

【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3月10日 (2011.3.10)

【公表番号】特表2010-516238(P2010-516238A)

【公表日】平成22年5月20日 (2010.5.20)

【年通号数】公開・登録公報2010-020

【出願番号】特願2009-545964(P2009-545964)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 N 5/0775 (2010.01)

C 1 2 N 5/078 (2010.01)

C 1 2 N 5/0786 (2010.01)

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/26 (2006.01)

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/073 (2010.01)

C 1 2 N 5/077 (2010.01)

G 0 1 N 27/62 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 2 0 2 A

C 1 2 N 5/00 2 0 2 H

C 1 2 N 5/00 2 0 2 J

C 1 2 N 5/00 2 0 2 N

C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 9/26

C 1 2 N 5/00 2 0 2 C

C 1 2 N 5/00 2 0 2 B

C 1 2 N 5/00 2 0 2 G

G 0 1 N 27/62 V

【手続補正書】

【提出日】平成23年1月17日 (2011.1.17)

【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】

胚性幹細胞、臍帯血細胞、造血幹細胞または間葉幹細胞のシアリレーションまたはフコシルレーションを変更する方法において、

a) C M P－シアリ酸および特異的シアリルトランスフェラーゼ酵素を使用することで前記細胞をシアリル化するステップと、および／または、

b) シアリダーゼ酵素によって前記細胞を脱シアリル化するステップと、および／または、

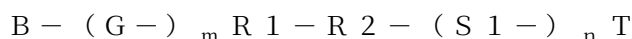
c) G D P－F u c および特異的フコシルトランスフェラーゼ酵素の使用によって前記細胞をフコシル化するステップと、を具え、

1) ここで、前記酵素が、アミン、チオールまたは酸化グリカンに対して化学的にタグ化され、および、

2) 前記酵素が当該酵素の基質結合部位に結合するインヒビタを使用して除去される、方法。

【請求項 2】

前記酵素が、
式 CONJ、



による構造を具え、Bは前記酵素、Gはグリカン（前記酵素がグリカンコンジュゲート体であるとき）、R1およびR2は、化学選択的なライゲーション基、Tはタグ、好ましくは、ビオチン；S1は、選択的なスペーサ基、好ましくは、 C_{1-10} アルキル、mおよびnは、独立して、0または1の整数である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記酵素が、抗原、ビオチン、ヒスータグ、化学タグ、フルオロアルカンまたはビオチン、好ましくは、フルオロアルカンのビオチンからなる群から選択されるタグ化基を酵素表面に共有結合することによってタグ化される、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

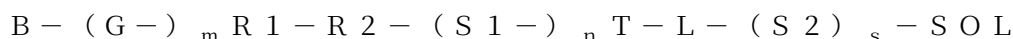
前記酵素がタグ化グリカンである、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記酵素が、N-アセチルラクトースアミン、FTIII、FTIV、FTV、FTVI、FTVIIおよびFTIX、ST3GalIII、ST3GalIVおよびST6GalIと反応するシアリルトランスフェラーゼまたはフコシルトランスフェラーゼ、あるいは、ST3GalIまたはST3GalIIおよびST3GalIVなど、O-グリカンコアIと反応するシアリルトランスフェラーゼからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記タグ化酵素は、式：



に従って、固相とタグ化酵素の複合体を形成し、

Bは前記酵素、SOLは固相、アフィニティマトリックス、ポリマ、または、前記酵素を除去するのに有用な他のマトリックス、Gはグリカン（前記酵素がグリカンコンジュゲート体であるとき）、

R1およびR2が、化学選択的なライゲーション基、Tはタグ、好ましくは、ビオチン、Lはタグに対して特異的に結合するリガンド；S1およびS2は、選択的スペーサ基、好ましくは、 C_{1-10} アルキル、

m、nおよびsは、独立して、0または1の整数であり、T-L間のリンクは、非共有性のアフィニティ結合でもよい、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記タグ化修飾酵素は、マトリックスに固定化され、前記マトリックスを前記細胞から分離することによって取り除く、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記方法が、前記細胞をCMP-シアル酸およびシアリルトランスフェラーゼ酵素とともに培養することによって、特異的 $\alpha 3$ -および/または $\alpha 6$ -リンクシアル酸を用いたシアリレーションステップ、および/または、細胞をGDP-Fuc酸およびフコシルトランスフェラーゼ酵素とともに培養することによって、特異的な $\alpha 3$ -および/または $\alpha 4$ -リンクフコースを用いたフコシレーションステップを具える、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記酵素のインヒビタまたは基質とともに細胞を培養するステップを含む、グリコシルトランスフェラーゼまたはシアリダーゼ修飾酵素を修飾細胞から除去する、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記インヒビタは、競合モノサッカライドグリコシドまたはオリゴサッカライドインヒビタである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

単離した臍帯血細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞または胚性幹細胞から調製または取得した細胞集団において、当該細胞集団が、

a) C M P-シアル酸および特異的シアリルトランスフェラーゼ酵素の使用によって細胞をシアリル化するステップと、および／または、

b) シアリダーゼ酵素によって前記細胞を脱シアリル化するステップと、および／または、

c) G D P-F u c および特異的フコシルトランスフェラーゼ酵素の使用によって、細胞をフコシル化するステップと；によって得ることが出来るインビトロ酵素的変更シアリレーションおよび／またはフコシレーションを具え、ここで、

1) 酵素が、アミン、チオールまたは酸化グリカンに化学的にタグ化され、

2) 前記酵素が、当該酵素の基質結合部位に結合するインヒビタを使用することで除去される、細胞集団。

【請求項 1 2】

前記細胞表面の前記増大したシアリル化および／またはフコシル化構造が、前記細胞を特異的組織にターゲティングするために使用される、請求項 1 1 に記載の細胞集団。

【請求項 1 3】

請求項 1 1 に記載の修飾細胞上にある構造の存在に関する質量分析において、グリカンの放出、グリカンフラクションの精製、分子質量の測定；選択的に、特異的シアリダーゼ酵素によるグリカンの一部の修飾、および、前記修飾されたグリカンの分析；および、前記特異的な構造へのグリカン分子質量の割当／適合、を具え、

好ましくは、シアリレーションレベル、および、選択的に、N e u G c の有無が、m/z 1 9 4 6、m/z 2 2 3 7 および m/z 2 2 5 3 でのグリカン名としてのおおよその正確質量数を用いて、指標グリカニングナル、または、表 1 および／または表 6 に挙げられた N e u G c 構造に割り当てられた対応するシグナルおよび付加的なシグナルによって分析され、ただし、選択的に、前記質量数が代替構造にも対応するとき、N e u G c の存在は、さらに、他のデータ、好ましくは、質量分析計またはラベリングデータによって確認される、質量分析。

【請求項 1 4】

臍帯血細胞集団における C F U を増大させるために、臍帯血細胞をインビトロで前記細胞のシアリレーションおよび／またはフコシレーションを変更する酵素と接触させるステップを含む方法。

【請求項 1 5】

前記トランスフェラーゼ又は修飾酵素が、アミンまたはチオール基および／またはタグ化グリカンに共有結合的にタグ化される、シアリルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼまたはシアリダーゼ細胞修飾酵素。

【請求項 1 6】

前記 トランスフェラーゼ又は酵素が、

式 C O N J

$$B - (G -)_m R 1 - R 2 - (S 1 -)_n T$$

に従った構造を具え、B は前記 トランスフェラーゼ又は酵素であり、G はグリカン（前記トランスフェラーゼ又は酵素がグリカンコンジュゲート体のとき）、R 1 および R 2 は、化学選択的ライゲーション基であり、T はタグ、好ましくは、ビオチン；S 1 は、選択的スぺーサ基、好ましくは C₁ - C₁₀ アルキル、m および n は、独立して、0 または 1 の整数である、請求項 1 5 に記載の トランスフェラーゼ又は酵素。

【請求項 1 7】

単離された初期ヒト細胞から調製または取得した新規細胞集団において、前記細胞集団

は、インビトロで酵素的に変更されたシアリレーションを具え、

a. Neu5Acによるインビトロでの増大したシアリレーション、および／または、

b. インビトロでの低減したシアリレーション、および／または、

c. GDP-Fucおよび特異的フコシルトランスフェラーゼ酵素の使用による前記細胞のフコシレーション、

とのいずれかを具える、細胞集団。

【請求項18】

前記細胞集団が、増大した量のNeu5Ac α 3構造のみを具え、さらに、増大した量の α 3-および／または α 4-リンクフコースを具える、請求項17に記載の細胞集団。

【請求項19】

単離された初期ヒト細胞集団に対して、末端シアル酸グリコシレーションを変更する方法にいて、当該方法が、前記細胞を、インタクト細胞のグリカン構造を変更可能な、グリコシダーゼおよび／またはグリコシルトランスフェラーゼ酵素の少なくとも一方と接触させる反応ステップを具える、方法。