

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6549599号
(P6549599)

(45) 発行日 令和1年7月24日(2019.7.24)

(24) 登録日 令和1年7月5日(2019.7.5)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	D

請求項の数 15 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2016-552628 (P2016-552628)	(73) 特許権者	511202045
(86) (22) 出願日	平成27年2月18日 (2015.2.18)		メルツ ファルマ ゲーエムペーハー ウ
(65) 公表番号	特表2017-506892 (P2017-506892A)		ント コンパニー カーゲーアーアー
(43) 公表日	平成29年3月16日 (2017.3.16)		ドイツ連邦共和国 60318 フランク
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/053403		フルト アム マイン, エッケンハイマー
(87) 国際公開番号	W02015/124618		ラントシュトラーセ 100
(87) 国際公開日	平成27年8月27日 (2015.8.27)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成29年12月11日 (2017.12.11)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	14155726.4	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成26年2月19日 (2014.2.19)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *in vitro*試験系におけるボツリヌス神経毒に対する細胞の感度を標準化し且つ増加させるためのガングリオシド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の感度を標準化する方法であって、以下のステップ:

a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ;

b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ;

c) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする条件下で、ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ;

を含み、これにより神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度を標準化する、前記方法。

【請求項2】

神経毒ポリペプチドに対して標準化された感度を有する人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の作製方法であって、以下のステップ:

a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを提供するステップ;

b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ

を含み、これにより神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度を

標準化する、前記方法。

【請求項 3】

以下のステップ：

c) ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；および

d) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする条件下で、ステップc)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ

をさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定する方法であって、以下のステップ：

a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞を、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ；

b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞を、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；

c) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする条件下で、ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞を、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ；および

d) 前記細胞中の神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定するステップを含む、前記方法。

【請求項 5】

人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを使用する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチ中の神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定するステップをさらに含む、請求項 1 または 3 に記載の方法。

【請求項 7】

感度の標準化が、GT1bを伴わずに処理された人工多能性幹細胞由来神経細胞の対照バッチと比較した、神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動の低下である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動の低下が、少なくとも1.5倍または少なくとも2倍の低下である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチが、継代の数、凍結/解凍サイクルの数、培養条件、保存時間、増殖時間、分化条件、またはそれらの組み合わせにおいて異なる、請求項 1 ~ 3 および 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

人工多能性幹細胞由来神経細胞が、ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞、好ましくはiCell(登録商標)神経細胞(Cellular Dynamics International社製)である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

細胞培養培地が、Neurobasal(登録商標)培地、B-27(登録商標)添加物(2%)、およびグルタミンまたはGlutaMAX(商標)(1%)を含む、請求項 1、2 または 4 に記載の方法。

【請求項 12】

GT1bが、1~300 μM、好ましくは30 μMの濃度で添加される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

神経毒ポリペプチドが、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F、BoNT/G

10

20

30

40

50

、BoNT/HもしくはTeNT、またはこれらのサブタイプである、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

神経毒ポリペプチドの生物学的活性が、免疫ウェスタンブロット解析、SDS-PAGE免疫ブロット解析またはELISAによる、神経毒で切断された基質の定量化によって決定される、請求項4または6に記載の方法。

【請求項15】

a) 神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度を標準化するための；または

b) 神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動を低下させるための、GT1bの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の感度を標準化する方法であって、以下のステップ：a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ；b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；c) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする条件

下で、ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップを含み、これにより神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度を標準化する、上記方法に関する。本発明はさらに、神経毒ポリペプチドに対して標準化された感度を有する人工多能性幹細胞由来神経細胞の作製方法であって、以下のステップ：a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを提供するステップ；b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップを含み、これにより神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度を標準化する、上記方法に関する。さらに、本発明には、神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定する方法であって、

以下のステップ：a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞を、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ；b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞を、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；c) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする条件下で、ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞を、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ；およびd) 前記細胞中の神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定するステップを含む、上記方法が包含される。最終的に、本発明は、以下：a) 神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度を標準化するため；またはb) 神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動を低下させるための、GT1bの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ボツリヌス菌(クロストリジウム・ボツリナム(*Clostridium botulinum*))および破傷風菌(クロストリジウム・テタニ(*Clostridium tetani*))は、それぞれ極めて強力な神経毒、すなわちボツリヌス毒素(BoNT)および破傷風毒素(TeNT)を産生する。これらのクロストリジウム神経毒(CNT)は、神経細胞に特異的に結合し、神経伝達物質の放出を阻害する。各毒素は、不活性な、プロセシングされていない約150kDaの一本鎖タンパク質として合成される。翻訳後プロセシングは、ジスルフィド橋の形成、および細菌プロテアーゼによる限定的なタンパク質分解(ニッキング)を包含する。活性な神経毒は、ジスルフィド結合によって連結された約50kDaのN末端軽鎖と約100kDaの重鎖との二本鎖からなる。CNTは、構造的および機能的には3つのドメイン、すなわち、触媒軽鎖、転座ドメインを含む重鎖(N末端半分)および受容体結合ドメイン(C末端半分)からなる(例えば、Kriegelstein 1990,

10

20

30

40

50

Eur J Biochem 188, 39; Krieglstein 1991, Eur J Biochem 202, 41; Krieglstein 1994, J Protein Chem 13, 49を参照)。ボツリヌス神経毒は、150kDaの神経毒タンパク質と関連の非毒性タンパク質とを含む分子複合体として合成される。複合体サイズは、クロストリジウム株、ならびに300kDaから500kDa超および900kDaにわたる別個の神経毒血清型によって異なる。これらの複合体中の非毒性タンパク質は、神経毒を安定化し、これを分解から保護する(Silberstein 2004, Pain Practice 4, S19-S26を参照)。

【 0 0 0 3 】

ボツリヌス菌は、ボツリヌス神経毒 (BoNT) のA~Gと呼ばれる7種類の抗原的に異なる血清型を分泌する。全血清型は、破傷風菌によって分泌される関連する破傷風神経毒 (TeNT) と共に、SNAREタンパク質を切断することによってシナプスのエキソサイトーシスを遮断する亜鉛(Zn^{2+})-エンドプロテアーゼである (Coesnon, 2006, Microbiology, 152, 759を参照)。CNTは、ボツリヌス菌および破傷風菌において見られる弛緩性筋麻痺を引き起こす (Fischer 2007, PNAS 104, 10447を参照)。

【 0 0 0 4 】

その毒性作用にも関わらず、ボツリヌス毒素複合体は、多数の疾患において治療剤として使用されてきた。ボツリヌス毒素血清型Aは、1989年に米国で、斜視、眼瞼けいれん、および他の障害の治療のためにヒトへの使用について認可された。これは、例えば、商品名BOTOX(Allergan Inc.)、または商品名DYSPOREX/RELOXIN(Ipsen Ltd.)の下、ボツリヌス毒素A(BoNT/A)タンパク質製剤として市販されている。改良された、複合体非含有ボツリヌス毒素A製剤は、商品名XEOMIN(Merz Pharmaceuticals GmbH)の下、市販されている。治療的適用のため、この製剤は治療対象の筋肉に直接注射される。生理的pHにおいて、毒素は、タンパク質複合体から放出され、所望の薬理作用を発揮する。ボツリヌス毒素の作用は一時的なものに過ぎず、これが治療効果を維持するためにボツリヌス毒素の反復投与が必要とされる可能性がある理由である。

【 0 0 0 5 】

クロストリジウム神経毒は、随意筋力を弱め、斜視、限局性筋失調症(頸部ジストニアなど)、および良性特発性眼瞼けいれんの有効な治療法である。これらはさらに、片側顔面けいれん、および限局性けいれんを軽減すること、またさらに、胃腸障害、多汗症、および美容上のしわ取りなどの広範囲の他の適応症において有効であることが示されている (Jost 2007, Drugs 67, 669を参照)。

【 0 0 0 6 】

クロストリジウム神経毒の製造工程の間、前記神経毒の定性的且つ定量的な決定ならびに生物学的に活性な神経毒ポリペプチドの品質管理が特に重要である。さらに、行政機関は口バストで、正確で、精密で、信頼性が高く、さらに検証されたボツリヌス毒素効力アッセイのみを承認する。現在、マウスLD₅₀バイオアッセイ、死亡率試験が依然として、製薬業者により彼らの製剤の効力を分析するために用いられる「究極の判断基準」である (Arnonら(2001), JAMA 285, 1059-1070を参照)。しかし、近年、動物試験の必要性ならびにこのタイプの動物ベースのアッセイに伴う全ての不利点、費用および倫理的な問題を軽減するための代替的アプローチを探索するために相当の努力が払われている。さらに規制当局は、製薬会社に、ボツリヌス神経毒の効力試験へ3つの「R」原則：「低下(Reduce)、精密化(Refine)、置換(Replace)」を適用させようとしている (Straughan, Altern. Lab. Anim. (2006), 34, 305-313を参照)。その結果、生きた動物を用いる方法の合理的な代替法を提供するため、細胞ベースの試験系が開発された。しかし、これまでのところ、神経毒の生物学的活性の決定に関しては、神経毒ポリペプチドに対して十分に高感度であることが示された3つの細胞性試験系のみが利用可能である。これらの細胞ベースの試験系は、in vitroで分化した齧歯類胚から単離された初代神経細胞 (Pellettら(2011), Biochem. Biophys. Res. Commun. 404, 388-392)、神経細胞に分化した人工多能性幹細胞 (Whitemarshら(2012), Toxicol. Sci. 126, 426-35)、およびSiMa細胞株に由来するクローン (WO 2010/105234 A1)の使用を包含する。

【 0 0 0 7 】

しかし、初代神経細胞の単離は動物の殺傷を必要とし、さらに労力を要し、時間がかかり、またこれらのアッセイの検証が課題であると考えられる。さらに、異なる初代神経細胞を用いる試験系は大きな変動を示す。同様に、神経系に分化した人工多能性幹細胞の作製は困難であり、また時間がかかる。さらに、このような細胞の保存には極めて問題がある。腫瘍細胞株を用いるアッセイは、多くの場合、BoNTに対して十分に高感度ではない。さらに、前記腫瘍細胞株には複雑な分化プロトコルが必要とされ、これが前記細胞株を用いるアッセイの大きな変動および/または高い失敗率をもたらす。

【0008】

上記の観点から、神経毒ポリペプチド活性の決定のためのさらなる試験系が非常に望ましい。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】WO 2010/105234 A1

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Kriegelstein 1990, Eur. J. Biochem. 188, 39

【非特許文献2】Kriegelstein 1991, Eur. J. Biochem. 202, 41

【非特許文献3】Kriegelstein 1994, J. Protein Chem. 13, 49

【非特許文献4】Silberstein 2004, Pain Practice 4, S19 - S26

20

【非特許文献5】Coesnon, 2006, Microbiology, 152, 759

【非特許文献6】Fischer 2007, PNAS 104, 10447

【非特許文献7】Jost 2007, Drugs 67, 669

【非特許文献8】Arnonら(2001), JAMA 285, 1059-1070

【非特許文献9】Straughan, Altern. Lab. Anim. (2006), 34, 305-313

【非特許文献10】Pellettら(2011), Biochem. Biophys. Res. Commun. 404, 388-392

【非特許文献11】Whitemarshら(2012), Toxicol. Sci. 126, 426-35

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

30

従って、本発明の根底にある技術的課題は、上述のニーズを満たす手段および方法の提供として理解することができる。上記技術的課題は、特許請求の範囲および本明細書中以下で特徴づけられる実施形態により解決される。

【課題を解決するための手段】

【0012】

第一の態様において、本発明は、神経毒ポリペプチドに対して標準化された感度(感受性)を有する人工多能性幹細胞(IPS)由来神経細胞(ニューロン)の作製方法であって、以下のステップ:

a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを提供するステップ;

b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ

40

を含み、これにより神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度を標準化する、上記方法に関する。

【0013】

この態様において、人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチが第1ステップで提供される。これらのバッチは、例えば、継代の数および/もしくは凍結/解凍サイクルの数、ならびに/または本明細書中の他の箇所而言及される他の特性において異なり得る。その後、人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bを含む適切な細胞培養培地中で、少なくとも3時間、少なくとも4時間、少なくとも5時間、少なくとも6時間、少なくとも12時間、少なくとも24時間(1日間)、少なくとも36時間、少なくとも48時間(2日間)、

50

少なくとも72時間(3日間)、少なくとも4日間、少なくとも5日間、またはさらに長く培養する。好ましくは、前記培養は数時間、例えば、3時間、4時間、5時間、6時間または12時間である。適切な細胞培養培地として、例えば、人工多能性幹細胞由来神経細胞の製造者または供給者によって提供される、B27添加物を含むNeurobasal(登録商標)培地、iCell(登録商標)神経細胞培地(Cellular Dynamics international ; CDI社製)または他の細胞培養培地を使用することができる。これにより、以下にさらに詳細に示されるとおり、GT1b処理を伴わない人工多能性幹細胞由来神経細胞の対照バッチと比較して、神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動を有意に低下させ得ることが本発明者らによって見出された。

【0014】

別の態様において、上記の本発明の方法は、以下のステップ：

- c) ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；および
 - d) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする条件下で、ステップc)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ
- をさらに含む。

【0015】

人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養した後、人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、最初に神経毒ポリペプチドと接触させ、その後、次のステップにおいて、上記神経毒ポリペプチドで少なくとも24時間(1日間)、少なくとも36時間、少なくとも48時間(2日間)、少なくとも60時間、少なくとも72時間(3日間)、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間(1週間)、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも5週間、少なくとも6週間またはさらに長く中毒化することができる。好ましくは、中毒化は、少なくとも72時間、またはそれ以上である。神経毒ポリペプチドは、例えば、本明細書中の他の箇所ですらに詳細に定義される、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F、BoNT/G、BoNT/HもしくはTeNT、またはこれらのサブタイプであり得る。人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチは、神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする条件下で、GT1bの存在下で上記の期間培養される。神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする適切な細胞培養条件および神経毒ポリペプチドの生物学的活性は、本明細書中の他の箇所ですらに定義されるとおりである。この処理により、GT1b処理を伴わない中毒化された人工多能性幹細胞由来神経細胞の対照バッチと比較して、神経毒ポリペプチドに対する前記人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動をさらに低下させることができる。

【0016】

さらなる態様において、本発明は、神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の感度を標準化する方法であって、以下のステップ：

- a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ；
 - b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；
 - c) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする条件下で、ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ；
- を含み、これにより神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度を標準化する、上記方法に関する。

【0017】

さらなる態様において、本発明の上述の方法は、1つ以上の付加的なステップを含み得る。例えば、前記付加的なステップは、本明細書中で定義される神経毒ポリペプチドの生

10

20

30

40

50

物学的活性を決定するステップを包含し得る。この目的のため、本明細書中に記載されるGT1bの存在下で培養した人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞を、本明細書中で定義される神経毒ポリペプチドと接触させる。本発明の方法により使用される用語「接触させる」は、例えばサンプル中に含まれ得る上述の細胞と神経毒ポリペプチドとを、物理的および/または化学的および/または生物学的相互作用を可能とするように、物理的に近接させることを指す。特異的相互作用を可能とする好適な条件は、当業者に周知である。前記条件は、本発明の方法において適用される細胞および神経毒に応じて決定され、当業者によって苦もなく適合され得る。さらに、相互作用を可能とするために十分な時間もまた、当業者により苦もなく決定され得る。例えば、特定量の明細書中で定義される単離もしくは組み換え神経毒ポリペプチドまたはその変異体、あるいは神経毒ポリペプチドを含むサンプルを、GT1b処理された人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞に添加することができる。その後、神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする条件下で、上記の細胞を神経毒ポリペプチドと共に、再度GT1bの存在下で少なくとも24時間インキュベートする。本明細書中で使用される「神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を発揮することを可能とする条件」は、当技術分野において公知である。その後、例えば上記細胞への溶解緩衝液の添加によって生物学的活性の発揮を停止させ、さらに神経毒ポリペプチドの生物学的活性を、例えば、切断された神経毒基質を特異的に検出するウェスタンブロットアッセイまたは特異的ELISA技術によって決定する。例えば、SNAP-25はBoNT/A、BoNT/C1およびBoNT/Eの既知の基質であり、これらによって切断される。VAMP/シナプトプレピンはBoNT/B、BoNT/D、BoNT/F、BoNT/GおよびTeNTの基質であり、これらによって切断されるが、シンタキシンはBoNT/C1の基質であり、これによって切断される。

10

20

【0018】

クロストリジウム神経毒は、それらがシナプス前神経終末からの神経伝達物質の分泌を特異的に阻害することを特徴とする。末梢神経細胞に対する選択性は、2つの異なる受容体、SV2およびGT1bの認識によって仲介される。神経毒の生理作用は、受容体の結合および神経毒の軽鎖の転座の後の、いわゆるSNARE複合体のタンパク質の切断に基づく。BoNTの生物学的活性の決定は、前記神経毒タンパク質の特性決定における重要な態様であり、BoNT含有製品の市販のため、とりわけ規制当局によって要求される。従って、BoNTの生物学的活性の測定のための信頼性の高い試験は、BoNTを含有する製品の研究、開発および販売の基盤である。さらに、倫理的な理由から、細胞ベースの試験系は、これまで支配的な動物試験を置き換えるものでなければならない。このような細胞ベースの試験系を確立するため、ボツリヌス神経毒に対して十分に高感度の神経細胞または細胞株が不可欠である。

30

【0019】

医薬品中のボツリヌス毒素の生物学的活性を決定するため、神経細胞または細胞株は以下の特性を有していなければならない：第1に、細胞は、標的(すなわちヒト患者)にできる限り近く類似させるため、ヒトの神経細胞由来のものである。第2に、細胞系は、最終製品中の賦形剤に対して、また好ましくは製造工程の中間段階における不純物に対してもロバストでなければならない(工程管理)。第3に、細胞ベースの試験系は、バイアル中のBoNTの生物学的活性(例えば、50 LD₅₀U BoNT/A)の正確な決定を可能とする動的測定範囲を示すものでなければならない。賦形剤の溶解性、細胞培養培地の体積等のような技術的要素を考慮して、1pM未満のBoNT濃度を正確に決定しなければならない。

40

【0020】

BoNTに対して十分に高い感度を有する利用可能な細胞ベースの試験系の一つは、神経細胞に分化した人工多能性幹細胞を用いる。本発明者らは、市販のヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞(Cellular Dynamics International, Inc., Madison)を用いて試験系を評価した。前記ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞を低温保存細胞として入手し、製造業者の取扱説明書に従って解凍して4日間培養した。前記細胞は、最終的に、それ以上増殖せず、またそれ以上変化し得ない最終分化した神経細胞の表現型を示すことを特徴とする神経細胞に分化した。前記表現型を形成させた後、上記細胞を神経毒ポリペプチドと共に72時間インキュベートした。その後、神経毒ポリペプチドBoNT/Aおよびその基質SNAP-25につい

50

て例示されるとおり、神経毒基質切断生成物を、細胞溶解物の免疫ウェスタンブロット解析またはELISA法によって定量した。前記試験の評価の結果として、上記供給者の同じ細胞バッチを用いて試験が行われる限り、前記試験系の高い感度、再現性および中間精度を確認することができた。しかし、前記供給者の異なる細胞バッチを使用した場合、神経毒ポリペプチドに対する前記細胞の感度について説明のつかない高い変動が見られたが、供給者による細胞数、生存能、表現型等に関する前記細胞バッチの特性決定は、上記の変動に関して何の手がかりも与えなかった。具体的には、上記供給者のヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なる細胞バッチの感度(EC50)は、1.7U/ml ~ 10U/ml超の範囲で変動した。

【0021】

驚くべきことに、ガングリオシド(例えばGT1b)の外部適用が、ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なる細胞バッチ間の感度の変動の劇的な低下をもたらしたことが、本発明者らにより見出された。この知見は、以下の理由から一般的ではない：第1に、神経細胞の表現型を示す細胞は、それら自体で十分なGT1bを内因的に産生する。これは、例えば初代神経細胞について見出されている。さらに、発明者らの経験では、初代神経細胞培養物の異なる製剤でも、神経毒ポリペプチドに対する感度においてこのような変動を示さなかった。さらに、このような作用は、例えばSiMa細胞を使用した神経芽腫細胞株ベースの試験では、異なる継代数についての試験でも、異なる低温保存バッチを試験した場合でも、観察することができなかった。第2に、Cellular Dynamics International社による供給者の取扱説明書は、神経毒ポリペプチドに対するヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なる細胞バッチの感度のこのような変動に関する情報を全く含んでいなかった。本発明の方法を使用すると、細胞培養培地に添加された30 μM GT1bの存在下での培養および神経毒インキュベーションにより、本発明者らによって前記変動を約30%から約15%(標準偏差)へと有利に低下させることができた。従って、本発明の方法は、神経毒の生物学的活性を決定するための、高感度で、正確且つ再現性のある細胞ベースの試験系を提供する。前記方法は、従来動物ベースの試験系の代替法として使用することができる。さらに、神経毒ポリペプチドに対するヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度を標準化するための本発明の比較的簡単な方法は、前記細胞の感度の改善をもたらす：GT1bの添加を伴わない細胞については、167fMに相当する約5U/mlのEC50が見られたが、GT1bが細胞培養培地に添加された細胞については、25fMに相当する約0.75U/mlのEC50が見られ、これは~7倍の感度の増加に相当する。従って、神経毒ポリペプチドに対するヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度は、GT1bの不存在下で培養されたヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞と比較して、GT1bの添加によって増加させ得ることが本発明者らにより見出された。具体的には、ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞の各単一バッチの感度は、前記ガングリオシドと共にインキュベーションすることによって改善することができた。興味深いことに、神経毒ポリペプチドに対する親SiMa細胞の感度もGT1bの添加によって増強することができた。この場合、GT1bで処理されていないSiMa細胞と比較して、前記神経芽腫細胞の感度を10倍増加させることができた。これらの結果は、以下の実施例に示されるとおり、Neuro2aなどの他の神経芽腫細胞が、GT1bと共にインキュベーションされたときに神経毒ポリペプチドに対する感度において同程度の増加を示さなかった、あるいはSH-SY5Y細胞(DSMZ細胞およびECACC細胞)、PC12細胞、またはNG108-15細胞のように、わずかな増加しか示さなかったことから、些細なタスクまたは自明の知見ではなかった。

【0022】

従って、別の態様において、本発明は、神経毒ポリペプチドに対して増加した感度を有する人工多能性幹細胞(IPS)由来神経細胞またはSiMa細胞の作製方法であって、以下のステップ：

a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞またはSiMa細胞を提供するステップ；

b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞またはSiMa細胞を、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ、

を含み、これにより前記神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞また

10

20

30

40

50

はSiMa細胞の感度を増加させる、上記方法に関する。さらなる態様において、この方法により、神経毒ポリペプチドに対して増加した感度を有するSH-SY5Y細胞、PC12細胞、またはNG108-15細胞を製造することができる。

【0023】

さらに別の態様において、上記の本発明の方法は、

c) ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞またはSiMa細胞を、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；および

d) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を發揮することを可能とする条件下で、人工多能性幹細胞由来神経細胞またはSiMa細胞を、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ

をさらに含む。

【0024】

あるいは、上記のとおり、SH-SY5Y細胞、PC12細胞、またはNG108-15細胞を、本発明の方法のこの態様で用いることができる。

【0025】

さらなる態様において、本発明は、神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定する方法であって、以下のステップ：

a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞またはSiMa細胞を、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ；

b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞またはSiMa細胞を、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；

c) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を發揮することを可能とする条件下で、ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞またはSiMa細胞を、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ；および

d) 前記細胞中の神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定するステップを含む、上記方法に関する。

【0026】

本発明のこの方法の他の態様において、神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定するため、SH-SY5Y細胞、PC12細胞、またはNG108-15細胞を代替的に用いることができる。

【0027】

好ましくは、神経毒ポリペプチドに対して増加した感度を有する人工多能性幹細胞由来神経細胞、SiMa細胞、SH-SY5Y細胞、PC12細胞、もしくはNG108-15細胞の作製のための本発明の方法において、または本発明の上記の細胞の感度を増加させるための本発明の方法において、前記人工多能性幹細胞由来神経細胞、SiMa細胞、SH-SY5Y細胞、PC12細胞、またはNG108-15細胞の単一パッチが使用される。SiMa細胞が親SiMa細胞(DSMZ no. ACC164)であることが好ましい。好ましくは、GT1bの濃度は、10~50 μM、より好ましくは30 μMである。人工多能性幹細胞由来神経細胞、SiMa細胞、SH-SY5Y細胞、PC12細胞、またはNG108-15細胞の、GT1bを含む細胞培養培地中での培養は、好ましくは少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも36時間、少なくとも48時間、少なくとも60時間、少なくとも72時間または少なくとも96時間またはさらに長い時間である。神経毒ポリペプチドによる中毒化は、好ましくは少なくとも36時間、48時間、60時間、72時間、96時間またはさらに長い時間行われる。好ましくは、神経毒ポリペプチドはBoNT/Aである。神経毒ポリペプチドに対するGT1b処理された人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度の増加は、GT1bで処理されていない人工多能性幹細胞由来神経細胞と比較して、好ましくは少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、または少なくとも6.7倍である。さらに、神経毒ポリペプチドに対するGT1b処理されたSiMa細胞の感度の増加は、GT1bで処理されていないSiMaと比較して、好ましくは少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、または少なくとも10倍である。神経毒ポリペプチドに対するGT1b処理されたSH-SY5Y細胞の感度の増加は、GT1bで処理されていないSH-SY5Y細胞と比較して、好ましくは少な

10

20

30

40

50

くとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、または少なくとも2倍である。神経毒ポリペプチドに対するGT1b処理されたPC12細胞の感度の増加は、GT1bで処理されていないPC12細胞と比較して、好ましくは少なくとも1.1倍、少なくとも1.2倍、少なくとも1.3倍、または少なくとも1.4倍である。さらに、神経毒ポリペプチドに対するGT1b処理されたNG108-15細胞の感度の増加は、GT1bで処理されていないNG108-15細胞と比較して、好ましくは少なくとも1.1倍、少なくとも1.2倍、少なくとも1.3倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.5倍、または少なくとも1.6倍である。

【0028】

本発明の方法は、分析対象の神経毒含有サンプルの高希釈を可能とする。さらに、本発明の方法は、分析対象のサンプル中の賦形剤および不純物に対してロバストであり、これが前記サンプルの高希釈を可能にする。このようなサンプルの高希釈は、前記潜在的な阻害物質をできる限り低い濃度で適用するため、サンプル中の賦形剤および不純物について重要である。

本発明はまた、以下に関する。

[項目1]

神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の感度を標準化する方法であって、以下のステップ：

a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ；

b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；

c) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を發揮することを可能とする条件下で、ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ；

を含み、これにより神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度を標準化する、前記方法。

[項目2]

神経毒ポリペプチドに対して標準化された感度を有する人工多能性幹細胞(IPS)由来神経細胞の作製方法であって、以下のステップ：

a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを提供するステップ；

b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ

を含み、これにより神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の感度を標準化する、前記方法。

[項目3]

以下のステップ：

c) ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；および

d) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を發揮することを可能とする条件下で、ステップc)の人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ

をさらに含む、項目2に記載の方法。

[項目4]

神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定する方法であって、以下のステップ：

a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞を、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ；

b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞を、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；

c) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を發揮することを可能とする条件下で、ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞を、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養する

10

20

30

40

50

ステップ；および

d) 前記細胞中の神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定するステップを含む、前記方法。

[項目5]

人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチを使用する、項目4に記載の方法。

[項目6]

人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチ中の神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定するステップをさらに含む、項目1または3に記載の方法。

[項目7]

感度の標準化が、GT1bを伴わずに処理された人工多能性幹細胞由来神経細胞の対照バッチと比較した、神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動の低下である、項目1～3のいずれか1項に記載の方法。

[項目8]

神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動の低下が、少なくとも1.5倍または少なくとも2倍の低下である、項目7に記載の方法。

[項目9]

人工多能性幹細胞由来神経細胞が、ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞、好ましくはiCell(登録商標)神経細胞(Cellular Dynamics International社製)である、項目1～8のいずれか1項に記載の方法。

[項目10]

人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチが、継代の数、凍結/解凍サイクルの数、培養条件、保存時間、増殖時間、分化条件、またはそれらの組み合わせにおいて異なる、項目1～3および5～9のいずれか1項に記載の方法。

[項目11]

細胞培養培地が、Neurobasal培地、B27添加物(2%)、およびグルタミンまたはGlutamax(1%)を含む、項目1、2または4に記載の方法。

[項目12]

GT1bが、1～300 μM、好ましくは30 μMの濃度で添加される、項目1～11のいずれか1項に記載の方法。

[項目13]

神経毒ポリペプチドが、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F、BoNT/G、BoNT/HもしくはTeNT、またはこれらのサブタイプである、項目1～12のいずれか1項に記載の方法。

[項目14]

神経毒ポリペプチドの生物学的活性が、免疫ウェスタンブロット解析、SDS-PAGE免疫ブロット解析またはELISAによる、神経毒で切断された基質の定量化によって決定される、項目4または6に記載の方法。

[項目15]

a) 神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度を標準化するための；または

b) 神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動を低下させるための、

GT1bの使用。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】 SiMa細胞を、実施例2に記載のとおり培養して中毒化し、切断SNAP-25と非切断SNAP-25の比をウェスタンブロット解析により決定した。X軸にはボツリヌス神経毒型の濃度が示され、Y軸には切断SNAP-25の相対量、すなわち、切断SNAP-25と非切断SNAP-25の比がプロットされる。丸はGT1bを伴わずに培養されたSiMa細胞を表し、四角は30 μM GT1bと共に培養されたSiMa細胞を表す。GT1bを伴う培養は、約10倍の感度の増加をもたらした。

10

20

30

40

50

【図2】SH-SY5Y細胞を、実施例2に記載のとおり培養して中毒化し、切断SNAP-25と非切断SNAP-25の比をウェスタンブロット解析により決定した。X軸にはボツリヌス神経毒型の濃度が示され、Y軸には切断SNAP-25の相対量、すなわち、切断SNAP-25と非切断SNAP-25の比がプロットされる。丸はGT1bを伴わずに培養されたSH-SY5Y細胞を表し、四角は30 μ M GT1bと共に培養されたSH-SY5細胞を表す。GT1bを伴う培養は、約2倍の感度の増加をもたらした。

【図3】PC12細胞を、実施例2に記載のとおり培養して中毒化し、切断SNAP-25と非切断SNAP-25の比をウェスタンブロット解析により決定した。X軸にはボツリヌス神経毒型の濃度が示され、Y軸には切断SNAP-25の相対量、すなわち、切断SNAP-25と非切断SNAP-25の比がプロットされる。丸はGT1bを伴わずに培養されたPC12細胞を表し、四角は30 μ M GT1bと共に培養されたPC12細胞を表す。GT1bを伴う培養は、約1.4倍の感度の増加をもたらした。

【図4】Neuro2A細胞を、実施例2に記載のとおり培養して中毒化し、切断SNAP-25と非切断SNAP-25の比をウェスタンブロット解析により決定した。X軸にはボツリヌス神経毒型の濃度が示され、Y軸には切断SNAP-25の相対量、すなわち、切断SNAP-25と非切断SNAP-25の比がプロットされる。丸はGT1bを伴わずに培養されたNeuro2A細胞を表し、四角は30 μ M GT1bと共に培養されたNeuro2A細胞を表す。所与の神経毒濃度においては、完全用量反応曲線も、またGT1bによる感度の増加も観察することができなかった。

【図5】NG108-15細胞を、実施例2に記載のとおり培養して中毒化し、切断SNAP-25と非切断SNAP-25の比をウェスタンブロット解析により決定した。X軸にはボツリヌス神経毒型の濃度が示され、Y軸には切断SNAP-25の相対量、すなわち、切断SNAP-25と非切断SNAP-25の比がプロットされる。丸はGT1bを伴わずに培養されたNG108-15細胞を表し、四角は30 μ M GT1bと共に培養されたNG108-15細胞を表す。GT1bを伴う培養は、約1.6倍の感度の増加をもたらした。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本明細書中で使用される「人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞(ニューロン)」は、広義には、神経毒ポリペプチドに特徴的な生物学的特性、すなわち(a)受容体結合、(b)内在化、(c)細胞質ゾル中へのエンドソーム膜を通過する転座、および/または(d)シナプス小胞膜融合に関与するタンパク質のエンドタンパク質分解切断を示す、神経毒ポリペプチドの影響を受けやすい細胞を意味する。従って、本明細書中で言及される「人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞」は神経毒中毒の影響を受けやすい。より具体的には、本明細書中に示される「神経毒中毒の影響を受けやすい」は、神経毒ポリペプチド(例えばBoNT/A)が神経毒基質(例えば、BoNT/Aの基質であるSNAP-25)を切断し、さらに神経毒のその対応する受容体への結合(例えば、BoNT/AのBoNT/A受容体への結合)、神経毒/受容体複合体の内在化、細胞内小胞から細胞質への神経毒軽鎖の転座、および神経毒基質のタンパク質分解切断を包含する全体的な細胞機構を受け得る細胞を意味する。神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定するためのアッセイは当技術分野において周知であり、また本明細書中の他の箇所でも記載されている(例えば、Pellettら、Withemarsら、上記引用箇所を参照)。当業者に理解されたとおり、神経毒感受性細胞は、好ましくは最初に神経毒を取り込み、その後上記の全体的な細胞機構を受ける可能性がある。本明細書中で使用される神経毒感受性細胞は、例えば、約100ナノモル(nM)、約10nM、約1nM、約500ピコモル(pM)、約400pM、約300pM、約200pM、約100pM、約90pM、約80pM、約70pM、約60pM、約50pM、約40pM、約30pM、約20pM、約10pM、約9pM、約8pM、約7pM、約6pM、約5pM、約4pM、約3pM、約2pM、約1pM、約0.5pM、約0.1pM、約50fM、約40fM、約30fM、約20fM、約10fM、約5fM、約4fM、約3fM、約2fMまたは約1fMの神経毒ポリペプチドを取り込むこともできるし、上記の値の1つに満たない神経毒ポリペプチドを取り込むこともできる。100pMを超えるEC50値は、文献中で報告されている。定義によれば、神経毒中毒の影響を受けやすい細胞は、少なくとも1つの神経毒受容体および少なくとも1つの神経毒基質を発現するか、またはこれらが発現するように操作されていなければならない。神経毒の受容体および基質は、当技術分

野において記載されている。従って、前記細胞は、好ましくは本明細書中で定義される生物学的に活性なまたは成熟した神経毒ポリペプチドの影響を受けやすい。好ましくは、本明細書中で使用される神経毒感受性細胞は、例えば、約1nM以下、500pM以下、約400pM以下、約300pM以下、約200pM以下、約100pM以下、約90pM以下、約80pM以下、約70pM以下、約60pM以下、約50pM以下、約40pM以下、約30pM以下、約20pM以下、約10pM以下、約9pM以下、約8pM以下、約7pM以下、約6pM以下、約5pM以下、約4pM以下、約3pM以下、約2pM以下、約1pM以下、約0.9pM以下、約0.8pM以下、約0.7pM以下、約0.6pM以下、約0.5pM以下、約0.4pM以下、約0.3pM以下、約0.2pM以下、約0.1pM、約50fM以下、約40fM以下、約30fM以下、約20fM以下、約10fM以下、約5fM以下、約4fM以下、約3fM以下、約2fM以下、またはさらに約1fM以下の神経毒ポリペプチドによる神経毒中毒の影響を受けやすい。例えば、本発明の方法においてGT1bが細胞培養培地に外部添加された人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞について、約3fMの極めて低いEC50値が本発明者らによって見出された。当技術分野において知られているとおり、「半最大有効濃度(EC50)」は、ある特定の暴露時間後にベースラインと最大値との間の中間の反応を誘導する薬物、抗体または毒物の濃度を指す。EC50は、薬物の効力の尺度として一般的に用いられている。従って、段階的用量反応曲線のEC50は、その最大効果の50%が見られる化合物の濃度を表す。量子的用量反応曲線のEC50は、暴露期間後に集団の50%が反応を示す化合物の濃度を表す。神経毒中毒の影響を受けやすいおよび/または神経毒取り込み能力を有する細胞または細胞株(すなわち本明細書中で定義される神経毒感受性細胞)の同定方法は、当技術分野において公知である(例えば、US 2012/0122128 A1を参照)。ある態様において、神経毒ポリペプチドの生物学的活性は、上述の生物学的特性の全てから生じる。今までのところ、本明細書中の他の箇所で見られるとおり、先行文献には、神経毒の生物学的活性の決定に使用することができる神経毒に対して十分に高い感度を有する幾つかの細胞ベースのアッセイのみが記載されている。神経毒の生物学的活性を評価するためのin vivoアッセイとしては、例えば、既に言及したマウスLD₅₀アッセイ、ならびにPearceらおよびDressierらによって記載されるex vivoマウス片側横隔膜アッセイ(Pearce 1994, Toxicol. Appl. Pharmacol. 128: 69-77およびDressier 2005, Mov. Disord. 20: 1617-1619を参照)が挙げられる。当業者に知られているとおり、神経毒の生物学的活性は、一般的には、マウスLD₅₀単位(MU)で表される。1MUは、腹腔内注射後に特定のマウス集団の50%を死滅させる神経毒成分の量である。

【0031】

より具体的には、本明細書中で使用される「人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞」は、文献中に記載されている(例えば、Whitemarshら、上記引用箇所; WO 2012/135621; US 2010/0279403およびUS 2010/0216181を参照)。特に、ヒト人工多能性幹細胞(hiPSC)は、in vitro毒素産生性試験のための様々な分化細胞モデルの提供にかなり有望である。hiPSC由来神経細胞は、例えばCellular Dynamics International社(Madison, WI)により分化および低温保存され、主に アミノ酪酸作動性神経細胞とグルタミン酸作動性神経細胞のほぼ純粋な汎神経細胞集団からなる。前記hiPSC由来神経細胞は、iCell(登録商標)神経細胞として知られている。供給者によれば、ウェスタンブロットおよび定量的PCRデータは、これらの神経細胞が、BoNT中毒に必要な受容体および基質を全て発現することを示した。BoNT/A中毒研究は、hiPSC由来神経細胞が、高感度で、生物学的に活性なBoNT/Aを再現性良く且つ定量的に検出することを示した。さらに、BoNT血清型B、C、EおよびBoNT/A複合体の定量的検出が示され、抗体防御研究を通してBoNT/A特異性が確認された。初代ラット脊髄細胞およびhiPSC由来神経細胞を用いたBoNT検出の直接比較は、hiPSC由来神経細胞の、同等のまたは増加した感度、より急勾配の用量反応曲線およびより完全なSNAREタンパク質標的切断を示した(Whitemarshら、上記引用箇所を参照)。これらのデータは、hiPSCに由来する神経細胞が、BoNT効力測定、中和抗体検出のため、さらに機構的研究のための、理想的且つ高感度のプラットフォームを提供することを示唆している。本発明の方法のある態様において、人工多能性幹細胞由来神経細胞は、哺乳動物(例えば、齧歯類、カニクイザル、マカクまたはチンパンジー)の人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞、好ましくはヒト人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞である。好ましくは、前記人工多能性幹

10

20

30

40

50

細胞由来神経細胞は、iCell(登録商標)神経細胞(Cellular Dynamics International, Inc. (CDI)社)である。供給者によれば、iCell(登録商標)神経細胞は、ヒト人工多能性幹(iPS)細胞に由来し、前臨床的創薬、神経毒性試験および疾患研究のための独自のin vitroシステムを提供する。さらに、iCell(登録商標)神経細胞は、成熟神経細胞の典型的な表現型の特徴および機能性を有する高品質且つ非常に純粋なヒト神経細胞を提供する。歴史的に、in vitroモデルは、初期段階疾患のモデリングの間の使用および同定における候補、ならびに薬物動態試験および安全性試験を含む創薬プロセスにおいて重要な役割を果たしてきた。ヒト脳の複雑性により、科学者らは現在、齧歯類の組織および形質転換細胞株から単離された初代細胞などの簡略化されたモデルを使用している。生物学的関連性、再現性、およびスケラビリティの問題が生じる可能性があり、下位モデルへの依存は、神経毒の業界において後期臨床試験または市場投入後まで観察されない薬物誘導性神経毒性をもたらし得る。iCell(登録商標)神経細胞はこれらの制限を克服し、前臨床的神経毒安全性試験のための、ロバスタな、十分に特徴づけられた、再現性の高いin vitroモデルを提供する。iCell(登録商標)神経細胞はヒトiPS細胞から高分化され、神経細胞的な特徴および機能を示す。iCell(登録商標)神経細胞は非常に純粋であり、生物学的に関連性があり且つ再現性のある結果を提供する。iCell(登録商標)神経細胞は、培養において数週間生存可能で、また純粋なままであり、急性反応および亜慢性反応の両方の評価を可能にする。さらに、iCell(登録商標)神経細胞は、最適な細胞性能のために特に処方された細胞培養培地と共に低温保存して輸送される。供給者の使用説明書によれば、これらを解凍して使用するの簡単である。しかし、iCell(登録商標)神経細胞の異なるバッチは、神経毒ポリペプチドに対する前記バッチの感度について大幅に異なることが、本発明者らによって見出された。その結果、異なるバッチについて、神経毒の生物学的活性の測定値の強い発散が得られた。神経毒ポリペプチドに対するiPS由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動を低下させるため、本発明の方法に従って、細胞培養培地へのGT1bの外部添加を有利に用いることができる。

10

20

【0032】

本明細書中で使用される単数形(「a」、「an」および「the」)は、文脈が明らかに別途指示しない限り、単数参照と複数参照の両方を含む。例として、「細胞("a cell")」は、1つの細胞、または2つ以上の細胞を指す。

【0033】

本明細書中で使用される用語「約」は、記載される項目、数、パーセント、または用語の値を限定する場合、記載される項目、数、パーセント、または用語の値のプラスマイナス10パーセント、9パーセント、8パーセント、7パーセント、6パーセント、5パーセント、4パーセント、3パーセント、2パーセントまたは1パーセントの範囲を指す。好ましいのはプラスマイナス10パーセントの範囲である。

30

【0034】

本明細書中で使用される用語「含む("comprising"、"comprises")」および「からなる("comprised of")」は、「含む("including"、"includes")」または「含有する("containing"、"contains")」と同義であり、包括的または非制限的であり、付加的な、列挙されていない構成員、要素または方法ステップを除外しない。明らかに、用語「含む("comprising")」は、用語「からなる("consisting of")」を包含する。さらに具体的には、本明細書中で使用される用語「含む("comprise")」は、特許請求の範囲が、全てのリストされた要素または方法ステップを包含するだけでなく、付加的な、無名の要素または方法ステップも含み得ることを意味する。例えば、ステップa)、b)およびc)を含む方法は、その最も狭い意味において、ステップa)、b)およびc)からなる方法を包含する。表現「からなる("consisting of")」は、組成物(または装置、もしくは方法)が、列挙された要素(またはステップ)は有するが、それ以上は有しないことを意味する。対照的に、用語「含む("comprises")」は、ステップa)、b)およびc)に加えてさらなるステップ(例えば、ステップd)およびe)を含む方法も包含し得る。

40

【0035】

50

本明細書中で「10～50 μMの濃度のGT1b」などの数値範囲が用いられる場合、この範囲は、10 μMおよび50 μMだけでなく、10 μM～50 μMの任意の数値、例えば、15 μM、20 μM、25 μM、30 μM、35 μM、40 μMおよび45 μMのGT1bも含む。

【0036】

本明細書中で使用される用語「in vitro」は、動物またはヒトの体の外側、または外部を表す。本明細書中で使用される用語「in vitro」は、「ex vivo」を含むと理解されるべきである。用語「ex vivo」は、典型的には、動物またはヒトの体から取り出され、体外（例えば、培養容器中）で維持または増殖された組織または細胞を指す。本明細書中で使用される用語「in vivo」は、動物またはヒトの体の内側、または内部を表す。

【0037】

本明細書中で使用される用語「分化（"differentiation"、"differentiating"）または分化した（"differentiated"）」は、特殊化していないかまたは比較的それほど特殊化していない細胞が、比較的より特殊化した細胞となる過程を表す。細胞個体発生の文脈において、形容詞「分化した（"differentiated"）」は相対語である。従って、「分化した細胞（"differentiated cell"）」は、それが比較される細胞よりも特定の発生経路をさらに下方に進行した細胞である。分化した細胞は、例えば、終末分化細胞（すなわち、生物の様々な組織および器官において特殊化した機能を担い、有糸分裂後であり得るが必ずしも有糸分裂後でなくてよい、完全に特殊化した細胞）であり得る。例えば、iCell（登録商標）神経細胞はヒトiPS細胞から終末分化し、神経細胞的な特徴および機能を示す。別の例では、分化細胞は、さらに増殖および/または分化し得る分化系統中の前駆細胞であってもよい。同様に、細胞は、それが比較される細胞よりも特定の発生経路をさらに下方に進行した場合、その細胞は「比較的より特殊化して」おり、ここで後者の比較される細胞は、従って「特殊化していない」かまたは「比較的それほど特殊化していない」と考えられる。比較的より特殊化した細胞は、特殊化していない細胞または比較的それほど特殊化していない細胞と、1つ以上の明らかな表現型の特徴（例えば、特定の細胞成分または産物（例えば、RNA、タンパク質、特異的細胞マーカーまたは他の物質）の発現の存在、不存在またはレベル、特定の生化学経路の活性、形態的外観、増殖能および/または動態、分化ポテンシャルおよび/または分化シグナルに対する応答等など）が異なる可能性があり、ここにかかる特徴は、比較的より特殊化した細胞の、前記発生経路に沿ったさらなる進行を示す。

【0038】

本明細書中で使用される用語「神経毒ポリペプチド」は、ボツリヌス菌神経毒および破傷風菌神経毒（またはクロストリジウム神経毒）、すなわちボツリヌス毒素(BoNT)および破傷風毒素(TeNT)を表す。最近、新たなボツリヌス毒素型、すなわちBoNT/Hが同定された(B arashおよびArnon, J. Infect. Dis. (2014), 209 (2) : 183-191を参照)。より具体的には、前記用語は、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F、BoNT/G、BoNT/Hおよび破傷風神経毒(TeNT)、またはこれらのサブタイプを包含する。例えば、BoNT/Aのサブタイプとして、BoNT/A1、BoNT/A2、BoNT/A3、BoNT/A4、およびBoNT/A5が挙げられる。BoNT/Bサブタイプは、例えば、BoNT/B1、BoNT/B2、BoNT/B3、BoNT/B4、BoNT/B5、BoNT/B6およびBoNT/B7を包含する。BoNT/Cサブタイプは、例えば、BoNT/C1-1およびBoNT/C1-2を含む。また、BoNT/D-Cサブタイプも包含される。BoNT/Eサブタイプとしては、例えば、BoNT/E1、BoNT/E2、BoNT/E3、BoNT/E4、BoNT/E5、BoNT/E6、BoNT/E7およびBoNT/E8が挙げられる。さらに、BoNT/Fサブタイプは、例えば、BoNT/F1、BoNT/F2、BoNT/F3、BoNT/F4、BoNT/F5、BoNT/F6、およびBoNT/F7を含む。神経毒ポリペプチドならびに、特にその軽鎖および重鎖は、上記のボツリヌス神経毒の抗原的に異なる血清型の1つに由来し得る。ある態様において、神経毒ポリペプチドの前記軽鎖および重鎖は、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F、BoNT/G、BoNT/HまたはTeNTからなる群から選択される神経毒の軽鎖および重鎖である。別の態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号1(BoNT/A)、配列番号3(BoNT/B)、配列番号5(BoNT/C1)、配列番号7(BoNT/D)、配列番号9(BoNT/E)、配列番号11(BoNT/F)、配列番号13(BoNT/G)または配列番号15(TeNT)に示される核酸配列を

10

20

30

40

50

含む前記神経毒ポリペプチドをコードする。さらに、ある態様において、配列番号2(BoNT/A)、配列番号4(BoNT/B)、配列番号6(BoNT/C1)、配列番号8(BoNT/D)、配列番号10(BoNT/E)、配列番号12(BoNT/F)、配列番号14(BoNT/G)または配列番号16(TeNT)のいずれか1つに示されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドが包含される。本発明の手段および方法のある態様において、さらに包含されるのは、配列番号2(BoNT/A)、配列番号4(BoNT/B)、配列番号6(BoNT/C1)、配列番号8(BoNT/D)、配列番号10(BoNT/E)、配列番号12(BoNT/F)、配列番号14(BoNT/G)および配列番号16(TeNT)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなる神経毒ポリペプチドである。BoNT/Hの対応する配列は、Doverらにより、*J. Infect. Dis.* (2014), 209 (2) : 192-202の刊行物中に示される。また、前記BoNT/H配列は、本発明の手段および方法の具体的態様にも包含される。

10

【 0 0 3 9 】

別の態様において、前記ポリヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチド置換、欠失および/または付加を含む上述のポリヌクレオチドの変異体であり、この変異体は、さらに別の態様において、1つ以上のアミノ酸置換、欠失および/または付加を有するポリペプチドを生じ得る。さらに、変異体ポリヌクレオチドは、別の態様において、配列番号1、3、5、7、9、11、13もしくは15のいずれか1つに示される(好ましくは完全)核酸配列またはBoNT/Hの核酸と少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である核酸配列変異体、あるいは配列番号2、4、6、8、10、12、14もしくは16のいずれか1つに示される(好ましくは完全)アミノ酸配列またはBoNT/Hのアミノ酸配列と少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列をコードする核酸配列変異体を含むものでなければならない。本明細書で用いられる用語「同一である」とは、配列が、最上位の一致が得られるように整列された2つの核酸配列または2つのアミノ酸配列間の同一アミノ酸の数を決定することによって特徴付けられる配列同一性を指す。配列同一性は、公開された技術または、例えば、BLASTP、BLASTNまたはFASTAなどのコンピュータプログラム中で体系化された方法を用いて計算することができる(Altschul 1990, *J Mol Biol* 215, 403)。一態様において、同一性パーセントの値は、全アミノ酸配列にわたって計算される。異なる配列を比較するため、様々なアルゴリズムに基づく一連のプログラムが当業者に利用可能である。これに関連して、NeedlemanおよびWunschまたはSmithおよびWatermanのアルゴリズムが特に信頼できる結果を与える。配列アラインメントを実行するために、GCGソフトウェアパッケージ(Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)の一部であるPileUpプログラム(Higgins 1989, *CABIOS* 5, 151)またはGapおよびBestFitプログラム(Needleman 1970, *J Mol Biol* 48; 443; Smith 1981, *Adv Appl Math* 2, 482)を用いることができる。パーセント(%)で上記された配列同一性の値は、本発明の別の態様においては、別途特定しない限り、配列アラインメントのための標準設定として常に用いられなければならない以下の設定：ギャップ重量：50、長さ重量：3、平均一致：10.000および平均不一致：0.000を用いて配列領域全体にわたってGAPプログラムを用いて決定される。本明細書中で言及されるクロストリジウム神経毒の変異体としては、例えば、ヒトの操作の助けによって産生されるクロストリジウム神経毒、例えば、限定するものではないが、例えばランダム変異導入法もしくは合理的設計を用いた遺伝子操作法または組換え法によって産生されたクロストリジウム神経毒、エンドまたはエキソタンパク質分解酵素などの酵素の活性により改変されたクロストリジウム神経毒の酵素改変変異体、あるいは化学合成によって産生されたクロストリジウム神経毒が挙げられる。「遺伝子操作」は、クロストリジウム神経毒をコードする遺伝子(すなわち、DNAまたはmRNAのような各核酸)を改変することによって任意の血清型/サブタイプの天然のクロストリジウム神経毒を改変するための、当技術分野において公知の方法を指す。神経

20

30

40

50

毒ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの遺伝子操作のための組換え法または神経毒ポリペプチドは、当技術分野において十分に記載されている（例えば、Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 第3版 Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratoryを参照）。本明細書中で使用される神経毒ポリペプチド変異体は、化学的に改変された神経毒ポリペプチドをさらに包含する。本明細書中で使用される「化学的改変」は、一般的に、任意の血清型またはサブタイプの天然のまたは組換えのクロストリジウム神経毒を化学反応等によって改変するための当技術分野において公知の方法を指し；とりわけ、クロストリジウム神経毒のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加または翻訳後修飾を指す。化学的に改変された神経毒ポリペプチドは、ピルビン酸化(pyruvation)、リン酸化、硫酸化、脂質化、ペグ化、グリコシル化および/または10
1個のアミノ酸もしくは例えば約2～約500個のアミノ酸を含むポリペプチドの化学的付加によって改変されたポリペプチドであり得る。例えば、ヒアルロン酸、またはポリビニルピロリドンもしくはポリエチレングリコール、あるいはそれらの混合物を神経毒ポリペプチドに組み込むことによって、クロストリジウム神経毒、または化学的改変もしくは遺伝子操作によってクロストリジウム毒素から誘導される毒素を安定化させることができる。ある態様において、上述の変異体ポリヌクレオチドのそれぞれが、1つ以上の、また別の態様においては全ての、各神経毒ポリペプチド（すなわちBoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/F、BoNT/G、BoNT/Hまたは破傷風神経毒素(TeNT)）の生物学的特性を保持するポリペプチドをコードする。当業者であれば、プロセシングされていない前駆体が若干の生物学的機能を発揮することが可能であり、または部分的に活性であると考え得るとしても、タンパク質分解活性化後に初めて、完全な生物学的活性が維持されることを理解するであろう。本明細書中で使用される「生物学的活性」は、(a) 受容体結合、(b) 内在化、(c) 細胞質ゾル中へのエンドソーム膜を通過する転座、および/または(d) シナプス小胞膜融合に関与するタンパク質のエンドタンパク質分解切断を指す。より具体的には、神経毒(例えばBoNT/A)が神経毒基質(例えば、SNAP-25)を切断する全体的な細胞機構は、神経毒のその対応する受容体への結合(例えば、BoNT/AのBoNT/A受容体への結合)、神経毒/受容体複合体の内在化、細胞内小胞から細胞質内への神経毒軽鎖の転座、および神経毒基質のタンパク質分解切断を包含する。神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定するためのin vitroおよびin vivoアッセイは当技術分野において周知である。生物学的活性を評価するためのin vivoアッセイとしては、Pearceら(Pearce 1994, Toxicol Appl Pharmacol 128: 69-77)およびDresslerら(Dressler 2005, Mov Disord 20: 1617-1619, Keller 2006, Neuroscience 139: 629-637)により記載されるマウスLD50アッセイおよびex vivoマウス片側横隔膜アッセイが挙げられる。生物学的活性は、一般的にマウス単位(MU)で表される。本明細書中で使用される1MUは、腹腔内注射後に特定のマウス集団の50%を死滅させる神経毒成分の量(すなわち、マウスi.p. LD50)である。さらなる態様において、変異体ポリヌクレオチドは、改善されたまたは変化した生物学的特性を有する神経毒をコードすることが可能であり、例えば、上記変異体ポリヌクレオチドは、酵素認識について改善された切断部位を含んでいてもよいし、受容体結合または上記に特定される任意の他の特性について改善されていてもよい。一部の態様において、神経毒ポリペプチドはサンプル中に含まれ得る。サンプルは、例えば、臨床サンプル、生物学的サンプル、食物サンプル、医薬サンプルまたは毒物学的サンプル、抗体サンプル等であり得る。40

【0040】

従って、本明細書中で使用される用語「神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定する」は、神経毒タンパク質の生物学的活性、すなわち(a) 受容体結合、(b) 内在化、(c) 細胞質ゾル中へのエンドソーム膜を通過する転座、および/または(d) シナプス小胞膜融合に関与するタンパク質のエンドタンパク質分解切断、を測定することを意味する。

【0041】

本明細書中で使用される用語「量」は、例えば、神経毒ポリペプチドまたは神経毒基質ポリペプチドの絶対量、前記ポリペプチドの相対量または濃度、ならびにそれらに相関するかまたはそれらから誘導され得る任意の値またはパラメータを包含する。50

【0042】

例えば神経毒ポリペプチドまたは神経毒基質ポリペプチドの「量を決定する」という用語は、例えば神経毒ポリペプチドまたは神経毒基質ポリペプチドの絶対量、相対量または濃度を、定量的または半定量的様式で測定することに関する。好適な検出のための基準は、当業者に周知である。神経毒ポリペプチドまたは神経毒基質ポリペプチドの量の決定は、ある態様において、標準溶液を所定量の神経毒ポリペプチドまたは神経毒基質ポリペプチドと共に適用することによる本方法の較正も必要とすることが理解されるだろう。このような較正を行う方法は、当業者に周知である。

【0043】

本発明の方法のある態様において、人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞は、GT1bを含む細胞培養培地中で培養される。ガングリオシドGT1bは神経毒ポリペプチドに結合し、神経細胞に対する神経毒の選択性を潜在的に仲介する。従って、GT1bを、神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の感度を標準化するために使用することができる。本発明者らによって、iPS由来神経細胞へのGT1bの外部添加が、GT1bを伴わずに処理されたiPS由来神経細胞の対照バッチと比較して、神経毒ポリペプチドに対する前記iPS由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動を大幅に低下させることが示された。好ましくは、前記GT1bは、約10~約50 μ Mの濃度で、すなわち約10 μ M、約15 μ M、約20 μ M、約25 μ M、約30 μ M、約35 μ M、約40 μ M、約45 μ M、または約50 μ Mの濃度で、より好ましくは約30 μ Mの濃度で存在する。

【0044】

さらなる態様において、本発明は、神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定する方法であって、以下のステップ：

a) 人工多能性幹細胞由来神経細胞を、GT1bを含む細胞培養培地中で少なくとも3時間培養するステップ；

b) ステップa)の人工多能性幹細胞由来神経細胞を、神経毒ポリペプチドと接触させるステップ；

c) 神経毒ポリペプチドがその生物学的活性を發揮することを可能とする条件下で、ステップb)の人工多能性幹細胞由来神経細胞を、GT1bの存在下で少なくとも24時間培養するステップ；および

d) 前記細胞中の神経毒ポリペプチドの生物学的活性を決定するステップを含む、上記方法に関する。

【0045】

本発明のこの方法の具体的態様において、本明細書中の他の箇所で定義されるとおり、人工多能性幹細胞由来神経細胞の異なるバッチが使用される。

【0046】

本発明の方法の一態様において、(神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞由来神経細胞の)「感度(感受性)の標準化」は、同じ条件下であるがGT1bを伴わずに処理された人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の対照バッチと比較した、神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動の低下である。

【0047】

別の態様において、神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動の低下は、同じ条件下であるがGT1bを伴わずに処理された人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の対照バッチと比較して、少なくとも1.1倍、少なくとも1.2倍、少なくとも1.3倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.5倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.7倍、少なくとも1.8倍、少なくとも1.9倍、少なくとも2倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、またはさらに少なくとも3倍の低下である。

【0048】

本発明の方法の他の態様において、人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞は、ヒト人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞である。好ましくは、前記人工多能性幹細胞(iPS)由来神

10

20

30

40

50

経細胞は、iCell(登録商標)神経細胞(Cellular Dynamics International社;上記)である。

【0049】

本発明の方法の一態様において、人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の異なるバッチは、継代の数、凍結/解凍サイクルの数、培養条件、保存時間、増殖時間、分化条件、またはそれらの組み合わせにおいて異なる。

【0050】

本発明の方法の別の態様において、細胞培養培地は、Neurobasal培地、B27添加物(2%)、およびグルタミンまたはGlutamax(1%)を含む。任意選択により、細胞培養培地は、抗生物質(1%)、N2添加物(1%)および/または血清アルブミン(0.2%)を含み得る。

10

【0051】

本発明の方法のさらなる態様において、GT1bは、1~300 μM、好ましくは30 μMの濃度で添加される。

【0052】

本発明の方法の別の態様において、神経毒ポリペプチドは、BoNT/A、BoNT/B、BoNT/C1、BoNT/D、BoNT/E、BoNT/G、BoNT/F、BoNT/HまたはTeNT、またはこれらのサブタイプである。

【0053】

本発明の方法のなおさらなる態様において、神経毒ポリペプチドの生物学的活性は、免疫ウェスタンプロット解析、SDS-PAGE免疫プロット解析またはELISAによる、神経毒により切断された基質の定量によって決定される(例えば、Pellettら(2010), J. Pharmacol. Toxicol. Methods 61, 304-310を参照)。

20

【0054】

さらなる態様において、本発明は、

a) 神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の異なるバッチの感度を標準化するため;または

b) 神経毒ポリペプチドに対する人工多能性幹細胞(iPS)由来神経細胞の異なるバッチの感度の変動を低下させるための、

GT1bの使用に関する。

【0055】

本発明の方法および使用の具体的態様は、以下の実施例に示される。

30

【0056】

ここで本発明は以下の実施例によって例示されるが、実施例は本発明の範囲を限定するものと解してはならない。

【実施例】

【0057】

実施例1:

Cellular Dynamics International社(CDI)の使用者の取扱説明書に従い、iCell(登録商標)神経細胞を解凍し、4つの異なる細胞バッチから、96ウェルプレート上にプレーティングした。プレーティングの24時間(h)後、培地を、使用者の取扱説明書に記載される新たな維持培地、または30 μM GT1bを添加した同培地のいずれかによって置換した。

40

【0058】

さらに72hのインキュベーション時間後、培地を除去し、様々な濃度のBoNT/Aを含有する新たな培地で置換した。細胞をGT1b含有培地上で増殖させた場合、新たな培地も30 μM GT1bを含有した。

【0059】

中毒化の開始から72h後、培地を吸引し、25 μlのSDSサンプル緩衝液の添加により細胞を溶解させた。

【0060】

Pellettら, 2010 (上記引用箇所)に記載されるとおり、切断SNAP-25パーセントを、SDS

50

-PAGE免疫プロット解析によって決定した。

【 0 0 6 1 】

EC50(SNAP-25の最大切断の半分を生じさせるBoNT/Aの濃度)は、切断SNAP-25パーセントをBoNT/A濃度に対してプロットすることによって計算した。

【 0 0 6 2 】

GT1bの添加を伴う、またGT1bの添加を伴わない、異なる細胞バッチの結果として得られたEC50値は表1に示される。

【 0 0 6 3 】

【表1】

表 1 :

	GT1b を伴わ ない EC50	GT1b を伴う EC50
バッチ 02	2.84 U/ml	0.65 U/ml
バッチ 03	5.37 U/ml	0.89 U/ml
バッチ 04	6.40 U/ml	0.77 U/ml
バッチ 05	5.47 U/ml	0.68 U/ml
平均値	5.02 U/ml	0.75 U/ml
RSD	30.3%	14.6%

10

20

【 0 0 6 4 】

EC50を~5.0 U/mLから~0.75 U/mLに低下させる、GT1bの添加から生じるより高い感度にも関わらず、上記バッチのEC50値の相対標準偏差は、~30%から~15%に低下する。

【 0 0 6 5 】

実施例2 :

SiMa細胞の培養および分化(図1を参照) : SiMa細胞を含むバイアルを解凍し、培養培地(90%RPMI 1640 + 10%熱不活性化(h.i.)FBS + 2mM L-グルタミン + / - 30 μM GT1b)中で30,000細胞/mLの最終密度まで再懸濁した。上記の細胞を、ポリ-D-リシン被覆96ウェルマイクロタイタープレート上に3,000細胞/ウェルで播種し、37 °C、95%O₂/5%CO₂で飽和水蒸気雰囲気下、72時間インキュベートした。72時間後、培地を、 1.0×10^{-9} ~ 5.65×10^{-15} Mの濃度のボツリヌス神経毒A型を含む無血清培地(MEM + 2%B27 + 1%N2 + 2%非必須アミノ酸 + 2mM L-グルタミン + / - 30 μM GT1b)に交換した。上記の72時間のインキュベーション後、培地を除去し、細胞を溶解緩衝液(20mM Tris/HCl、20mM NaCl、2mM MgCl₂、0.5%Triton X-100、5U/mLベンゾナーゼ、pH8.0)中で再懸濁し、RotiLoad 1 SDSサンプル緩衝液と混合し、マウスで産生した抗体(Synaptic Systems社、SySy111111)を用いて、Whitemarshら(2012), Toxicol. Sci. 126, 426-35に記載されるような、切断SNAP-25/非切断SNAP-25の比を決定するためのウェスタンプロット解析に供した。

30

【 0 0 6 6 】

SH-SY5Y細胞の培養および分化(図2を参照) : SH-SY5Y細胞を含むバイアルを解凍し、培養培地(85%MEM : F12 + 15%熱不活性化FBS + / - 30 μM GT1b)中で60,000細胞/mLの最終密度まで再懸濁した。上記の細胞を、非被覆96ウェルマイクロタイタープレート上に6,000細胞/ウェルで播種し、37 °C、95%O₂/5%CO₂で飽和水蒸気雰囲気下、24時間インキュベートした。次いで、培地に神経成長因子(100ng/ml)とアフィジコリン(0.3mM) + / - 30 μM GT1bを添加した。この培地を2~3日毎に交換した。17日間のインキュベーション後、培地を、 1.0×10^{-9} ~ 5.65×10^{-15} Mの濃度のボツリヌス神経毒A型を含む新たな培地に交換した。上記の72時間のインキュベーション後、培地を除去し、細胞を溶解緩衝液(20mM Tris/HCl、20mM NaCl、2mM MgCl₂、0.5%Triton X-100、5U/mLベンゾナーゼ、pH8.0)中で再懸濁し、RotiLoad 1 SDSサンプル緩衝液と混合し、マウスで産生した抗体(Synaptic Systems社、SySy111111)を用いて、Whitemarshら(2012), Toxicol. Sci. 126, 426-35に記載される

40

50

ような、切断SNAP-25/非切断SNAP-25の比を決定するためのウェスタンブロット解析に供した。

【 0 0 6 7 】

PC12細胞の培養および分化(図3を参照) : PC12細胞を含むバイアルを解凍し、培養培地(85% RPMI 1640 + 10% ウマ血清 + 5% 熱不活性化FBS + / - 30 μ M GT1b)中で25,000細胞/mLの最終密度まで再懸濁した。上記の細胞を、コラーゲン被覆96ウェルマイクロタイタープレート上に2,500細胞/ウェルで播種し、37 $^{\circ}$ C、95%O₂/5%CO₂で飽和水蒸気雰囲気下、72時間インキュベートした。次いで、培地に神経成長因子(100ng/ml) + / - 30 μ M GT1bを添加した。この培地を2~3日毎に交換した。11日間のインキュベーション後、培地を $1.0 \times 10^{-9} \sim 5.65 \times 10^{-15}$ Mの濃度のボツリヌス神経毒A型を含む新たな培地に交換した。上記の72時間のインキュベーション後、培地を除去し、細胞を溶解緩衝液(20mM Tris/HCl、20 mM NaCl、2mM MgCl₂、0.55% Triton X-100、5U/mLベンゾナーゼ、pH8.0)中で再懸濁し、RotiLoad 1 SDSサンプル緩衝液と混合し、マウスで産生した抗体(Synaptic Systems社、SySy111111)を用いて、Whitemarshら(2012), Toxicol. Sci. 126, 426-35に記載されるような、切断SNAP-25/非切断SNAP-25の比を決定するためのウェスタンブロット解析に供した。

10

【 0 0 6 8 】

Neuro2A細胞の培養および分化(図4を参照) : Neuro2A細胞を含むバイアルを解凍し、培養培地(90% DMEM + 10% 熱不活性化FBS + / - 30 μ M GT1b)中で20,000細胞/mLの最終密度まで再懸濁した。上記の細胞を、96ウェルマイクロタイタープレート上に2,000細胞/ウェルで播種し、37 $^{\circ}$ C、95%O₂/5%CO₂で飽和水蒸気雰囲気下、24時間インキュベートした。培地を無血清DMEM + / - 30 μ M GT1bで交換し、その後37 $^{\circ}$ Cで3日間インキュベーションした。次いで、培地を、0.2% BSA + / - 30 μ M GT1bおよび $1.0 \times 10^{-9} \sim 5.65 \times 10^{-15}$ Mの濃度のボツリヌス神経毒A型を含む新たな無血清培地に交換した。上記の72時間のインキュベーション後、培地を除去し、細胞を溶解緩衝液(20mM Tris/HCl、20mM NaCl、2mM MgCl₂、0.5% Triton X-100、5U/mLベンゾナーゼ、pH8.0)中で再懸濁し、RotiLoad 1 SDSサンプル緩衝液と混合し、マウスで産生した抗体(Synaptic Systems社、SySy111111)を用いて、Whitemarshら(2012), Toxicol. Sci. 126, 426-35に記載されるような、切断SNAP-25/非切断SNAP-25の比を決定するためのウェスタンブロット解析に供した。

20

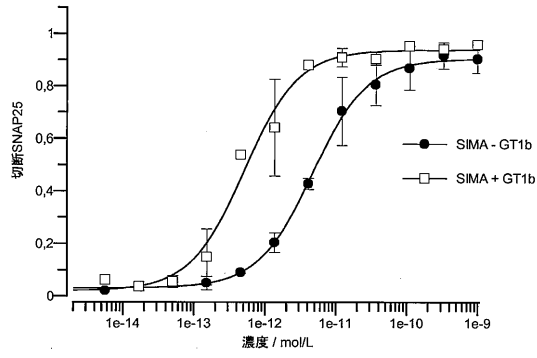
【 0 0 6 9 】

NG108-15細胞の培養および分化(図5を参照) : SH-SY5Y細胞を含むバイアルを解凍し、培養培地(90% DMEM + 10% 熱不活性化FBS + / - 30 μ M GT1b)中で60,000細胞/mLの最終濃度まで再懸濁した。上記の細胞を、96ウェルマイクロタイタープレート上に6,000細胞/ウェルで播種し、37 $^{\circ}$ C、95%O₂/5%CO₂で飽和水蒸気雰囲気下、72時間インキュベートした。次いで、培地にジブチリル-cAMP(1mM) + / - 30 μ M GT1bを添加した。この培地を2~3日毎に交換した。5日間のインキュベーション後、培地を、 $1.0 \times 10^{-9} \sim 5.65 \times 10^{-15}$ Mの濃度のボツリヌス神経毒A型を含む新たな培地に交換した。上記の72時間のインキュベーション後、培地を除去し、細胞を溶解緩衝液(20mM Tris/HCl、20mM NaCl、2mM MgCl₂、0.5% Triton X-100、5U/mLベンゾナーゼ、pH8.0)中で再懸濁し、RotiLoad 1 SDSサンプル緩衝液と混合し、マウスで産生した抗体(Synaptic Systems社、SySy111111)を用いて、Whitemarshら(2012), Toxicol. Sci. 126, 426-35に記載されるような、切断SNAP-25/非切断SNAP-25の比を決定するためのウェスタンブロット解析に供した。

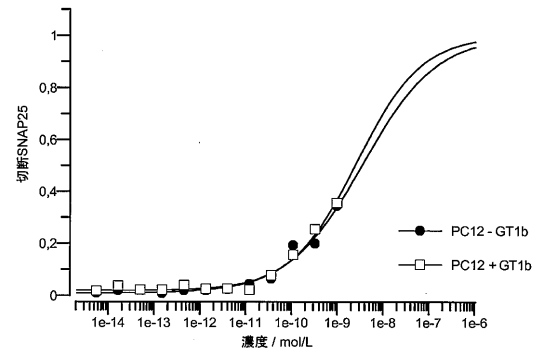
30

40

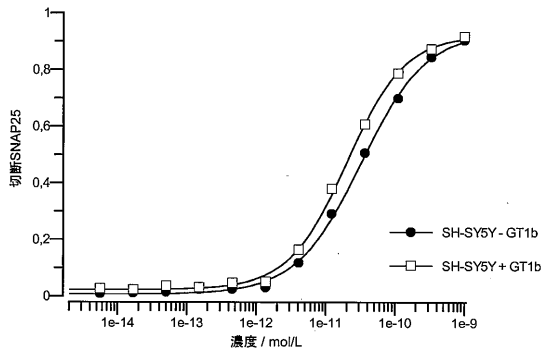
【 図 1 】



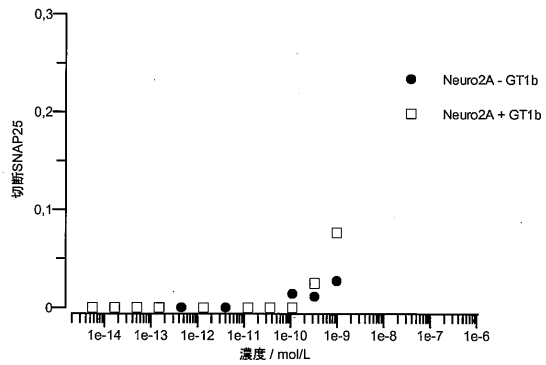
【 図 3 】



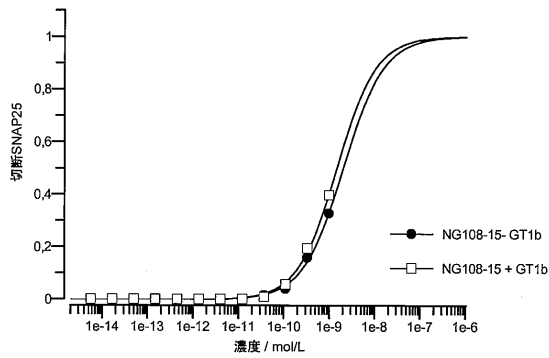
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

0006549599000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100169971
弁理士 菊田 尚子
- (74)代理人 100169579
弁理士 村林 望
- (72)発明者 アイゼレ, カール - ハイイツ
ドイツ連邦共和国 6 0 3 8 5 フランクフルト アム マイン, パーラメンツプラッツ 2 ベー
- (72)発明者 マンデル, ゲルト
ドイツ連邦共和国 6 0 4 3 8 フランクフルト, ベルタ - バッグ - シュトラーセ 4 6

審査官 木原 啓一郎

- (56)参考文献 PLOS ONE, 2 0 1 2 年 1 1 月 2 1 日, Vol. 7, No. 11, e49516
CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, 2 0 1 3 年 5 月 6 日, Vol. 364, pp. 2
57-285
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2 0 0 2 年 9 月 6 日, Vol. 277, No. 36, pp. 32815-3
2819
TOXICOLOGICAL SCIENCES, 2 0 1 2 年 1 月 5 日, Vol. 126, No. 2, pp. 426-435

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

G 0 1 N 3 3 / 5 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

专利名称(译)	神经节苷脂在体外测试系统中标准化并增加细胞对肉毒杆菌神经毒素的敏感性		
公开(公告)号	JP6549599B2	公开(公告)日	2019-07-24
申请号	JP2016552628	申请日	2015-02-18
[标]申请(专利权)人(译)	梅兹制药有限两合公司		
申请(专利权)人(译)	梅尔茨制药有限公司UND Cie的汽车门机管局		
当前申请(专利权)人(译)	梅尔茨制药有限公司UND Cie的汽车门机管局		
[标]发明人	アイゼレカールハインツ マンデルゲルト		
发明人	アイゼレ,カール-ハインツ マンデル,ゲルト		
IPC分类号	C12N5/10 C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	C12N5/0619 C12N2500/36 C12N2501/50 C12N2506/45 G01N33/5058 G01N2333/33 G01N33/5073 C12N2501/998		
FI分类号	C12N5/10.ZNA C12Q1/02 G01N33/53.D		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	2014155726 2014-02-19 EP		
其他公开文献	JP2017506892A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及标准化诱导的多能干细胞 (iPS) 衍生的神经元对神经毒素多肽的敏感性的方法, 包括步骤: a) 在细胞培养基中培养不同批次的诱导多能干细胞衍生的神经元。包含GT1b至少3小时; b) 使步骤a) 的不同批次的诱导多能干细胞衍生的神经元与神经毒素多肽接触; c) 在允许神经毒素多肽发挥其生物活性的条件下, 在GT1b存在下培养步骤b) 的不同批次的诱导多能干细胞衍生的神经元至少24小时, 从而标准化诱导的多能性的敏感性干细胞衍生的神经元到神经毒素多肽。本发明进一步涉及产生诱导性多能干细胞衍生神经元的方法, 所述神经元具有对神经毒素多肽的标准化敏感性, 包括步骤: a) 提供不同批次的诱导多能干细胞衍生神经元; b) 在包含GT1b的细胞培养基中培养步骤a) 的不同批次的诱导多能干细胞衍生的神经元至少3小时, 从而标准化诱导的多能干细胞衍生的神经元对神经毒素多肽的敏感性。此外, 本发明包括测定神经毒素多肽的生物活性的方法, 包括步骤: a) 在包含GT1b的细胞培养基中培养诱导的多能干细胞衍生的神经元至少3小时; b) 使步骤a) 的诱导的多能干细胞衍生的神经元与神经毒素多肽接触; c) 在允许神经毒素多肽发挥其生物活性的条件下, 在GT1b存在下培养步骤b) 诱导的多能干细胞衍生的神经元至少24小时; d) 确定生物学所述细胞中神经毒素多肽的活性。最后, 本发明涉及GT1b用于a) 标准化不同批次的诱导多能干细胞衍生神经元对神经毒素多肽的敏感性的用途。或b) 降低不同批次的诱导多能干细胞衍生神经元对神经毒素多肽的敏感性的可变性。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6549599号 (P6549599)
(45) 発行日 令和1年7月24日 (2019. 7. 24)	(24) 登録日 令和1年7月5日 (2019. 7. 5)	
(51) Int. Cl. F 1		
C 1 2 N 5 / 1 0 (2006. 01)	C 1 2 N 5 / 1 0 Z N A	
C 1 2 Q 1 / 0 2 (2006. 01)	C 1 2 Q 1 / 0 2	
G O 1 N 3 3 / 5 3 (2006. 01)	G O 1 N 3 3 / 5 3 D	
請求項の数 15 (全 24 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-552628 (P2016-552628)	(73) 特許権者 511202045	
(86) (22) 出願日 平成27年2月18日 (2015. 2. 18)	メルツ ファルマ ゲーエムベーハー ウ	
(65) 公表番号 特表2017-506892 (P2017-506892A)	ント コンパニー カーゲーアーア	
(43) 公表日 平成29年3月16日 (2017. 3. 16)	ドイツ連邦共和国 60318 フランク	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/053403	フルト アム マイネン, エッケンハイマー	
(87) 国際公開番号 W02015/124618	ラントシュトゥーセ 100	
(87) 国際公開日 平成27年8月27日 (2015. 8. 27)	(74) 代理人 100091096	
審査請求日 平成29年12月11日 (2017. 12. 11)	弁理士 平木 祐輔	
(31) 優先権主張番号 14155726.4	(74) 代理人 100118773	
(32) 優先日 平成26年2月19日 (2014. 2. 19)	弁理士 藤田 啓	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人 100123389	
	弁理士 新井 栄一	
	(74) 代理人 100111741	
	弁理士 田中 夏夫	

(54) 【発明の名称】 in vitro 試験系におけるボツリヌス神経毒に対する細胞の感度を標準化し且つ増加させるためのガングリオシド

最終頁に続く