

【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18年8月17日(2006.8.17)

【公表番号】特表2005-502712(P2005-502712A)

【公表日】平成17年1月27日(2005.1.27)

【年通号数】公開・登録公報2005-004

【出願番号】特願2003-528119(P2003-528119)

【国際特許分類】

A O 1 N 1/02 (2006.01)

【F I】

A O 1 N 1/02

【誤訳訂正書】

【提出日】平成18年6月30日(2006.6.30)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

脂肪組織から幹細胞、前駆細胞及びマトリックス物質を回収及び保存する方法であって

、

a. 容器の細胞収集部分の中に真空吸引された脂肪組織を処理する工程であって、前記細胞収集部分は、前記容器から透過性膜によって離されており、前記透過性膜は、脂肪組織の所望成分を含む材料を前記細胞収集部分の中に保持して、廃棄し得る成分を廃棄処分のために通り抜けさせるものである前記工程；

b. 前記細胞収集部分に保持されている前記材料を廃棄し得る成分から分離し、前記材料からマトリックス物質及び脂肪細胞枯渇細胞集団のうち少なくとも一つを分離する前記工程；

c. 前記脂肪細胞枯渇細胞集団及びマトリックス物質のうち、一つ又はそれ以上を凍結保存及び低温貯蔵する工程；

を含む前記方法。

【請求項2】

所望成分が、幹細胞、前駆細胞及びマトリックス物質を含む細胞集団を含み、廃棄し得る成分が膨張溶液、生理食塩水、血液、血餅、遊離脂質及び成熟脂肪細胞を含む、請求項1の方法。

【請求項3】

透過性膜が、規定された多孔度のフィルター材である、請求項1の方法。

【請求項4】

細胞収集部分に保持されている材料を分離することが、前記材料を単離及び洗滌することを含み、脂肪細胞枯渇細胞集団を分離することが、前記単離された材料を脱凝集すること並びに遊離脂質及び脂肪細胞を除去することを含む、請求項1の方法。

【請求項5】

脱凝集が、細胞収集部分中の材料のタンパク質分解酵素へ曝露、機械的脱凝集又はこれらの組合せによって達成される、請求項4の方法。

【請求項6】

脱凝集が、細胞収集部分中の材料を、コラゲナーゼ、トリプシン、パパイン、DNase若しくはリパーゼへ曝露する、細かく刻む若しくは剪断する行為、又はそれらの組合せによ

って達成される、請求項 5 の方法。

【請求項 7】

細胞収集部分に保持されている材料が幹細胞及び前駆細胞を含み、前記幹細胞及び前駆細胞が、遠心分離又は浮遊密度浮揚によって廃棄し得る成分から分離される、請求項 1 の方法。

【請求項 8】

所望成分が、該材料から遠心分離、スピニング膜分離、固相構造物に対する示差的付着及び溶離のいずれかと蛍光発色セルソーティングとによって、又はそれらの組合せによって分離される、請求項 1 の方法。

【請求項 9】

固相構造物が抗体被覆ビーズである、請求項 8 の方法。

【請求項 10】

所望成分を、幹細胞に富む相と前駆細胞に富む相とに分離することを更に含む、請求項 8 の方法。

【請求項 11】

治療目的で同種の哺乳動物への送達に適する哺乳動物幹細胞であって、脂肪組織から分離された生存能力のある幹細胞を含み、凍結保存された後に解凍された状態である前記幹細胞。

【請求項 12】

凍結保存する工程が、
所望成分を、一つ以上の凍結保護添加剤と混合すること；
そのようにして生成した混合物を、 -50°C に到達するまで 毎分約 -1°C から約 -3°C の一定な冷却速度にて冷却すること；及び
冷却した前記混合物を、液体窒素が入っている貯蔵容器の中に置くこと；
を含む請求項 1 の方法。

【請求項 13】

凍結保護添加剤が、浸透性の凍結保護剤、非浸透性の凍結保護剤及びこれらの組合せからなる群より選択される、請求項 12 の方法。

【請求項 14】

浸透性の凍結保護剤がジメチルスルホキシド、グリセロール、1,2-プロパンジオール又はこれらの組合せ を含み、非浸透性の凍結保護剤が自家血漿、ヒト血清、ヒドロキシエチルスターチ、アルブミン、ポリビニルピロリドン又はこれらの組合せ を含む、請求項 13 の方法。

【請求項 15】

a. 所望成分が、5% ヒト血清アルブミン溶液の細胞懸濁液として調製され；
b. 前記懸濁液が 4°C まで冷却され；
c. 前記懸濁液が 4°C に維持され、一方ジメチルスルホキシド (DMSO) が冷却された懸濁液にゆっくり添加されて、約 5 体積 % ～ 約 20 体積 % の最終 DMSO 濃度にされ；
d. 前記細胞懸濁液を、 -50°C の温度が得られるまで毎分約 -1°C の速度にて冷却し；
e. 前記細胞懸濁液を、 -90°C の温度が得られるまで毎分約 -10°C の速度にて冷却して；
f. 前記細胞懸濁液が、液体窒素貯蔵容器の気相中に置かれる；

請求項 1 の方法。

【請求項 16】

所望成分が、凍結保存前に二つ以上の部分に分離される、請求項 1 の方法。

【請求項 17】

最終 DMSO 濃度が 10 体積 % である、請求項 15 の方法。

【請求項 18】

凍結保存された 所望成分を、前記所望成分の温度を約 4°C までゆっくり上昇させることによって回復させる工程をさらに含む、請求項 1 の方法。

【請求項 19】

マトリックス物質が、収集部分に保持されている材料から分離され、残留する水分含有量が約0.5体積%～約5.0体積%になるまで凍結乾燥され、約25℃以下にて貯蔵される、請求項1の方法。

【請求項20】

患者に送達するための担体溶液中に生存能力のある幹細胞を含む治療用組成物であって、
前記幹細胞は、脂肪組織から回収されたものであって脂肪組織中に存在する他の細胞材料から分離されたものであり、凍結保存された後に解凍された状態であって治療的又は美容的用途のために生存能力がある、前記治療用組成物。

【請求項21】

脂肪組織から回収され、幹細胞と同様な処理を受けた前駆細胞を更に含む、請求項20の治療用組成物。

【請求項22】

単一ドナーの脂肪組織に由来する生存能力のある幹細胞を、前記幹細胞の生存度を適切なレベルに保つのに十分な量の凍結保存剤中に含む凍結保存治療用組成物であって、前記幹細胞は、解凍され前記凍結保存剤を除去された後に種々の細胞種に分化して増殖するのに十分な量で存在している、前記治療用組成物。

【請求項23】

生存能力のある前駆細胞を更に含む、請求項22の凍結保存治療用組成物。

【請求項24】

脂肪組織から幹細胞、前駆細胞及びマトリックス物質を回収及び保存する方法であって、
a.脂肪組織を提供する工程；
b.前記脂肪組織から、脂肪細胞枯渇細胞集団及びマトリックス物質の少なくとも一つを分離する工程；及び
c.前記脂肪細胞枯渇細胞集団及びマトリックス物質の少なくとも一つを凍結保存する工程；
を含む前記方法。

【請求項25】

凍結保存された脂肪細胞枯渇細胞集団及びマトリックス物質の少なくとも一つを解凍する工程を更に含む、請求項24の方法。

【請求項26】

解凍する工程が、脂肪細胞枯渇細胞集団及びマトリックス物質の少なくとも一つを約37℃の温度まで温めることを含む、請求項25の方法。

【請求項27】

提供された脂肪組織が、吸引によって得られた脂肪組織である、請求項24の方法。

【請求項28】

提供された脂肪組織が、容器に收容されている幹細胞及び前駆細胞と他の脂肪組織成分とを分離し得る容器の中に吸引された脂肪組織である、請求項26の方法。

【請求項29】

分離する工程が、実質的に同一であるが前記分離する工程を含まない方法に対して、生存能力のある細胞数を増加させることを提供するのに有効である、請求項24の方法。

【請求項30】

分離する工程が、脂肪組織から多能性幹細胞を分離することを含む、請求項24の方法。

【請求項31】

凍結保存する工程が、脂肪細胞枯渇細胞集団を凍結保護剤と混合することを含む、請求項24の方法。

【請求項32】

提供する工程、分離する工程及び凍結保存する工程が連続的に行われる、請求項24の

方法。

【請求項 3 3】

分離する工程が、遠心分離、スピニング膜分離、固相構造物に対する示差的付着及び溶解の少なくとも一つと蛍光発色セルソーティングとを含む、請求項 2 4 の方法。

【請求項 3 4】

凍結保存されたマトリックス物質を解凍する工程を更に含む、請求項 2 4 の方法。

【請求項 3 5】

解凍する工程が、マトリックス物質を約 37℃ の温度まで温めることを含む、請求項 3 4 の方法。

【請求項 3 6】

提供された脂肪組織が、容器に収容されている他の脂肪組織成分とマトリックス物質とを分離し得る容器の中に吸引された脂肪組織である、請求項 3 5 の方法。

【請求項 3 7】

凍結保存する工程が、マトリックス物質を凍結保護剤と混合することを含む、請求項 2 4 の方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 0 1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 0 1】

本出願は、2001年9月14日に出願された米国仮特許出願第 60/322,070 号の利益を主張する。

本発明は、後に続く使用のために凍結保存される脂肪組織由来の細胞、特に脂肪組織由来の幹細胞及び前駆細胞の集団を対象としており、前記凍結保存された細胞の治療的使用も対象とする。本発明は、脂肪組織から抽出される結合組織マトリックス物質(connective tissue matrix material)の調製及び貯蔵、並びに貯蔵後の前記物質の治療的及び美容的使用も対象とする。前記細胞集団及び前記マトリックス物質は、種々の疾患及び障害を有する患者に対する治療的、構造的及び/又は美容的処置に用いられ得る。好ましい態様では、凍結保存され解凍された細胞が、自家(自己)修復、再構成、再構築及び診断的用途に用いられ得る。本発明は、本発明の幹細胞、前駆細胞及び結合組織の収集、処理及び保存の方法にも関する。前述の方法及び回収して保存した材料は、主としてヒトへの使用のために意図されたが、動物薬に用いることもでき、他の哺乳動物に対して応用し得る。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 2 3

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 2 3】

組織生存度の保護は、処理設備への速い効率的な輸送を確実にすることによって達成される。細胞生存度を最大限にするために、温度制御も用いられ得る。

従って、収集缶は断熱容器の中に置かれるべきである。パッキングは、本技術分野に既知の温度制御手段のいずれかで(例えば湿った氷、凍結ゲルパック)補われて、予期される輸送所要時間の間中、適切な温度が維持され得る。好ましい態様では、冷却剤及び断熱容器が所定の温度制御機能を提供することが検証されるべきである(例えば、前記冷却剤及び断熱容器が、少なくとも所定の時間の間は所定の温度より下の温度を保つべきである)。

当業者には他の密封及びパッケージングの態様が思い浮かぶであろうし、そのような態様は、要求に応じて用いられて、法的な要求事項又は品質システム改良に適合され得る。

収集時と処理時との間において脂肪組織の幹細胞区画の生存度を保つために、輸送条件

が制御されることが必要不可欠である。加えて、試験されていないヒト生体材料の輸送に関する法的な要求事項が存在する。

【誤訳訂正 4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0030

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0030】

[細胞の凍結保存及び貯蔵]

上に示すように、適切な添加剤及び有効な凍結保存処理を欠いている細胞凍結は、細胞に対して破壊的である。幹細胞及び前駆細胞が、凍結前に脂肪組織及び他の生体材料から分離されなければならないことも見出された。脂肪組織を凍結保存して解凍した後に幹細胞を分離する試みでは、生存能力のある幹細胞が有用な量で生成しなかった。

凍結保存添加剤は、二つの一般的なカテゴリー；細胞膜を通過し得る浸透性の凍結保護剤と非浸透性の凍結保護剤とに分類される。浸透性の凍結保護剤の例には、ジメチルスルホキシド(DMSO)、グリセロール及び1,2-プロパンジオールが挙げられるが、これだけに限られない。非浸透性の凍結保護剤の例には、ヒドロキシエチルスターチ、アルブミン及びポリビニルピロリドンが挙げられるが、これだけに限られない。

最も一般的に使用される浸透凍結保護剤はDMSOであり、しばしば、自家血漿、ヒト血清アルブミン及び/又はヒドロキシエチルスターチのような非浸透剤と組合せて用いられる。

好ましい態様では、用いられる特定の凍結保護添加剤が検証されて、解凍後の細胞の適切な回復が保証される。

凍結保存に続いて、凍結過程の間の冷却速度を制御することによって、生存能力のある細胞の回復が最適化され得る。最も一般的な冷却プロトコルは、開始から約-50℃までの重要な冷却段階の間、-1℃から-3℃の一定な冷却速度を維持する。

前記冷却速度は、種々の手段によって達成され得る。そのような手段にはコンピュータ制御された凍結速度を使用すること、冷却した有機溶媒浴に浸漬すること、又はメカニカルフリーザーの中に設置することが挙げられるが、これだけに限られない。好ましい態様では、選択されたシステムの能力が、所定の冷却速度を生じることについて検証される。しかしながら、選択された前記冷却速度は、用いる冷却速度が凍結保存後の細胞の適切な回復を提供することについて検証されている限りは、上で指定するパラメータ（開始から-50℃までは、-1℃から-3℃）を超えてもよい。

【誤訳訂正 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0033

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0033】

[凍結保存された細胞の回復]

温度を上昇させて細胞が解凍される条件も重要である。例えば、細胞内の非常に小さい氷の粒子が、核形成及び再結晶化をもたらし得る。同様に、凍結の間に観察された浸透圧が、解凍の間における細胞損傷の源でもあり得る。さらに、凍結保護剤DMSOは、4℃より上では細胞にとって有害であることを示唆する証拠が存在する(Hak A.M., F.G. Offerijns and C.C. Verheul "Toxic Effects Of DMSO On Cultured Beating Heart Cells At Temperatures Above Zero" Cryobiology 10, p244-250, (1973))。このように、解凍後の前記凍結保護剤への曝露は、最小限にされるべきである。

加えて、無菌閉鎖システム及び許可された試薬の使用が、本発明の施用の好ましい点である。

好ましい態様では、細胞を入れているカセットが液体窒素貯蔵容器から取り出され、フ

リーザバッグが前記カセットから取り出されて柔軟な滅菌外部容器（例えば、滅菌済みのジップロック形式プラスチックバッグ）の中に置かれる。前記プラスチックバッグは、密封されて37℃の水浴に浸漬されて、その温度を約4℃まで上昇させる。前記プラスチックバッグは解凍する間そと操作されて、バッグ内部の材料の粘稠性が半解け雪のようになるまで温める間、材料全体にわたる均一な熱移動が確実にされる。この時点で、クライオバッグは水浴及び外部容器から取り出されてコールドパック上に置かれ、その間に、クライオバッグから導かれているチューブ又はポートが、閉鎖滅菌容器に通じている閉鎖滅菌チューブに接続される。閉鎖滅菌容器は、5%ヒト血清アルブミンのようなタンパク質源が補足された緩衝化等張溶液を含み得る。次に細胞がチューブを通してクライオバッグから閉鎖滅菌容器に移される。次に、無菌閉鎖流体系を保つ手段により接続されている第二の閉鎖滅菌バッグに液相を圧出することによって、過剰なアルブミン溶液及びDMSOが細胞から除去され得る。次に、患者へ送達するために、細胞が更に別の等張溶液に再懸濁され得る。

【誤訳訂正 6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0044

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0044】

〔細胞及びマトリックス物質の貯蔵後の検査〕

臨床使用を対象とした細胞及び物質を、臨床応用に先立って検査及び/又はテストしてもよい。そのような行為を行う場合には、解凍した細胞の生存度を保つように注意すべきである。

見込まれるテストには、トリパンブルー色素排除試験又は同様な技術を用いる細胞の数及び生存度の測定、並びにDNAフィンガープリンティング又は同様なアプローチによる細胞ドナーの同一性の確認が挙げられるが、これだけに限られない。好ましい態様では、凍結貯蔵バッグに通じる滅菌チューブの中に密封されている凍結保存した材料の一部が、解凍を妨害することなく又はバッグの中身が周囲環境に曝露されることなく、バッグから切り離され得る。前記チューブの全長に密封された細胞は、前記バッグの中身全てが解凍するのに先立って、解凍され検査され得る。このようにして、細胞の主体が解凍される前にテストが行われて、ドナーと細胞との同一性が確かめられ得る。

加えて、処理の終了時点の細胞に対して、上に列挙する検査及びテスト（例えば表現型の検査又はクローン原性培養）の一部又は全部が用いられてもよい。

〔臨床応用に先立っての細胞及び物質の貯蔵後操作〕

脂肪組織に含まれる幹細胞及び前駆細胞集団の性質は、組織工学及び遺伝子医学を含む非常に多くの用途に用いられ得る。そのような分野のある種の特別な用途では、レシピエント内への配置又は研究での使用に先だって、幹細胞及び前駆細胞集団の操作が必要とされることもある。

その例には、細胞培養して細胞集団の数及び/又は純度を増加させること、小集団の濃縮又は精製、細胞への遺伝物質の導入、又は細胞培養に基づき細胞集団を分化させて所望の表現型若しくは機能の獲得を容易にすることが挙げられるが、これだけに限られない。

【誤訳訂正 7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0047

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0047】

本発明の脂肪組織に由来する幹細胞及び前駆細胞集団並びにマトリックス物質は、様々な治療的、構造的及び美容的用途の可能性を有する。そのような用途のための細胞及び/又はマトリックス物質は、これらが用いられる予定の個人から（自家適用）、又は血縁ド

ナー若しくは非血縁ドナーから（同種適用）提供され得る。本発明の細胞集団の好ましい態様では、細胞及び/又はマトリックス物質が、脂肪組織を得た人に戻される自家適用で用いられる。そのようなアプローチは、抗拒絶反応薬物の使用を回避し、組織の拒絶と病原菌の導入との危険性を減少する。そのようなアプローチは、幹細胞及び前駆細胞集団並びにマトリックス物質が、それらの細胞が意図される健康状態の背景の一部でない状況において、実行可能である。例えば、自家の幹細胞及び前駆細胞は、心筋組織の修復を促進すること又は軟骨修復に適し得る。しかしながら、遺伝子導入を欠く場合に、自家の脂肪組織由来の幹細胞及び前駆細胞は、骨形成の遺伝病である骨形成不全を患っている患者の骨の修復に使用することには適さない。そのような設定の場合は、血縁ドナー又は非血縁ドナーからの同種の幹細胞及び前駆細胞が好まれ得る。

本発明の変更及び変形は、本発明の意図及び範囲から離れることなく成され得る。本開示に含まれる具体的な実施例及び態様は例示の目的でのみ提供されるものであり、本発明は付記するクレームの点からのみ限定される。

例えば好ましい収集法は、廃棄し得る成分から所望成分を最初に分離するために中に透過性膜を有する収集装置を利用しているが、単一患者からの脂肪吸引の吸引物を全て単一収集容器に集めて、次にその収集した材料全てを、凍結乾燥に先だって幹細胞、前駆細胞、マトリックス物質及び他の所望成分の分離及び単離する場所へ輸送してもよい。

さらに本発明は、脂肪吸引吸引物全体の収集、輸送及び凍結保存も企図する。幹細胞、前駆細胞、マトリックス物質及び他の所望成分は、前記吸引物が適切な処理温度、例えば4℃又は4℃より高いが好ましくは体温より低い温度まで再加熱された後に、上述の方法を用いて回収及び分離され得る。