



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2014127505, 05.12.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.12.2012

Дата регистрации:
30.06.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
05.12.2011 US 61/566,948;
12.12.2011 US 61/569,595;
24.04.2012 US 61/637,570;
07.05.2012 US 13/465,490;
26.06.2012 US 61/664,494

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2016 Бюл. № 4

(45) Опубликовано: 30.06.2017 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 07.07.2014

(86) Заявка РСТ:
US 2012/067966 (05.12.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/086008 (13.06.2013)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЭНДЖЕЛ Маттью (US),
РОДЕ Кристофер (US)

(73) Патентообладатель(и):

ФЭКТОР БАЙОСАЙЕНС ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20110143397 A1, 16.06.2011. ЕА
14166 В1, 29.10.2010. RU 2009148666 А,
10.07.2011.

(54) **СПОСОБЫ И ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ КЛЕТОК**

(57) **Формула изобретения**

1. Способ перепрограммирования клетки в менее дифференцированное состояние, включающий:

(а) культивирование дифференцированной клетки в среде для перепрограммирования, содержащей альбумин, где альбумин обработан ионообменной смолой или древесным углем,

(б) трансфицирование клетки одной или более синтетических молекул РНК, где указанные одна или более синтетических молекул РНК включают по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую один или более факторов перепрограммирования, и где указанное трансфицирование приводит к получению клетки, экспрессирующей

один или более факторов перепрограммирования; и

(с) повторение стадии (b) по меньшей мере дважды в течение 5 последовательных дней с получением клетки, перепрограммированной в менее дифференцированное состояние.

2. Способ по п. 1, где альбумин был обработан октаноатом натрия.

3. Способ по п. 2, где альбумин нагрет до температуры, составляющей по меньшей мере 40°C.

4. Способ по п. 1, где указанные одна или более синтетических молекул РНК включают по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую по меньшей мере один член группы: белок Oct4, белок Sox2, белок Klf4 и белок c-Myc.

5. Способ по п. 1, где указанные одна или более синтетических молекул РНК включают по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок Oct4, по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок Sox2, по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок Klf4, и по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок c-Myc.

6. Способ по п. 1, дополнительно включающий приведение указанной клетки в контакт с по меньшей мере с одним членом группы: поли-L-лизин, поли-L-орнитин, RGD-пептид, фибронектин, витронектин, коллаген и ламинин.

7. Способ по п. 1, где указанные одна или более синтетических молекул РНК включают по меньшей мере один член группы: остаток псевдоуридина и остаток 5-метилцитидина.

8. Способ по п. 1, где клетка представляет собой клетку кожи.

9. Способ по п. 1, где альбумин дополнительно обрабатывают октаноатом натрия и нагревают до температуры, составляющей по меньшей мере 40°C.

10. Способ по п. 9, где указанные одна или более синтетических молекул РНК включают по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую по меньшей мере один член группы: белок Oct4, белок Sox2, белок Klf4 и белок c-Myc.

11. Способ по п. 9, где указанные одна или более синтетических молекул РНК включают по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок Oct4, по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок Sox2, по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок Klf4, и по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок c-Myc.

12. Способ по п. 9, дополнительно включающий приведение указанной клетки в контакт по меньшей мере с одним членом группы: поли-L-лизин, поли-L-орнитин, RGD-пептид, фибронектин, витронектин, коллаген и ламинин.

13. Способ по п. 9, где указанные одна или более синтетических молекул РНК включают по меньшей мере один член группы: остаток псевдоуридина и остаток 5-метилцитидина.

14. Способ по п. 9, где клетка представляет собой клетку кожи.

15. Среда для культивирования клеток для перепрограммирования клетки в менее дифференцированное состояние, содержащая: среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко: питательную среду F-12 (DMEM/F12), 10 мкг/мЛ инсулина, 5,5 мкг/мЛ трансферрина, 6,7 нг/мЛ селенита натрия, 20 нг/мЛ основного фактора роста фибробластов (bFGF) и 5 мг/мЛ альбумина, где альбумин обработан ионообменной смолой и/или древесным углем.

16. Среда для культивирования клеток по п. 15, дополнительно включающая по меньшей мере одно из следующих: 15 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (ГЭПЭС), 2 мМ L-аланил-L-глутамин, 2 мкг/мЛ этаноламин, 4,5 мкг/мЛ холестерина, 25 мкг/мЛ полиоксиэтиленсорбитан моноолеат, 2 мкг/мЛ D-альфа-токоферол ацетат и 1 мкг/мЛ L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат

сесквимагний соль гидрата.

17. Среда для культивирования клеток по п. 15, где альбумин обработан октаноатом натрия.

18. Среда для культивирования клеток по п. 15, где альбумин нагрет до температуры, составляющей по меньшей мере 40°C.

19. Среда для культивирования клеток по п. 15, где альбумин является рекомбинантным.

20. Среда для культивирования клеток для перепрограммирования клетки в менее дифференцированное состояние, содержащая среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко: питательную среду F-12 (DMEM/F12), 10 мкг/мЛ инсулина, 5,5 мкг/мЛ трансферрина, 6,7 нг/мЛ селенита натрия, 20 нг/мЛ основного фактора роста фибробластов (bFGF) и 5 мкг/мЛ альбумина, где менее чем 0,65% сухого веса альбумина включает липиды и/или менее чем 0,35% сухого веса альбумина включает свободные жирные кислоты.

21. Среда для культивирования клеток по п. 20, дополнительно включающая по меньшей мере одно из следующих: 15 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (ГЭПЭС), 2 мМ L-аланил-L-глутамин, 2 мкг/мЛ этаноламин, 4,5 мкг/мЛ холестерин, 25 мкг/мЛ полиоксиэтиленсорбитан моноолеат, 2 мкг/мЛ D-альфа-токоферол ацетат и 1 мкг/мЛ L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат сесквимагний соль гидрата.

22. Среда для культивирования клеток по п. 20, где альбумин является рекомбинантным.

23. Набор, включающий среду для культивирования клеток по п. 15 и одну или более синтетических молекул РНК.

24. Набор по п. 23, где альбумин является рекомбинантным.

25. Набор по п. 23, где указанные одна или более синтетических молекул РНК содержат по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую один или более факторов перепрограммирования.

26. Набор по п. 25, где указанные одна или более синтетических молекул РНК включают по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую по меньшей мере один из: белка Oct4, белка Sox2, белка Klf4 и белка с-Мус.

27. Набор по п. 25, где указанные одна или более синтетических молекул РНК включают по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок Oct4, по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок Sox2, по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок Klf4, и по меньшей мере одну молекулу РНК, кодирующую белок с-Мус.

28. Набор по п. 25, где указанные одна или более синтетических молекул РНК включают по меньшей мере один из остатка псевдоуридина и остатка 5-метилцитидина.