

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-544563
(P2024-544563A)

(43)公表日 令和6年12月3日(2024.12.3)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/0735(2010.01)	C 1 2 N	5/0735	4 B 0 2 9	
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	4 B 0 6 3
C 1 2 M	3/00 (2006.01)	C 1 2 M	3/00	A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/00 (2006.01)	C 1 2 N	1/00	G	
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全45頁)					
(21)出願番号	特願2024-528549(P2024-528549)		(71)出願人	322012882	
(86)(22)出願日	令和4年11月11日(2022.11.11)			ザ・セメックス・アライアンス	
(85)翻訳文提出日	令和6年6月25日(2024.6.25)			The Semex Alliance	
(86)国際出願番号	PCT/CA2022/051664			カナダ国、エヌ・１・エイチ、６・ジェ	
(87)国際公開番号	WO2023/082007			イ・２、オンタリオ、ゲルフ、ノース	
(87)国際公開日	令和5年5月19日(2023.5.19)			６、ハイウェイ ５ ６ ５ ３	
(31)優先権主張番号	63/278,751			5 6 5 3 Highway 6 North	
(32)優先日	令和3年11月12日(2021.11.12)			Guelph, Ontario, N1	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			H 6 J 2, Canada	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		(74)代理人	100114775	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(			弁理士 高岡 亮一	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		(74)代理人	100121511	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			弁理士 小田 直	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		(74)代理人	100202751	
	最終頁に続く			弁理士 岩堀 明代	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ナイーブ型ウシ胚性幹細胞の誘導

(57)【要約】

本開示は、ナイーブ型ウシ胚性幹細胞の誘導に有用な方法、生成物、及び組成物に関する。胚の付着及び伸長形成を可能にする、正に帯電した生体適合性ポリマーを含むECMコーティング基板について記載されている。また、ウシ胚を培養し、ナイーブ型胚性幹細胞を誘導するのに好適な伸長培地も提供される。ナイーブ型ウシ胚性幹細胞は、望ましい遺伝的特徴を有する着床前胚を増殖させること；インビトロ育種プログラムのための、始原生殖細胞及び／または配偶子を誘導すること、及び獣医学用生物学的製剤及び治療薬を開発及び提供することを含む、インビトロ育種プログラムに使用することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ナイーブ型ウシ胚性幹細胞を誘導する方法であって、

- a) ナイーブ型ウシ胚性幹細胞を含む透明帯（ZP）除去ウシ胚を提供すること；
- b) 前記 ZP 除去ウシ胚を細胞外マトリックス（ECM）コーティング基板と接触させることであって、前記 ECM コーティング基板は、正に帯電した生体適合性ポリマー層に隣接する負に帯電した基板表面と、前記正に帯電した生体適合性ポリマー層に隣接する負に帯電した ECM 層とを含む、基板を含む、前記接触させること、ならびに
- c) 伸長培地の存在下で前記 ZP 除去ウシ胚を培養して、前記 ECM コーティング基板への前記 ZP 除去ウシ胚の付着、及び誘導ナイーブ型ウシ胚性幹細胞を含む内部細胞塊（ICM）の伸長を誘導すること、を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

前記正に帯電した生体適合性ポリマー層が A 型ゼラチンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記負に帯電した ECM 層が EHS-ECM を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記基板がポリスチレンを含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記伸長培地が、以下：

N2B27 成分；
Wnt 活性化剤成分；
Wnt 阻害剤成分；
MEK/ERK 阻害剤成分；
ROCK 阻害剤成分；
LIF 成分；
アクチビン A 成分
PKC 阻害剤；及び
インスリン成分、
のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

30

【請求項 6】

前記伸長培地が、以下：

前記 N2B27 成分；
前記 Wnt 活性化剤成分；
前記 Wnt 阻害剤成分；
前記 MEK/ERK 阻害剤成分；
前記 ROCK 阻害剤成分；
前記 LIF 成分；
前記 PKC 阻害剤；及び
前記インスリン成分、を含む、請求項 5 に記載の方法。

40

【請求項 7】

前記伸長培地が、アクチビン A 成分、任意選択でヒトアクチビン A をさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 N2B27 成分が、B27 サプリメント及び N2 サプリメント、任意選択で約 1 % の B27 サプリメント及び約 0.5 % の N2 サプリメントを含み；
前記 Wnt 活性化剤成分が、CHIR99021、BIO、CHIR-98014、LY2090314、及び／または IM-12 を含み；
前記 Wnt 阻害剤成分が、XAV939、IWR-1、及び／または IWP-2 を含み；
前記 MEK/ERK 阻害剤成分が、PD0325901、ラボキセルチニブ、GSK11

50

20212、MEK162、PD184352、トラメチニブ、LY3214996、及び／またはウリキセルチニブを含み；

前記ROCK阻害剤成分が、Y27632、チアゾピビン、及び／またはブレビスタチンを含み；

前記LIF成分が、ヒトLIFを含み；

前記PKC阻害剤が、Go6983、Go6976、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、ソトラスタウリン、スタウロスポリン、及び／またはビスインドリルマレイミドを含み；

前記インスリン成分が、インスリンを含む、請求項5～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記ZP除去ウシ胚が、3～8日目の胚、任意選択で6日目もしくは7日目の胚であり、または、前記ZP除去胚が、桑実胚（ステージ4）；胚盤胞（ステージ5）；拡張中胚盤胞（ステージ6）；拡張胚盤胞（ステージ7）；孵化中胚盤胞（ステージ8）；または孵化後胚盤胞（ステージ9）である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記ZP除去ウシ胚が、酵素補助ZP除去によって得られる、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

請求項10に記載の方法であって、以下のステップ：

- a) 胚を提供するステップ；
- b) 前記胚をプロテアーゼ溶液と接触させるステップ；
- c) 前記プロテアーゼ溶液中で前記胚をインキュベートして前記ZPを部分的に消化し、ZP薄化胚を得るステップ；
- d) 前記ZP薄化胚をプロテアーゼ不活化培地と接触させて前記プロテアーゼを不活化するステップ；
- e) 前記ZPを破断するステップ；及び
- f) 前記胚を操作して、前記胚から前記ZPを分離するステップ、を含む、酵素補助ZP除去によって前記ZP除去ウシ胚を得ることをさらに含む、前記方法。

【請求項12】

ステップc)におけるプロテアーゼの濃度が、0.1%～0.5%であり、任意選択で約0.25%である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記胚及び前記プロテアーゼ溶液を、ステップc)において約30～60秒間、任意選択で約45秒間インキュベートする、請求項11または12に記載の方法。

【請求項14】

ステップe)においてマイクロブレードを使用して前記ZPを破断させる、請求項11～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

ステップf)における前記胚の操作がピペッティングを含む、請求項11～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記ZP除去胚が、遺伝子修飾されている、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記ZP除去胚を、1つ以上のバイオマーカーについて前記ZP除去胚の1つ以上の遺伝子型を決定するために遺伝子検査している、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

1つ以上のバイオマーカーについて、前記ZP除去ウシ胚の1つ以上の遺伝子型を決定するために遺伝子検査を実行することをさらに含む、請求項1～16のいずれか1項に記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 19】

1つ以上のバイオマーカーの遺伝子検査に基づいて、前記 Z P 除去ウシ胚を選択することをさらに含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記誘導ナীব型ウシ胚性幹細胞の 1 つ以上の遺伝子型を決定するために遺伝子検査を実行することをさらに含む、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記 Z P 除去ウシ胚が、再構成 2 倍体胚から得られる、請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記 Z P 除去ウシ胚が、新鮮な胚、任意選択で新鮮な生検胚から得られる、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記 Z P 除去ウシ胚が、凍結胚、任意選択で生検凍結胚から得られる、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記凍結胚を解凍すること、及び前記胚を回復培地と接触させることを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

以下：

- a) 前記凍結胚を解凍すること；
- b) 前記凍結胚を前記回復培地と接触させること；
- c) 前記胚を操作して、前記回復培地中の前記胚から前記 Z P を分離すること；及び
- d) 前記 Z P 除去ウシ胚を前記回復培地中でインキュベートすること、を含む、方法によって、前記 Z P 除去ウシ胚を得ることを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記回復培地が、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (GSK-3) 阻害剤、MEK/ERK キナーゼ阻害剤、及び Rho 関連コイルドコイル含有プロテインキナーゼ (ROCK) 阻害剤を含む、請求項 24 または 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記回復培地が、CHIR99021、PD0325901 及び Y27632 を含む、請求項 24～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 Z P 除去胚をアダプテーション培地とともにインキュベートすることをさらに含み、前記アダプテーション培地は、回復培地と伸長培地との組み合わせを含む、請求項 24～27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記アダプテーション培地が、回復培地と伸長培地との組み合わせを、約 0.3 : 1～1.7 : 1 の間、約 0.5 : 1～1.5 : 1 の間、または任意選択で約 1 : 1 の比率で含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

細胞外マトリックス (ECM) コーティング基板を調製する方法であって、

- a) 負に帯電した表面を含む基板を提供すること；
- b) 前記負に帯電した表面を、生体適合性ポリマーを含む第 1 の溶液と接触させることであって、前記生体適合性ポリマーは正に帯電している、前記接触させること；
- c) 前記正に帯電した生体適合性ポリマーの層が、前記基板の前記負に帯電した表面上に堆積されるように、前記基板を前記第 1 の溶液と接触させてインキュベートすること；
- d) 前記第 1 の溶液を除去し、任意選択で前記基板を洗浄すること；
- e) 前記基板を、細胞外マトリックス (ECM) を含む第 2 の溶液と接触させることで

10

20

30

40

50

あって、前記 E C M は負に帯電している、前記接触させること；ならびに

f) 前記負に帯電した E C M の層が前記正に帯電した生体適合性ポリマーの前記層上に堆積されるように、前記基板を前記第 2 の溶液と接触させてインキュベートすること、を含む、前記方法。

【請求項 3 1】

前記生体適合性ポリマーが A 型ゼラチンである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記 E C M が E H S - E C M を含む、請求項 3 0 または 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記基板がポリスチレンである、請求項 3 0 ～ 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

請求項 3 0 ～ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法に従って作製された E C M コーティング基板。

【請求項 3 5】

正に帯電した表面を含む基板；

前記基板の前記負に帯電した表面と接触する、正に帯電した生体適合性ポリマーの層；

前記正に帯電した生体適合性ポリマーの前記層と接触する、負に帯電した E C M の層、を含む、E C M コーティング基板。

【請求項 3 6】

前記生体適合性ポリマーが A 型ゼラチンである、請求項 3 5 に記載の E C M コーティング基板。

20

【請求項 3 7】

前記 E C M が E H S - E C M を含む、請求項 3 5 または 3 6 に記載の E C M コーティング基板。

【請求項 3 8】

前記基板がポリスチレンである、請求項 3 5 ～ 3 7 のいずれか 1 項に記載の E C M コーティング基板。

【請求項 3 9】

胚を培養するための、任意選択で、I C M 伸長を誘導する及び／またはナイーブ型胚性幹細胞を誘導するための、請求項 3 5 ～ 3 8 のいずれか 1 項に記載の E C M コーティング基板の使用。

30

【請求項 4 0】

前記胚がウシ胚であり、任意選択で 5 日目～7 日目の間のウシ胚である、請求項 3 9 に記載の使用。

【請求項 4 1】

前記ウシ胚が再構成 2 倍体胚である、請求項 4 0 に記載の使用。

【請求項 4 2】

N 2 B 2 7 成分；

W n t 活性化剤成分；

W n t 阻害剤成分；

M E K / E R K 阻害剤成分；

R O C K 阻害剤成分；

L I F 成分；

P K C 阻害剤；及び

インスリン成分、を含む、培地組成物。

40

【請求項 4 3】

前記 N 2 B 2 7 成分が、B 2 7 サプリメント及び N 2 サプリメント、任意選択で約 1 % の B 2 7 サプリメント及び約 0 . 5 % の N 2 サプリメントを含み；

前記 W n t 活性化剤成分が、C H I R 9 9 0 2 1、B I O、C H I R - 9 8 0 1 4、L Y 2 0 9 0 3 1 4、または I M - 1 2 を含み；

50

前記 Wnt 阻害剤成分が、XAV939、IWR-1、または IWP-2 を含み；

前記 MEK / ERK 阻害剤成分が、PD0325901、ラボキセルチニブ、GSK1120212、MEK162、PD184352、トラメチニブ、LY3214996、またはウリキセルチニブを含み；

前記 ROCK 阻害剤成分が、Y27632、チアゾピビン、またはブレビスタチンを含み；

前記 LIF 成分が、ヒト LIF を含み；

前記 PKC 阻害剤が、Go6983、Go6976、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、ソトラスタウリン、スタウロスポリン、及び／またはビスインドリルマレイミドを含み；

前記インスリン成分が、インスリンを含む、請求項 42 に記載の培地組成物。

【請求項 44】

アクチビン A 成分、任意選択でヒトアクチビン A をさらに含む、請求項 42 または 43 に記載の培地組成物。

【請求項 45】

胚を培養して ICM 伸長形成を誘導するための、請求項 42～44 のいずれか 1 項に記載の培地組成物の使用であって、任意選択で、前記胚はウシ胚である、前記使用。

【請求項 46】

前記ウシ胚が再構成 2 倍体胚である、請求項 45 に記載の使用。

【請求項 47】

酵素補助 ZP 除去によって ZP 除去ウシ胚を得る方法であって、以下のステップ：

a) 胚を提供するステップ；

b) 前記胚をプロテアーゼ溶液と接触させるステップ；

c) 前記プロテアーゼ溶液中で前記胚をインキュベートして前記 ZP を部分的に消化し、ZP 薄化胚を得るステップ；

d) 前記 ZP 薄化胚をプロテアーゼ不活化培地と接触させて前記プロテアーゼを不活化するステップ；

e) 前記 ZP を破断するステップ；及び

f) 前記胚を操作して、前記胚から前記 ZP を分離するステップ、を含む、前記方法。

【請求項 48】

ステップ c) におけるプロテアーゼの濃度が、0.1%～0.5% であり、任意選択で約 0.25% である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記胚及び前記プロテアーゼ溶液を、ステップ c) において約 30～60 秒間、任意選択で約 45 秒間インキュベートする、請求項 47 または 48 に記載の方法。

【請求項 50】

ステップ e) においてマイクロブレードを使用して前記 ZP を破断させる、請求項 47～49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 51】

ステップ f) における前記胚の操作がピペッティングを含む、請求項 47～50 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 52】

グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (GSK-3) 阻害剤、MEK / ERK キナーゼ阻害剤、及び Rh o 関連コイルドコイル含有プロテインキナーゼ (ROCK) 阻害剤を含む、回復培地。

【請求項 53】

前記回復培地が、任意選択で約 3 uM の CHIR99021、任意選択で約 1 uM の PD0325901、及び任意選択で約 10 uM の Y27632 を含む、請求項 52 に記載の培地。

【請求項 54】

10

20

30

40

50

解凍、生検、遺伝子編集、もしくは細胞誘導中またはその後に胚を回復するための、請求項 5 2 または 5 3 に記載の回復培地の使用。

【請求項 5 5】

請求項 1 ～ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法を使用して作製されたナীব型ウシ胚性幹細胞。

【請求項 5 6】

育種スキームまたは遺伝子改良プログラムにおける、請求項 5 5 に記載のナীব型ウシ胚性幹細胞の使用。

【請求項 5 7】

任意選択で望ましい遺伝的特徴を有する、着床前胚を増殖させる；任意選択でインビトロ育種プログラムのための、始原生殖細胞及び／または配偶子を誘導する、及び／または獣医学用生物学的製剤または治療薬を開発及び提供するための、請求項 5 5 に記載のナীব型ウシ胚性幹細胞の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年11月12日出願の米国仮出願第63／278,751号の優先権の利益を主張するものであり、その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、ウシ幹細胞に関し、より具体的には、ナীব型ウシ胚性幹細胞、関連する方法、及び組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

導入

ナীব型胚性幹細胞は、栄養膜幹細胞及び胚体外内胚葉系列細胞などの胚体外細胞を含む、体内のあらゆるタイプの細胞に分化することができる。マウス胚盤胞様構造（誘導プラストイド（*iblastoid*）とも呼ばれる）は、拡張多能性幹（*EPSC*）細胞を分化させることによって生成され（*Liet al.*, 2019）、さらに最近では、ヒト誘導プラストイド構造が、胚性幹細胞由来のナীব型多能性幹細胞（*Yuet al.*, 2021）または人工多能性幹細胞（*iPS*, *Liu et al.*, 2021）のいずれかを使用して生成されている。しかし、マウスまたはヒトとは異なり、ウシナীব型幹細胞の誘導はまだ報告されていない。

【0004】

着床前胚に由来するウシプライム型胚性幹細胞、より具体的には胚の内部細胞塊（*ICM*）構造に関する報告は非常に少ない（*Bogliotti et al.*, 2018; *Soto et al.*, 2021）。しかし、プライム型 *ESC* は胚体外細胞に分化しないため、誘導プラストイド構造の生成に直接使用することはできない。さらに、プライム型 *ESC* は、インビトロ育種で使用するための生殖細胞分化に効率的に使用することはできない（*Hou et al.*, 2018）。多能性の基底状態（着床前 *ICM*）を表すナীব型胚性幹細胞は、プライム型 *ES* 細胞よりも効率的に生殖細胞に分化することができる（*De Los Angeles*, 2019）。

【0005】

労働集約的であり、かつ低い胚生産率（胚盤胞形成の約20～30%）によって一般に制限される核移植（クローニング）アプローチの使用とは対照的に、ウシナীব型幹細胞の誘導は、望ましい特徴を有する胚の効率的な増殖を促進する場合がある。胚における望ましい遺伝的特徴は、自然に発生する可能性があり、*Smith et al.*, *WO 2020/168422* などの生殖補助技術、または遺伝子修飾を使用して生成することができる、減数分裂、変異、及び遺伝子移入などのプロセスの結果として生じる場合

10

20

30

40

50

がある。さらに、動物科学及び獣医学は、遺伝子修飾動物を大規模に生産するための効率的なプラットフォームを提供し、インビトロ育種プログラムの重要な構成技術を提供し、先進的な獣医学用生物製剤及び治療薬の開発及び提供を可能にすることによって、ナীব型幹細胞技術から幅広い利益を実現することができる。ナীব型ウシ胚性幹細胞、及びそれに関連する誘導プラストイド作製のための方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本明細書では、ウシナীব型胚性幹細胞を樹立するために、桑実胚及び胚盤胞期胚などのウシ胚を使用して付着及び伸長形成を達成するのに有用な材料及び方法が記載される。実施例で実証されるように、層状ECMコーティング基板上にプレーティングされた透明帯（ZP）除去ウシ胚は、従来のECMコーティング基板上にプレーティングされた胚と比較して、より高い付着率及び伸長形成を提供する。

10

【0007】

さらに、胚の付着及び伸長形成、ならびにそのような伸長からの内部細胞塊（ICM）細胞の増殖を支援し、ICMからのナীব型胚性幹細胞の誘導を可能にする伸長培地組成物及び関連する方法が記載されている。したがって、本明細書に記載される実施形態は、ナীব型ウシ胚性幹細胞を誘導するのに有用であり、任意選択で、例として、誘導プラストイド構造を作製する、望ましい遺伝的特徴を有する着床前胚を増殖させる、インビトロ育種プログラムのための始原生殖細胞及び／または配偶子を誘導する、及び／または獣医学用生物学的製剤及び治療薬を開発及び提供するためのなどの育種プログラムでの使用に有用である。

20

【0008】

したがって、一態様では、ナীব型ウシ胚性幹細胞を誘導するための方法が提供される。一実施形態では、この方法は、ナীব型ウシ胚性幹細胞を含む透明帯（ZP）除去ウシ胚を提供すること；ZP除去ウシ胚を細胞外マトリックス（ECM）コーティング基板と接触させることであって、ECMコーティング基板は、正に帯電した生体適合性ポリマー層に隣接する負に帯電した基板表面と、正に帯電した生体適合性ポリマー層に隣接する負に帯電したECM層を含む基板を含む、接触させること、ならびに伸長培地の存在下でZP除去ウシ胚を培養して、ECMコーティング基板へのZP除去ウシ胚の付着、及び誘導ナীব型ウシ胚性幹細胞を含む内部細胞塊（ICM）の伸長を誘導すること、を含む。

30

【0009】

一実施形態では、ウシ胚は遺伝子修飾されている。

【0010】

別の実施形態では、ZP除去ウシ胚は、再構成2倍体胚から得られる。

【0011】

一実施形態では、生体適合性ポリマーは生理学的pHで負に帯電している。一実施形態では、生体適合性ポリマーはA型ゼラチンである。

【0012】

一実施形態では、ECMはEHS-ECMを含む。

【0013】

一実施形態では、基板は、ポリスチレンを含む。

【0014】

一実施形態では、伸長培地は、基本培地と、ECMコーティング基板へのZP除去胚の付着及びフィーダーフリー培養系におけるICMの伸長を誘導するのに有用な本明細書に記載の1つ以上の成分とを含む。例えば、一実施形態では、伸長培地は、DMEM/F12とNeurobasal培地の1:1混合物；N2B27成分；Wnt活性化剤成分；Wnt阻害剤成分；MEK/ERK阻害剤成分；ROCK阻害剤成分；LIF成分；PKC阻害剤成分；及びインスリン成分：のうちの1つ以上を含む。任意選択で、伸長培地は

40

50

、アクチビン A 成分をさらに含む。

【0015】

一実施形態では、伸長培地は、N2B27成分；Wnt活性化剤成分；Wnt阻害剤成分；MEK／ERK阻害剤成分；ROCK阻害剤成分；LIF成分；アクチビン A 成分；PKC阻害剤；及びインスリン成分、を含む。

【0016】

一実施形態では、N2B27成分は、B27サプリメント及びN2サプリメントを含み、任意選択で、約1%のB27サプリメント及び約0.5%のN2サプリメントを含み；Wnt活性化剤成分は、CHIR99021、BIO、CHIR-98014、LY2090314、及び／またはIM-12を含み；Wnt阻害剤成分は、XAV939、IWR-1、及び／またはIWP-2を含み；MEK／ERK阻害剤成分は、PD0325901、ラボキセルチニブ、GSK1120212、MEK162、PD184352、トラメチニブ、LY3214996、及び／またはウリキセルチニブを含み；ROCK阻害剤成分は、Y27632、チアゾピビン、及び／またはブレビスタチンを含み；LIF成分は、ヒトLIFを含み；アクチビン A は、ヒトアクチビン A を含み；PKC阻害剤は、Go6983、Go6976、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、ソトラスタウリン、スタウロスポリン、及び／またはビスインドリルマレイミドを含み；及び／またはインスリン成分は、インスリンを含む。

10

【0017】

一実施形態では、ZP除去ウシ胚は、桑実胚（ステージ4）；胚盤胞（ステージ5）；拡張中胚盤胞（ステージ6）；拡張胚盤胞（ステージ7）；孵化中胚盤胞（ステージ8）；または孵化後胚盤胞（ステージ9）である。

20

【0018】

一実施形態では、ZP除去ウシ胚は、酵素補助ZP除去によって得られる。

【0019】

一実施形態では、方法は、酵素補助ZP除去によってZP除去ウシ胚を得ることを含む。

【0020】

また、本明細書では、酵素補助ZP除去の方法であって、以下のステップ：a) 胚を提供するステップ；b) 胚をプロテアーゼ溶液と接触させるステップ；c) プロテアーゼ溶液中で胚をインキュベートしてZPを部分的に消化し、ZP薄化胚を得るステップ；d) ZP薄化胚をプロテアーゼ不活化培地と接触させてプロテアーゼを不活化するステップ；e) ZPを破断させるステップ；及びf) 胚を操作して、胚からZPを分離するステップを含む、方法も提供される。

30

【0021】

一実施形態では、ステップc)におけるプロテアーゼの濃度は約0.1%～約0.5%、約0.2%～0.3%、または約0.25%である。

【0022】

一実施形態では、胚及びプロテアーゼ溶液は、ステップc)において約30～60秒間、任意選択で約45秒間インキュベートする。

40

【0023】

一実施形態では、ステップe)でマイクロブレードを使用してZPを破断させる。

【0024】

一実施形態では、ステップf)における胚の操作は、ピペッティングを含む。

【0025】

一実施形態では、この方法は、1つ以上のバイオマーカーについて、ZP除去ウシ胚の1つ以上の遺伝子型を決定するために遺伝子検査を行うことをさらに含む。

【0026】

一実施形態では、この方法は、1つ以上のバイオマーカーの遺伝子検査に基づいて、ZP除去ウシ胚を選択することをさらに含む。

50

【0027】

一実施形態では、この方法は、誘導ナীব型ウシ胚性幹細胞の1つ以上の遺伝子型を決定するために遺伝子検査を実行することをさらに含む。

【0028】

一実施形態では、ZP除去ウシ胚は、新鮮な胚、任意選択で新鮮な生検胚から得られる。

【0029】

一実施形態では、ステップa)の胚は、遺伝子修飾胚である。

【0030】

一実施形態では、ZP除去ウシ胚は、凍結胚、任意選択で生検凍結胚から得られる。

10

【0031】

一実施形態では、この方法は、凍結胚を解凍すること、及び胚を回復培地と接触させることを含む。

【0032】

一実施形態では、ZP除去ウシ胚は、凍結胚を解凍すること；凍結胚を回復培地と接触させること；胚を操作して、回復培地中の胚からZPを分離すること；及びZP除去ウシ胚を回復培地中でインキュベートすること、を含む方法によって得られる。

【0033】

一実施形態では、回復培地は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 (GSK-3) 阻害剤、MEK/ERKキナーゼ阻害剤、及びRh関連コイルドコイル含有プロテインキナーゼ (ROCK) 阻害剤を含む。

20

【0034】

一実施形態では、回復培地は、CHIR99021、PD0325901、及びY27632を含む。

【0035】

一実施形態では、この方法は、ZP除去胚をアダプテーション培地とともにインキュベートすることをさらに含み、アダプテーション培地は、回復培地と伸長培地との組み合わせを含む。

【0036】

一実施形態では、アダプテーション培地は、回復培地と伸長培地との組み合わせを、約0.5:1~1.5:1の間の比率、任意選択で約1:1の比率で含む。

30

【0037】

別の態様では、本明細書に記載された方法を使用して誘導されたナীবウシ幹細胞が提供される。さらなる態様には、育種スキームまたは遺伝子改良プログラムにおける、ならびに望ましい遺伝的特徴を有する着床前胚を増殖させる、インビトロ育種プログラムのための始原生殖細胞及び／または配偶子を誘導する、及び／または獣医学用生物学的製剤及び治療薬を開発及び提供するための、本明細書に記載の方法を使用して誘導されたナীবウシ幹細胞の使用が含まれる。

【0038】

別の態様では、細胞外マトリックス (ECM) コーティング基板を調製する方法であって、負に帯電した表面を含む基板を提供すること；負に帯電した表面を生体適合性ポリマーを含む第1の溶液と接触させることであって、生体適合性ポリマーは正に帯電している、接触させること；正に帯電した生体適合性ポリマーの層が、基板の負に帯電した表面上に堆積されるように、基板を第1の溶液と接触させてインキュベートすること；第1の溶液を除去し、任意選択で基板を洗浄すること；基板を細胞外マトリックス (ECM) を含む第2の溶液と接触させることであって、ECMは負に帯電している、接触させること；ならびに負に帯電したECMの層が正に帯電した生体適合性ポリマーの層上に堆積されるように、基板を第2の溶液と接触させてインキュベートすること、を含む、方法が提供される。

40

【0039】

50

一実施形態では、生体適合性ポリマーは、A型ゼラチンを含む。

【0040】

一実施形態では、ECMは、EHS-ECMを含む。

【0041】

一実施形態では、基板は、ポリスチレンを含む。

【0042】

一態様には、本明細書に記載の方法に従って作製されたECMコーティング基板が含まれる。

【0043】

さらなる態様には、正に帯電した表面；基板の負に帯電した表面と接触する、正に帯電した生体適合性ポリマーの層；正に帯電した生体適合性ポリマーの層と接触する、負に帯電したECMの層：を含む、ECMコーティング基板が含まれる。

【0044】

一実施形態では、生体適合性ポリマーは、A型ゼラチンを含む。

【0045】

一実施形態では、ECMは、EHS-ECMを含む。

【0046】

一実施形態では、基板は、ポリスチレンを含む。

【0047】

本開示の一態様は、胚を培養するための、任意選択で、ICM伸長を誘導する及び／またはナイーブ型胚性幹細胞を誘導するための、本明細書に記載のECMコーティング基板の使用を含む。

【0048】

一実施形態では、胚はウシ胚であり、任意選択で5日目～7日目の間のウシ胚である。

【0049】

別の実施形態では、ウシ胚は、再構成2倍体胚である。

【0050】

一実施形態では、胚は、遺伝子修飾胚である。

【0051】

別の態様では、胚を培養するための、任意選択で、ICM伸長を誘導する及び／またはナイーブ型胚性幹細胞を誘導するための、基本培地及び1つ以上の成分を含む培地組成物が提供される。一実施形態では、培地組成物は、N2B27成分；Wnt活性化剤成分；Wnt阻害剤成分；MEK/ERK阻害剤成分；ROCK阻害剤成分；LIF成分；PKC阻害剤；及びインスリン成分：のうちの1つ以上を含む。任意選択で、培地組成物は、アクチビンA成分をさらに含む。

【0052】

一実施形態では、N2B27成分は、約1%のB27サプリメント及び約0.5%のN2サプリメントを含み；Wnt活性化剤成分は、CHIR99021、BIO、CHIR-98014、LY2090314、またはIM-12を含み；Wnt阻害剤成分は、XAV939、IWR-1、またはIWP-2を含み；MEK/ERK阻害剤成分は、PD0325901、ラボキセルチニブ、GSK1120212、MEK162、PD184352、トラメチニブ、LY3214996、またはウリキセルチニブを含み；ROCK阻害剤成分は、Y27632、チアゾピビン、またはプレビスタチンを含み；LIF成分は、ヒトLIFを含み；アクチビンA成分は、ヒトアクチビンAを含み；PKC阻害剤は、Go6983、Go6976、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、ソトラスタウリン、スタウロスポリン、またはビスインドリルマレイミドを含み；及び／またはインスリン成分は、インスリンを含む。

【0053】

さらなる態様は、本明細書に記載の培地組成物を、胚を培養してICM伸長形成を誘導するために使用することを含み、任意選択で、胚はウシ胚、再構成2倍体ウシ胚であり、

10

20

30

40

50

及び／または胚は遺伝子修飾胚である。

【0054】

さらなる態様には、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3（GSK-3）阻害剤、任意選択でCHIR99021、MEK／ERKキナーゼ阻害剤、任意選択でPD0325901、及びRho関連コイルドコイル含有プロテインキナーゼ（ROCK）阻害剤、任意選択でY27632：を含む回復培地が含まれる。

【0055】

前述のセクションは、例としてのみ提供されており、本開示及び添付の特許請求の範囲を限定することを意図したものではない。本開示の組成物及び方法に関連する追加の目的及び利点は、本特許請求の範囲、説明、及び実施例を考慮すれば当業者には理解されるであろう。例えば、本開示の種々の態様及び実施形態は、多数の組み合わせで利用することができ、それらはすべて本明細書によって明示的に企図されている。これらの追加の利点、目的、及び実施形態は、本開示の範囲内に明示的に含まれる。本開示の背景を明らかにするために、また特定の場合には実践に関する追加の詳細を提供するために本明細書で使用する刊行物及び他の資料は、参照により組み込まれ、便宜上、添付の参照セクションに列挙される。

【図面の簡単な説明】

【0056】

本開示のさらなる目的、特徴及び利点は、本開示の例示的な実施形態を示す添付の図面と併せて以下の詳細な説明から、明らかになるであろう、添付の図面において：

【図1】異なるコーティング材料上にプレーティングされた胚の付着及び伸長速度を決定するための実験の結果を示す。（左上）コーティング溶液を含むNunc 35mm培養皿、（右上）コーティング材料に応じた付着及び伸長効率、（左下）付着していない胚、（右下）付着した胚。

【図2】Geltrix及び30um細孔セルストレーナーを備えた加工された皿表面の画像を示す（画像の倍率；×100）。

【図3】プラズマ処理ポリスチレン皿表面の化学構造の概略図を示す。

【図4】交互積層法（Layer-By-Layer）（LBL）コーティングの図を示す。

【図5】交互積層法ECMコーティング基板を使用した改善された誘導効率を示す。LBL ECMコーティング基板は、EHS-ECMのみを使用した対照プロトコールと比較して、高くかつ安定な付着率、TE（栄養外胚葉細胞）及びICM（内部細胞塊）の成長を示した。

【図6】（左）プロテアーゼ処理皿のレイアウトの概略図、及び（右）ZPが酵素処理によって完全に除去されたプロテアーゼ処理された低品質胚の画像を示す。

【図7】ZP除去6日目の新鮮な胚を示す。ZP除去後、すべての胚は健康に見える。

【図8】解凍後回復皿のレイアウトの概略図（左上）、及び解凍後の胚の回復に対する2iY培地の効果を示す画像（右上）を示す。（下）2iY処理胚は、胚のより速い再拡張によって観察されるように、対照胚培養培地よりも速い回復、及びより高い誘導効率を示していた。2iY処理胚は、対照群よりも大きなサイズ及び明確なICMを示していた（破線の円）。

【図9】解凍後の胚の品質に対する2iYの効果を示すグラフである。2iY処理胚は、解凍後の回復後に、より進んだ発達ステージを示す。

【図10】アダプテーション培地皿#1及び皿#2のレイアウトの概略図を示す。下部は、伸長の誘導に対するアダプテーション時間の影響を示すグラフである。

【図11】種々のタイプの血清源による誘導結果を示すグラフである。FBS＝ウシ胎児血清；KOSR＝knock-out serum replacement（ノックアウト血清リプレースメント）；SR＝血清代替品；N2B27＝N2サプリメント＋B27サプリメント（実施例を参照のこと）。

【図12】種々のWntシグナル伝達経路及び標的を示す概略図である。

10

20

30

40

50

【図 1 3】 ナイーブ型幹細胞の誘導に対するフォルスコリン及び二重キナーゼ W n t 経路修飾の効果を示すグラフである。

【図 1 4】 伸長物の誘導に対する I L - 6 及び S R C 阻害剤の効果を示すグラフである。下部は、S R C の下流の種々の経路を示す概略図である。

【図 1 5】 ナイーブ伸長の形成に対する M E K 阻害剤の効果を示す。

【図 1 6】 ナイーブ型幹細胞培地（左）と t 2 i L G o Y 培地によって誘導された伸長コロニーを示す画像との間の誘導効率を示すグラフである。

【図 1 7】 （左）伸長の内胚葉分化を示す。I C M コロニー（矢印）は、未分化（矢じり）及び分化（星）内胚葉細胞によって覆われている。（右）インスリン添加後の 1 回目の継代後の I C M 細胞コロニー（明色の縁を有する細胞の塊）。

10

【図 1 8】 ナイーブ型ウシ胚性幹細胞の誘導に基づいて、続いて始原生殖細胞株及び配偶子を生成し、複数の遺伝的に同一の胚（誘導プラストイドとも呼ばれる）を生成するための細胞株の誘導に含まれるステップの概略を示す。

【発明を実施するための形態】

【0057】

以下は、本開示を実践する当業者を支援するために提供される詳細な説明である。特に定義されない限り、本明細書で用いる全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書の説明で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明する目的のみであり、本開示を限定するようには意図されていない。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、図面及び他の参考文献は、参照によってその全体が明示的に組み込まれる。

20

【0058】

さらに、特定のセクションに記載されている定義及び実施形態は、当業者には理解されるように、それらが好適である本明細書に記載されている他の実施形態に適用可能であることが意図されている。例えば、以下の文章では、本開示のさまざまな態様がより詳細に定義される。そのように定義された各態様は、反対のことが明確に示されない限り、他の任意の態様と組み合わせることができる。特に、本明細書に記載の任意の特徴は、本明細書に記載の他の任意の特徴と組み合わせることができる。

【0059】

I. 一般的な定義

30

本明細書で使用される場合、以下の用語は、特に指定がない限り、以下に帰属する意味を有する場合がある。しかし、当業者に公知または理解されている他の意味も可能であり、本開示の範囲内にあることを理解されたい。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によってその全体が組み込まれる。矛盾する場合、定義を含めて、本明細書が優先される。加えて、材料、方法、及び実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

【0060】

値の範囲が提供される場合、文脈が別途明確に指示しない限り、下限値の単位の 10 分の 1 までの、その範囲の上限値から下限値の間の各介在値、ならびにその表示範囲の任意の他の表示値または介在値が、本明細書に包含されることが理解される。任意の下限値から任意の上限値までの範囲を企図する。これらのより小さい範囲の上限値及び下限値は、より小さい範囲内に独立して含まれてもよく、また、表示範囲内の任意の具体的な除外限度に従って、本明細書にも包含される。表示範囲が 1 つまたは両方の限界値を含む場合、それらの含まれる限定値の片方（または）両方を除外する範囲もまた、本発明に含まれる。

40

【0061】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。

【0062】

50

本明細書の詳細な説明及び特許請求の範囲内のすべての数値は、示された値「約」または「およそ」によって修正され、当業者によって予想される実験誤差及び変動を考慮に入れている。

【0063】

本明細書及び特許請求の範囲において使用される「及び／または」という語句は、そのように結合した要素、すなわち、ある場合には結合的に存在し、他の場合には分離的に存在する要素の「一方または両方」を意味すると理解されるべきである。「及び／または」と列挙された複数の要素は、同じように、すなわちそのように結合した要素の「1つ以上の」と解釈されるべきである。具体的に特定された要素と関連するかどうかにかかわらず、「及び／または」の句によって具体的に特定される要素以外の他の要素が任意選択により存在してもよい。

10

【0064】

本明細書及び特許請求の範囲において本明細書で使用する「または」は、上で定義した「及び／または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、リスト中の項目を分離する場合、「または」または「及び／または」は包括的であると解釈されるべきであり、すなわち、複数の要素またはリストの要素、及び任意選択でリストにない追加の項目のうちの少なくとも1つを含むが、また同様に1つ以上を含む。「のうちの1つのみ」または「のうちの厳密に1つ」、または特許請求の範囲において使用される場合の「からなる」などの、明確に反対を示す用語のみが、複数の要素またはリストの要素のうちの厳密に1つの要素を含むことを意味する。一般的に、本明細書で使用される「または」という用語は、「どちらか一方」「のうちの1つ」「のうちの1つのみ」または「のうちの厳密に1つ」という排他性を意味する用語が先行する場合、排他的な代替物（すなわち、「一方または他方であるが両方ではない」）を示すものとしてのみ解釈されるものとする。

20

【0065】

上記の明細書と同様に特許請求の範囲において、「備える (comprising)」「含む (including)」「運ぶ (carrying)」「有する (having)」「含有する (containing)」「包含する (involving)」「保持する (holding)」「からなる (composed of)」などの全ての移行句は非限定的に用いられるものであり、すなわち、それを含むがそれに限定されることはないということの意味すると理解されるべきである。「からなる (consisting of)」及び「実質的にからなる (consisting essentially of)」という移行句のみが、それぞれ限定的または半限定的な移行句である。

30

【0066】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、1つ以上の要素のリストに関して、「少なくとも1つの」という語句は、要素のリスト内の1つ以上の要素から選択される、少なくとも1つの要素を意味し、必ずしも要素のリスト内に具体的に挙げられたありとあらゆる要素のうちの少なくとも1つを含むというわけではなく、要素のリスト内の要素の任意の組み合わせを除外しないと理解されるべきである。この定義によってまた、「少なくとも1つの」という語句が指す要素のリスト内で具体的に特定される要素以外に、具体的に特定されたこれらの要素に関連しているかどうかにかかわらず、要素が任意選択で存在してもよいことが可能になる。

40

【0067】

本明細書で使用される「約」という用語は、参照されている数値のプラスまたはマイナス10%～15%、5～10%、または任意選択で約5%を意味する。

【0068】

2つ以上のステップまたは動作を含む、本明細書に記載のある特定の方法では、方法のステップまたは動作の順序は、文脈により別途示されない限り、方法のステップまたは動作が記載されている順序に必ずしも限定されないことを理解すべきである。

【0069】

本明細書に記載されているものと類似または同等の任意の方法及び材料を、本開示の実

50

践または試験に使用することができると理解すべきである。

【0070】

II. 方法

本明細書では、ナীব型胚性幹細胞の伸長形成及びナীব型胚性幹細胞の誘導のための方法が記載される。実施例に記載されているように、発明者らは、層状ECMコーティング基板及び具体的に配合された伸長培地を含むフィーダーフリー培養系におけるナীবウシ幹細胞伸長形成を実証した。層状ECMコーティング基板及び伸長培地は、桑実胚または胚盤胞期（例えば、ウシ6日目または7日目）の胚などの胚に由来する内部細胞塊（ICM）細胞のエキスピボまたはインビトロでの付着及び伸長を支援する。したがって、本明細書に記載される材料及び方法は、ナীব型ウシ胚性幹細胞を誘導及び維持するの

10

【0071】

したがって、一態様では、ナীব型ウシ胚性幹細胞を誘導するための方法が提供される。一実施形態では、この方法は、

ナীব型ウシ胚性幹細胞を含む透明帯（ZP）除去ウシ胚を提供すること；

ZP除去ウシ胚を細胞外マトリックス（ECM）コーティング基板と接触させることであ

20

って、ECMコーティング基板は、正に帯電した生体適合性ポリマー層に隣接する負に帯電した基板表面と、正に帯電した生体適合性ポリマー層に隣接する負に帯電したECM層とを含む基板を含む、接触させること、ならびに

【0072】

伸長培地の存在下でZP除去ウシ胚を培養して、ECMコーティング基板へのZP除去ウシ胚の付着、及び誘導ナীব型ウシ胚性幹細胞を含む内部細胞塊（ICM）の伸長を誘導すること、を含む。

本明細書で使用される場合、「ナীব型胚性幹細胞」という用語は、桑実胚期の胚、例として、細胞がまだ未分化状態にある、5日目または6日目のウシ胚、の細胞の分子的特徴を実質的に保持する胚性幹細胞を指すために使用される。ナীব型胚性幹細胞は、胚盤胞（7日目の胚など）の内部細胞塊（ICM）内で見出される場合がある。ナীব型胚性幹細胞は、完全な生物に発達することができる場合があり、及び／または成体組織及び／または細胞型の完全な補体を生じさせる能力を保持している場合がある。ナীব型胚性幹細胞は、人工多能性幹細胞（iPSC）とは対照的に、外因性多能性因子の発現を必要とせず、自己複製の未分化状態で誘導及び維持することができる。同様に、「ナীব型ウシ胚性幹細胞」という用語は、ウシ由来のナীব型胚性幹細胞を指す。

30

【0073】

ナীব型胚性幹細胞、例としてナীব型ウシ胚性幹細胞は、例えば、胚、例えば桑実胚（ステージ4）；胚盤胞（ステージ5）；拡張中胚盤胞（ステージ6）、拡張胚盤胞（ステージ7）、孵化中胚盤胞（ステージ8）、または孵化後胚盤胞（ステージ9）の胚細胞など、十分に未分化な組織から誘導することができる。一実施形態では、ナীব型ウシ胚性幹細胞は、3～8日目のウシ胚、任意選択で、3、4、5、6、7、もしくは8日目のウシ胚、または5～7日のウシ胚から誘導することができる。一実施形態では、ウシ胚は、桑実胚（ステージ4）；胚盤胞（ステージ5）；拡張中胚盤胞（ステージ6）；拡張胚盤胞（ステージ7）；孵化中胚盤胞（ステージ8）；または孵化後胚盤胞（ステージ9）である。一実施形態では、ウシ胚は3～7日目の胚であり、任意選択で5～7日目の胚、または6日目もしくは7日目の胚である。一実施形態では、胚は、着床前胚である。一実施形態では、胚は、以前に凍結及び／または生検された胚である。一実施形態では、胚は、遺伝子修飾されている。一実施形態では、胚は、1つ以上のバイオマーカーの遺伝子検査に基づいて選択される。

40

50

【0074】

「遺伝子修飾胚」とは、胚細胞のゲノムDNAを操作して、1つ以上の外因性遺伝子を発現させ、及び／または1つ以上の内因性遺伝子または遺伝子産物の発現または機能活性に影響を及ぼす変異（複数可）を内因性遺伝子または遺伝子間領域内に導入した胚を指す。ウシ胚における遺伝子修飾の成功例としては、マイクロインジェクションによる導入遺伝子の導入（U．S．7，067，713）及びレンチウイルス感染（Park，2007）、ならびに最近では、トランスフェクション及びゲノム編集ツール、例としてジungkフィンガーヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）などを使用したゲノム編集（Bishop and Van Eenennaam，2020）、ならびにクラスター化され規則的に間隔を空けた短いパリンドロームリピート（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）／CRISPR関連遺伝子（CRISPR／Cas）システムが挙げられる。遺伝子修飾の一般的なウシ標的は、乳タンパク質遺伝子、例としてβ-ラクトグロブリン、β-カゼイン、ミオスタチン、有角／無角、耐暑性を改善するためのスリック（slick）被毛を与えるプロラクチン受容体、及び疾患感受性もしくは回復力に關与する種々の遺伝子である（Wang et al．，2022）。

10

【0075】

同様に、「遺伝子修飾細胞」とは、細胞のゲノムDNAを操作して、1つ以上の外因性遺伝子を発現させ、及び／または1つ以上の内因性遺伝子または遺伝子産物の発現または機能活性に影響を及ぼす変異（複数可）を内因性遺伝子または遺伝子間領域内に導入した細胞を指す。

20

【0076】

透明帯（ZP）は、培養基板への胚細胞の付着を妨げる。したがって、一実施形態では、胚のZPを、層状ECMコーティング基板及び／または伸長培地と接触させる前に除去する。ZP除去胚は、任意の好適な方法を使用して提供または取得することができる。例えば、ZPを、酵素的、化学的、及び／または機械的手段を使用して薄化及び／または破断して、その後、機械的操作によって胚から分離して、ZP除去胚を得ることができる。ZPを薄化及び／または破断するための好適な酵素的または化学的手段としては、例えば、プロナーゼなどのプロテアーゼまたは酸性タイロイド液の使用が挙げられる。ZPを破断するための好適な機械的方法としては、例えば、マイクロブレード、マイクロピペット、マイクロニードル、またはレーザーの使用が挙げられる。破断したZPは、例えば、ピペッティング、ボルテックス処理、またはマイクロピペットもしくはマイクロニードルを使用する直接操作などの攪拌によって、胚から分離することができる。

30

【0077】

一実施形態では、ZP除去胚は、酵素補助ZP除去によって得られる。実施例に示すように、桑実胚（6日目）ウシ胚のプロテアーゼ処理、その後のZPの機械的破断及び分離により、本明細書に記載されるナীব型胚性幹細胞を誘導するのに好適なZP除去胚が得られる。

【0078】

従来の胚生検技術では、例えばマイクロブレードを使用してZPを破断させる。したがって、一実施形態では、ZP除去胚は、生検胚から得られる。

40

【0079】

胚における望ましい遺伝的特徴は、減数分裂、変異、及び遺伝子移入などのプロセスの結果として生じる場合があり、これらは、自然に発生するか、または遺伝子修飾によって発生する可能性がある。したがって、一実施形態では、ZP除去胚は、遺伝子修飾胚から得られる。

【0080】

ZP除去ウシ胚が得られる胚は、新鮮なものであっても事前に凍結されたものであってもよく、任意選択で生検凍結胚から得られるものであってもよい。一実施形態では、胚は、遺伝子検査された胚である。

50

【0081】

一実施形態では、ウシ胚は、再構成2倍体胚である。再構成2倍体胚は、例えば、Smith et al.、WO2020/168422に記載されており、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0082】

所定のゲノムを有する2倍体胚は、スクリーニング及び選択された雄性生殖及び単為生殖の胚性半数体細胞を使用して、双親胚を再構成することによってインビトロで生成することができる(Smith et al.、WO2020/168422)。再構成2倍体胚のゲノムは、対立遺伝子、ハプロタイプ、または、例として、生産形質(例えば、牛乳、脂肪、タンパク質、脂肪%、タンパク質%、乳タンパク質バリエーション組成。例えば、A2A2牛乳)、肉質形質、成長形質、健康形質(例えば、体細胞スコア、乳房炎抵抗性、免疫応答、生存性、耐病性)、繁殖形質(例えば、妊娠率、受胎率)、分娩形質(例えば、分娩の容易さ、分娩後初回授精まで、死産)、体型形質(例えば、無角形質、乳房及び乳頭形質、足及び脚形質、体格形質、寸法形質)、効率形質(例えば、飼料利用性形質、作業性、寿命、生産寿命)、新規形質(例えば、ロボット搾乳形質、耐暑性、活動形質及び行動形質)、及び複合指数形質(例えば、LPI(生涯生産性指数)、TPI(総生産性指数)、及び種々の有害な対立遺伝子及びハプロタイプの欠如(例えば、矮小体軀症、単蹄、減毛症、短脊椎症、シトルリン血症、ウシ白血球接着不全)、のような遺伝的またはゲノム的特徴を大幅に補完するための厳格な遺伝的基準を満たす形質の固有の組み合わせを含むように作製することができる。

【0083】

培養中のほとんどの細胞(間質由来細胞を除く)は、組織培養皿などのインビトロで付着及び増殖するために支持層を必要とする。この支持層は、一般にフィーダー細胞系として知られる間質細胞(皿に直接付着)から作成され得る。胚性幹細胞の培養には、マウス胚性線維芽細胞(MEF)フィーダー系がよく使用される。しかし、フィーダー系を使用する場合の欠点の1つは、マウスとは異なる種の胚性幹細胞などの細胞をMEF上で培養する場合に、異種間汚染が発生する可能性があることである。別の選択肢は、支持層としてタンパク質マトリックスを使用することであり、フィーダーフリー系としても知られている。

【0084】

Boggliotti et al. (2018)は、ウシプライム型胚性幹細胞を培養するためのフィーダー系の使用について記載しており、そこでは、低い付着率を補うために、針を使用して胚を培養皿の底に押しつけた。しかし、このような外因性の機械的力を使用すると、細胞が損傷することがある。対照的に、本明細書に記載の実施形態は、細胞を培養皿上に機械的に押し付けることなく、分化度の低いナীব型胚性幹細胞の付着及び伸長形成を達成する。一実施形態では、本明細書に記載の方法及び生成物は、ナীব型胚性幹細胞を誘導するためのフィーダーフリー系を提供する。

【0085】

例えば、図5に示すように、正に帯電した生体適合性ポリマー結合層を用いる交互積層法(LbL)プロトコルを使用して生成されたECMコーティング基板は、Engelbreth-Holm-Swarmマウス肉腫細胞から抽出されたECM、例としてMatrigel(Corning製)またはGeltrex(Invitrogen製)を使用した対照基板と比較して、より高くより安定な付着率ならびにTE(栄養外胚葉細胞)及びICM(内部細胞塊)の成長を示した。

【0086】

したがって、一実施形態では、正に帯電した表面;基板の負に帯電した表面と接触する、正に帯電した生体適合性ポリマーの層;正に帯電した生体適合性ポリマーの層と接触する、負に帯電したECMの層;を含む、基板が提供される。

【0087】

また、本明細書に記載される胚の付着及び伸長に好適なECMコーティング基板を調製

する方法も提供される。一実施形態では、この方法は、

- a) 負に帯電した表面を含む基板を提供すること、
- b) 負に帯電した表面を、生体適合性ポリマーを含む第1の溶液と接触させることであって、生体適合性ポリマーは正に帯電している、接触させること；
- c) 正に帯電した生体適合性ポリマーの層が、基板の負に帯電した表面上に堆積されるように、基板を第1の溶液と接触させてインキュベートすること；
- d) 第1の溶液を除去し、任意選択で基板を洗浄すること；
- e) 基板を細胞外マトリックス（ECM）を含む第2の溶液と接触させることであって、ECMは負に帯電している、接触させること；ならびに
- f) 負に帯電したECMの層が正に帯電した生体適合性ポリマーの層上に堆積されるように、基板を第2の溶液と接触させてインキュベートすること、を含む。

10

【0088】

本明細書で使用される場合、「基板」という用語は、一般に、材料の層（複数可）が堆積または接着する物理的表面を意味する。基板は剛性であっても柔軟性であってもよく、任意の好適な材料、例えばポリスチレンなどのプラスチックで作成してもよい。基板は、親水性にするため、及び／または表面に負電荷などの電荷を与えるために処理してもよい。任意選択で、基板はプラズマ処理される。一実施形態では、基板はプラズマ処理ポリスチレン（組織培養プラスチックとしても知られる）である。

【0089】

本明細書で使用される場合、「生体適合性ポリマー」という用語は、一般に、生きた組織または細胞と適合性のあるポリマー、例えば非毒性であり、例えば生存、成長、増殖及び／または細胞の他の生物学的活性に対して望ましくない影響を引き起こさないポリマーを意味する。生体適合性ポリマーは、そのような活動性に関して不活性であり得、及び／または所望の活動性を支援し得る。生体適合性ポリマーは、天然に存在するポリマーであってもよく、天然に存在するポリマーから調製されてもよく、または所望の特性を有する合成ポリマーであってもよい。好適な生体適合性ポリマーは、基板をポリマーでコーティングするために使用される条件下で、基板の表面上へのポリマーの堆積及び／または接着をもたらす特性を有する。ポリマーの堆積または接着は、例えば、静電相互作用、水素結合、または他の任意の好適なタイプ（複数可）の相互作用を通じて起こり得る。したがって、生体適合性ポリマーの好適な特性には、例えば、コーティングに使用される溶液のpHにおける正電荷などの電荷を含めてもよい。ポリマーと基板の間の相互作用は、その後の洗浄及びECMコーティングステップに使用される条件（例えば、pH）、及び細胞培養に使用される条件（例えば、生理学的pH）の下で維持される必要がある。好適なポリマーとしては、ゼラチンA型（酸硬化組織由来のものなど）が挙げられる。したがって、一実施形態では、生体適合性ポリマーはA型ゼラチンであり、任意選択でA型ブタゼラチンである。

20

30

【0090】

当技術分野で理解されるように、「インキュベートする」または「インキュベートすること」という用語は、例えば物質、材料、組成物などを特定の温度または温度範囲内に一定期間維持することを意味する。

40

【0091】

本明細書で使用される場合、「生理学的pH」という用語は、約7.1～約7.6、任意選択で約7.15～約7.45、約7.2～約7.4、約7.25～約7.35、または約7.3のpHを意味する。

【0092】

本明細書で使用される「細胞外マトリックス」または「ECM」という用語は、一般に、例えばタンパク質、グリコサミノグリカン（GAG）、及び／またはプロテオグリカンなどの1つ以上の高分子成分を含む生体適合性マトリックスを意味し、これは、例えばエクスピボまたはインビトロで成長した細胞などの、細胞の成長及び増殖のための付着及び支持を提供する。一般的なECM成分としては、ラミニン、コラーゲン（例えば、コラー

50

ゲンⅠ～ⅩⅤ）、フィブロネクチン、ビトロネクチン、エンタクチン／ニドゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、及び／またはそれらの１つ以上の機能的バリエーションの１つ以上を挙げることができるが、これらに限定されない。当技術分野で知られているように、ECMには一般に、Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫細胞から単離されたものなどの基底膜抽出物が含まれ、以下「EHS-ECM」と呼ぶ（例えば、商品名Matrigel（商標）（Corning）及びGeltrex（商標）（ThermoFisher）で販売されている）。一実施形態では、EHS-ECMは、例えば、ラミニン、コラーゲンⅣ、エンタクチン／ニドゲン、及びヘパラン硫酸プロテオグリカンを含み得る。あるいは、所望であれば、異なる組成及び／または精製成分（例えば、FN）を有するECMの他の供給源、及び／または合成ECM様基板（例えば、RGDペプチドを含む）もまた、コーティング方法で使用するすることができる。当業者には理解されるように、好適なECM成分（複数可）の選択は、細胞型、分化のステージ、及び他の実験パラメータを含むがこれらに限定されない複数の要因に依存する。例えば、EHS-ECMは、ウシ胚の培養（例えば、付着及び伸長）に好適であることが本明細書で実証されている。したがって、一実施形態では、ECMはEHS-ECMであり、任意選択でMatrigelまたはGeltrexである。

10

【0093】

本明細書に示されているように、ウシ胚からの付着及び伸長形成は、胚が培養される伸長培地の組成によって影響を受ける。伸長培地は、例えば、基本培地、及び１つ以上の小分子、成長因子、及び／または栄養素を含み得る。好適な基本培地は、当業者が容易に決定することができ、DMEM／F12、改良型DMEM／F12及びNeurobasal培地を含むが、これらに限定されない。適切なサプリメントは、当業者が容易に決定することができ、MEM非必須アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax、アスコルビン酸、インスリン、BSA（画分Ⅴ）、ベータ-メルカプトエタノール及びペニシリン／ストレプトマイシンを含むが、これらに限定されない。本開示の一態様では、ICMの付着及び伸長を含む、ナイーブ型胚性幹細胞の誘導及び維持に有用な伸長培地成分が提供される。一実施形態では、伸長培地は、基本培地及び／またはサプリメント、ならびに１つ以上の伸長培地成分を含む。一実施形態では、伸長培地は、B27サプリメント及びN2サプリメントを含み、任意選択で約１％のB27サプリメント及び約０．５％のN2サプリメントを含む、１つ以上のN2B27成分；Wnt活性化剤成分、任意選択でCHIR99021、BIO、CHIR-98014、LY2090314、またはIM-12；Wnt阻害剤成分、任意選択でXAV939、IWR-1、またはIWP-2；MEK／ERK阻害剤成分、任意選択でPD0325901、ラボキセルチニブ、GSK1120212、MEK162、PD184352、トラメチニブ、LY3214996、またはウリキセルチニブ；ROCK阻害剤成分、任意選択でY27632、チアゾピピン、またはブレビスタチン；LIF成分、任意選択でヒトLIF；PKC阻害剤、任意選択でGo6983、Go6976、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、ソトラスタウリン、スタウロスポリン、またはビスインドリルマレイミド；ならびにインスリン成分、任意選択でインスリンを含む。任意選択で、伸長培地は、N2B27、CHIR99021（Wnt活性化剤）、XAV939（Wnt阻害剤）、PD0325901（MEK／ERK阻害剤）、ラボキセルチニブ（ERK特異的阻害剤）、Go6983（PKC阻害剤）、Y27632（ROCK阻害剤）、及び／またはLIFのうちの１つ以上を含んでもよい。一実施形態では、伸長培地は、アクチビンA成分、任意選択でヒトアクチビンAをさらに含む。

20

30

40

【0094】

Ⅱ．生成物及び組成物

本開示の一態様では、ナイーブ型ウシ胚性幹細胞の誘導及び培養に有用な生成物及び組成物が提供される。

【0095】

例えば、一実施形態では、正に帯電した生体適合性ポリマー層に隣接する負に帯電した

50

基板表面と、正に帯電した生体適合性ポリマー層に隣接する負に帯電したECM層とを含む基板を含むECMコーティング基板が提供される。一実施形態では、生体適合性ポリマーは、A型ゼラチンである。一実施形態では、ECMは、EHS-ECMを含む。一実施形態では、基板は、ポリスチレンなどの細胞培養に好適なプラスチック基板である。

【0096】

また、本明細書に記載のウシ胚の付着、伸長形成の促進、及び／またはナイーブ型ウシ胚性幹細胞の誘導に好適な培地の配合物も提供される。

【0097】

一実施形態では、伸長培地は、基本培地と、本明細書で特定される1つ以上の成分とを含む。例えば、一実施形態では、伸長培地は、N2B27成分、Wnt活性化剤成分、Wnt阻害剤成分、MEK/ERK阻害剤成分、ROCK阻害剤成分、LIF成分、PKC阻害剤、及びインスリン成分、のうちの1つ以上を含む。一実施形態では、伸長培地は、N2B27成分、Wnt活性化剤成分、Wnt阻害剤成分、MEK/ERK阻害剤成分、ROCK阻害剤成分、LIF成分、PKC阻害剤、及びインスリン成分を含む。

【0098】

一実施形態では、N2B27成分は、B27サプリメント及びN2サプリメント、任意選択で約1%のB27サプリメント及び約0.5%のN2サプリメントを含む。

【0099】

一実施形態では、Wnt活性化剤成分は、CHIR99021、BIO、CHIR-8014、LY2090314、またはIM-12を含む。任意選択で、Wnt活性化剤成分は、任意選択で約0.1 μ M～約5 μ M、任意選択で約1 μ M、～約3 μ M、任意選択で約1 μ M、約2 μ M、または約3 μ Mの濃度でCHIR99021を含む。

【0100】

一実施形態では、Wnt阻害剤成分は、XAV939、IWR-1、またはIWP-2を含む。任意選択で、Wnt阻害剤成分は、任意選択で約0.2 μ M～約10 μ M、任意選択で約1 μ M～約5 μ M、任意選択で約2 μ Mの濃度でXAV939を含む。任意選択で、Wnt阻害剤成分は、任意選択で約0.25 μ M～約10 μ M、任意選択で約1 μ M～約5 μ M、任意選択で約2.5 μ Mの濃度でIWR-1を含む。

【0101】

一実施形態では、MEK/ERK阻害剤成分は、PD0325901、ラボキセルチニブ、GSK1120212、MEK162、PD184352、トラメチニブ、LY3214996、またはウリキセルチニブを含む。任意選択で、MEK/ERK阻害剤成分は、PD0325901またはラボキセルチニブを含む。任意選択で、MEK/ERK阻害剤成分は、約0.05 μ M～約5 μ M、任意選択で約0.1 μ M～約2 μ M、任意選択で約1 μ Mの濃度でPD0325901を含む。任意選択で、MEK/ERK阻害剤成分は、約0.25 μ M～約10 μ M、任意選択で約1 μ M～約5 μ M、任意選択で約2.5 μ Mの濃度でラボキセルチニブを含む。

【0102】

一実施形態では、ROCK阻害剤成分は、Y27632チアゾピビン、またはブレビスタチンを含む。任意選択で、ROCK阻害剤成分は、任意選択で約0.5 μ M～約20 μ M、任意選択で約5 μ M～約10 μ M、任意選択で約5 μ Mまたは約10 μ Mの濃度でY27632を含む。

【0103】

一実施形態では、LIF成分は、任意選択で約1 ng/ml～約1000 ng/ml、任意選択で約5 ng/ml～約100 ng/ml、任意選択で約5 ng/ml、約10 ng/ml、約20 ng/ml、または約100 ng/mlの濃度でヒトLIFを含む。

【0104】

一実施形態では、アクチビンAは、任意選択で約1 ng/ml～約50 ng/ml、任意選択で約5 ng/ml～約50 ng/ml、任意選択で約10 ng/mlまたは約20 ng/mlの濃度でヒトアクチビンAを含む。

【0105】

一実施形態では、PKC阻害剤は、Go6983、Go6976、LY317615、LY333531、PKC412、GSK690693、ソトラスタウリン、スタウロスポリン、またはビスインドリルマレイミドを含む。任意選択で、PKC阻害剤は、任意選択で約0.2 μM～約25 μM、任意選択で約2 μM～約2.5 μM、任意選択で約2 μMまたは約2.5 μMの濃度でGo6983を含む。

【0106】

一実施形態では、インスリン成分は、任意選択で約2 μg/ml～約200 μg/ml、任意選択で約20 μg/mlの濃度でインスリンペプチドを含む。

【0107】

また、胚の解凍後の回復に好適な製剤も提供される。図8及び9に示されるように、本明細書に記載されるように配合された回復培地で処理された胚は、対照と比較して胚のより速い再拡張によって観察されるように、より速い回復及びより高い誘導効率を示した。回復培地で処理した胚はまた、対照と比較してより大きく見え、より明確なICMを有していた。

【0108】

一実施形態では、回復培地は、グリコゲンシンターゼキナーゼ3 (GSK-3) 阻害剤、MEK/ERKキナーゼ阻害剤、及びRho関連コイルドコイル含有プロテインキナーゼ (ROCK) 阻害剤を含む。好適なGSK-3阻害剤としては、例えばCHIR99021が挙げられる。好適なMEK/ERK阻害剤としては、例えばPD0325901が挙げられる。好適なROCK阻害剤としては、例えばY27632が挙げられる。一実施形態では、回復培地はCHIR99021を、任意選択で0.1 μM～約5 μM、任意選択で約1 μM～約3 μM、任意選択で約1 μM、約2 μM、または約3 μMで；PD0325901を、任意選択で約0.05 μM～約5 μM、任意選択で約0.1 μM～約2 μM、または約1 μMで；及びY27632を、任意選択で約0.5 μM～約20 μM、任意選択で約5 μM～約10 μM、または約10 μMで含む。

【0109】

また、本明細書に記載のECMコーティング基版、伸長培地及び／または回復培地のうちの1つ以上を含むキットも提供される。一実施形態では、ECMコーティング基板、伸長培地、及び／または回復培地は、別個の容器にパッケージ化される。

【0110】

一態様には、本明細書に記載の方法を使用して誘導されたナীবウシ幹細胞が含まれる。一実施形態では、ナীবウシ幹細胞は遺伝子修飾幹細胞である。

【0111】

III. 使用

また、培養中の胚の付着、胚細胞の伸長、及び／またはナীব型胚性幹細胞の誘導を支援するための、本明細書に記載の生成物、組成物またはキットの使用も提供される。

【0112】

例えば、一実施形態では、胚及び／または胚由来の細胞を培養するための、本明細書に記載のECMコーティング基板の使用が提供される。一実施形態では、ECMコーティング基板は、胚の付着及び／または伸長、ならびにナীব型胚性幹細胞、任意選択でナীব型ウシ胚性幹細胞の誘導を促進するのに有用である。

【0113】

別の実施形態では、胚及び／または胚由来の細胞を培養するための、本明細書に記載の伸長培地の使用が提供される。一実施形態では、伸長培地は、胚の付着及び／または伸長、ならびにナীব型胚性幹細胞、任意選択でナীব型ウシ胚性幹細胞の誘導を促進するのに有用である。一実施形態では、伸長培地は、本明細書に記載のECMコーティング基板と組み合わせて使用するためのものである。

【0114】

別の実施形態では、胚、任意選択でウシ胚、及び任意選択で再構成2倍体ウシ胚を処理

10

20

30

40

50

するための、本明細書に記載の回復培地またはアダプテーション培地の使用が提供される。一実施形態では、回復培地は、新鮮な胚、または以前に生検及び／または凍結された胚を処理するのに有用である。回復培地は、例えばZP除去、解凍、生検、遺伝子編集、または細胞誘導など、胚が回復培地から利益を受けることができるプロセスにも有用である。

【0115】

さらなる態様には、育種スキームまたは遺伝子改良プログラムにおける、または望ましい遺伝的特徴を有する着床前胚を増殖させる、インビトロ育種プログラムのための始原生殖細胞及び／または配偶子を誘導する、及び／または獣医学用生物学的製剤及び治療薬を開発及び提供するための、本明細書に記載の方法を使用して誘導されたナীবウシ幹細胞の使用が含まれる。

10

【0116】

以下の非限定的実施例は、本出願を例示するものである。

【実施例】

【0117】

実施例1. コーティング材料の最適化

この実施例では、3つの異なる細胞外マトリックスコーティング材料を、コーティング材料として試験した：ゼラチンタイプA (Sigma、G1890)、Geltrex (商標) (Thermo Fisher、A1413301) 及びMatrigel (商標) (Corning、354277)。特に示さない限り、実施例で使用されるEHS-ECM (細胞外マトリックス) は、Geltrex 及び／またはMatrigelを指す。

20

【0118】

コーティング材料のタイプごとに、及び材料の種々の濃度で、付着率及び伸長率を決定した。

【0119】

コーティングのプロトコールは、以下の通りであった：

1. 50 μ L のコーティング溶液を4ドロップ：0.1%ゼラチンまたは100倍濃縮溶液として提供されたさまざまな濃度のEHS-ECMを、Nunc表面35 mm²細胞培養皿に塗布した (図1を参照のこと)。
2. コーティング基板を、加湿した5%CO₂インキュベーター内で38.5°Cで1時間インキュベートした。
3. インキュベーション後、過剰なコーティング溶液を除去し、50 μ L の細胞培養培地をコーティング領域に塗布し、4 mL の鉱油で覆い、50 μ L の追加の培地を各ドロップに加えた。
4. 培地を、加湿した5%O₂、5%CO₂インキュベーター内で38.5°Cにて2時間平衡化させた。
5. ZPの除去及び胚のアダプテーション後、1つの胚を1つのマイクロ培養ドロップに配置し、伸長誘導を開始した。
6. 最初の付着率は、48時間の伸長培養で決定し、最初の培地交換は最初の付着決定の直後に行った。
7. 付着率及び伸長率を毎日評価し、毎日の評価直後に培地を交換した。

30

40

【0120】

結果

図1に示すように、EHS-ECMコーティング (Geltrex) ではゼラチンコーティングと比較してより高い付着率が観察されたが、伸長形成速度に差異は観察されなかった。

【0121】

異なる濃度のEHS-ECMを使用した場合、伸長効率の差異は観察されなかった。全体的な付着率が低かったため、伸長効率が低下した。

50

【0122】

実施例2．メッシュによる溝付き表面コーティング

コーティング溶液の薄層によって作成された滑らかな表面は、胚が付着するための適切な「地形」を提供していないという仮説が立てられた。付着率を改善できるかどうかを試験するために、メッシュ膜をゼラチンまたはEHS-ECMコーティング材料でコーティングすることによって溝付き表面を作成した。

【0123】

皿の加工のプロトコールは以下の通りであった：

1. セルストレーナー膜（孔径30 μm ）を1 cm^2 のサイズに切断した。
2. 切断した膜を35 mm^2 皿上に置いた。
3. 50 μl のコーティング材料（0.5%ゼラチンまたは1 $\times$ EHS-ECM）を、切断した膜に塗布した。1 $\times$ EHS-ECMは、実施例1において最良の付着率を示したので、この実験には1 $\times$ EHS-ECMを選択した。
4. コーティング材料を加湿インキュベーター内で38.5 $^{\circ}\text{C}$ で1時間重合させ、次にベンチ上（ラミナーフードの下）で室温にて30分間乾燥させた。
5. コーティング表面を、UV下で20分間滅菌した。
6. 表面を加工した皿を氷上に置き、膜を注意深く除去した。

【0124】

結果

図2に示すように、このプロトコールを使用すると、溝付き皿表面を容易に作成することができる。しかし、培養培地を加えると、溝は急速に崩壊した。

【0125】

実施例3．交互積層法（LbL）プロトコールを使用して生成されたECMコーティング基板

新鮮な胚を使用した場合、EHS-ECMで中程度の付着率が得られたにもかかわらず、特に凍結解凍した胚からの伸長は困難であった。実施例1に記載したコーティングプロトコールを使用すると、培養ドロップの底にタンパク質の破片が若干観察された。タンパク質マトリックスが培養皿の表面から剥離したという仮説を立て、タンパク質マトリックスが培養皿に十分に強く付着していなかったという仮説をさらに立てた。この問題に対処するために、コーティングプロトコールを修正して、交互積層法アプローチを採用した。

【0126】

実施例1及び2で使用したNunc（商標）デルタ（プラズマ処理）ポリスチレン皿は、負に帯電した表面を有する（例えば、図3及び4を参照のこと）。一般的なECM成分、例えば基底膜抽出物も、コーティングに使用される条件下及び／または生理学的pHで負に帯電する。例えば、Geltrex（A14133、Thermo fisher）は、コーティングに使用される希釈緩衝液のpHであるpH7.2で、負に帯電する（EHS-ECMの等電点：4～5）。タンパク質マトリックスの分子は、表面の-OH残基との水素結合によってプラズマ処理ポリスチレン表面に接着することができる（Lerman et al., 2018）。

【0127】

しかし、両方の成分が同様の静電荷を有するため、両側間の相互作用は比較的弱い。したがって、正に帯電した材料を両方の負に帯電した成分間の「静電接着剤」として配置する「交互積層法」アプローチを調査した（例えば、図4を参照のこと）。ゼラチンA型（通常ブタから抽出される）の等電点は7～9であるが、ゼラチンB型（通常ウシから抽出される）の等電点は4.8～5.1である。したがって、ゼラチンA型はpH7.2で正に帯電しており、交互積層法プロトコールで「静電接着剤」として機能するのに好適な候補となる。さらに、ゼラチンは静電的安定性を提供できるだけでなく、EHS-ECMと同様のタンパク質モチーフを豊富に提供し、ゼラチン層とEHS-ECM層の間の生物学的相互作用を強化することができる。

【0128】

L b L E C Mコーティング基板を生成するためのプロトコールは以下の通りであった：

1. 40 u l の 0.1 %ゼラチン A 型 (D M E M / F 1 2 基本培地で希釈) を N u n c 3 5 m m ² 細胞培養皿の表面に塗布して小さなドロップを作成した。
2. 皿を、加湿した 5 % C O ₂ インキュベーター内で 3 8 . 5 ° C で 1 時間インキュベートした。
3. インキュベーション後、ゼラチン溶液を除去し、C a ²⁺ 及び M g ²⁺ を含む 5 0 u l の D P B S を加えて、ドロップから過剰なゼラチンを洗浄し、続いて吸引を使用して除去した。洗浄ステップを、さらに 2 回繰り返した。
4. 5 0 u l の 1 x E H S - E C M をゼラチンコーティング領域に塗布し、加湿した 5 % C O ₂ インキュベーター内で 3 8 . 5 ° C にて 1 時間インキュベートした。
5. インキュベーション後、E H S - E C M 溶液を除去し、5 0 u l の培地を塗布した；ドロップを 4 m l の鉱油で覆い、5 0 u l の追加の培地を各ドロップに加えた。
6. 培地を、5 % C O ₂ インキュベーター内で 2 時間平衡化させた。

【0129】

結果

図 5 に示すように、対照条件 (E H S - E C M のみ) と比較して、L B L E H S - E C M コーティング基板を使用すると、胚の付着が改善され、より安定した。L b L E H S - E C M コーティング基板の使用により、胚から伸長を生み出す能力も大幅に改善された。伸長物は、通常の E H S - E C M コーティング基板と比較して、最終的に胚性幹細胞を生じさせるより良好な I C M 成長を示した。対照と比較して、T E 成長の改善も観察された。

【0130】

実施例 4 . 伸長培養のための胚の調製

胚は、胚盤胞とも呼ばれ、透明帯 (Z P) を形成する糖タンパク質の厚い膜で囲まれている。発達中、胚盤胞は拡張を開始し、最終的には「孵化」し、胚盤胞がその「殻」から出ることができるようになる。一般に、インビトロ培養の 8 日目頃に、孵化中及び孵化後胚盤胞を得ることが可能である。しかし、ウシのインビトロ胚培養培地は、7 日目までは発育を効率的に支援することができ、その後は胚をレシピエントに移植するか凍結する必要がある。予備実験から、Z P は胚の付着をブロックすることがわかっているため、伸長培養の前に Z P を除去する必要がある。したがって、新鮮な 6 日目 / 7 日目胚及び / または凍結 / 解凍された 7 日目胚からの Z P 除去の改善を図るために調査を実行した。

【0131】

新鮮な胚のための酵素ベースの透明帯 (Z P) 消化プロトコール

酵素ベースのアプローチは、Z P 除去のために頻繁に使用される技術である。このプロトコールでは、通常、0.05 ~ 0.5 % の間の濃度のプロテアーゼ (S t r e p t o m y c e s g r i s e u s 由来、P r o n a s e、S i g m a P 8 8 1 1) を使用する。しかし、プロテアーゼは糖タンパク質に特異的な酵素ではないため、Z P が完全に消化されると胚に損傷を与える可能性もある。

【0132】

Z P 消化プロトコールは以下の通りであった：

1. プロテアーゼ処理皿を準備した (図 6 を参照のこと)。
2. 胚を、胚培養培地からドロップ 1 の胚取扱培地 (H e p e s 緩衝培地) に移した。
3. 胚を、ドロップ 1 から 3 まで連続的に移して洗浄した。
4. 胚を、プロテアーゼドロップ (試験濃度：0.05 %、0.1 %、0.25 % または 0.5 %) に移し、Z P の消化が観察されるまで (約 2 分間) インキュベートした。
5. プロテアーゼ処理胚を、胚取扱培地中 10 % F B S で作成した不活化培地のドロップ 4、5、及び 6 に移した。

【0133】

結果

図 6 に示すように、プロテアーゼへの長時間の曝露は、胚自体の解離を引き起こし、細

10

20

30

40

50

胞に損傷を与える可能性がある（暗色で不透明な細胞によって示されている）。

【0134】

桑実胚期（例えば、ウシ6日目）の胚は、（胚盤胞の拡張によりZPが薄くなり始めている、拡張胚盤胞期（例えば、ウシ7日目）と比較して）非常に厚いZPを有し、最低濃度（ $< 0.1\%$ ）では完全な消化は可能ではなかった。

【0135】

より高い濃度（ $> 0.25\%$ ）では、FBSへの曝露後に酵素が完全には不活性化されなかったため、胚は高濃度のプロテアーゼによって悪影響を受け、その結果、胚は単一割球に完全に解離した。

【0136】

ZPを消化するのに必要なタイミングも、胚ごとにばらつきが大きい。したがって、標準化されたプロトコルを入手することは非常に困難であった。

【0137】

新鮮であるかまたは冷凍／解凍した場合の酵素補助ZP除去プロトコル

7日目の胚に対する既存の胚生検プロトコルでは、マイクロブレードを使用してZPを切断し、胚生検を実行する。生検によってZPに開口部が形成されると、ZPからの胚の放出が容易になる。しかし、ZPがはるかに厚く／硬いため、このアプローチは、桑実胚期（6日目など）の胚には簡単に適用することができない。したがって、2つの異なるプロトコルを組み合わせ、桑実胚期胚用の「酵素補助ZP除去プロトコル」を開発した。簡単に言うと、胚の解離または細胞への損傷を引き起こすことなく、ZPを薄くて柔らかくするのに十分なプロテアーゼで胚を処理する。その後、ZPが薄化した桑実胚は、マイクロブレードを使用した通常の生検技術で容易に使用できるようになる。

【0138】

ZP消化プロトコルは以下の通りであった：

1. プロテアーゼ皿を 0.25% プロテアーゼを用いて準備した（例えば、図6に示すように）。プロテアーゼドロップは、使用の最長2時間前に調製した。
2. 1つ以上の胚を、胚培養培地から、胚取扱培地で作成したドロップ1に移した。
3. 胚を、ドロップ1からドロップ3に移して洗浄した。
4. 胚を、 0.25% プロテアーゼドロップに移し、45秒間インキュベートした。
5. 処理胚を、胚取扱培地中 10% FBSで作成した不活化培地ドロップ4、5、及び6に移す。
6. ZP薄化胚を、生検皿に移す。

【0139】

結果

酵素補助ZP除去プロトコルを使用して、図7に示すようにZP除去桑実胚を作製することができる。

実施例5．生検凍結胚の解凍後品質を改善するための組成物

【0140】

育種用途では、生検凍結胚を、典型的には遺伝的に同定し（例えば、バイオマーカーについてスクリーニングして）、これにより医師が所望の遺伝的特徴を有する胚を選択できるようになる。7日目の胚を生検して凍結することは可能であるが、これらの胚は新鮮な胚と比較してより多くのストレスにさらされる。生検凍結胚は、ZPが開いているため（生検手順により）、ZPを、穏やかにピペティングすることで容易に除去することができる。しかし、生検－凍結－解凍された胚の品質は、一般に新鮮な胚よりも劣る。本明細書では、3つの阻害剤：CHIR99021、PD0325901及びY27632を含む、解凍後回復培地（本明細書では「2iY」培地または「回復培地」と呼ぶ）について説明する。CHIR99021及びPD0325901は、幹細胞分野では「2i」としても知られる、良好に特徴付けられた阻害剤である。これら2つの阻害剤は、ナイーブ型胚性幹細胞の転写因子活性に関与する2つの重要な経路を調節する（CHIR99021：GSK3の阻害によるWnt経路活性化剤、PD0325901：MEK経路阻害）。

Y 2 7 6 3 2 は、R O C K 阻害剤であり、アクチンフィラメント安定剤である。これら 3 つの阻害剤が、主要な幹細胞性経路を調節することによって解凍後ストレスから細胞を保護し、より迅速な細胞回復を促進する能力を試験した。ここで示した実験は、このプロトコールによって、解凍後の胚の品質が大幅に向上し、伸長のより効率的な誘導が可能になることを実証している。

【0141】

プロトコール

1. 3 μ M C H I R 9 9 0 2 1 (2 5 2 0 6 9 1、P e p r o T e c h)、1 μ M P D 0 3 2 5 9 0 1 (3 9 1 1 0 9 1、P e p r o T e c h)、及び 1 0 μ M Y 2 7 6 3 2 (1 2 9 3 8 2 3、P e p r o T e c h) を、胚取扱培地 (2 i Y 培地) に加えた。
2. 2 i Y 培地 (図 8 を参照) または対照胚培養培地を使用して、解凍皿を準備した。
3. 1 つ以上の胚を、プロトコールに従って解凍した。
4. 胚を、2 i Y 培地または対照胚取扱培地に入れた。
5. 解凍直後に Z P を穏やかにピペッティングして除去した。
6. 胚を、6 . 8 % C O ₂、5 % O ₂ の加湿インキュベーター内で 3 8 . 5 °C にて 4 時間インキュベートした。
7. 胚が完全に回復 (再拡張) したら、胚を伸長培地に移した。胚盤胞腔の外観の存在によって回復を確認した。

【0142】

結果

図 8 に示すように、2 i Y 処理群は、L b L - E C M コーティング皿上にそれぞれ 2 日間及び 4 ~ 5 日間プレーティングした場合、対照群よりも高い付着及び伸長形成速度を示した。2 i Y 処理胚は、対照胚培養培地よりも速い回復と、胚のより速い再拡張によって観察されるように、より高い誘導効率を示す。4 時間の回復後に対照群と比較して、2 i Y 処理胚はより大きく、明確な I C M を示す (図 8 の破線の円)。

【0143】

2 i Y 処理群は、凍結保存から解凍して 4 時間後に、ステージがより進行し、品質が改善した胚を示す (図 9 を参照のこと)。

【0144】

実施例 6 . 新しい培養環境への胚のアダプテーション

培養中の細胞、特に胚性幹細胞は、培地成分及び栄養素レベルに対して非常に敏感である。しかし、細胞培養において、特に完全培地 / 市販培地を使用する場合に見落とされがちな 2 つの因子、すなわち培地の浸透圧及び pH がある。胚取扱培地から D M E M (胚性幹細胞基本培地) に胚を直接移すと、細胞にストレスを与えることが観察され (データは提示されていない)、浸透圧及び pH の測定により、両方の培地の大きな差異が確認された (表 1 を参照)。したがって、アダプテーション培地は、細胞の新しい微小環境への段階的なアダプテーションを促進する場合があるという仮説が立てられた。

【0145】

プロトコール

1. 解凍培地と伸長培地を、1 : 1 の比率で混合した。
2. アダプテーション皿は、図 1 0 に示すように準備した。
3. 解凍後の回復後、胚をアダプテーション培地 (解凍培地の比 1 : 1 (例えば、胚取扱培地と伸長培地 (例えば、D M E M))) で 2 回洗浄した後、皿 # 1 中のアダプテーションドロップに入れた (図 1 0)。
4. 1 時間のアダプテーション後、胚を、皿 # 2 の洗浄ドロップ (伸長培地) に移すことによって 4 回洗浄した。
5. 次に、胚を伸長培地 (D M E M) に移して、プレーティングした。
6. 次に、アダプテーション胚を、L b L コーティングマイクロドロップにプレーティングした。

【0146】

結果

表 1：種々の培地の pH 及び浸透圧（O s m）の測定値。
測定値は、2 回取得した。

培地	pH	Osm
胚取扱培地	7.17, 7.15	269, 268
アダプテーション	7.21, 7.22	309, 310
伸長培地	7.27, 7.28	353, 353

10

【 0 1 4 7 】

アダプテーション処理の関数としての誘導効率（胚プレーティングの 4～6 日後に測定された付着、TE 成長、及び ICM 成長）を図 10 に示す。1 時間のアダプテーション後、0.5 時間のアダプテーションまたはアダプテーションを行わない対照と比較して、誘導効率が改善する。1 時間を超えるアダプテーション（2 時間及び 4 時間のインキュベーション）では、1 時間のアダプテーションと比較して差異は全く示されなかった。

【 0 1 4 8 】

実施例 7. 伸長形成を支援する能力についての培地の試験

細胞培養培地は、代謝、生存及び増殖などの細胞の一般的な維持を支援するための種々の成分を含有する。分化、自己再生を促進させるか、または単に細胞成長を促進させるために、追加の成長因子または阻害剤を加えてもよい。ナイーブ型胚性幹細胞を誘導し、それらを未分化状態に維持するには、培養培地中に成長因子と阻害剤の組み合わせが必要になる。添加剤の不適切な組み合わせまたはそれらの分子の濃度の差異により、幹細胞の不可逆的な分化が誘導される可能性がある。

【 0 1 4 9 】

血清／血清代替品のタイプ

図 11 に示すように、5 つの異なる血清源／濃度条件を試験した。この試験には、FBS（10091、Gibco（商標））、knock-out serum replacement（ノックアウト血清リプレースメント）（10828-10、Gibco（商標））、血清代替品（S0638、Sigma）、B27 サプリメント（17504-044、Gibco（商標））、及び N2 サプリメント（17502-048、Gibco（商標））を使用した。従来のマウス 2 i L 培地（DMEM／F12+1% MEM 非必須アミノ酸+2 mM Glutamax+100 μM ベータメルカプトエタノール+100 IU ペニシリン／ストレプトマイシン+3 μM CHIR99021、1 μM PD0325901 及び 100 ng／ml LIF を含む成長因子／阻害剤）を、10% FBS 及び 20% KOSR、及び 1x-、2x-SR 群の血清検査用の基本培地として使用した。t2 i L GoY 培地（DMEM／F12 と神経基本培地の 1：1 混合物+1% MEM 非必須アミノ酸+2 mM Glutamax+50 μg／ml BSA、フラクション V+100 μM ベータメルカプトエタノール+100 IU ペニシリン／ストレプトマイシン+成長因子／阻害剤、例えば 1 μM CHIR99021、1 μM PD0325901、10 μM Y27632、2.5 μM G06983 及び 10 ng／ml LIF）を、N2B27 群の試験に使用した。この異なる組み合わせの理由は、2 i L 培地の配合が（t2 i L GoY 培地と比較して）はるかに単純であり、FBS、KOSR、または SR などの基本的な血清源に、より好適であるためである。

【 0 1 5 0 】

他の種において広く使用されている血清源である Knock-Out Serum Replacement（KOSR）は、ウシ胚の伸長に関して非常に低い効率を示した。

【 0 1 5 1 】

50

ウシ由来成分を含有する血清代替品（SR）は、KOSRと比較してはるかに良好な効率を示した。

【0152】

1%のB27サプリメント及び0.5%のN2サプリメントを含むN2B27培地は、試験した他の成分と比較して、ウシ胚の伸長誘導（TE及びICM成長）に関して最良の結果を示した。

【0153】

試験された追加の基本培地及びその他の成分／添加剤

従来のマウス2iL培地：培地組成：DMEM／F12＋1×血清代替品＋100ng／ml白血病阻害因子（LIF）＋3uM CHIR99021＋1uM PD0325901。

表2：マウス2iL培地を使用した誘導率

培地	基本培地	起源	成長因子/阻害剤	n=	付着%	TE%	ICM%
2iL	DMEM/F12	6日目の胚	hLIF: 100ng/ml CHIR99021: 3μM PD0325901: 1μM	32	88%	50%	19%

【0154】

正の付着率が得られたが、伸長形成速度は低く、ICM拡張は19%、TE拡張は50%のみであった。

【0155】

ナীব型ヒト幹細胞培地－NHSM（Gafni et al., 2013）：培地組成：DMEM／F12：Neurobasal培地（1：1混合物）＋N2B27血清＋8ng／ml FGF＋1ng／ml TGF-β＋20ng／ml LIF＋3uM CHIR99021＋1uM PD0325901＋10uM SP600125＋10uM＋SB203580

表3：NHSM培地を使用した誘導率

培地	基本培地	起源	血清型	成長因子/阻害剤	n=	付着%	TE%	ICM%
NHSM	DMEM/F12 と Neurobasal 培地の 1:1 混合	5日目の胚	N2B27	hFGF: 8 ng/ml hTGF-β: 1 ng/ml hLIF: 20 ng/ml CHIR99021: 3 μM PD0325901: 1 μM SP600125: 10 μM SB203580: 10 μM	30	63%	27%	0%

【0156】

この組み合わせは、ICM拡張が0%で非常に低い効率を示した。

【0157】

フォスコリン培地

フォスコリンはアデニリルシクラーゼ刺激因子であり、多くのシグナル伝達経路に関与する二次メッセンジャーである細胞内のcAMPレベルを増加させる。フォスコリンと2iL培地の組み合わせは、ヒトナীব型幹細胞の誘導（Hanna et al.,

， 2010）及びウシナイーブ様多能性幹細胞の再プログラミング（Kawaguchi et al.， 2015）において良好な効率を示した。

【0158】

2iL Fkの配合：従来のマウス2iL培地+10uMフォルスコリン

【0159】

この組み合わせは、従来の2iL培地及びNHSM培地と比較して、誘導効率が向上した（図13）。しかし、ICM誘導ナイーブ型幹細胞コロニーは、継代後2iL Fk培地中でそれ以上の拡張を示さなかった。

【0160】

Wntの二重キナーゼ調節

Wntは、ナイーブ型幹細胞シグナル伝達経路の重要な役割を果たすことが知られている。Wnt活性化剤CHIR99021とIWR-1またはXAV939などのWnt阻害剤（どちらも同じタンパク質複合体の阻害剤であるが、それぞれが異なるユニットを標的としている）の組み合わせによって、ベータ-カテニンの細胞質蓄積がもたらされ、接着ジャンクションの重要な成分であるE-カドヘリンの安定化を通じて、マウス多能性幹の自己再生が促進される可能性がある（Kim et al.， 2013）。2iL Fk培地で観察される不十分な拡張を克服するWntの二重調節の能力を試験した。

【0161】

二重Wnt培地の配合：1.5uM CHIR99021+2.5uM IWR-1+1uM PD0325901+100ng/ml LIF+10uM フォルスコリン。

【0162】

図13に示すように、この組み合わせはウシ胚性幹細胞に対して負の効果を示した。

【0163】

ウシIL-6（LIFのスーパーファミリー）及びSRCi：

ウシIL-6（LIFのスーパーファミリー）及びSRC阻害剤を、それぞれ、ヒトナイーブ型幹細胞の誘導に使用されている、t2iL GoY培地で使用されるhLIF及びPD0325901の代替品として試験した（滴定済2i/LIF/Go6983/Y27632、Guo et al.， 2016）。

【0164】

ヒトLIFは、最初はt2iL GoYの配合に使用された。しかし、ヒトとウシのLIFの配列は異なっている。したがって、LIFスーパーファミリーのメンバーであるウシIL-6を、ヒトLIFの代替品として試験した。

【0165】

RTK阻害剤であるSRC阻害剤は、成長因子によって誘導されるシグナル伝達経路のほとんどに関与している（Theunissen et al.， 2014）。SRC阻害のエンドポイントは、最終的にERK/MEK経路を標的とすることがわかったため、（MEKi PD0325901による）MEK経路阻害の代替となる新規な戦略として、SRC阻害剤を試験した。

【0166】

t2iL GoY培地の配合：DMEM/F12：Neurobasal培地（1：1混合物）+N2B27血清+1uM CHIR99021+1uM PD0325901+10ng/mlヒトLIF+2.5uM Go6983+10uM Y27632。

【0167】

SRCi培地の配合：PD0325901を2uMのCGP77675（SRC阻害剤）で置き換え、ヒトLIFを10ng/mlのウシIL-6で置き換えた、t2iL GoY培地。

【0168】

図14に示すように、ヒトLIFのウシIL-6、またはMEK阻害剤PD0325901のSRC阻害剤CGP77675のいずれかの置換は、t2iL GoY培地と比較して、低い付着速度または低い伸長形成速度のいずれかを介して、誘導効率に負の効果を

10

20

30

40

50

した。

【0169】

MEK阻害剤 (MEKi)

Zhao et al., (2021) は、MEK阻害剤がウシES細胞培地から除去されなければならないことを示唆する結果を発表したが、これはヒト細胞に関して以前に発表された結果とは対照的である。培地からMEK阻害剤を除去することでそのアプローチを試験する調査を実行した。

表4：MEK調節による誘導率。

培地	基本培地	起源	血清型	成長因子/阻害剤	付着%	TE%	ICM%
+MEK阻害剤	DMEM/F12とNeurobasal培地の1:1混合	6日目の胚	N2B27	CHIR99021: 1 μM PD0325901: 1 μM Go6983: 2.5 μM Y27632: 10 μM hLIF: 20 ng/ml	98%	83%	34%
-MEK阻害剤	DMEM/F12とNeurobasal培地の1:1混合	6日目の胚	N2B27	CHIR99021: 1 μM Go6983: 2.5 μM XAV939: 2 μM hLIF: 20 ng/ml	67%	50%	0%,

10

20

【0170】

MEK阻害剤であるPD0325901を培地から除去すると、ICM細胞分化の明確な兆候である胚腔形成によって示されるように、誘導効率が低下する (図15を参照のこと)。

【0171】

PKC阻害剤、Go6983

最近の培養培地組成の改良により、これまでに試験された最良の培養条件、すなわち2iLIFk及びt2iLGoY培地を、2i及びNHSM培地と並行して試験した。注目すべきことに、図16に示すように、t2iLGoYにPKC阻害剤Go6983 (Guo et al., 2016)を加えると、誘導効率が向上した。

30

【0172】

t2iLGoY培地は、同様のICM成長速度を示したが、付着及び伸長形成、特にTE成長において、はるかに高い速度を示した。

【0173】

t2iLGoY培地の配合：DMEM／F12：Neurobasal培地（1：1混合物）＋N2B27血清＋1uM CHIR99021＋1uM PD0325901＋10ng／ml LIF＋2.5uM Go6983＋10uM Y27632。

【0174】

インスリン

ICM細胞の形態は、上記の種々の培地組成物を使用した最初の継代後には維持されなかった。ICM細胞は、伸長培養中及び継代後にすぐに胚体外内胚葉細胞（胚盤葉下層）に分化した。

【0175】

培地中のインスリン濃度を調整することで、そのタイプの分化を克服できる可能性があるという仮説が立てられた (Anderson et al., 2017)。

【0176】

図17に示すように、培地に20ug／mlのインスリンを加えると、伸長培養中に胚盤葉下層形成は観察されず、継代後にICM細胞を得ることができる。

40

50

【0177】

ERK経路阻害

Khan et al. (2021) は、ハイスループット化学スクリーニングを使用してヒトナイブ型幹細胞の最良の培養条件を同定し、ERK経路の阻害が安定なヒトナイブ型幹細胞培養を維持するための重要な要因であると同定した (Khan et al., 2021)。

【0178】

Wnt経路の阻害はまた、ヒトナイブ型幹細胞分野における重要な要因として強調されている (Bredenkamp et al., 2019)。Khan et al. (2021) と Bredenkamp et al. (2019) のアプローチを組み合わせ、PXGRY/LA培地を調査及び開発した。

【0179】

PXGRY/LAの配合：DMEM/F12：Neurobasal培地（1：1混合物）+N2B27血清+1uM PD0325901+2uM XAV939+2uM Go6983+2.5uMラボキセルチニブ+10uM Y27632+10ng/ml LIF+20ng/ml アクチビンA。

【0180】

表5に示すように、Wnt経路の活性化（t2iLGoY培地を用いる）またはその阻害（PXGRY/LA培地の使用による）によっては、フィーダーフリーシステムを使用してナイブ伸長を誘導する効率に有意な差異が示されなかった。しかし、ナイブ型幹細胞は、一般にフィーダー細胞上で誘導及び維持され、ナイブ型幹細胞培地はそのような培養系用に技術的に設計されている。Cosin-Roger et al., 2019及びTalbot et al., 2012によると、フィーダー細胞はいくつかの重要な成長因子、及びより重要なことに、Wntリガンドを分泌する。フィーダーフリー系を伴うPXGRY/LA培地では、Wnt経路が阻害されるだけでなく、通常はフィーダー細胞から分泌されるWntリガンドも完全に枯渇する。したがって、Wnt阻害の効果は、フィーダーフリー条件を使用した場合、フィーダー細胞上で維持された細胞と比較して、特に数回の継代培養後には同じではない場合がある。したがって、t2iLGoYは、フィーダーフリー条件を使用したウシナイブ細胞の誘導により好適である場合がある。

表5：Wnt調節による誘導率。

培地	基本培地	起源	血清型	成長因子/阻害剤	付着%	TE%	ICM%
t2iLGoY	DMEM/F12とNeurobasal培地の1:1混合	6日目の胚	N2B27	CHIR99021: μM PD0325901: $1\ \mu\text{M}$ Go6983: $2.5\ \mu\text{M}$ Y27632: $10\ \mu\text{M}$ hLIF: $20\ \text{ng/ml}$	98%	83%	34%
PXGRY/LA	DMEM/F12とNeurobasal培地の1:1混合	6日目の胚	N2B27	PD0325901: $1\ \mu\text{M}$ XAV939: $2\ \mu\text{M}$ Go6983: $2\ \mu\text{M}$ ラボキセルチニブ: $2.5\ \mu\text{M}$ Y27632: $10\ \mu\text{M}$ hLIF: $20\ \text{ng/ml}$ アクチビンA: $20\ \text{ng/ml}$	100%	90%	33%

10

20

30

40

50

【0181】

実施例8：誘導ブラストイド構造の作製

前述の実施例に記載の高効率プロトコルを使用して生成された安定なウシナীব型幹細胞を使用して、Liu et al. (2021)、Yu et al. (2021)、及びYanagida et al. (2021)によって最近発表されたものと同様のアプローチを使用して誘導ブラストイド構造を再構築する。

【0182】

プロトコル

1. 酵素解離法を使用して、ナীব型幹細胞コロニーを単一細胞に解離する。
2. 細胞数を数え、誘導ブラストイド培地1で細胞密度を500細胞/mlに調整する。誘導ブラストイド培地1は、ナীব型幹細胞を栄養膜幹細胞に分化させ、胚盤胞の外層(TE)を形成する。
3. マルチチャネルピペットを用いて、非接着性丸底96ウェルプレートの各ウェルに100個の細胞(200ul)をプレーティングする。
4. 48時間後、培養プレートから誘導ブラストイド培地1を除去し、200ulの誘導ブラストイド培地2を加える。
5. 48時間後に、十分に樹立された誘導ブラストイドを、誘導ブラストイド操作培地(Hepes緩衝DMEM/F12+Neurobasal培地)に移し、通常の胚等級付けシステムに基づいて誘導ブラストイドの品質を評価する。
6. Boviteq胚凍結プロトコルに従って、誘導ブラストイドを凍結する。

10

20

【0183】

誘導ブラストイド培地1の配合は、改良型-DMEM/F12+0.5%血清代替品+1%MEM NEAA+1%Glutamax(商標)+0.1mMベターメルカプトエタノール+ゲンタマイシン+2μM CHIR99021+5μM Y27632+0.5mMバルプロ酸+1μM A83-01+50ng/ml EGFである。

【0184】

誘導ブラストイド培地2の配合は、DMEM/F12及びneurobasal培地の1:1混合物+1%MEM NEAA+1%Glutamax(商標)+0.1mMベターメルカプトエタノール+100IU/ml Pen/Strep+100ng/ml アクチビンA+3μM CHIR99021+10ng/ml LIFである。

30

【0185】

参考文献

- Anderson KGV, Hamilton WB, Roske F V., Azad A, Knudsen TE, Canham MA, Forrester LM and Brickman JM (2017) Insulin fine-tunes self-renewal pathways governing naive pluripotency and extra-embryonic endoderm. *Nature Cell Biology* 19 1164-1177.
- Bishop TF and Van Eenennam AL. (2020) Genome editing approaches to augment livestock breeding programs. *J Exp Biol.* 223 (Suppl_1): jeb207159. doi: 10.1242/jeb.207159.
- Bogliotti YS, Wu J, Vilarino M, Okamura D, Soto DA, Zhong C, Sakurai M, Sampaio RV, Suzuki K, Izpisua Belmonte JC et al. (2018) Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

40

50

States of America 115 2090–2095.

Bredenkamp N, Stirparo GG, Nichols J, Smith A and Guo G (2019) The Cell–Surface Marker Sushi Containing Domain 2 Facilitates Establishment of Human Naive Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 12.

Cosin–Roger J, Ortiz–Masia MD and Barrachina MD (2019) Macrophages as an emerging source of wnt ligands: Relevance in mucosal integrity. *Frontiers in Immunology* 10 2297.

De Los Angeles A (2019) Frontiers of Pluripotency. *Methods in Molecular Biology* 2005 3–27.

Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben–Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A et al. (2013) Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504.

Guo G, Von Meyenn F, Santos F, Chen Y, Reik W, Bertone P, Smith A and Nichols J (2016) Naive Pluripotent Stem Cells Derived Directly from Isolated Cells of the Human Inner Cell Mass. *Stem Cell Reports* 6.

Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, Cassady JP, Muffat J, Carey BW and Jaenisch R (2010) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 9222–9227.

Hou Z, An L, Han J, Yuan Y, Chen D and Tian J (2018) Revolutionize livestock breeding in the future: an animal embryo–stem cell breeding system in a dish. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2018 9:1 9 1–11.

Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M and Imai H (2015) Generation of Naive Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline–Inducible Transcription Factors. *PLOS ONE* 10 e0135403.

Khan SA, Park K mi, Fischer LA, Dong C, Lungjangwa T, Jimenez M, Casalena D, Chew B, Dietmann S, Auld DS et al. (2021) Probing the signaling requirements for naive human pluripotency by high–throughput chemical screening. *Cell Reports* 35.

- Kim H, Wu J, Ye S, Tai CI, Zhou X, Yan H, Li P, Pera M and Ying QL (2013) Modulation of β -catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nature Communications* 4.
- Lerman MJ, Lembong J, Muramoto S, Gillen G and Fisher JP (2018) The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material. *Tissue Engineering – Part B: Reviews* 24. 10
- Li R, Zhong C, Yu Y, Liu H, Sakurai M, Yu L, Min Z, Shi L, Wei Y, Takahashi Y et al. (2019) Generation of Blastocyst-like Structures from Mouse Embryonic and Adult Cell Cultures. *Cell* 179 687–702. e18.
- Liu X, Tan JP, Schroder J, Aberkane A, Ouyang JF, Mohenska M, Lim SM, Sun YBY, Chen J, Sun G et al. (2021) Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids. *Nature* 591 627–632. 20
- Park F. (2007) Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics*. 31: 159–173.
- Smith, LC, Labrecque, R, Paredes LMA, Therrien J, and Vigneault, C. 2020. Use of haploid embryonic cells to generate offspring with predetermined genomes. WO 2020/168422.
- Solter D and Knowles BB (1975) Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA* 72 (12): 099–102 30
- Soto DA, Navarro M, Zheng C, Halstead MM, Zhou C, Guiltinan C, Wu J and Ross PJ (2021). Simplification of culture conditions and feeder-free expansion of bovine embryonic stem cells. *Scientific Reports* 2021 11:11 1–15.
- Talbot NC, Sparks WO, Powell AM, Kahl S and Caperna TJ (2012) Quantitative and semiquantitative immunoassay of growth factors and cytokines in the conditioned medium of STO and CF-1 mouse feeder cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 48 1–11. 40
- Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M, Faddah DA, Reddy J, Fan ZP, Maetz el D, Ganz K, Shi L et al. (2014) Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell* 15. 50

Wang S, Qu Z, Huang Q, Zhang J, Lin S, Yang Y, Meng F, Li J, and Zhang K. (2022) Application of Gene Editing Technology in Resistance Breeding of Livestock. Life (Basel). 12:1070. doi: 10.3390/life12071070.

Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, Dattani A, Smith A and Guo G (2021) Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. Cell Stem Cell 28.

Yu L, Wei Y, Duan J, Schmitz DA, Sakurai M, Wang L, Wang K, Zhao S, Hon GC and Wu J (2021) Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. Nature 591 620–626.

Zhao L, Gao X, Zheng Y, Wang Z, Zhao G, Ren J, Zhang J, Wu J, Wu B, Chen Y et al. (2021) Establishment of bovine expanded potential stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 118.

【図面】

【図 1】

【図 2】

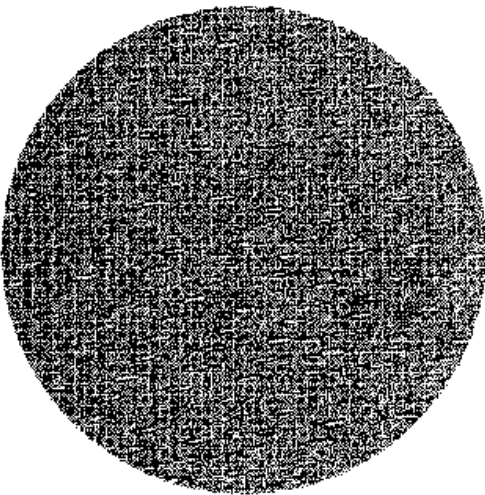
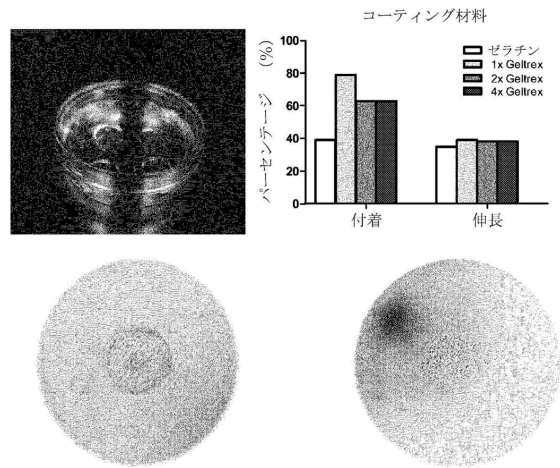


FIG. 2

【図 3】

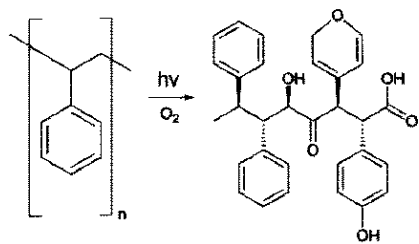
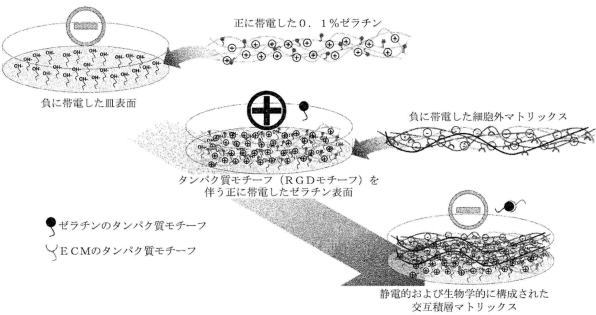


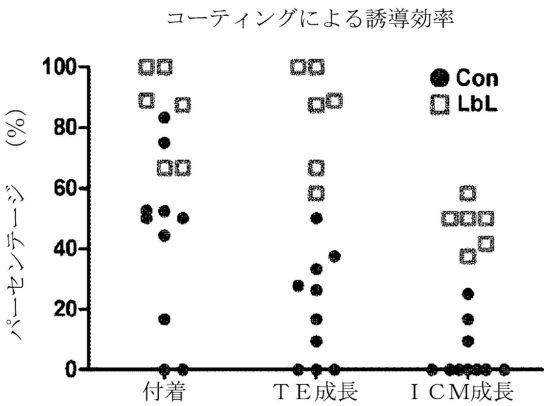
FIG. 3

【図 4】

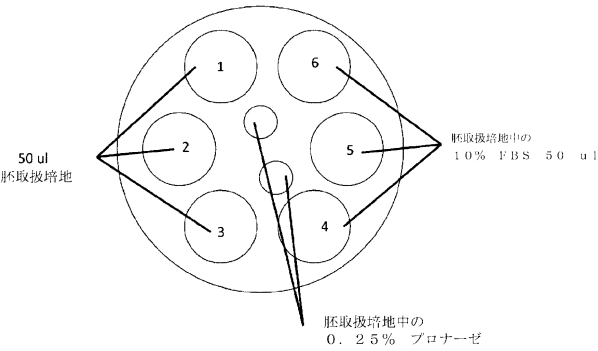


10

【図 5】



【図 6 - 1】



20

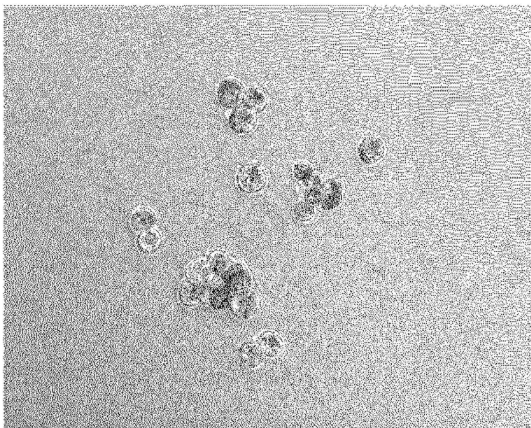
30

40

50

【図 6 - 2】

(続き)



【図 7】

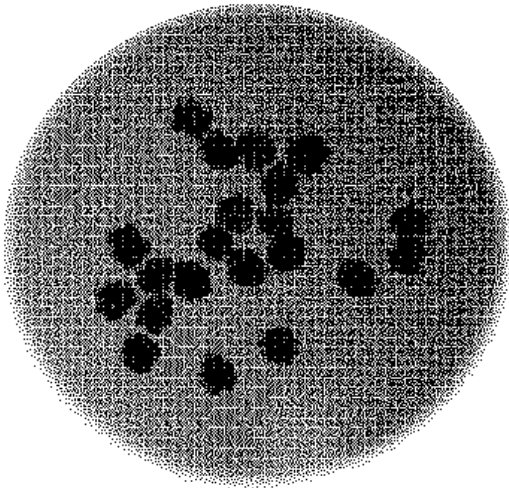
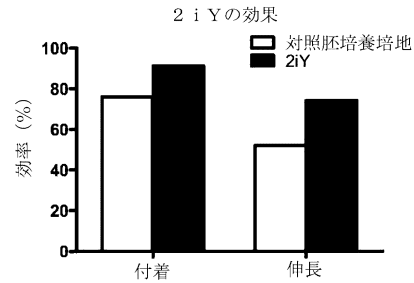
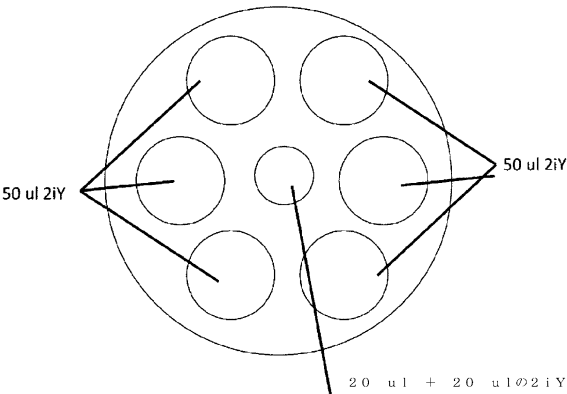


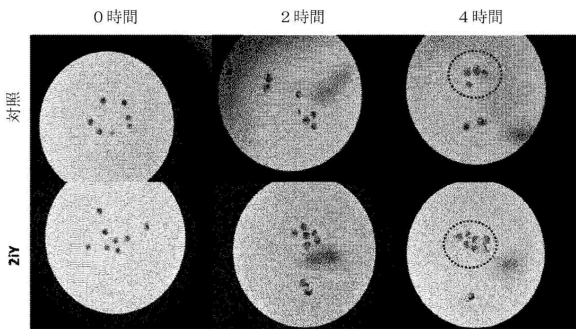
FIG. 7

【図 8 - 1】



【図 8 - 2】

(続き)



10

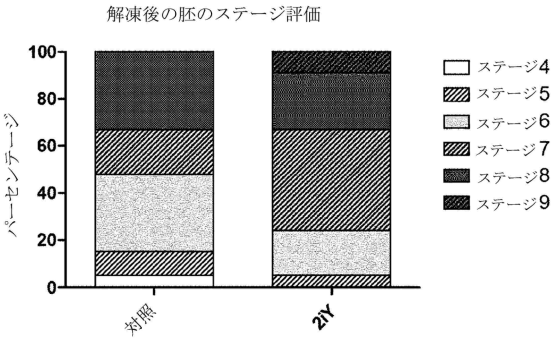
20

30

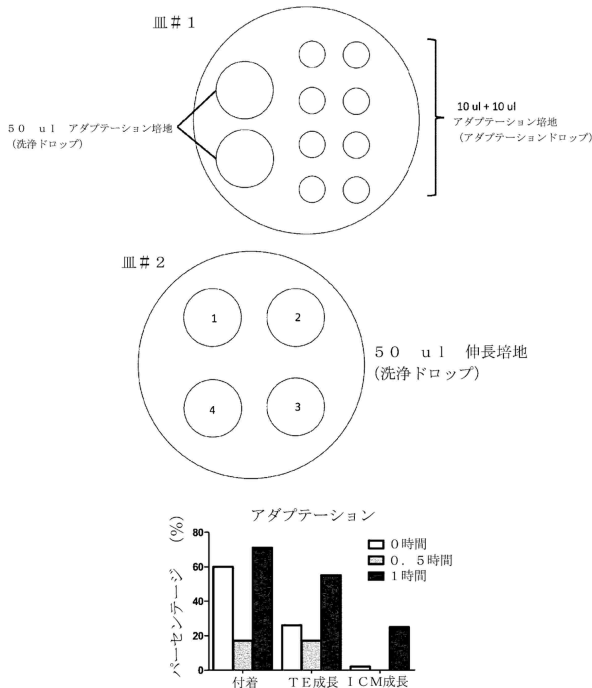
40

50

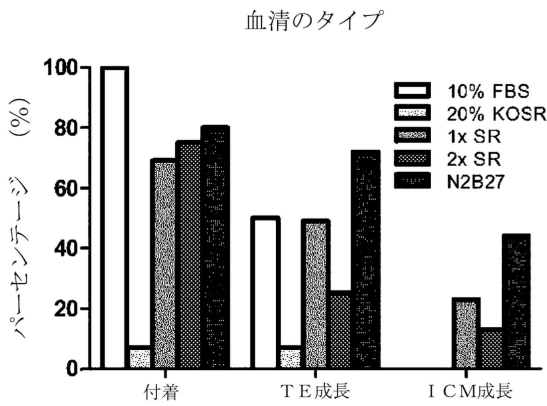
【図 9】



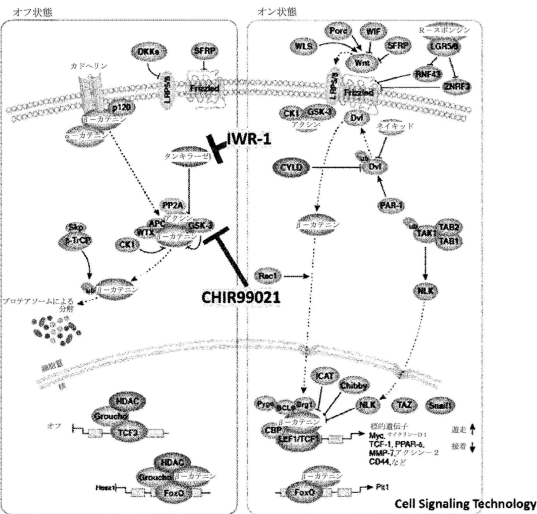
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

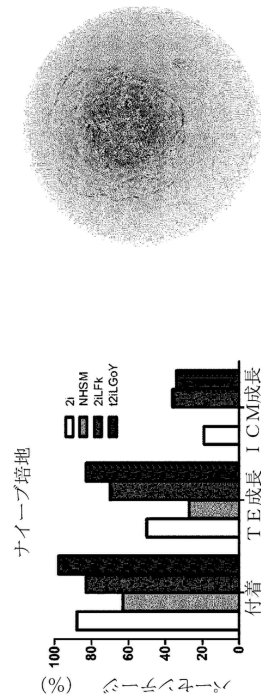
20

30

40

50

【図 1 6】



【図 1 7】

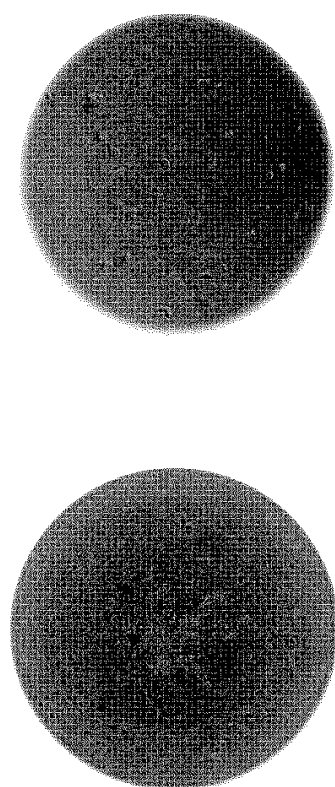
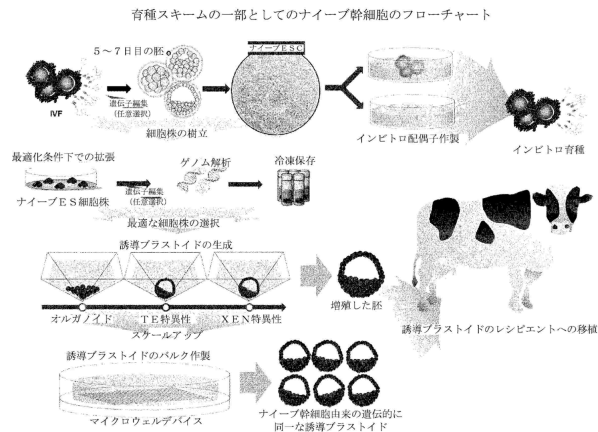


FIG. 17

【図 1 8】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2022/051664
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12N 5/00</i> (2006.01), <i>A01K 67/02</i> (2006.01), <i>A61K 35/545</i> (2015.01), <i>A61P 15/08</i> (2006.01), <i>C12N 5/073</i> (2010.01), <i>C12N 5/0735</i> (2010.01) CPC: <i>C12N 5/0068</i> (2020.01), <i>A01K 67/02</i> (2020.01), <i>A61K 35/545</i> (2020.01), <i>A61P 15/08</i> (2020.01), <i>C12N 5/0603</i> (2020.01), <i>C12N 5/0606</i> (2020.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Keywords used across the whole IPC and CPC		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases : Questel Orbit, CAPLUS, EMBASE, MEDLINE, BIOTECHABS, BIOSIS Keywords: Extracellular matrix, bovine, embryo, embryonic stem cells, ESC, morula, blastocyst, iblastoid, inner cell mass, ICM, ZP, Zona pellucida, MEK, ERK, PD0325901, Raxoxertinib, GSK1120212, MEK162, PD184352, Trametinib, LY3214996, Ulixertinib, inhibitor, LIF, Leukemia Inhibitory Factor		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SOTO, D.A. et al., " <i>Simplification of culture conditions and feeder-free expansion of bovine embryonic stem cells</i> ". Scientific Reports, 26 May 2021 (26-05-2021), Vol. 11, Article number: 11045 *Abstract, Figs 3 and 4, Materials and methods, Derivation and culture of NBFR-bESCs*	1-5, 8-15, 17, 18, 20-25, 55 6, 7, 16, 19, 26-29
X Y	WO 2019/140260 A1 (ROSS, P.J. et al.) 18 July 2019 (18-07-2019) *Para. [0006], [0085], [0142] and claims*	55-57 16, 19
Y	WO 2014/174470 A1 (HANNA, Y. et al.) 30 October 2014 (30-10-2014) *Abstract, page 85 lines 15-21, page 100 lines 21 and 22, page 155 lines 10-24, page 159 lines 25-page 160, line 9, page 242*	6, 7, 26-29
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 15 December 2022 (15-12-2022)		Date of mailing of the international search report 16 January 2023 (16-01-2023)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Karine Chartrand (819) 661-7629

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/051664**Box No. II** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:

1-29 and 55-57

- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/CA2022/051664

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2014174470A1	30 October 2014 (30-10-2014)	CN105531365A EP2989199A1 EP2989199B1 ES2831424T3 IL241930B JP2016521971A US2014315301A1 US10920192B2 US2021253998A1	27 April 2016 (27-04-2016) 02 March 2016 (02-03-2016) 12 August 2020 (12-08-2020) 08 June 2021 (08-06-2021) 30 June 2020 (30-06-2020) 28 July 2016 (28-07-2016) 23 October 2014 (23-10-2014) 16 February 2021 (16-02-2021) 19 August 2021 (19-08-2021)
WO2019140260A1	18 July 2019 (18-07-2019)	BR112020013546A2 CN111566202A EP3737742A1 EP3737742A4 IL275568A US2020385674A1	01 December 2020 (01-12-2020) 21 August 2020 (21-08-2020) 18 November 2020 (18-11-2020) 13 October 2021 (13-10-2021) 31 August 2020 (31-08-2020) 10 December 2020 (10-12-2020)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2022/051664

Continuation of : Box No. III

Group A - Claims 1-29 and 55-57 are directed to (i) a method of deriving naive bovine embryonic stem cells, the method comprising: a) providing a Zona Pellucida (ZP)-free bovine embryo comprising naive bovine embryonic stem cells; b) contacting the ZP-free bovine embryo with an extracellular matrix (ECM)-coated substrate, wherein the ECM-coated substrate comprises a substrate comprising a negatively charged substrate surface adjacent to a positively charged biocompatible polymer layer, and a negatively charged ECM layer adjacent to the positively charged biocompatible polymer layer; and c) culturing the ZP-free bovine embryo in the presence of outgrowth medium to induce attachment of the ZP-free bovine embryo to the ECM-coated substrate and outgrowth of an inner cell mass (ICM) comprising derived naive bovine embryonic stem cells, (ii) the naive bovine embryonic stem cells produced by this method and (iii) their use;

Group B - Claims 30-41 are directed to (i) a method of preparing an ECM-coated substrate, the method comprising a) providing a negatively charged substrate, b) contacting the negatively charged substrate with a positively charged biocompatible polymer, c) incubating the substrate with the biopolymer, d) removing the biocompatible polymer, e) contacting the substrate with a negatively charged ECM, and f) incubating the negatively charged ECM with the substrate, (ii) an ECM-coated substrate comprising a negatively charged substrate, a layer of positively charged biocompatible polymer in contact with the negatively charged substrate and a layer of negatively charged ECM in contact with the layer of positively charged biocompatible polymer, and (iii) its use;

Group C - Claims 42-46 are directed to (i) a media composition comprising a N2B27 component, a Wnt activator component, a Wnt inhibitor component, a MEK/ERK inhibitor component, a ROCK inhibitor component, a LIF component, a PCK inhibitor and an insulin component, and (ii) its use;

Group D - Claims 47-51 are directed to a method of obtaining ZP-free bovine embryo by enzyme-assisted ZP removal, the method comprising a) providing an embryo, b) contacting the embryo with a protease solution, c) incubation the embryo in the protease solution to obtain a ZP-thinned embryo, d) contacting the ZP-thinned embryo with a protease inactivation medium, e) rupturing the ZP and f) manipulating the embryo to separate the ZP from the embryo; and

Group E - Claims 52-54 are directed to (i) a recovery medium comprising a glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitor, a MEK/ERK kinase inhibitor and a Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase (ROCK) inhibitor and (ii) its use.

An *a posteriori* analysis revealed that the common concept linking the claims of Groups A and B is an ECM-coated substrate comprising a negatively charged surface, a positively charged biocompatible polymer and a negatively charged ECM layer. However, such substrate is known in the art [see p. 10, D1 (SOTO et al.)]. This document describes a method of deriving and culturing bovine embryos where whole zona-free blastocysts or isolated inner cell mass (ICM) are placed on a monolayer of MEF feeders in separate wells of a 48-well dish previously coated with 0.1% gelatin. The 48-well dish used for tissue culture is expected to be plasma-treated for it to be appropriate for tissue culture, which imparts a negative charge to the substrate. The treatment with gelatin provides the biocompatible polymer layer with a positive charge above the negatively charged substrate. The use of MEF feeders is well known in the art to provide an ECM that will impact the derivation of embryos. Also, the examiner considers that the MEF feeder layer disclosed in D1 is encompassed by the broad definition of the ECM as claimed in independent claims 1, 30 and 35. The examiner is of the opinion that the ECM of D1 inherently contains negatively charged molecules. This provides the negatively charged ECM layer above the positively charged layer of biopolymer. In addition, this document teaches that the MEF feeder layer can be substituted for a vitronectin or Matrigel layer once the bovine embryonic stem cells are established. Therefore there is no common inventive concept linking the claims of Group A and Group B.

An *a priori* analysis has concluded that there is no common concept linking the claims of Group A and B with the claims of Group C, D and E.

In view of the description, it seems that independent claim 35 (and dependent claims 36-41) contain a lack of clarity in the expression "a substrate comprising a positively charged surface". Independent claim 35 (and dependent claims 36-41) was therefore interpreted as "an ECM-coated substrate comprising a substrate comprising a negatively charged surface" for the purpose of group establishment.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13.

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,
MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100208580

弁理士 三好 玲奈

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 ラブレック, レミ

カナダ国, ケベック ジェー0エイチ 1ダブリュー0, サンピエ, 180 リュ ダヴィニオン

(72)発明者 ジャン, シージョン

カナダ国, ケベック ジェー2エイチ 1エックス5, グランビー, 55 リュ デ シーニュ

F ターム (参考) 4B029 AA27 BB11 CC02 GA08 GB10

4B063 QA13 QQ08 QQ28 QQ42 QR08 QR32 QR42 QR62 QR66 QR77

QS03 QS25 QS34 QS36 QX02

4B065 AA90X AC20 BA30 CA43 CA46