

【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、Wnt経路をモジュレートする薬剤に接触させることを含む、インピ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で前記細胞を培養すること；
- c) 前記Wnt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ES様細胞コロニーの数を増強すること；
- d) 前記Wnt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ES様細胞コロニーの数を増強すること；
- e) Wnt3a馴化培地で前記細胞を培養すること；
- f) Wnt馴化培地で前記細胞を培養すること；
- g) 前記細胞を前記Wnt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Wntタンパク質を含有する培地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 - Myc 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 Wnt タンパク質が Wnt3a 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 ES 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 - Myc 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) 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 1 2】

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ピ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 1 3】

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 1 4】

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 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記シグナル伝達経路が W n t 経路である、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

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 1 7】

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クレプトされているか； (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 1 8】

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 1 7 記載の組成物。

【請求項 1 9】

iPS細胞およびWnt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Wnt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、Wnt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ができるこ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、Wnt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Wnt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ES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Wnt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ES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、Wnt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、Wnt3a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13)

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14)

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-Myc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15)

前記細胞をさらにWnt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16)

外因性の可溶性で生物学的に活性なWnt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17)

前記Wntタンパク質がWnt3aである、項目16記載の方法。

(項目18)

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19)

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ES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20)

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21)

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22)

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23)

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24)

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23記載の方法。

(項目25)

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、治療をする個体を治療する方法。

(項目26)

前記個体がヒトである、項目25記載の方法。

(項目27)

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25記載の方法。

(項目28)

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 25 記載の方法。

(項目 29)

(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細胞；および、(ii) Wnt 経路の活性を増大させ、そして該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 30)

前記細胞が、その型の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 29 記載の組成物。

(項目 31)

前記薬剤が Wnt3a タンパク質である、項目 29 記載の組成物。

(項目 32)

前記細胞が遺伝的に改変されない、項目 29 記載の組成物。

(項目 33)

前記細胞が、その型の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 29 記載の組成物。

(項目 34)

前記細胞が、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含有するように改変される、項目 29 記載の組成物。

(項目 35)

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に哺乳類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 36)

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関与する能力から選択される、項目 35 記載の方法。

(項目 37)

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 35 記載の方法。

(項目 38)

前記培地が Wnt 飼化培地である、項目 35 記載の方法。

(項目 39)

前記培地が Wnt3a 飼化培地である、項目 35 記載の方法。

(項目 40)

前記 Wnt 経路の活性をモジュレートする薬剤が Wnt3a タンパク質である、項目 35 記載の方法。

(項目 41)

前記候補薬剤が小分子である、項目 35 記載の方法。

(項目42)

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43)

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44)

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45)

下記工程：

(a) Wnt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46)

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関与する能力から選択される、項目45記載の方法。

(項目47)

前記Wnt経路の活性を増大させる薬剤がWnt3aタンパク質である、項目45記載の方法。

(項目48)

前記候補薬剤が小分子である、項目45記載の方法。

(項目49)

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50)

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51)

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52)

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51記載の方法。

(項目53)

前記シグナル伝達経路がWnt経路である、項目52記載の方法。

(項目54)

下記工程：

(a) Wnt経路モジュレーターを含有する培地中に哺乳類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、多能性状態への哺乳類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Wnt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Wnt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Wnt経路モジュレーターを同定する、方法。

(項目55)

前記方法が、(i)少なくとも10のWnt経路モジュレーターを試験すること；および(ii)該Wnt経路モジュレーターのうちの1つ以上を、他の試験したWnt経路モジュレーターの少なくとも50%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54記載の方法。

(項目56)

前記方法が、少なくとも20のWnt経路モジュレーターを試験することを含む、項目54記載の方法。

(項目57)

前記方法が、前記Wnt経路モジュレーターのうちの1つ以上を、他の試験したWnt経路モジュレーターの少なくとも75%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54記載の方法。

(項目58)

前記Wnt経路モジュレーターが小分子である、項目54記載の方法。

(項目59)

適当な時間の後、前記培地が前記Wnt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Wnt経路モジュレーターを同定する、項目54記載の方法。

(項目60)

下記成分：

(a) Wnt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クレプトされているか；(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-Myc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、哺乳類細胞；を含有する、組成物。

(項目61)

前記細胞培養培地がWnt-3aCMを含む、項目60記載の組成物。

(項目62)

前記1つ以上の再プログラミング因子がOct4、Nanog、Sox2、Lin28、およびKlf4から選択される、項目60記載の組成物。

(項目63)

iPS細胞およびWnt経路を活性化する薬剤を含む、組成物。

(項目64)

前記Wnt経路を活性化する薬剤がWnt3aタンパク質である、項目63記載の組成物。

(項目65)

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Wnt経路をモジュレートする薬剤の使用。