

【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3年4月8日(2021.4.8)

【公表番号】特表2020-513794(P2020-513794A)
 【公表日】令和2年5月21日(2020.5.21)
 【年通号数】公開・登録公報2020-020
 【出願番号】特願2019-546831(P2019-546831)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 5/079 (2010.01)
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)
 G 0 1 N 33/48 (2006.01)
 G 0 1 N 33/68 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 K 35/30 (2015.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/079
 C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 Q 1/6869 Z
 G 0 1 N 33/48 M
 G 0 1 N 33/68
 C 1 2 N 5/10
 A 6 1 K 35/30
 A 6 1 P 25/28

【手続補正書】

【提出日】令和3年2月24日(2021.2.24)

【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】

多能性幹細胞(PSC)からヒトマイクログリア様細胞(iMGL)を産生する方法であって、

(i)造血分化因子を補充した培地を使用してPSCを分化させて誘導造血始原細胞(iHPC)を産生する工程と、

(ii)マイクログリア分化培地を使用してCD43⁺ iHPCをヒトマイクログリア様細胞(iMGL)に分化させる工程と

を含む方法。

【請求項2】

工程(i)が、1日~21日の間のインキュベーション期間を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記インキュベーション期間の1~10日目に、前記PSCが低酸素または正常酸素環境においてインキュベートされる、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記インキュベーション期間の1日目および2日目に、前記培地がFGF2、BMP4、アクチビンA、LiCl、およびVEGFの造血分化因子を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記インキュベーション期間の3日目および4日目に、前記培地がFGF2およびVEGFの造血分化因子を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

前記インキュベーション期間の5～10日目に、前記培地がFGF2、VEGF、TPO、SCF、IL3、およびIL6の造血分化因子を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項7】

前記培地中のFGF2、BMP4、VEGF、TPO、SCF、IL-3、およびIL-6の各々の濃度が、5ng/ml～100ng/mlの間であり、前記培地中のアクチビンAの濃度が、0.1ng/ml～30ng/mlの間であり、かつ

LiClの濃度が約2mMである、

請求項4-6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

蛍光活性化細胞選別(FACS)を使用してCD43⁺iHPCを単離することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

CD43⁺iHPCを単離することが、CD43⁺マーカーを選択することによって実行される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

単離された前記iHPCが、80%を超える純度である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

工程(ii)が、20～30日の間のインキュベーション期間をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

工程(ii)の前記マイクログリア分化培地が、因子CSF-1、IL-34、およびTGF-1を含み、前記マイクログリア分化培地が無血清である、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記培地中のCSF-1の濃度が、5ng/ml～50ng/mlの間である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記培地中のIL-34の濃度が、25ng/ml～125ng/mlの間である、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

前記培地中のTGF-1の濃度が、2.5ng/ml～100ng/mlの間である、請求項12に記載の方法。

【請求項16】

工程(ii)が、1～5日の間のインキュベーション期間で前記iMGLを成熟させることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

工程(ii)が、CD200およびCX3CL1を含む培地中で前記iMGLをインキュベートすることにより、前記iMGLを成熟させることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

CD200がヒト組換えCD200である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

CX3CL1がヒト組換えCX3CL1である、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

前記培地中のCD200およびCX3CL1の各々の濃度が、 $1\text{ ng/ml} \sim 1\text{ }\mu\text{g/ml}$ の間である、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

前記CD43⁺ iHPCがCD235a⁺ / CD41a⁺であり；
産生された前記iMGLがc-kit⁺ / CD45⁺であり；
前記c-kit⁺ / CD45⁺ iMGLが25日のインキュベーション期間の14日目に検出することができ；
前記iMGLが、2つの別個のiMGLの集団：(1)CD45⁺ / CX3CR1⁺および(2)CD45⁺ / CX3CR1⁺を含み；
産生された前記iMGLが少なくとも70%の純度レベルを有し；かつ
純度レベルが、プリン受容体、P2ry12の発現、Trem2の発現、Iba1の発現、またはPu1の発現を使用して評価される、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

ミクログリアの運命への拘束性に関する既知のマーカーである因子の発現について試験することをさらに含み、ここで試験される因子の前記発現がPU.1およびTREM2を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項23】

多能性幹細胞(PSC)からヒトミクログリア様細胞(iMGL)を産生する方法であって、

- (i) PSCを誘導造血始原細胞(iHPC)に分化させる工程と、
 - (ii) 前記iHPCを分化させてiMGLを産生する工程と
- を含む方法。

【請求項24】

CD200およびCX3CL1を含む培地中で前記iMGLをインキュベートすることにより、前記iMGLを成熟させる工程(iii)をさらに含み、工程(iii)が1～5日の間のインキュベーション期間を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記iHPCがCD43⁺ / CD235a⁺ / CD41⁺である、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記iHPCが、工程(ii)において無血清分化培地中に前記iHPCを置くことにより、前記iMGLに分化し、ここで前記無血清分化培地が、MCSF、IL-34、およびTGF- β 1を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記産生されたiMGLがc-kit⁺ / CD45⁺であり、前記iMGLが、2つの別個のiMGLの集団を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項28】

前記2つの別個のiMGLの集団が：(1)CD45⁺ / CX3CR1⁺および(2)CD45⁺ / CX3CR1⁺を含む、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

工程(i)が5～15日の間のインキュベーション期間を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項30】

工程(ii)が20～30日の間のインキュベーション期間を含む、請求項23に記載の方法。