

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-517794

(P2019-517794A)

(43) 公表日 令和1年6月27日 (2019. 6. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/077 (2010. 01)	C 1 2 N 5/077	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/34 (2015. 01)	A 6 1 K 35/34	4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/00 (2006. 01)	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53 (2006. 01)	G 0 1 N 33/53	Y
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-562924 (P2018-562924)
 (86) (22) 出願日 平成29年5月30日 (2017. 5. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年1月23日 (2019. 1. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/063047
 (87) 国際公開番号 W02017/207576
 (87) 国際公開日 平成29年12月7日 (2017. 12. 7)
 (31) 優先権主張番号 16172528.8
 (32) 優先日 平成28年6月1日 (2016. 6. 1)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 502329153
 ミルテニイ バイオテック ゲゼルシャフ
 ト ミット ベシュレンクテル ハフツン
 グ
 ドイツ連邦共和国, 5 1 4 2 9 ベルギッ
 シュ グラドバッハ, フリードリッヒエ
 ベルトーシュトラッセ 6 8
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100119183
 弁理士 松任谷 優子
 (74) 代理人 100149076
 弁理士 梅田 慎介
 (74) 代理人 100173185
 弁理士 森田 裕

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞および心筋細胞サブポピュレーションの生成、同定ならびに単離のための方法

(57) 【要約】

本発明は、多能性および/または複能性幹細胞を含む出発細胞組成物に由来する心筋細胞の生成、単離、検出および/または分析のための方法であって、a) 多能性および/または複能性幹細胞を心血管細胞に分化させ、それによって、心筋細胞および非心筋細胞を含むサンプルを生成するステップ; およびb) サンプルの非心筋細胞を、非心筋細胞の抗原に特異的な複数の抗体またはその抗原結合断片で標識するステップ、およびc) 標識された非心筋細胞をサンプルから枯渇化させるステップ; および任意選択でd) サンプルの心筋細胞を、心筋細胞の抗原に特異的な少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片で標識するステップ; およびe) 標識された心筋細胞を濃縮し、多能性および/または複能性幹細胞に由来する心筋細胞サブタイプを検出および単離するステップを含む方法を提供する。

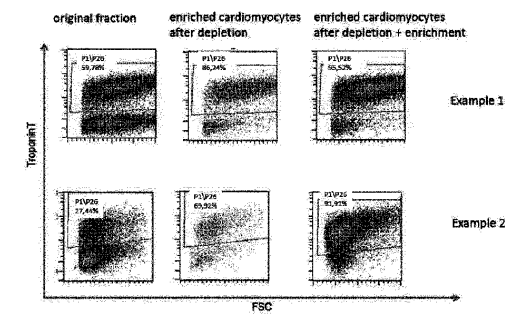


FIG 8

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

多能性および／または複能性幹細胞を含む出発細胞組成物に由来する心筋細胞の生成、単離、検出および／または分析のための方法であって、

a) 前記多能性および／または複能性幹細胞を心血管細胞に分化させ、それによって、心筋細胞および非心筋細胞を含むサンプルを生成するステップ；

b) 前記サンプルの非心筋細胞を、非心筋細胞の抗原に特異的な複数の抗体またはその抗原結合断片で標識するステップであって、前記複数の抗体またはその抗原結合断片は、抗CD10、抗CD105、抗CD140b、抗CD61、抗CD44、抗CD141、および抗CD51/61からなる群から選択される、ステップ；

c) 標識された前記非心筋細胞を前記サンプルから枯渇化させるステップを含む、方法。

【請求項 2】

前記非心筋細胞は、3つの抗体またはその抗原結合断片で標識され、前記抗体またはその抗原結合断片は、抗CD140b、抗CD141および抗CD10である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記非心筋細胞は、前記群から選択される2つの抗体またはその抗原結合断片で標識される、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

非心筋細胞の抗原に特異的な前記複数の抗体またはその抗原結合断片は、タグにカップリングされている、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

枯渇化ステップc)は、磁気細胞分離によって実施され、前記タグは磁気粒子である、または蛍光活性化セルソーティングによって実施され、前記タグはフルオロフォアである、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

d) ステップc)の後、前記サンプルの心筋細胞を、心筋細胞の抗原に特異的な少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片で標識するステップであって、前記少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片は、抗PTK7、抗CD99、抗CD276、抗CD56、抗CD59、抗CD147、抗CD239、抗CD298、抗CD49f、抗CD262、抗CD81、抗Tra-1-85、抗CD49e、抗CD24、抗CD47、抗CD46、抗CD49c、抗CD51、抗CD29、抗CD98、抗CD63、および抗CD146c、抗CD151からなる群から選択される、ステップ；

e) 標識された前記心筋細胞を濃縮するステップをさらに含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

心筋細胞に特異的な前記少なくとも1つの抗体またはその断片は、抗CD56である、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

心筋細胞の抗原に特異的な前記少なくとも1つの抗体またはその断片は、タグにカップリングされている、請求項6または7に記載の方法。

【請求項 9】

濃縮ステップe)は、磁気細胞分離によって実施され、前記タグは磁気粒子である、または蛍光活性化セルソーティングによって実施され、前記タグはフルオロフォアである、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

非心筋細胞の標識(ステップb)および心筋細胞の標識(ステップd)が同時に実施される場合、非心筋細胞の抗原に特異的な前記複数の抗体またはその抗原結合断片にカップリングされている磁気粒子と、心筋細胞の抗原に特異的な前記少なくとも1つの抗体また

10

20

30

40

50

はその断片にカップリングされている磁気粒子とは、区別可能な磁気粒子である、あるいは非心筋細胞を標識するステップ（ステップ b）、および心筋細胞を標識するステップ（ステップ d）が同時に実施される場合、非心筋細胞の抗原に特異的な前記複数の抗体またはその抗原結合断片にカップリングされているフルオロフォアと、心筋細胞の抗原に特異的な前記少なくとも 1 つの抗体またはその断片にカップリングされているフルオロフォアとは、区別可能なフルオロフォアである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ c) の後に、追加のステップ：

I) ステップ c) の心筋細胞を、心筋細胞のサブポピュレーションの抗原に特異的な少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片で標識するステップであって、前記少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片は、抗 PTK7、抗 CD81、抗 CD276、抗 CD239、抗 CD298、抗 CD49c、抗 CD200、抗 CD230、抗 CD324、抗 ROR1、抗 CD146、抗 CD317、抗 CD49a、抗 CD43、抗 CD111、抗 CD201、抗 CD138、抗 CD271、抗 CD222、抗 CD82、抗 CD44、抗 CD90、抗 CD95、抗 CD142、抗 Notch-2、抗 KIR-2D、抗 CD197、抗 CD240DCE、抗 CD184、抗 ASCA-1 (GLAST)、抗 CCR10、抗 CDIR、抗 CD183、抗 CD97、抗 CD49b、抗 CD134、抗 CD13、抗 fMLP、抗 CD83、抗 CD79b、抗 CD5、抗 CD74、および抗 CD80 からなる群から選択される、ステップ；

II) ステップ I) の標識された前記心筋細胞を濃縮し、それによって、心筋細胞のサブポピュレーションを濃縮するステップを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ e) の後に、追加のステップ：

I) ステップ e) の心筋細胞を、心筋細胞のサブポピュレーションの抗原に特異的な少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片で標識するステップであって、前記少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片は、抗 PTK7、抗 CD81、抗 CD276、抗 CD239、抗 CD298、抗 CD49c、抗 CD200、抗 CD230、抗 CD324、抗 ROR1、抗 CD146、抗 CD317、抗 CD49a、抗 CD43、抗 CD111、抗 CD201、抗 CD138、抗 CD271、抗 CD222、抗 CD82、抗 CD44、抗 CD90、抗 CD95、抗 CD142、抗 Notch-2、抗 KIR-2D、抗 CD197、抗 CD240DCE、抗 CD184、抗 ASCA-1 (GLAST)、抗 CCR10、抗 CDIR、抗 CD183、抗 CD97、抗 CD49b、抗 CD134、抗 CD13、抗 fMLP、抗 CD83、抗 CD79b、抗 CD5、抗 CD74、および抗 CD80 からなる群から選択される、ステップ；

II) ステップ I) の標識された前記心筋細胞を濃縮し、それによって、心筋細胞のサブポピュレーションを濃縮するステップを含む、請求項 6 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

閉鎖系において実施される、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法によって得られる心筋細胞の組成物を含む医薬組成物。

【請求項 15】

請求項 11 または 12 に記載の方法によって得られる心筋細胞サブポピュレーションの組成物を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

10

20

30

40

50

心血管疾患は、世界中の主要な死因である。心筋梗塞後、多数の心筋細胞（CM）が、失われ、線維芽細胞に置き換わり、瘢痕組織が形成される。これにより、不整脈が引き起こされ、心臓機能が低下する。したがって、有効な細胞置換戦略に対する必要性が高い。それが理由で、純粋であり、十分に特徴付けられた、ヒト多能性幹細胞（PSC）由来の心筋細胞の生成が必須条件である。さらに、細胞置換療法には莫大な量の心筋細胞（細胞 10^9 個超 / 用量）が必要とされ、今日まで、スケーラブルで、完全に自動化された心臓分化および精製プロセスとして利用可能なものはない。

【0002】

例えば、使用される分化プロトコルまたは幹細胞株によって、異なる程度で標的細胞（心筋細胞）および非標的細胞（非心筋細胞）の混合物を生成する、PSC由来心筋細胞のインビトロ生成方法がいくつか報告されている。これまで報告されたプロトコルは、様々な基本培地およびサイトカイン / 小分子組成物を使用する、人手による細胞プロセッシング手順に主に基づいている。大部分のプロトコルにはWntシグナル伝達の活性化および阻害が含まれ、プロトコルによっては追加の制御因子としてアクチビンAおよびBMP4を使用する。例えば、米国特許出願公開第20140134733A1号および欧州特許第14167201.4号は、例えば、B27サプリメントを含む（ゼノフリーではない）ため、再生医学アプローチへの適用可能性が低い、Wntアゴニストおよびアンタゴニストの使用に基づく汎用のプロトコルを記載している。種々のサイトカインおよび小分子を使用する高度に複雑なプロトコルが、米国特許出願公開第20140193909A1号に開示されている。高い分化効率が記載されているが、培地調合が複雑であり、様々な幹細胞クローン間で分化効率が変動すると予測されるため、そのプロトコルを標準化することは困難である。国際公開第2013063305A2号は、規定条件下で心筋細胞の生成を可能にする分化プロトコルを開示している。そのプロトコルには、プレビスタチン（blebistatin）、アクチビンA、BMP-4およびWnt-R-1と基本培地StemPro 34（登録商標）（Life Technologies）との組合せが含まれる。培養の21日後に90%を超える分化効率が得られると主張している。しかし、分化誘導前に、ディスパーゼを使用して細胞塊を形成させてから幹細胞を採取することを記載している。細胞数を決定することができないことにより、初期の細胞播種が複雑となり、制御できにくく、標準化しにくい。こうした理由と、分化時間が比較的長いことから、このプロトコルは、再生医学アプローチへの適用可能性が低いと考えられる。2015年に、前述の小分子に追加して、CHIR99021（GSK3阻害剤）、Wnt-C59（Wntシグナル伝達阻害剤）および基本培地としてKO DMEMを含む類似のプロトコルが公開された（Zhang等、2015）。高い分化効率が、分化の8日以内に達成された。

【0003】

ヒトPSC培養物の心血管分化は、均質な細胞集団を含有せず、どちらかといえば種々の心筋細胞および非心筋細胞、ならびに心筋細胞サブタイプまたはサブポピュレーションで構成される。重要なことに、hPSC由来心筋細胞集団の不純度または不均質性は、細胞療法などの、下流にあるいかなる種類の適用にも影響する。心筋細胞サブポピュレーションの標的および非標的細胞または混合物が移植される場合、心不整脈が誘発される可能性がある。代謝性選択、遺伝子工学、または表面マーカーに基づく分離を含む、PSC由来心筋細胞の単離方法が、以下の通りいくつか報告されている。

【0004】

Tohyama等（2013）および米国特許出願公開第20090275132A1号は、培地への乳酸補充に基づく心筋細胞の代謝性選択を記載している。その方法は、非筋細胞を選択的に死滅させることを意図しているにもかかわらず、増殖している心筋細胞も影響を受け、それによって、心筋細胞の回収率が低くなる。さらに、代謝性選択は、長期プロセスであり、数日にわたって実施される必要がある。

【0005】

PSC由来心筋細胞の濃縮は、遺伝子操作および抗生物質選択によって達成することも

できる (Xu 等、2008)。抗生物質選択によってほとんど純粋な心筋細胞培養物を得ることができるけれども、遺伝子改変を伴わないことが細胞療法アプローチには有利である。

【0006】

表面マーカーに基づくPSC由来心筋細胞の濃縮も報告されており、例えば、SirpaまたはVCAM-1に基づく細胞分離プロトコルを使用する (Dubois 等、2011、Uosaki 等、2011)。しかし、これらのマーカーは、CM、さらには非心筋細胞を部分的にしか標識しないことが示されたため、細胞療法の開発に必要とされる標準化された心筋細胞精製プロセスの確立には適していない。加えて、VCAM-1またはSirpaに対する抗体を使用する磁気による濃縮の間に心筋細胞の損失が大きいことが報告された (例えば、Fuernstenaue-Sarp等、2015)。

10

【0007】

米国特許出願公開第2015/0184129A1号は、心筋細胞特異的なマーカーとしてCD340、CD56、SSEA-3およびSSEA-4を開示している。これらの抗原に対する抗体により、非心筋細胞を事前に除去することなく、心筋細胞および非心筋細胞の混合細胞集団から心筋細胞を濃縮することが可能となることが記載されている。しかし、全てのマーカーが、神経細胞もしくはNK細胞 (CD56) または上皮性および多能性幹細胞 (CD340、SSEA-3、SSEA-4) などの、非心筋細胞においても発現することは周知である。したがって、多能性幹細胞の心血管分化によって生成される心筋細胞の選択的な精製は、関連する非心筋細胞集団の除去を可能にする事前の精製ステップなしには、見込みがほとんどない。

20

【0008】

さらに、心臓系列に向かって分化したPSC培養物が、CD90、CD31、CD140bおよびCD49aに関して陽性の非心筋細胞をも含むことが報告された (例えば、Dubois 等、2011)。Dubois 等 (2011) によって示唆されたように、これらのマーカーを発現する細胞を除去するアプローチは、心筋細胞の濃縮に使用することができる。国際公開第2012/135253A1号および国際公開第2012/024782A1号は、以下のマーカーCD90、CD73、CD140b、CD10、CD105、CD44、Stro-1; SSEA-3、SSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81のうちの1つまたは複数に関して陽性の細胞の枯渇化によるCM濃縮方法を記載した。請求項は、非心筋細胞の最も重要なマーカーとしてCD90に焦点を当てている。

30

【0009】

さらに、PSC由来心筋細胞集団が、心筋細胞サブポピュレーション、例えば、心房性、心室性、およびペースメーカー様細胞ならびにそれぞれの細胞培養物の電気生理学的な特徴付けなどによって以前に示された異なる成熟度段階の混合物を含有することが公知である (例えば、Burrige 等、2014)。現在まで、心臓前駆細胞の同定または選択的な単離を可能にし得るマーカーがほんのわずかであるが報告されており、例えば、CD13およびROR2である (Skellton 等、2016)。PSC由来心筋細胞の発現プロファイリングからのデータを、心筋細胞サブポピュレーションの濃縮を目的とする細胞同定または細胞分離手順へと移行させることはまだできていない (Piccini 等、2015; van den Berg 等、2015)。

40

【0010】

より詳細には、心筋細胞精製プロトコルの現在の制限事項は以下の通りである。

a. 例えば、心筋細胞および非筋細胞を標識する表面抗体の使用 (SirpaおよびVCAM-1に基づくCM精製戦略) により、心筋細胞マーカーの特異性が欠如していること

b. 例えば、磁気細胞分離 (Dubois 等、2011; Fuernstenaue-Sarp等、2015) または乳酸ベースの分化/選択培地による、単離手順の間に心筋細胞の損失が大きいこと

50

- c. 手順が長期にわたること（例えば、乳酸ベースの分化培地）（T o h y a m a 等、2013）
- d. 例えば、心筋細胞における表面マーカーの発現が分化プロセスの間に変動しやすく、心筋細胞における表面マーカーの発現が分化プロトコールによっても異なるので、標準化の可能性が失われていること
- e. 心筋細胞機能または生存度に対して影響があること
- f. 心筋細胞産生の手順を標準化し、細胞置換療法に必要とされる多数の細胞数を得るための、心筋細胞分化および精製の自動化プロセスが確立されていないこと
- g. 現在、心筋細胞サブピュレーションの混合物は、例えば、前臨床細胞療法への適用のために使用され、P S C から心筋細胞への分化によって生成されるC Mサブピュレーションに関する詳細な報告がないこと。

10

【0011】

したがって、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞および心筋細胞サブピュレーション（それにより、例えば、その後、研究、診断学、薬理的および／または臨床的適用、例えば、細胞療法における前記心筋細胞および／または心筋細胞サブピュレーションの使用が可能になる）を生成、同定および／または単離するための改善または代替方法に対する必要性が高い。

【発明の概要】

【0012】

予想外なことに、1または2ステップの細胞分離手順により、98%までの純度での、多能性幹細胞由来心筋細胞のロバストで標準化された精製（濃縮または単離）が可能となることが見出された。開発された細胞分離手順は、マーカー遺伝子発現および分化効力、ならびに使用される分化プロトコールおよび多能性幹細胞クローン、または多能性幹細胞由来心筋細胞の濃縮のために選択される分化の時点の変動に関わらず、心筋細胞が同様の純度になることを保証する。細胞分離手順には、1ステップ分離の場合、非心筋細胞の枯渇化のための非心筋細胞マーカーに対する少なくとも2つの抗体またはその抗原結合断片の組合せが含まれ、非心筋細胞マーカーは抗C D 1 0、抗C D 1 0 5、抗C D 1 4 0 b、抗C D 6 1、抗C D 4 4、抗C D 1 4 1、および抗C D 5 1 / 6 1 からなる群から選択される。驚くべきことに、これら非心筋細胞マーカーのうちの2つの組合せを使用して、インビトロで分化した多能性および／または複能性（m u l t i p o t e n t）幹細胞に由来する心筋細胞を含むサンプルから非心筋細胞を枯渇化させることにより、当技術分野において公知の方法によっては達成されない心筋細胞精製プロセスの標準化が可能となり、その理由は、開発された細胞分離手順が、マーカー遺伝子発現および分化効力、ならびに使用される分化プロトコールおよび多能性幹細胞クローン、または多能性幹細胞由来心筋細胞の濃縮のために選択される分化の時点の変動に関わらず、心筋細胞が同様の純度になることを保証するからである。この細胞分離手順のロバスト性により、このプロセスが自動化された細胞プロセシングシステムに移行させることが可能であり、それによって、例えば、再生療法アプローチに必要とされる多数の細胞数の心筋細胞の制御および標準化された濃縮も実現される。

20

30

【0013】

さらに、心筋細胞の濃縮した細胞組成物を、当技術分野において公知の方法によっては達成されない優れた純度および回収率で得ることができる。前記2つのマーカーの組合せに、非心筋細胞マーカーの前記群から選択される1つまたは複数の非心筋細胞マーカーを加えることにより、生成された心筋細胞の細胞組成物における心筋細胞の純度および／または回収率がさらに向上した（s. 図7～11）。重要なことに、前記非心筋細胞マーカーのうちの少なくとも2つの組合せは十分であり、2つは、心筋細胞ではなく、非心筋細胞の枯渇化後の心筋細胞濃縮ステップのため選択された、すなわち、サンプルから望まれない（非標的）細胞を枯渇化させる抗体によって標識されるであろう全ての細胞型が枯渇化させる。当業者に公知の方法によって細胞集団を心筋細胞に分化させる場合に多能性および／または複能性幹細胞を含む出発細胞組成物からの細胞の混入が起こり得るとしても

40

50

、それに関わらず、前記非心筋細胞マーカーのうちの2つ以上を使用して非心筋細胞が枯渇化される。

【0014】

好ましい細胞分離手順には、1ステップ分離の場合、非心筋細胞の枯渇化のための、非心筋細胞マーカー、CD140b、CD141、CD10に対する抗体の組合せが含まれる。2ステップ分離手順には、本明細書で開示されている非心筋細胞マーカー、および本明細書で開示されている抗体またはその抗原結合断片の組合せを使用することによって非心筋細胞を枯渇化させ、続いてまたは同時に、抗PTK7、抗CD99、抗CD276、抗CD56、抗CD59、抗CD147、抗CD239、抗CD298、抗CD49f、抗CD262、抗CD81、抗Tra-1-85、抗CD49e、抗CD24、抗CD47、抗CD46、抗CD49c、抗CD51、抗CD29、抗CD98、抗CD63、抗CD146c、および抗CD151からなる群から選択される少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片を用いて心筋細胞を濃縮するステップが含まれる。優先的には、心筋細胞マーカーは、CD56である。

10

【0015】

好ましい2ステップ分離手順には、CD140b、CD141およびCD10に対する抗体の組合せによって非心筋細胞を枯渇化させ、続いてまたは同時に、CD56に対する抗体を用いて心筋細胞を濃縮するステップが含まれる。

【0016】

さらに、磁気または蛍光活性化セルソーティングによって、事前に濃縮した多能性幹細胞由来心筋細胞からの心筋細胞サブポピュレーションを同定し、続いて精製することを可能にする新規細胞表面マーカーを同定した。同定された各サブポピュレーションの機能性は、例えば、細胞療法への適用の開発に現在使用されている心筋細胞サブポピュレーションの混合物をしのぐ可能性がある。

20

【0017】

Zhang等(2015)または任意の他のロバストなPSC心筋細胞分化プロトコルなどの当業者に公知の方法によって多能性または複能性幹細胞を心筋細胞に分化させることによって生成される心筋細胞は、心筋細胞および心筋細胞サブポピュレーションの濃縮のための新しく開発されたプロトコルによってさらに精製することができる。

【0018】

重要なことに、心筋細胞および心筋細胞サブタイプの濃縮のための新しく開発された手順は、高度に精製された多能性幹細胞由来心筋細胞を提供する、人手によるまたは自動化された磁気ならびに蛍光活性化セルソーティング手順に適用可能である。それによって、多能性幹細胞由来心筋細胞の生成、ならびにそれに続く心筋細胞および心筋細胞サブポピュレーションの精製は、驚くべきことに、閉鎖された細胞サンプルプロセッシングシステム中で実施して、心筋細胞をGMPまたはGMP様条件下で生成することができる。さらに予想外なことに、本発明のプロセスは、前記閉鎖された細胞サンプルプロセッシングシステムを使用する自動化された手順において利用しやすいことが見出された。本発明の方法によって得られる組成の細胞は、例えば、冠状動脈性心疾患などの、心筋細胞の損失と関連する心血管疾患に罹患している患者における心筋細胞の損失によって引き起こされる症状を軽快または好転させる治療処置として、患者に対する細胞置換療法に使用してもよい。

40

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】多能性幹細胞由来心筋細胞の生成に使用されるプロトコルは、Zhang等(2015)による以前に公開された方法に基づき、Wntシグナル伝達活性化剤および阻害剤、ならびにFGF-2、アクチビンA、BMP-4およびRho-キナーゼ阻害剤を組み合わせた(A)。心臓トロポニンT(cTnT)発現のフローサイトメトリー分析(B)、およびPSC由来心筋細胞培養物の典型的な形態(C)によって示されるように、心筋細胞が高い効力で生成された。

【図2A-B】フローサイトメトリーに基づく抗体スクリーニングにより、CMマーカー

50

アルファアクチニンまたはトロポニンTとの発現の重複がほとんどないことによって示されるように、非心筋細胞のいくつかの表面マーカーを同定した。さらに、これらのマーカーは、CD56との共発現を示す。それぞれのマーカーのドットプロットが、この図中に示される(図2A、図2B)。

【図3A-B】フローサイトメトリーに基づく抗体スクリーニングにより、それぞれの表面マーカーとCMマーカーアルファアクチニンまたはトロポニンTの発現が重複することによって示されるように、心筋細胞のいくつかの表面マーカーを同定した。それぞれのマーカーのドットプロットが、この図中に示される(図3A、図3B)。

【図4】抗体に基づく表面マーカー分析により、いくつかの以前に報告された非心筋細胞表面マーカーと、アルファアクチニンまたはトロポニンTのような心筋細胞マーカーとの共発現を同定した。したがって、これらの表面マーカーは非心筋細胞の除去に適していない。

10

【図5】CD140bに対する抗体を使用して非心筋細胞を磁気で枯渇化させることによってPSC由来心筋細胞を濃縮することは、心筋細胞含量を、オリジナル画分中のおよそ37%から心筋細胞濃縮画分中のおよそ48%にしか濃縮することができないことから、不十分である。心筋細胞は、心臓トロポニンT(cTnT)に対する抗体によって標識される。

【図6】細胞表面マーカー(a)Sirpa(CD172a)または(b)VCAM-1(CD106)に対する抗体を使用する磁気分離によるPSC由来心筋細胞の濃縮。抗Sirpaに基づく分離により、CMがおよそ17%からおよそ31%に濃縮され、抗VCAM-1に基づく分離により、CMがおよそ12%からおよそ34%に濃縮される。心筋細胞は、トロポニンTに対する抗体によって標識される。

20

【図7】非心筋細胞の除去のための、CD140b、CD141およびCD10に対する抗体を使用する磁気細胞分離による心筋細胞の精製、すなわち、心筋細胞精製のための1ステップ手順についての2つの例。ドットプロットは、心筋細胞、すなわち、心臓トロポニンT(cTnT)陽性細胞が、オリジナル画分中のおよそ66%またはおよそ22%から、それぞれおよそ96%およびおよそ92%の純度に濃縮されることを示す。

【図8】引き続き非心筋細胞の枯渇化、および磁気細胞分離による心筋細胞の濃縮、すなわち、心筋細胞精製のための2ステップ手順による心筋細胞精製についての2つの例。ドットプロットは、心筋細胞(すなわち、心臓トロポニンT(cTnT)陽性細胞)が、それぞれ、オリジナル画分中のおよそ59%、またはおよそ27%から、およそ95%、およびおよそ92%の純度に濃縮されることを示す。

30

【図9】MACSQuant Tyto(登録商標)(Miltenyi Biotec)を使用する、フローサイトメトリーに基づくセルソーティングによる心筋細胞精製についての1つの例。そのために、非筋細胞マーカーとしてCD10/CD141/CD140bおよび心筋細胞マーカーとしてCD56の組合せを使用した。CD56単陽性細胞集団を選択してソーティングした。ドットプロットは、心筋細胞、すなわち、心臓トロポニンT(cTnT)陽性細胞が、オリジナル画分中のおよそ29%からおよそ96%に、またはおよそ30%の心臓トロポニンT(cTnT)陽性細胞から出発しておよそ98%の純度に濃縮されることを示す。

40

【図10】心臓トロポニンT(cTnT)発現を、オリジナル画分(A)、非心筋細胞の除去後の心筋細胞濃縮画分(B)、ならびに非心筋細胞の除去および心筋細胞の濃縮後の心筋細胞濃縮画分(C)において分析した。細胞の核は、Dapiで標識されている。

【図11】A)精製およびリプレーティングした後の、心筋細胞によるカルシウム感受性色素Fluo8の取り込みにより、心筋細胞機能が証明される。B)精製およびリプレーティングした心筋細胞は、典型的な形態を示す。

【図12】精製された心筋細胞のフローサイトメトリー分析により、アルファアクチニン、ミオシン重鎖、およびトロポニンTのような、心筋細胞特異的マーカーの発現が明らかにされ、真の心筋細胞の濃縮が示される。トロポニンT陽性集団内のMLC2aおよびMLC2vの発現は、異なる心筋細胞サブポピュレーションの存在を示す。

50

【図 1 3 A - F】P S C 由来心筋細胞のフローサイトメトリー分析により、アルファアクチニンまたはトロポニン T 発現心筋細胞の集団内のいくつかの表面マーカーの発現が明らかにされた。それぞれの細胞内心筋細胞マーカー（アルファアクチニンおよびトロポニン T）との共発現の比に基づいて、表面マーカーは、A：群 1：80～95% C M 標識；B：群 2：60～80% C M 標識；C：群 3：40～60% C M 標識；D：群 4：25～40% C M 標識；E および F：群 5：10～25% C M 標識の 5 群に細分される。

【図 1 4 A - F】図 1 4 A、図 1 4 B、図 1 4 C、図 1 4 D、図 1 4 E および図 1 4 F は、P S C 由来心筋細胞の精製に使用することができる潜在的なマーカー組合せを示す。全てのマーカー組合せは、特異的な心臓マーカー c T N T との共発現をほんのわずかでも示さないが、c T N T 陰性集団とは強い共発現を示す。これによって、それらは非心筋細胞の効率の高い枯渇化に適したマーカーとして認定される。さらに、マーカー組合せは C D 5 6 と共発現され、C D 5 6 に対する抗体を使用する心筋細胞の濃縮前にそれらの細胞を除去する必要性を示している。全てのドットプロットにおいて、単陽性 C D 5 6 心筋細胞集団は、二重陽性 C D 5 6 / 非心筋細胞マーカー陽性集団から明らかに区別可能である。それが理由で、単陽性心筋細胞集団は、高度に純粋な心筋細胞集団を取得するために容易にソーティングすることができる。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明者らは、Z h a n g 等（2015）などの当業者に公知の方法によって多能性および / または複能性幹細胞を心筋細胞に分化させることに由来する心筋細胞の精製のための、人手によるならびに自動化および標準化された新規のプロセスを開発した。詳細について図 1 を参照されたい。精製プロセスは、表面マーカースクリーニングにおいて同定された、非心筋細胞マーカー（方法のステップ 1）に対する抗体（複数の抗体）の組合せ、および心筋細胞マーカー（方法の任意選択のステップ 2）に対する単一の抗体または抗体の組合せに基づいており（図 2 および図 3）、1 または 2 ステップの細胞分離手順のいずれかとなる。非心筋細胞または心筋細胞に対して特異的な以下の抗原を同定した：

【0021】

（i）非心筋細胞マーカー（図 2）：

・ C D 1 0、C D 4 4、C D 1 0 5、C D 1 4 0 b、C D 6 1、C D 1 4 1、C D 5 1 / 6 1

（i i）心筋細胞マーカー（図 3）：

・ P T K 7、C D 9 9、C D 2 7 6、C D 5 6、C D 5 9、C D 1 4 7、C D 2 3 9、C D 2 9 8、C D 4 9 f、C D 2 6 2、C D 8 1、T r a - 1 - 8 5、C D 4 9 e、C D 2 4、C D 4 7、C D 4 6、C D 4 9 c、C D 5 1、C D 2 9、C D 9 8、C D 6 3、C D 1 4 6 c、C D 1 5 1

【0022】

驚くべきことに、本発明者らのデータは、C D 9 0、C D 3 1 および C D 4 9 a のような、非心筋細胞に関する以前に報告されたマーカー（D u b o i s 等、2011）が、アルファアクチニンまたは心臓トロポニン T のような、心筋細胞マーカーと共発現されることを示す。この観察は分化時点、使用される幹細胞クローンおよび分化効率に依存し、このため、これらのマーカーは非心筋細胞の選択的な除去による効率的な標準化された C M 精製に適していない（図 4）。さらに、本発明者らは、非心筋細胞の以前に報告されたマーカー（すなわち、C D 1 4 0 b（D u b o i s 等、2011））に対する抗体が、非心筋細胞の除去による心筋細胞の精製に十分であるかどうかを試験した。本発明者らのデータは、約 37% の初期 C M 含量が、C D 1 4 0 b 陽性非心筋細胞の磁気による枯渇化後におよそ 48% の純度にしか増加させることができないこと（図 5）から、C D 1 4 0 b に対する抗体を使用するだけでは心筋細胞を十分に濃縮することができないことを示している。さらに、C D 1 4 0 b に基づく非心筋細胞枯渇化ステップの後に P S C 由来心筋細胞の排他的な精製を可能にし得る、心筋細胞表面マーカーに対する抗体は見出されなかった。さらに、C D 1 4 0 b を発現する細胞の量は、変動し、分化効率、プロトコールおよび

10

20

30

40

50

幹細胞クローンに依存し、それによって、CD140b単独は、PSC由来非筋細胞の除去に適したマーカーではないことが示される。

【0023】

予想外なことに、VCAM-1のような、筋細胞に関する以前に報告された表面マーカーは、筋細胞のサブピュレーションまたは筋細胞および非筋細胞のサブピュレーションだけを標識し(Sirpa)、したがって、多能性幹細胞の心血管分化からの筋細胞の精製に適していないことを本発明者らは見出した(図6)。

【0024】

以前に報告されたマーカーは筋細胞の精製に適しておらず、本発明者らのスクリーニングではPSC由来筋細胞だけに発現される表面マーカーの同定につながらなかったの
10
で、本発明者らは、1または2ステップ手順に基づく筋細胞の精製のための新しい方法を開発した。驚くべきことに、新しい方法は、出発ヒトPSCクローン、使用される分化プロトコル、または分離の時点(図7~図11)に関わらず、機能する。プロセスには、第1のステップにおける非筋細胞の除去、および任意選択で筋細胞濃縮ステップが含まれ、98%までの純度、および非常に良好な回収率(80%まで)で筋細胞が供給される。

【0025】

本発明者らのフローサイトメトリーに基づくスクリーニングは、本明細書で開示されて
20
いる方法において使用することができる、非筋細胞の7つの抗原に対する抗体を同定し、これら抗体またはその抗原結合断片のうちの2つは、非筋細胞を枯渇化させ、それによって、筋細胞を濃縮するのに十分であり得る。本明細書で開示されている非筋細胞の枯渇化のための2つの抗体またはその断片のそのような組合せは：

抗CD10および抗CD105、抗CD10および抗CD140b、抗CD10および抗CD61、抗CD10および抗CD44、抗CD10および抗CD141、抗CD10および抗CD51/61、抗CD105および抗CD140b、抗CD105および抗CD61、抗CD105および抗CD44、抗CD105および抗CD141、抗CD105および抗CD51/61、抗CD140bおよび抗CD61、抗CD140bおよび抗CD44、抗CD140bおよび抗CD141、抗CD140bおよび抗CD51/61、抗CD61および抗CD44、抗CD61および抗CD141、抗CD61および抗CD51/61、抗CD44および抗CD141、抗CD44および抗CD51/61、また
30
は抗CD141および抗CD51/61であってもよい。これらの2つの抗体またはその抗原結合断片の組合せの各々は、前記7つのマーカーの1つまたは複数の追加のマーカーによって補充されてもよい(図14)。3つの抗体またはその抗原結合断片の好ましい組合せは、CD140b、CD10およびCD141であってもよい。しかし、抗CD10、抗CD105、抗CD140b、抗CD61、抗CD44、抗CD141、および抗CD51/61からなる群から選択される3つの抗体またはその抗原結合断片のあらゆる他の組合せも、本明細書で開示されている枯渇化に好適である(図14)。非筋細胞の1
40
ステップの枯渇化か、または第2のステップ、例えば、CD56に対する抗体での筋細胞の濃縮との組合せのいずれかにより、98%までのPSC由来筋細胞の精製が可能である。2ステップ手順には、抗CD10、抗CD105、抗CD140b、抗CD61、抗CD44、抗CD141、および抗CD51/61からなる群から選択される複数の抗体またはその抗原結合断片(例えば、CD140b、CD141、CD10に対する抗体)での事前の枯渇化ステップ、次いで、筋細胞の抗原に特異的な少なくとも1つの抗体またはその断片を使用して筋細胞を濃縮することが含まれ、前記少なくとも1つの抗体またはその断片は、抗PTK7、抗CD99、抗CD276、抗CD56、抗CD59、抗CD147、抗CD239、抗CD298、抗CD49f、抗CD262、抗CD81、抗Tra-1-85、抗CD49e、抗CD24、抗CD47、抗CD46、抗CD49c、抗CD51、抗CD29、抗CD98、抗CD63、および抗CD146c、抗CD151からなる群から選択される。例えば、前記抗体またはその抗原結合断片は、抗CD56抗体またはその抗原結合断片であってもよい(図8)。

10

20

30

40

50

【0026】

抗CD56抗体またはその抗原結合断片は、本明細書で開示されている方法のステップ2において心筋細胞の濃縮を陽性とするために好ましい抗体またはその抗原結合断片であってもよい。表面マーカースクリーニングによって同定され、心筋細胞濃縮ステップに使用された、候補から選択されたマーカーCD56は、心筋細胞に排他的に発現されないで、CD56に対する抗体による高い純度への心筋細胞の濃縮は、全てのCD56陽性非心筋細胞の効率的な除去後にのみ可能である。抗体の抗CD140b、抗CD10および抗CD141の組合せは、CD56陽性非心筋細胞の必要とされる除去を達成した。精製プロトコルの標準化には、分化効率および表面マーカー発現の効率的な適用範囲での変動が必要とされる。CD140b、CD10およびCD10に対する抗体を含めることは、非心筋細胞を標識するための抗体組合せの1つの選択であり、心筋細胞精製プロトコルの標準化を可能にし、すなわち、マーカー発現または分化効力の変動に関わらず、同様の純度が得られる。したがって、予想外なことに、抗体の組合せが、分化効率、幹細胞クローンおよび分化プロトコルに関わらず、PSC由来心筋細胞の標準化された精製を可能にすることにより、この精製戦略が、性能のロバスト性により再生医学への適用に適したものになる。非心筋細胞を除去するための、同様に有効な戦略は、いまだどこにも報告されていない。

10

【0027】

重要なことに、前述の手順は、例えば、autoMACS（登録商標）ProまたはCliniMACS（登録商標）Prodigy（両方ともMiltenyi Biotec GmbH）を使用する、人手による磁気細胞分離手順にも、自動化された細胞分離手順にも適用可能であり、それによって、細胞分離手順のスケールアップを可能にし、心筋細胞の自動化された生成を閉鎖系における心筋細胞の自動化された精製に直接的に連結する。さらに、この組合せに限定されないがCD140b、CD141およびCD10であることが好ましい、非心筋細胞の枯渇化のための表面マーカー、ならびにこれに限定されないがCD56であることが好ましい心筋細胞濃縮のための表面マーカーに対する抗体の同じ組合せを使用して、例えば、MACSQuant Tyto（登録商標）（Miltenyi Biotec GmbH）を使用する蛍光活性化セルソーティングによって心筋細胞を濃縮することができることを本発明者らは見出した（図9）。これらのデータにより、抗体の同様のセットを使用する、磁気およびフローサイトメトリーに基づくセルソーティング手順の両方が、再現性をもって心筋細胞を精製するために適用することができることが証明される。

20

30

【0028】

重要なことに、選択される戦略に関わりなく、本明細書で記載された全ての分離手順により、高度に純粋で機能的な心筋細胞が得られ、すなわち、濃縮された心筋細胞を良好にプレーティングし、プレーティング後24時間以内に収縮を開始し、培養において安定に維持することができた。心筋細胞の濃縮ならびに濃縮後のプレーティングの成功およびサルコメア構造は、オリジナル画分、枯渇化後の心筋細胞濃縮画分、ならびに非心筋細胞の枯渇化、および心筋細胞に関する濃縮後の純粋な心筋細胞集団におけるトロポニンT発現の免疫蛍光分析によって追加的に示すことができた（図10）。濃縮された心筋細胞は典型的な形態を示し、カルシウム感受性色素での標識は、典型的なCa²⁺流が観察されたことから精製された心筋細胞の機能性を示した（図11）。さらに、単離手順は、細胞療法の必須の前提条件である、残留する多能性幹細胞の完全な除去を可能にする。そのような精製された心筋細胞をサブポピュレーションへとさらに分離することは、本明細書で記載された同様の細胞分離技術、および以下に記載される心筋細胞サブポピュレーションマーカーに対する新規抗体を使用することで可能である。

40

【0029】

濃縮された心筋細胞のフローサイトメトリー分析により、ミオシン重鎖、アルファアクチニンおよびトロポニンTのような、心筋細胞特異的マーカーの発現が示され、真の心筋細胞の濃縮が示される。トロポニンT陽性集団内のMLC2a（「心房性/未成熟心筋細胞

50

胞」)およびMLC2v(「心室性/成熟心筋細胞」)の発現は、異なる心筋細胞サブポピュレーションの存在を示す(図12)。また、前述の表面マーカーのスクリーニングにより、PSC由来心筋細胞サブポピュレーションの標識に適したいくつかの表面マーカーが明らかにされ(図13)、それによって、CMサブポピュレーションの定量、さらにはCMサブポピュレーションの単離が可能となった。

【0030】

心筋細胞を、心筋細胞特異的筋肉タンパク質(心臓アルファアクチニンまたはトロポニンT)に対するモノクローナル抗体で検出した。濃縮された心筋細胞、または心筋細胞および非心筋細胞の混合物を、ヒト表面エпитープに対する抗体で同時に染色した。驚くべきことに、フローサイトメトリー分析は、いくつかの抗体が心筋細胞サブポピュレーションを検出することを明らかにしたが、それぞれの抗原が、hPSC由来CMサブポピュレーションに発現されていることについては以前には報告されていなかった。したがって、本発明のさらなる態様は、心筋細胞サブタイプの分析および単離のための方法を提供する。

10

【0031】

本明細書で開示されている方法の多能性および/または複能性幹細胞(ステップa)を含む出発細胞組成物から由来する心筋細胞は、心筋細胞のサブポピュレーションの抗原に特異的な少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片で標識されてもよく、前記少なくとも1つの抗体またはその断片は、抗PTK7、抗CD81、抗CD276、抗CD239、抗CD298、抗CD49c、抗CD200、抗CD230、抗CD324、抗ROR1、抗CD146、抗CD317、抗CD49a、抗CD43、抗CD111、抗CD201、抗CD138、抗CD271、抗CD222、抗CD82、抗CD44、抗CD90、抗CD95、抗CD142、抗Nctch-2、抗KIR-2D、抗CD197、抗CD240DCE、抗CD184、抗ASCA-1(GLAST)、抗CCR10、抗CDIR、抗CD183、抗CD97、抗CD49b、抗CD134、抗CD13、抗fMLP、抗CD83、抗CD79b、抗CD5、抗CD74、および抗CD80からなる群から選択される。

20

【0032】

心筋細胞のサブポピュレーションの前記標識は、本明細書で開示されている方法のステップc)またはe)後に引き続いて実施されてもよい。または、非心筋細胞の枯渇化(ステップc)および心筋細胞のサブポピュレーションの濃縮は、同時に実施されてもよい。

30

【0033】

本発明の好ましい実施形態において、心筋細胞のサブポピュレーションの抗原に特異的な前記少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片は、厳密に抗PTK7、抗CD81、抗CD276、抗CD239、抗CD298、抗CD49c、抗CD200、抗CD230、抗CD324、抗ROR1、抗CD146、抗CD317、抗CD49a、抗CD43、抗CD111、抗CD201、抗CD138、抗CD271、抗CD222、抗CD82、抗CD44、抗CD90、抗CD95、抗CD142、抗Nctch-2、抗KIR-2D、抗CD197、抗CD240DCE、抗CD184、抗ASCA-1(GLAST)、抗CCR10、抗CDIR、抗CD183、抗CD97、抗CD49b、抗CD134、抗CD13、抗fMLP、抗CD83、抗CD79b、抗CD5、抗CD74、および抗CD80からなる群から選択される1つの抗体またはその断片である。

40

【0034】

前記群から選択される心筋細胞のサブポピュレーションの抗原に特異的な1つの抗体またはその抗原結合断片の使用は、心筋細胞サブポピュレーションを同定し単離するのに十分である。

【0035】

それぞれの表面マーカーと細胞内心筋細胞マーカー(アルファアクチニンまたはトロポニンT)の共発現に応じて、表面マーカーは、様々な群に細分される(図13)：

【0036】

50

それぞれの表面マーカーと心筋細胞マーカーの共発現（％）：

群 1、80～95％：PTK7、CD81、CD276、CD239、CD298、CD49c（図13A）

群 2、60～80％：CD200、CD230、CD324、ROR1、CD146、CD317、CD49a（図13B）

群 3、40～60％：CD43、CD111、CD201、CD138、CD271、CD222、CD82（図13C）

群 4、25～40％：CD44、CD90、CD95、CD142、Notch-2（図13D）

群 5、10～25％：KIR-2D、CD197、CD240DCE、CD184、ASC A-1（GLAST）、CCR10、CDIR、CD183、CD97、CD49b、CD134、CD13、fMLP、CD83、CD79b、CD5、CD74、CD80（図13Eおよび13F）

【0037】

したがって、本明細書で列挙された全ての表面マーカーは、心筋細胞サブポピュレーションを同定、定量および精製するために使用することができる。各サブポピュレーションの機能性は、下流の実験、特に細胞置換療法のために現在使用される心筋細胞の混合物をしのぐ可能性がある。これらのマーカーは、様々な発生段階の細胞、または様々なタイプの心筋細胞を標識することもでき、したがって、様々なサブポピュレーションが、他のものよりも良好に心臓に一体化し得ることから、これらのマーカーの発現は移植において重要な役割を果たし得る。それが理由で、これらのマーカーは、細胞療法などのための心筋細胞サブポピュレーションの精製のための類似の技術（磁気またはフローサイトメトリーに基づく細胞分離）を使用した、当業者に公知の心筋細胞分化プロトコールによって生成されたPSC由来心筋細胞およびサブポピュレーションの品質管理および選択の両方に適している。

【0038】

一態様において、本発明は、多能性および／または複能性幹細胞を含む出発細胞組成物に由来する心筋細胞の生成、単離、検出および／または分析のための方法であって、

a) 前記多能性および／または複能性幹細胞を心血管細胞に分化させ、それによって、心筋細胞および非心筋細胞を含むサンプルを生成するステップ；

b) 前記サンプルの非心筋細胞を、非心筋細胞の抗原に特異的な複数の抗体またはその抗原結合断片で標識するステップであって、前記複数の抗体またはその抗原結合断片は、抗CD10、抗CD44、抗CD105、抗CD140b、抗CD61、抗CD141、および抗CD51/61からなる群から選択されるステップ；

c) 標識された前記非心筋細胞を前記サンプルから枯渇化させるステップを含む方法を提供する。

【0039】

前記方法において、前記サンプルの前記非心筋細胞は、非心筋細胞の抗原に特異的な2、3、4、5、6または7つの抗体またはその抗原結合断片で標識され、前記2、3、4、5、6または7つの抗体またはその抗原結合断片は、抗CD10、抗CD44、抗CD105、抗CD140b、抗CD61、抗CD141、および抗CD51/61からなる群から選択される；

【0040】

前記方法において、前記非心筋細胞は、2つの抗体またはその抗原結合断片で標識され、前記2つの抗体またはその抗原結合断片は、抗CD10および抗CD105、抗CD10および抗CD140b、抗CD10および抗CD61、抗CD10および抗CD44、抗CD10および抗CD141、抗CD10および抗CD51/61、抗CD105および抗CD140b、抗CD105および抗CD61、抗CD105および抗CD44、抗CD105および抗CD141、抗CD105および抗CD51/61、抗CD140bおよび抗CD61、抗CD140bおよび抗CD44、抗CD140bおよび抗CD14

10

20

30

40

50

1、抗CD140bおよび抗CD51/61、抗CD61および抗CD44、抗CD61および抗CD141、抗CD61および抗CD51/61、抗CD44および抗CD141、抗CD44および抗CD51/61、または抗CD141および抗CD51/61である。

【0041】

前記方法において、前記非心筋細胞は、3つの抗体またはその抗原結合断片で標識され、前記抗体またはその抗原結合断片は、抗CD140b、抗CD141および抗CD10である。

【0042】

前記方法において、非心筋細胞の抗原に特異的な前記複数の抗体またはその抗原結合断片は、タグにカップリングされている。

10

【0043】

前記枯渇化は、磁気細胞分離によってまたは蛍光活性化セルソーティングによって実施されてもよい。

【0044】

前記方法において、枯渇化ステップc)は、磁気細胞分離によって実施されてもよく、前記タグは磁気粒子であってもよい、または蛍光活性化セルソーティングによって実施されてもよく、前記タグはフルオロフォアであってもよい。

【0045】

前記方法は、追加のステップ：

20

d) 前記サンプルの心筋細胞を、心筋細胞の抗原に特異的な少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片で標識するステップであって、前記少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片は、抗PTK7、抗CD99、抗CD276、抗CD56、抗CD59、抗CD147、抗CD239、抗CD298、抗CD49f、抗CD262、抗CD81、抗Tra-1-85、抗CD49e、抗CD24、抗CD47、抗CD46、抗CD49c、抗CD51、抗CD29、抗CD98、抗CD63、抗CD146cおよび抗CD151からなる群から選択される、ステップ；

e) 標識された前記心筋細胞を濃縮するステップ
を含み得る。

30

【0046】

心筋細胞に特異的な前記少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片は、抗CD56であってもよい。

【0047】

前記方法において、心筋細胞の抗原に特異的な前記少なくとも1つの抗体またはその断片は、タグにカップリングされてもよい。

【0048】

標識された心筋細胞の前記濃縮は、磁気細胞分離によってまたは蛍光活性化セルソーティングによって実施されてもよい。

【0049】

前記方法において、濃縮ステップe)は、磁気細胞分離によって実施されてもよく、前記タグは磁気粒子であってもよい、または蛍光活性化セルソーティングによって実施されてもよく、前記タグはフルオロフォアであってもよい。

40

【0050】

前記枯渇化および前記濃縮の両方は、磁気細胞分離によって実施されてもよい、あるいは前記枯渇化および前記濃縮の両方は、蛍光活性化セルソーティングによって実施されてもよい、またはさらに代替的に前記枯渇化は磁気細胞分離によって実施されてもよく、前記濃縮は蛍光活性化セルソーティングによって実施されてもよく、またはその逆でもよい。

【0051】

前記方法において、ステップは、ステップa)、ステップb)、ステップc)、ステッ

50

ブ d) およびステップ e) の順番で実施されてもよい。

【 0 0 5 2 】

ステップ a) から e) を含む前記方法において、ステップ a) から e) は、前記心筋細胞の単離または濃縮の成功を可能にする、任意の順番で実施されてもよい。

【 0 0 5 3 】

前記方法において、前記枯渇化 (ステップ c) および前記濃縮 (ステップ e) が同時に実施される場合、前記サンプルの心筋細胞の、少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片での前記標識 (ステップ d) は、ステップ a) の後 (かつステップ c) の前) に実施されてもよい。前記枯渇化 (ステップ c) および前記濃縮 (ステップ e) が同時に実施される場合、非心筋細胞の抗原に特異的な前記複数の抗体またはその抗原結合断片にカップリングされている前記タグと、心筋細胞の抗原に特異的な前記少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片にカップリングされている前記タグとは、区別可能な (または別個の) タグであってもよい。タグがフルオロフォアである場合、区別可能なタグは、例えば、FITC および APC であってもよい、またはタグが磁気粒子である場合、区別可能なタグは、例えば、MACS beads (商標) (Miltenyi Biotec GmbH) およびマイクロビーズ (登録商標) (Miltenyi Biotec GmbH) であってもよい。

10

【 0 0 5 4 】

前記方法において、非心筋細胞の標識 (ステップ b) および心筋細胞の標識 (ステップ d) が同時に実施される場合、非心筋細胞の抗原に特異的な前記複数の抗体またはその抗原結合断片にカップリングされている磁気粒子と、心筋細胞の抗原に特異的な前記少なくとも 1 つの抗体またはその断片にカップリングされている磁気粒子とは、区別可能な磁気粒子である、あるいは非心筋細胞の標識 (ステップ b) および心筋細胞の標識 (ステップ d) が同時に実施される場合、非心筋細胞の抗原に特異的な前記複数の抗体またはその抗原結合断片にカップリングされているフルオロフォアと、心筋細胞の抗原に特異的な前記少なくとも 1 つの抗体またはその断片にカップリングされているフルオロフォアとは、区別可能なフルオロフォアである。

20

【 0 0 5 5 】

あるいは、前記タグ (tag) またはタグ (tags) は、本明細書で開示される方法において使用される抗体の間接的な固定化が可能とする、ビオチンのようなハプテンなどの、磁気粒子またはフルオロフォア以外の他の分子であってもよい。前記タグが、区別可能なフルオロフォアである場合、少なくともステップ c) および e) は、蛍光活性化セルソーティングによって同時に実施されてもよい。あるいは、全てのステップは、引き続いて実施されてもよい。

30

【 0 0 5 6 】

ステップ a) から c) を含む前記方法において、方法は、ステップ c) の後に、追加のステップ :

I) ステップ c) の心筋細胞を、心筋細胞のサブポピュレーションの抗原に特異的な少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片で標識するステップであって、前記少なくとも 1 つの抗体またはその抗原結合断片は、抗 PTK7、抗 CD81、抗 CD276、抗 CD239、抗 CD298、抗 CD49c、抗 CD200、抗 CD230、抗 CD324、抗 ROR1、抗 CD146、抗 CD317、抗 CD49a、抗 CD43、抗 CD111、抗 CD201、抗 CD138、抗 CD271、抗 CD222、抗 CD82、抗 CD44、抗 CD90、抗 CD95、抗 CD142、抗 Notch-2、抗 KIR-2D、抗 CD197、抗 CD240DC E、抗 CD184、抗 ASCA-1 (GLAST)、抗 CCR10、抗 CDIR、抗 CD183、抗 CD97、抗 CD49b、抗 CD134、抗 CD13、抗 fMLP、抗 CD83、抗 CD79b、抗 CD5、抗 CD74、および抗 CD80 からなる群から選択される、ステップ ;

40

II) ステップ I) の標識された前記心筋細胞を濃縮し、それによって、心筋細胞のサブポピュレーションを濃縮するステップ

50

を含む。

【0057】

ステップa) からe) を含む前記方法において、方法はステップe) の後に、追加のステップ:

I) ステップe) の心筋細胞を、心筋細胞のサブポピュレーションの抗原に特異的な少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片で標識するステップであって、前記少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片は、抗PTK7、抗CD81、抗CD276、抗CD239、抗CD298、抗CD49c、抗CD200、抗CD230、抗CD324、抗ROR1、抗CD146、抗CD317、抗CD49a、抗CD43、抗CD111、抗CD201、抗CD138、抗CD271、抗CD222、抗CD82、抗CD44、抗CD90、抗CD95、抗CD142、抗Notch-2、抗KIR-2D、抗CD197、抗CD240DCE、抗CD184、抗ASCA-1 (GLAST)、抗CCR10、抗CDIR、抗CD183、抗CD97、抗CD49b、抗CD134、抗CD13、抗fMLP、抗CD83、抗CD79b、抗CD5、抗CD74、および抗CD80からなる群から選択される、ステップ;

II) ステップI) の標識された前記心筋細胞を濃縮し、それによって、心筋細胞のサブポピュレーションを濃縮するステップ

を含む。

【0058】

一般に、前記方法の分化ステップは、前記多能性および/または複能性幹細胞を心筋細胞に分化させることに適した任意の培地で実施されてもよい(本明細書で開示されている方法のステップa))。多能性/複能性幹細胞の心筋細胞への分化、ならびに心筋細胞および心筋細胞サブタイプの精製は、閉鎖系において自動化された形で実施されてもよい。多能性/複能性幹細胞の心筋細胞への分化に使用される好ましい閉鎖系は、Miltenyi BiotecからのCliniMACS(登録商標)prodigyであってもよい。

【0059】

別の態様において、本発明は、上記および本明細書で開示されている方法によって得られる心筋細胞の実質的に純粋な組成物を提供する。

【0060】

さらなる態様において、本発明は、上記および本明細書で開示されている方法によって得られる心筋細胞の組成物を含む医薬組成物を提供する。

【0061】

さらなる態様において、本発明は、心筋細胞のサブポピュレーションを含む実質的に純粋な組成物であって、前記サブポピュレーションが、PTK7、CD81、CD276、CD239、CD298、CD49c、CD200、CD230、CD324、ROR1、CD146、CD317、CD49a、CD43、CD111、CD201、CD138、CD271、CD222、CD82、CD44、CD90、CD95、CD142、Notch-2、KIR-2D、CD197、CD240DCE、CD184、ASCA-1 (GLAST)、CCR10、CDIR、CD183、CD97、CD49b、CD134、CD13、fMLP、CD83、CD79b、CD5、CD74、およびCD80からなる表面マーカーの群から選択される少なくとも1つの表面マーカー(抗原)の発現を含み、前記組成物が、多能性および/または複能性幹細胞を含む出発細胞組成物に由来する心筋細胞の濃縮のための方法によって得られ、前記方法が、

a) 前記ヒト多能性および/または複能性幹細胞を心血管細胞に分化させ、それによって、心筋細胞および非心筋細胞を含むサンプルを生成するステップ;

b) 前記サンプルの非心筋細胞を、非心筋細胞の抗原に特異的な複数の抗体またはその断片で標識するステップであって、前記複数の抗体またはその断片は、抗CD10、抗CD44、抗CD105、抗CD140b、抗CD61、抗CD141、抗CD171、および抗CD51/61からなる群から選択される、ステップ;

- c) 標識された前記非心筋細胞を前記サンプルから枯渇化させるステップ；
- d) ステップc)の心筋細胞を、心筋細胞の前記サブポピュレーションの抗原に特異的な少なくとも1つの抗体またはその断片で標識するステップであって、前記少なくとも1つの抗体またはその断片は、抗PTK7、抗CD81、抗CD276、抗CD239、抗CD298、抗CD49c、抗CD200、抗CD230、抗CD324、抗ROR1、抗CD146、抗CD317、抗CD49a、抗CD43、抗CD111、抗CD201、抗CD138、抗CD271、抗CD222、抗CD82、抗CD44、抗CD90、抗CD95、抗CD142、抗Notch-2、抗KIR-2D、抗CD197、抗CD240DCE、抗CD184、抗ASCA-1(GLAST)、抗CCR10、抗CDIR、抗CD183、抗CD97、抗CD49b、抗CD134、抗CD13、抗fMLP、抗CD83、抗CD79b、抗CD5、抗CD74、および抗CD80からなる群から選択される、ステップ；
- e) ステップd)の標識された前記心筋細胞を濃縮し、それによって、心筋細胞のサブポピュレーションの組成物を生成するステップを含む、実質的に純粋な組成物を提供する。

【0062】

心筋細胞の前記サブポピュレーションは、薬学的な使用のためであってもよい。

【0063】

別の態様において、本発明は、心筋細胞のサブポピュレーションの実質的に純粋な組成物であって、前記サブポピュレーションが、PTK7、CD81、CD276、CD239、CD298、CD49c、CD200、CD230、CD324、ROR1、CD146、CD317、CD49a、CD43、CD111、CD201、CD138、CD271、CD222、CD82、CD44、CD90、CD95、CD142、Notch-2、KIR-2D、CD197、CD240DCE、CD184、ASCA-1(GLAST)、CCR10、CDIR、CD183、CD97、CD49b、CD134、CD13、fMLP、CD83、CD79b、CD5、CD74、およびCD80からなる群から選択される少なくとも1つの表面マーカー(抗原)の発現を含み、前記組成物が、多能性および/または複能性幹細胞を含む出発細胞組成物に由来する心筋細胞の生成および単離のための方法によって得られ、前記方法が、

- a) 前記多能性および/または複能性幹細胞を心血管細胞に分化させ、それによって、心筋細胞および非心筋細胞を含むサンプルを生成するステップ；
- b) 前記サンプルの非心筋細胞を、非心筋細胞の抗原に特異的な複数の抗体またはその抗原結合断片で標識するステップであって、前記少なくとも1つの抗体またはその断片は、抗CD10、抗CD44、抗CD105、抗CD140b、抗CD61、抗CD141、抗CD171、および抗CD51/61からなる群から選択される、ステップ；
- c) 標識された前記非心筋細胞を前記サンプルから枯渇化させるステップ；
- d) 前記サンプルの心筋細胞を、心筋細胞の抗原に特異的な少なくとも1つの抗体またはその断片で標識するステップであって、前記少なくとも1つの抗体またはその断片は、抗PTK7、抗CD99、抗CD276、抗CD56、抗CD59、抗CD147、抗CD239、抗CD298、抗CD81、抗CD49f、抗CD262、抗CD81、抗Tra-1-85、抗CD49e、抗CD24、抗CD47、抗CD46、抗CD49c、抗CD51、抗CD29、抗CD98、抗CD63、抗CD146cおよび抗CD151からなる群から選択される、ステップ；

- e) 標識された前記心筋細胞を濃縮するステップ；
- f) ステップe)の心筋細胞を、心筋細胞の前記サブポピュレーションの抗原に特異的な少なくとも1つの抗体またはその断片で標識するステップであって、前記少なくとも1つの抗体またはその断片は、抗PTK7、抗CD81、抗CD276、抗CD239、抗CD298、抗CD49c、抗CD200、抗CD230、抗CD324、抗ROR1、抗CD146、抗CD317、抗CD49a、抗CD43、抗CD111、抗CD201、抗CD138、抗CD271、抗CD222、抗CD82、抗CD44、抗CD90、

抗CD95、抗CD142、抗Notch-2、抗KIR-2D、抗CD197、抗CD240DCE、抗CD184、抗ASCA-1(GLAST)、抗CCR10、抗CDIR、抗CD183、抗CD97、抗CD49b、抗CD134、抗CD13、抗fMLP、抗CD83、抗CD79b、抗CD5、抗CD74、および抗CD80からなる群から選択される、ステップ；

g) ステップf)の標識された前記心筋細胞を濃縮し、それによって、心筋細胞のサブポピュレーションの組成物を生成するステップを含む、実質的に純粋な組成物を提供する。

【0064】

実施形態

PSC由来心筋細胞の精製のための方法は、MACS(登録商標)細胞分離技術(Miltenyi Biotec GmbH)を使用する磁気細胞分離によって例示された：

【0065】

PSC由来心筋細胞の単離の出発点は、ヒトPSCの心血管分化から典型的に得られる、PSC由来心筋細胞および非心筋細胞の混合細胞集団である。分化プロセスは、図1に示されるように実施されてもよい。

【0066】

ヒト多能性幹細胞(PSC)由来心筋細胞の磁気単離は、1または2ステップ手順において実施される。第1に、非心筋細胞を、非心筋細胞マーカー(例えば、CD140b、CD141、CD10)に対する抗体の組合せ(複数の抗体)で磁氣的に標識し、引き続いて、MACS(登録商標)Separator(Miltenyi Biotec GmbH)の磁場に置いたMACS(登録商標)カラム(Miltenyi Biotec GmbH)による分離によって枯渇化させる。

【0067】

第2ステップにおいて、PSC由来心筋細胞を、心筋細胞マーカー(例えば、CD56)に対する少なくとも1つの抗体で磁氣的に標識し、MACS(登録商標)Separator(Miltenyi Biotec)の磁場に置いたMACS(登録商標)カラム(Miltenyi Biotec)による分離によって、事前に濃縮されたPSC由来心筋細胞画分からの陽性選択によって単離する。

【0068】

磁場からカラムを取り除いた後、磁氣的に保持しているPSC由来心筋細胞を、陽性選択された細胞画分として溶出することができる。磁気によるCM(心筋細胞)濃縮は、例えば、autoMACS(登録商標)Pro(Miltenyi Biotec GmbH)、ならびに閉鎖系、例えば、CliniMACS(登録商標)Prodigy(Miltenyi Biotec GmbH)を使用して自動化された形で実施することもできる。

【0069】

MACS(登録商標)技術以外の他の磁気細胞分離システムを使用してもよい。本明細書でほんの一例として使用されるMACS(登録商標)技術に磁気細胞分離プロセスを制限することは意図していない。

【0070】

PSC由来心筋細胞の精製のための方法は、MACS(登録商標)Quant Tyeo(Miltenyi Biotec GmbH)を使用する蛍光活性化セルソーティング技術によって例証された：

蛍光活性化セルソーティング(FACS)では、1または2ステップソーティング手順が可能である。PSC由来心筋細胞および非心筋細胞は、異なるフルオロフォアを使用して、非心筋細胞マーカー(例えば、CD140b、CD141、CD10)に対する抗体および心筋細胞表面マーカー(例えば、CD56)に対する抗体の組合せで標識される。心筋細胞表面マーカーについて陽性であり、非心筋細胞マーカーについて陰性である心筋細胞は、次いで、閉鎖型の無菌システムにおけるセルソーティングも可能にする、MA

10

20

30

40

50

C S (登録商標) Q u a n t T y t o (M i l t e n y i B i o t e c G m b H)
などのフローサイトメーターを使用してソーティングすることができる。

【 0 0 7 1 】

精製された心筋細胞は、選択した分離戦略に関わらず、効率的にプレーティングされ、培養においてリプレーティング後に接触を開始する。M A C S (登録商標) Q u a n t T y t o (M i l t e n y i B i o t e c G m b H) 以外の他の蛍光活性化セルソーティングシステムも、使用してもよい。本明細書でほんの一例として使用されるM A C S (登録商標) Q u a n t T y t o に、磁気細胞分離プロセスを制限することは意図していない。

【 0 0 7 2 】

閉鎖系におけるP S C由来心筋細胞の精製のための方法：

本明細書中、本発明の方法を、閉鎖され、優先的には自動化されたシステムにおいて実施して、濃縮された心筋細胞をG M PまたはG M P様条件下で生成することができることも開示される。予想外なことに、本発明の方法は、前記閉鎖系を使用する自動化されたプロセスにおいて利用しやすいことが見出された。

【 0 0 7 3 】

本発明の方法によって得られる組成の細胞は、例えば、冠状動脈性心疾患のような、心筋細胞の損失と関連する心臓疾患に罹患している患者における、心筋細胞の損失によって引き起こされる症状を軽快または好転させる治療処置として、患者に対する細胞置換療法に使用してもよい。

【 0 0 7 4 】

本発明の一実施形態において、前記方法は、自動化された方法（プロセス）である。方法は、（１）P S C由来心筋細胞の生成、ならびに（２）閉鎖系における心筋細胞および心筋細胞サブポピュレーションの精製を含む。

【 0 0 7 5 】

心血管分化プロトコルを閉鎖系に移行させるには、それぞれの分化の安定的な性能およびスケーラビリティが必要とされる。心筋細胞精製プロトコルの標準化には、分化効率および表面マーカー発現の有効な適用範囲での変動が必要とされる。したがって、使用される分化プロトコルもしくは幹細胞株または分化の時点に関わらず、例えば、非心筋細胞の除去のための抗体カクテル抗C D 1 4 0 b、抗C D 1 4 1および抗C D 1 0、ならびに、例えば、心筋細胞のさらなる濃縮のための抗C D 5 6抗体のロバスト性能は、閉鎖系における標準化されたプロセスを保証する。抗C D 4 9 a、抗C D 9 0および抗C D 3 1のような、非心筋細胞マーカーに対する他の以前に報告された抗体組合せ（図４）は、非心筋細胞に制限されず、または単独で使用される場合（抗C D 1 4 0 b、図５）も、非心筋細胞のサブポピュレーションだけを標識し、したがって、心筋細胞の高い精製を保証する、閉鎖され、自動化されたシステムにおける使用に適していない。さらに、C D 5 6に対する抗体だけによる心筋細胞の濃縮は、C D 5 6が非心筋細胞にも発現されることが公知であることから、不十分であり、したがって、第１のステップにおいてC D 5 6陽性非心筋細胞の除去が必要とされる。したがって、本明細書で開示される抗体組合せは、閉鎖され自動化された心筋細胞生成および精製手順に適している。さらに、本明細書で開示される方法によって供給される心筋細胞からの心筋細胞サブポピュレーションの選択的な濃縮により、閉鎖系における心筋細胞集団のさらなる純化が可能となる。

【 0 0 7 6 】

したがって、多能性細胞または非心筋細胞が混入していない、より良く規定された細胞組成をもたらす全てのステップは、心血管疾患の処置のための潜在的な細胞産物などの細胞組成物の臨床への適用の安全性および有効性を高めるのに寄与する。

【 0 0 7 7 】

そのような閉鎖系は、ほとんどの、優先的には全てのステップを自動化された形で実施することが可能となり得る。例として、C l i n i M A C S P r o d i g y (登録商標) (M i l t e n y i B i o t e c G m b H , G e r m a n y) が、自動化されたプ

10

20

30

40

50

ロセスを実装された、閉鎖細胞サンプルプロセッシングシステムとして本明細書で使用されている。このシステムは、WO 2009/072003に詳細に開示されている。しかし、本発明の方法の使用を、CliniMACS Prodigy（登録商標）（Miltenyi Biotec GmbH、Germany）に制限することは意図していない。

【0078】

定義

別段の規定がない限り、本明細書で使用する技術および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって一般に理解される意味と同一である。

【0079】

本明細書で使用される用語「多能性幹細胞（PSC）」は、自己複製し、胚性胚葉の内胚葉、中胚葉および外胚葉、ならびにそれに由来する細胞のいずれかに分化する潜在能力を有することが可能な細胞を指す。これらの特徴は、胚性幹細胞（ESC）および誘導多能性幹細胞（iPSC）にも当てはまる。優先的には、これらの細胞は、ヒトである。ヒト胚性幹細胞を、例えば、WO 03/046141に開示されているように、破壊することなく胚から単離することができる。多能性の程度が異なることは、当技術分野において公知であり、「プライム型」の多能性幹細胞、「ナイーブ型」の多能性幹細胞、または「リセット段階」の多能性幹細胞と呼ばれる。

【0080】

本明細書で使用される用語「人工多能性幹細胞（iPSC）」は、分化能が低くなった細胞、すなわち、より分化した細胞、典型的には体細胞から多能性の状態に変換することによって生成された多能性細胞を指し、生じた細胞は、自己複製し、胚性胚葉の内胚葉、中胚葉および外胚葉、ならびにそれに由来する細胞のいずれかに分化する潜在能力を有することが可能である。

【0081】

本明細書で使用される用語「複能性幹細胞」は、限定されるが複数の細胞型に分化する能力を有する前駆細胞を指す。

【0082】

本明細書で使用される用語「分化」は、発生生物学において使用される用語である細胞分化を指し、特殊化していない細胞がより特殊化した細胞型になるプロセスを表す。インビトロでは、幹細胞の分化は、自発的に起こり得るか、または特殊な培養培地、サイトカイン、受容体アンタゴニストまたは小分子などの分化誘導因子を培養培地に添加することによって意図的に誘導される。「0日」は、分化の開始日を示す。分化プロセスは、操作者が望む限り持続してもよく、細胞培養培地が細胞を生存および/または成長および/または増殖させる条件を有する限り実施することができる。

【0083】

本明細書で使用される用語「出発細胞組成物」は、多能性および/または複能性幹細胞ならびに他の細胞を任意の比で含むサンプル、またはサンプル中の前記多能性または複能性幹細胞と他の細胞との混合物を指す。優先的には、前記出発細胞組成物は、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%までの多能性または複能性幹細胞である細胞を含む。優先的には、出発細胞組成物は、多能性および/または複能性幹細胞からなる。前記他の細胞は、前記多能性または複能性幹細胞を起源とする、自発的に分化した細胞であってもよい。前記自発的に分化した細胞は、幹細胞関連マーカーの発現の損失および分化関連マーカーの発現の開始によって特徴付けられる。優先的には、細胞は、生存可能である。細胞は、ヒトを起源とする。

【0084】

本明細書で使用される用語「ロバスト性能」または「ロバスト性」は、心筋細胞濃縮について選択される、抗原発現における変動性、分化効率、使用される幹細胞クローン、および分化の時点に関わらず、98%までの純度の心筋細胞の精製を指す。精製方法は、本明細書で開示されている非心筋細胞または心筋細胞を標識するための抗体の組合せによる

10

20

30

40

50

、本明細書で開示されている１または２ステップの細胞分離手順のいずれかに基づいており、これによって、前記抗原を発現する細胞の生成および分離のための自動化されたプロセスの実装が可能となる。

【００８５】

抗原結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片に関する用語「に特異的に結合する」または「に特異的な」は、サンプル中の特異的抗原、例えば、ＣＤ１４０ｂ、ＣＤ１４１、ＣＤ１０、ＣＤ５６を認識して、それに結合するが、前記サンプル中の他の抗原は実質的に認識せず、結合もしない抗原結合分子（抗体またはその抗原結合断片の場合、抗原結合ドメイン）を指す。ある種に由来する抗原に特異的に結合する抗体またはその断片の抗原結合ドメインは、別の種に由来するその抗原にも結合し得る。この異種間反応性は、本明細書で使用される「に特異的な」の定義に反しない。抗原、例えば、ＣＤ１４０ｂ、ＣＤ１４１、ＣＤ１０、ＣＤ５６抗原に特異的に結合する抗体またはその断片の抗原結合ドメインは、前記抗原の異なるバリエーション（対立形質バリエーション、スプライスバリエーション、アイソフォームなど）にも実質的に結合し得る。この交差反応性は、抗原、例えば、ＣＤ１４０ｂ、ＣＤ１４１、ＣＤ１０、ＣＤ５６に特異的であるという抗原結合ドメインの定義に反しない。

10

【００８６】

本明細書で使用される用語「閉鎖系」は、新たな材料の導入、ならびに細胞の増殖、分化、活性化および／または分離などの細胞培養ステップの実施などの培養プロセスの実施の間の細胞培養汚染の危険性を低下させるいかなる閉鎖系も意味する。このような系は、

20

【００８７】

本明細書で使用される用語「自動化された方法」、または「自動化されたプロセス」は、そうでなければ操作者によって手動で実施されるであろう、装置および／またはコンピュータおよびコンピュータソフトウェアの使用により自動化されている任意のプロセスを指す。自動化された方法（プロセス）は、実現するためヒトの介入を減らし、ヒトの時間を短縮することを必要とする。場合によっては、本発明の方法の少なくとも１ステップが、ヒトの支援も介入もなく実施される場合、本発明の方法は自動化されている。優先的には、本明細書で開示されている本発明の全てのステップがヒトの支援も介入もなく実施される場合、本発明の方法は自動化されている。優先的には、自動化されたプロセスは、本明細書で開示されている閉鎖系、例えば、CliniMACS（登録商標）Prodigyに実装される。

30

【００８８】

用語「治療上有効な量」は、患者における治療上の利益をもたらす量を意味する。

【００８９】

本明細書で使用される用語「マーカー」は、ある特定の細胞型によって特異的に発現される、細胞抗原を指す。優先的には、マーカーは、細胞表面マーカーであるため、生細胞の濃縮、単離および／または検出を実施することができる。マーカーは、本明細書で使用されるＣＤ５６などの陽性選択マーカーであってもよい、または本明細書で使用されるＣＤ１４０ｂ、ＣＤ１４１、ＣＤ１０などの陰性選択マーカーであってもよい。細胞内に発現される細胞抗原、例えば、構造または筋肉タンパク質または転写因子は、心筋細胞および／またはそのサブpopulationを同定するため使用される分析用マーカーであるが、生細胞の濃縮のためには使用できない。

40

【００９０】

本明細書で使用される用語「発現」は、コードされるタンパク質を含む、遺伝子または

50

遺伝子産物の発現を互換的に指す。遺伝子産物の発現は、例えば、タンパク質に結合する抗体を使用するイムノアッセイによって決定されてよい。例えば、タンパク質、例えば、細胞表面タンパク質CD140b、CD141、CD10、CD56のレベルを決定するため好適な技術は、フローサイトメトリー技術である。

代替的に、遺伝子の発現は、例えば、mRNAレベルの測定によって決定されてよい。

【0091】

本明細書で使用される用語「PSC由来心筋細胞(PSC-derived cardiomyocyte)」または「PSC由来心筋細胞(PSC-derived cardiomyocytes)」は、特殊な培地、小分子、成長因子、サイトカイン、選択される遺伝子またはRNAの過剰発現などの誘導の合図によって、多能性幹細胞からインビトロで生成されるサルコメア含有横紋筋細胞を指す。心筋細胞は、特殊な分子、例えば、ミオシン重鎖、トロポニンT、ミオシン軽鎖、心臓アルファアクチニンのようなタンパク質の発現によって特徴付けられる。心筋細胞は、同様に、他の細胞型から生成されてもよい。本明細書で使用される用語「心筋細胞」は、任意の心筋細胞サブポピュレーションまたは心筋細胞サブタイプ、例えば、心房性、心室性およびペースメーカー心筋細胞を含むアンブレラタームである。

10

【0092】

本明細書で使用される用語「非心筋細胞(non-cardiomyocyte)」または「非心筋細胞(non-cardiomyocytes)」は、本明細書で規定される、および使用される「心筋細胞」の判定基準を満たさない細胞調製物における任意の細胞、または細胞の集団を指す。

20

【0093】

用語「心筋細胞サブポピュレーション」または「心筋細胞サブタイプ」は、互換的に使用され、上で規定される心筋細胞の集団内の任意のサブポピュレーションを指す。それぞれの心筋細胞サブポピュレーションまたはサブタイプは、選択される細胞表面マーカーと、ミオシン重鎖、トロポニンT、心臓アルファアクチニン、ミオシン軽鎖のような細胞内心筋細胞特異的なタンパク質との共発現によって同定される。本明細書で開示されている方法によって得られる心筋細胞および/または心筋細胞サブポピュレーションは、当業者に公知の研究、診断学、薬理学的、または臨床適用などの引き続くステップに使用されてもよい。

30

【0094】

本明細書で使用される用語「心血管細胞」は、多能性幹細胞の分化によってインビトロで生成された心血管系統の細胞を指す。これには、単または複能性の前駆細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、線維芽細胞、心筋細胞、および各細胞型のそれぞれのサブタイプが含まれるが、制限されない。

【0095】

本明細書で使用される用語「除去/枯渇化」は、例えば、本明細書で規定される、および使用される非心筋細胞に特異的な抗原結合分子との標識による、またはバーコール勾配遠心分離などの物理的な枯渇化法の使用による、または特殊な培地(例えば、グルコース枯渇化乳酸豊富化培地)の使用による、またはDNAもしくはRNA分子もしくは分子ビーコンを使用し、それによって、非心筋細胞を特異的に標識し、細胞分離手順、例えば、磁気セルソーティングまたは蛍光活性化セルソーティング(例えば、FACS(登録商標))による、それらの枯渇化を可能にすることによる、望まれない非心筋細胞から所望の心筋細胞を分離する陰性選択のプロセスを指す。

40

【0096】

本明細書で使用される用語「タグ」は、抗原結合分子、例えば、抗体もしくはその抗原結合断片が、他の分子、例えば、粒子、フルオロフォア、ビオチンのようなハブテン、または培養皿およびマイクロタイタープレートなどの大きな表面にカップリングまたはコンジュゲーションすることを指す。場合によっては、例えば、抗原結合分子を培養皿の大きな表面にカップリングする場合、カップリングは、抗原結合分子の直接的な固定化となる

50

。他の場合は、このカップリングは間接的な固定化となり、例えば、磁気ビーズに直接的または間接的に（例えば、ビオチンを介して）カップリングされている抗原結合分子は、前記ビーズが磁場に保持されると固定化される。さらに他の場合は、抗原結合分子の、他の分子へのカップリングは、直接的にも間接的にも固定化せず、本発明による細胞の濃縮、分離、単離および検出を可能にする。例えば、抗原結合分子がフルオロフォアにカップリングされ、これにより、例えば、FACソーティング（FACS sorting）のようなフローサイトメトリー法または蛍光顕微鏡によって、強く標識された細胞、弱く標識された細胞、および標識されていない細胞を区別することが可能になる場合などである。

【0097】

本明細書で使用される用語「粒子」は、コロイド粒子、ミクروسフェア、ナノ粒子またはビーズなどの固相を指す。このような粒子を生成する方法は、当技術分野において周知である。粒子は、磁気粒子であってもよい。粒子は、溶液もしくは懸濁液中にあってもよく、または本発明で使用する前に、ある状態にあってもよい。次いで、凍結乾燥された粒子は、本発明に関して処理されるサンプルと接触させる前に好都合な緩衝液で復元される。

10

【0098】

本明細書で使用される用語「磁性粒子」における「磁性」は、当業者に周知の方法で調製できる磁性粒子の全てのサブタイプ、特に強磁性粒子、超常磁性粒子および常磁性粒子を指す。「強磁性」材料は磁場に強く影響を受け、磁場が除去されたとき、磁気特性を保持することが可能である。「常磁性」材料は、弱い磁化率のみを有し、磁場を取り除くと迅速にその弱い磁気を失う。「超常磁性」材料は、高い磁化率を有し、すなわち、磁場に置くと強く磁気を帯びるが、常磁性材料のように迅速に磁気を失う。

20

【0099】

本明細書で使用される用語「抗体」は、当業者に周知の方法で生成することができるポリクローナルまたはモノクローナル抗体を指す。抗体は、マウス、ラット、ヒツジ、ヒトなどの任意の種のものであってもよい。治療目的では、非ヒト抗原結合断片が使用される場合は当技術分野で公知の任意の方法によってこれらをヒト化することができる。抗体は、修飾抗体（例えばオリゴマー、還元、酸化および標識抗体）であってもよい。

【0100】

用語「抗体」は、インタクトな分子とFab、Fab'、F(ab')₂、Fvおよび一本鎖抗体などの抗体断片（抗原結合断片）の両方を含む。

30

【0101】

抗体と、タグまたは粒子との間の連結（カップリングまたはコンジュゲーション）は、共有結合または非共有結合であり得る。共有結合は、例えばポリスチレンビーズ上のカルボキシル基に対する、または修飾ビーズ上のNH₂もしくはSH₂基に対する連結であり得る。非共有結合連結は、例えば、ビオチン-アビジン、または抗フルオロフォア抗体に連結されているフルオロフォアカップリング粒子を介する。粒子、フルオロフォア、ビオチンのようなハブテン、または大きな表面、例えば、培養皿に対して抗体をカップリングするための方法は、当業者に周知である。

【0102】

原理的には、除去、濃縮、単離または選択のために、任意のソーティング技術を使用することができる。この技術には、例えばアフィニティークロマトグラフィー、または当技術分野において公知の任意の他の抗体依存性の分離技術が含まれる。当技術分野において公知のあらゆるリガンド依存性の分離技術を、細胞の物理的特性を利用する陽性および陰性の両方の分離技術と併用することもできる。

40

【0103】

特に強力なソーティング技術は、磁気セルソーティングである。細胞を磁氣的に分離する方法は、例えばInvitrogen、Stem cell Technologies、in Cellpro、Seattle、またはAdvanced Magnetic s、Bostonから市販されている。例えば、モノクローナル抗体は、Dynal

50

M 4 5 0 のような磁気ポリスチレン粒子または類似の磁気粒子に直接的にカップリングし、例えば細胞分離のため使用することができる。D y n a b e a d s 技術はカラムベースではなく、代わりに、細胞が付着したこれらの磁気ビーズはサンプルチューブ中で液相キネティクスを受け、チューブを磁気ラック上に置くことによって細胞が単離される。しかし、本発明による心筋細胞を含有するサンプルから心筋細胞サブポピュレーションを濃縮、ソーティングおよび/または検出するための好ましい実施形態において、モノクローナル抗体は、例えば、多糖による有機物コーティングを有するコロイド性超常磁性マイクロ粒子（磁気活性化セルソーティング（M A C S（登録商標））技術（M i l t e n y i B i o t e c、B e r g i s c h G l a d b a c h、G e r m a n y））と併用される。これらの粒子（ナノビーズまたはマイクロビーズ）は、モノクローナル抗体に直接的にコンジュゲートするか、または抗免疫グロブリン、アビジンもしくは抗ハプテン特異的マイクロビーズと併用するかのいずれかであってもよい。M A C S 技術により、細胞を、特定の表面抗原に対する抗体でコーティングした磁気ナノ粒子と共にインキュベートすることによって分離することが可能となる。これにより、この抗原を発現する細胞を磁気ナノ粒子に付着させる。その後、細胞溶液は、強磁場に置かれたカラムに移される。このステップにおいて、細胞（抗原を発現している）はナノ粒子に付着し、カラムに滞留するが、他の細胞（抗原を発現していない）は流される。この方法により、細胞を、特定の抗原に関して陽性または陰性に分離することができる。陽性選択の場合、磁気カラムに付着している、対象の抗原を発現している細胞は、磁場からカラムを取り除いた後に、分離容器に洗い出される。陰性選択の場合、使用される抗体は、対象ではない細胞に存在することが公知である表面抗原に対する抗体である。

【 0 1 0 4 】

カラムに細胞/磁気ナノ粒子溶液をアプライした後、これらの抗原を発現している細胞はカラムに結合し、流出する画分は、対象の細胞を含有するため採取される。これらの細胞は、ナノ粒子にカップリングされている抗体によって標識されていないので、「自然のまま（u n t o u c h e d）」である。手順は、直接的な磁気標識または間接的な磁気標識を使用して実施することができる。直接的な標識の場合、特異的な抗体は、磁気粒子に直接的にカップリングされている。直接的な磁気標識が可能ではない、または望まれない場合、間接的な標識が好都合な代替となる。任意の細胞表面マーカーに対する、一次抗体、特異的モノクローナルまたはポリクローナル抗体、一次抗体の組合せを、この標識戦略に使用することができる。一次抗体は、コンジュゲートされていないもの、ビオチン化されたもの、またはフルオロフォアがコンジュゲートされたもののいずれであってもよい。次いで、磁気標識は、抗免疫グロブリンマイクロビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、または抗フルオロフォアマイクロビーズで達成される。本発明の方法は、a) 混合細胞集団からの非心筋細胞の除去、またはb) 混合細胞集団からの心筋細胞および心筋細胞サブタイプの濃縮を目的とする、直接的な磁気標識および間接的な磁気標識の両方を可能にする。前述のプロセスはまた、閉鎖型細胞サンプルプロセッシングシステム、例えば、C l i n i M A C S（登録商標）（M i l t e n y i B i o t e c G m b H、G e r m a n y）またはC l i n i M A C S（登録商標）P r o d i g y（M i l t e n y i B i o t e c G m b H、G e r m a n y）において実施することができる。

【 0 1 0 5 】

本明細書で使用される用語「剤」は、優先的には多能性幹細胞から心血管細胞、好ましくは心筋細胞への分化を誘導するように細胞培地に添加するための、物質、例えば、小分子、成長因子、サイトカイン、選択された遺伝子またはR N A の過剰発現を指す。

【 0 1 0 6 】

本明細書で使用される用語「心筋細胞の実質的に純粋な組成物」または「心筋細胞のサブポピュレーションの実質的に純粋な組成物」は、標的細胞画分中に、少なくとも70%、より優先的には少なくとも90%、最も優先的には少なくとも95%のアルファアクチニンもしくはトロポニンTまたはミオシン重鎖もしくはミオシン軽鎖陽性細胞を含有する細胞組成物を指す。

【0107】

用語「多能性および／または複能性幹細胞から心筋細胞への分化」には、少なくとも20%、より優先的には少なくとも50%、最も優先的には少なくとも70%の効力で心筋細胞が分化するのに適した任意の培地または方法が含まれる。そのような方法は、当技術分野において周知であり、例えば、Zhang等(2015)に開示されている。

【0108】

濃縮された心筋細胞集団および／またはサブポピュレーションはまた、細胞培養の前および／または後に、療法、例えば、細胞療法、または疾患の予防における医薬組成物として使用することもできる。医薬組成物は、動物またはヒト、優先的にはヒト患者に移植されてもよい。医薬組成物は、薬学的に有効な量の医薬組成物を哺乳動物に投与する場合によって含む、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の処置および／または予防のために使用することができる。疾患は、心筋細胞の存在によって、および／または関連性のある場所、すなわち心臓における関連性のある細胞の濃度を増加させることによって処置および／または予防することができる、任意の疾患であってもよい。治療的および／または予防的に処置される疾患は、任意の心臓障害、例えば、虚血または急性／慢性炎症の結果としての心筋細胞の損失により特徴付けられる障害であってもよい。処置は、心臓の関連性のある場所への濃縮された心筋細胞集団および／またはサブポピュレーションの移植であってもよい。本開示の医薬組成物は、処置（または予防）対象の疾患に適した形で投与してもよい。適切な用量は臨床試験によって決定できるが、投与の量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患のタイプおよび重症度などの因子によって決定されることになる。

10

20

【実施例1】

【0109】

多能性および／または複能性幹細胞の心筋細胞への分化

多能性幹細胞由来心筋細胞の効率の高い生成に使用されたプロトコールは、Zhang等(2015)による以前に公開された方法に基づき、Wntシグナル伝達活性化剤および阻害剤、ならびにFGF-2、アクチニンA、BMP-4およびRho-キナーゼ阻害剤を組み合わせた(図1a)。心臓トロポニンT(cTnT)発現のフローサイトメトリー分析(図1bを参照されたい)、およびPSC由来心筋細胞培養物の典型的な形態(図1cを参照されたい)によって示されるように、心筋細胞は7日以内に高い効力で生成された。

30

【実施例2】

【0110】

PSC由来心筋細胞の精製に適した心筋細胞および非心筋細胞マーカーの同定

実施例1に記載されたプロトコールに従ってhESCおよびiPSCを分化させた。心筋細胞および非心筋細胞マーカーの同定のために、400を超える抗体でのフローサイトメトリーに基づく表面マーカースクリーニングを、96ウェルフォーマットで実施した。心筋細胞と非心筋細胞とを区別するために、細胞内心筋細胞マーカー、例えば、アルファアクチニンまたはトロポニンT(cTnT)に対する抗体で細胞をカウンター染色した。Inside Stain Kit(登録商標)(Miltenyi Biotec)を使用して細胞内染色(inside stain)を実施した。表面マーカースクリーニングの結果を、フローサイトメーター、例えば、MACSQuant(登録商標)(Miltenyi Biotec)を使用して分析した。この手順を使用して、細胞内心臓マーカーとの共発現がほとんどない(図2A、2Bを参照されたい)、細胞内心筋細胞マーカーの発現と完全に重複する(図3A、3Bを参照されたい)、または心臓マーカーの発現と部分的に重複する(図13A~Fを参照されたい)のいずれかを示す、いくつかのマーカーを同定した。後者のマーカーは、心筋細胞サブポピュレーションを標識する。さらに、非心筋細胞に関して以前に報告された、いくつかの表面マーカーを、このスクリーニングアプローチによって分析した(図4を参照されたい)。全ての3つのマーカーが細胞内心臓マーカー、トロポニンTまたはアルファアクチニンとの部分的な共発現を示すので

40

50

、3つのマーカーのうちのどれかが非心筋細胞だけを標識するわけではないことを、データは示す。

【実施例3】

【0111】

非心筋細胞の磁気枯渇化によるPSC由来心筋細胞の濃縮

PSC由来心筋細胞培養物(実施例1を参照されたい)を、磁気活性化セルソーティング(MACS)に使用した。細胞を、引き続いて、抗CD140bビオチン抗体、および磁気ビーズにコンジュゲートした抗ビオチン抗体で標識し、MACS(登録商標)Separator(Miltenyi Biotec)の磁場に置かれたMACS細胞分離カラム(Miltenyi Biotec)を使用してさらに分離した。陰性画分を、抗CD140bおよび細胞内心筋細胞特異的マーカー心臓トロポニンT(cTNT)でカウンター染色した。出発心筋細胞集団の純度を37.1%から48.18%に増加できることが示された(図5)。

10

【実施例4】

【0112】

心筋細胞の磁気濃縮化によるPSC由来心筋細胞の濃縮

PSC由来心筋細胞培養物(実施例1を参照されたい)を磁気活性化セルソーティング(MACS)に使用した。細胞を、抗Sirpaビオチンまたは抗VCAM-1ビオチン抗体のいずれか、および磁気ビーズにコンジュゲートした抗ビオチン抗体で標識した。PSC由来心筋細胞の濃縮のための両マーカーは以前に報告されたものである。MACS(登録商標)Separator(Miltenyi Biotec)の磁場に置かれたMACS細胞分離カラム(Miltenyi Biotec)を使用して、細胞をさらに分離した。陽性画分(濃縮された心筋細胞)を、抗Sirpaまたは抗VCAM-1抗体のいずれか、および細胞内心筋細胞特異的マーカー心臓トロポニンT(cTNT)に対する抗体でカウンター染色した。細胞分離抗体として、抗Sirpaを使用して17%から32%に、抗VCAM-1を使用して12%から34%にPSC由来心筋細胞を濃縮できることが示された(それぞれ図6aおよび6bを参照されたい)。

20

【実施例5】

【0113】

1または2ステップ細胞分離戦略を使用するPSC由来心筋細胞の濃縮

PSC由来心筋細胞培養物(実施例1を参照されたい)をMACSに使用した。分化効率および幹細胞クローンに応じて、1または2ステップの細胞分離戦略を使用した。第1のステップには、抗CD140bビオチン、抗CD10ビオチンおよび抗CD141ビオチン、非心筋細胞集団に特異的な抗体の組合せ、および磁気ビーズにコンジュゲートした抗ビオチン抗体の抗体での、非心筋細胞集団の磁気標識が含まれる。次いで、MACS(登録商標)Separator(Miltenyi Biotec)の磁場に置かれたMACS細胞分離カラム(Miltenyi Biotec)を使用して、細胞を分離した。非心筋細胞の枯渇化のみの後に得られた心筋細胞濃縮画分は、図7に示される高度に精製された心筋細胞集団、または図8に示される部分的に精製された心筋細胞集団のいずれかを含有した。後者の結果では、引き続いて、磁気ビーズに直接的にコンジュゲートされた抗CD56抗体を使用して、心筋細胞を直接的に磁氣的に標識した(ステップ2)。MACS(登録商標)Separator(Miltenyi Biotec)の磁場に置かれたMACS細胞分離カラム(Miltenyi Biotec)を使用して、細胞をさらに分離した。陽性心筋細胞含有画分は、心筋細胞マーカー心臓トロポニンT(cTNT)に対する抗体でカウンター染色したところ、高い純度を示した。

30

40

【実施例6】

【0114】

蛍光活性化セルソーティング(FACS)を使用するPSC由来心筋細胞の濃縮

PSC由来心筋細胞培養物(実施例1を参照されたい)をFACSに使用した。抗CD140b、抗CD10および抗CD141 PE-Vio770(Miltenyi B

50

iotec)、ならびに抗CD56 VioBright(商標)FITC抗体を使用して細胞を染色した。次いで、細胞をソーティングカートリッジに移し、マイクロチップに基づくフローサイトメーターMACS QuantTyto(登録商標)(Miltenyi Biotec)を使用してソーティングした。CD140b、CD10およびCD141陰性かつCD56陽性細胞を規定し、陽性画分としてソーティングした。陽性画分の細胞を、心臓マーカー心臓トロポニンTを使用してカウンター染色したところ、高い純度の陽性画分を示した(図9を参照されたい)。

【実施例7】

【0115】

精製されていないおよび精製されたPSC由来心筋細胞の免疫蛍光分析

10

PSC由来心筋細胞培養物(実施例1)を、実施例5に記載されたMACSを使用して精製した。オリジナル画分、非心筋細胞枯渇化画分(ステップ1)および心筋細胞濃縮画分(ステップ2)の細胞を、マトリゲル(Corning)コーティング96ウェルプレートのStemMACS(登録商標)Thiazovivin(Miltenyi Biotec)を補充した標準培養培地にプレーティングした。細胞密度は、細胞300,000個/cm²であった。細胞を、37 °Cおよび5%CO₂で24時間培養した。その後、細胞を、4%PFAを使用して固定した。MACS(登録商標)BSAストック溶液(Miltenyi Biotec)を補充したautoMACS(登録商標)リンス緩衝液を使用して、ブロックングを実施した。次いで、細胞を、心臓トロポニンT抗体(Miltenyi Biotec)、抗ヒトIgG Alexa488(Life Technologies)、およびInside Stain Kit(登録商標)(Miltenyi Biotec)の成分を使用するHoechstで染色した。図10に示されるように、PSC由来心筋細胞の段階的な精製プロセスは、蛍光顕微鏡を使用して可視化することができた。

20

【実施例8】

【0116】

精製された心筋細胞の機能性および形態

PSC由来心筋細胞培養物(実施例1)を、実施例5に記載されたMACSを使用して精製した。陽性画分の細胞を、マトリゲル(登録商標)(Corning)コーティング96ウェルプレートのStemMACS(登録商標)Thiazovivin(Miltenyi Biotec)を補充した標準培養培地にプレーティングした。細胞密度は、細胞300,000個/cm²であった。細胞を、37 °Cおよび5%CO₂で24時間培養した。次いで、細胞形態をモニターした(図11bを参照されたい)。次いで、心筋細胞のカルシウム流を可視化するために、細胞を、カルシウム感受性色素Flou8(Life Technologies)を使用して生染色した。心筋細胞に典型的なカルシウム流を、蛍光顕微鏡を使用して観察した(図11aを参照されたい)。

30

【実施例9】

【0117】

精製された心筋細胞の心筋細胞特異的なマーカーの分析

PSC由来心筋細胞培養物(実施例1)を、実施例5に記載されたMACSを使用して精製した。精製された心筋細胞画分を、Inside Stain Kit(登録商標)(Miltenyi Biotec)を使用して、心筋細胞特異的な細胞内マーカーに対する抗体の異なる組合せで染色し、フローサイトメーター、例えば、MACS Quant(登録商標)(Miltenyi Biotec)を使用して分析した。マーカー組合せは、心筋細胞特異的な発現プロファイルを示した(図12を参照されたい)。

40

【実施例10】

【0118】

心筋細胞精製に適したマーカー組合せの同定

ソーティング戦略に使用することができる特異的な組合せを見出すために、8つの非心臓マーカーからのマーカー組合せをCD56および心臓トロポニンT(細胞内心臓マーカー

50

ー)と共染色した。そのために、凍結したiPS由来心筋細胞(8日)を、標準培養培地において解凍した。次いで、1ウェル当たり 2×10^5 個の細胞を、APC中にマーカー組合せの特異的な抗体を含有し、FITC中にCD56を含有する96ウェルプレートに添加した。表面マーカーを、フローサイトメトリーに関する標準プロトコルを使用して染色した。次いで、心筋構造(心臓トロポニンT)を、inside stain kit(Miltenyi Biotec)を使用して染色した。細胞染色を、MACS Quant Analyzer(Miltenyi Biotec)を使用して分析した。全ての単一マーカー染色は、非筋細胞集団との部分的な重複を示した(図2A、2B)。非心筋細胞および心筋細胞を、明らかに区別できなかった。それが理由で、これらの単一マーカーは、PSC由来心筋細胞の効率的な精製に適していなかった。セルソーティング後、残りの非心筋細胞は、心筋細胞集団に混入するであろう。それと対照的に、非心筋細胞マーカーのうちの少なくとも2つを組み合わせることによって標識された非筋細胞の数を増加させることができた(図14A~F)。心筋細胞および非心筋細胞集団を、明らかに区別できた。したがって、これらのマーカーは、図7~9に示されるように心筋細胞集団の効率の高い精製を可能にする。

10

【0119】

[文献]

Burridge et al., 2014. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* 11:855-60

Dubois et al., 2011. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 29:1011-8.

20

Fuerstenau-Sharp et al., 2015. Generation of highly purified human cardiomyocytes from peripheral blood mononuclear cell-derived induced pluripotent stem cells. *PloS One.* 10(5):e0126596

Piccini et al., 2015. Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Genome-wide expression profiling of long-term in vitro maturation in comparison to human heart tissue. *Genom Data* 4:69-72

Skelton et al., 2016. CD13 and ROR2 Permit Isolation of Highly Enriched Cardiac Mesoderm from Differentiating Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 12; 6:95-108.

30

Tohyama et al., 2013. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell.* 12(1):127-37.

Uosaki et al., 2011. Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. *PloS One.* 6(8):e23657.

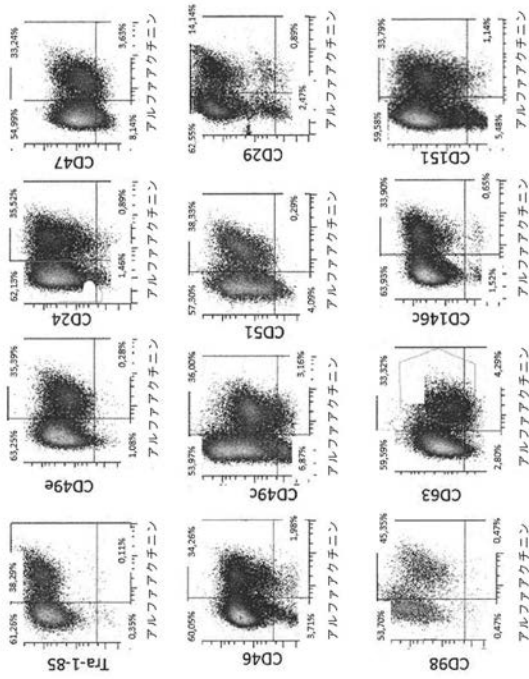
Van den Berg et al., 2015. Transcriptome of human foetal heart compared with cardiomyocytes from pluripotent stem cells. *Development* 142:3231-8.

Xu et al., 2008. Highly enriched cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Cytotherapy.* 10(4):376-89

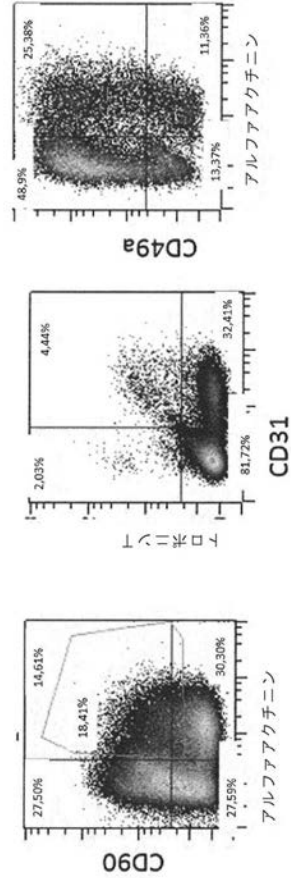
40

Zhang et al., 2015. Universal cardiac induction of human pluripotent stem cells in two and three-dimensional formats: implications for in vitro maturation. *Stem Cells;* 33:1456-69.

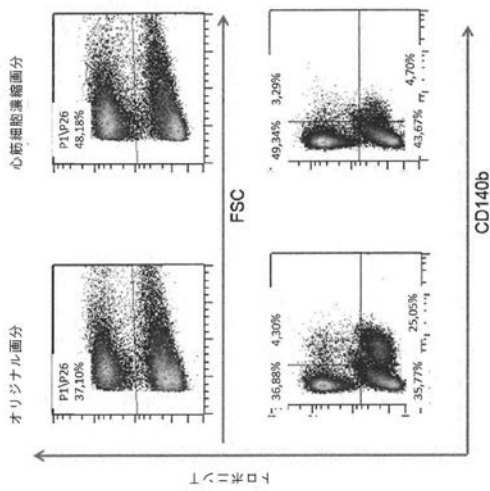
【図 3 B】



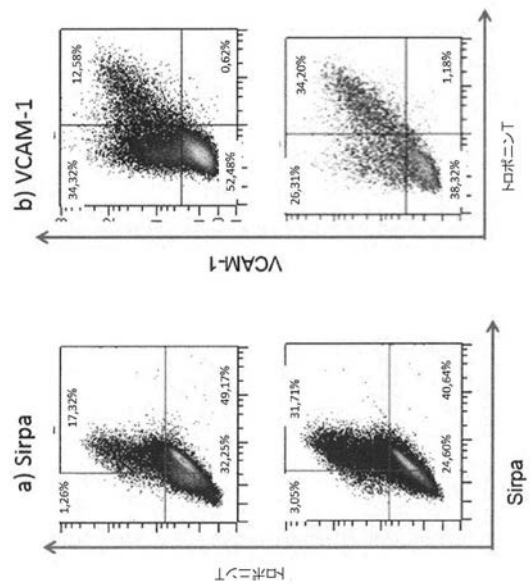
【図 4】



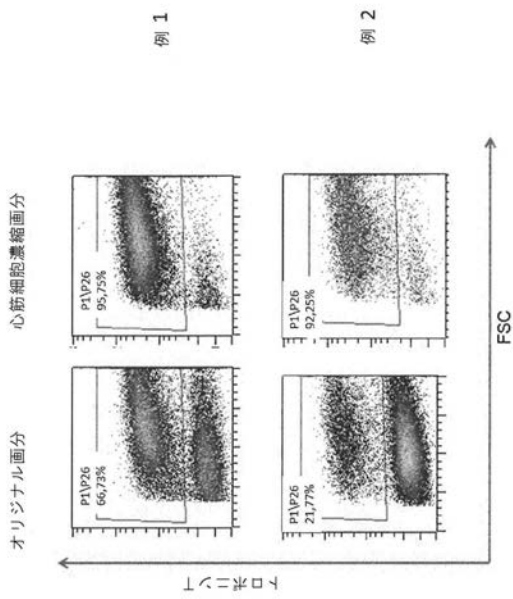
【図 5】



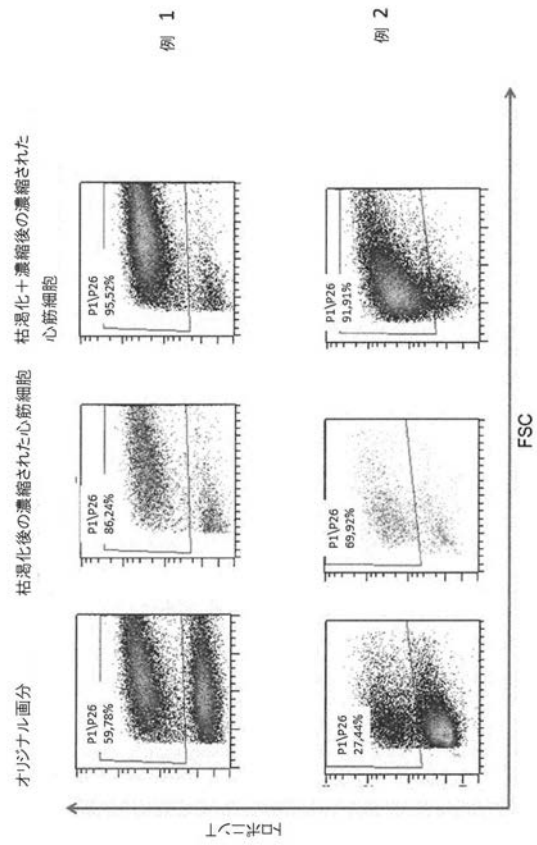
【図 6】



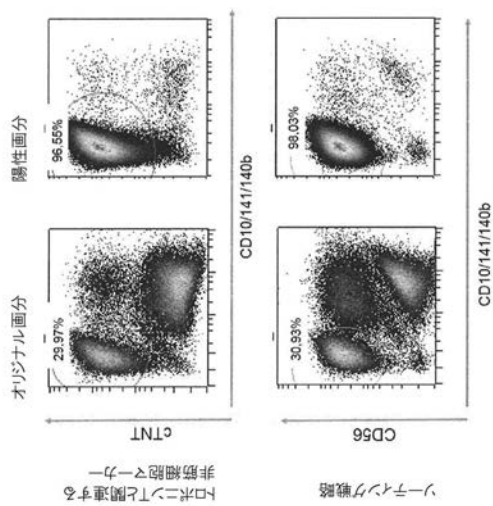
【図 7】



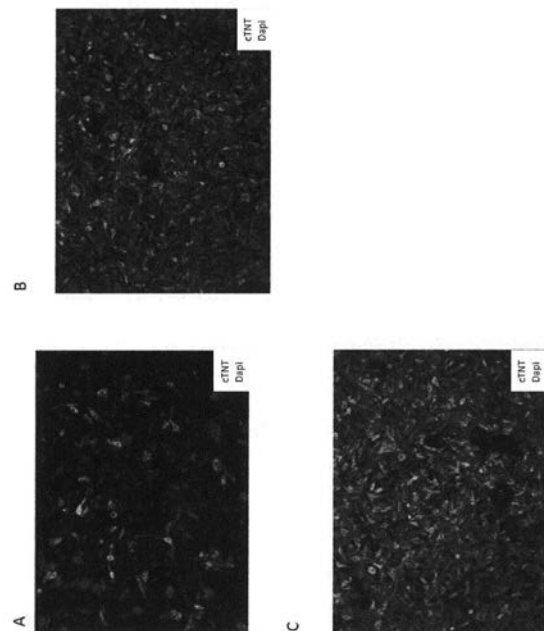
【図 8】



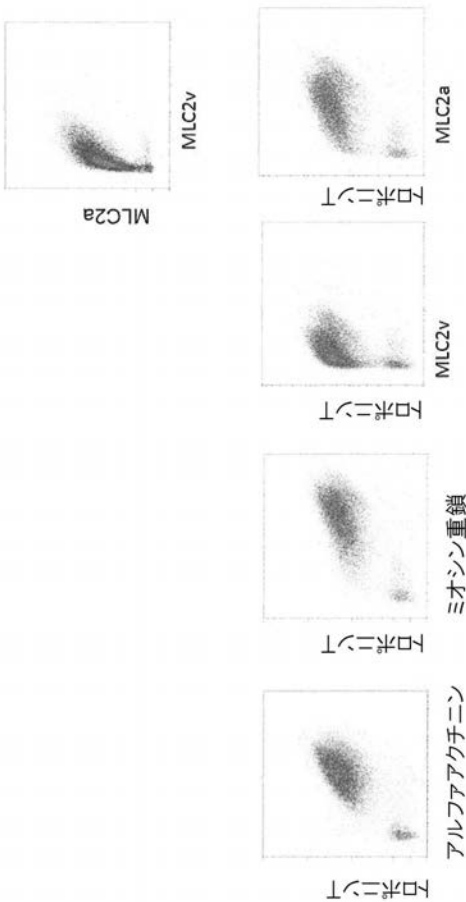
【図 9】



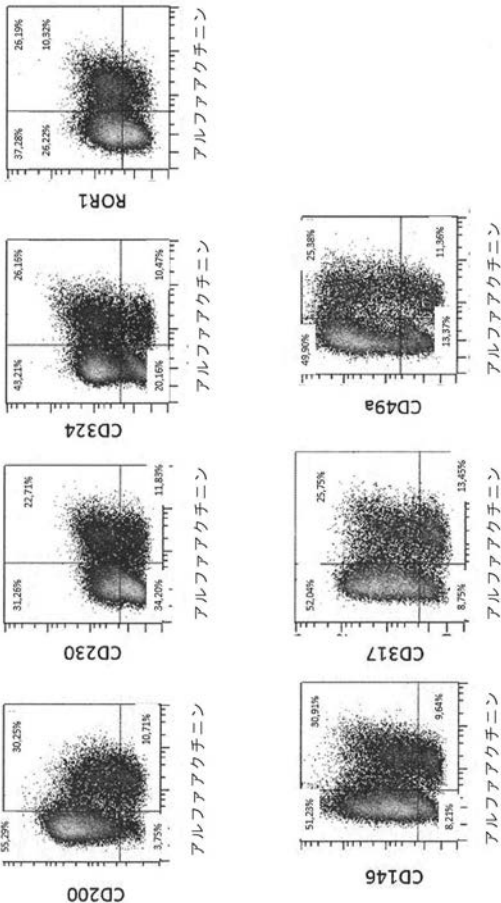
【図 10】



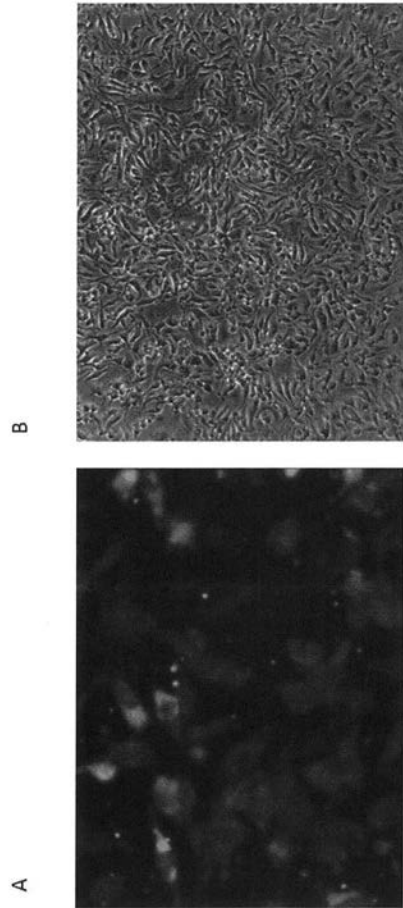
【図 1 2】



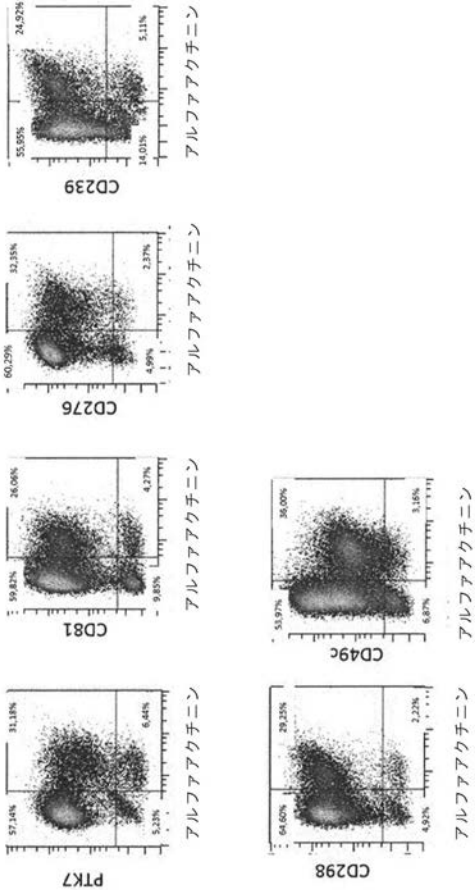
【図 1 3 B】



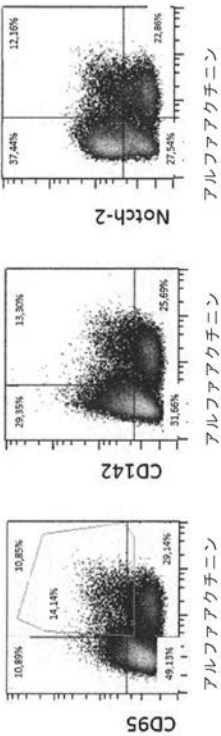
【図 1 1】



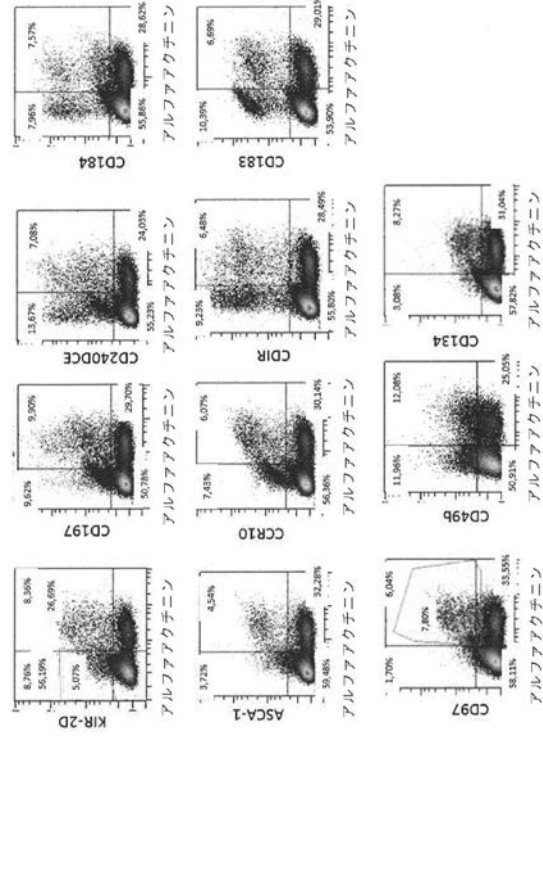
【図 1 3 A】



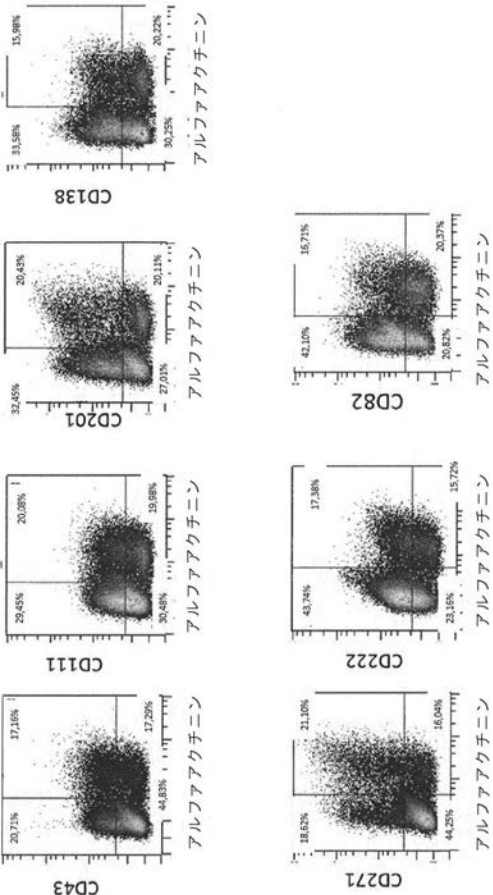
【図 13 D】



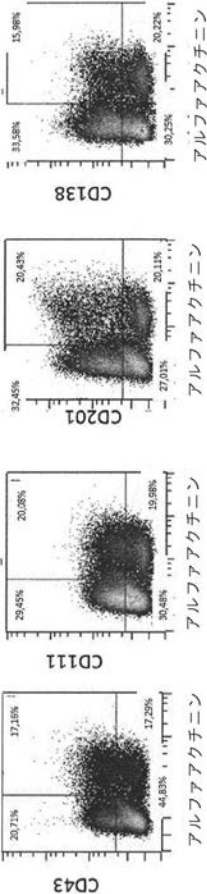
【図 13 E】



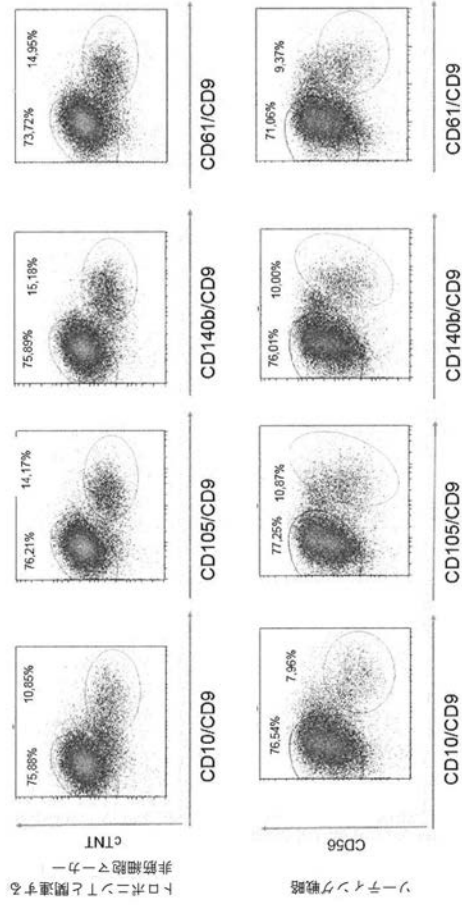
【図 13 C】



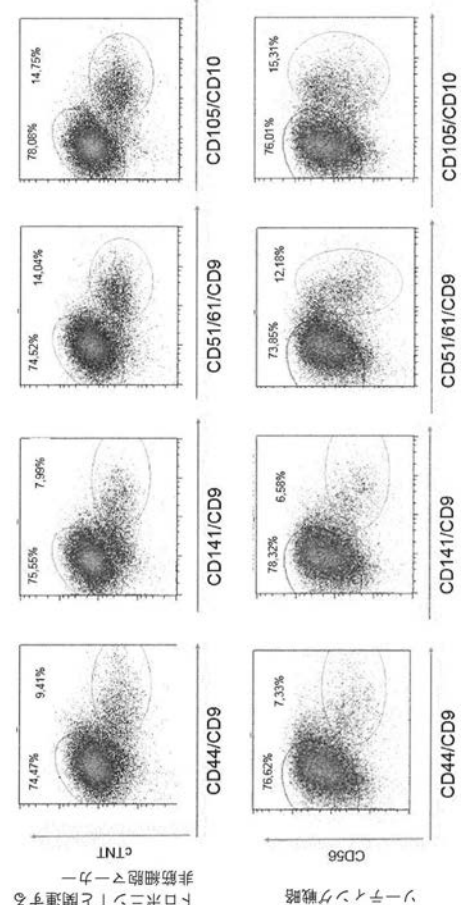
【図 13 B】



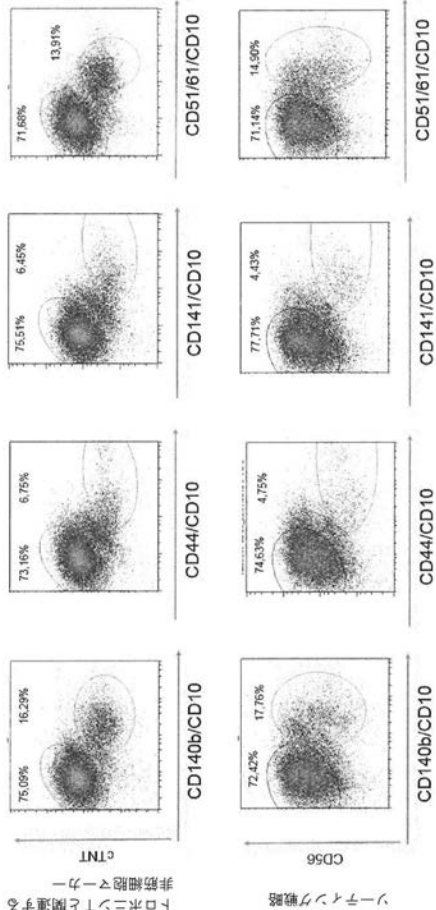
【図 14 A】



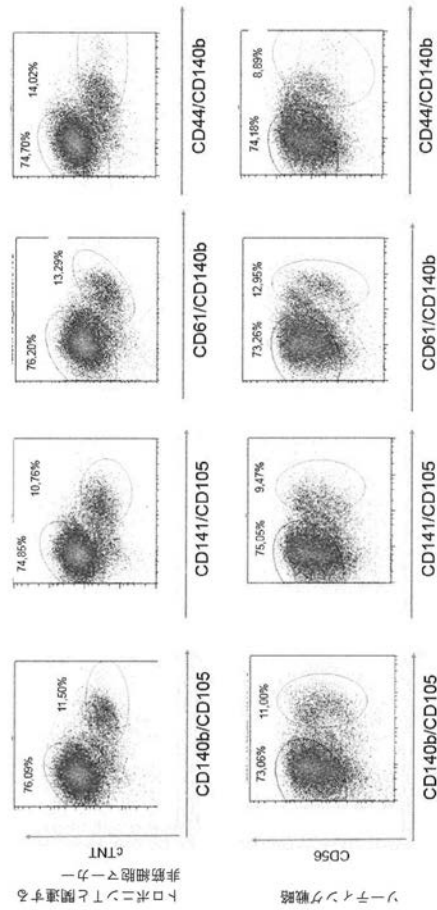
【図 14 B】



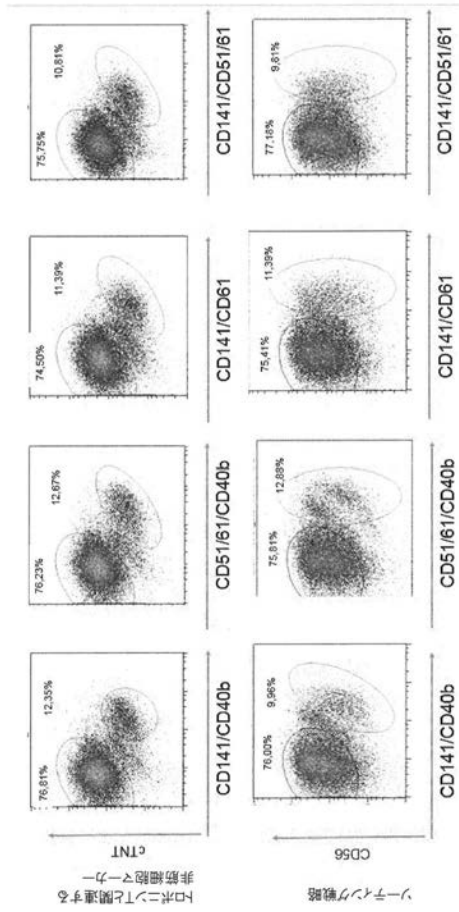
【図 14 C】



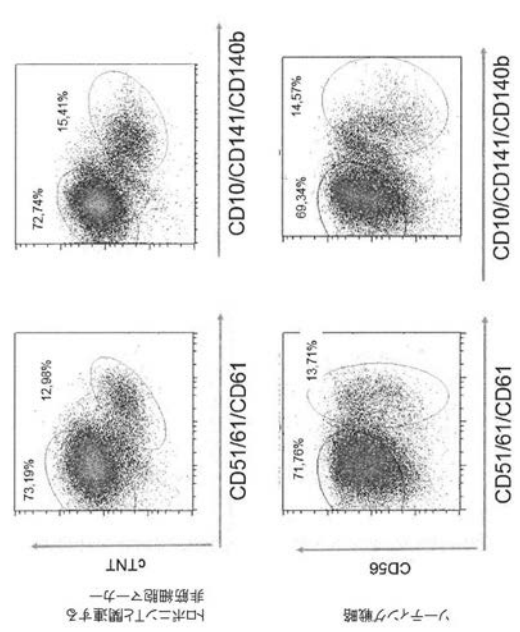
【図 14 D】



【図 14 E】



【図 14 F】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/063047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/077 C12N5/0735 C12N5/074 ADD.		
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) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/135253 A1 (GERON CORP [US]; O'SULLIVAN CHRISTOPHER [US]; NISHIMOTO KEVIN [US]; RE) 4 October 2012 (2012-10-04) cited in the application	1,3-5,14
Y	the whole document page 58 - page 61; examples VI-VII claim 50 ----- -/--	2,6-13, 15
☒ 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 "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 1 August 2017		Date of mailing of the international search report 23/08/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Zuber Perez, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/063047

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUBOIS NICOLE C ET AL: "SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells", NATURE BIOTECHNOLOGY, GALE GROUP INC, US, vol. 29, no. 11, 1 November 2011 (2011-11-01), pages 1011-1019, XP009167979, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT.2005 [retrieved on 2011-10-23]	14
Y	the whole document page 1016, paragraph 2; figure 7 -----	2
X	WO 2012/133954 A1 (UNIV KYOTO [JP]; YAMASHITA JUN [JP]; UOSAKI HIDEKI [JP]) 4 October 2012 (2012-10-04)	14
Y	the whole document claims 1-12 -----	6-12, 15
X	WO 2014/014119 A1 (UNIV KYOTO [JP]) 23 January 2014 (2014-01-23)	14
Y	the whole document claims 1-15 -----	6-12, 15
X	CHUNHUI XU: "Differentiation and enrichment of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells", JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, ACADEMIC PRESS, GB, vol. 52, no. 6, 20 March 2012 (2012-03-20), pages 1203-1212, XP028482910, ISSN: 0022-2828, DOI: 10.1016/J.YJMCC.2012.03.012 [retrieved on 2012-03-30]	14
Y	the whole document -----	2, 6-13, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/063047

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012135253 A1	04-10-2012	AU 2012236707 A1 CA 2829804 A1 EP 2691512 A1 US 2014329314 A1 US 2016362661 A1 WO 2012135253 A1	12-09-2013 04-10-2012 05-02-2014 06-11-2014 15-12-2016 04-10-2012
WO 2012133954 A1	04-10-2012	EP 2691513 A1 JP 6025067 B2 JP 2014511139 A US 2014057287 A1 WO 2012133954 A1	05-02-2014 16-11-2016 12-05-2014 27-02-2014 04-10-2012
WO 2014014119 A1	23-01-2014	JP 2015527872 A US 2015184129 A1 WO 2014014119 A1	24-09-2015 02-07-2015 23-01-2014

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)		G 0 1 N 33/543	5 4 1 A	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28		
A 6 1 K 35/545 (2015.01)		A 6 1 K 35/545		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, NE, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(74) 代理人 100162503

弁理士 今野 智介

(74) 代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72) 発明者 ノアック, クリスティン

ドイツ連邦共和国 5 1 4 2 9 ベルギッシュ グラートバハ, モイツツフェルト 7 3

(72) 発明者 エッカルト, ドミニク

ドイツ連邦共和国 5 1 4 2 9 ベルギッシュ グラートバハ, ディアーコニッセンヴェーク 2 9

(72) 発明者 ボシオ, アンドレアス

ドイツ連邦共和国 5 0 9 3 9 ケルン, ハンフヴェーク 1 7

F ターム (参考) 4B063 QA20 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR66 QR72 QR77 QS28 QS33

QS36 QX02

4B065 AA90X AC20 BD14 BD39 BD50 CA44

4C087 AA01 AA03 BB47 BB64 MA67 NA06 NA20 ZA36

4H045 AA11 AA30 BA10 BA50 CA40 DA75 EA50

专利名称(译)	人多能干细胞来源的心肌细胞和心肌细胞亚群的产生，鉴定和分离方法		
公开(公告)号	JP2019517794A	公开(公告)日	2019-06-27
申请号	JP2018562924	申请日	2017-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	美天旎生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	Mirutenii生物GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	ボシオアンドレアス		
发明人	ノアック,クリスティン エッカルト,ドミニク ボシオ,アンドレアス		
IPC分类号	C12N5/077 C12Q1/02 A61K35/34 A61P9/00 G01N33/53 G01N33/543 C07K16/28 A61K35/545		
CPC分类号	C12N5/0657 C12N2500/98 C12N2501/115 C12N2501/155 C12N2501/16 C12N2501/415 C12N2501/727 C12N2506/02 C12N2506/45		
FI分类号	C12N5/077 C12Q1/02 A61K35/34 A61P9/00 G01N33/53.Y G01N33/543.541.A C07K16/28 A61K35/545		
F-TERM分类号	4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BD14 4B065/BD39 4B065/BD50 4B065/CA44 4C087/AA01 4C087/AA03 4C087/BB47 4C087/BB64 4C087/MA67 4C087/NA06 4C087/NA20 4C087/ZA36 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50		
代理人(译)	松任谷裕子 森田 裕 Nobuto滤纸冲		
优先权	2016172528 2016-06-01 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于产生，分离，检测和/或分析衍生自包含多能和/或多能干细胞的起始细胞组合物的心肌细胞的方法，所述干细胞包括：a) 多能性和/或将多能干细胞分化为心血管细胞，从而产生包含心肌细胞和非心肌细胞的样品；和b) 对非心肌细胞抗原具有特异性的样品非心肌细胞。用多种抗体或其抗原结合片段标记，和c) 从样品中消耗标记的非心肌细胞；和任选地d) 样品中对心肌细胞抗原具有特异性的心肌细胞。用至少一种抗体或其抗原结合片段标记；和e) 富集标记的心肌细胞以检测和分离衍生自多能和/或多能干干细胞的心肌亚型。该方法包括该步骤。

