

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成25年5月2日 (2013.5.2)

【公表番号】特表2012-512910(P2012-512910A)

【公表日】平成24年6月7日 (2012.6.7)

【年通号数】公開・登録公報2012-022

【出願番号】特願2011-542519(P2011-542519)

【国際特許分類】

A 6 1 K 35/44 (2006.01)

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 L 27/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 P 25/16 (2006.01)

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

【F I】

A 6 1 K 35/44 Z N A

A 6 1 P 25/00

A 6 1 L 27/00 V

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 25/16

C 1 2 N 5/00 2 0 2 A

【手続補正書】

【提出日】平成24年3月30日 (2012.3.30)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経傷害を治療する薬剤において、

臍帯組織由来細胞、

を含み、

前記臍帯組織由来細胞は、実質的に血液のないヒト臍帯組織由来であり、

前記細胞は、培養中に自己再生および増殖することができ、少なくとも神経の表現型の細胞に分化する能力を有し、

前記細胞は、C D 1 1 7 を発現しない、薬剤。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の薬剤において、

前記神経傷害は、脳虚血、急性虚血後の再灌流、出生時低酸素虚血性傷害、心停止、頭蓋内出血、頭蓋内病変、揺さぶられ症候群である、薬剤。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の薬剤において、

前記細胞は、前記神経傷害の治療を促進する遺伝子産物を産生するように、遺伝子操作される、薬剤。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の薬剤において、

前記細胞は、少なくとも 1 つの他の細胞型と共に投与される、薬剤。

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載の薬剤において、

前記他の細胞型は、星状細胞、乏突起膠細胞、ニューロン、神経前駆細胞、神経幹細胞、または他の多分化能もしくは多能性幹細胞である、薬剤。

## 【請求項 6】

請求項 1 に記載の薬剤において、

前記細胞は、患者の中枢または末梢神経系の所定部位に投与される、薬剤。

## 【請求項 7】

請求項 1 に記載の薬剤において、

前記臍帯組織由来細胞は、h T E R T またはテロメラーゼを発現しない、薬剤。

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載の薬剤において、

前記細胞は、注射または注入により投与される、薬剤。

## 【請求項 9】

患者の脳室下帯 ( S V Z ) の再生能力を刺激する薬剤において、

単離臍帯組織由来細胞、

を含み

前記臍帯組織由来細胞は、実質的に血液のないヒト臍帯組織由来であり、

前記細胞は、培養中に自己再生および増殖することができ、少なくとも神経の表現型の細胞に分化する能力を有し、

前記細胞は、C D 1 1 7 を発現しない、薬剤。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の薬剤において、

前記細胞は、前記脳室下帯の前記再生能力を促進する遺伝子産物を産生するように、遺伝子操作される、薬剤。

## 【請求項 11】

請求項 9 に記載の薬剤において、

前記細胞は、少なくとも 1 つの他の細胞型と共に投与される、薬剤。

## 【請求項 12】

請求項 11 に記載の薬剤において、

前記他の細胞型は、星状細胞、乏突起膠細胞、ニューロン、神経前駆細胞、神経幹細胞、または他の多分化能もしくは多能性幹細胞である、薬剤。

## 【請求項 13】

請求項 9 に記載の薬剤において、

前記細胞は、前記患者の中枢または末梢神経系の所定部位で投与される、薬剤。

## 【請求項 14】

請求項 9 に記載の薬剤において、

前記細胞は、注射または注入により投与される、薬剤。

## 【請求項 15】

請求項 9 に記載の薬剤において、

前記薬剤は、神経発生、血管新生、またはシナプス形成を増大させる、薬剤。

## 【請求項 16】

請求項 1 または 9 に記載の薬剤において、

前記細胞は、C D 1 0、C D 1 3、C D 4 4、C D 7 3、C D 9 0、P D G F r - 、および H L A - A、B、C のそれぞれを発現する、薬剤。

## 【請求項 17】

請求項 1、9、または 16 に記載の薬剤において、

前記細胞は、C D 3 1、C D 3 4、C D 4 5、C D 1 4 1、および H L A - D R、D P、D Q のいずれも発現しない、薬剤。

## 【請求項 18】

請求項 9 に記載の薬剤において、

前記細胞は、h T E R T または テロメラーゼを発現しない、薬剤。

【請求項 19】

請求項 9 または 18 に記載の薬剤において、

前記細胞は、C D 10、C D 13、C D 44、C D 73、C D 90、P D G F r - 、  
および H L A - A、B、C のそれぞれを発現する、薬剤。

【請求項 20】

請求項 9、18、または 19 に記載の薬剤において、

前記細胞は、C D 31、C D 34、C D 45、C D 141、および H L A - D R、D P  
、D Q のいずれも発現しない、薬剤。

【請求項 21】

神経傷害を有する患者を治療する医薬組成物において、

前記神経傷害を治療するのに有効な量の、医薬的に許容可能な担体、および単離臍帯組織由来細胞、

を含み、

前記臍帯組織由来細胞は、実質的に血液のないヒト臍帯組織由来であり、

前記細胞は、培養中に自己再生および増殖することができ、少なくとも神経の表現型の細胞に分化する能力を有し、

前記細胞は、C D 117 を発現しない、医薬組成物。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の医薬組成物において、

前記細胞は、h T E R T または テロメラーゼを発現しない、医薬組成物。

【請求項 23】

請求項 21 または 22 に記載の医薬組成物において、

前記細胞は、C D 10、C D 13、C D 44、C D 73、C D 90、P D G F r - 、  
および H L A - A、B、C のそれぞれを発現する、医薬組成物。

【請求項 24】

請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項 に記載の医薬組成物において、

前記細胞は、C D 31、C D 34、C D 45、C D 141、および H L A - D R、D P  
、D Q のいずれも発現しない、医薬組成物。

【請求項 25】

神経傷害を有する患者を治療するキットであって、医薬的に許容可能な担体、単離臍帯組織由来細胞集団、および前記患者を治療する方法において前記キットを使用するための説明書を含む、キットにおいて、

前記臍帯組織由来細胞は、実質的に血液のないヒト臍帯組織由来であり、少なくとも神経の表現型の細胞に分化し、

前記細胞は、C D 117 を発現しない、キット。

【請求項 26】

請求項 25 に記載のキットにおいて、

少なくとも 1 つの他の細胞型の集団、

をさらに含む、キット。

【請求項 27】

請求項 25 に記載のキットにおいて、

前記細胞は、h T E R T または テロメラーゼを発現しない、キット。

【請求項 28】

請求項 25 または 27 に記載のキットにおいて、

前記細胞は、C D 10、C D 13、C D 44、C D 73、C D 90、P D G F r - 、  
および H L A - A、B、C のそれぞれを発現する、キット。

【請求項 29】

請求項 25、27、または 28 に記載のキットにおいて、

前記細胞は、CD31、CD34、CD45、CD141、およびHLA-DR、DP、DQのいずれも発現しない、キット。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

さらに、本発明の方法に有用なUTCは、遺伝子発現により特徴付けられることができ、遺伝子発現は、線維芽細胞、間葉系幹細胞、もしくは腸骨稜骨髓細胞であるヒト細胞に関し、interleukin 8; reticulon 1; chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha); chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2); chemokine (C-X-C motif) ligand 3; およびtumor necrosis factor, alpha-induced protein 3のうちの少なくとも1つをコード化する遺伝子について、増加する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0076

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0076】

さらに、本発明の方法に有用なUTCは、以下のうち少なくとも1つの分泌により特徴付けられ得る：MCP-1; IL-6; IL-8; GCP-2; HGF; KGF; FGF; HB-EGF; BDNF; TPO; MIP1b; I309; MDC; RANTES; TMP1。さらに、本発明の方法に有用なUTCは、ELISAにより検出されたときに、以下のうち少なくとも1つの分泌がないことにより特徴付けられ得る：TGF-2; ANG2; PDGFbb; MIP1a; VEGF。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0130

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0130】

CNSは、いくらか免疫特権の組織なので、UTCによる細胞療法を開始する前に、患者の免疫反応を抑制することが必要かまたは好ましいであろう。先に、UTCは、混合リンパ球反応において同種異系のPBMCを刺激しないことが示されている（米国特許出願第10/877,269（現在は米国特許第7,524,489号）を参照）。したがって、同種または、さらには異種のUTCによる移植は、場合によっては許容され得る。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0350

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0350】

実施例23

テロメラーゼ活性のアッセイ

テロメラーゼは、染色体の完全性を保護し、また細胞の複製寿命を延ばすのに役立つ、テロメア繰り返し体を合成するよう機能する（Liu, K, et al., PNAS, 1999; 96: 5147-5152）。テロメラーゼは、2つの成分、テロメラーゼRNAテンプレート（hTER）、およびテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）のみからな

る。テロメラーゼの調節は、h T E Rではなく、h T E R Tの転写により決定される。h T E R T mRNAのリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(P C R)は、ゆえに、細胞のテロメラーゼ活性を決定する、認められた方法である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0351

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0351】

細胞単離

リアルタイムP C R実験が行われ、ヒト臍帯組織由来細胞のテロメラーゼ産生が決定された。ヒト臍帯組織由来細胞が、実施例13~15、および、米国特許第7,510,873号として特許となった米国特許出願第10/877,012号(‘012号出願)に記載される実施例に従って、準備された。概して、正常な運搬後にNational Disease Research Interchange(Philadelphia, Pa.)から入手された臍帯が洗浄され、血液および残骸を除去し、機械的に解離される。組織は次に、コラゲナーゼ、ディスパーゼおよびヒアルロニダーゼを含む消化酵素で、培養培地において37でインキュベートされる。ヒト臍帯組織由来細胞は、‘012号出願の実施例に記載された方法に従って培養された。間葉系幹細胞および正常な皮膚線維芽細胞(cc-2509ロット#9F0844)が、Cambrex, Walkersville, Md.から入手された。多能性ヒト精巣胎児性癌(テラトーマ)細胞株nTera-2細胞(NTERA-2 cl.D1)(Plaia et al, Stem Cells, 2006;24(3):531-546を参照)を、ATCC(Manassas, Va.)から購入し、‘012号出願に記載した方法に従って培養した。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0353

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0353】

リアルタイムP C R

P C Rが、Applied Biosystems Assays-On-Demand(商標)(TaqMan(登録商標)遺伝子発現アッセイとしても知られる)を用いて、製造業者の仕様書(Applied Biosystems)に従って、cDNAサンプルに対して行われた。この市販のキットは、ヒト細胞のテロメラーゼのアッセイに広く使われる。端的には、h T E R T(ヒトテロメラーゼ遺伝子)(Hs00162669)およびヒトGAPDH(内部対照)が、ABI prism 7000 SDSソフトウェア(Applied Biosystems)と共に7000配列検出システムを用いて、cDNAおよびTaqMan(登録商標)Universal P C Rマスターミックスと混合された。熱サイクル条件は、最初は、50で2分、95で10分、その後、95で15秒および60で1分の40サイクルであった。P C Rデータは、製造業者の仕様書に従って分析された。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0355

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0355】

ヒト臍帯組織由来細胞(isolate 022803, ATCC受入番号PTA-6

067) および nTera-2 細胞が、アッセイされ、結果は、hUTC の 2 つのロットではテロメラーゼの発現を示さず、一方、テラトーマ細胞株は、高レベルの発現を表した (表 22 - 2)。

【表 30】

表22-2

細胞型	hTERT		GAPDH		
	実験1	実験 2	実験 1	実験2	hTERT正常
nTera2	22.85	27.31	16.41	16.31	.61
022803	-	-	22.97	22.79	-