

【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 19 年 10 月 11 日 (2007.10.11)

【公表番号】特表 2003-509031(P2003-509031A)

【公表日】平成 15 年 3 月 11 日 (2003.3.11)

【出願番号】特願 2001-522835(P2001-522835)

【国際特許分類】

A 0 1 K 67/02 (2006.01)

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

A 0 1 K 67/02

A 0 1 K 67/027

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 5/00 B

【手続補正書】

【提出日】平成 19 年 7 月 26 日 (2007.7.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (i) 任意に脱核されるブタ卵母細胞を活性化する

(i i) 核移入 (N T) ユニットを作出するために前記の活性化段階 (i) の後でもしくはほとんど同時に前記のブタ卵母細胞の中に適切な分化した子ブタ細胞もしくは核を転移する

(i i i) もし卵母細胞が前もって脱核されていない場合、内生卵母細胞核を除去する

(i v) 培養段階の後任意に、ブタ胎児もしくは哺乳動物を作出するために雌のブタに前記の N T ユニットを移入する

ことから成るブタ胎児もしくは生存している産子をクローニングする方法。

【請求項 2】 胎児を産子にまで発生分化することを含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 結果として生存している産子を作出する請求項 1 または 2 記載の方法

。

【請求項 4】 前記の分化したブタ細胞もしくは細胞核内において適切な D N A が挿入され、除去されあるいは一時変異され、それによって結果として遺伝的に去勢された N T ユニットを作出する請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】 前記の遺伝的一時変異が組換えウイルス、ウイルスベクター、ネイキッド (n a k e d) D N A、もしくはプラスミドベクターの利用によってもたらされる請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 マイクロインジェクションが前記の非相同 D N A を挿入するために用いられる請求項 4 記載の方法。

【請求項 7】 電気穿孔法が非相同 D N A を挿入するために用いられる請求項 4 記載の方法。

【請求項 8】 分化した細胞が前記のクローン胎児もしくは哺乳動物の細胞、組織、あるいは器官のヒトへの移植に対する拒絶反応を抑制する一つ以上の遺伝的変異から成る請求項 4 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 分化した細胞あるいは核が増殖している非静止状態の細胞の分化した細胞あるいは核である請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】 前記の分化した細胞が G_1 、 G_2 もしくは M の中に存在する請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】 移入された NT ユニットが一つの細胞である請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】 移入が活性化と同日に実施される請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】 2 細胞発生期より以降の段階になるまで前記の活性核移入ユニットを培養することを含む請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】 前記の分化した細胞もしくは核の導入の後卵母細胞が脱核される請求項 1 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】 ブタ卵母細胞が *in vitro* で成熟する請求項 1 から 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】 ブタ卵母細胞が *in vivo* で成熟する請求項 1 から 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】 分化したブタ細胞もしくは細胞核が中胚葉由来である請求項 1 から 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】 分化したブタ細胞もしくは細胞核が外胚葉由来である請求項 1 から 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】 分化したブタ細胞もしくは細胞核が内胚葉由来である請求項 1 から 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】 前記の分化したブタ細胞もしくは核が体細胞から得られる請求項 1 から 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】 前記の分化したブタ細胞もしくは核が胚細胞から得られる請求項 1 から 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】 宿主の哺乳動物または雌性子ブタが一個以上のヘルパー非ヒト胚から成る請求項 1 から 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】 分化したブタ細胞もしくは細胞核が成熟分化した細胞もしくはその細胞由来の核である請求項 1 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】 分化したブタ細胞もしくは細胞核が線維芽細胞もしくは細胞核である請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】 分化したブタ細胞もしくは細胞核が胚のもしくは胎児の細胞あるいは細胞核である請求項 1 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】 分化したブタ細胞あるいは核が子ブタから直接得られた増殖細胞である請求項 1 から 25 の記載の方法。

【請求項 27】 前記の分化した細胞もしくは核が組織培養液の中で増殖した増殖細胞から得られる請求項 1 から 25 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】 前記の分化した細胞もしくは核が核移入に先だって、*in vivo* で増殖する請求項 1 から 25 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】 前記の増殖しているブタ細胞が、子ブタ細胞が注射された SCID マウスから得られる請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】 前記の増殖細胞が遺伝的に変異した請求項 27 または 28 記載の方法。

【請求項 31】 脱核された卵母細胞が脱核の前に成熟する請求項 1 から 30 のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】 キメラ非ヒト胚を作出する受精非ヒト胚を持つクローン化された NT ユニットの結合をさらに含む請求項 1 から 31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】 キメラ胚を産子にまで発育させることを含む請求項 32 記載の方法。

【請求項 34】 (i) 任意に脱核されるブタ卵母細胞を活性化する

(i i) 核移入 (N T) ユニットの形成に適した条件下で、ブタ卵母細胞に適切な分化をしたブタ細胞もしくは細胞核を挿入する

(i i) もし前もって除去されていない場合前述の卵母細胞から内生の核を除去する

(i i i) 結果として生じた核移入ユニットを活性化する

(i v) 多能がありまた組織培養液中で無期限に維持できるブタ C I C M 細胞株を得るために前記の培養された N T ユニットから得られた細胞を培養する

ことから成る、多能子ブタ培養内部細胞塊 (C I C M) 細胞株の作出の方法。

【請求項 3 5】 適切な D N A が挿入され、除去されもしくは分化したブタ細胞あるいは細胞核に一時変異し、それによって結果として遺伝的に去勢された N T ユニットの作出が起こる請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】 識別できる胞胚壁初期の外層および内部細胞塊が得られるまで前記の活性化された核移入ユニットを培養することを含む請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 3 7】 得られる C I C M 細胞株は、分化誘導される請求項 3 4 から 3 6 のいずれかに記載の方法。