

【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28年6月23日 (2016.6.23)

【公表番号】特表2015-517311(P2015-517311A)

【公表日】平成27年6月22日 (2015.6.22)

【年通号数】公開・登録公報2015-040

【出願番号】特願2015-511803(P2015-511803)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 35/12 (2015.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 5/00 1 0 2

A 6 1 K 35/12

A 6 1 P 43/00 1 0 5

【手続補正書】

【提出日】平成28年5月2日 (2016.5.2)

【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】

体細胞を脱分化または再プログラム化するための方法であって、

O c t 4、S o x 2、K l f 4、c M y c、N a n o g および L i n 2 8 から選択される再プログラム化因子の合成 m R N A のうちいずれか 1 種または複数とトランス活性化ドメインとの融合産物を有効量含む組成物を、単離された前記体細胞にトランスフェクトし、これにより前記体細胞を再プログラム化または脱分化するステップを含む、方法。

【請求項 2】

前記組成物が、N 末端 M y o D トランス活性化ドメインと融合した O c t 4 を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

O c t 4 が、タンデムに 3 連で N 末端 M y o D トランス活性化ドメインと融合している、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

O c t 4、S o x 2、K l f 4、c M y c、N a n o g および L i n 2 8 から選択される再プログラム化因子の合成 m R N A のうちいずれか 1 種または複数を使用することにより哺乳動物細胞を再プログラム化するための方法であって、

a) フィーダーフリー表面において標準 6 ウェルプレートのウェルあたり細胞 25k ~ 250k の密度で、または他の表面領域のウェルにおいてウェル当たり比例して減らした数の細胞で、標的細胞を成長させるステップと、

b) 再プログラム化の間に各回 50ng ~ 800ng / ml で変動する用量の m R N A を細胞にトランスフェクトするステップとを含む、方法。

【請求項 5】

標的細胞を、フィーダーフリー表面において標準 6 ウェルプレートのウェルあたり細胞 50 k、75 k、100 k または 150 k の密度で成長させ、

a) 再プログラム化の間に各回 50 ng ~ 800 ng / ml で変動する用量の mRNA を細胞にトランスフェクトするステップであって、より初期の時点においてより後期の時点よりも低い用量を使用する、ステップと、

b) 継代せずに iPSC を獲得するステップと
を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

標的細胞を、フィーダーフリー表面において標準 6 ウェルプレートのウェルあたり細胞 50 k、75 k、100 k または 150 k の密度で成長させるが、各ウェルの容量を、0.5 ml ~ 5 ml の適切な培地となるよう調整し、

a) 再プログラム化の間に各回 50 ng ~ 800 ng / ml で変動する用量の mRNA を細胞にトランスフェクトするステップであって、より初期の時点においてより後期の時点よりも低い用量を使用する、ステップと、

b) 継代せずに iPSC を獲得するステップと
を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

異種フリーである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 種または複数の因子が、mRNA、制御性 RNA、siRNA、miRNA およびこれらの組合せからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記体細胞に、少なくとも 2 種の異なる RNA をトランスフェクトする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記体細胞が、単能性細胞、複能性細胞、多能性細胞および分化細胞からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 種または複数の RNA が、前記体細胞から単能性細胞、複能性細胞または多能性細胞への脱分化を誘導する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記因子のうち少なくとも 1 種が、OCT4、SOX2、NANOG、LIN28、KLF4 および MYC mRNA からなる群より選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 14】

OCT4、SOX2、NANOG および LIN28 mRNA を組み合わせて投与する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 15】

OCT4、SOX2、KLF4 および MYC mRNA を組み合わせて投与する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 16】

前記トランスフェクトされた細胞が、培養において人工多能性幹 (iPS) 細胞として維持される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記トランスフェクトされた細胞が、人工多能性幹細胞を形成し、分化細胞を形成するように前記 iPS 細胞を誘導するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

患者における疾患または障害の 1 種または複数の症状を処置または阻害するための組成

物であって、in vitroの脱分化細胞を含み、前記脱分化細胞が、請求項1に記載の方法に従って調製されることと、前記脱分化細胞が前記患者に投与されることとを特徴とする、組成物。

【請求項19】

前記組成物が、RargおよびLrH-1トランス活性化ドメインをさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項20】

前記組成物が、VP16トランス活性化ドメインと融合したOct4を含む、請求項1に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

本明細書に記載および特許請求されている発明は、本概要に表記または記載または参照されている特質および実施形態等を含むがこれらに限定されない、多くの特質および実施形態を有する。これは包括的であるようには企図されておらず、本明細書に記載および特許請求されている発明は、本概要に同定されている特色または実施形態に（よって）限定されず、これら特色または実施形態は、制限目的ではなく単なる説明目的で含まれている。後述する詳細な説明において、追加的な実施形態を開示することができる。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目1）

体細胞を脱分化または再プログラム化するための方法であって、

Oct4、Sox2、Klf4、cMyo、NanogおよびLin28から選択される再プログラム化因子の合成mRNAのうちいずれか1種または複数とトランス活性化ドメインとの融合産物を有効量含む組成物を、単離された前記体細胞にトランスフェクトし、これにより前記体細胞を再プログラム化または脱分化するステップを含む、方法。

（項目2）

前記組成物が、N末端MyoDトランス活性化ドメインと融合したOct4を含む、項目1に記載の方法。

（項目3）

Oct4が、タンデムに3連でN末端MyoDトランス活性化ドメインと融合している、項目2に記載の方法。

（項目4）

項目1に記載の再プログラム化因子の合成mRNAのうちいずれか1種または複数を使用することにより哺乳動物細胞を再プログラム化するための方法であって、

a) フィーダーフリー表面において標準6ウェルプレートのウェルあたり細胞25k～250kの密度で、または他の表面領域のウェルにおいてウェル当たり比例して減らした数の細胞で、標的細胞を成長させるステップと、

b) 再プログラム化の間に各回50ng～800ng/mlで変動する用量のmRNAを細胞にトランスフェクトするステップとを含む、方法。

（項目5）

標的細胞を、フィーダーフリー表面において標準6ウェルプレートのウェルあたり細胞50k、75k、100kまたは150kの密度で成長させ、

a) 再プログラム化の間に各回50ng～800ng/mlで変動する用量のmRNAを細胞にトランスフェクトするステップであって、より初期の時点においてより後期の時点よりも低い用量を使用する、ステップと、

b) 継代せずに i P S C を獲得するステップとを含む、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

標的細胞を、フィーダーフリー表面において標準 6 ウェルプレートのウェルあたり細胞 5 0 k、7 5 k、1 0 0 k または 1 5 0 k の密度で成長させるが、各ウェルの容量を、0 . 5 m l ~ 5 m l の適切な培地となるよう調整し、

a) 再プログラム化の間に各回 5 0 n g ~ 8 0 0 n g / m l で変動する用量の m R N A を細胞にトランスフェクトするステップであって、より初期の時点においてより後期の時点よりも低い用量を使用する、ステップと、

b) 継代せずに i P S C を獲得するステップとを含む、項目 4 に記載の方法。

(項目 7)

前記哺乳動物細胞が、ヒト細胞である、項目 4 に記載の方法。

(項目 8)

異種フリーである、項目 4 に記載の方法。

(項目 9)

前記 1 種または複数の因子が、m R N A、制御性 R N A、s i R N A、m i R N A およびこれらの組合せからなる群より選択される、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 0)

前記体細胞に、少なくとも 2 種の異なる R N A をトランスフェクトする、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 1)

前記体細胞が、単能性細胞、複能性細胞、多能性細胞および分化細胞からなる群より選択される、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記 1 種または複数の R N A が、前記体細胞から単能性細胞、複能性細胞または多能性細胞への脱分化を誘導する、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記因子のうち少なくとも 1 種が、O C T 4、S O X 2、N A N O G、L I N 2 8、K L F 4 および M Y C m R N A からなる群より選択される、項目 4 に記載の方法。

(項目 1 4)

O C T 4、S O X 2、N A N O G および L I N 2 8 m R N A を組み合わせて投与する、項目 4 に記載の方法。

(項目 1 5)

O C T 4、S O X 2、K L F 4 および M Y C m R N A を組み合わせて投与する、項目 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記トランスフェクトされた細胞が、培養において人工多能性幹 (i P S) 細胞として維持される、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記トランスフェクトされた細胞が、人工多能性幹細胞を形成し、分化細胞を形成するように前記 i P S 細胞を誘導するステップをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 8)

患者における疾患または障害の 1 種または複数の症状を処置または阻害するための方法であって、項目 1 に記載の方法に従って細胞を i n v i t r o で脱分化させるステップと、前記細胞を前記患者に投与するステップとを含む、方法。

(項目 1 9)

前記組成物が、R a r g および L r H - 1 トランス活性化ドメインをさらに含む、項目 2 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記組成物が、V P 1 6 トランス活性化ドメインと融合した O c t 4 を含む、項目 1 に記載の方法。