

【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 29 年 4 月 13 日 (2017.4.13)

【公表番号】特表 2016-513972 (P2016-513972A)

【公表日】平成 28 年 5 月 19 日 (2016.5.19)

【年通号数】公開・登録公報 2016-030

【出願番号】特願 2016-502165 (P2016-502165)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/073 (2010.01)

A 6 1 K 35/39 (2015.01)

A 6 1 K 35/545 (2015.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 1/18 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/073

A 6 1 K 35/39

A 6 1 K 35/545

A 6 1 P 3/10

A 6 1 P 1/18

【手続補正書】

【提出日】平成 29 年 3 月 10 日 (2017.3.10)

【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】

クロモグラニン A (C H G A) 陰性細胞を生成する方法であって、ヒト胚体内胚葉系列細胞を i n v i t r o で T G F β スーパーファミリーメンバーおよび W n t ファミリーメンバーと接触させ、それにより C H G A 陰性細胞を生成することを含む、方法。

【請求項 2】

前記 T G F β スーパーファミリーメンバーはアクチビン A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 W n t ファミリーメンバーは W n t 3 a である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ヒト胚体内胚葉系列細胞を i n v i t r o で E R B B 受容体キナーゼ活性化作用物質と接触させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 E R B B 受容体キナーゼ活性化作用物質はヘレグリンである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 C H G A 陰性細胞に単能性の未成熟ベータ細胞を形成させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記単能性のヒト未成熟ベータ細胞は I N S および N K X 6 . 1 を発現する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

成熟ベータ細胞を *in vivo* で生成するための方法であって、

(a) ヒト胚体内胚葉系列細胞を *in vitro* で TGFβ スーパーファミリーメンバーおよび Wnt ファミリーメンバーと接触させ、それにより CHGA 陰性細胞を生成するステップと、

(b) 前記 CHGA 陰性細胞を未成熟ベータ細胞に分化させるステップと、

(c) ステップ (b) の前記未成熟ベータ細胞を哺乳動物対象に移植するステップと、

(d) 前記未成熟ベータ細胞を *in vivo* で成熟させて、インスリン分泌性ベータ細胞を含む細胞の集団を生成するステップと

を含む、方法。

【請求項 9】

前記 TGFβ スーパーファミリーメンバーはアクチビン A である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ヒト胚体内胚葉系列細胞を、少なくとも 50 ng/mL の前記 TGFβ スーパーファミリーメンバーと接触させる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 Wnt ファミリーメンバーは Wnt3a である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ヒト胚体内胚葉系列細胞を、少なくとも 25 ng/mL の前記 Wnt ファミリーメンバーと接触させる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ヒト胚体内胚葉系列細胞を *in vitro* で ERBB 受容体キナーゼ活性化作用物質と接触させることをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 ERBB 受容体キナーゼ活性化作用物質はヘレグリンである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ヒト胚体内胚葉系列細胞を、前記 TGFβ スーパーファミリーメンバーおよび前記 Wnt ファミリーメンバーの 5 分の 1 ~ 15 分の 1 の前記 ERBB 受容体キナーゼ活性化作用物質と接触させる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記未成熟ベータ細胞は INS および NKX6.1 を発現する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 17】

前記未成熟ベータ細胞は INS、NKX6.1、および MAFB を発現する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 18】

単能性ヒト未成熟ベータ細胞を生成する方法であって、

a) ヒト胚体内胚葉系列細胞を *in vitro* でアクチビン A および Wnt3a と接触させ、それにより CHGA 陰性細胞を生成するステップと、その後

b) 前記 CHGA 陰性細胞を単能性ヒト未成熟ベータ細胞に分化させるステップとを含む、方法。

【請求項 19】

前記単能性ヒト未成熟ベータ細胞は INS および NKX6.1 を発現する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ステップ (a) は、前記ヒト内胚葉系列細胞を *in vitro* でヘレグリンと接触させることをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。