

【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17年11月17日(2005.11.17)

【公表番号】特表2004-510434(P2004-510434A)
 【公表日】平成16年4月8日(2004.4.8)
 【年通号数】公開・登録公報2004-014
 【出願番号】特願2002-532583(P2002-532583)
 【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 5/06

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/15

G 0 1 N 33/50

【F I】

C 1 2 N 5/00 E

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/15 Z

G 0 1 N 33/50 Z

【手続補正書】
 【提出日】平成16年4月6日(2004.4.6)
 【手続補正1】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】特許請求の範囲
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【特許請求の範囲】

【請求項1】 樹立細胞系ではない内胚葉由来の前駆細胞、その子孫、またはその混合物を、培地の存在下、フィーダー細胞を含む層の上で培養する段階を含む、内胚葉由来の前駆細胞、その子孫、またはその混合物の増殖方法。

【請求項2】 前駆細胞、その子孫、またはその混合物が脊椎動物細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 前駆細胞、その子孫、またはその混合物がヒト細胞、非ヒト霊長類細胞、ブタ細胞、イヌ細胞、ウサギ細胞、ラット細胞、マウス細胞、またはその組み合わせを含む、請求項2記載の方法。

【請求項4】 前駆細胞、その子孫、またはその混合物が肝臓、肺、腸、膵臓、甲状腺、性腺の前駆細胞、またはその組み合わせを含む、請求項3記載の方法。

【請求項5】 前駆細胞、その子孫、またはその混合物が肝臓に由来する、請求項4記載の方法。

【請求項6】 培地が基礎培地を含む、請求項1記載の方法。

【請求項7】 基礎培地がダルベッコ変法イーグル培地およびハムF12を含む、請求項6記載の方法。

【請求項8】 培地が少なくとも1つのホルモンを含む、請求項1記載の方法。

【請求項9】 ホルモンがインスリンである、請求項8記載の方法。

【請求項10】 培地がグルココルチコイドホルモンをさらに含む、請求項8記載の方法。

【請求項11】 グルココルチコイドホルモンがデキサメタゾンである、請求項8記載の方法。

【請求項12】 培地が鉄飽和トランスフェリンをさらに含む、請求項1記載の方法。

- 【請求項 13】 培地がニコチンアミドをさらに含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 14】 培地が血清アルブミンをさらに含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 15】 培地が少なくとも1つの還元剤をさらに含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 16】 還元剤がβメルカプトエタノールである、請求項15記載の方法。
- 【請求項 17】 培地が少なくとも1つの脂質補給剤を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 18】 脂質補給剤が遊離脂肪酸混合物を含む、請求項17記載の方法。
- 【請求項 19】 遊離脂肪酸混合物が、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、またはその組み合わせを含む、請求項17記載の方法。
- 【請求項 20】 培地がグルタミン酸を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 21】 培地が微量元素をさらに含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 22】 微量元素がCuSO₄を含む、請求項21記載の方法。
- 【請求項 23】 微量元素がH₂SeO₃を含む、請求項21記載の方法。
- 【請求項 24】 培地が抗酸化剤を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 25】 抗酸化剤がH₂SeO₃を含む、請求項24記載の方法。
- 【請求項 26】 培地が抗生物質をさらに含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 27】 培地が上皮成長因子をさらに含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 28】 フィーダー細胞の供給源が、少なくとも1つの脊椎動物から得た組織を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 29】 脊椎動物が胚を含む、請求項28記載の方法。
- 【請求項 30】 脊椎動物が、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、イヌ、ウサギ、ラット、マウス、またはその組み合わせを含む、請求項29記載の方法。
- 【請求項 31】 フィーダー細胞がクローンである、請求項1記載の方法。
- 【請求項 32】 クローンがST05である、請求項31記載の方法。
- 【請求項 33】 フィーダー細胞が間質細胞を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 34】 フィーダー細胞が線維芽細胞を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 35】 肝前駆細胞が、細胞間接着分子（ICAM）抗原を発現する、主要組織適合性抗原（MHC）クラスIaを発現しない、MHCクラスIbを弱く発現する、OX18を弱く発現する、αフェトプロテインを発現する、アルブミンを発現する、サイトケラチン19を発現する、またはその組み合わせである、請求項1記載の方法。
- 【請求項 36】 ICAMがICAM-1である、請求項35記載の方法。
- 【請求項 37】 肝子孫細胞が、MHCクラスIaを発現しない、MHCクラスIbを発現する、ICAMを弱く発現する、OX18を弱く発現する、αフェトプロテインを発現する、アルブミンを発現する、サイトケラチン19を発現する、またはその組み合わせである、請求項1記載の方法。
- 【請求項 38】 ICAMがICAM-1である、請求項37記載の方法。
- 【請求項 39】 肝前駆細胞、その子孫、またはその組み合わせが、積み重なったコロニーとして増殖する請求項1記載の方法。
- 【請求項 40】 肝前駆細胞のクローニングをさらに含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 41】 クローニングに細胞数の希釈、クローニング・カラー（collar）、アガロース中での増殖、ビーズ上での増殖、フローサイトメトリー、またはその組み合わせが利用される、請求項40記載の方法。
- 【請求項 42】 肝前駆細胞が少なくとも1回の有糸分裂を行なう、請求項1記載の方法。
- 【請求項 43】 肝前駆細胞が少なくとも10回の有糸分裂を行なう、請求項42記載の方法。
- 【請求項 44】 肝前駆細胞が、別の運命をもつ娘細胞を生む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 45】 娘細胞が胆管細胞に分化する、請求項44記載の方法。
- 【請求項 46】 娘細胞が肝実質細胞に分化する、請求項44記載の方法。

【請求項47】 肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物、および少なくとも1つの肝増殖因子を含むと考えられる試料を提供する段階、前駆細胞、その子孫、またはその混合物と試料とを混合する段階、ならびに肝前駆細胞の増殖の刺激を観察する段階を含む、肝増殖因子の同定方法。

【請求項48】 肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物、および少なくとも1つの肝分化因子を含むと考えられる試料を提供する段階、前駆細胞、その子孫、またはその混合物と試料とを混合する段階、ならびに肝前駆細胞の分化を観察する段階を含む、肝分化因子の同定方法。

【請求項49】 肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物、および少なくとも1つの肝毒素を含むと考えられる試料を提供する段階、前駆細胞、その子孫、またはその混合物と試料とを混合する段階、および肝前駆細胞の死を観察する段階を含む、肝毒素の同定方法。

【請求項50】 肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物、および肝前駆細胞・代謝に影響を与える能力があると考えられる薬剤を提供する段階、前駆細胞、その子孫、またはその混合物と試料とを混合する段階、ならびに肝前駆細胞の代謝の変化を観察する段階を含む、薬剤の開発方法。

【請求項51】 肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物、および抗菌効果を持つと考えられる薬剤を少なくとも1つ提供する段階、前駆細胞、その子孫、またはその混合物と薬剤とを混合する段階、ならびに肝前駆細胞の増殖の変化を観察する段階を含む、新規の抗菌剤の同定方法。

【請求項52】 肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物を提供する段階、および前駆細胞、その子孫、またはその混合物を、体外肝臓として働くために十分な細胞群が得られるまで、バイオリアクター中で培養する段階を含む、体外肝臓の調製方法。

【請求項53】 (a) 少なくとも1つの肝前駆細胞を提供する段階、および
(b) 少なくとも1つのフィーダー細胞の生合成産物を含む培地中で肝前駆細胞を培養する段階を含む、樹立細胞系ではない肝前駆細胞、その子孫、またはその混合物の増殖方法。

【請求項54】 培地がグルココルチコイド、インスリン、上皮成長因子、ニコチンアミド、または組み合わせをさらに含む、請求項53記載の方法。

【請求項55】 フィーダー細胞の生合成産物が、ペプチド、糖ペプチド、リポペプチド、脂質、糖脂質、炭化水素、蛋白質、糖蛋白質、リポ蛋白質、またはその組み合わせを含み、生合成産物が肝前駆細胞の増殖または分化を促進する、請求項53記載の方法。

【請求項56】 フィーダー細胞の生合成産物が、インスリン様成長因子、インターロイキン6ファミリーの増殖因子、肝細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子、細胞外マトリックス、またはその組み合わせを含み、生合成産物が肝前駆細胞の増殖または分化を促進する、請求項53記載の方法。

【請求項57】 少なくとも1つの肝前駆細胞が、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、イヌ、ウサギ、ラット、またはマウスから得られる少なくとも1つの細胞を含む、請求項53記載の方法。

【請求項58】 少なくとも1つの肝前駆細胞のクローニングをさらに含む、請求項53記載の方法。

【請求項59】 増殖因子の添加をさらに含む、請求項53記載の方法。

【請求項60】 肝実質細胞、胆管細胞、またはその組み合わせを生産するための分化因子の添加をさらに含む、請求項59記載の方法。

【請求項61】 培地が無血清である、請求項1記載の方法。

【請求項62】 内胚葉由来の前駆細胞、その子孫、またはその混合物を無血清培地の存在下、フィーダー細胞を含む層の上で培養する段階を含む、内胚葉由来の前駆細胞、その子孫、またはその混合物の増殖方法。