

【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2年9月10日(2020.9.10)

【公表番号】特表2019-528057(P2019-528057A)

【公表日】令和1年10月10日(2019.10.10)

【年通号数】公開・登録公報2019-041

【出願番号】特願2019-507218(P2019-507218)

【国際特許分類】

C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)
C 1 2 N	5/0735	(2010.01)
A 6 1 K	35/44	(2015.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	11/00	(2006.01)
A 6 1 P	13/12	(2006.01)
C 1 2 N	15/113	(2010.01)
A 6 1 K	35/545	(2015.01)

【F I】

C 1 2 N	5/10	
C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 N	5/0735	
A 6 1 K	35/44	
A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	13/12	
C 1 2 N	15/113	Z
A 6 1 K	35/545	

【手続補正書】

【提出日】令和2年7月31日(2020.7.31)

【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】

単離されたヒトKDR⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞集団をヒト多能性幹細胞から作製する方法であって、

(a) 多能性幹細胞(PSC)を提供する工程；

(b) i) アクチビンA、BMP-4、VEGFおよびFGF-2を含む中胚葉分化培地で前記多能性幹細胞を約24時間培養すること、および

ii) その後、約72時間にわたって約24～48時間ごとに、工程i)の培地を、BMP-4、VEGFおよびFGF-2を含む中胚葉分化培地に置換すること

を含む、前記多能性幹細胞を中胚葉へと分化誘導する工程；ならびに

(c) iii) 中胚葉細胞をソーティングしてKDR⁺NCAM⁺APLNR⁺細胞を選択することを含む、前記分化誘導された細胞から前記中胚葉細胞を単離する工程を含む方法。

【請求項2】

前記ソーティングが、SSEA5⁻KDR⁺NCAM⁺APLNR⁺細胞を選択することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記中胚葉への分化誘導が、中胚葉へ分化誘導中の前記細胞をFc-NRP-1と接触させることをさらに含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記Fc-NRP-1を工程ii)の中胚葉分化培地に添加する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記中胚葉への分化誘導が、中胚葉へ分化誘導中の前記細胞を1種以上のmiRNA阻害剤と接触させることをさらに含み、該1種以上のmiRNA阻害剤によって、PSCと比較してSSEA5⁻KDR⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞において低発現しているmiRNAが抑制される、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記miRNA阻害剤によって、miR-221-3p、miR-1271-5p、miR-559、miR-543、miR-361-3p、miR-30d-5p、miR-124-3pおよびmiR-185-5pからなる群から選択されるmiRNAが抑制される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

中胚葉へ分化誘導中の前記細胞を、miR-221-3p阻害剤、miR-1271-5p阻害剤およびmiR-559阻害剤のうちの1種以上のmiRNA阻害剤、好ましくはmiR-221-3p阻害剤と接触させる、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

前記中胚葉への分化誘導が、中胚葉へ分化誘導中の前記細胞を1種以上のmiRNAミミックと接触させることをさらに含み、該1種以上のmiRNAミミックが、PSCと比較してSSEA5⁻KDR⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞において高発現しているmiRNAを模倣する、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記miRNAミミックが、miR-330-5p、miR-145-5p、miT-214-3pおよびmiR-497-5pからなる群から選択されるmiRNAを模倣する、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

中胚葉へ分化誘導中の前記細胞を、miR-330-5pミミック、miR-145-5pミミックおよびmiT-214-3pミミックのうちの1種以上のmiRNAミミック、好ましくはmiR-330-5pミミックの共存下で培養する、請求項7に記載の方法。

【請求項11】

前記中胚葉への分化誘導が、中胚葉へ分化誘導中の前記細胞をmiR-214ミミックと接触させることをさらに含む、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記単離された中胚葉細胞が、哺乳動物に移植された場合に血管形成能を示す、請求項1~11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記単離された中胚葉細胞を内皮へと分化誘導する工程をさらに含み、該工程が、
(a) 前記単離された中胚葉細胞を、BMP-4、VEGFおよびFGF-2を含む内皮分化培地中で約6~8日間培養すること、ならびに

(b) 内皮へ分化誘導された前記細胞から、敷石状の形態を示すCD31⁺NRP-1⁺血管内皮コロニー形成細胞様(ECFC様)細胞を単離することを含む、請求項1~12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記単離されたECFC様細胞が、CD144⁺、KDR⁺および-SMA⁻のうちの1つ以上の発現をさらなる特徴とする、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記内皮への分化誘導工程を、共培養細胞、胚様体の形成および外因性TGF- の抑制の

うちの 1 つ以上が存在しない条件で行う、請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記単離されたECFC様細胞が、共移植細胞の非存在下で哺乳動物に移植された場合に血管形成能を示す、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

単離されたヒトKDR⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞集団であって、該単離されたKDR⁺NCAM⁺APLN R⁺中胚葉細胞が、哺乳動物に移植された場合に血管形成能を示すこと、および該単離されたKDR⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞が、インビトロにおいてヒト多能性幹細胞（PSC）から誘導されたものであることを特徴とする、単離された集団。

【請求項 1 8】

前記KDR⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞がSSEA5⁻である、請求項 1 7 に記載の単離された集団。

【請求項 1 9】

前記KDR⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞における 1 つ以上の側板 / 胚体外中胚葉マーカーの発現がPSCと比較して増加しており、該側板 / 胚体外中胚葉マーカーが、BMP4、WNT5A、NKX2-5およびHAND1から選択される、請求項 1 7 または 1 8 に記載の単離された集団。

【請求項 2 0】

前記KDR⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞における中軸中胚葉マーカー、沿軸中胚葉マーカーおよび / または中間中胚葉マーカーのうちの 1 つ以上の発現が、PSCと比較して増加しておらず、該中軸中胚葉マーカーがCHIRDおよびSHHから選択され、該沿軸中胚葉マーカーがPAX1、MEOX1およびTCF15から選択され、該中間中胚葉マーカーがGOSR1、PAX2およびPAX8から選択される、請求項 1 9 に記載の単離された集団。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法によって得られる、単離されたヒトKDR⁺NC AM⁺APLNR⁺中胚葉細胞集団。

【請求項 2 2】

請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法によって得られる、単離されたヒトNRP-1⁺CD31⁺血管内皮コロニー形成細胞様細胞（ECFC様細胞）集団。

【請求項 2 3】

請求項 1 7 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のKDR⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞を含む医薬組成物。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 に記載の血管内皮コロニー形成細胞様細胞（ECFC様細胞）を含む医薬組成物。

【請求項 2 5】

細胞活動を修飾する能力について試験薬剤を試験する方法であって、

(a) 請求項 1 7 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の細胞集団中の少なくとも 1 個の細胞を試験薬剤に曝露させること；ならびに

(b) 細胞増殖および細胞生存率のうちの 1 つ以上に対する前記試験薬剤の効果を観察すること

を含む方法。