

【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 4 年 1 月 4 日 (2022.1.4)

【公表番号】特表 2021-503301 (P2021-503301A)

【公表日】令和 3 年 2 月 12 日 (2021.2.12)

【年通号数】公開・登録公報 2021-006

【出願番号】特願 2020-545051 (P2020-545051)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/073 (2010.01)

A 6 1 K 35/50 (2015.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 K 47/46 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/19 (2006.01)

A 6 1 K 38/17 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 5/073

A 6 1 K 35/50

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 37/04

A 6 1 K 47/46

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 9/127

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 37/02

A 6 1 P 43/00 1 0 7

A 6 1 K 38/19

A 6 1 K 38/17

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 11 月 15 日 (2021.11.15)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 7 7】

様々な刊行物、特許、及び、特許出願を、本明細書で引用しており、それらの開示の全内容を参照により援用する。

本件出願は、以下の態様の発明を提供する。

(態様 1)

胎盤、または、その一部からエキソソームを単離する方法であって、前記方法は：

a) 胎盤、または、その一部、好ましくは、培養胎盤、または、その一部を、第 1 の培地と接触させること；及び

b) 前記胎盤、または、その一部からエキソソームの集団を含む第 1 の画分を得ること；

c) 任意に、前記胎盤、または、その一部を、第 2 の培地と接触させ、かつ、前記胎盤、または、その一部に由来するエキソソームの集団を含む第 2 の画分を得ること；

d) 任意に、前記胎盤、または、その一部を、第 3 の培地と接触させ、かつ、前記胎盤、または、その一部に由来するエキソソームの集団を含む第 3 の画分を得ること；及び

e) 任意に、前記第 1、第 2、及び／または、第 3 の画分に由来するエキソソームの集団を、好ましくは、連続遠心分離、及び／または、所望のエキソソームの集団に存在するマーカー、または、ペプチドに特異的な抗体、または、その結合部分を使用するアフィニティークロマトグラフィーで単離すること、を含み、前記抗体、または、その結合部分を、膜、樹脂、ビーズ、または、容器などの基質に固定している、前記方法。

(態様 2)

前記胎盤、または、その一部が、羊膜をさらに含む、態様 1 に記載の方法。

(態様 3)

前記胎盤、または、その一部が、ヒト胎盤、または、その一部である、態様 2 に記載の方法。

(態様 4)

前記第 1、第 2、及び／または、第 3 の培地を、胎盤、または、その一部と、45 分間、または、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または、24 時間、または、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または、20 日間など、少なくとも 45 分間かけて接触させ、任意の時間の長さは、前記した時点のいずれか 2 つで定義した範囲内にある、前出態様のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 5)

前記第 1、第 2、及び／または、第 3 の培地を、胎盤、または、その一部と、少なくとも 7、14、28、35、または、42 日間、または、前記した時点のいずれか 2 つで定義した範囲内にある任意の長さの時間をかけて接触させる、態様 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 6)

前記胎盤、または、その一部が、細分化、粉碎、または、酵素処理してある、態様 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 7)

前記胎盤、または、その一部は、実質的に平坦、または、シート状であり、及び、脱細胞化し、かつ、実質的に乾燥させており、及び、前記方法が、外因性細胞を含む体液を、前記脱細胞化胎盤、または、その一部と接触させて、前記脱細胞化胎盤、または、その一部に対して、前記外因性細胞を播種することをさらに含み、及び、前記細胞と、前記脱細胞化胎盤、または、その一部との接触は、脱細胞化胎盤、または、その一部を、第 1 の培地と接触させる前に行う、態様 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 8)

前記外因性細胞を、前記胎盤、または、その一部のドナー対象とは異なる対象から得る、態様 7 に記載の方法。

(態様 9)

前記体液が、腹水、血液、または、血漿である、態様 7 または 8 に記載の方法。

(態様 10)

前記細胞が、臓器に由来する、態様 7 または 8 に記載の方法。

(態様 11)

前記細胞が、肝臓、腎臓、肺、または、脾臓に由来する、態様 10 に記載の方法。

(態様 1 2)

前記細胞が、免疫細胞である、態様 7 または 8 に記載の方法。

(態様 1 3)

前記細胞が、T 細胞または B 細胞である、態様 1 2 に記載の方法。

(態様 1 4)

前記第 1 の培地が、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 1 5)

前記第 1、第 2、または第 3 の画分が、腹水、血液、または、血漿に由来するエキソソームを含む、態様 9 に記載の方法。

(態様 1 6)

前記第 1、第 2、または第 3 の画分が、臓器細胞に由来するエキソソームを含む、態様 1 0 に記載の方法。

(態様 1 7)

前記細胞が、肝臓、腎臓、肺、または、脾臓に由来する、態様 1 1 に記載の方法。

(態様 1 8)

前記第 2 の培地が、成長因子を含む、態様 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 1 9)

前記第 3 の培地が、キレート剤を含む、態様 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 2 0)

前記キレート剤が、ホスホネート、B A P T A 四ナトリウム塩、B A P T A / A M、D i - N o t r o p h e n (商標) 試薬四ナトリウム塩、E G T A / A M、ピリドキサルイソニコチノイルヒドラジン、N、N、N'、N' - テトラキス - (2 ピリジルメチル) エチレンジアミン、6 - プロモ - N' - (2 - ヒドロキシベンジリデン) - 2 - メチルキノリン - 4 - カルボヒドラジド、1, 2 - ビス (2 - アミノフェノキシ) エタン - N、N、N'、N' - 四酢酸テトラキス (アセトキシメチルエステル)、(エチレンジニトリロ) 四酢酸、(E D T A)、エダタミル、エチレンジニトリロ四酢酸、エチレングリコール - ビス (2 - アミノエチルエーテル) - N、N、N'、N' - 四酢酸、または、エチレングリコール - ビス (β - アミノエチルエーテル) - N、N、N'、N' - 四酢酸四ナトリウム塩 (E G T A)、または、これらのあらゆる組み合わせである、態様 1 9 に記載の方法。

(態様 2 1)

前記キレート剤が、E D T A、または、E G T A、または、これらの組み合わせである、態様 1 9 または 2 0 に記載の方法。

(態様 2 2)

前記キレート剤を、1 m M、2 m M、3 m M、4 m M、5 m M、6 m M、7 m M、8 m M、9 m M、1 0 m M、2 0 m M、3 0 m M、4 0 m M、5 0 m M、6 0 m M、7 0 m M、8 0 m M、9 0 m M、または、1 0 0 m M の濃度、または、前記した濃度のいずれか 2 つで定義した範囲内にある濃度で第 3 の培地に提供する、態様 1 9 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 2 3)

前記第 3 の培地での E D T A の濃度は、1 m M、2 m M、3 m M、4 m M、5 m M、6 m M、7 m M、8 m M、9 m M、1 0 m M、2 0 m M、3 0 m M、4 0 m M、5 0 m M、6 0 m M、7 0 m M、8 0 m M、9 0 m M、または、1 0 0 m M の濃度、または、前記した濃度のいずれか 2 つで定義した範囲内にある濃度で提供する、態様 1 9 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 2 4)

前記第 3 の培地が、プロテアーゼを含む、態様 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 2 5)

前記プロテアーゼが、トリプシン、コラゲナーゼ、キモトリプシン、または、カルボキ

シペプチダーゼ、または、これらのあらゆる組み合わせである、態様 24 に記載の方法。

(態様 26)

前記プロテアーゼが、トリプシンである、態様 25 に記載の方法。

(態様 27)

前記プロテアーゼを、1 mM、2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、または、100 mM の濃度、または、前記した濃度のいずれか 2 つで定義した範囲内にある濃度で第 3 の培地に提供する、態様 24 に記載の方法。

(態様 28)

前記方法が、前記胎盤、または、その一部を、さらなる複数の培地と接触させることをさらに含み、前記接触により、エキソソームを含む複数の画分が得られる、態様 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 29)

前記第 1、第 2、第 3、または、さらなる培地が、グルコースを含む、態様 28 に記載の方法。

(態様 30)

前記第 1、第 2、第 3、または、さらなる培地が、GM-CSF を含む、態様 28 または 29 に記載の方法。

(態様 31)

前記第 1、第 2、第 3、または、さらなる培地が、血清を含む、態様 28～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 32)

前記第 1、第 2、第 3、または、さらなる培地が、DMEM を含む、態様 28～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 33)

前記第 1、第 2、第 3、または、さらなる培地が、AHR アンタゴニストを含む、態様 28～32 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 34)

前記 AHR アンタゴニストが、SR1 である、態様 33 に記載の方法。

(態様 35)

前記 SR1 が、1 nM、10 nM、100 nM、200 nM、300 nM、400 nM、500 nM、600 nM、700 nM、800 nM、900 nM、または、1 mM の濃度、または、前記した値のいずれか 2 つで定義した範囲内にあるその他のあらゆる濃度である、態様 34 に記載の方法。

(態様 36)

前記第 1 の培地が、0℃、5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ の温度、または、前記した温度のいずれか 2 つで定義した範囲内にある温度を維持しながら、前記胎盤、または、その一部と接触している、態様 1～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 37)

前記第 2 の培地が、0℃、5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ の温度、または、前記した温度のいずれか 2 つで定義した範囲内にある温度を維持しながら、前記胎盤、または、その一部と接触している、態様 1～36 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 38)

前記第 3 の培地が、0℃、5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ の温度、または、前記した値のいずれか 2 つで定義した範囲内にある温度を維持しながら、前記胎盤、または、その一部と接触している、態様 1～37 のいずれか 1 項に記載の方法。

(態様 39)

前記複数のさらなる培地が、0℃、5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃の温度、または、前記した値のいずれか2つで定義した範囲内にある温度を維持しながら、前記胎盤、または、その一部と接触している、態様28～38のいずれか1項に記載の方法。

(態様40)

前記第1、第2または第3のかん流液、または、さらなる複数の培地が、抗生物質を含む、態様1～39のいずれか1項に記載の方法。

(態様41)

(a) 前記第1、第2、及び／または、第3の画分、または、複数の画分を、組織フィルターに通すこと；

(b) (a)で回収した濾過物に対して第1の遠心分離を行って、細胞ペレット、及び、第1の上清を生成すること；

(c) 前記第1の上清に関して第2の遠心分離を行って、第2の上清を生成すること；及び

(d) 前記第2の上清に関して第3の遠心分離を行って、エキソソームペレットを生成すること；及び、任意に、

(e) 前記エキソソームを溶液に再懸濁すること、

を含む方法で、前記エキソソームを、前記第1、第2、及び／または、第3の画分、または、複数の画分から単離する、態様1～40のいずれか1項に記載の方法。

(態様42)

前記エキソソームが、CD63、CD63-A、パーフォリン、Fas、TRAIL、または、グランザイムB、または、これらのあらゆる組み合わせを含む、態様1～41のいずれか1項に記載の方法。

(態様43)

前記エキソソームが、CD63Aを含む、態様42に記載の方法。

(態様44)

前記エキソソームが、シグナル伝達分子を含む、態様1～43のいずれか1項に記載の方法。

(態様45)

前記エキソソームが、サイトカイン、mRNA、または、miRNAを含む、態様1～44のいずれか1項に記載の方法。

(態様46)

アフィニティークロマトグラフィーによってエキソソームを単離することをさらに含み、アフィニティークロマトグラフィーが、ウイルス抗原、ウイルスタンパク質、細菌抗原、細菌タンパク質、真菌抗原、または、真菌タンパク質を含むエキソソームの除去に関して選択的である、前出態様のいずれか1項に記載の方法。

(態様47)

1つ以上のさらなるアフィニティークロマトグラフィーステップによってエキソソームを単離することをさらに含み、前記1つ以上のさらなるクロマトグラフィーステップが、炎症マーカー、及び／または、腫瘍マーカーを含むエキソソームの除去に関して選択的である、態様1～46のいずれか1項に記載の方法。

(態様48)

ヒト胎盤由来のエキソソームを含む組成物であって、前記エキソソームが、CD1c、CD20、CD24、CD25、CD29、CD2、CD3、CD8、CD9、CD11c、CD14、CD19、CD31、CD40、CD41b、CD42a、CD44、CD45、CD49e、CD4、CD56、CD62P、CD63、CD69、CD81、CD86、CD105、CD133-1、CD142、CD146、CD209、CD326、HLA-ABC、HLA-DRDPDQ、MCSP、ROR1、SSEA-4、または、これらの組み合わせに対して陽性である、前記組成物。

(態様49)

前記エキソソームが、CD1c、CD20、CD24、CD25、CD29、CD2、CD3、CD8、CD9、CD11c、CD14、CD19、CD31、CD40、CD41b、CD42a、CD44、CD45、CD49e、CD4、CD56、CD62P、CD63、CD69、CD81、CD86、CD105、CD133-1、CD142、CD146、CD209、CD326、HLA-ABC、HLA-DRDPDQ、MCSP、ROR1、及び、SSEA-4に対して陽性である、態様48に記載の組成物。

(態様50)

前記エキソソームが、CD1c、CD20、CD24、CD25、CD29、CD2、CD3、CD8、CD9、CD11c、CD14、CD19、CD31、CD40、CD41b、CD42a、CD44、CD45、CD49e、CD4、CD56、CD62P、CD63、CD69、CD81、CD86、CD105、CD133-1、CD142、CD146、CD209、CD326、HLA-ABC、HLA-DRDPDQ、MCSP、ROR1、及び、SSEA-4からなる群から選択した、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、または、それ以上のマーカーに対して陽性である、態様48に記載の組成物。

(態様51)

前記エキソソームが、CD3-、CD11b-、CD14-、CD19-、CD33-、CD192-、HLA-A-、HLA-B-、HLA-C-、HLA-DR-、CD11c-、または、CD34-である、態様48～50のいずれか1項に記載の組成物。

(態様52)

前記エキソソームが、CD3-、CD11b-、CD14-、CD19-、CD33-、CD192-、HLA-A-、HLA-B-、HLA-C-、HLA-DR-、CD11c-、及び、CD34-である、態様48～50のいずれか1項に記載の組成物。

(態様53)

前記エキソソームが、非コードRNA分子を含む、態様48～52のいずれか1項に記載の組成物。

(態様54)

前記RNA分子が、マイクロRNAである、態様53に記載の組成物。

(態様55)

前記マイクロRNAを、表7のマイクロRNA、及び、それらの組み合わせからなる群から選択する、態様54に記載の組成物。

(態様56)

前記マイクロRNAを、hsa-mir-26b、hsa-mir-26b-5p、hsa-mir-26a-2、hsa-mir-26a-1、hsa-mir-26a-5p、hsa-mir-30d、hsa-mir-30d-5p、hsa-mir-100、hsa-mir-100-5p、hsa-mir-21、hsa-mir-21-5p、hsa-mir-22、hsa-mir-22-3p、hsa-mir-99b、hsa-mir-99b-5p、hsa-mir-181a-2、hsa-mir-181a-1、hsa-mir-181a-5p、及び、これらの組み合わせからなる群から選択する、態様54に記載の組成物。

(態様57)

前記エキソソームが、表3のサイトカイン、及び、それらの組み合わせからなる群から選択するサイトカインを含む、態様48～56のいずれか1項に記載の組成物。

(態様58)

前記エキソソームが、表4のサイトカイン受容体、及び、それらの組み合わせからなる群から選択するサイトカイン受容体を含む、態様48～57のいずれか1項に記載の組成物。

(態様59)

前記エキソソームが、表6のタンパク質、及び、それらの組み合わせからなる群から選択するタンパク質を含む、態様48～58のいずれか1項に記載の組成物。

(態様 6 0)

前記エキソソームが、細胞質アコニット酸ヒドラターゼ、細胞表面糖タンパク質 M U C 1 8、タンパク質アルギニン N-メチルトランスフェラーゼ 1、グアニンヌクレオチド結合タンパク質 G (s) サブユニットアルファ、カリニン-5、カルシウム結合タンパク質 3 9、グルコシダーゼ 2 サブユニットベータ、塩化物細胞内チャネルタンパク質 5、セマフォリン-3 B、6 0 S リボソームタンパク質 L 2 2、スプライセオソーム R N A ヘリカーゼ D D X 3 9 B、転写活性化タンパク質 P u r-アルファ、プログラム細胞死タンパク質 1 0、B R O 1 ドメイン含有タンパク質 B R O X、キヌレニン-オキシグルタル酸トランスアミナーゼ 3、ラミニンサブユニットアルファ 5、A T P 結合カセットサブファミリー E メンバー 1、シンタキシン結合タンパク質 3、プロテアソームサブユニットベータタイプ 7、及び、これらの組み合わせ、からなる群から選択したタンパク質を含む、態様 4 8 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(態様 6 1)

前記エキソソームが、間葉系幹細胞、臍帯血、または、胎盤かん流液に由来するエキソソームよりも少なくとも 2 倍高いレベルで、少なくとも 1 つのマーカー分子を含む、態様 4 8 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(態様 6 2)

前記エキソソームが、間葉系幹細胞、臍帯血、及び、胎盤かん流液に由来するエキソソームよりも少なくとも 2 倍高いレベルで、少なくとも 1 つのマーカー分子を含む、態様 4 8 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(態様 6 3)

前記エキソソームを、全胎盤培養物の培地から単離する、態様 4 8 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(態様 6 4)

前記エキソソームを、胎盤葉、または、胎盤の一部を含む全培養物の培地から単離する、態様 4 8 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(態様 6 5)

前記エキソソームを、態様 1 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法で生成する、態様 4 8 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(態様 6 6)

静脈内投与に適した形態である、態様 4 8 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(態様 6 7)

局所注射に適した形態である、態様 4 8 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(態様 6 8)

局所投与に適した形態である、態様 4 8 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(態様 6 9)

超音波送達に適した形態である、態様 4 8 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(態様 7 0)

免疫細胞の増殖を増加させる方法であって、前記細胞を、態様 4 8 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させることを含む、前記方法。

(態様 7 1)

前記免疫細胞が、T 細胞である、態様 7 0 に記載の方法。

(態様 7 2)

前記免疫細胞が、N K 細胞である、態様 7 0 に記載の方法。

(態様 7 3)

前記免疫細胞が、C D 3 4 + 細胞である、態様 7 0 に記載の方法。

(態様 7 4)

がん細胞の増殖を阻害する方法であって、前記細胞を、態様 4 8 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させることを含む、前記方法。

(態様 7 5)

前記対象での血管形成または血管新生の方法であって、前記対象に対して、態様４８～６５のいずれか１項に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

(態様７６)

前記対象の免疫系を調節する方法であって、前記対象に対して、態様４８～６５のいずれか１項に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

(態様７７)

対象の罹患組織または損傷組織を修復する方法であって、前記対象に対して、態様４８～６５のいずれか１項に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

(態様７８)

対象のがんを処置する方法であって、前記対象に対して、態様４８～６５のいずれか１項に記載の組成物を投与することを含む、前記方法。

(態様７９)

前記対象が、ヒトである、態様７５～７８のいずれか１項に記載の方法。