

【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29年6月1日 (2017.6.1)

【公表番号】特表2016-521971(P2016-521971A)

【公表日】平成28年7月28日 (2016.7.28)

【年通号数】公開・登録公報2016-045

【出願番号】特願2016-509588(P2016-509588)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/073 (2010.01)

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/873 (2010.01)

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

A 6 1 P 15/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/545 (2015.01)

【 F I 】

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 5/073

C 1 2 N 5/071

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 K

A 0 1 K 67/027

A 6 1 P 15/00 1 7 1

A 6 1 K 35/545

【手続補正書】

【提出日】平成29年4月13日 (2017.4.13)

【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】

単離ヒトナীব型多能性幹細胞 (PSC) であって、非メチル化 X 不活性化特異的転写産物 (XIST) 遺伝子を有し、

(i) 前記ナীব型 PSC が女性 PSC である場合、前記ナীব型女性 PSC は前記 XIST 遺伝子の非メチル化対立遺伝子を 2 つ有し、ここで女性細胞中に XIST 遺伝子の非メチル化対立遺伝子が 2 つ存在することは、前記 XIST 遺伝子のプロモーターにおいてシーケンシングされた CpG のメチル化リードを約 20% よりも少なく有することを意味し、

(ii) 前記ナীব型 PSC が男性 PSC である場合、前記ナীব型男性 PSC は前記 XIST 遺伝子の非メチル化対立遺伝子を 1 つ有し、ここで男性細胞中に XIST 遺伝子の非メチル化対立遺伝子が 1 つ存在することは、前記 XIST 遺伝子のプロモーターにおいてシーケンシングされた CpG のメチル化リードを約 20% よりも少なく有することを意味し、および / または

転写因子 E 3 (T F E 3) の発現レベルについて、免疫染色アッセイにより決定される核から細胞質への発現率が 1 に等しいもしくは 1 を超えることを特徴とする、単離ヒトナイーブ型 P S C。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の単離ヒトナイーブ型 P S C 細胞を少なくとも 1 0 % 含む、単離ナイーブ型 P S C 集団。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の単離ナイーブ型 P S C および培養基を含有する、細胞培養液。

【請求項 4】

前記培養基は、少なくとも 1 0 回継代するあいだ前記ナイーブ型 P S C を未分化多能性状態で維持できる、請求項 3 に記載の細胞培養液。

【請求項 5】

E R K 1 / 2 阻害剤、G S K 3 阻害剤、p 3 8 阻害剤、J N K 阻害剤、S T A T 3 活性化因子、ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F)、形質転換増殖因子ベータ 1 (T G F 1)、プロテインキナーゼ C (P K C) 阻害剤、R O C K 阻害剤、および N O T C H 阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する、培養基。

【請求項 6】

E R K 1 / 2 阻害剤、G S K 3 阻害剤、p 3 8 阻害剤、J N K 阻害剤、S T A T 3 活性化因子、ならびに形質転換増殖因子受容体 (T G F R) 阻害剤、線維芽細胞増殖因子受容体 (F G F R) 阻害剤、プロテインキナーゼ C (P K C) 阻害剤、R O C K 阻害剤、および N O T C H 阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する、培養基。

【請求項 7】

細胞および請求項 5 または 6 のいずれか一項に記載の培養基を含有する、細胞培養液。

【請求項 8】

前記培地は、少なくとも 2 回継代するあいだナイーブ型多能性幹細胞を未分化状態で維持できる、請求項 7 に記載の細胞培養液。

【請求項 9】

ナイーブ型多能性幹細胞 (P S C) を発生させる方法であって、

非ナイーブ型 P S C 細胞を、前記非ナイーブ型 P S C からナイーブ型 P S C を発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、

(i) 前記ナイーブ型 P S C が女性 P S C である場合、前記ナイーブ型女性 P S C は X 不活性化特異的転写産物 (X I S T) 遺伝子の非メチル化対立遺伝子を 2 つ有し、

(i i) 前記ナイーブ型 P S C が男性 P S C である場合、前記ナイーブ型男性 P S C は前記 X I S T 遺伝子の非メチル化対立遺伝子を 1 つ有し、および / または

前記ナイーブ型 P S C における転写因子 E 3 (T F E 3) の発現レベルについて、免疫染色アッセイにより決定される核から細胞質への発現率が 1 に等しいもしくは 1 を超えることを特徴とする、ナイーブ型 P S C を発生させる方法。

【請求項 1 0】

前記条件は請求項 5 または 6 のいずれか一項に記載の培養基を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記条件は低酸素を含む、請求項 9 または 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記培養基は M B D 3 阻害剤をさらに含有する、請求項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記培養基はクロモドメインヘリカーゼ D N A 結合タンパク質 4 (C H D 4) 阻害剤をさらに含有する、請求項 9 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記培養基は P 6 6 アルファ・コイルドコイル・ドメインをさらに含有する、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記非ナীব型 P S C はプライム型 P S C、胚盤胞、人工多能性幹細胞 (i P S C)、および体細胞からなる群より選択される、請求項 9 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

体細胞からの人工多能性幹細胞 (i P S C) の発生を改善する方法であって、

(a) O c t 4、S o x 2、K l f 4、および c - M y c からなる群より選択される少なくとも二種の増殖因子を、体細胞中において発現させる工程、ならびに

(b) 前記体細胞中における M b d 3 の発現および / または活性を阻害する工程を有する、体細胞からの i P S C の発生を改善する方法。

【請求項 17】

前記 M b d 3 活性の前記阻害を、ヌクレオソームリモデリング脱アセチル化酵素 (N u R D) 複合体への前記 M b d 3 の結合を阻害することによって実施する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 M b d 3 の N u R D 複合体への前記結合の前記阻害を、クロモドメインヘリカーゼ D N A 結合タンパク質 4 (C H D 4) 阻害剤を用いて実施する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 M b d 3 の N u R D 複合体への前記結合の前記阻害を、P 6 6 アルファ・コイルドコイル・ドメインを用いて実施する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 M b d 3 発現の前記阻害をプロテインキナーゼ C (P K C) 阻害剤を用いて実施する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記体細胞において E S 細胞発現 R a s (E R A S) コード配列を外因的に発現させる工程、または前記体細胞において前記 E R A S の内因的発現を活性化する工程をさらに有する、請求項 16 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記発現をさせる前の前記 M b d 3 のレベルのうち 10 ~ 30 % が前記 M b d 3 の前記阻害により阻害されるよう、前記発現を少なくとも 48 時間実施する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 23】

前記発現を約 48 時間実施し、前記約 48 時間の後で前記阻害を実施する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 i P S C はネズミ i P S C である、請求項 16 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

L I F、E R K 1 / 2 阻害剤、および G S K 3 b 阻害剤を含有する培地中で前記ネズミ i P S C を培養する工程をさらに有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 i P S C がヒト i P S C である場合、前記方法は、

(c) L I F、E R K 1 / 2 阻害剤、G S K 3 b 阻害剤、P 38 阻害剤、J N K 阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F)、および形質転換増殖因子ベータ 1 (T G F 1) を含有する培養基中で前記ヒト i P S C を培養する工程

をさらに有する、請求項 16 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記培地は R O C K 阻害剤をさらに含有する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

工程 (c) を、工程 (a) における前記発現から約 48 時間後に実施する、請求項 26 または 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

前記発現を、前記増殖因子の D N A トランスフェクションによって実施する、請求項 16 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記発現を、前記増殖因子の R N A トランスフェクションによって実施する、請求項 16 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記発現を、前記増殖因子のタンパク質トランスフェクションによって実施する、請求項 16 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記ナীব型 P S C は 20 回を超えて継代培養しても前記未分化多能性状態を維持できる、請求項 1 に記載の前記単離ナীব型 P S C。

【請求項 33】

ナীব型多能性幹細胞 (P S C) を発生させる方法であって、

非ナীব型 P S C 細胞を、前記非ナীব型 P S C からナীব型 P S C を発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、

前記ナীব型 P S C は、非メチル化 X 不活性化特異的転写産物 (X I S T) 遺伝子を有し、

(i) 前記ナীব型 P S C が女性 P S C である場合、前記ナীব型女性 P S C は前記 X I S T 遺伝子の非メチル化対立遺伝子を 2 つ有し、

(i i) 前記ナীব型 P S C が男性 P S C である場合、前記ナীব型男性 P S C は前記 X I S T 遺伝子の非メチル化対立遺伝子を 1 つ有し、および / または

転写因子 E 3 (T F E 3) の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が 1 に等しいもしくは 1 を超えることを特徴とし、

前記条件は、K O - D M E M、N 2 サプリメント (G i b c o)、A l b u m a x I、L I F、E R K 1 / 2 阻害剤、G S K 3 b 阻害剤、p 3 8 阻害剤、J N K 阻害剤、およびプロテインキナーゼ C 阻害剤を含有する培養基を含む、ナীব型 P S C を発生させる方法。

【請求項 34】

ナীব型多能性幹細胞 (P S C) を発生させる方法であって、

非ナীব型 P S C 細胞を、前記非ナীব型 P S C からナীব型 P S C を発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、

前記ナীব型 P S C は、非メチル化 X 不活性化特異的転写産物 (X I S T) 遺伝子を有し、

(i) 前記ナীব型 P S C が女性 P S C である場合、前記ナীব型女性 P S C は前記 X I S T 遺伝子の非メチル化対立遺伝子を 2 つ有し、

(i i) 前記ナীব型 P S C が男性 P S C である場合、前記ナীব型男性 P S C は前記 X I S T 遺伝子の非メチル化対立遺伝子を 1 つ有し、および / または

転写因子 E 3 (T F E 3) の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が 1 に等しいもしくは 1 を超えることを特徴とし、

前記条件は、K O - D M E M、N 2 サプリメント (G i b c o)、A l b u m a x I (I n v i t r o g e n)、L I F、T G F 1、E R K 1 / 2 阻害剤、G S K 3 b 阻害剤、p 3 8 阻害剤、J N K 阻害剤、およびプロテインキナーゼ C 阻害剤を含有する培養基を含む、ナীব型 P S C を発生させる方法。

【請求項 35】

始原生殖細胞を発生させる方法であって、霊長類ナイーブ型多能性幹細胞を、前記霊長類ナイーブ型多能性幹細胞から始原生殖細胞を誘導できるよう選択された培養基において培養する工程を有し、前記培養基はR h oキナーゼ（R O C K）阻害剤および骨形成タンパク質4（B M P 4）を含有する、始原生殖細胞を発生させる方法。