

【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23年10月13日 (2011.10.13)

【公表番号】特表2010-537634(P2010-537634A)

【公表日】平成22年12月9日 (2010.12.9)

【年通号数】公開・登録公報2010-049

【出願番号】特願2010-522965(P2010-522965)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/07 (2010.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

A 6 1 K 35/12 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 2 0 2

C 1 2 Q 1/02

A 6 1 K 35/12

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 37/02

【手続補正書】

【提出日】平成23年8月23日 (2011.8.23)

【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】

哺乳類体細胞を、該細胞が再プログラミングされて多能性状態になるように、W n t 経路をモジュレートする薬剤に接触させることを含む、インビトロで哺乳類体細胞を再プログラミングする方法。

【請求項 2】

前記方法が、

a) 前記薬剤を含有する培養培地中で前記細胞を培養すること；

b) 少なくとも 10 日間前記薬剤を含有する培養培地中で前記細胞を培養すること；

c) 前記 W n t 経路をモジュレートする薬剤に前記細胞を接触させることにより、少なくとも 5 倍 E S 様細胞コロニーの数を増強すること；

d) 前記 W n t 経路をモジュレートする薬剤に前記細胞を接触させることにより、少なくとも 10 倍 E S 様細胞コロニーの数を増強すること；

e) W n t 3 a 馴化培地中で前記細胞を培養すること；

f) W n t 馴化培地中で前記細胞を培養すること；

g) 前記細胞を前記 W n t 経路をモジュレートする第 2 の薬剤と接触させること；または

h) 外因性の可溶性で生物学的に活性な W n t タンパク質を含有する培地中で前記細胞を培養すること

を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞が

a) ヒト細胞である；

- b) 終末分化した細胞である；
- c) 線維芽細胞である；
- d) その型の細胞において通常存在するよりも高レベルで少なくとも1つの再プログラミング因子を発現するかもしくは含有するように改変される；
- e) 遺伝的に改変されない；または
- f) その細胞型の細胞において通常存在するよりも高レベルで c - M y c を発現するように遺伝的に改変されない、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記 W n t タンパク質が W n t 3 a である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

前記再プログラミングされた細胞が多能性であることを確認することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞を再プログラミングした後に該細胞を所望の細胞型にインビトロで分化させることをさらに含む、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

a) 前記方法が細胞の集団に対して実施され、そして該方法が形態学的基準により E S 様細胞を同定することをさらに含む；

b) 前記方法が細胞の集団に対して実施され、そして該方法が再プログラミングされた細胞を選択するための化学的選択を実施することを含まない；または

c) 前記方法が細胞の集団に対して実施され、そして該方法が多能性状態に再プログラミングされる細胞を多能性状態に再プログラミングされない細胞から分離することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

治療を要する個体を治療するための組成物であって、該組成物は、個体から得られた体細胞を含み、ここで該体細胞の少なくとも一部分は、請求項 1 記載の方法に従って再プログラミングされており、

場合により該細胞を 1 つ以上の所望の細胞型に分化させた後に、該個体に該再プログラミングされた細胞の少なくとも一部分を投与することを特徴とする、組成物。

【請求項 9】

(i) 改変または処理を行わない場合よりも高いレベルで少なくとも 1 つの再プログラミング因子を発現または含有するように改変または処理を受けている哺乳類体細胞；および、(i i) W n t 経路の活性を増大させ、そして該体細胞を多能性状態に再プログラミングすることに寄与する薬剤を含む、組成物。

【請求項 10】

前記体細胞が、

a) その型の体細胞に通常存在するよりも高レベルで少なくとも 1 つの再プログラミング因子を発現または含有するように改変される；

b) 遺伝的に改変されない；

c) その型の体細胞において通常存在するよりも高レベルで c - M y c を発現するように遺伝的に改変されない；または

d) その型の体細胞において通常存在するよりも高レベルで少なくとも 1 つの再プログラミング因子を発現するかもしくは含有するように改変される、請求項 9 記載の組成物。

【請求項 11】

下記工程：

(a) W n t 経路の活性をモジュレートする薬剤および候補薬剤を含有する培地中で哺乳類体細胞の集団を培養すること；

(b) 適当な時間の後、適当な時間に亘って培養物中に該細胞およびその子孫を維持した後に E S 細胞の 1 つ以上の特徴を有する細胞が存在するかどうかを決定すること；

を含む、哺乳類体細胞の再プログラミングをモジュレートするために有用である薬剤を同

定する方法であって、該培地が該候補薬剤を含有していない場合に予測されるものとは異なるレベルでE S細胞の1つ以上の特徴を有する細胞が存在するとき、E S様状態への哺乳類体細胞の再プログラミングをモジュレートするために有用であるものとして該候補薬剤を同定する、方法。

【請求項12】

下記工程：

(a) W n t 経路の活性を増大させる薬剤および候補薬剤に哺乳類体細胞の集団を接触させること；

(b) 適当な時間に亘り細胞培養系中に該細胞を維持すること；および、

(c) E S細胞の1つ以上の特徴を有する細胞が該培養系中に存在するかどうかを決定することを含む、E S様状態に哺乳類体細胞を再プログラミングするために有用な薬剤をインビトロで同定する方法であって、該細胞を該候補薬剤に接触させていなかった場合に予測されるものよりも高値のレベルでE S細胞の1つ以上の特徴を有する細胞が存在するとき、E S様状態に哺乳類体細胞を再プログラミングするために有用であるものとして該薬剤を同定する、方法。

【請求項13】

哺乳類体細胞の再プログラミング方法であって、該細胞が再プログラミングされるように細胞外シグナリング分子の存在下に該細胞を培養することを含む、方法。

【請求項14】

前記細胞外シグナリング分子が、細胞受容体の細胞外ドメインへのその分子の結合が前記細胞内のシグナル伝達経路を開始または改変する分子である、請求項13記載の方法。

【請求項15】

前記シグナル伝達経路がW n t 経路である、請求項14記載の方法。

【請求項16】

下記工程：

(a) W n t 経路モジュレーターを含有する培地中で哺乳類体細胞の集団を培養すること；

(b) 適当な時間の後、適当な時間に亘って培養物中に該細胞およびその子孫を維持した後にE S細胞の1つ以上の特徴を有する細胞が存在するかどうかを決定すること；

を含む、多能性状態への哺乳類体細胞の再プログラミングをモジュレートするために有用なW n t 経路モジュレーターを同定するための方法であって、該培地が該W n t 経路モジュレーターを含有していない場合に予測されるものとは異なるレベルでE S細胞の1つ以上の特徴を有する細胞が存在するとき、E S様状態への哺乳類体細胞の再プログラミングをモジュレートするために有用であるものとして該W n t 経路モジュレーターを同定する、方法。

【請求項17】

下記成分：

(a) W n t 経路モジュレーターを含有する細胞培養培地；および、

(b) 複数の哺乳類体細胞であって、ここで(i)該細胞が1つ以上の再プログラミング因子を発現するように遺伝的に改変されているか、もしくは一過性にトランスフェクトされているか；(ii)該細胞が、内因性の多能性遺伝子のためのプロモーターに作動可能に連結した選択マーカーをコードする核酸配列を含有するように遺伝的に改変されているか；または(iii)該細胞培養培地が、c - M y c以外の再プログラミング因子を代替する1つ以上の小分子、核酸、またはポリペプチドを含有する、哺乳類体細胞；を含有する、組成物。

【請求項18】

a) 前記細胞培養培地がW n t - 3 a C Mを含む；および/または

b) 前記1つ以上の再プログラミング因子がO c t 4、N a n o g、S o x 2、L i n 2 8、およびK l f 4から選択される、請求項17記載の組成物。

【請求項19】

i P S 細胞および W n t 経路を活性化する薬剤を含む、組成物。

【請求項 20】

哺乳類体細胞を再プログラミングするための医薬の製造における W n t 経路をモジュレートする薬剤の使用。

【請求項 21】

哺乳類体細胞を再プログラミングするための組成物であって、W n t 経路をモジュレートする薬剤を含む、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】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

本明細書に記載した実施形態の全ては本発明の種々の態様に適用されることを意図している。さらにまた、本発明の種々の実施形態およびその要素は、適切である場合は常時、1つ以上の他のそのような実施形態および/または要素と組み合わせることができることも意図している。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

哺乳類体細胞を、該細胞が再プログラミングされるように、W n t 経路をモジュレートする薬剤に接触させることを含む、哺乳類体細胞を再プログラミングする方法。

(項目 2)

前記細胞を再プログラミングすることが、該細胞を多能性状態に再プログラミングすることを含む、項目 1 記載の方法。

(項目 3)

接触させることが、前記薬剤を含有する培養培地中で前記細胞を培養することを含む、項目 1 記載の方法。

(項目 4)

接触させることが、少なくとも 10 日間前記薬剤を含有する培養培地中で前記細胞を培養することを含む、項目 1 記載の方法。

(項目 5)

前記 W n t 経路をモジュレートする薬剤に前記体細胞を接触させることが、少なくとも 5 倍 E S 様細胞コロニーの数を増強する、項目 1 記載の方法。

(項目 6)

前記 W n t 経路をモジュレートする薬剤に前記体細胞を接触させることが、少なくとも 10 倍 E S 様細胞コロニーの数を増強する、項目 1 記載の方法。

(項目 7)

前記方法が、W n t 馴化培地中で前記細胞を培養することを含む、項目 1 記載の方法。

(項目 8)

前記方法が、W n t 3 a 馴化培地中で前記細胞を培養することを含む、項目 1 記載の方法。

(項目 9)

前記細胞がヒト細胞である、項目 1 記載の方法。

(項目 10)

前記細胞が終末分化した細胞である、項目 1 記載の方法。

(項目 11)

前記細胞が線維芽細胞である、項目 1 記載の方法。

(項目 12)

前記体細胞が、その型の体細胞において通常存在するよりも高レベルで少なくとも 1 つの再プログラミング因子を発現するか含有するように改変される、項目 1 記載の方法。

(項目 1 3)

前記体細胞が遺伝的に改変されない、項目 1 記載の方法。

(項目 1 4)

前記体細胞が、その細胞型の体細胞において通常存在するよりも高レベルで *c - M y c* を発現するように遺伝的に改変されない、項目 1 記載の方法。

(項目 1 5)

前記細胞をさらに *W n t* 経路をモジュレートする第 2 の薬剤と接触させる、項目 1 記載の方法。

(項目 1 6)

外因性の可溶性で生物学的に活性な *W n t* タンパク質を含有する培地中で前記細胞を培養する、項目 1 記載の方法。

(項目 1 7)

前記 *W n t* タンパク質が *W n t 3 a* である、項目 1 6 記載の方法。

(項目 1 8)

前記再プログラミングされた細胞が多能性であることを確認することをさらに含む、項目 1 記載の方法。

(項目 1 9)

前記方法が細胞の集団に対して実施され、そして該方法が形態学的基準により *E S* 様細胞を同定することをさらに含む、項目 1 記載の方法。

(項目 2 0)

前記方法が細胞の集団に対して実施され、そして該方法が再プログラミングされた細胞を選択するための化学的選択を実施することを含まない、項目 1 記載の方法。

(項目 2 1)

前記方法が細胞の集団に対して実施され、そして該方法が多能性状態に再プログラミングされる細胞を多能性状態に再プログラミングされない細胞から分離することをさらに含む、項目 1 記載の方法。

(項目 2 2)

前記再プログラミングされた細胞を対象に投与することをさらに含む、項目 1 記載の方法。

(項目 2 3)

前記細胞を再プログラミングした後に該細胞を所望の細胞型にインビトロで分化させることをさらに含む、項目 1 記載の方法。

(項目 2 4)

前記分化した細胞を対象に投与することをさらに含む、項目 2 3 記載の方法。

(項目 2 5)

下記工程：

(a) 個体から体細胞を得ること；

(b) 項目 1 記載の方法に従って該体細胞の少なくとも一部分を再プログラミングすること；および、

(c) 場合により該細胞を 1 つ以上の所望の細胞型に分化させた後に、該個体に該再プログラミングされた細胞の少なくとも一部分を投与すること；
を含む、治療を要する個体を治療する方法。

(項目 2 6)

前記個体がヒトである、項目 2 5 記載の方法。

(項目 2 7)

前記方法が細胞の集団に対して実施され、そして該方法が多能性状態に再プログラミングされる細胞を多能性状態に再プログラミングされない細胞から分離することをさらに含む、項目 2 5 記載の方法。

(項目 2 8)

前記細胞をインビトロで分化させること、および、場合により、細胞療法が有用である

状態に対する治療を要する個体に該分化した細胞を投与することをさらに含む、項目 2 5 記載の方法。

(項目 2 9)

(i) 改変または処理を行わない場合よりも高いレベルで少なくとも 1 つの再プログラミング因子を発現または含有するように改変または処理を受けている哺乳類体細胞；および、(ii) Wnt 経路の活性を増大させ、そして該体細胞を多能性細胞に再プログラミングすることに寄与する薬剤を含む、組成物。

(項目 3 0)

前記体細胞が、その型の体細胞に通常存在するよりも高レベルで少なくとも 1 つの再プログラミング因子を発現または含有するように改変される、項目 2 9 記載の組成物。

(項目 3 1)

前記薬剤が Wnt 3 a タンパク質である、項目 2 9 記載の組成物。

(項目 3 2)

前記体細胞が遺伝的に改変されない、項目 2 9 記載の組成物。

(項目 3 3)

前記体細胞が、その型の体細胞において通常存在するよりも高レベルで c - Myc を発現するように遺伝的に改変されない、項目 2 9 記載の組成物。

(項目 3 4)

前記体細胞が、その型の体細胞において通常存在するよりも高レベルで少なくとも 1 つの再プログラミング因子を発現するか含有するように改変される、項目 2 9 記載の組成物。

(項目 3 5)

下記工程：

(a) Wnt 経路の活性をモジュレートする薬剤および候補薬剤を含有する培地中で哺乳類体細胞の集団を培養すること；

(b) 適当な時間の後、適当な時間に亘って培養物中に該細胞およびその子孫を維持した後に ES 細胞の 1 つ以上の特徴を有する細胞が存在するかどうかを決定すること；

を含む、哺乳類体細胞の再プログラミングをモジュレートするために有用である薬剤を同定する方法であって、該培地が該候補薬剤を含有していない場合に予測されるものとは異なるレベルで ES 細胞の 1 つ以上の特徴を有する細胞が存在するとき、ES 様状態への哺乳類体細胞の再プログラミングをモジュレートするために有用であるものとして該候補薬剤を同定する、方法。

(項目 3 6)

前記特徴がコロニー形態、ES 細胞により選択的に発現される内在性遺伝子の発現、ES 細胞により選択的に発現される遺伝子の発現制御配列に作動可能に連結した検出可能なマーカーの発現、免疫無防備状態のマウスに注射した場合に内胚葉、中胚葉および外胚葉の特徴を有する細胞に分化する能力、および分娩まで生存するキメラの形成に關与する能力から選択される、項目 3 5 記載の方法。

(項目 3 7)

前記細胞が少なくとも 1 つの再プログラミング因子を発現するように改変されている、項目 3 5 記載の方法。

(項目 3 8)

前記培地が Wnt 馴化培地である、項目 3 5 記載の方法。

(項目 3 9)

前記培地が Wnt 3 a 馴化培地である、項目 3 5 記載の方法。

(項目 4 0)

前記 Wnt 経路の活性をモジュレートする薬剤が Wnt 3 a タンパク質である、項目 3 5 記載の方法。

(項目 4 1)

前記候補薬剤が小分子である、項目 3 5 記載の方法。

(項目 4 2)

前記方法が、哺乳類体細胞の再プログラミングを増強するために有用である薬剤を同定することを含み、前記培地が前記候補薬剤を含有していない場合に予測されるものより高値のレベルでES細胞の1つ以上の特徴を有する細胞が存在するとき、ES様状態への哺乳類体細胞の再プログラミングを増強するために有用であるものとして該候補薬剤を同定する、項目35記載の方法。

(項目 4 3)

工程 (b) が適当な時間に亘って培養物中に前記細胞およびその子孫を維持した後にES細胞コロニーの1つ以上の特徴を有する細胞コロニーが存在するかどうかを決定することを含み、前記培地が前記候補薬剤を含有していない場合に予測されるものとは異なるレベルでES細胞コロニーの1つ以上の特徴を有する細胞コロニーが存在するとき、ES様状態への哺乳類体細胞の再プログラミングをモジュレートするために有用であるものとして該候補薬剤を同定する、項目35記載の方法。

(項目 4 4)

前記細胞が少なくとも1つの再プログラミング因子を発現する、項目35記載の方法。

(項目 4 5)

下記工程：

(a) W n t 経路の活性を増大させる薬剤および候補薬剤に哺乳類体細胞の集団を接触させること；

(b) 適当な時間に亘り細胞培養系中に該細胞を維持すること；および、

(c) ES細胞の1つ以上の特徴を有する細胞が該培養系中に存在するかどうかを決定することを含む、ES様状態に哺乳類体細胞を再プログラミングするために有用な薬剤を同定する方法であって、該細胞を該候補薬剤に接触させていなかった場合に予測されるものよりも高値のレベルでES細胞の1つ以上の特徴を有する細胞が存在するとき、ES様状態に哺乳類体細胞を再プログラミングするために有用であるものとして該薬剤を同定する、方法。

(項目 4 6)

前記特徴が、コロニー形態、ES細胞により選択的に発現される内在性遺伝子の発現、ES細胞により選択的に発現される遺伝子の発現制御配列に作動可能に連結した検出可能なマーカーの発現、免疫無防備状態のマウスに注射した場合に内胚葉、中胚葉および外胚葉の特徴を有する細胞に分化する能力、および分娩まで生存するキメラの形成に關与する能力から選択される、項目45記載の方法。

(項目 4 7)

前記W n t 経路の活性を増大させる薬剤がW n t 3 a タンパク質である、項目45記載の方法。

(項目 4 8)

前記候補薬剤が小分子である、項目45記載の方法。

(項目 4 9)

前記細胞が少なくとも1つの再プログラミング因子を発現する、項目45記載の方法。

(項目 5 0)

工程 (b) が適当な時間に亘って培養物中に前記細胞およびその子孫を維持した後にES細胞コロニーの1つ以上の特徴を有する細胞コロニーが存在することを決定することを含み、前記培地が前記候補薬剤を含有していない場合に予測されるものとは異なるレベルでES細胞コロニーの1つ以上の特徴を有する細胞コロニーが存在するとき、ES様状態への哺乳類体細胞の再プログラミングをモジュレートするために有用であるものとして該候補薬剤を同定する、項目45記載の方法。

(項目 5 1)

細胞が再プログラミングされるように細胞外シグナリング分子の存在下に該細胞を培養することを含む、哺乳類体細胞の再プログラミング方法。

(項目 5 2)

前記細胞外シグナリング分子が、細胞受容体の細胞外ドメインへのその分子の結合が細胞内のシグナル伝達経路を開始または改変する分子である、項目 5 1 記載の方法。

(項目 5 3)

前記シグナル伝達経路が W n t 経路である、項目 5 2 記載の方法。

(項目 5 4)

下記工程：

(a) W n t 経路モジュレーターを含有する培地中で哺乳類体細胞の集団を培養すること；

(b) 適当な時間の後、適当な時間に亘って培養物中に該細胞およびその子孫を維持した後に E S 細胞の 1 つ以上の特徴を有する細胞が存在するかどうかを決定すること；

を含む、多能性状態への哺乳類体細胞の再プログラミングをモジュレートするために有用な W n t 経路モジュレーターを同定するための方法であって、該培地が該 W n t 経路モジュレーターを含有していない場合に予測されるものとは異なるレベルで E S 細胞の 1 つ以上の特徴を有する細胞が存在するとき、E S 様状態への哺乳類体細胞の再プログラミングをモジュレートするために有用であるものとして該 W n t 経路モジュレーターを同定する、方法。

(項目 5 5)

前記方法が、(i) 少なくとも 1 0 の W n t 経路モジュレーターを試験すること；および (i i) 該 W n t 経路モジュレーターのうちの 1 つ以上を、他の試験した W n t 経路モジュレーターの少なくとも 5 0 % よりも再プログラミングの速度または効率に対して有意に高い作用を有するものとして同定することを含む、項目 5 4 記載の方法。

(項目 5 6)

前記方法が、少なくとも 2 0 の W n t 経路モジュレーターを試験することを含む、項目 5 4 記載の方法。

(項目 5 7)

前記方法が、前記 W n t 経路モジュレーターのうちの 1 つ以上を、他の試験した W n t 経路モジュレーターの少なくとも 7 5 % よりも再プログラミングの速度または効率に対して有意に高い作用を有するものとして同定することを含む、項目 5 4 記載の方法。

(項目 5 8)

前記 W n t 経路モジュレーターが小分子である、項目 5 4 記載の方法。

(項目 5 9)

適当な時間の後、前記培地が前記 W n t 経路モジュレーターを含有していない場合に予測されるものよりも多い数で E S 細胞の 1 つ以上の特徴を有する細胞が存在するとき、E S 様状態へ細胞を再プログラミングする速度または効率を上昇させるために有用であるものとして該 W n t 経路モジュレーターを同定する、項目 5 4 記載の方法。

(項目 6 0)

下記成分：

(a) W n t 経路モジュレーターを含有する細胞培養培地；および、

(b) 複数の哺乳類体細胞であって、ここで (i) 該細胞が 1 つ以上の再プログラミング因子を発現するように遺伝的に改変されているか、もしくは一過性にトランスフェクトされているか；(i i) 該細胞が、内因性の多能性遺伝子のためのプロモーターに作動可能に連結した選択マーカーをコードする核酸配列を含有するように遺伝的に改変されているか；または (i i i) 該細胞培養培地が、c - M y c 以外の再プログラミング因子を代替する 1 つ以上の小分子、核酸、またはポリペプチドを含有する、哺乳類体細胞；を含む、組成物。

(項目 6 1)

前記細胞培養培地が W n t - 3 a C M を含む、項目 6 0 記載の組成物。

(項目 6 2)

前記 1 つ以上の再プログラミング因子が O c t 4、N a n o g、S o x 2、L i n 2 8、および K l f 4 から選択される、項目 6 0 記載の組成物。

(項目 6 3)

i P S 細胞および W n t 経路を活性化する薬剤を含む、組成物。

(項目 6 4)

前記 W n t 経路を活性化する薬剤が W n t 3 a タンパク質である、項目 6 3 記載の組成物。

(項目 6 5)

哺乳類体細胞を再プログラミングするための医薬の製造における W n t 経路をモジュールする薬剤の使用。