

【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25年5月23日(2013.5.23)

【公表番号】特表2012-508591(P2012-508591A)

【公表日】平成24年4月12日(2012.4.12)

【年通号数】公開・登録公報2012-015

【出願番号】特願2011-545349(P2011-545349)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

A 6 1 K 35/12 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 5/00 1 0 2

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

A 6 1 K 35/12

【手続補正書】

【提出日】平成24年3月23日(2012.3.23)

【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】

(a) OriP部位；(b) EBNA1遺伝子をコードするDNAセグメント；(c) 1つまたは複数のatt組換え部位；および(d) 少なくとも1つの選択可能なマーカーをコードするDNAセグメントを含む、単離された核酸分子。

【請求項2】

EBNA1発現が構成的である、請求項1記載の単離された核酸分子。

【請求項3】

EBNA1発現を駆動する構成的プロモーターが、天然のEBNA1プロモーター、強力なウイルスプロモーター、操作された構成的プロモーター、または系統特異的もしくは組織特異的な構成的プロモーターからなる群より選択される、請求項2記載の単離された核酸分子。

【請求項4】

EBNA1発現が誘導性である、請求項1記載の単離された核酸分子。

【請求項5】

EBNA1発現を駆動する誘導性プロモーターが誘導性抗生物質オペロンである、請求項4記載の単離された核酸分子。

【請求項6】

発現が望まれるDNA配列に作動可能に連結されたプロモーターをそれぞれが含む1つまた

は複数の発現カセットが、前記単離された核酸分子内の1つまたは複数のatt組換え部位の少なくとも1つに導入されている、請求項2または4記載の単離された核酸分子。

【請求項7】

発現カセットが組織特異的遺伝子、リプログラミング遺伝子、または発生遺伝子をコードする、請求項6記載の単離された核酸分子。

【請求項8】

リプログラミング遺伝子が、Oct4、Sox2、c-Myc、およびKlf4；Oct3/4、Nanog、Lin28、SSEA1、ならびにTRA1-80からなる群より選択される、請求項7記載の単離された核酸分子。

【請求項9】

発現カセットを駆動するプロモーターが、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、リプログラミング遺伝子プロモーター、および発生遺伝子プロモーターからなる群より選択されるタイプである、請求項6記載の単離された核酸分子。

【請求項10】

発現カセットを駆動するプロモーターが哺乳動物起源の天然のプロモーターである、請求項9記載の単離された核酸分子。

【請求項11】

発現カセットを駆動するプロモーターが操作されたプロモーターである、請求項6記載の単離された核酸分子。

【請求項12】

発現カセットを駆動するプロモーターが細胞特異的プロモーターである、請求項9記載の単離された核酸分子。

【請求項13】

発現カセットを駆動するプロモーターが発生段階特異的プロモーターである、請求項9記載の単離された核酸分子。

【請求項14】

細胞が幹細胞である、請求項12記載の単離された核酸分子。

【請求項15】

発生段階が生殖細胞、胚性細胞、前駆細胞、胎児細胞、新生児細胞、または幹細胞のいずれかの段階である、請求項13記載の単離された核酸分子。

【請求項16】

哺乳動物がヒトである、請求項10記載の単離された核酸分子。

【請求項17】

リプログラミング遺伝子プロモーターが、Oct4、Sox2、c-Myc、およびKlf4；Oct3/4、Nanog、Lin28、SSEA1、ならびにTRA1-80からなるプロモーターの群から選択される、請求項9記載の単離された核酸分子。

【請求項18】

選択可能なマーカーが蛍光タンパク質、抗生物質耐性を与えるタンパク質、または酵素のいずれかである、請求項1記載の単離された核酸分子。

【請求項19】

選択可能なマーカーが蛍光タンパク質である、請求項18記載の単離された核酸分子。

【請求項20】

蛍光タンパク質が、緑色蛍光タンパク質（GFP）およびその修飾された突然変異体、赤色蛍光タンパク質（RFP）およびその修飾された突然変異体などからなる群より選択される、請求項19記載の単離された核酸分子。

【請求項21】

蛍光タンパク質がGFPである、請求項20記載の単離された核酸分子。

【請求項22】

選択可能なマーカーが抗生物質耐性を与えるタンパク質である、請求項18記載の単離された核酸分子。

【請求項 23】

抗生物質がテトラサイクリン、ネオマイシン、ブラストサイジン、ハイグロマイシン、アンピシリン、およびピューロマイシンからなる群より選択される、請求項22記載の単離された核酸分子。

【請求項 24】

抗生物質がハイグロマイシンである、請求項23記載の単離された核酸分子。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

もう一つの具体的局面において、本発明は、(a)パキユロウイルスゲノムの全てまたは一部；(b)OriP部位；(c)1つまたは複数のatt組換え部位；(d)誘導性プロモーター下にEBNA1遺伝子をコードするDNAセグメント；ならびに(e)少なくとも1つの選択可能なマーカー；(f)任意で、WPREエレメントおよび/またはVSV-Gエレメントを含む、単離された核酸分子を目的とする。

[本発明1001]

(a) OriP部位；(b) EBNA1遺伝子をコードするDNAセグメント；(c) 1つまたは複数のatt組換え部位；および(d) 少なくとも1つの選択可能なマーカーをコードするDNAセグメントを含む、単離された核酸分子。

[本発明1002]

EBNA1発現が構成的である、本発明1001の単離された核酸分子。

[本発明1003]

EBNA1発現を駆動する構成的プロモーターが、天然のEBNA1プロモーター、強力なウイルスプロモーター、操作された構成的プロモーター、または系統特異的もしくは組織特異的な構成的プロモーターからなる群より選択される、本発明1002の単離された核酸分子。

[本発明1004]

EBNA1発現が誘導性である、本発明1001の単離された核酸分子。

[本発明1005]

EBNA1発現を駆動する誘導性プロモーターが誘導性抗生物質オペロンである、本発明1004の単離された核酸分子。

[本発明1006]

発現が望まれるDNA配列に作動可能に連結されたプロモーターをそれぞれが含む1つまたは複数の発現カセットが、前記単離された核酸分子内の1つまたは複数のatt組換え部位の少なくとも1つに導入されている、本発明1002または1004の単離された核酸分子。

[本発明1007]

発現カセットが組織特異的遺伝子、リプログラミング遺伝子、または発生遺伝子をコードする、本発明1006の単離された核酸分子。

[本発明1008]

リプログラミング遺伝子が、Oct4、Sox2、c-Myc、およびKlf4；Oct3/4、Nanog、Lin28、SSEA1、ならびにTRA1-80からなる群より選択される、本発明1007の単離された核酸分子。

[本発明1009]

発現カセットを駆動するプロモーターが、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、リプログラミング遺伝子プロモーター、および発生遺伝子プロモーターからなる群より選択されるタイプである、本発明1006の単離された核酸分子。

[本発明1010]

発現カセットを駆動するプロモーターが哺乳動物起源の天然のプロモーターである、本発明1009の単離された核酸分子。

[本発明1011]

発現カセットを駆動するプロモーターが操作されたプロモーターである、本発明1006の単離された核酸分子。

[本発明1012]

発現カセットを駆動するプロモーターが細胞特異的プロモーターである、本発明1009の単離された核酸分子。

[本発明1013]

発現カセットを駆動するプロモーターが発生段階特異的プロモーターである、本発明1009の単離された核酸分子。

[本発明1014]

細胞が幹細胞である、本発明1012の単離された核酸分子。

[本発明1015]

発生段階が生殖細胞、胚性細胞、前駆細胞、胎児細胞、新生児細胞、または幹細胞のいずれかの段階である、本発明1013の単離された核酸分子。

[本発明1016]

哺乳動物がヒトである、本発明1010の単離された核酸分子。

[本発明1017]

リプログラミング遺伝子プロモーターが、Oct4、Sox2、c-Myc、およびKlf4；Oct3/4、Nanog、Lin28、SSEA1、ならびにTRA1-80からなるプロモーターの群から選択される、本発明1009の単離された核酸分子。

[本発明1018]

選択可能なマーカーが蛍光タンパク質、抗生物質耐性を与えるタンパク質、または酵素のいずれかである、本発明1001の単離された核酸分子。

[本発明1019]

選択可能なマーカーが蛍光タンパク質である、本発明1018の単離された核酸分子。

[本発明1020]

蛍光タンパク質が、緑色蛍光タンパク質（GFP）およびその修飾された突然変異体、赤色蛍光タンパク質（RFP）およびその修飾された突然変異体などからなる群より選択される、本発明1019の単離された核酸分子。

[本発明1021]

蛍光タンパク質がGFPである、本発明1020の単離された核酸分子。

[本発明1022]

選択可能なマーカーが抗生物質耐性を与えるタンパク質である、本発明1018の単離された核酸分子。

[本発明1023]

抗生物質がテトラサイクリン、ネオマイシン、ブラストサイジン、ハイグロマイシン、アンピシリン、およびピューロマイシンからなる群より選択される、本発明1022の単離された核酸分子。

[本発明1024]

抗生物質がハイグロマイシンである、本発明1023の単離された核酸分子。

[本発明1025]

（a）ウイルスゲノムの全部または一部；（b）OriP部位；（c）1つまたは複数のatt組換え部位；（d）任意で、EBNA1遺伝子をコードするDNAセグメント；および（e）少なくとも1つの選択可能なマーカーを含む、単離された核酸分子。

[本発明1026]

EBNA1をコードするDNAセグメントが同じ前記核酸分子上にある、本発明1025の単離された核酸分子。

[本発明1027]

EBNA1をコードするDNAセグメントが、別の、第2の単離された核酸分子上にあり、該第2の単離された核酸分子が（a）ウイルスゲノムの全部または一部；（b）OriP部位；（c）1

つまたは複数のatt組換え部位；および(d)少なくとも1つの選択可能なマーカーをさらに含む、本発明1025の単離された核酸分子。

[本発明1028]

EBNA1発現が構成的である、本発明1025または1027の単離された核酸分子。

[本発明1029]

EBNA1発現を駆動する構成的プロモーターが、天然のEBNA1プロモーター、強力なウイルスプロモーター、操作された構成的プロモーター、系統特異的プロモーター、または組織特異的プロモーターからなる群より選択される、本発明1028の単離された核酸分子。

[本発明1030]

EBNA1発現が誘導性である、本発明1025または1027の単離された核酸分子。

[本発明1031]

EBNA1発現を駆動する誘導性プロモーターが誘導性の抗生物質オペロンである、本発明1030の単離された核酸分子。

[本発明1032]

誘導性の抗生物質オペロンがTetオペロンである、本発明1031の単離された核酸分子。

[本発明1033]

前記ウイルスゲノムが昆虫ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルス由来である、本発明1025または1027の単離された核酸分子。

[本発明1034]

ウイルスゲノムが昆虫ウイルス由来である、本発明1033の単離された核酸分子。

[本発明1035]

昆虫ウイルスがバキュロウイルスである、本発明1034の単離された核酸分子。

[本発明1036]

昆虫ウイルスがWPREエレメントおよび/またはVSV-Gエレメントをさらに含む、本発明1035の単離された核酸分子。

[本発明1037]

発現が望まれるDNA配列に作動可能に連結されたプロモーターをそれぞれが含む1つまたは複数の発現カセットが、前記単離された核酸分子内の1つまたは複数のatt組換え部位の少なくとも1つに導入されている、本発明1025または1027の単離された核酸分子。

[本発明1038]

前記1つまたは複数の発現カセットの少なくとも1つが、組織特異的プロモーター、リプログラミング遺伝子プロモーター、発生遺伝子プロモーターなどからなる群より選択されるプロモーターを有する、本発明1037の単離された核酸分子。

[本発明1039]

1つまたは複数の発現カセットの少なくとも1つが、組織特異的遺伝子、リプログラミング遺伝子、または発生遺伝子をコードする、本発明1025または1027の単離された核酸分子。

[本発明1040]

リプログラミング遺伝子がOct4、Sox2、c-Myc、およびKlf4；Oct3/4、Nanog、Lin28、SEA1、ならびにTRA1-80からなる群より選択される、本発明1039の単離された核酸分子。

[本発明1041]

リプログラミング遺伝子プロモーターが哺乳動物起源の天然のプロモーターである、本発明1038の単離された核酸分子。

[本発明1042]

リプログラミング遺伝子プロモーターが操作されたプロモーターである、本発明1038の単離された核酸分子。

[本発明1043]

プロモーターが細胞特異的プロモーターである、本発明1038の単離された核酸分子。

[本発明1044]

プロモーターが発生段階特異的プロモーターである、本発明1038の単離された核酸分子。

°

[本発明1045]

細胞が幹細胞である、本発明1043の単離された核酸分子。

[本発明1046]

発生段階が生殖段階、胚性段階、前駆段階、胎児段階、新生児段階、または幹細胞段階のいずれかである、本発明1044の単離された核酸分子。

[本発明1047]

哺乳動物がヒトである、本発明1041の単離された核酸分子。

[本発明1048]

選択可能なマーカーが抗生物質耐性を与えるタンパク質である、本発明1025の単離された核酸分子。

[本発明1049]

抗生物質がテトラサイクリン、ネオマイシン、ブラストサイジン、ハイグロマイシン、アンピシリン、およびピューロマイシンからなる群より選択される、本発明1048の単離された核酸分子。

[本発明1050]

抗生物質がハイグロマイシンである、本発明1049の単離された核酸分子。

[本発明1051]

(a) ウイルスゲノムの全部または一部；(b) プロモーターによって駆動される1つまたは複数の発現カセット；(c) 少なくとも1つの選択可能なマーカー；ならびに(d) 任意で、WPREエレメントおよび/またはVSV-GエレメントをコードするDNAセグメントを含む、単離された核酸分子。

[本発明1052]

前記発現カセットがコードするリプログラミング遺伝子がOct4、Sox2、c-Myc、およびKlf4；Oct3/4、Nanog、Lin28、SSEA1、ならびにTRA1-80からなる群より選択される、本発明1051の単離された核酸分子。

[本発明1053]

前記発現カセットが、組織特異的遺伝子、リプログラミング遺伝子、または発生遺伝子をコードする、本発明1051の単離された核酸分子。

[本発明1054]

発現カセットを駆動するプロモーターが、天然のプロモーター、操作されたプロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、リプログラミング遺伝子プロモーター、および発生遺伝子プロモーターからなる群より選択される、本発明1051の単離された核酸分子。

[本発明1055]

SEQ ID NO:3のpBacMam Ver1プロモーターレスウイルスベクターを含む、キット。

[本発明1056]

SEQ ID NO:4のpEBNA-DESTプラスミドベクターを含む、キット。

[本発明1057]

SEQ ID NO:5のpEP-EGプラスミドベクターを含む、キット。

[本発明1058]

SEQ ID NO:6のpEP-hOGプラスミドベクターを含む、キット。

[本発明1059]

SEQ ID NO:7のpBacMam Ver1ウイルスベクターを含む、キット。

[本発明1060]

SEQ ID NO:9のpBacMam Ver2ウイルスベクターを含む、キット。

[本発明1061]

SEQ ID NO:10のpBacMam Ver2プロモーターレスウイルスベクターを含む、キット。

[本発明1062]

SEQ ID NO:11のpBacMam Ver2プロモーターレスウイルスベクターを含む、キット。

[本 発 明1063]

SEQ ID NO:12のpBacMam Ver2ウイルスベクターを含む、キット。

[本 発 明1064]

SEQ ID NO:49のpBacMam Ver1ウイルスベクターを含む、キット。

[本 発 明1065]

本発明1001、1025、または1051の核酸分子の1つまたは組み合わせを形質導入された細胞であって、それぞれの核酸分子が、該細胞をリプログラミングするための少なくとも1つの発現カセットを有する、細胞。

[本 発 明1066]

幹細胞である、本発明1065の細胞。

[本 発 明1067]

成体体細胞である、本発明1065の細胞。

[本 発 明1068]

細胞分化をリプログラミングするための本発明1001、1025、または1051のベクターの使用。

[本 発 明1069]

細胞が幹細胞または初代細胞である、本発明1068のベクターの使用。

[本 発 明1070]

幹細胞が胚性幹細胞、新生児幹細胞、胎児幹細胞、若年幹細胞、または成体幹細胞である、本発明1069のベクターの使用。

[本 発 明1071]

初代細胞が胎児初代細胞、若年初代細胞、または成体初代細胞である、本発明1069のベクターの使用。

[本 発 明1072]

GFPを構成的に発現するDNAセグメントを発現カセットが含む、本発明1001のベクターを含むpEPEG-BG01V細胞株。

[本 発 明1073]

Oct4プロモーターがGFPの発現を駆動する、本発明1001のベクターを含むpEPOG-BG01V細胞株。

[本 発 明1074]

(i) 本発明1001、1025、または1051の核酸分子を単独でまたは組み合わせてのいずれかで細胞に導入する工程；

(ii) コードされる1つまたは複数のポリペプチドを適切な培養条件下で該細胞内で発現させる工程；

(iii) 該細胞がリプログラミングされたかどうかを同定する工程を含む、細胞をリプログラミングするための方法。

[本 発 明1075]

細胞が幹細胞である、本発明1074の細胞をリプログラミングするための方法。

[本 発 明1076]

細胞が成体体細胞である、本発明1074の細胞をリプログラミングするための方法。

[本 発 明1077]

細胞が罹患細胞である、本発明1074の細胞をリプログラミングするための方法。

[本 発 明1078]

疾患が癌である、本発明1074の細胞をリプログラミングするための方法。

[本 発 明1079]

リプログラミングが、特定の細胞型への分化の誘導である、本発明1074の細胞をリプログラミングするための方法。

[本 発 明1080]

リプログラミングが、より幹様の脱分化状態に向かう、本発明1074の細胞をリプログラミングするための方法。

[本 発 明1081]

- (i) 本 発 明1055 ~ 1064のいずれかの組成物を幹細胞に導入する工程 ;
- (ii) コードされる1つまたは複数のポリペプチドを適切な培養条件下で該幹細胞内で発現させる工程 ;
- (iii) 該幹細胞がリプログラミングされたかどうかを同定する工程 ;
- (iv) リプログラミングされた該幹細胞を培養下で増殖させかつ維持する工程を含む、リプログラミングされた幹細胞群を産生する方法。

[本 発 明1082]

SEQ ID NO:2のpBacMam Ver1ウイルスベクターおよびリプログラミング遺伝子を含む、ウイルス粒子。

[本 発 明1083]

SEQ ID NO:8のpBacMam Ver2ウイルスベクターおよびリプログラミング遺伝子を含む、ウイルス粒子。

[本 発 明1084]

- (i) 1つまたは複数のdsRNA小分子を細胞に導入するまたは発現させる工程 ;
 - (ii) 該細胞がリプログラミングされたかどうかを同定する工程
- を含む、細胞をリプログラミングするための方法であって、
該小dsRNA分子が、リプログラミング遺伝子のプロモーター領域と相互作用する、方法
。

[本 発 明1085]

SEQ ID NO:13 ~ 48の二本鎖RNA配列のいずれか1つまたは組み合わせを含む、組成物。

[本 発 明1086]

SEQ ID NO:3のpBacMam Ver1プロモーターレスウイルスベクターを含む、ウイルス粒子
。

[本 発 明1087]

SEQ ID NO:7のpBacMam Ver1ウイルスベクターを含む、ウイルス粒子。

[本 発 明1088]

SEQ ID NO:9のpBacMam Ver2ウイルスベクターを含む、ウイルス粒子。

[本 発 明1089]

SEQ ID NO:10のpBacMam Ver2プロモーターレスウイルスベクターを含む、ウイルス粒子
。

[本 発 明1090]

SEQ ID NO:11のpBacMam Ver2プロモーターレスウイルスベクターを含む、ウイルス粒子
。

[本 発 明1091]

SEQ ID NO:12のpBacMam Ver2ウイルスベクターを含む、ウイルス粒子。

[本 発 明1092]

SEQ ID NO:49のpBacMam Ver1ウイルスベクターを含む、ウイルス粒子。

[本 発 明1093]

- (i) 本 発 明1001、1025、または1051の核酸分子を、単独でまたは組み合わせて、細胞に導入する工程 ;
 - (ii) コードされる1つまたは複数のポリペプチドを適切な培養条件下で該細胞内で発現させる工程 ;
 - (iii) 該細胞がリプログラミングされたかどうかを同定する工程
- を含む、誘導多能性細胞 (iPSC) を産生するための方法。

[本 発 明1094]

本 発 明1093の方法によって産生される、誘導多能性細胞 (iPSC) 。

[本 発 明1095]

(a) OriP 部位 ; (b) 構成的プロモーター下にEBNA1遺伝子をコードするDNAセグメント ; (c) 1つまたは複数のatt組換え部位 ; および (d) 少なくとも1つの選択可能なマーカ

ーをコードするDNAセグメントを含む、単離された核酸分子。

[本発明1096]

(a) OriP部位；(b) 誘導性プロモーター下にEBNA1遺伝子をコードするDNAセグメント；(c) 1つまたは複数のatt組換え部位；および(d) 少なくとも1つの選択可能なマーカーをコードするDNAセグメントを含む、単離された核酸分子。

[本発明1097]

(a) パキキュロウイルスゲノムの全てまたは一部；(b) OriP部位；(c) 1つまたは複数のatt組換え部位；(d) 構成的プロモーター下にEBNA1遺伝子をコードするDNAセグメント；ならびに(e) 少なくとも1つの選択可能なマーカー；(f) 任意で、WPREエレメントおよび/またはVSV-Gエレメントを含む、単離された核酸分子。

[本発明1098]

(a) パキキュロウイルスゲノムの全てまたは一部；(b) OriP部位；(c) 1つまたは複数のatt組換え部位；(d) 誘導性プロモーター下にEBNA1遺伝子をコードするDNAセグメント；ならびに(e) 少なくとも1つの選択可能なマーカー；(f) 任意で、WPREエレメントおよび/またはVSV-Gエレメントを含む、単離された核酸分子。