

【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 8 月 21 日 (2014.8.21)

【公表番号】特表 2013-534140 (P2013-534140A)

【公表日】平成 25 年 9 月 2 日 (2013.9.2)

【年通号数】公開・登録公報 2013-047

【出願番号】特願 2013-523311 (P2013-523311)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 (2006.01)

A 6 1 L 27/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 1 0 2

C 1 2 N 5/00 Z N A

A 6 1 L 27/00 V

【手続補正書】

【提出日】平成 26 年 7 月 7 日 (2014.7.7)

【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】

不死化した B 細胞から人工多能性幹細胞 (i P S 細胞) を作製する方法であって、

a) 1 つ以上の不死化させるエプスタイン・バーウイルス (E B V) 要素により不死化された不死化 B 細胞を取得することと、

b) 前記不死化 B 細胞を、該細胞内で外来性リプログラミング因子の発現を起こすこと
によってリプログラミングし、それにより i P S 細胞を作製することと、

を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記 i P S 細胞から前記 E B V 要素を除去することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 E B V 要素を本質的に含まない i P S 細胞を単離または濃縮することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

不死化前の前記 B 細胞が血液サンプルから取得されており、ここで特に、

前記血液サンプルが約 0 . 0 1 m L ~ 約 5 m L の容量を有し、とりわけ、

前記血液サンプルが約 0 . 1 m L ~ 約 0 . 5 m L の容量を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記不死化 B 細胞が、エプスタイン・バーウイルス (E B V) 要素を使用して B 細胞を不死化することにより取得される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記不死化させる E B V 要素が、誘導性の外来性リプログラミング発現カセットを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記不死化 B 細胞が、樹立リンパ芽球様細胞株から取得される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

リプログラミングは、以下：

i) 1 つ以上のリプログラミングエピソームベクター要素を前記不死化 B 細胞に導入すること、あるいは

i i) 前記不死化 B 細胞をフィーダー層の非存在下で培養すること
を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

リプログラミングは、以下：

i) 前記不死化 B 細胞と 1 つ以上のシグナル伝達阻害剤を接触させることであって、該シグナル伝達阻害剤には、グリコゲン合成酵素キナーゼ 3 (G S K - 3) 阻害剤、マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (M E K) 阻害剤、トランスフォーミング成長因子 (T G F -) 受容体阻害剤、白血病抑制因子 (L I F)、p 5 3 阻害剤、N F - B 阻害剤、またはこれらの組み合わせが含まれる、不死化 B 細胞と 1 つ以上のシグナル伝達阻害剤を接触させること、あるいは

i i) 前記不死化 B 細胞を線維芽細胞成長因子 (F G F) と接触させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

リプログラミングは、以下：

i) P a x - 5 に特異的な阻害性ヌクレオチドを前記不死化 B 細胞に導入することも

i i) 前記不死化 B 細胞内における外来性 C / E B P の発現
も含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 i P S 細胞を心臓細胞、造血細胞、神経細胞、または肝細胞にインビトロで分化させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

胚性幹細胞と比較して不完全な B 細胞免疫グロブリン可変領域遺伝子セットを含むゲノムを有するヒト i P S 細胞であって、外来性遺伝的要素を本質的に含まないヒト i P S 細胞。

【請求項 13】

前記ゲノムが、選択された遺伝マーカーを含み、特に、前記選択された遺伝マーカーが、選択された疾患の遺伝マーカーである、請求項 1 2 に記載のヒト i P S 細胞。

【請求項 14】

前記ゲノムが不死化 B 細胞に由来し、特に、前記ヒト i P S 細胞が、正常な核型を有する、請求項 1 2 に記載のヒト i P S 細胞。

【請求項 15】

請求項 1 2 に記載のヒト i P S 細胞に由来する、分化した細胞、組織、または器官。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0045】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになる。しかしながら、詳細な説明および特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、この詳細な説明から本発明の趣旨および範囲内の様々な変更および改良が当業者に明らかになるため、単なる例示として与えられることを理解されたい。

例えば、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目 1)

不死化した B 細胞から人工多能性幹細胞 (i P S 細胞) を作製する方法であって、

a) 1 つ以上の不死化させるエプスタイン・バーウイルス (E B V) 要素により不死化された不死化 B 細胞を取得することと、

b) 上記不死化 B 細胞を、該細胞内で外来性リプログラミング因子の発現を起こすこと
によってリプログラミングし、それにより i P S 細胞を作製することと、

を含む、上記方法。

(項目 2)

上記 i P S 細胞から上記 E B V 要素を除去することをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

上記 E B V 要素を本質的に含まない i P S 細胞を単離または濃縮することをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

不死化前の上記 B 細胞が血液サンプルから取得されている、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

上記血液サンプルが約 0 . 0 1 m L ~ 約 5 m L の容量を有する、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

上記血液サンプルが約 0 . 1 m L ~ 約 0 . 5 m L の容量を有する、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

上記不死化 B 細胞が、エプスタイン・バーウイルス (E B V) 要素を使用して B 細胞を不死化することにより取得される、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

上記不死化させる E B V 要素が、誘導性の外来性リプログラミング発現カセットを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

上記不死化 B 細胞が、樹立リンパ芽球様細胞株から取得される、項目 1 に記載の方法。

(項目 10)

リプログラミングは、1 つ以上のリプログラミングエピソームベクター要素を上記不死化 B 細胞に導入することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 11)

リプログラミングは、上記不死化 B 細胞をフィーダー層の非存在下で培養することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 12)

リプログラミングは、上記不死化 B 細胞と 1 つ以上のシグナル伝達阻害剤を接触させることをさらに含み、該シグナル伝達阻害剤には、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (G S K - 3) 阻害剤、マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (M E K) 阻害剤、トランスフォーミング成長因子 (T G F -) 受容体阻害剤、白血病抑制因子 (L I F) 、 p 5 3 阻害剤、N F - B 阻害剤、またはこれらの組み合わせが含まれる、項目 1 に記載の方法。

(項目 13)

リプログラミングは、上記不死化 B 細胞を線維芽細胞成長因子 (F G F) と接触させることをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 14)

リプログラミングは、P a x - 5 に特異的な阻害性ヌクレオチドを上記不死化 B 細胞に導入することを含まない、項目 1 に記載の方法。

(項目 15)

リプログラミングは、上記不死化 B 細胞内における外来性 C / E B P の発現を含まな

い、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 6)

上記 i P S 細胞を心臓細胞、造血細胞、神経細胞、または肝細胞にインビトロで分化させることをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 7)

胚性幹細胞と比較して不完全な B 細胞免疫グロブリン可変領域遺伝子セットを含むゲノムを有するヒト i P S 細胞であって、外来性遺伝的要素を本質的に含まないヒト i P S 細胞。

(項目 1 8)

上記ゲノムが、選択された遺伝マーカーを含む、項目 1 7 に記載のヒト i P S 細胞。

(項目 1 9)

上記選択された遺伝マーカーが、選択された疾患の遺伝マーカーである、項目 1 8 に記載のヒト i P S 細胞。

(項目 2 0)

上記ゲノムが不死化 B 細胞に由来する、項目 1 7 に記載のヒト i P S 細胞。

(項目 2 1)

正常な核型を有する、項目 2 0 に記載のヒト i P S 細胞。

(項目 2 2)

項目 1 7 に記載のヒト i P S 細胞に由来する、分化した細胞、組織、または器官。