

【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10月19日 (2017.10.19)

【公表番号】特表2016-529916(P2016-529916A)

【公表日】平成28年9月29日 (2016.9.29)

【年通号数】公開・登録公報2016-057

【出願番号】特願2016-542829(P2016-542829)

【国際特許分類】

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

【F I】

A 0 1 K 67/027 Z N A

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/04

【手続補正書】

【提出日】平成29年9月11日 (2017.9.11)

【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】

蛍光タンパク質に特異的な T 細胞受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含むゲノムを有する遺伝子導入非ヒト哺乳動物であって、該非ヒト哺乳動物の T 細胞が前記 T 細胞受容体を含む、前記遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

【請求項 2】

齧歯動物である、請求項 1 に記載の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

【請求項 3】

前記齧歯動物がマウスである、請求項 2 に記載の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

【請求項 4】

前記蛍光タンパク質が、

(i) 緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質のいずれかである、および / または
(i i) 配列番号 : 5 を含む、

請求項 1 に記載の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

【請求項 5】

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 : 1、配列番号 : 3、および配列番号 : 1 と配列番号 : 3 の両方からなる群より選択されたポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

【請求項 6】

前記 T 細胞受容体が、

(i) 配列番号 : 2、配列番号 : 4、および配列番号 : 2 と配列番号 : 4 の両方からなる群より選択されたアミノ酸配列を含む、および / または

(i i) 主要組織適合複合体 (M H C) I または I I に装填される蛍光タンパク質に特異的である、

請求項 1 に記載の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の遺伝子導入非ヒト哺乳動物からの単離 T 細胞。

【請求項 8】

蛍光タンパク質に特異的な T 細胞受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現構築物を含む、単離 T 細胞。

【請求項 9】

前記蛍光タンパク質が、

(i) 緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質のいずれかである、および / または
(i i) 配列番号 : 5 を含む、

請求項 8 に記載の単離 T 細胞。

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 : 1、配列番号 : 3、および配列番号 : 1 と配列番号 : 3 の両方からなる群より選択されたポリヌクレオチド配列を含む、請求項 8 に記載の単離 T 細胞。

【請求項 11】

前記 T 細胞受容体が、

(i) 配列番号 : 2、配列番号 : 4、および配列番号 : 2 と配列番号 : 4 の両方からなる群より選択されたアミノ酸配列を含む、および / または
(i i) 主要組織適合複合体 (M H C) I または I I に装填される蛍光タンパク質に特異的である、

請求項 8 に記載の単離 T 細胞。

【請求項 12】

哺乳動物細胞である、請求項 8 に記載の単離 T 細胞。

【請求項 13】

ネズミ細胞である、請求項 12 に記載の単離 T 細胞。

【請求項 14】

遺伝子導入非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

プロモーターと機能し得るように連結された蛍光タンパク質に特異的な T 細胞受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現構築物を、遺伝子導入胚を生み出すために非ヒト哺乳動物胚へ導入する工程、

前記遺伝子導入胚を疑似妊娠非ヒト哺乳動物へ移植する工程、

前記遺伝子導入胚を成熟させる工程、および

前記ポリヌクレオチドを含む少なくとも 1 匹の遺伝子導入仔を単離する工程を含む、前記方法。

【請求項 15】

前記ポリヌクレオチドが、T 細胞の少なくとも前駆細胞で発現される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記前駆細胞が幹細胞である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 T 細胞が、成熟ヘルパー T 細胞または成熟細胞傷害性 T 細胞である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記胚が受精卵または分割球であり、前記ポリヌクレオチドの前記受精卵への導入が微量注入法によって実行され、前記ポリヌクレオチドの前記分割球への導入がレトロウイルス感染による、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

プロモーターと機能し得るように連結された蛍光タンパク質に特異的な T 細胞受容体を

コードするポリヌクレオチド配列を含む非ヒト哺乳動物体細胞または細胞核を提供する工程、

再構成細胞の形成に適切な条件下で、前記非ヒト哺乳動物体細胞または細胞核を除核卵母細胞へ挿入する工程、

胚を形成するよう前記再構成細胞を活性化させる工程、

2細胞発育段階を超えるまで前記胚を培養する工程、および

前記胚が、非ヒト哺乳動物へ発育可能なキメラ胎仔へ成長するよう、前記培養胚を宿主哺乳動物へ移入する工程を含む、前記方法。

【請求項 20】

非ヒト哺乳動物における細胞の枯渇方法であって、

一つまたは複数の細胞種で標的タンパク質を発現する非ヒト哺乳動物を提供する工程、および

該標的タンパク質に対して特異的なT細胞受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現構築物を含み、前記非ヒト哺乳動物における前記一つまたは複数の細胞種を枯渇させるために前記一つまたは複数の細胞種を攻撃する単離T細胞を、該非ヒト哺乳動物へ導入する工程

を含む、前記方法。

【請求項 21】

作用因子に対するT細胞応答の特徴づけ方法であって、

請求項1に記載の遺伝子導入非ヒト哺乳動物を提供する工程、

ワクチン、ウイルス、病原体、移植細胞、および癌細胞系からなる群より選択され、蛍光タンパク質および/または蛍光タンパク質コード化配列を含む作用因子を、前記遺伝子導入非ヒト哺乳動物へ導入する工程、ならびに

前記遺伝子導入非ヒト哺乳動物における前記T細胞応答を特徴づけるために、蛍光タンパク質に特異的な前記T細胞受容体と前記作用因子との間の相互作用をモニターする工程を含む、前記方法。

【請求項 22】

前記非ヒト哺乳動物が齧歯動物である、請求項19～21のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

前記齧歯動物がマウスである、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

前記標的タンパク質が蛍光タンパク質であり、前記ポリヌクレオチド配列が、該蛍光タンパク質に対して抗原特異的であるT細胞受容体をコードする、請求項20に記載の方法。

【請求項 25】

前記蛍光タンパク質が、

(i) 緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質のいずれかである、および/または (ii) 配列番号：5を含む、

請求項21または24に記載の方法。

【請求項 26】

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：1と配列番号：3の両方からなる群より選択されたポリヌクレオチド配列を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項 27】

前記T細胞受容体が、

(i) 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：2と配列番号：4の両方からなる群より選択されたアミノ酸配列を含む、および/または

(ii) 主要組織適合複合体(MHC) IまたはIIに装填される蛍光タンパク質に特異的である、

請求項 2 1 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 2 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 3】

本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物は、T細胞が蛍光タンパク質のエピトープを識別する最初の抗原特異性TCRマウスである。本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物は、蛍光タンパク質に対する免疫応答を研究するために使用できる。したがって、以前不可能であった文脈での免疫応答研究のために、何千ものGFP（および他の蛍光タンパク質）遺伝子導入マウス、GFP（および他の蛍光タンパク質）発現腫瘍細胞株、およびGFP（および他の蛍光タンパク質）発現病原体を利用できる。本発明の技術のもう一つの適用においては、本発明の遺伝子導入非ヒト哺乳動物は、非ヒト哺乳動物における稀な細胞種の枯渇方法として使用できる。

[本発明1001]

蛍光タンパク質に特異的なT細胞受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含むゲノムを有する遺伝子導入非ヒト哺乳動物であって、該非ヒト哺乳動物のT細胞が前記T細胞受容体を含む、前記遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

[本発明1002]

齧歯動物である、本発明1001の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

[本発明1003]

前記齧歯動物がマウスである、本発明1002の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

[本発明1004]

前記蛍光タンパク質が、緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質のいずれかである、本発明1001の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

[本発明1005]

前記蛍光タンパク質が配列番号：5を含む、本発明1001の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

[本発明1006]

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：1と配列番号：3の両方からなる群より選択されたポリヌクレオチド配列を含む、本発明1001の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

[本発明1007]

前記T細胞受容体が、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：2と配列番号：4の両方からなる群より選択されたアミノ酸配列を含む、本発明1001の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

[本発明1008]

前記T細胞受容体が、主要組織適合複合体（MHC）IまたはIIに装填される蛍光タンパク質に特異的である、本発明1001の遺伝子導入非ヒト哺乳動物。

[本発明1009]

本発明1001の遺伝子導入非ヒト哺乳動物からの単離T細胞。

[本発明1010]

蛍光タンパク質に特異的なT細胞受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現構築物を含む、単離T細胞。

[本発明1011]

前記蛍光タンパク質が、緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質のいずれかである、本発明1010の単離T細胞。

[本発明1012]

前記蛍光タンパク質が配列番号：5を含む、本発明1010の単離T細胞。

[本発明1013]

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：1と配列番号：3の両方からなる群より選択されたポリヌクレオチド配列を含む、本発明1010の単離T細胞。

[本発明1014]

前記T細胞受容体が、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：2と配列番号：4の両方からなる群より選択されたアミノ酸配列を含む、本発明1010の単離T細胞。

[本発明1015]

前記T細胞受容体が、主要組織適合複合体（MHC）IまたはIIに装填される蛍光タンパク質に特異的である、本発明1010の単離T細胞。

[本発明1016]

哺乳動物細胞である、本発明1010の単離T細胞。

[本発明1017]

ネズミ細胞である、本発明1016の単離T細胞。

[本発明1018]

遺伝子導入非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

プロモーターと機能し得るように連結された蛍光タンパク質に特異的なT細胞受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現構築物を、遺伝子導入胚を生み出すために非ヒト哺乳動物胚へ導入する工程、

前記遺伝子導入胚を疑似妊娠非ヒト哺乳動物へ移植する工程、

前記遺伝子導入胚を成熟させる工程、および

前記ポリヌクレオチドを含む少なくとも1匹の遺伝子導入仔を単離する工程を含む、前記方法。

[本発明1019]

前記ポリヌクレオチドが、T細胞の少なくとも前駆細胞で発現される、本発明1018の方法。

[本発明1020]

前記前駆細胞が幹細胞である、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記T細胞が、成熟ヘルパーT細胞または成熟細胞傷害性T細胞である、本発明1019の方法。

[本発明1022]

前記胚が受精卵または分割球であり、前記ポリヌクレオチドの前記受精卵への導入が微量注入法によって実行され、前記ポリヌクレオチドの前記分割球への導入がレトロウイルス感染による、本発明1018の方法。

[本発明1023]

非ヒト哺乳動物の作製方法であって、

プロモーターと機能し得るように連結された蛍光タンパク質に特異的なT細胞受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含む非ヒト哺乳動物体細胞または細胞核を提供する工程、

再構成細胞の形成に適切な条件下で、前記非ヒト哺乳動物体細胞または細胞核を除核卵母細胞へ挿入する工程、

胚を形成するよう前記再構成細胞を活性化させる工程、

2細胞発育段階を超えるまで前記胚を培養する工程、および

前記胚が、非ヒト哺乳動物へ発育可能なキメラ胎仔へ成長するよう、前記培養胚を宿主哺乳動物へ移入する工程を含む、前記方法。

[本発明1024]

前記非ヒト哺乳動物が齧歯動物である、本発明1023の方法。

[本発明1025]

前記齧歯動物がマウスである、本発明1024の方法。

[本発明1026]

非ヒト哺乳動物における細胞の枯渇方法であって、
一つまたは複数の細胞種で標的タンパク質を発現する非ヒト哺乳動物を提供する工程、
および

該標的タンパク質に対して特異的なT細胞受容体をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現構築物を含み、前記非ヒト哺乳動物における前記一つまたは複数の細胞種を枯渇させるために前記一つまたは複数の細胞種を攻撃する単離T細胞を、該非ヒト哺乳動物へ導入する工程
を含む、前記方法。

[本発明1027]

前記非ヒト哺乳動物が齧歯動物である、本発明1026の方法。

[本発明1028]

前記齧歯動物がマウスである、本発明1027の方法。

[本発明1029]

前記標的タンパク質が蛍光タンパク質であり、前記ポリヌクレオチド配列が、該蛍光タンパク質に対して抗原特異的であるT細胞受容体をコードする、本発明1026の方法。

[本発明1030]

前記蛍光タンパク質が、緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質のいずれかである、本発明1029の方法。

[本発明1031]

前記蛍光タンパク質が配列番号：5を含む、本発明1030の方法。

[本発明1032]

作用因子に対するT細胞応答の特徴づけ方法であって、
本発明1001の遺伝子導入非ヒト哺乳動物を提供する工程、
ワクチン、ウイルス、病原体、移植細胞、および癌細胞系からなる群より選択され、蛍光タンパク質および/または蛍光タンパク質コード化配列を含む作用因子を、前記遺伝子導入非ヒト哺乳動物へ導入する工程、ならびに

前記遺伝子導入非ヒト哺乳動物における前記T細胞応答を特徴づけるために、蛍光タンパク質に特異的な前記T細胞受容体と前記作用因子との間の相互作用をモニターする工程を含む、前記方法。

[本発明1033]

前記非ヒト哺乳動物が齧歯動物である、本発明1032の方法。

[本発明1034]

前記齧歯動物がマウスである、本発明1033の方法。

[本発明1035]

前記蛍光タンパク質が、緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質のいずれかである、本発明1032の方法。

[本発明1036]

前記蛍光タンパク質が配列番号：5を含む、本発明1035の方法。

[本発明1037]

前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：1と配列番号：3の両方からなる群より選択されたポリヌクレオチド配列を含む、本発明1032の方法。

[本発明1038]

前記T細胞受容体が、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：2と配列番号：4の両方からなる群より選択されたアミノ酸配列を含む、本発明1032の方法。

[本発明1039]

前記T細胞受容体が、主要組織適合複合体(MHC)IまたはIIに装填される蛍光タンパク質に特異的である、本発明1032の方法。