

【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1月21日(2016.1.21)

【公表番号】特表2015-500637(P2015-500637A)

【公表日】平成27年1月8日(2015.1.8)

【年通号数】公開・登録公報2015-002

【出願番号】特願2014-543917(P2014-543917)

【国際特許分類】

C 1 2 N	5/0735	(2010.01)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/01	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	31/04	(2006.01)
A 6 1 P	31/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	5/00	2 0 2 C
C 1 2 Q	1/02	Z N A
C 1 2 N	5/00	1 0 2
C 1 2 N	15/00	X
C 1 2 N	15/00	A
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/00	

【手続補正書】

【提出日】平成27年11月25日(2015.11.25)

【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】

一倍体細胞の哺乳動物細胞系を生成させる方法であつて、  
 発生において塊になつてゐる胚段階にある複数の一倍体細胞を取得し、  
 その複数の一倍体細胞から細胞を単離し、  
 その複数の一倍体細胞から単離した細胞を増殖させ、  
 その増殖させた細胞から一倍体ゲノムを持つ1個以上の個別の細胞を選択して単離し、  
 それによつて、安定な一倍体細胞の細胞系の細胞を取得することを含み、  
 前記一倍体細胞を無支持細胞培養条件下で維持し又は成長させる、方法。

**【請求項 2】**

前記哺乳動物の一倍体単為生殖卵母細胞または胚性細胞を取得するステップと、その卵母細胞または胚性細胞を偽妊娠雌に移すステップと、その卵母細胞または胚性細胞を多細胞段階へと増殖させるステップと、必要に応じてその多細胞段階の細胞を培養して胚盤胞段階にすることにより、発生において塊になっている胚段階にある前記複数の一倍体細胞を提供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 3】**

細胞培養物の前記細胞を培養し、50継代までの後にその細胞培養物から一倍体細胞を単離し、その単離した一倍体細胞を新たに継続する細胞培養物として増殖させることをさらに含む、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 4】**

親細胞がヘテロ接合またはホモ接合である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 5】**

単為生殖の桑実胚または胚盤胞に由来する多能性一倍体胚性幹細胞系を生成させる方法であって、

(a) 被験雌からの未受精の卵母細胞をインビトロで活性化させて単為生殖を誘導し；

(b) ステップ(a)で活性化された卵母細胞を培養して桑実胚および／または胚盤胞を生成させ；

(c) ステップ(b)の桑実胚および／または胚盤胞から胚性幹細胞を単離し、必要に応じてその胚性幹細胞を、その胚性幹細胞の分化を抑制する細胞培地に移し；

(d) ステップ(c)の胚性幹細胞をFACS分析し、一倍体DNAを含む胚性幹細胞を同定し、および／または豊富にし；

(e) 必要に応じ、一倍体DNAを含む胚性幹細胞のFACS精製とその胚性幹細胞の増殖を繰り返し、それによって一倍体胚性幹細胞系を生成させることを含み、

前記細胞を無支持細胞培養条件下で維持し又は成長させる、方法。

**【請求項 6】**

ステップ(a)の前記未受精の卵母細胞が、インビトロで成熟した卵母細胞である、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

ステップ(a)の卵母細胞をエタノールまたは塩化ストロンチウム( $\text{SrCl}_2$ )に曝露することによって活性化させる、請求項5または6に記載の方法。

**【請求項 8】**

ステップ(d)および／または(e)を少なくとも5回繰り返す、請求項5～7のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 9】**

哺乳動物の前記被験雌または前記細胞が哺乳動物由来である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記細胞系の一倍体胚性幹細胞が、細胞周期のG1期に1n染色体セットを持ち、G2期に2n染色体セットを持つことを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記細胞系の生成した胚性幹細胞の少なくとも60%が一倍体である、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記細胞系の一倍体胚性幹細胞が、胚性幹細胞マーカーであるアルカリホスファターゼ、Oct4、Sox2、Nanog、Klf4、Rex1、Klf2、cMyc、Sall4、SSEA-1のうちの1つ以上の発現を特徴とする、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記細胞系の一倍体胚性幹細胞が、少なくとも50継代にわたって安定な増殖を示す、請

求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記細胞系の一倍体胚性幹細胞が、少なくとも7継代にわたって一倍性を維持する、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記細胞系の一倍体胚性幹細胞を分化させることをさらに含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記細胞系の一倍体胚性幹細胞の遺伝子を改変することをさらに含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 7】

内部細胞塊の培養によって、またはその内部細胞塊または栄養芽層または胚盤胞の成長に由来する細胞の培養によって細胞を維持することを含むか、前記複数の細胞の単離に、多細胞段階の細胞の個別化を含む、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 8】

個別の細胞を増殖させて細胞培養物にする(サブクローニング)、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記細胞を、支持層の上で維持した後に、無支持細胞培養条件で維持するか増殖させる、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 0】

無支持細胞培養条件下で維持し又は成長させることができる、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法によって生成した、桑実胚または胚盤胞に由来する胚性幹様細胞系。

【請求項 2 1】

無支持細胞培養条件下で維持し又は成長させることができる、少なくとも60%の一倍体胚性幹細胞を含む、桑実胚または胚盤胞に由来する胚性幹様細胞系。

【請求項 2 2】

桑実胚または胚盤胞に由来する請求項20または21の胚性幹様細胞系を含む試験系またはキット。

【請求項 2 3】

胚盤胞に由来する前記胚性幹様細胞が、胚盤胞の内部細胞塊( ICM )に由来する、請求項20または21に記載の胚性幹様細胞。

【請求項 2 4】

胚盤胞に由来する前記胚性幹様細胞が、栄養芽層に由来する、請求項20または22に記載の胚性幹様細胞。

【請求項 2 5】

無支持細胞培養条件下で維持し又は成長させることができる、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法によって得ることが可能な一倍体ゲノムを有する細胞からなる細胞培養物。

【請求項 2 6】

一倍体ゲノムを有する細胞を提供することを含む、突然変異の分析方法であって、突然変異をその細胞の興味の対象である遺伝子座に導入し、その細胞でその遺伝子座に関係する変化した活性を観察する操作を含む、方法。

【請求項 2 7】

前記細胞が、少なくとも10継代にわたって一倍体の形態で安定である、請求項26に記載の方法。

【請求項 2 8】

対象である1個以上の遺伝子が不活性化されている、請求項25に記載の細胞培養物の細胞。

【請求項 2 9】

遺伝子Droshaおよび／またはRargのノックアウトを含む一倍体哺乳動物細胞。

【請求項 3 0】

対象である表現型を含む細胞を生成させる方法であって、  
一倍体ゲノムを有する複数の細胞をランダムに突然変異させ、  
前記の対象の表現型を有する細胞を選択すること  
を含む、方法。

【請求項 3 1】

対象である前記表現型が、前記細胞を毒素または増殖阻害剤と接触させたときの細胞の生存または細胞の増殖である、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記毒素がリシンである、請求項31に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記複数の細胞が少なくとも1000個の細胞を含む、請求項30～32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 4】

請求項30～33のいずれか1項に記載の方法によって得ることができて、毒素に対する耐性を持つ一倍体細胞。

【請求項 3 5】

細胞で毒素耐性の活性を有する遺伝子標的をスクリーニングする方法であって、  
請求項31～33のいずれか1項に記載の毒素耐性を有する細胞を生成させ、  
前記ランダム突然変異のない細胞と比較した、毒素耐性を有するそれら細胞における突然変異を同定することをさらに含む、方法。

【請求項 3 6】

毒素に対する治療薬を同定する方法であって、請求項35に記載の遺伝子標的を同定し、  
その遺伝子標的、またはその遺伝子標的の遺伝子産物に治療候補分子を接触させ、その候補と前記遺伝子標的または遺伝子産物との結合イベント、または前記毒素に対する前記細胞の改変された耐性を同定することを含む、方法。

【請求項 3 7】

前記毒素がリシンであり、前記遺伝子標的の選択が、Gpr107、Fut9、Tcf711、Slc35c1、Fgfr2、Galnt2、Mid1、B4galnt1、B4galnt3、Plcd3、Ror2、Samd4b、Gcnt2、Ggt1の中からなされる、請求項36に記載の細胞。

【請求項 3 8】

対象におけるAB5毒素の中毒を治療する方法、または対象においてAB5毒素に対する耐性を誘導する方法であって、

表1または表2の遺伝子のうちの任意の1つを前記対象において抑制することを含む、方法。

【請求項 3 9】

AB5毒素に対する耐性が増大した改変細胞であって、表1または表2の遺伝子のうちの任意の1つの発現が、前記毒素に対する耐性の増大がない非改変細胞と比べて低下している改変細胞。

【請求項 4 0】

AB5毒素の中毒またはシュードモナス外毒素Aの中毒を治療する方法であって、フコシリ化阻害剤を投与する操作を含む、方法。