

【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26年1月9日(2014.1.9)

【公開番号】特開2013-176400(P2013-176400A)

【公開日】平成25年9月9日(2013.9.9)

【年通号数】公開・登録公報2013-049

【出願番号】特願2013-127052(P2013-127052)

【国際特許分類】

|         |        |           |
|---------|--------|-----------|
| C 1 2 N | 5/10   | (2006.01) |
| A 0 1 K | 67/027 | (2006.01) |
| C 1 2 N | 5/02   | (2006.01) |
| C 1 2 N | 5/0735 | (2010.01) |
| C 1 2 N | 5/074  | (2010.01) |
| C 1 2 N | 15/09  | (2006.01) |

【F I】

|         |        |         |
|---------|--------|---------|
| C 1 2 N | 5/00   | 1 0 2   |
| A 0 1 K | 67/027 | Z N A   |
| C 1 2 N | 5/02   |         |
| C 1 2 N | 5/00   | 2 0 2 C |
| C 1 2 N | 5/00   | 2 0 2 D |
| C 1 2 N | 15/00  | A       |

【手続補正書】

【提出日】平成25年11月18日(2013.11.18)

【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】

多能性ラット細胞とMEKインヒビターおよびGSK3インヒビターを含む培養培地とを含む、多能性ラット細胞の培養物であって、該多能性ラット細胞が、ラットキメラの生殖系列に寄与し得る、培養物。

【請求項2】

胚盤胞から多能性ラット細胞を誘導する方法であって、

(1) 胚盤胞を得る工程；

(2) MEKインヒビターおよびGSK3インヒビターの存在下で該胚盤胞を培養して、内部細胞塊を得る工程；

(3) 該内部細胞塊の一次派生物を単離および解離する工程；

(4) 該内部細胞塊の解離した一次派生物から1または複数の細胞を単離する工程；および

(5) 該単離した1または複数の細胞を、MEKインヒビター、GSK3インヒビターおよびFGFレセプターのアンタゴニストの存在下で培養する工程、を含む、方法。

【請求項3】

前記多能性細胞が、Nanog、Oct4、FGF4、Sox-2およびアルカリリフォスファターゼのうち1つ以上を発現する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

遺伝子操作ラットを得る方法であって、Nanog、Oct4、FGF4およびSox-2のうち2つ以上を発現するラット多能性細胞を遺伝子改変する工程であって、該多能性ラット細胞が、ラットキメラの生殖系列に寄与し得る工程および該多能性細胞をラット胚に導入して遺伝子改変ラットを産生する工程を含み、該ラット多能性細胞が該遺伝子改変ラットの生殖系列に寄与する、方法。

【請求項5】

前記ラット多能性細胞が、Nanog、Oct4およびSox-2を発現する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記ラット多能性細胞が、さらにアルカリリフォスファターゼを発現する、請求項4または5に記載の方法。

【請求項7】

前記ラット多能性細胞が、Rex1、Stella、FGF4およびSox-2を発現する、請求項4から6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

前記多能性細胞が、FGF5を発現しない、請求項4から7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

前記多能性ラット細胞の子孫が、培養物中で維持された後に、原多能性ラット細胞の特性を保持する、請求項4から8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

前記多能性細胞が、3つの胚葉のすべてから分化した細胞が存在する奇形腫または奇形癌を形成し得る、請求項4から9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

前記細胞が、培養物中で単一細胞として増殖および/または繁殖し得る、請求項4から6のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

前記遺伝子操作哺乳動物が、目的の遺伝子についてのホモ接合性ヌルである、請求項4から11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

前記遺伝子改変する工程が、ラットまたは非ヒト哺乳動物中の遺伝子の対応するヒト遺伝子への置換を含む、請求項4から11のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

前記遺伝子改変する工程が、1以上の目的の遺伝子のノックアウトを含む、請求項4から12のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

前記遺伝子改変する工程が、目的の遺伝子の標的挿入を含む、請求項4から14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

請求項4から15のいずれかに記載の方法によって得られる、遺伝子操作ラット。

【請求項17】

Nanog、Oct4、FGF4およびSox-2のうち2つ以上を発現する多能性ラット細胞であって、該多能性ラット細胞が、ラットキメラの生殖系列に寄与し得る、多能性ラット細胞。

【請求項18】

Nanog、Oct4およびSox-2を発現する、請求項17に記載の多能性ラット細胞。

【請求項19】

さらにアルカリリフォスファターゼを発現する、請求項17または18に記載の多能性ラット細胞。

【請求項20】

Rex1、Stella、FGF4およびSox-2を発現する、請求項17から19のいずれかに記載の多能性ラット細胞。

**【請求項21】**

前記多能性細胞がFGF5を発現しない、請求項17から20のいずれかに記載の多能性ラット細胞。

**【請求項22】**

前記多能性ラット細胞の子孫が、培養物中で維持された後に、原多能性ラット細胞の特性を保持する、請求項17から21のいずれかに記載の多能性ラット細胞。

**【請求項23】**

前記多能性細胞が、3つの胚葉のすべてから分化した細胞が存在する奇形腫または奇形癌を形成し得る、請求項17から22のいずれかの請求項に記載の多能性ラット細胞。

**【請求項24】**

前記細胞が、培養物中で単一細胞として増殖および／または繁殖し得る、請求項17から23のいずれかに記載の多能性ラット細胞。

**【請求項25】**

請求項17から24のいずれかに記載の多能性ラット細胞の集団。

**【請求項26】**

細胞の少なくとも95%が、以下の多能性細胞の特性：

a)キメラを形成する能力；

b)培養物中で単一細胞として増殖および／または繁殖する能力；

c)Rex1、Stella、FGF4およびSox-2の発現；

d)それらが、アクチビンおよび／またはFGFの存在下で分化が誘導されるかまたは増殖しない；

e)それらが、アクチビンレセプター遮断によって分化が誘導されないかまたは死滅する；および

f)該多能性細胞の増殖および／または繁殖が、MEKインヒビター、GSK3インヒビターおよび必要に応じてFGFレセプターのアンタゴニストの存在によって支持される；

の2つ以上を保持する多能性ラット細胞の集団であって、

該多能性ラット細胞が、ラットキメラの生殖系列に寄与し得る、多能性ラット細胞の集団。

**【請求項27】**

細胞の少なくとも95%がNanogおよび／またはOct4を発現する、請求項26に記載の多能性ラット細胞の集団。

**【請求項28】**

多能性ラット細胞とMEKインヒビター、GSK3インヒビターおよびFGFレセプターのアンタゴニストを含む培養培地とを含む、多能性ラット細胞の培養物であって、該多能性ラット細胞が、ラットキメラの生殖系列に寄与し得る、培養物。