

【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) アクチピン A、BMP-4、VEGF および FGF-2 を含む中胚葉分化培地中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、miR-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miR-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 α -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- β 1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13または14に記載の方法。

【請求項16】

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13～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

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⁺APLNR⁺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18】

前記KDR⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞がSSEA5⁻である、請求項17に記載の単離された集団。

【請求項19】

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17または18に記載の単離された集団。

【請求項20】

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19に記載の単離された集団。

【請求項21】

請求項1～12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⁺NCAM⁺APLNR⁺中胚葉細胞集団。

【請求項22】

請求項13～16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23】

請求項17～21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24】

請求項22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25】

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17～21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。