

【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26年5月22日(2014.5.22)

【公開番号】特開2013-17486(P2013-17486A)

【公開日】平成25年1月31日(2013.1.31)

【年通号数】公開・登録公報2013-005

【出願番号】特願2012-221023(P2012-221023)

【国際特許分類】

C 1 2 N	5/0789	(2010.01)
C 1 2 N	5/074	(2010.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	5/0797	(2010.01)
A 0 1 K	67/027	(2006.01)
C 1 2 N	5/09	(2010.01)
C 1 2 N	5/0775	(2010.01)
A 6 1 L	27/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/12	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/02	(2006.01)
A 6 1 P	37/04	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
A 6 1 P	41/00	(2006.01)
A 6 1 P	7/06	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	5/00	2 0 2 Q
C 1 2 N	5/00	2 0 2 D
C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	5/00	2 0 2 T
A 0 1 K	67/027	
C 1 2 N	5/00	2 0 2 U
C 1 2 N	5/00	2 0 2 H
A 6 1 L	27/00	V
A 6 1 K	35/12	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	41/00	
A 6 1 P	7/06	

【手続補正書】

【提出日】平成26年4月2日(2014.4.2)

【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】

細胞生存及び増殖を促進するプロトオンコジーン又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログを含む組み換え核酸分子と、アポトーシスを阻害するタンパク質又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログをコードする核酸配列を含む組み換え核酸分子と、を含み、

1以上の前記プロトオンコジーン及び／又は前記プロトオンコジーンによりコードされるタンパク質は誘導可能であり、且つ前記プロトオンコジーンは1以上のMYC又はICN-1であり、

前記コードされたタンパク質は、Bc1-2ファミリーに属するメンバーであり、

前記条件的に不死化された成人造血幹細胞は、1以上のプロトオンコジーンの発現又は活性化の存在下で、分化多能性を維持する、条件的に不死化された成人造血幹細胞。

**【請求項2】**

1以上の組み換え核酸分子が、組み込みベクターに含まれる、請求項1記載の条件的に不死化された成人造血幹細胞。

**【請求項3】**

細胞生存及び増殖を促進するプロトオンコジーン又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログは、1以上のMYC-ER又はICN-1-ERである、請求項1又は2記載の条件的に不死化された成人造血幹細胞。

**【請求項4】**

細胞生存及び増殖を促進するプロトオンコジーンによりコードされる組み換えタンパク質又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログと、アポトーシスを阻害する組み換えタンパク質又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログと、を含み、

前記プロトオンコジーンは1以上のMYC又はICN-1であり、

前記タンパク質は、アポトーシスを阻害するBc1-2ファミリーに属するメンバーであり、

前記条件的に不死化された成人造血幹細胞は、プロトオンコジーンの発現活性化の存在下で、分化多能性を維持する、条件的に不死化された成人造血幹細胞。

**【請求項5】**

1以上の前記組み換えタンパク質は、外因的に合成されたものである、請求項4記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項6】**

1以上の前記組み換えタンパク質は、内因的に合成されたものである、請求項4記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項7】**

前記プロトオンコジーン若しくは前記プロトオンコジーンによりコードされるタンパク質又はその両方の発現、転移又は活性化が誘導される、請求項1～6のいずれかに記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項8】**

前記細胞生存及び増殖を促進するプロトオンコジーンがMYCである、請求項1～7のいずれか1項に記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項9】**

前記細胞生存及び増殖を促進するプロトオンコジーンがMYC-ERである、請求項1～8のいずれか1項に記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項10】**

前記アポトーシスを阻害するタンパク質は、前記幹細胞中でアポトーシス促進性タンパク質を阻害する、請求項1～9のいずれか1項に記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項11】**

アポトーシスを阻害する前記タンパク質又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログ、又はこれらをコードする核酸配列が、Bc1-2、Bc1-X、Bc1-w、Bc1-XL、Mc1-1、Mad-1、及びhTERTの1以上である、請求項1～10のい

すれか 1 項に記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項 1 2】**

アポトーシスを阻害する前記タンパク質又はこれをコードする核酸配列が B c 1 - 2 である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項 1 3】**

細胞生存及び増殖を促進するプロトオノンコジーン又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログによりコードされる前記組み換えタンパク質は、 T a t 融合タンパク質であるか、又は前記アポトーシスを阻害するタンパク質は、 T a t 融合タンパク質であるか、又はその両方である、請求項 4 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項 1 4】**

細胞生存及び増殖を促進するプロトオノンコジーン又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログによりコードされる前記組み換えタンパク質は、 T a t - M Y C であり、前記アポトーシスを阻害するタンパク質は、 T a t - B c 1 - 2 である、請求項 4 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項 1 5】**

細胞生存及び増殖を促進するプロトオノンコジーンによりコードされる 1 以上のタンパク質若しくは該タンパク質をコードする組み換え核酸、又はアポトーシスを阻害する組み換えタンパク質若しくは該タンパク質をコードする組み換え核酸を含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項 1 6】**

前記幹細胞がヒト幹細胞である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項 1 7】**

前記幹細胞が遺伝的に改変された幹細胞である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の条件的に不死化された造血幹細胞。

**【請求項 1 8】**

複数の請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の条件的に不死化された造血幹細胞と、幹細胞成長因子の組み合わせを含む培養培地と、を含む、条件的に不死化された造血幹細胞培養物。

**【請求項 1 9】**

前記幹細胞成長因子が、インターロイキン 6 ( I L - 6 )、 I L - 3 、及び幹細胞因子 ( S C F ) を含む、請求項 1 8 記載の条件的に不死化された造血幹細胞培養物。

**【請求項 2 0】**

前記培地は無血清培地であり、前記幹細胞成長因子は、幹細胞因子 ( S C F ) 、 I L - 3 、 I L - 6 、トロンボポイエチン ( T P O ) 、インスリン様増殖因子 2 ( I G F - 2 ) 、および線維芽細胞成長因子 1 ( F G F - 1 ) を含む、請求項 1 8 記載の条件的に不死化された造血幹細胞培養物。

**【請求項 2 1】**

前記幹細胞成長因子の組み合わせは、 I L - 3 、 I L - 6 、幹細胞因子 ( S C F ) 、 F 1 t 3 - L 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( G M - C S F ) 、トロンボポイエチン ( T P O ) 、インスリン様増殖因子 2 ( I G F - 2 ) 、および線維芽細胞成長因子 1 ( F G F - 1 ) からなる群から選択される、請求項 1 8 記載の条件的に不死化された造血幹細胞培養物。

**【請求項 2 2】**

条件的に不死化された成人幹細胞を作製する方法であり、

a ) 細胞生存および増殖を促進するプロトオノンコジーン又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログによりコードされたタンパク質、又は該タンパク質をコードする核酸分子を、 1 以上の成人造血幹細胞内に送達するステップであり、前記プロトオノンコジーン若しくは前記プロトオノンコジーンによりコードされるタンパク質又はその両方の 1 以上が誘

導可能であり、且つ 1 以上の M Y C 又は I C N - 1 であるステップと、

b ) 前記細胞のアポトーシスを阻害するタンパク質、該タンパク質をコードする核酸分子、又は前記細胞内のプロアポトシスタンパク質を阻害する核酸分子若しくはタンパク質を、前記 1 以上の成人造血幹細胞内に送達することにより、前記 1 以上の成人造血幹細胞のアポトーシスを阻害するステップであって、前記タンパク質は、アポトーシスを阻害する B c 1 - 2 ファミリーのメンバーであるステップと、

c ) 条件的に不死化された成人造血幹細胞を作製するために、幹細胞成長因子の組み合わせの存在下、1 以上の前記プロトオンコジーン又は前記プロトオンコジーンによりコードされるタンパク質が活性である条件下で、前記 1 以上の成人造血幹細胞を増殖させるステップと、

を含み、

前記条件的に不死化された成人造血幹細胞は、1 以上のプロトオンコジーンの発現又は前記プロトオンコジーンによりコードされるタンパク質の活性化の存在下で、分化多能性を維持する、方法。

【請求項 2 3】

条件的に不死化された成人幹細胞を作製する方法であり、

a ) 細胞生存及び増殖を促進するプロトオンコジーン又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログを含む核酸分子を、成人造血幹細胞に形質導入するステップであって、前記プロトオンコジーン若しくは前記プロトオンコジーンによりコードされるタンパク質又はその両方の 1 以上が誘導可能であり、且つ 1 以上の M Y C 又は I C N - 1 であるステップと、

b ) アポトーシスを阻害するタンパク質又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログをコードする核酸配列を含む核酸分子を、成人造血幹細胞に形質導入するステップであって、前記コードされたタンパク質は、アポトーシスを阻害する B c 1 - 2 ファミリーのメンバーであるステップと、

c ) 条件的に不死化された成人造血幹細胞を作製するために、幹細胞成長因子の組み合わせの存在下、前記プロトオンコジーンの発現若しくは前記プロトオンコジーンによりコードされるタンパク質の活性化、又はその両方がある条件下で、前記成人造血幹細胞を増殖させるステップと、

を含み、

前記条件的に不死化された成人造血幹細胞は、1 以上のプロトオンコジーンの発現若しくは前記プロトオンコジーンによりコードされるタンパク質の活性化又はその両方の存在下で、分化多能性を維持する、方法。

【請求項 2 4】

前記 ( a ) 若しくは ( b ) の核酸分子、又はその両方が組み換えベクターに含まれている、請求項 2 2 または 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

前記 ( a ) 若しくは ( b ) の核酸分子、又はその両方が、薬剤感受性タンパク質をコードする核酸配列を含む組み換えベクターに含まれている、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

条件的に不死化された成人造血幹細胞の製造方法であって、

a ) 細胞生存及び増殖を促進するプロトオンコジーン又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログによりコードされる第 1 の組み換えタンパク質を、1 以上の成人造血幹細胞に送達するステップであって、前記プロトオンコジーンが 1 以上の M Y C 又は I C N - 1 であるステップ；

b ) アポトーシスを阻害する第 2 の組み換えタンパク質又はその生物学的に活性の断片若しくはホモログを、1 以上の成人造血幹細胞に送達するステップであって、前記タンパク質は、B c 1 - 2 ファミリーに属するメンバーであるステップ；および

c ) 1 以上の条件的に不死化された成人造血幹細胞を作製するために、幹細胞成長因子

の組み合わせの存在下、前記第1の組み換えタンパク質及び前記第2の組み換えタンパク質が活性となる条件で、前記1以上の条件的に不死化された成人造血幹細胞を増殖させるステップ、を含み、

前記1以上の条件的に不死化された成人造血幹細胞は、第1の組み換えタンパク質の存在下で分化多能性を維持する、方法。

【請求項27】

前記第1の組み換えタンパク質若しくは第2の組み換えタンパク質、またはその両方を前記1以上の成人造血幹細胞に送達するステップは、前記第1の組み換えタンパク質若しくは第2の組み換えタンパク質、またはその両方の存在下で、前記1以上の成人造血幹細胞を培養するステップを含む、請求項26記載の方法。

【請求項28】

前記第1の組み換えタンパク質若しくは前記第2の組み換えタンパク質、またはその両方は、外因的に合成されたものである、請求項26または27記載の方法。

【請求項29】

前記増殖のステップが、インターロイキン6(IL-6)、IL-3、および幹細胞因子(SCF)を含む培地で行われる、請求項22~28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

前記増殖のステップが、幹細胞因子(SCF)、IL-6、IL-3、トロンボポイエチン(TPO)、インスリン様増殖因子2(IGF-2)、および線維芽細胞成長因子1(FGF-I)を含む無血清培地で行われる、請求項1、請求項9、または請求項10に記載の方法。

【請求項31】

更に、前記1以上の成人造血幹細胞の分化を可能にするために、前記細胞生存及び増殖を促進するタンパク質の発現、転移又は送達の1以上を停止するステップを含む、請求項22~30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

更に、前記幹細胞のアポトーシスを阻害するタンパク質の発現又は送達の1以上を停止するステップを含む、請求項22~31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

更に、特異的な細胞型に分化を導くサイトカインの少なくとも1つの存在下で、1以上の前記成人造血幹細胞を培養するステップを含む、請求項31又は32記載の方法。

【請求項34】

前記サイトカインはエリスロポエチン(EPO)を含む、請求項33記載の方法

【請求項35】

更に、SCF、IL-3、又はIL-6の少なくとも1つの存在下で、1以上の前記成人造血幹細胞を培養するステップを含む、請求項31又は32記載の方法。

【請求項36】

遺伝子欠損の修正、遺伝子発現の沈黙、又は遺伝子の過剰発現のために、1以上の前記成人造血幹細胞を遺伝的に改変するステップを更に含む、請求項22~35のいずれか1項に記載の方法。

【請求項37】

前記成人造血幹細胞が、低温保存された血液、プラセンタ、骨髓、又は正常患者または顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)で処置された患者の、末梢血液の1以上から得られた成人造血幹細胞である、請求項22~36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】

前記1以上の条件的に不死化された成人造血幹細胞が、請求項1~17のいずれか1項に記載の条件的に不死化された成人造血幹細胞の1以上である、請求項22~37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】

請求項22~37のいずれか1項に記載の方法により得られる、条件的に不死化された

成人造血幹細胞又はそこから分化した細胞。

**【請求項 4 0】**

請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の 1 以上の条件的に不死化された成人造血幹細胞への前記細胞生存及び増殖を促進するタンパク質の発現、活性化又は送達の 1 以上を停止するステップと、

前記 1 以上の条件的に不死化された成人造血幹細胞と E P O とを接触させることと、を含む、赤血球細胞の調製方法。

**【請求項 4 1】**

請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の 1 以上の条件的に不死化された成人造血幹細胞への前記細胞生存及び増殖を促進するタンパク質の発現、活性化又は送達の 1 以上を停止するステップと、

S C F 、 I L - 3 、又は I L - 6 の少なくとも 1 つの存在下で、前記幹細胞を培養するステップと、を含む、N K 又は N K T 細胞の調製方法。

**【請求項 4 2】**

請求項 1 ~ 1 7 及び 3 8 のいずれか 1 項に記載の条件的に不死化された成人造血幹細胞又はそこから分化した細胞を含む、個人へ投与するための医薬。

**【請求項 4 3】**

請求項 2 2 ~ 3 7 、 4 0 及び 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法により得られる条件的に不死化された成人造血幹細胞又はそこから分化した細胞を含む、個人へ投与するための医薬。

**【請求項 4 4】**

前記条件的に不死化された成人造血幹細胞又はそこから分化した細胞が、前もって冷凍された前記細胞のストックから得られたものである、請求項 4 2 又は 4 3 に記載の医薬。

**【請求項 4 5】**

前記個人が、癌、免疫不全症、及び貧血症から選択される 1 以上の状態である、請求項 4 2 又は 4 3 に記載の医薬。

**【請求項 4 6】**

前記個人が、外科的処置を受けているか、免疫細胞の機能の改善を必要とするか、又は幹細胞により修正される遺伝的欠陥を有する、請求項 4 2 又は 4 3 に記載の医薬。

**【請求項 4 7】**

前記個人が、成人造血幹細胞又はそこから分化した細胞を必要としている、請求項 4 2 又は 4 3 に記載の医薬。

**【請求項 4 8】**

T a t タンパク質のタンパク質形質導入ドメイン；及び前記 T a t タンパク質のタンパク質形質導入ドメインと付着し、細胞生存及び増殖を促進することが可能な M Y C タンパク質、を含む、融合タンパク質。

**【請求項 4 9】**

請求項 4 8 記載の融合タンパク質；並びにアポトーシスを抑制する B c l - 2 ファミリーメンバー及び T a t タンパク質のタンパク質形質導入ドメインを含む融合タンパク質、を含む組成物。

**【請求項 5 0】**

インビトロで培養された 1 以上の細胞の細胞増殖又は細胞生存の 1 以上を促進する方法であって、

前記 1 以上の細胞に、請求項 4 8 記載の融合タンパク質又は請求項 4 9 記載の組成物を提供するステップ；及び

培地中で前記 1 以上の細胞を培養するステップ、を含み、前記融合タンパク質又は組成物に暴露されなかつた対応する細胞と比較して、前記 1 以

上の細胞の前記増殖又は生存の 1 以上が増加している、方法。

**【請求項 5 1】**

系統決定並びに / 又は細胞分化及び発達を制御する化合物を同定する方法であり、

a ) 請求項 1 ~ 1 7 及び 3 8 のいずれか 1 項に記載の条件的に不死化された成人造血幹細胞又はそこから分化した細胞を、テストする化合物と接觸させるステップと、

b ) 前記化合物の非存在下での前記幹細胞との比較において、前記 ( a ) の幹細胞の、少なくとも一つの遺伝子型または表現型の特徴を検出するステップであり、と、

を含み、

前記化合物の存在下における前記特徴の差の検出により、前記化合物が前記幹細胞の前記特徴に影響することを示す、方法。