

【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9月20日(2022.9.20)

【国際公開番号】WO2020/061371
 【公表番号】特表2022-501049(P2022-501049A)
 【公表日】令和4年1月6日(2022.1.6)
 【出願番号】特願2021-516628(P2021-516628)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0735(2010.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 N 5/079(2010.01)

【F I】

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/079

10

【手続補正書】

【提出日】令和4年9月9日(2022.9.9)

【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】

(a) 未分化のヒト多能性幹細胞の非胚様体(非EB)凝集塊の懸濁培養物を得る工程であって、該ヒト多能性幹細胞が未分化状態のままである、該工程；

(b) (a)からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、トランスフォーミング増殖因子(TGF) /アクチビン/ノーダルシグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質および骨形成タンパク質(BMP)シグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質の存在下で、第1の期間にわたって培養し、それによって神経外胚葉への分化を誘導する工程；

(c) (b)からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、レチノイン酸、およびスムーズン受容体の少なくとも1つのアゴニストの存在下で、第2の期間にわたって培養する工程；ならびに

(d) (c)からの凝集塊を動的懸濁状態で、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)および上皮成長因子(EGF)の存在下でさらなる期間にわたって、該細胞がグリア前駆細胞に成熟するまで培養する工程

を含む、グリア前駆細胞を含む細胞の集団を未分化のヒト多能性幹細胞から得るための方法。

【請求項2】

(d)からの非EB凝集塊を収集してそれらを基材上にプレーティングし、それによって該凝集塊から細胞を移動させる追加の工程をさらに含み、任意で、該基材が組換えヒトラミニン521である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記ヒト多能性幹細胞がヒト胚性幹細胞(hESC)またはヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

TGF /アクチビン/ノーダルシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質がアクチビン受容体様キナーゼ5(ALK5)の阻害物質であるか、または

20

30

40

50

TGF /アクチビン/ノーダルシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質が、SB431542、LY2157299、GW788388、A-77-01、A-83-01、およびSB505124からなる群より選択される、

請求項1に記載の方法。

【請求項5】

BMPシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質が、アクチビン受容体様キナーゼ2 (ALK2) の阻害物質、ドルソモルフィン、DMH-1、K02288、ML3467、LDN193189、およびノギンタンパク質からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

少なくとも1つのスムーズド受容体アゴニストが、ブルモルファミン、スムーズドアゴニスト (SAG、CAS 364590-63-6)、およびソニック・ヘッジホッグ (SHH) タンパク質からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項7】

前記第1の期間が約3~4日である、または前記第2の期間が約3日である、または工程(a)~(d)が約21日間にわたって実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

請求項1に記載の方法に従って得られた、グリア前駆細胞を含む分化した細胞集団。

【請求項9】

前記グリア前駆細胞が、カルシウム電位依存性チャンネル補助サブユニット4 (CACNG4)、脂肪酸結合タンパク質7 (FABP7)、および性決定領域Yボックス6 (SOX6) より選択される1つまたは複数のマーカーを発現する、請求項8に記載の分化した細胞集団。

20

【請求項10】

(a) 請求項1に記載の方法に従ってグリア前駆細胞を得る工程；
 (b) (a)からの細胞を収集してそれらを基材上にプレATINGし、それによって凝集塊から細胞を移動させる工程；ならびに
 (c) (b)からの細胞を、上皮成長因子 (EGF) および血小板由来成長因子AA (PDGF-AA) の存在下でさらなる期間にわたって、該細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) に成熟するまで接着培養する工程

30

を含む、OPCを含む細胞の集団を未分化のヒト多能性幹細胞から得るための方法であって、
 該OPCが、神経/グリア抗原2 (NG2)、血小板由来成長因子受容体A (PDGFR)、およびガングリオシドGD3 (GD3) より選択される1つまたは複数のマーカーを発現する、該方法。

【請求項11】

前記接着培養が約21日間にわたって実施される、または前記接着培養が基材上で実施され、該基材が、(i)細胞接着ペプチド、ならびに(ii)ラミニンおよびビトロネクチンより選択される細胞外マトリックスより選択される、または

40

前記接着培養が組換えヒトラミニン521もしくはラミニン511 E8フラグメント上で実施される、

請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記ヒト多能性幹細胞がhESCまたはhiPSCである、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

請求項10に記載の方法に従って得られた、OPCを含む分化した細胞集団。

【請求項14】

前記細胞の少なくとも60%がNG2陽性である、または前記細胞の少なくとも70%がNG2陽性である、または

50

前記細胞の少なくとも80%がNG2陽性である、または前記細胞の少なくとも90%がNG2陽性である、
請求項13に記載の分化した細胞集団。

【請求項15】

前記細胞の少なくとも60%がPDGFR 陽性である、または前記細胞の少なくとも70%がPDGFR 陽性である、または前記細胞の少なくとも80%がPDGFR 陽性である、または前記細胞の少なくとも90%がPDGFR 陽性である、
請求項13に記載の分化した細胞集団。

【請求項16】

前記細胞の少なくとも60%がGD3陽性である、または前記細胞の少なくとも70%がGD3陽性である、または前記細胞の少なくとも80%がGD3陽性である、または前記細胞の少なくとも90%がGD3陽性である、
請求項13に記載の分化した細胞集団。

【請求項17】

(a) 未分化のヒト多能性幹細胞の非胚様体(非EB)凝集塊の懸濁培養物を得る工程であって、該ヒト多能性幹細胞が未分化状態のままである、該工程；

(b) (a)からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、トランスフォーミング増殖因子(TGF)/アクチビン/ノーダルシグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質および骨形成タンパク質(BMP)シグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質の存在下で、第1の期間にわたって培養し、それによって神経外胚葉への分化を誘導する工程；ならびに

(c) (b)からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、レチノイン酸、およびスムーズンド受容体の少なくとも1つのアゴニストの存在下で第2の期間にわたって、該細胞がペアードボックス6(PAX6)陽性神経外胚葉細胞に成熟するまで培養する工程を含む、ヒト多能性幹細胞から神経外胚葉細胞への分化を誘導するための方法。

【請求項18】

前記ヒト多能性幹細胞がヒト胚性幹細胞(hESC)またはヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

TGF /アクチビン/ノーダルシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質が、アクチビン受容体様キナーゼ5(ALK5)の阻害物質、SB431542、LY2157299、GW788388、A-77-01、A-83-01、およびSB505124からなる群より選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

BMPシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質が、アクチビン受容体様キナーゼ2(ALK2)の阻害物質、ドルソモルフィン、DMH-1、K02288、ML3467、LDN193189、およびノギンタンパク質からなる群より選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

少なくとも1つのスムーズンド受容体アゴニストが、プルモルファミン、スムーズンドアゴニスト(SAG、CAS 364590-63-6)、およびソニック・ヘッジホッグ(SHH)タンパク質からなる群より選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項22】

前記第1の期間が約3~4日である、または前記第2の期間が約3日である、または工程(a)~(c)が約7~8日間にわたって実施される、
請求項17に記載の方法。

【請求項23】

請求項17に記載の方法に従って得られた、PAX6陽性神経外胚葉細胞を含む分化した細胞集団。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

前記PAX6陽性神経外胚葉細胞が、Hesファミリー-BHLH転写因子5 (HES5) ならびにZBTB16 (zinc finger and BTB domain containing 16) より選択される1つまたは複数のマーカーをさらに発現する、請求項2.3に記載の分化した細胞集団。

【請求項 2 5】

(a) 脱凝集しておりかつ単一細胞懸濁液を形成している未分化のヒト多能性幹細胞を動的懸濁状態で培養して、非胚様体 (非EB) 凝集塊を得る工程であって、該非EB凝集塊中の該ヒト多能性幹細胞が未分化状態のままである、該工程；

(b) (a) からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) /アクチビン/ノーダルシグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質および骨形成タンパク質 (BMP) シグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質の存在下で、第1の期間にわたって培養し、それによって神経外胚葉への分化を誘導する工程；

(c) (b) からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、レチノイン酸、およびスムーズンド受容体の少なくとも1つのアゴニストの存在下で、第2の期間にわたって培養する工程；ならびに

(d) (c) からの凝集塊を動的懸濁状態で、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) および上皮成長因子 (EGF) の存在下でさらなる期間にわたって、該細胞がグリア前駆細胞に成熟するまで培養する工程

を含む、グリア前駆細胞を含む細胞の集団を未分化のヒト多能性幹細胞から得るための方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 3】

さらに別の態様は、本開示の方法に従って得られた、OPCを含む分化した細胞集団である。好ましい態様では、本発明による方法に従って作製されたOPCは、神経/グリア抗原2 (NG2)、血小板由来成長因子受容体A (PDGFR)、およびガングリオシドGD3 (GD3) (GD3は、抗ジシアロガングリオシドおよびガングリオシドGD3シンターゼとしても知られる) より選択される1つまたは複数のマーカーを発現する。そのため、例えば、本発明に従って作製されたOPCは、NG2、PDGFR、もしくはGD3；NG2とPDGFR、NG2とGD3、もしくはPDGFRとGD3の組み合わせ；またはNG2とPDGFRとGD3の組み合わせを発現することができる。特定の態様では、分化した細胞集団は、NG2陽性細胞を少なくとも60%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、NG2陽性細胞を少なくとも70%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、NG2陽性細胞を少なくとも80%含む。他の態様では、分化した細胞集団は、NG2陽性細胞を少なくとも90%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、NG2陽性細胞を少なくとも98%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、PDGFR陽性細胞を少なくとも60%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、PDGFR陽性細胞を少なくとも70%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、PDGFR陽性細胞を少なくとも80%含む。他の態様では、分化した細胞集団は、PDGFR陽性細胞を少なくとも90%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、PDGFR陽性細胞を少なくとも98%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、GD3陽性細胞を少なくとも60%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、GD3陽性細胞を少なくとも70%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、GD3陽性細胞を少なくとも80%含む。他の態様では、分化した細胞集団は、GD3陽性細胞を少なくとも90%含む。特定の態様では、分化した細胞集団は、GD3陽性細胞を少なくとも98%含む。

[本発明1001]

(a) 未分化のヒト多能性幹細胞の非胚様体 (非EB) 凝集塊の懸濁培養物を得る工程

であって、該ヒト多能性幹細胞が未分化状態のままである、該工程；

(b) (a)からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、トランスフォーミング増殖因子(TGF)/アクチビン/ノーダルシグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質および骨形成タンパク質(BMP)シグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質の存在下で、第1の期間にわたって培養し、それによって神経外胚葉への分化を誘導する工程；

(c) (b)からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、レチノイン酸、およびスムーズンド受容体の少なくとも1つのアゴニストの存在下で、第2の期間にわたって培養する工程；ならびに

(d) (c)からの凝集塊を動的懸濁状態で、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)および上皮成長因子(EGF)の存在下でさらなる期間にわたって、該細胞がグリア前駆細胞に成熟するまで培養する工程

を含む、グリア前駆細胞を含む細胞の集団を未分化のヒト多能性幹細胞から得るための方法。

[本発明1002]

(d)からの非EB凝集塊を収集してそれらを基材上にプレーティングし、それによって該凝集塊から細胞を移動させる追加の工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記基材が組換えヒトラミン521である、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記ヒト多能性幹細胞がヒト胚性幹細胞(hESC)である、本発明1001の方法。

[本発明1005]

前記ヒト多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)である、本発明1001の方法。

[本発明1006]

TGF/アクチビン/ノーダルシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質がアクチビン受容体様キナーゼ5(ALK5)の阻害物質である、本発明1001の方法。

[本発明1007]

TGF/アクチビン/ノーダルシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質が、SB431542、LY2157299、GW788388、A-77-01、A-83-01、およびSB505124からなる群より選択される、本発明1001の方法。

[本発明1008]

TGF/アクチビン/ノーダルシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質がSB431542である、本発明1001の方法。

[本発明1009]

BMPシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質がアクチビン受容体様キナーゼ2(ALK2)の阻害物質である、本発明1001の方法。

[本発明1010]

BMPシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質が、ドルソモルフィン、DMH-1、K02288、ML3467、LDN193189、およびノギンタンパク質からなる群より選択される、本発明1001の方法。

[本発明1011]

BMPシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質がドルソモルフィンである、本発明1001の方法。

[本発明1012]

少なくとも1つのスムーズンド受容体アゴニストが、プルモルファミン、スムーズンドアゴニスト(SAG、CAS 364590-63-6)、およびソニック・ヘッジホッグ(SHH)タンパク質からなる群より選択される、本発明1001の方法。

[本発明1013]

少なくとも1つのスムーズンド受容体アゴニストがプルモルファミンである、本発明1001の方法。

[本発明1014]

10

20

30

40

50

前記第1の期間が約3～4日である、本発明1001の方法。

[本発明1015]

前記第2の期間が約3日である、本発明1001の方法。

[本発明1016]

工程(a)～(d)が約21日間にわたって実施される、本発明1001の方法。

[本発明1017]

本発明1001の方法に従って得られた、グリア前駆細胞を含む分化した細胞集団。

[本発明1018]

前記グリア前駆細胞が、カルシウム電位依存性チャンネル補助サブユニット4(CACN G4)、脂肪酸結合タンパク質7(FABP7)、および性決定領域Yボックス6(SOX6)より選択される1つまたは複数のマーカーを発現する、本発明1017の分化した細胞集団。

10

[本発明1019]

(a) 本発明1001の方法に従ってグリア前駆細胞を得る工程；

(b) (a)からの細胞を収集してそれらを基材上にプレATINGし、それによって凝集塊から細胞を移動させる工程；ならび

(c) (b)からの細胞を、上皮成長因子(EGF)および血小板由来成長因子AA(PDGF-AA)の存在下でさらなる期間にわたって、該細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)に成熟するまで接着培養する工程

を含む、OPCを含む細胞の集団を未分化のヒト多能性幹細胞から得るための方法であって、

20

該OPCが、神経/グリア抗原2(NG2)、血小板由来成長因子受容体A(PDGFR)、およびガングリオシドGD3(GD3)より選択される1つまたは複数のマーカーを発現する、該方法。

[本発明1020]

前記接着培養が約21日間にわたって実施される、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記接着培養が基材上で実施され、該基材が、(i)細胞接着ペプチド、ならびに(ii)ラミニンおよびビトロネクチンより選択される細胞外マトリックスより選択される、本発明1019の方法。

[本発明1022]

前記接着培養が組換えヒトラミニン521上で実施される、本発明1019の方法。

30

[本発明1023]

前記接着培養がラミニン511 E8フラグメント上で実施される、本発明1019の方法。

[本発明1024]

前記ヒト多能性幹細胞がhESCである、本発明1019の方法。

[本発明1025]

前記ヒト多能性幹細胞がhiPSCである、本発明1019の方法。

[本発明1026]

本発明1019の方法に従って得られた、OPCを含む分化した細胞集団。

[本発明1027]

前記細胞の少なくとも60%がNG2陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。

40

[本発明1028]

前記細胞の少なくとも70%がNG2陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。

[本発明1029]

前記細胞の少なくとも80%がNG2陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。

[本発明1030]

前記細胞の少なくとも90%がNG2陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。

[本発明1031]

前記細胞の少なくとも60%がPDGFR陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。

[本発明1032]

50

- 前記細胞の少なくとも70%がPDGFR陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。
[本発明1033]
- 前記細胞の少なくとも80%がPDGFR陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。
[本発明1034]
- 前記細胞の少なくとも90%がPDGFR陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。
[本発明1035]
- 前記細胞の少なくとも60%がGD3陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。
[本発明1036]
- 前記細胞の少なくとも70%がGD3陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。
[本発明1037]
- 前記細胞の少なくとも80%がGD3陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。
[本発明1038]
- 前記細胞の少なくとも90%がGD3陽性である、本発明1026の分化した細胞集団。
[本発明1039]
- (a) 未分化のヒト多能性幹細胞の非胚様体(非EB)凝集塊の懸濁培養物を得る工程であって、該ヒト多能性幹細胞が未分化状態のままである、該工程；
- (b) (a)からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、トランスフォーミング増殖因子(TGF) /アクチビン/ノーダルシグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質および骨形成タンパク質(BMP)シグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質の存在下で、第1の期間にわたって培養し、それによって神経外胚葉への分化を誘導する工程；ならび
- (c) (b)からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、レチノイン酸、およびスムーズド受容体の少なくとも1つのアゴニストの存在下で第2の期間にわたって、該細胞がペアードボックス6(PAX6)陽性神経外胚葉細胞に成熟するまで培養する工程を含む、ヒト多能性幹細胞から神経外胚葉細胞への分化を誘導するための方法。
[本発明1040]
- 前記ヒト多能性幹細胞がヒト胚性幹細胞(hESC)である、本発明1039の方法。
[本発明1041]
- 前記ヒト多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)である、本発明1039の方法。
[本発明1042]
- TGF /アクチビン/ノーダルシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質がアクチビン受容体様キナーゼ5(ALK5)の阻害物質である、本発明1039の方法。
[本発明1043]
- TGF /アクチビン/ノーダルシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質が、SB431542、LY2157299、GW788388、A-77-01、A-83-01、およびSB505124からなる群より選択される、本発明1039の方法。
[本発明1044]
- TGF /アクチビン/ノーダルシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質がSB431542である、本発明1039の方法。
[本発明1045]
- BMPシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質がアクチビン受容体様キナーゼ2(ALK2)の阻害物質である、本発明1039の方法。
[本発明1046]
- BMPシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質が、ドルソモルフィン、DMH-1、K02288、ML3467、LDN193189、およびノギンタンパク質からなる群より選択される、本発明1039の方法。
[本発明1047]
- BMPシグナル伝達の前記少なくとも1つの阻害物質がドルソモルフィンである、本発明1039の方法。
[本発明1048]
- 少なくとも1つのスムーズド受容体アゴニストが、プルモルファミン、スムーズド

10

20

30

40

50

アゴニスト (SAG、CAS 364590-63-6)、およびソニック・ヘッジホッグ (SHH) タンパク質からなる群より選択される、本発明1039の方法。

[本発明1049]

少なくとも1つのスムーズド受容体アゴニストがプルモルファミンである、本発明1039の方法。

[本発明1050]

前記第1の期間が約3~4日である、本発明1039の方法。

[本発明1051]

前記第2の期間が約3日である、本発明1039の方法。

[本発明1052]

工程(a)~(c)が約7~8日間にわたって実施される、本発明1039の方法。

[本発明1053]

本発明1039の方法に従って得られた、PAX6陽性神経外胚葉細胞を含む分化した細胞集団。

[本発明1054]

前記PAX6陽性神経外胚葉細胞が、Hesファミリー-BHLH転写因子5 (HES5)ならびにZBTB16 (zinc finger and BTB domain containing 16)より選択される1つまたは複数のマーカーをさらに発現する、本発明1053の分化した細胞集団。

[本発明1055]

(a) 脱凝集しておりかつ単一細胞懸濁液を形成している未分化のヒト多能性幹細胞を動的懸濁状態で培養して、非胚様体 (非EB) 凝集塊を得る工程であって、該非EB凝集塊中の該ヒト多能性幹細胞が未分化状態のままである、該工程；

(b) (a)からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) /アクチビン/ノーダルシグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質および骨形成タンパク質 (BMP) シグナル伝達の少なくとも1つの阻害物質の存在下で、第1の期間にわたって培養し、それによって神経外胚葉への分化を誘導する工程；

(c) (b)からの非EB凝集塊を動的懸濁状態で、レチノイン酸、およびスムーズド受容体の少なくとも1つのアゴニストの存在下で、第2の期間にわたって培養する工程；ならび

(d) (c)からの凝集塊を動的懸濁状態で、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) および上皮成長因子 (EGF) の存在下でさらなる期間にわたって、該細胞がグリア前駆細胞に成熟するまで培養する工程を含む、グリア前駆細胞を含む細胞の集団を未分化のヒト多能性幹細胞から得るための方法。

10

20

30

40

50