

【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5年1月19日(2023.1.19)

【公開番号】特開2022-97516(P2022-97516A)

【公開日】令和4年6月30日(2022.6.30)

【年通号数】公開公報(特許)2022-118

【出願番号】特願2022-66559(P2022-66559)

【国際特許分類】

C 12 N 5/0735(2010.01)

10

C 12 N 5/10(2006.01)

【F I】

C 12 N 5/0735

C 12 N 5/10

【手続補正書】

【提出日】令和5年1月5日(2023.1.5)

【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

20

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

単細胞に解離したヒト多能性幹細胞を含む治療細胞を単離する方法であって、前記方法が、

ヒト人工多能性幹細胞(iPSC)と、1または複数の解離酵素とを接触させて単細胞に解離させたヒト多能性幹細胞を得ること、を含み、

前記ヒトiPSCが基底状態の多能性を有するナイーブヒトiPSCを含み、前記基底状態の多能性を有するナイーブヒトiPSCが、GATA6、CDX2、またはCGBのうちの1または複数の再活性化された発現を示すことを特徴とする、方法。

30

【請求項2】

前記方法が、1種または複数種の多能性のマーカーを発現する1または複数の单一の解離した多能性幹細胞を選択して単離し、1または複数の单一の解離した多能性幹細胞を得ることにより、前記単細胞に解離したヒト多能性幹細胞を選別することを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

1つの選択された单一の解離した多能性幹細胞を拡大して、それから誘導された人工多能性幹細胞のクローン集団を得ることを更に含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記方法が、前記人工多能性幹細胞をフィーダーフリー培地中で培養することを更に含み、前記培養が、Rock、GSK3、MEK、およびTGFのそれぞれを特異的に阻害することを含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項5】

単細胞の多能性幹細胞を得る方法であって、前記方法が、

a) GATA6、CDX2、またはCGBのうちの1または複数の再活性化された発現を示すことを特徴とする、基底状態の多能性を有するナイーブヒト人工多能性幹細胞(iPSC)を乖離すること；

b) それにより得られた乖離した細胞を、フィーダーフリー培地中で懸濁して、フィーダーフリー細胞懸濁物を提供すること；

50

c) 前記フィーダーフリー細胞懸濁物を、1種または複数種の多能性のマーカーを発現する細胞について選別して、単一の i P S C について富化された細胞集団を得ること；および

d) ステップ c) から得られた i P S C をフィーダーフリー培地内で単離すること、を含む、方法。

【請求項 6】

選別が、1種または複数種の多能性のマーカーを発現する細胞のための、磁気ビーズまたはフローサイトメトリーによるものである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

単離するステップが、前記フィーダーフリー培地内で R o c k 、 G S K 3 、 M E K 、および T G F のそれぞれを特異的に阻害することを更に含む、請求項 5 または 6 に記載の方法。
10

【請求項 8】

単一の人工多能性幹細胞について富化された細胞集団が、1種または複数種の多能性のマーカーを発現している細胞に関して少なくとも 20% 、少なくとも 50% 、少なくとも 100% 、少なくとも 200% 、または少なくとも 500% 富化されている、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 種または複数種の多能性のマーカーが、 S S E A 4 、 T R A 1 6 0 、 T R A 1 8 1 、 T R A 1 - 8 5 、 T R A 2 - 5 4 、 G C T M - 2 、 T G 3 4 3 、 T G 3 0 、 C D 9 、 C D 2 9 、 C D 3 0 、 C D 5 0 、 C D 1 3 3 / プロミニン、 C D 1 4 0 a 、 C D 5 6 、 C D 7 3 、 C D 1 0 5 、 C D 3 1 、 C D 3 4 、 O C T 4 、 N a n o g または S o x 2 を含む、請求項 5 または 6 に記載の方法。
20

【請求項 10】

R o c k 、 G S K 3 、 M E K 、および T G F のそれぞれを特異的に阻害することが、前記フィーダーフリー培地中に、(a) チアゾビシンまたは Y 2 7 6 3 2 、(b) A - 8 3 - 0 1 または S B 4 3 1 5 4 2 、(c) B I O または C H I R 9 9 0 2 1 、および(d) P D 9 8 0 5 9 または P D 0 3 2 5 9 0 1 を含めることを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法により生成されるヒト人工多能性幹細胞(i P S C)を含む組成物であって、前記ヒト i P S C が、 G A T A 6 、 C D X 2 、または C G B のうちの 1 または複数の再活性化された発現を示すことを特徴とする、基底状態の多能性を有するナイーブヒト i P S C を含む、組成物。
30

【請求項 12】

単離された人工多能性幹細胞であって、(a) 前記細胞が、フィーダーフリー培地組成物と接触しており、(b) 前記人工多能性幹細胞が、基底状態の多能性を有するナイーブヒト人工多能性幹細胞(i P S C)であり、前記基底状態の多能性を有するナイーブヒト i P S C が、 G A T A 6 、 C D X 2 、または C G B のうちの 1 または複数の再活性化された発現を示すことを特徴とする、単離された人工多能性幹細胞。

【請求項 13】

前記細胞が、 O c t 4 、必要に応じて、 S o x 2 および K l f 4 、を含むタンパク質をコードする 1 または複数の外因性ポリヌクレオチドを含む、請求項 1 2 に記載の単離された人工多能性幹細胞。

【請求項 14】

前記ナイーブヒト i P S C が、再プログラミング細胞と、 i) T F G 受容体阻害剤、 i) G S K 3 阻害剤、 i i i) M E K 阻害剤、および i v) R o c k 阻害剤を含む作用剤の混合物を含むフィーダーフリー培地とを接触させることを含む方法により得られる、請求項 1 2 または 1 3 に記載の単離された人工多能性幹細胞。

【請求項 15】

(i) 前記再プログラミング細胞が、体細胞、多能性細胞、人工多能性幹細胞、またはブ
50

ライムされた多能性細胞であり、

(i i) 前記ナイーブヒト i P S C が、 T F G 受容体、アクチシン、および M E K シグナル伝達経路の外因性の刺激の不在下で複製し、かつ多能性を維持し、

(i i i) 前記ナイーブヒト i P S C が、フィーダーフリー環境において少なくとも 1 回の細胞分裂を可能にする、

請求項 1 4 に記載の単離された人工多能性幹細胞。

【請求項 1 6】

前記ナイーブヒト i P S C の基底状態の多能性が、前記作用剤の混合物との接触なしに得られた人工多能性幹細胞と比較して、

a) クローン性の改善；

b) X 染色体の再活性化の増大；

c) フィーダーフリー条件下での自己再生能の改善；

d) フィーダーフリー条件下での単一細胞の生存率の改善；

e) 少なくとも 50 % 低い X i s t 活性を有すること、

によって特徴付けられる、請求項 1 5 に記載の単離された人工多能性幹細胞。

10

【請求項 1 7】

基底状態の多能性を有さないヒト細胞と、 R O C K 阻害剤、並びに T G F 阻害剤、 G S K 3 阻害剤および M E K 阻害剤のうちの 1 または複数を含む作用剤の混合物とを含む組成物であって、

(a) 前記ヒト細胞が、 O c t 4 をコードする、 1 または複数の外因性ポリヌクレオチドを含み； 20

(b) 前記組成物がフィーダーフリーであり；

(c) 前記作用剤の混合物が、前記ヒト細胞において基底状態の多能性を誘導するのに有効な量で存在し；

(d) 前記基底状態の多能性が、 G A T A 6 、 C D X 2 、または C G B のうちの 1 または複数の再活性化された発現を特徴とする、組成物。

【請求項 1 8】

前記基底状態の多能性を有さないヒト細胞が、再プログラミング細胞である、請求項 1 7 に記載の組成物。

30

【請求項 1 9】

前記再プログラミング細胞が、体細胞、多能性細胞、人工多能性幹細胞、またはライムされた多能性細胞である、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

再プログラミングされた細胞またはその集団であって、(a)

前記細胞が、基底状態の多能性を有するナイーブヒト人工多能性幹細胞(i P S C)であり、(b) 前記再プログラミングされた細胞が、 G A T A 6 、 C D X 2 、または C G B のうちの 1 または複数の再活性化された発現を示し、(c) 前記再プログラミングされた細胞が、

A) フィーダーフリー環境において、 O c t 4 と、 S o x 2 および K l f 4 の一方または両方とを含む再プログラミング因子を非多能性細胞の集団に導入して再プログラミングを誘導すること、 40

B) ステップ A) の細胞を、以下の作用剤の混合物：

i) T G F 受容体阻害剤、

i i) G S K 3 阻害剤、

i i i) M E K 阻害剤、および

i v) R O C K 阻害剤

と、接触させることを含む方法によって得られ、

前記接触がフィーダーフリー条件下である、再プログラミングされた細胞またはその集団。

【請求項 2 1】

50

前記方法が、

C) ステップ (B) からの前記細胞を解離させること；および
D) (C) の細胞を単細胞選別して、SSEA4、TRA160、TRA181、TRA
 1 - 85、TRA2 - 54、GCTM - 2、TG343、TG30、CD9、CD29、
 CD30、CD50、CD133 / プロミニン、CD140a、CD56、CD73、C
 D105、CD31、CD34、OCT4、Nanog または Sox2 を含む 1 種または
 複数種の多能性のマーカーを発現する個々の細胞を得ること、を更に含む、請求項 20 に
 記載の再プログラミングされた細胞またはその集団。

【請求項 22】

前記方法が、ステップ (D) からの個々の細胞を、

10

i) TGF 受容体阻害剤、

i i) GSK3 阻害剤、

i i i) MEK 阻害剤、および

i v) ROCK 阻害剤

のうちの 1 または複数を含むフィーダーフリー培地中で培養することを更に含む、請求項
 21 に記載の再プログラミングされた細胞またはその集団。

【請求項 23】

前記再プログラミングされた細胞の集団が、クローン細胞を含む、請求項 21 に記載の再
 プログラミングされた細胞またはその集団。

20

【請求項 24】

前記再プログラミングされた細胞が、通常の核型および / または通常の染色体コピー数を
 含む、改善したゲノム安定性を示す、請求項 20 に記載の再プログラミングされた細胞ま
 たはその集団。

【請求項 25】

前記再プログラミングされた細胞が、解離後に、クローン性の改善、および / または生存
 率の増強を有する、請求項 24 に記載の再プログラミングされた細胞またはその集団。

【請求項 26】

前記細胞が、生存率の増強を有する、解離した人工多能性幹細胞またはその集団である、
 請求項 20 ~ 22 のいずれか一項に記載の再プログラミングされた細胞またはその集団。

30

40

50