

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成24年12月6日 (2012.12.6)

【公表番号】特表2012-505665(P2012-505665A)

【公表日】平成24年3月8日 (2012.3.8)

【年通号数】公開・登録公報2012-010

【出願番号】特願2011-532316(P2011-532316)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

A 6 1 K 35/12 (2006.01)

A 6 1 K 35/36 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 7/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 17/02 (2006.01)

A 6 1 P 19/00 (2006.01)

A 6 1 P 13/12 (2006.01)

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 5/00 2 0 2 A

A 6 1 K 35/12

A 6 1 K 35/36

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 9/10 1 0 3

A 6 1 P 3/10

A 6 1 P 7/00

A 6 1 P 37/06

A 6 1 P 17/02

A 6 1 P 19/00

A 6 1 P 13/12

A 6 1 P 27/02

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02

【手続補正書】

【提出日】平成24年10月18日 (2012.10.18)

【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】

脂肪組織から細胞の集団を得る方法であって、該方法は、少なくとも約 2 0 0 U / m l 溶

液かつ約 319 U / ml 溶液以下の濃度で酵素を含む溶液中で、該脂肪組織を約 30 分と 60 分の間の時間インキュベートする工程を包含し、そのことにより該脂肪組織から細胞の集団を得る方法。

【請求項 2】

前記酵素の濃度が約 200 U / ml 溶液と約 300 U / ml 溶液の間である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記酵素の濃度が約 225 U / ml 溶液と約 275 U / ml 溶液の間である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記酵素の濃度が約 245 U / ml 溶液と 255 U / ml 溶液の間である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記時間が約 45 分と約 55 分の間である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記酵素がコラゲナーゼ、トリプシン、ディスパーゼ、もしくは少なくとも前述のうちの 1 つを含む酵素の混合物である、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

脂肪組織の容量と酵素溶液の容量の比が約 1 : 1 である、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

脂肪組織 1 ml 当たり少なくとも  $6.0 \times 10^5$  個細胞が得られる、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

脂肪組織 1 ml 当たり少なくとも  $8.0 \times 10^5$  個細胞が得られる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

脂肪組織から標的細胞の濃縮された集団を得る方法であって、以下：

a . 請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法に従って脂肪組織から細胞の集団を得る工程；および

b . 一次抗体を含む第二の溶液内で該細胞の集団をインキュベートする工程であって、該一次抗体は、該細胞の集団を、標的細胞を含むサブ集団と標的細胞を実質的に含まないサブ集団とに分けるものであり、そのことにより、標的細胞の濃縮された集団を得る工程を包含する方法。

【請求項 11】

前記一次抗体が、前記標的細胞によって発現されない細胞マーカーに対して特異的な抗体である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記一次抗体が CD45、グリコホリン A および CD31 からなる群から選択される細胞マーカーに対して特異的な抗体である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記一次抗体が、前記標的細胞によって発現される細胞マーカーに対して特異的な抗体である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記細胞マーカーが CD34 である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記標的細胞が CD34 陽性細胞である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記細胞の集団をビーズとインキュベートする工程を包含し、そのことによりビーズおよ

び前記一次抗体を含む複合体を形成する、請求項 10 から 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記ビーズが前記一次抗体に結合するタンパク質を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記タンパク質が：(i) 前記一次抗体に特異的に結合する二次抗体、もしくはその抗原結合フラグメント、(ii) プロテイン A、(iii) プロテイン G、および(iv) これらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ビーズが、1 : 1 と 5 : 1 の間のビーズと標的細胞の比で存在する、請求項 16 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記ビーズと標的細胞の比が約 4 : 1 である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記第二の溶液から前記複合体を取り出す工程を包含する、請求項 16 から 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記ビーズが常磁性ビーズであり、前記複合体が前記溶液から磁石で取り出される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記複合体を放出ペプチドとともにインキュベートする工程を包含する、請求項 13 から 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記放出ペプチドが、CD34 のエピトープもしくは前記一次抗体のエピトープであるエピトープを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記放出ペプチドが、可溶性の CD34 もしくは PR34 放出ペプチドである、請求項 23 もしくは 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記複合体を注射器で粉砕する工程を包含する、請求項 23 から 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

得られた前記集団が、1 日より短い間、培養もしくはプレートされる、請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

得られた前記集団を拡張する、あらゆる工程が存在しない、請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

請求項 10 から 28 のいずれか 1 項に記載の方法にしたがって、脂肪組織から得られた標的細胞の濃縮された集団。

【請求項 30】

前記濃縮された集団における標的細胞の割合が、(a) の前記細胞の集団における標的細胞の割合の約 1.5 倍から約 5 倍である、請求項 29 に記載の濃縮された集団。

【請求項 31】

前記標的細胞が CD34 陽性細胞である、請求項 29 もしくは 30 に記載の濃縮された集団。

【請求項 32】

患者への投与のための細胞を含む薬学的組成物を調製する方法であって、該方法は、請求項 29 から 31 のいずれか 1 項に記載の標的細胞の濃縮された集団を薬学的に受容可能なキャリアと調合する工程を包含する方法。

【請求項 33】

前記細胞が患者にとって自己由来である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記細胞が、1 日以下の間、培養もしくはプレートされた、請求項 3 2 もしくは 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記薬学的組成物の前記細胞の少なくとも 5 0 % が C D 3 4 陽性細胞である、請求項 3 2 から 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

請求項 3 2 から 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法にしたがって調製された薬学的組成物。

【請求項 3 7】

患者における疾患もしくは医学的状态を処置するための組成物であって、該組成物は、該疾患もしくは医学的状态を処置するのに効果的な量で、請求項 3 6 に記載の薬学的組成物を含む組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 1】

その脂肪組織から得られた細胞集団（例えば、標的細胞の濃縮された細胞集団）を含む薬学的組成物を調製する関連した方法、およびこれらの方法にしたがって調製された薬学的組成物、および患者における疾患もしくは医学的状态を処置する方法においてその薬学的組成物を用いる方法が、本明細書中に提供される。

本発明はまた、以下の項目を提供する。

（項目 1）

脂肪組織から細胞の集団を得る方法であって、該方法は、少なくとも約 2 0 0 U / m l 溶液かつ約 3 1 9 U / m l 溶液以下の濃度で酵素を含む溶液中で、該脂肪組織を約 3 0 分と 6 0 分の間の時間インキュベートする工程を包含し、そのことにより該脂肪組織から細胞の集団を得る方法。

（項目 2）

上記酵素の濃度が約 2 0 0 U / m l 溶液と約 3 0 0 U / m l 溶液の間である、項目 1 に記載の方法。

（項目 3）

上記酵素の濃度が約 2 2 5 U / m l 溶液と約 2 7 5 U / m l 溶液の間である、項目 2 に記載の方法。

（項目 4）

上記酵素の濃度が約 2 4 5 U / m l 溶液と 2 5 5 U / m l 溶液の間である、項目 3 に記載の方法。

（項目 5）

上記時間が約 4 5 分と約 5 5 分の間である、項目 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

（項目 6）

上記酵素がコラゲナーゼ、トリプシン、ディスパーゼ、もしくは少なくとも前述のうちの 1 つを含む酵素の混合物である、上記項目のいずれか 1 項に記載の方法。

（項目 7）

脂肪組織の容量と酵素溶液の容量の比が約 1 : 1 である、上記項目のいずれか 1 項に記載の方法。

（項目 8）

脂肪組織 1 m l 当たり少なくとも  $6 \cdot 0 \times 10^5$  個細胞が得られる、上記項目のいずれか

1 項に記載の方法。

( 項目 9 )

脂肪組織 1 m l 当たり少なくとも  $8 \cdot 0 \times 10^5$  個細胞が得られる、項目 8 に記載の方法

。

( 項目 10 )

脂肪組織から標的細胞の濃縮された集団を得る方法であって、以下：

a . 項目 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法に従って脂肪組織から細胞の集団を得る工程；および

b . 一次抗体を含む第二の溶液内で該細胞の集団をインキュベートする工程であって、該一次抗体は、該細胞の集団を、標的細胞を含むサブ集団と標的細胞を実質的に含まないサブ集団とに分けるものであり、そのことにより、標的細胞の濃縮された集団を得る工程を包含する方法。

( 項目 11 )

上記一次抗体が、上記標的細胞によって発現されない細胞マーカーに対して特異的な抗体である、項目 10 に記載の方法。

( 項目 12 )

上記一次抗体が C D 4 5、グリコホリン A および C D 3 1 からなる群から選択される細胞マーカーに対して特異的な抗体である、項目 11 に記載の方法。

( 項目 13 )

上記一次抗体が、上記標的細胞によって発現される細胞マーカーに対して特異的な抗体である、項目 10 に記載の方法。

( 項目 14 )

上記細胞マーカーが C D 3 4 である、項目 13 に記載の方法。

( 項目 15 )

上記標的細胞が C D 3 4 陽性細胞である、項目 14 に記載の方法。

( 項目 16 )

上記細胞の集団をビーズとインキュベートする工程を包含し、そのことによりビーズおよび上記一次抗体を含む複合体を形成する、項目 10 から 15 に記載の方法。

( 項目 17 )

上記ビーズが上記一次抗体に結合するタンパク質を含む、項目 16 に記載の方法。

( 項目 18 )

上記タンパク質が：( i ) 上記一次抗体に特異的に結合する二次抗体、もしくはその抗原結合フラグメント、( i i ) プロテイン A、( i i i ) プロテイン G、および( i v ) これらの組み合わせからなる群から選択される、項目 17 に記載の方法。

( 項目 19 )

上記ビーズが、1：1と5：1の間のビーズと標的細胞の比で存在する、項目 16 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 20 )

上記ビーズと標的細胞の比が約 4：1である、項目 19 に記載の方法。

( 項目 21 )

上記第二の溶液から上記複合体を取り出す工程を包含する、項目 16 から 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 22 )

上記ビーズが常磁性ビーズであり、上記複合体が上記溶液から磁石で取り出される、項目 21 に記載の方法。

( 項目 23 )

上記複合体を放出ペプチドとともにインキュベートする工程を包含する、項目 13 から 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 24 )

上記放出ペプチドが、C D 3 4 のエピトープもしくは上記一次抗体のエピトープであるエ

ピトープを含む、項目 2 3 に記載の方法。

( 項目 2 5 )

上記放出ペプチドが、可溶性の C D 3 4 もしくは P R 3 4 放出ペプチドである、項目 2 3 もしくは 2 4 に記載の方法。

( 項目 2 6 )

上記複合体を注射器で粉碎する工程を包含する、項目 2 3 から 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 7 )

得られた上記集団が、1 日より短い間、培養もしくはプレートされる、項目 1 から 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 8 )

得られた上記集団を拡張する、あらゆる工程が存在しない、項目 1 から 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 9 )

項目 1 0 から 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法にしたがって、脂肪組織から得られた標的細胞の濃縮された集団。

( 項目 3 0 )

上記濃縮された集団における標的細胞の割合が、( a ) の上記細胞の集団における標的細胞の割合の約 1 . 5 倍から約 5 倍である、項目 2 9 に記載の濃縮された集団。

( 項目 3 1 )

上記標的細胞が C D 3 4 陽性細胞である、項目 2 9 もしくは 3 0 に記載の濃縮された集団。

( 項目 3 2 )

患者への投与のための細胞を含む薬学的組成物を調製する方法であって、該方法は、項目 2 9 から 3 1 のいずれか 1 項に記載の標的細胞の濃縮された集団を薬学的に受容可能なキャリアと調合する工程を包含する方法。

( 項目 3 3 )

上記細胞が患者にとって自己由来である、項目 3 2 に記載の方法。

( 項目 3 4 )

上記細胞が、1 日以下の間、培養もしくはプレートされた、項目 3 2 もしくは 3 3 に記載の方法。

( 項目 3 5 )

上記薬学的組成物の上記細胞の少なくとも 5 0 % が C D 3 4 陽性細胞である、項目 3 2 から 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 3 6 )

項目 3 2 から 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法にしたがって調製された薬学的組成物。

( 項目 3 7 )

患者における疾患もしくは医学的状态を処置する方法であって、該方法は、該疾患もしくは医学的状态を処置するのに効果的な量で、項目 3 6 に記載の薬学的組成物を該患者に投与する工程を包含する方法。