。相関係数 (R^2) が、 > 0 (すべてのドット) の発現水準でのすべての検出された転写を使用することで、または $> 0 . 99$ の検出信頼度を示す転写で求められた (R^2 s e l e c t 、点線の

楕円形により示される)。斜線は、平均および2フォールドディファレンス(2-fold difference)の限界を示す。

【図15】図15はDC-HAIFで維持された初期および晩期の継代BG02細胞の異なるポピュレーションにおける相対遺伝子発現の階層的な菌株群形成樹状図を示す。細胞は、密接(約0.0075)に群生し、コンディショニングされた培地(CM)でBG02およびBG03細胞が同様に維持された(約0.037)。また、DC-HAIF中で維持されたBG02細胞は、他の評価されるhESCポピュレーションと密接して群生される。説明として、図15では、CMはコンディショニングされた媒体である。DCは、上で定義されるように、定義された培養液DC-HAIFである。apはACCUTASE(登録商標)単独細胞継代である。DC-HAIFは、FGF2を含まないことを除いて、本明細書に定義されるような、DC-HAIFと同じである。

【図16】図16は96-ウエルおよび384-ウエルのDC-HAIF中で培養されたBG02細胞のモルホロジーとアルカリ性ホスファターゼ染色について示す。96-ウエルプレートの1つのウエルで成長したBG02細胞(10^4 細胞/ウエル)の相コントラストイメージング(A)および(B)アルカリ性ホスファターゼ染色。384-ウエルプレートの1つのウエルで成長したBG02細胞(10^3 細胞/ウエル)の相コントラストイメージング(C)および(D)アルカリ性ホスファターゼ染色。

【図17】図17はDC-HAIFで懸濁培養で育てられたBG02の暗視野イメージについて示す。2日目と6日目の培養物について示す。4倍率を使用することでイメージを得た。

【図18】図18はDC-HAIFの接着および懸濁培養での成長速度について示す。接着および懸濁培養で平行なウエルで 1×10^6 細胞のBG02がプレーティングされた。細胞数は1-6日で数えられた。

【図19】図19は懸濁および接着hESCsのqPCR分析について表現する。懸濁液中で成長するBG02細胞(S.hESCs)と接着培地で成長するもの(hESCs)は同等なレベルのOCT4発現およびSOX17発現の欠如を示した。胚体内胚葉(DE)に分化した接着細胞、および懸濁液中で胚体内胚葉(S.DE d3)に分化した懸濁hESCsは、ともに期待された顕著なOCT4の少ない発現とSOX17の多い発現を示した。

【図20】図20は懸濁培養におけるY27632の存在下でのhESC集合の増大について示す。3mLのDC-HAIFまたはDC-HAIF + Y27632中に、 2×10^6 のBG02細胞をシードし、6-ウエルのトレイ中で、100rpmの回転台上でインキュベータ内においた。1日目と3日目に集合体のイメージを得た。

【図21】図21はY27632の存在下での懸濁集合体のRT-PCR分析について示す。RT-PCRは、多分化能のマーカーの発現を評価するために増殖した培養物に実行された。OCT4、NANOG、REX1、SOX2、UTF1、CRIPTO、FOX D3、TERTおよびDPPA5は検出された。分化型リネッジのマーカーであるAFP、MSX1、およびHAND1は検出されなかった。

【図22A】図22A-Nはマーカー遺伝子OCT4(パネルA)、BRACH(パネルB)、SOX17(パネルC)、FOX A2またはHNF3beta(パネルD)、HNF1beta(パネルE)、PDX1(パネルF)NKX6.1(パネルG)、NKX2.2(パネルH)、INS(パネルI)、GCG(パネルJ)、SST(パネルK)、SOX7(パネルL)、ZIC1(パネルM)、AFP(パネルN)、HNF4A(パネルO)、およびPTF1A(パネルP)の発現様式を示す棒グラフである。これは完全なリストではないが、多分化能ヒト胚性幹(hES)細胞(ステージ0、d0)、胚体内胚葉細胞(ステージ1; d2)、PDX1-陰性の前腸内胚葉細胞(ステージ2; d5)、PDX1-陽性内胚葉細胞(ステージ3、d8)、脾性内胚葉細胞(ステージ4; d11)、脾性内分泌性先駆、および/またはホルモン分泌細胞(ステージ5; d15)を同定するために使用できる。

【図22B】図22の続き。

【図 2 2 C】図 2 2 の続き。

【図 2 2 D】図 2 2 の続き。

【図 2 2 E】図 2 2 の続き。

【図 2 2 F】図 2 2 の続き。

【図 2 2 G】図 2 2 の続き。

【図 2 2 H】図 2 2 の続き。

【図 2 2 I】図 2 2 の続き。

【図 2 2 J】図 2 2 の続き。

【図 2 2 K】図 2 2 の続き。

【図 2 2 L】図 2 2 の続き。

【図 2 2 M】図 2 2 の続き。

【図 2 2 N】図 2 2 の続き。

【図 2 2 O】図 2 2 の続き。

【図 2 2 P】図 2 2 の続き。

【図 2 3】図 2 3 は、培養物における培地の全容積 (mL) と 관련된懸濁液の細胞集合体の直径 (ミクロン) の範囲を示すグラフである。

【図 2 4 A】図 2 4 A - D は、hES - 由来細胞中の PDX 1 (パネル A)、NKX 6.1 (パネル B)、NGN 3 (パネル C)、および NKX 2.2 (パネル D) の、それらが由来する hES 細胞培養の細胞濃度との関連での、マーカー遺伝子の発現パターンを示す棒グラフである。

【図 2 4 B】図 2 4 の続き。

【図 2 4 C】図 2 4 の続き。

【図 2 4 D】図 2 4 の続き。

【図 2 5】図 2 5 は、0 日 (d 0) での多能性細胞の細胞集合体の直径と、2、5、8 および 12 日目 (それぞれ d 2、d 5、d 8、および d 12) の分化した細胞集合体の直径を示す。測定された細胞集合体サイズは、最小、最大、2 番目と 3 番目の四分線、およびメジアンを示しながらプロットされた。毎日、 1×10^6 細胞 / mL (左) と 2×10^6 細胞 / mL (右) から形成された細胞集合体を示している。

【図 2 6 A】図 2 6 A - D は、回転ボトル容器フォーマット中の種々の示した標識遺伝子の発現パターンを示している棒グラフである。それぞれのチャートの左のサンプルは 6 ウェルのトレイの中に形成されたゼロ日目 (d 0) の細胞集合体 (多能性細胞マーカー対照) を表す。棒によってマークされたサンプルは、(左から右に向かって) : 0 日目の未分化集合体、および 2、5、8、12 日目の分化した集合体を示す。黒い棒は、 1×10^6 細胞 / mL の回転ボトル ; 黒いダッシュの付いた棒は 2×10^6 細胞 / mL の回転ボトル ; 灰色の棒は、6 ウェルのトレイである。

【図 2 6 B】図 2 6 の続き。

【図 2 6 C】図 2 6 の続き。

【図 2 6 D】図 2 6 の続き。

【図 2 7 A】図 2 7 A - D は、実施例 2 7 の表 1 1 と 1 2 に記載されているように、より大きい回転ボトル容器フォーマット中の種々の示したマーカー遺伝子の発現パターンを示している棒グラフである。左のサンプルは 6 ウェルのトレイ hESC 集合と分化 (対照 ; 図 2 7 A) を表す。0、2、5、8、および 12 日目での、ベントされた (V) またはベントされない (NV) 490 cm^2 ローラーボトル (約 1.2 L 容量) での分化が示されている。2 日目のサンプルは培養物の損失のため、最後の 490 V のサンプル (一番右のカラム) については採取されなかった。同じ d 0 コントロールはそれぞれのローラーボトル分化 (アスタリスク) に使用された。

【図 2 7 B】図 2 7 の続き。

【図 2 7 C】図 2 7 の続き。

【図 2 7 D】図 2 7 の続き。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

本明細書において使用される時、「分化可能な細胞」という用語は、少なくとも部分的に成熟した細胞に分化できる細胞または細胞集合、または細胞の分化、たとえば他の細胞との融合、または少なくとも部分的に成熟した細胞への分化に参加できるものを記載するために使用される。本明細書において使用される時、「部分的に成熟している細胞 (partially mature cells)」、「前駆細胞 (progenitor cells)」、「未熟細胞 (immature cells)」、「前駆体細胞 (precursor cells)」、「多能性細胞 (multipotent cells)」、およびそれらと同等の用語は、例えば、胚体内胚葉細胞、PD X 1 陰性前腸内胚葉細胞、PD X 1 陽性プレ腸性内胚葉細胞を含む PD X 1 陽性の腸性内胚葉細胞、PD X 1 陽性腸性内胚葉端細胞のような、末端分化細胞を含む。すべてが、同じ臓器または組織からの成熟細胞の、たとえばモルホロジーまたは蛋白質発現などの遺伝表現型の少なくとも1つの特徴を示すが、さらに他の少なくとも1つの細胞タイプに分化できる。例えば、正常の、成熟したヘパトサイトは、アルブミン、線維素原、 α -1-アンチトリプシン、プロトロンビン凝固因子、鉄結合性グロブリン、およびシトクロム P - 450 などの解毒酵素のようなタンパク質を通常発現する。したがって、本発明において「部分的に成熟しているヘパトサイト」は、アルブミンまたは別の1種以上のタンパク質を発現することができるか、または正常で、成熟したヘパトサイトの外観または機能を持ち始めることができる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0085

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0085】

本明細書に記載された細胞集合体は、ホモ細胞集合体またはヘテロ細胞の集合体である場合がある。本明細書において使用される時、「ホモ細胞」、「単細胞」の細胞集合体またはその同等の表現は懸濁液中の複数の細胞集合体を示す。ここで各細胞集合体は実質的に単独細胞の複数の生細胞を含む。たとえば本明細書の方法で製造される h E S 細胞集合体は、実質的にホモ細胞であることができ、多分化能 h E S 細胞から実質的に成ることができ、胚体内胚葉細胞から実質的に成ることができ、前腸内胚葉細胞から実質的に成ることができ、腸性内胚葉細胞から実質的に成ることができ、さらに PD X 1 - 陽性のプレ腸性内胚葉細胞、PD X 1 - 陽性の腸性内胚葉細胞、PD X 1 - 陽性の腸性内胚葉、腸性の内分泌性前駆細胞、腸臓内分泌細胞、および同様のものであることができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0086

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0086】

本明細書において使用される時、「実質的に」または「本質的に」との用語は、「デミニマム (de minimus)」または少量の成分または細胞が細胞集合体懸濁液タイプ内に存在することを意味し、たとえば本明細書に記載された懸濁液における細胞集合体は「本質的にまたは実質的に均質」であり、「本質的にまたは実質的にホモ細胞」であり、「本質的に h E S 細胞」であり、「本質的にまたは実質的に胚体内胚葉細胞」であり、「本質的にまたは実質的に前腸内胚葉細胞」であり、「本質的にまたは実質的に PD X

1 - 陰性の前腸内胚葉細胞」であり、「本質的にまたは実質的に PDX 1 - 陽性のプレ膵性内胚葉細胞」であり、「本質的にまたは実質的に PDX 1 - 陽性の膵性内胚葉または前駆細胞」であり、「本質的にまたは実質的に PDX 1 - 陽性の膵性内胚葉端細胞」であり、「本質的にまたは実質的に膵性内分泌腺の前駆細胞」であり、「本質的にまたは実質的に膵性内分泌腺の細胞」、および同様のものである。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0093】

胚様体は本発明で記載される細胞集合体とは異なり、3つの胚葉からの多数の細胞タイプで作られた細胞集合体であり、典型的には未分化型胚性幹細胞の集合体を非有向性分化シグナル(non-directed differentiation signals)、たとえば20%のウシ胎仔血清などに暴露することによって作成される細胞集合体である。この非有向性方法論の結果は、生体外で通常の胎児成長をまねることを意図する細胞タイプの混合物である。このアプローチは基礎研究レベルで胎児成長を調べることに役立つが、それは細胞収率、集合体のアイデンティティ、集合体の純粋さ、バッチの一貫性、安全性、細胞機能、および商品原価が主要な関心であるところのすべての大規模な細胞治療製造プロセスには適用できない。そのうえ、胚様体から所定の細胞タイプを精製するのに使われた任意の富化作用戦略にかかわらず、分化プロトコールは単独細胞タイプの大集合体を発生させる直接的なアプローチを提供しない。それに続いて、汚染物集合体がいつも支配的であり、特定集合体を精製するどんな試みも妨げるだろう。胚性幹細胞の集合体を作成して、分化することへのすべての先行研究は、それらの方法論において以下のコンポーネントの一個以上を有する：

- 1) ヒト胚性幹細胞ではなくマウスの使用
- 2) 通常の細胞接着過程ではなく、細胞を集合させるために遠心沈殿に依存する強制集合プロトコール
- 3) 静的条件における、細胞塊の集合
- 4) 非単独細胞解離または表面の細胞をこすり落とすことによる集合体の形成
- 5) すべての胚様体と胚葉の細胞タイプの形成をもたらす、15 - 20%の胎児ウシ血清を使用する細胞集合体の非直接分化。

我々の知識によれば、胚様体を分化するのに15 - 20%のFCSを利用しない唯一の研究が、細胞集合体が強制的な集合で形成されて、次に集合体がすぐに中胚葉に、適切な培地を使用して分化されるプロトコールについて説明する(Ngら、Blood, 2005, 106(5): 1601)。しかしながら、この仕事では、10 - 12日間静的に集合された後、研究者が非集合の接着培養に胚様体を移しているのも、本発明とは無関係である。従来の仕事と対照的に、本発明は1) ヒト胚性幹細胞を単独細胞に分離し、集合直径および細胞生存のコントロールを改良するために最適化されたせん断速度で回転培養(rotational culture)することによる集合体の形成、

2) 次に直接、胚体内胚葉へES細胞集合体を分化させ、前腸内胚葉に分化させ、プレ膵性前腸内胚葉へ分化させ、次いで膵性内胚葉および最終的に膵臓内分泌細胞へ分化させる。

この分化プロトコールは高能率と最小量の汚染物集合体で、胚体内胚葉および膵性リネッジ集合体を発生させる。そのうえ、他のすべての公開された研究と対照的に、胚性幹細胞集合と分化へのこのアプローチは胚様体を作成しない。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

分化型および未分化細胞の混合物であり、典型的には数個の胚葉からの細胞から成り、ランダムな分化を行う胚様体と対照的に、本明細書に記載された細胞集合体は、本質的にまたは実質的にホモ - セルであり、多分化能、バイポーテント (b i p o t e n t) 、またはユニポーテント (u n i p o t e n t) タイプの細胞の集合体として存在し、たとえば胚細胞、胚体内胚葉、前腸内胚葉、PDX1 - 陽性の膵性内胚葉、膵臓内分泌細胞、および同様のものとして存在する。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0096

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0096】

本明細書に記載された分化培養条件とhES - 由来の細胞タイプは、実質的にd'Amour他、2006、上掲、で記載されていたものと同様である。d'Amour他、2006、は5ステップ分化プロトコールについて説明する：

ステージ1 (実質的に胚体内胚葉生産)

ステージ2 (実質的にPDX1 - 陰性の前腸内胚葉生産)

ステージ3 (実質的にPDX1 - 陽性の前腸内胚葉生産)

ステージ4 (実質的に、膵性内胚葉、または上皮または膵性内分泌性前駆体生産) 、および

ステージ5 (実質的に、ホルモン発現性内分泌細胞生産) 。

重要なことには、初めて、本明細書に記載された懸濁法でこれらのすべての細胞形を製造できる。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0097

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0097】

本明細書において使用される時、「胚体内胚葉 (DE) 」は、腸管または腸管に由来する臓器細胞に分化できる多分化能内胚葉リネッジ細胞を示す。ある実施態様によると、胚体内胚葉細胞はほ乳動物細胞である。そして、好適な実施態様では、胚体内胚葉細胞はヒト細胞である。本発明のいくつかの実施態様では、胚体内胚葉細胞は、発現するか、またはあるマーカーを有意に発現しない。いくつかの実施態様では、SOX17、CXCR4、MXL1、GATA4、HNF3beta、GSC、FGF17、VWF、CALCR、FOXQ1、CMKOR1、CRIP1、およびCERから選ばれた1種以上のマーカーは、胚体内胚葉細胞の中で発現される。他の実施態様では、OCT4、 - フェトタンパク (AFP) 、スロムボムデュリン (Thrombomodulin (登録商標)) 、SPARC、SOX7、およびHNF4alphaから選ばれた1種以上のマーカーは、胚体内胚葉細胞の中で有意に発現されない。胚体内胚葉細胞集合体とその生産方法は、2004年12月23日に出願された、名称が胚体内胚葉 (DEFINITIVE ENDODERM) の、米国特許出願第11/021,618に記載されており、この出願は全体が本明細書に組み込まれる。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 9 8 】

本発明のさらに異なる実施態様は、「PDX 1 - 陰性の前腸内胚葉細胞」および「前腸内胚葉細胞」、およびそれらの同等物の細胞培養と細胞集合体に関する。PDX 1 - 陰性の前腸内胚葉細胞は、また多分化能であり、様々な細胞と、胸腺、甲状腺、副甲状腺、肺 / 気管支、肝臓、咽頭部、嚔嚢、十二指腸の一部およびエウスターキオ管を含む組織をもたらすことができる。いくつかの実施態様では、前腸内胚葉細胞は、SOX 17、HNF 1 B、HNF 1 、FOXA 1 を非前腸内胚葉細胞、たとえばこれらのマーカーを有意に発現しない胚体内胚葉またはPDX陽性の内胚葉と比べて、増加するレベルで発現する。PDX 1 - 陰性の前腸内胚葉細胞は、PDX 1、AFP、SOX 7、およびSOX 1 を低レベルで発現するかまたは全く発現しない。PDX 1 - 陰性の前腸内胚葉細胞集合体とその生産方法は、2006年10月27日に出願された、PDX 1発現性の背側および腹側の前腸内胚葉細胞(PDX 1 - expressing dorsal and ventral foregut endoderm)のタイトルの米国特許出願第11 / 588 , 693に記載され、この出願は全体が本明細書に組み込まれる。

【 手 続 補 正 1 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 1 0 4

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 1 0 4 】

間葉の胚体内胚葉細胞と比べて、上記の細胞形の大部分は上皮化される。いくつかの実施態様において、腭性内胚葉細胞は、2006年10月27日に出願された、PDX I 発現性の背側および腹側の前腸内胚葉細胞(PDX 1 EXPRESSING DORSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM)の名称の米国特許出願11 / 588 , 693に記載された表3から選択される1つ以上のマーカー、および / または表4から選択される1つ以上のマーカー、および2005年4月26日に出願されたPDX 1発現性の内胚葉細胞(PDX 1 - expressing endoderm)の名称の米国特許出願11 / 115 , 868の1種以上のマーカーを発現する。これらは本明細書中に参考として全体が援用される。

【 手 続 補 正 1 2 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 1 9 5

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 1 9 5 】

部分的に、末端に、または可逆的に本発明の分化可能な細胞を分化するのに細胞分化媒体または環境を利用できる。本発明によると、細胞分化環境の培地は、さまざまな成分、たとえば、KODMEM培地(Knockout Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、DMEM、HamのF12培地、FBS(ウシ胎仔血清)、FGF 2(線維芽細胞増殖因子2)、KSRまたはhLIF(ヒト白血病阻止因子)を含むことができる。また、細胞分化環境は、たとえばL-グルタミン、NEAA(非必須アミノ酸)、P/S(ペニシリン/ストレプトマイシン)、N2、B27およびメルカプトエタノール(ME)のようなサプリメントを含むことができる。以下のような追加要素を細胞分化環境に加えることができると企図される; フィブロネクチン、ラミニン、ヘパリン、ヘパリン硫酸塩、レチノイン酸、表皮細胞増殖因子ファミリー(EGFs)のメンバー; FGF 2、FGF 7、FGF 8、および / またはFGF 10を含む線維芽細胞増殖因子ファミリー(FGFs)のメンバー、血小板由来増殖因子ファミリー(PDGFs)のメンバー; 転換増殖因子(TGF) / 骨形成たん白質の(BMP) / 成長および分化因子(GDF)ファミリーのアンタゴニスト、これらに限定されるものではないがたとえば、ノギン、ホリスタチン、コルジン、グレムリン、セルベラス/DANF

ファミリー蛋白質、ベントピン、高ドーズアクチビン、およびアムニオンレス (amni onless) ; 変異体またはそれらの機能的な断片。TGF / BMP / GDFアンタゴニストも、TGF / BMP / GDF受容体 - Fcキメラの形で加えることができる。加えることができる他の要素としては、Notch受容体ファミリー (Notch receptor family) を介してシグナリングを活性化または不活性化できる分子類、これらに制限されるものではないが、たとえば、デルタ - 様 (Delta-like) およびジャグド (Jagged) ファミリーのタンパク質、並びにノッチ (Notch) プロセッシング、または解裂の阻害剤、またはそれらの変異体および機能的な断片を含んでいる。他の増殖因子としては、インスリンの様の増殖因子ファミリー (insulin like growth factor family: IGF)、インスリン、ウイングレスリレイテッド (WNT) 因子ファミリー (wingless related (WNT) factor family)、ヘッジホッグ因子ファミリー (hedgehog factor family)、それらの変異体または機能的な断片があげられる。内胚葉系中胚葉幹 / 前駆細胞、内胚葉幹 / 前駆細胞、中胚葉幹 / 前駆細胞、または胚体内胚葉幹 / 前駆細胞の増殖と生存を促進するため、並びにこれらの前駆細胞の由来体の生存や分化を促進するために、追加要素を加えることができる。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0240

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0240】

実施例14 - 懸濁培養でエキスパンドされた分化可能な細胞の特性

定量的RT-PCR (qPCR) は、DC-HAIF中での懸濁培養および接着培養で育てられたhESCsの遺伝子発現を比較するのに使用された。多能性細胞のマーカーであるOCT4の同程度が、両方の培養形式で観測され、懸濁培養で維持された培養が、本来未分化であったことが確認された。胚体内胚葉のマーカーであるSOX17は、hESCsのどちらの集合体でも発現されなかった。また、qPCR分析は懸濁培養hESCsが、懸濁における集合体として胚体内胚葉に分化する可能性を調べた。接着および懸濁hESCsは、同じ条件を使用して分化された。2%のBSA、100ng/mL アクチビン A、8ng/mL FGF2、および25ng/mL Wnt3Aを含むRPMIでhESC培養物が24時間処理され、次いで、Wnt3Aを含まずに同じ培地で2日間処理した。未分化型hESCsと比べて、両方の胚体内胚葉のサンプルでOCT4の発現は減少され、SOX17の発現は増大された。この分化分析は、DC-HAIFでの懸濁培養で培養されたhESCsが、胚体内胚葉の同様な形成で証明されるように、それらの分化能を維持したことが確認された。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0255

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0255】

細胞集合体の直径はせん断速度に従って変化するが、様々な条件、すなわち異なる回転速度、および / または細胞集合体の異なるサイズおよび形状において遺伝子発現には甚大な効果は全くないことに留意することは重要である。すなわち、多分化能hES細胞またはhES細胞 - 由来細胞タイプ (例えば、胚体内胚葉、前腸内胚葉、PDX1内胚葉、脾性内胚葉、および内分泌細胞) のために観察された署名マーカーが、上記の本明細書に参照され組み込まれているd'Amour他の出願およびそれらの関連出願で説明されたことと一致していた。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0259

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0259】

実施例18 - 懸濁培養におけるhES細胞集合体は内胚葉リネッジタイプ細胞に分化できる

上記のd'Amour他(2006)および米国特許出願番号2005/0266554、2005/0158853、2006/0003313、2006/0148081、2007/0122905と2007/0259421に記載されているように、ヒト胚性幹(hES)細胞は、生体外で維持され、胚体内胚葉(ステージ1)、前腸内胚葉、およびPDX1内胚葉に分化する。上記の文献は参照され、その全体が本明細書の一部として組み込まれる。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0264

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0264】

胚体内胚葉(ステージI)への分化

ヒトES細胞集合体は初日はRPMI、100ng/mLアクチビンAおよび可変濃度のFBS(US Defined FBS、HyClone、カタログNo. SH30070.03)、および25ng/mL - 75ng/mL Wnt3a、2日目と3日目(d0からd2)は、さらに100ng/mLアクチビンAおよび可変濃度のFBS(HyClone)を含むRMPI、ペン/ストレプ、およびグルタマックス培地において分化された。3日のステージ1実験計画が使用されるか、または望ましい場合には、ほとんどの分化実験FBS濃度は、最初の24時間(d1)では0%、第2の24時間(d2)については0.2%(d2)、および第3の24時間(d3)については0.2%(d3)である。望ましくは、2日のステージ1実験計画が実行される。

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0265

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0265】

2日のステージ1実験計画の終わりの懸濁培養における、hES - 由来細胞集合体のQPCR分析は、接着プレート対照と比べて、hES集合体の胚体内胚葉へ向けての高能率的な有向分化を示す。細胞集合体は100rpm、120rpm、および140rpmで形成された。いくつかの実験では、hES - 由来集合体が、分化の前にバイオリアクタ(スピナーフラスコ)に移された。胚体内胚葉細胞に分化したhES細胞培養と、接着hES細胞培養物がコントロールとして使用された。未分化型hES細胞集合体と接着性のプレートコントロールと比べて、SOX17とFOXA2の増加した発現レベルが懸濁培養と接着培養の細胞集合体で観測された。図22、パネルC(SOX17)、およびD(FOXA2)のステージ1(d2)を参照。さらに、内胚葉の最終的な接着プレートコントロールと比較して、SOX7、胚体外および臓器の内胚葉を汚染と関連する遺伝子の発現水準は、胚体内胚葉細胞集合体内でかなり減少した。図22、パネルLのステージ1(d2)を参照。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0267

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0267】

さらにhES細胞集合体分化の効率を評価するために、ES-由来細胞集合体の凍結切片が、SOX17およびHNF3β発現について、免疫細胞学および共焦点顕微鏡を使用することで調べられた。染色された凍結切片の像解析は、ステージ1（胚体内胚葉細胞）の終期のすべての細胞のほぼ90%以上が、HNF3βおよび/または、SOX17を発現したことを示した。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0268

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0268】

これらのデータはすべて、細胞集合体としての胚性幹細胞の高能率的な分化が達成でき、識別領域の胚体内胚葉マーカー（signature definitive endoderm marker）の発現水準に基づいて、接着平板培養の分化と比べて、本明細書に記載されるように、胚体内胚葉を製造するための方法は、より効率的であることを示す。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0270

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0270】

QPCR分析は、実質的に上で議論したようにして実行された。接着性の平板培養のコントロールと比較して、HNF1とHNF4αの増加した発現レベルが細胞集合体培養で観測された。図22、パネルE（HNF1β）、およびパネルO（HNF4α）のステージ2（d5）を参照。具体的ステージ0、1、2、および5hESまたはhES-由来細胞集合体（または、分化型集合体についての「dAggs」）を製造する方法はパネルOでわずかに変更された。この文脈では、分化された細胞集合体は、対応するステージの、それらが由来する接着平板対照培養から開始された、分化されたhESまたはhES-由来細胞集合体をいう。例えば、ステージ1では、分化細胞集合体（「dAggs」）懸濁培養は、ステージ0の接着性プレートから開始され、100rpmから140rpmの回転プラットフォーム上で約24時間、本明細書に記載された培地のいずれでインキュベートされる。これらの分化型細胞集合体は、対応する接着性のプレート対照でステージ1の胚体内胚葉細胞にさらに分化された。図22、パネルOは、ステージの1つの分化細胞の集合体または接着性のプレート対照のどちらかにも、顕著なHNF4α（HNF4A）発現がないことを示している。対照的に、同様の方法がステージ2のサンプルのために行われて、HNF4Aを発現量の増加したレベルで製造した。ステージ5のサンプルでは、HNF4Aの発現も確固としている。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0289

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0289】

ステージ1（分化プロトコールへの約d2またはd3；胚体内胚葉タイプ細胞）の終期で、接着培養はPBS+/-で1度洗浄され、1mLまたは5mLピペットを使用して37にあらかじめ暖かくされたアキュターゼ（Accutase）の2mLで、約2-5

分、単独細胞に分離された。次に、RMP I、ペンノストレブ、およびグルタマックス培地中の10% FBSの4 mLが加えられ、単独細胞懸濁液は40ミクロンの青色フィルター(BD Biosciences)を通して濾過され、50 mL円錐管に入れられた。細胞は、実質的に上で説明したように、数えられて、ペレットにされた(遠心分離された)。

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0304

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0304】

ステージ3の間に使用される細胞密度とノギンの濃度は、臍性内胚葉前駆細胞、および/または、内分泌性前駆細胞または前駆体を示すそれらの遺伝子類の発現に異なった影響を与えた。簡潔に言えば、細胞密度の増大と臍性前駆細胞細胞タイプ(例えば、臍性内胚葉、臍性上皮、PDX1-陽性の臍性内胚葉)の対応する増大の間には、直線関係がある。例えば、ステージ3(または、8日目)の後に、細胞密度の増大は、PDX1とNKX6.1の高められた遺伝子発現で示したように、臍性前駆細胞の細胞数の増大に対応する。図24Aおよび24Bを参照。対照的に、ステージ4(または、14日目)の後の、細胞密度の増大と内分泌性前駆細胞細胞タイプにおける減少の間には逆相関性がにあった。例えば、細胞密度が減少するにつれて、ステージ3(または、8日目)の後に、少なくともNGN3とNKX2.2の減少した発現がみられた。図24Cおよび24Dを参照。

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0305

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0305】

しかし、与えられる任意の密度でのノギンの低い濃度(例えば、25 ng/mL)は、NGN3とNKX2.2の減少した発現で示されるように、内分泌性前駆細胞タイプを減少させた。図24Cおよび24Dを参照。細胞培養における、ノギンの細胞密度非依存性作用は、細胞から内因的に生成されたBMPシグナルが外因的に加えられたノギンによって拮抗されることを示唆する。内因的に生成された信号の分化結果への影響は、BMPのみに制限されるのではなく、他の増殖因子、および/または、細胞によって培地中に分泌された薬剤が、単独または外因の増殖因子、および/または、薬剤と組み合わせられて類似的または対照的な作用を持つことができる。

【手続補正24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0327

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0327】

ステージ1-4中で遺伝子発現を調べるために、 1×10^6 細胞/mLと 2×10^6 細胞/mLの出発濃度で実行された分化を分析するためにQ-PCRが使用された(図26)。ある特定の遺伝子だけが図26に示されているが、出願人は、以前に非常に詳細にステージ1-4のそれぞれにおいて多くの遺伝子の発現および非発現について説明した。米国特許8,211,699、ERBB3リガンドを使用した、懸濁液中での多能性幹細胞の培養方法、2012年7月3日発行；米国特許7,958,585、プリミティブストリークおよび内胚葉系中胚葉細胞、2011年7月26日発行；米国特許7,510,876、胚体内胚葉(CYTHERA.045A)、2009年3月31日発行；米国特許7,541,185、胚体内胚葉の分化のためのファクターの同定方法、2009年6

月2日発行；米国特許7,625,753、胚体内胚葉の増殖、2009年12月1日発行；米国特許7,695,963、胚体内胚葉産生の増大方法、2010年4月13日発行；米国特許7,704,738、胚体内胚葉、2010年4月27日発行；米国特許7,993,916、胚体内胚葉産生の増大方法、2011年8月9日発行；米国特許8,008,075、幹細胞集合体懸濁組成物およびその分化方法、2011年8月30日発行；米国特許8,178,878、自己再生のための組成物および方法、およびヒト胚性幹細胞の分化、2012年5月29日発行；米国特許8,216,836、胚体内胚葉の分化のためのファクターの同定方法、2012年7月10日発行；米国特許7,534,608、腭性ホルモンの製造方法、2009年5月19日発行；米国特許7,695,965、腭性ホルモンの製造方法、2010年4月13日発行；米国特許7,993,920、腭性ホルモンの製造方法、2011年8月9日発行；米国特許8,129,182、内分泌性前駆体細胞、腭性ホルモン発現細胞、およびその製造方法、2012年3月6日発行；米国特許出願11/875,057、ヒト血清を含むフィダーフリーな多能性幹細胞のための組成物および方法、2007年10月19日出願；米国特許出願12/618,659、ヒト多能性幹細胞から誘導された腭性リネッジ細胞のカプセル化、2009年11月13日出願；本明細書中に参考としてそれらの全体が援用される。分化方法に高い信頼度を得た後にだけ、出願人はマーカーのより小さいセットをシグネチャーマーカーとして選択し、図26に示されているように、様々なステージ1-4細胞集合体を同定した。

【手続補正25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0328

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0328】

図26は、回転するボトルフォーマット内で分化された細胞集合体が、分化のそれぞれのステージで期待される典型的なシグネチャーマーカーを発現することを示す。これは同時に6ウェルトレイで実行された分化の研究と一致している（対照、図26）。同様に、シグネチャーマーカーの発現の欠如が、予想される場合で観測された。例えば、OCT4やNanogなどの多分化能性幹細胞マーカーはすべての培養条件でd0に存在していた（図26A）。同様に、内胚葉系中胚葉マーカーのMIXL1とEomesの1時的な増殖機構が、ローラーボトル分化と6-ウェルトレイの分化の両方に存在する（図26、それぞれ黒色の棒、黒色の斜線、灰色の棒の比較）。ステージ2の細胞は胚体内胚葉を産生した。これはSOX17およびHNF3 [FOX A2]を発現する。これは6-ウェルトレイで分化されたステージ2タイプの細胞に観察されるものと同様である。ステージ4タイプの細胞はPD X1とNK X6.1を発現する。これは6-ウェルトレイで分化された培養物に観察されるものと同様である（図26、それぞれ黒色の棒、黒色の斜線、灰色の棒の比較）。最後に、オフターゲットリネッジのためのマーカーの発現は、150mLの回転されたボトルと6ウェルのトレイの培養物において実質的に差は無かった。分化のコントロールは回転フォーマット中で厳しく保持される。これらのマーカーはZIC1（外胚葉リネッジ）、初期発現PAX6（神経リネッジ）、SOX7（胚体外内胚葉）、CDX2（栄養外胚葉）、および初期発現AFP（卵黄袋）を含む。

【手続補正26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0335

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0335】

表11および9の分化プロセスのQ-PCR分析は、適切なリネッジ特定がPECの形成までの各段階で現れたことを示した。図27A-Dを参照されたい。表11に記載され

ている4つの培地は、多分化能のマーカー（例えば、OCT4、Nanog）の下向き調節と、内胚葉系中胚葉マーカー（例えば、MixL1、Eomes）の上向き調節を示した。図27Aを参照されたい。胚体内胚葉（例えば、SOX17とHNF3）のマーカーは2日目から予想通りに発現され、次いで他の内胚葉と臍性マーカー（例えば、HNF1、PDX1、NKX6.1、PTF1A、NGN3、およびNKX2.2）が発現された。図27Bを参照されたい。重要なことには、6ウェルトレイ対照分化（例えば、PAX6、SOX7、CDX2、AFP、およびZIC1）と比べて、オフターゲットリネッジ（非内胚葉の、または、非臍性のリネッジ）を示すマーカーは上がらなかった。したがって、臍性の内訳の厳格な管理がこれらのスケールアップされた分化実験で維持された。図27Cを参照されたい。例えば、典型的にいくつかの分化で散発的に起こる小規模のオフターゲット集合体の存在を示すAFP発現は6ウェルのトレイ対照では低かった。図27Dとシュルツ他を参照されたい。2012、上掲。AFP発現はローラーボトル培地でさえ低かった。これは潜在的にd12での集合体の小さい個体数の低下を示す。図27Dを参照されたい。

【手続補正27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0336

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0336】

多段階（ステージ1 - 4）実験計画でhESCから分化された臍性細胞培養物の細胞構成を評価するために、共染色との組み合わせに基づくフローサイトメトリー分析が、以前にケリー他に実質的に記載されていたように使用された。2011、ネイチャーバイオテクノロジー29:750 - 56。D'Amour他、2005、上掲、クルーン他、2008、上掲、シュルツ他、2012、上掲。本明細書に参考としてそれらの全体が援用される。シュルツ他、2012、上掲は、少なくとも37の分化について大規模なフローサイトメトリー分析とPEC細胞組成を示した。シュルツ他はPECの細胞構成を以下から成るものとして記述した：約26 - 36%のCHGA⁺/NKX6.1⁺/PDX1^{+/+}、約46 - 56%のCHGA⁺/NKX6.1^{+/+}/PDX1^{+/+}（ポリ - ホルモン性内分泌細胞）、約10 - 15%のCHGA⁺/NKX6.1⁻/PDX1⁺（PDX1 - 内胚葉細胞のみ）、および3%以下のCHGA⁺/NKX6.1⁻/PDX1⁻（残りのまたは、トリプルネガティブ細胞）。シュルツ他を参照されたい。2012、上掲、図2C。

【手続補正28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0337

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0337】

同様に、図11に示されるように、フローサイトメトリー分析がローラーボトルで分化微分されたステージ4（12日目）PEC培養物について実行された。PEC組成物は上記のシュルツの他で記載されていたものと一致し、正確な割合は表12に示された条件で4つのローラーボトルからの平均である。これらのスケールアップされたローラーボトル分化のPECは、約40%のCHGA⁺/NKX6.1⁺/PDX1^{+/+}、約43%のCHGA⁺/NKX6.1^{+/+}/PDX1^{+/+}または（ポリ - ホルモン性内分泌細胞）、約10%のCHGA⁺/NKX6.1⁻/PDX1⁺（またはPDX1 - 内胚葉細胞のみ）、および約2%のCHGA⁺/NKX6.1⁻/PDX1⁻（または残りのまたは、トリプルネガティブ細胞）。PEC組成物のフローサイトメトリー分析は、5rpmと8rpmの異なった回転速度も、ベント付きのまたはベント無しのキャップのタイプも、PEC細胞組成に見かけの影響を与えなかったことを示す。上記の記載およびQ - PCE分析に基づいて、これらの条件はPECへの途中のステージ1 - 4の細胞のリネッジ内訳に効果を与えな

い(図26)。したがって、上記の研究と分析はスケールアップ可能な回転ボトルフォーマットでのhESCの集合とPECへの分化の有効性を確認した。表12中、Vはベント有り、NVはベント無しを表す。