

【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3部門第2区分

【発行日】平成26年12月11日(2014.12.11)

【公表番号】特表2014-511118(P2014-511118A)

【公表日】平成26年5月8日(2014.5.8)

【年通号数】公開・登録公報2014-023

【出願番号】特願2013-535151(P2013-535151)

【国際特許分類】

A 6 1 K 35/12 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 P 7/04 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 35/12

C 1 2 N 5/00 1 0 2

A 6 1 P 7/04

【手続補正書】

【提出日】平成26年10月21日(2014.10.21)

【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】

対象における血小板減少を治療する方法であって、前記方法は、

a) ヒト多能性幹細胞におけるGATA-1の発現を減少させる工程であって、それにより、GATA-1ノックアウトまたはノックダウン幹細胞を生成するものである、前記減少させる工程と、

b) 前記GATA-1ノックアウトまたはノックダウン幹細胞をトロンボポエチンの存在下で培養する工程であって、それにより、自己複製する巨核球・赤血球前駆細胞(MEP)様細胞株(G1ME)を生成するものである、前記培養する工程と、

c) 前記G1ME細胞においてGATA-1を発現させる工程であって、それにより、最終的な赤血球および巨核球に前記細胞を分化させるものである、前記発現させる工程と、

d) 工程c)の前記細胞から巨核球を単離する工程と、

e) 前記単離した巨核球を前記対象に投与する工程であって、それにより、前記血小板減少を治療するものである、前記投与する工程と  
を有する、方法。

【請求項2】

請求項1記載の方法において、前記ヒト多能性幹細胞はヒト胚性幹細胞または人工多能性幹(iPS)細胞である、方法。

【請求項3】

請求項1記載の方法において、この方法は、さらに、

工程e)の前に、目的タンパク質をコードする核酸分子の前記細胞への送達を有するものである、方法。

【請求項4】

請求項3記載の方法において、この方法は、さらに、

目的タンパク質をコードする核酸分子の前記G1ME細胞への送達を有するものである

、方法。

【請求項 5】

請求項 1 記載の方法において、工程 a ) は、前記ヒト多能性幹細胞における遺伝子ターゲティングによって GATA - 1 ノックアウトを生成する工程を有するものである、方法。

【請求項 6】

請求項 1 記載の方法において、工程 a ) は、 GATA - 1 siRNA または shRNA を前記ヒト多能性幹細胞に送達する工程を有するものである、方法。

【請求項 7】

請求項 1 記載の方法において、工程 c ) は、 GATA - 1 をコードする核酸分子を有するウイルスベクターに前記 G1ME 細胞を接触させる工程を有するものである、方法。

【請求項 8】

請求項 1 記載の方法において、工程 c ) は GATA - 1 発現の抑制の除去を有するものである、方法。

【請求項 9】

請求項 1 記載の方法において、工程 c ) は、 GATA - 1 を天然レベルに発現する工程を有するものである、方法。

【請求項 10】

請求項 1 記載の方法において、工程 b ) はさらに、間質細胞を有する GATA - 1 ノックアウトまたはノックダウン幹細胞を培養する工程を有するものである、方法。

【請求項 11】

請求項 1 記載の方法において、工程 d ) は、少なくとも約 50 μm の直径を有する細胞を単離する工程を有するものである、方法。

【請求項 12】

自己複製する巨核球 - 赤血球前駆細胞 (MEP) 様細胞株を生成する方法であって、前記方法は、

a ) ヒト多能性幹細胞における GATA - 1 の発現を減少させる工程であって、それにより、 GATA - 1 ノックアウトまたはノックダウン幹細胞を生成するものである、前記減少させる工程と、

b ) 前記 GATA - 1 ノックアウトまたはノックダウン幹細胞をトロンボポエチンの存在下で培養する工程であって、それにより、自己複製する巨核球 - 赤血球前駆細胞 (MEP) 様細胞株 (G1ME) を生成するものである、前記培養する工程と、

を有する、方法。

【請求項 13】

請求項 12 記載の方法において、この方法は、さらに、  
目的タンパク質をコードする核酸分子を前記細胞に送達する工程を有するものである、方法。

【請求項 14】

請求項 12 記載の方法によって生成された、単離された自己複製する巨核球 - 赤血球前駆細胞 (MEP) 様細胞株。

【請求項 15】

血小板減少症の治療に使用するための単離巨核球であって、前記単離巨核球は、

a ) ヒト多能性幹細胞における GATA - 1 の発現を減少させる工程であって、それにより GATA - 1 ノックアウトまたはノックダウン幹細胞を生成する、前記減少させる工程と、

b ) 前記 GATA - 1 ノックアウトまたはノックダウン幹細胞をトロンボポエチンの存在下で培養する工程であって、それにより自己複製する巨核球 - 赤血球前駆細胞 (MEP) 様細胞株 (G1ME) を生成する、前記培養する工程と、

c ) 前記 G1ME 細胞において GATA - 1 を発現させる工程であって、それにより前記細胞を最終的な赤血球および巨核球に分化させる、前記発現させる工程と、

d ) 工程 c ) の前記細胞から巨核球を単離する工程と、  
を有する方法によって取得される、単離巨核球。

**【請求項 1 6】**

請求項 1 5 記載の血小板減少症の治療に使用するための単離巨核球であって、さらに、  
治療用タンパク質をコードする核酸分子を有する、単離巨核球。

**【手続補正 2】**

**【補正対象書類名】**明細書

**【補正対象項目名】**0 0 0 7

**【補正方法】**変更

**【補正の内容】**

**【0 0 0 7】**

血小板産生、巨核球から循環血小板が生じることによる工程は、依然として不完全に理解されている。試験管内での研究は、血小板が血小板前駆体ストランドの先端でノードを形成することを示唆している (Italiano et al. (1999) J. Cell. Biol., 147: 1299 - 1312)。しかしながら、多光子生体内顕微鏡を使用する、生頭蓋冠髄の直接的な視覚化は、巨核球が大きな細胞質断片を血管系内に放出し (Junt et al. (2007) Science 317: 1767 - 1770)、その後に、血小板内で再組織化を受けなければならないことを示唆している。肺静脈系の巨核球様倍数体の核の形態分析および定量化に基づく研究は、巨核球が肺に血小板を放出することを示唆する (Zucker-Franklin et al. (2000) Am. J. Pathol., 157: 69 - 74)。培養における巨核球からの血小板の派生は、報告されたが (Choi et al. (1995) Blood 85: 402 - 413)、量的に平均水準以上になることは困難であった。血小板を生体外で発達させるための現在の努力は、非常に制限されているように見受けられ、臨床的に関連した結果ではない。現在まで、試験管内で生成された血小板の注入からの公開された最も良い結果は、低い血小板数 (~ 104 /  $\mu$ l) を有する放射線処理されたマウスを使用したものである (Nishikii et al. (2008) J. Exp. Med., 205: 1917 - 1927)。ドナー血小板が計数するピークパーセントは、依然としてわずか 1% ~ 2% であった。

この出願の発明に関連する先行技術文献情報としては、以下のものがある（国際出願日以降国際段階で引用された文献及び他国に国内移行した際に引用された文献を含む）。

(先行技術文献)

(特許文献)

(特許文献 1) 米国特許出願公開第 2006 / 0134783 号明細書

(特許文献 2) 米国特許出願公開第 2008 / 0275049 号明細書

(非特許文献)

(非特許文献 1) Stachura et al. Early block to erythromegakaryotic development conferred by loss of transcriptional factor GATA-1. Blood 2006, 107: 87 - 97; abstract, pg 89, col 2, para 1 - 2, pg 90, col 1, para 2, pg 90, col 2, para 2, pg 91, col 1, para 1, pg 91, col 2, para 1, Fig. 1C

(非特許文献 2) Shividassani et al. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. The EMBO Journal 1997, 16: 3965 - 3973; abstract