

【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7月14日(2016.7.14)

【公表番号】特表2015-521469(P2015-521469A)
【公表日】平成27年7月30日(2015.7.30)
【年通号数】公開・登録公報2015-048
【出願番号】特願2015-517358(P2015-517358)
【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0797 (2010.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 2 0 2 T

【手続補正書】

【提出日】平成28年5月24日(2016.5.24)

【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】

以下の段階を含む、インビトロで高純度の運動ニューロン前駆細胞(MNP)を産生する方法：

未分化ヒト胚幹細胞(hESC)またはヒト人工多能性幹細胞(iPSC)を、フィーダー細胞上で培養する段階；

採取前の24時間、hESC培地とMNP誘導培地の混合物をhESC/iPSC培養物に供給する段階；

継代溶液を用いてhESC/iPSCコロニーを採取する段階；

hESC/iPSCコロニーを、レチノイン酸およびFGF-2を添加したMNP誘導培地を含む超低接着フラスコに移すことによって神経化ステップを開始する段階であって、少なくとも5日間ニューロスフェアを作製する、段階；

FGF-2を添加したMNP誘導培地を用いることによって、hESC/iPSCニューロスフェア培養物を約10~12日間腹側化する段階；

ニューロスフェアをより小さいスフェアへと解離させる段階と、接着フラスコにおいて少なくとも4日間MNP誘導培地を用い神経ロゼットとして発達させる段階；

トリプシンを用いて神経ロゼットを細胞浮遊液へと解離させる段階；

ゼラチンコーティング表面による陰性吸着プロセスを用いてMNPを精製および濃縮する段階と、Matrigelコーティングフラスコに非接着MNPを再播種する段階；

FGF-2を添加したMNP誘導培地を用いてMNPを約4~5日間発達させる段階；

トリプシンを用いてマトリクスコーティングフラスコから接着MNPを採取する段階；

ゼラチンコーティングフラスコによる陰性吸着プロセスを用いることによってMNP細胞浮遊液を精製する段階；および

得られた非接着MNPをゼラチンコーティングフラスコから集める段階。

【請求項2】

採取したMNPの純度が少なくとも75~95%である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

フィーダー細胞が、マウス胚性線維芽細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、またはヒト包皮線維芽細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

bFGFの濃度が、未分化hESCまたはiPSCを播種した初日から培養7日目までは約10 ng/ml

であり、培養8日目からMNPの採取までは約5 ng/mlである、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

レチノイン酸の濃度が、培養1日目から培養7日目までは約10 μMである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

hESC培地とMNP誘導培地の混合物が約1：1の比率である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

hESC培地が、Knockout DMEM、20%KOSR、アミノ酸、および増殖因子を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

MNP誘導培地が、古典的な高グルコースDMEMとDMEM/F12の50：50混合物を含み、DMEM/F12にはインスリン、トランスフェリン、セレン、グルタミン、塩化マグネシウム、およびB27が添加されている、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

以下の段階を含む、MNPを凍結保存する方法：

- (a) 採取したMNPを含む上清を遠心分離する段階；
- (b) 得られた MNPの沈降物を凍結培地中で再浮遊させる段階と、クライオバイアルに入れアリコートにする段階；
- (c) MNPを含むクライオバイアルを速度制御フリーザーに移す段階；
- (d) 速度制御フリーザーにおいてMNPを含むクライオバイアルをプログラムされた凍結プロセスに供する段階；および
- (e) 長期間保存するために、プログラムされた凍結後に、MNPを含むクライオバイアルを速度制御フリーザーから液体窒素デュワーに移す段階。

【請求項10】

回収した凍結保存MNPの生存率が融解後約85～95%である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

採取したMNPの純度が凍結保存前に少なくとも80～90%である、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

凍結培地が、DMSOと予め調合した、最適化されcGMP準拠産生され無タンパク質かつ無血清の凍結培地である、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

凍結培地がCryoStor CS10である、請求項9に記載の方法。

【請求項14】

以下のパラメータをさらに含む、請求項9に記載の方法：

- (a) プログラム可能な速度制御フリーザーを用いてクライオバイアルを5 に平衡化する段階；
- (b) フリーザーチャンバー温度が約5～-10 に達するまで、フリーザーを0.5～2 /分の速度で冷却する段階；
- (c) フリーザーチャンバーが約-35 ～-50 の温度に達するまで、フリーザーを20～30 /分の速度で冷却する段階；
- (d) フリーザーチャンバーを、5 /分～20 /分の速度で-10 ～-20 に加温する段階；
- (e) フリーザーチャンバーを、0.5～2 /分の速度で-30 ～-50 に冷却する段階；
- (f) フリーザーチャンバーを、5 /分～15 /分の一定速度で-70 ～-100 に冷却する段階；および
- (g) フリーザーからMNPを含むクライオバイアルを取り出す段階と、液体窒素での保存に移す段階。

【請求項15】

以下の段階を含む、cGMPに従ってインビトロで高純度の運動ニューロン前駆細胞(MNP)を産生する方法：

未分化ヒト胚幹細胞(hESC)またはヒト人工多能性幹細胞(iPSC)を、フィーダーを含

まない条件で、およそ60～80%コンフルエンスに達するように少なくとも5日間培養する段階；

採取前の24時間のあいだ、無血清で異種由来成分を含まずかつ既知成分の培地をhESC/iPSC培養物に供給する段階；

無タンパク質の酵素性ではない継代溶液を用いてhESC/iPSCコロニーを採取する段階；

hESC/iPSCコロニーを、レチノイン酸およびFGF-2を添加したMNP誘導培地を含む超低接着フラスコに移すことによって神経化ステップを開始する段階であって、少なくとも5日間ニューロスフェアを作製する、段階；

FGF-2を添加したMNP誘導培地を用いることによって、hESC/iPSCニューロスフェアを約10～12日間腹側化する段階；

ニューロスフェアをより小さいスフェアへと解離させる段階と、接着フラスコにおいて少なくとも4日間MNP誘導培地を用い神経ロゼットとして発達させる段階；

トリプシンを用いて神経ロゼットを細胞浮遊液へと解離させる段階；

ゼラチンコーティング表面による陰性吸着プロセスを用いてMNPを精製および濃縮する段階；

無タンパク質の既定のマトリクスコーティングフラスコに非接着MNPを再播種する段階；

FGF-2を添加した異種由来成分を含まない既知組成のMNP誘導培地を用いてMNPを約4～5日間発達させる段階；

無タンパク質の既知組成の継代溶液を用いて、無タンパク質の既定のマトリクスコーティングフラスコから接着MNPを採取する段階；

ゼラチンコーティングフラスコによる陰性吸着プロセスを用いることによって、MNP細胞浮遊液を精製する段階；および

得られた非接着MNPをゼラチンコーティングフラスコから集める段階。

【請求項16】

採取したMNPの純度が少なくとも60～90%である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

bFGFの濃度が、未分化hESCまたはiPSCを播種した初日から培養7日目までは約10 ng/mlであり、培養8日目からMNPの採取までは約5 ng/mlである、請求項15に記載の方法。

【請求項18】

FGF-2がcGMP準拠グレードの材料である、請求項15に記載の方法。

【請求項19】

レチノイン酸の濃度が、培養1日目から培養7日目までは約10 μMである、請求項15に記載の方法。

【請求項20】

既知組成で異種由来材料を含まない培地とMNP誘導培地の混合物が約50：50の比率である、請求項15に記載の方法。

【請求項21】

既知組成で異種由来材料を含まない培地が、ビタミン、組換え型アルブミン、非必須アミノ酸、およびcGMP準拠グレードの増殖因子を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項22】

MNP誘導培地が、古典的な高グルコースDMEMとDMEM/F12の50：50混合物であり、DMEM/F12にはインスリン、トランスフェリン、セレン、グルタミン、塩化マグネシウム、およびB27が添加されている、請求項15に記載の方法。

【請求項23】

B27、インスリン、FGF-2、およびトランスフェリンがcGMP準拠グレードの材料である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

培養する段階が少なくとも5日間である、請求項1に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

そのため、当業者は、本開示が基づく概念が、本発明のいくつかの目的を行うために、他の方法、システム、キット、および組成物を設計するための基礎として容易に利用されうること認識するであろう。それゆえ、同等の構築物は、それらが本発明の主旨および範囲から逸脱しない限り、それらも本発明に含まれることは重要である。

[本発明1001]

以下の段階を含む、インビトロで高純度の運動ニューロン前駆細胞（MNP）を産生する方法：

未分化ヒト胚幹細胞（hESC）またはヒト人工多能性幹細胞（iPSC）を、フィーダー細胞上で培養する段階；

採取前の24時間、hESC培地とMNP誘導培地の混合物をhESC/iPSC培養物に供給する段階；

継代溶液を用いてhESC/iPSCコロニーを採取する段階；

hESC/iPSCコロニーを、レチノイン酸およびFGF-2を添加したMNP誘導培地を含む超低接着フラスコに移すことによって神経化ステップを開始する段階であって、少なくとも5日間ニューロスフェアを作製する、段階；

FGF-2を添加したMNP誘導培地を用いることによって、hESC/iPSCニューロスフェア培養物を約10～12日間腹側化する段階；

ニューロスフェアをより小さいスフェアへと解離させる段階と、接着フラスコにおいて少なくとも4日間MNP誘導培地を用い神経ロゼットとして発達させる段階；

トリプシンを用いて神経ロゼットを細胞浮遊液へと解離させる段階；

ゼラチンコーティング表面による陰性吸着プロセスを用いてMNPを精製および濃縮する段階と、Matrigelコーティングフラスコに非接着MNPを再播種する段階；

FGF-2を添加したMNP誘導培地を用いてMNPを約4～5日間発達させる段階；

トリプシンを用いてマトリクスコーティングフラスコから接着MNPを採取する段階；

ゼラチンコーティングフラスコによる陰性吸着プロセスを用いることによってMNP細胞浮遊液を精製する段階；および

得られた非接着MNPをゼラチンコーティングフラスコから集める段階。

[本発明1002]

採取したMNPの純度が少なくとも75～95%である、本発明1001の方法。

[本発明1003]

フィーダー細胞が、マウス胚性線維芽細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、またはヒト包皮線維芽細胞である、本発明1001の方法。

[本発明1004]

bFGFの濃度が、未分化hESCまたはiPSCを播種した初日から培養7日目までは約10 ng/mlであり、培養8日目からMNPの採取までは約5 ng/mlである、本発明1001の方法。

[本発明1005]

レチノイン酸の濃度が、培養1日目から培養7日目までは約10 μMである、本発明1001の方法。

[本発明1006]

hESC培地とMNP誘導培地の混合物が約1：1の比率である、本発明1001の方法。

[本発明1007]

hESC培地が、Knockout DMEM、20%KOSR、アミノ酸、および増殖因子を含む、本発明1001の方法。

[本発明1008]

MNP誘導培地が、古典的な高グルコースDMEMとDMEM/F12の50：50混合物を含み、DMEM/F12にはインスリン、トランスフェリン、セレン、グルタミン、塩化マグネシウム、およびB

27が添加されている、本発明1001の方法。

[本発明1009]

以下の段階を含む、MNPを凍結保存する方法：

(a) 採取したMNPを含む上清を遠心分離する段階；

(b) 得られた MNPの沈降物を凍結培地中で再浮遊させる段階と、クライオバイアルに入れアリコートにする段階；

(c) MNPを含むクライオバイアルを速度制御フリーザーに移す段階；

(d) 速度制御フリーザーにおいてMNPを含むクライオバイアルをプログラムされた凍結プロセスに供する段階；および

(e) 長期間保存するために、プログラムされた凍結後に、MNPを含むクライオバイアルを速度制御フリーザーから液体窒素デュワーに移す段階。

[本発明1010]

回収した凍結保存MNPの生存率が融解後約85～95%である、本発明1009の方法。

[本発明1011]

採取したMNPの純度が凍結保存前に少なくとも80～90%である、本発明1009の方法。

[本発明1012]

凍結培地が、DMSOと予め調合した、最適化されcGMP準拠産生され無タンパク質かつ無血清の凍結培地である、本発明1009の方法。

[本発明1013]

凍結培地がCryoStor CS10である、本発明1009の方法。

[本発明1014]

以下のパラメータをさらに含む、本発明1009の方法：

(a) プログラム可能な速度制御フリーザーを用いてクライオバイアルを5 に平衡化する段階；

(b) フリーザーチャンバー温度が約5～-10 に達するまで、フリーザーを0.5～2 /分の速度で冷却する段階；

(c) フリーザーチャンバーが約-35 ～-50 の温度に達するまで、フリーザーを20～30 /分の速度で冷却する段階；

(d) フリーザーチャンバーを、5 /分～20 /分の速度で-10 ～-20 に加温する段階；

(e) フリーザーチャンバーを、0.5～2 /分の速度で-30 ～-50 に冷却する段階；

(f) フリーザーチャンバーを、5 /分～15 /分の一定速度で-70 ～-100 に冷却する段階；および

(g) フリーザーからMNPを含むクライオバイアルを取り出す段階と、液体窒素での保存に移す段階。

[本発明1014]

以下の段階を含む、cGMPに従ってインビトロで高純度の運動ニューロン前駆細胞 (MNP) を産生する方法：

未分化ヒト胚幹細胞 (hESC) またはヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) を、フィーダーを含まない条件で、およそ60～80% コンフルエンスに達するように少なくとも5日間培養する段階；

採取前の24時間のあいだ、無血清で異種由来成分を含まずかつ既知成分の培地をhESC/iPSC培養物に供給する段階；

無タンパク質の酵素性ではない継代溶液を用いてhESC/iPSCコロニーを採取する段階；

hESC/iPSCコロニーを、レチノイン酸およびFGF-2を添加したMNP誘導培地を含む超低接着フラスコに移すことによって神経化ステップを開始する段階であって、少なくとも5日間ニューロスフェアを作製する、段階；

FGF-2を添加したMNP誘導培地を用いることによって、hESC/iPSCニューロスフェアを約10～12日間腹側化する段階；

ニューロスフェアをより小さいスフェアへと解離させる段階と、接着フラスコにおいて少なくとも4日間MNP誘導培地を用い神経口ゼットとして発達させる段階；

トリプシンを用いて神経ロゼットを細胞浮遊液へと解離させる段階；

ゼラチンコーティング表面による陰性吸着プロセスを用いてMNPを精製および濃縮する段階；

無タンパク質の既定のマトリクスコーティングフラスコに非接着MNPを再播種する段階；

FGF-2を添加した異種由来成分を含まない既知組成のMNP誘導培地を用いてMNPを約4～5日間発達させる段階；

無タンパク質の既知組成の継代溶液を用いて、無タンパク質の既定のマトリクスコーティングフラスコから接着MNPを採取する段階；

ゼラチンコーティングフラスコによる陰性吸着プロセスを用いることによって、MNP細胞浮遊液を精製する段階；および

得られた非接着MNPをゼラチンコーティングフラスコから集める段階。

[本発明1015]

採取したMNPの純度が少なくとも60～90%である、本発明1014の方法。

[本発明1016]

bFGFの濃度が、未分化hESCまたはiPSCを播種した初日から培養7日目までは約10 ng/mlであり、培養8日目からMNPの採取までは約5 ng/mlである、本発明1014の方法。

[本発明1017]

FGF-2がcGMP準拠グレードの材料である、本発明1014の方法。

[本発明1018]

レチノイン酸の濃度が、培養1日目から培養7日目までは約10 μ Mである、本発明1014の方法。

[本発明1019]

既知組成で異種由来材料を含まない培地とMNP誘導培地の混合物が約50：50の比率である、本発明1014の方法。

[本発明1020]

既知組成で異種由来材料を含まない培地が、ビタミン、組換え型アルブミン、非必須アミノ酸、およびcGMP準拠グレードの増殖因子を含む、本発明1014の方法。

[本発明1021]

MNP誘導培地が、古典的な高グルコースDMEMとDMEM/F12の50：50混合物であり、DMEM/F12にはインスリン、トランスフェリン、セレン、グルタミン、塩化マグネシウム、およびB27が添加されている、本発明1014の方法。

[本発明1022]

B27、インスリン、FGF-2、およびトランスフェリンがcGMP準拠グレードの材料である、本発明1021の方法。

[本発明1023]

培養する段階が少なくとも5日間である、本発明1001の方法。