

【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】令和2年6月25日(2020.6.25)

【公表番号】特表2019-515695(P2019-515695A)

【公表日】令和1年6月13日(2019.6.13)

【年通号数】公開・登録公報2019-022

【出願番号】特願2019-511806(P2019-511806)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

A 6 1 K 35/39 (2015.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/071

C 1 2 Q 1/02

A 6 1 K 35/39

A 6 1 P 3/10

G 0 1 N 33/15 Z

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/53 N

G 0 1 N 33/53 B

【手続補正書】

【提出日】令和2年5月11日(2020.5.11)

【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】

イヌ科動物膵細胞またはイヌ科動物細胞腫瘍を調製する方法であって、

a) イヌ科動物未熟膵細胞に、i) インスリンプロモーターの制御下でSV40ラージT抗原を発現するレンチウイルスベクター、またはii) インスリンプロモーターの制御下でSV40ラージT抗原を発現するレンチウイルスベクターおよびインスリンプロモーターの制御下でhTertを発現するレンチウイルスベクター、またはiii) インスリンプロモーターの制御下でSV40ラージT抗原とhTertの両方を発現するレンチウイルスベクターを形質導入および同時形質導入する工程；

b) a) で得られた形質導入未熟膵細胞を第1の重症複合免疫不全症(scid)非ヒト動物の腎被膜に導入する工程；

c) 形質導入未熟膵細胞にインスリノーマ様構造を発達させる工程、ここで、インスリノーマ様構造のイヌ科動物未熟膵細胞はインスリン産生膵細胞に分化している；

d) 工程c) で得られたインスリノーマ様構造を顕微解剖し、その細胞を解離させる工程；

e) 工程d) で得られた細胞を第2のscid非ヒト動物の腎被膜にサブ移植する工程；

；

f) 工程 e) のサブ移植細胞に新たに発達したインスリノーマ様構造を発達および再生させる工程、ここで、当該新たに発達したインスリノーマ様構造はインスリン産生膵細胞内で富化される；

g) 工程 f) で得られたインスリノーマ様構造を顕微解剖し、その細胞を解離させ、回収する工程；

h) 場合により、工程 g) で得られた細胞を第 3 の非ヒト *s c i d* 動物の腎被膜にサブ移植し、インスリン産生膵細胞のさらなる富化および増幅を可能とする工程；および

i) 場合により、適当な量のインスリン産生膵細胞が得られるまで工程 e)、f) および g) を繰り返す工程を含んでなる、方法。

【請求項 2】

前記イヌ科動物未熟膵細胞が、イヌ未熟膵細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記イヌ科動物未熟膵細胞が、膵臓の右葉（または頭部）の一部または膵臓の全右葉（または頭部）から得られる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記イヌ科動物未熟膵細胞が、最終の妊娠第三期、好ましくは受胎後 40 ~ 60 日、さらに好ましくは受胎後 40 ~ 55 日、さらに好ましくは受胎後 40 ~ 46 日、特に受胎後 45 日のイヌ科動物胎仔膵臓から得られる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記レンチウイルスベクターの構築物が、可逆的または条件付き不死化を可能とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記レンチウイルスベクターが、少なくとも 1 つの *L o x P* 部位および *S V 4 0* ラージ T を含んでなり、かつ/または、*h T E R T* 遺伝子が、*C r e* リコンビナーゼの作用によって除去される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記レンチウイルスベクターが、少なくとも 1 つの *F R T* 部位を含んでなり、かつ、*S V 4 0* ラージ T および/または *h T E R T* 遺伝子が、*F L P* リコンビナーゼの作用によって除去される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

*S V 4 0* ラージ T を発現する前記レンチウイルスベクターおよび *h T E R T* を発現する前記レンチウイルスベクターが、*L o x P* 部位または *F L P* 部位をさらに含んでなる（ただし、部位特異的組換え部位は前記ベクター間で異なる）、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

不死化遺伝子 *S V 4 0* ラージ T および/または *h T E R T* が除去された細胞のみを選択するために、*C r e* または *F L P* リコンビナーゼの作用後に負の選択工程が行われる、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記レンチウイルスベクターが、少なくとも 1 つの負の選択マーカー遺伝子を含む、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記負のマーカー遺伝子が、*H S V - T K* 遺伝子、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (*H P R T*) 遺伝子、グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (*G p t*) 遺伝子、およびシトシンデアミナーゼ遺伝子からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 *s c i d* 非ヒト動物が、*s c i d* マウスである、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

工程 d) の細胞に、インスリンプロモーターの制御下で抗生物質耐性遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを形質導入することをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記抗生物質耐性遺伝子が、ネオマイシン耐性遺伝子である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

工程 i) で得られたイヌ科動物膵細胞を回収して均質な細胞集団を形成し、場合により、前記集団を *in vitro* で培養してイヌ科動物機能的細胞株を樹立することをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 16】

SV40 ラージ T、hTERT および / または抗生物質耐性導入遺伝子を除去することを含む 1 以上の脱不死化工程をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法によって得ることができるイヌ科動物細胞腫瘍またはイヌ科動物膵細胞。

## 【請求項 18】

前記腫瘍または細胞が、以下の特徴：

カルボキシペプチダーゼ - A 陰性

転写因子 Pdx1 陽性

転写因子 MafA 陽性

プロコンベルターゼ Pcsk1 陽性

グルコース輸送体 Glut2 の発現

カリウムチャネルのサブユニットをコードする Kcnj11 および Abcc8 の発現

亜鉛輸送体 Znt8 (Slc30a8) の発現

イヌ科動物特異的インスリンの発現

のうち少なくとも 1 つを有する、請求項 17 に記載のイヌ細胞腫瘍またはイヌ膵細胞。

## 【請求項 19】

前記腫瘍または細胞が、抗インスリン抗体、抗 GAD 抗体および / または抗 IA2 抗体との反応に陽性である、請求項 17 または 18 のいずれか一項に記載のイヌ科動物細胞腫瘍またはイヌ科動物膵細胞。

## 【請求項 20】

前記細胞が、無血清培地およびマトリゲルまたはフィブロネクチンコーティングウェルでの培養で維持および増殖される、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載のイヌ膵細胞。

## 【請求項 21】

マトリゲルまたはフィブロネクチンを含んでなる無血清培地中に請求項 17 ~ 20 のいずれか一項に記載のイヌ科動物膵細胞を含んでなる細胞培養物。

## 【請求項 22】

前記細胞が最初の細胞表現型に復帰する、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法によって得ることができるイヌ科動物機能的膵細胞。

## 【請求項 23】

薬学上許容可能な担体と、有効量の請求項 22 に記載のイヌ科動物機能的膵細胞とを含んでなり、前記細胞が場合によりカプセル封入される、獣医学用組成物。

## 【請求項 24】

イヌ科動物膵障害の治療において使用するための請求項 23 に記載のイヌ科動物機能的膵細胞。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019515695A5</a>	公开(公告)日	2020-06-25
申请号	JP2019511806	申请日	2017-05-11
发明人	ポール、チエルニフフ		
IPC分类号	C12N5/071 C12Q1/02 A61K35/39 A61P3/10 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	C12N5/0676 C12N5/0693 C12N2503/00 C12N2503/02 C12N2510/04 G01N33/56966 C12N2503/04		
FI分类号	C12N5/071 C12Q1/02 A61K35/39 A61P3/10 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33/53.B		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR77 4B063/QR90 4B063/QS28 4B063/QS40 4B063/QX01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA46 4C087/AA01 4C087/AA03 4C087/BB51 4C087/BB65 4C087/CA04 4C087/NA14 4C087/ZC35 4C087/ZC61		
代理人(译)	永井裕之 中村KoTakashi 朝仓悟 反町隆史博		
优先权	62/334738 2016-05-11 US		
其他公开文献	JP2019515695A		

#### 摘要(译)

本发明涉及制备商业规模量的犬功能性β细胞和从不成熟的犬不成熟的胰腺组织建立细胞系的方法。本发明还涉及使用犬β细胞肿瘤或由其衍生的细胞的诊断方法。该方法包括亚移植程序，其用于富集增殖的β细胞内的植入物以产生犬β细胞系。这些菌株在葡萄糖刺激下表达，产生和分泌胰岛素。