

【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18年8月31日(2006.8.31)

【公表番号】特表2005-535343(P2005-535343A)

【公表日】平成17年11月24日(2005.11.24)

【年通号数】公開・登録公報2005-046

【出願番号】特願2004-529314(P2004-529314)

【国際特許分類】

**A 0 1 K 67/027 (2006.01)**

**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)**

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**C 1 2 N 5/10 (2006.01)**

【F I】

A 0 1 K 67/027 Z N A

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 5/00 B

【手続補正書】

【提出日】平成18年7月13日(2006.7.13)

【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】

生存するGGTA 1欠損ブタ。

【請求項2】

ブタがミニチュアブタである、請求項1に記載のブタ。

【請求項3】

GGTA 1欠損細胞を選択する方法であって、

(a) GGTA 1ヘテロ接合体ブタまたは胎仔から細胞系を得る工程；

(b) GGTA 1欠損細胞について細胞を濃縮する工程；および

(c) GGTA 1欠損生細胞について株をスクランする工程

を含む、前記方法。

【請求項4】

工程(b)において、細胞が、

(a) 補体の存在下で、該細胞に抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体を処置すること；

(b) 抗gal試薬に結合している磁性マイクロビーズを用いて、該細胞を枯渇させること；

(c) 該細胞に抗ガラクトース - (1,3) - ガラクトース抗体を処置し、抗抗体に結合している磁性マイクロビーズを用いて該細胞を枯渇させること；および

(d) 該株にgalエピトープリガンドを処置し、そして抗リガンド抗体に結合している磁性マイクロビーズを用いて該株を枯渇させること

からなる群から選択される少なくとも1つの処置または複数の処置により濃縮される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

工程 ( b ) において、細胞が、下記の各処置：

( a ) 補体の存在下で、該細胞に抗ガラクトース - ( 1,3 ) - ガラクトース抗体を処置すること；

( b ) 該細胞にgalエピトープリガンドを処置し、そして抗リガンド抗体に結合している磁性マイクロビーズを用いて、株を枯渇させること  
を3回行うことにより濃縮される、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

細胞系がブタ胎仔線維芽細胞系であるか、あるいは細胞系がブタ胎仔線維芽細胞のクローン集団である、請求項3～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

ブタ胎仔線維芽細胞がミニチュアブタ由来である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

細胞系が幹細胞系である、請求項3～5のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

幹細胞が始原幹細胞である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

抗ガラクトース - ( 1,3 ) - ガラクトース抗体が霊長類の抗体であるか、あるいは、抗ガラクトース - ( 1,3 ) - ガラクトース抗体が、モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項4または5に記載の方法。

【請求項11】

抗gal試薬が、抗ガラクトース - ( 1,3 ) - ガラクトース抗体およびレクチンからなる群から選択される、請求項4または5に記載の方法。

【請求項12】

galエピトープリガンドがIB4結合体であり、抗エピトープリガンドが抗IB4結合体である、請求項4または5に記載の方法。

【請求項13】

IB4結合体がIB4ビオチンおよびIB4-FITCからなる群から選択され、抗IB4結合体が抗ビオチンおよび抗FITCからなる群から選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

ブタGGTA 1欠損細胞。

【請求項15】

細胞がGGTA 1遺伝子についてホモ接合体であり、かつ前記GGTA 1遺伝子は破壊されているかまたは機能しないようにされているか、あるいは、細胞がGGTA 1遺伝子について半接合体であり、かつ1つのみのGGTA 1アレルが破壊されているかまたは機能しないようにされているか、あるいは、細胞がGGTA 1遺伝子について複合ヘテロ接合体であり、かつ前記GGTA 1遺伝子は2つの異なる変異アレルを含む、請求項14に記載のブタ細胞。

【請求項16】

細胞がQ2、Q9、Q32またはQ37由来である、請求項17に記載のブタ細胞。

【請求項17】

ガラクトース - ( 1,3 ) - ガラクトースエピトープの発現を欠損しているブタ臓器。

【請求項18】

臓器がGGTA 1遺伝子についてホモ接合体である細胞を含み、かつ前記GGTA 1遺伝子は破壊されているかまたは機能しないようにされているか、あるいは、臓器がGGTA 1遺伝子について半接合体である細胞を含み、かつ1つのみのGGTA 1アレルが破壊されているかまたは機能しないようにされているか、あるいは、臓器がGGTA 1遺伝子について複合ヘテロ接合体である細胞を含み、かつ前記GGTA 1遺伝子は2つの異なる変異アレルを含む、請求項17に記載のブタ臓器。

【請求項19】

ブタ臓器が、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、甲状腺および皮膚を含む群から選択される、請求項17または18に記載のブタ臓器。

## 【請求項 2 0】

ガラクトース - (1,3) - ガラクトースエピトープの発現を欠損しているブタ組織。

## 【請求項 2 1】

組織が GGTA 1 遺伝子についてホモ接合体である細胞を含み、かつ前記 GGTA 1 遺伝子は破壊されているかまたは機能しないようにされているか、あるいは、組織が GGTA 1 遺伝子について半接合体である細胞を含み、かつ 1 つのみの GGTA 1 アレルが破壊されているかまたは機能しないようにされているか、あるいは、組織が GGTA 1 遺伝子について複合ヘテロ接合体である細胞を含み、かつ前記 GGTA 1 遺伝子は 2 つの異なる変異アレルを含む、請求項 2 0 に記載のブタ組織。

## 【請求項 2 2】

GGTA 1 欠損細胞を選択すること、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞を前記 GGTA 1 欠損細胞と融合させて NT 由来の胚を産生すること、および代理母に NT 由来の胚を移植することを含む、生存する GGTA 1 欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法。

## 【請求項 2 3】

GGTA 1 欠損細胞が、ブタ胎仔線維芽細胞系またはブタ胎仔線維芽細胞のクローン集団由来である、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

ブタ胎仔線維芽細胞がミニチュアブタ由来である、請求項 2 3 に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

ブタ胎仔線維芽細胞が GGTA 1 ノックアウトについてヘテロ接合体である、請求項 2 3 に記載の方法。

## 【請求項 2 6】

GGTA 1 欠損細胞が Q2、Q9、Q32 または Q37 由来である、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 5】

図面の簡単な説明

図 1 . 抗体および補体による選択を複数のラウンド行った後の、野生型 (F-12) および GGTA 1 ヘテロ接合体 (355-F3) の胎仔細胞のフローサイトメトリー解析。細胞は、(1,3)-gal エピトープ特異的なレクチン IB4 を用い、染色前 (塗りつぶしなしのトレース) または染色後 (塗りつぶしのトレース) に解析した。細胞は、各選択から 5 ~ 9 日後に解析した。処置後の解析は、F12 細胞の最後の選択から 1 7 日後および 355-F3 細胞の最後の選択から 2 2 日後に行われた。抗体 / 補体選択直後の細胞リカバー率を示し、これは処置中の細胞の喪失の全てを含んでいる。

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 9】

8 番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞を Q2 由来の細胞と融合させて NT 由来の胚を産生すること、および代理母に前記 NT 由来の胚を移植することを含む、生存する GGTA 1 欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。他の全ての条件は、7 番目の側面に記載した通りである。

9 番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞を Q9 由来

の細胞と融合させてNT由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。他の全ての条件は、7番目の側面に記載した通りである。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

10番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をQ32由来の細胞と融合させてNT由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。他の全ての条件は、7番目の側面に記載した通りである。

11番目の側面においては、本発明は、卵母細胞を除核すること、前記卵母細胞をQ37由来の細胞と融合させてNT由来の胚を産生すること、および代理母に前記NT由来の胚を移植することを含む、生存するGGTA 1欠損ブタを作製する方法であって、前記代理母は発情を開始しているが排卵を完了していない、前記方法を提供する。他の全ての条件は、7番目の側面に記載した通りである。