

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-513510

(P2017-513510A)

(43) 公表日 平成29年6月1日(2017.6.1)

(51) Int.Cl.

A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

F 1

A01K 67/027
C12N 15/00
C12N 5/10

Z N A
A

テーマコード(参考)

4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁)

(21) 出願番号 特願2016-565064 (P2016-565064)
(86) (22) 出願日 平成27年4月28日 (2015.4.28)
(85) 翻訳文提出日 平成28年12月26日 (2016.12.26)
(86) 國際出願番号 PCT/US2015/027995
(87) 國際公開番号 WO2015/168125
(87) 國際公開日 平成27年11月5日 (2015.11.5)
(31) 優先権主張番号 61/985,327
(32) 優先日 平成26年4月28日 (2014.4.28)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 513214088
リコンビネティクス・インコーポレイテッド
RE COMBINE TICS, INC.
アメリカ合衆国55114ミネソタ州セン
ト・ポール、ユニバーシティ・アベニュー
・ウエスト1246番、スウィート301
(74) 代理人 100081422
弁理士 田中 光雄
(74) 代理人 100084146
弁理士 山崎 宏
(74) 代理人 100122301
弁理士 富田 憲史
(74) 代理人 100157956
弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ブタにおける多重遺伝子編集

(57) 【要約】

細胞における多重遺伝子編集を行うための材料および方法が提示される。さらに、方法はそれを作製する動物および方法を含む。

GENERATION OF HOMOZYGOUS CATTLE EDITED AT MULTIPLE ALLELES

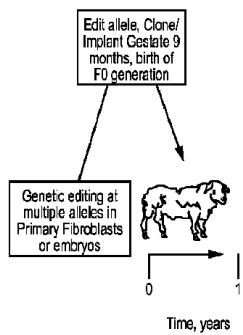


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多重遺伝子編集を含む大型脊椎動物。

【請求項 2】

少なくとも 3 つの天然対立遺伝子を有するウシの第一品種またはブタの第一品種は第二品種または別種の対応する外因性対立遺伝子と置換され、前記外因性対立遺伝子は減数分裂組換えを伴わない前記対応する天然対立遺伝子の置換であり、ここで前記動物は外因性マーカー遺伝子を含まない、請求項 1 に記載の動物。

【請求項 3】

前記 3 つの対立遺伝子の各々が 3 つの異なる遺伝子に対応する、請求項 2 に記載の動物。

10

【請求項 4】

前記外因性置換対立遺伝子の少なくとも 3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、または 7 つを含み、各々が減数分裂組換えを伴わない、請求項 2 または 3 に記載の動物。

【請求項 5】

第二品種または別種の対応する外因性対立遺伝子で置換された少なくとも 2 つの天然対立遺伝子を有する第 1 の動物であり、前記外因性対立遺伝子は、減数分裂組換えを伴わない前記対応する天然対立遺伝子の置換である、請求項 1 に記載の動物。

【請求項 6】

3 ~ 25 の数の対立遺伝子置換を含むかまたは 2 ~ 25 の数のノックアウト遺伝子編集を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の動物。

20

【請求項 7】

ホモ接合性編集、ヘテロ接合性編集、またはそれらの組み合わせを含む前記遺伝子編集を伴う、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の動物。

【請求項 8】

宿主動物由来の宿主細胞とドナー動物由来のドナー細胞とのキメラであり、前記宿主細胞は前記多重遺伝子編集を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の動物。

30

【請求項 9】

前記動物の有性生殖により、前記ドナー細胞の遺伝子型を有する配偶子が子孫に伝えられる、請求項 8 に記載の動物。

【請求項 10】

マーカー遺伝子を含まない、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の動物。

【請求項 11】

家畜、サル、イヌ、ネコ、トリ、鳥類、魚類、ウサギ、ブタ、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄目からなる群から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の動物。

【請求項 12】

前記多重遺伝子編集が、以下の遺伝子 : I L 2 R g - 、 R A G 2 、 I L 2 R g ; R A G 2 、 I L 2 R g y 、 R A G 2 、 I L 2 R g 、 R A G 2 、 I L 2 R g ; R A G 2 、 I L 2 R g ; R A G 2 、 D G A T 、 A B C G 2 、 A C A N 、 A M E L Y 、 B L G 、 B M P 1 B (F e c B) 、 D A Z L 、 D G A T 、 E i f 4 G I 、 G D F 8 、 H o r n - p o l l l o c u s 、 I G F 2 、 C W C 1 5 、 K i s s R / G R P 5 4 、 O F D 1 Y 、 p 6 5 、 P R L R 、 P r m d 1 4 、 P R N P 、 R o s a 、 S o c s 2 、 S R Y 、 Z F Y 、 - ラクトグロブリン、 C L P G 、 M O D Y 1 (H N F 4) 、 M O D Y 2 (G C K) 、 M O D Y 3 (H N F 1) 、 M O D Y 4 (P d x 1) 、 M O D Y 5 (H N F - 1) 、 M O D Y 6 (神経原性分化 1) 、 M O D Y 7 (K L F 1 1) 、 M O D Y 8 (C E L) 、 M O D Y 9 (P A X 4) 、 M O D Y 1 0 (I N S) 、 M O D Y 1 1 (B L K) 、 A P C 、 A p o E 、 D M D 、 G H R H R 、 H R 、 H S D 1 1 B 2 、 L D L R 、 N F 1 、 N P P A 、 N R 3 C 2 、 p 5 3 、 P K D 1 、 R b m 2 0 、 S C N N 1 G 、 t P 5 3 、 D A Z L 、 F A H 、 H B B 、 I L 2 R G 、 P D X 1 、 P I T X 3 、 R u n x 1 、 R A G 2 、 G G T A 、 D A Z L 、 V A S A 、 M

40

50

IWI、PIWI、DCAF17、VDR、PNPLA1、HRAS、Telomerase-vert、DSP、SNRPE、RPL21、LAMA3、UROD、EDAR、OFD1、PEX7、COL3A1、ALOX12B、HLCS、NIPAL4、CERS3、ANTXR1、B3GALT6、DSG4、UBR1、CTC1、MBTPS2、UROS、ABHD5、NOP10、ALMS1、LAMB3、EOGT、SAT1、RBPJ、ARHGAP31、ACVR1、IKBKG、LPAR6、HR、ATR、HTRA1、AIRE、BCS1L、MCCC2、DKC1、PORCN、EBP、SLITRK1、BTK、DOCK6、APCDD1、ZIP4、CASR、TERT、EDARADD、ATP6V0A2、PVRL1、MGP、KRT85、RAG2、RAG-1、ROR2、CLAUDIN1、ABC12、SLA-DRA1、B4GALT7、COL7A1、NHP2、GNA11、WNT5A、USB1、LMNA、EPS8L3、NSDHL、TRPV3、KRAS、TINF2、TGM1、DCLRE1C、PKP1、WRAP53、KDM5C、ECM1、TP63、KRT14、RIPK4、PRKDC、BCL11a、BMI1、CCR5、CXCR4、DKK1、ETV2、FLI1、FLK1、GATA2、GATA4、HHEX、キット、LMX1A、MYF5、MYOD1、MYOG、NKX2-5、NR4A2、PAX3、PDX1、PITX3、Runx1、RAG2、GGTA、HR、HANDII、TBX5、ETV2、PDX1、TBX4、ID2SOX2、TTF1/NKX2-1、MESP1、GATA4、NKX2-5、FAH、PRKDC、RUNX1、FLI1、PITX3、LMX1A、DKK1、NR4A2/NURR1、FLK1、HHEX1、BCL11A、RAG2、RAG1、IL2RG、c-キット/SCFR、BMI1、HANDII、TBX5、GATA2、DAZL、OLIG1、OLIG2、それらのヘテロ接合体、それらのホモ接合体、およびそれらの組み合わせ、の1つ以上において行われる、請求項1~11のいずれか一項に記載の動物。

10

20

30

30

【請求項13】

脊椎動物の細胞または胚における複数の標的染色体DNA部位でインビトロでの遺伝子編集を行う方法であって、

第1の標的染色体DNA部位に特異的な第1の標的化エンドヌクレアーゼおよび第1の標的部位配列に相同な第1の相同組換え修復(HDR)鑄型；および

第2の標的染色体DNA部位に特異的な第2の標的化エンドヌクレアーゼおよび第2の標的部位配列に相同な第2のHDR鑄型

を脊椎動物の細胞または胚に導入するステップを含み、

前記第1のHDR鑄型配列が前記第1の標的部位で前記天然染色体DNA配列を置換し、かつ前記第2のHDR鑄型配列が前記第2の標的部位配列で前記天然染色体DNA配列を置換する、

方法。

【請求項14】

第3、第4、第5、第6、および第7の標的染色体DNA部位に各々特異的な第3、第4、第5、第6、および第7の標的化エンドヌクレアーゼ、ならびに

第3、第4、第5、第6、および第7の標的染色体DNA部位に各々相同な第3、第4、第5、第6、および第7のHDR鑄型

の1つ以上を前記細胞または胚に導入するステップをさらに含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記標的化エンドヌクレアーゼが、TALEN、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ、RNAガイドエンドヌクレアーゼ、またはCas9を含む、請求項13~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

少なくとも第1の標的染色体DNA部位が対立遺伝子における遺伝子座である、請求項13~15のいずれか一項に記載の方法。

40

50

【請求項 17】

前記 H D R 鑄型の少なくとも 1 つが前記鑄型に同族の前記 D N A 標的部位のノックアウトをコードする、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 H D R 鑄型の少なくとも 1 つが、外因性対立遺伝子における前記鑄型に同族の前記 D N A 標的部位での対立遺伝子の置換をコードする、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記細胞または胚が家畜の第一種または第一品種であり、また複数の前記編集が天然対立遺伝子と動物の第二種または第二品種に由来する外因性対立遺伝子との置換を含む、請求項 13 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記細胞または胚が前記標的 D N A 部位での複数の遺伝子編集においてホモ接合性であり、前記編集が前記標的 D N A 部位に同族の H D R 鑄型によってコードされる、請求項 13 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記細胞または胚が前記標的 D N A 部位での複数の遺伝子編集においてヘテロ接合性であり、前記編集が前記標的 D N A 部位に同族の H D R 鑄型によってコードされる、請求項 13 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記細胞または胚が、大型脊椎動物、家畜、サル、イヌ、ネコ、トリ、鳥類、魚類、ウサギ、ブタ、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄目からなる群から選択される、請求項 13 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記細胞が、接合体、幹細胞、成体幹細胞、多能性細胞、前駆細胞、および初代細胞からなる群から選択される、請求項 13 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記胚が、接合体、胚盤胞、桑実胚であるか、または 1 ~ 2 0 0 の数の細胞を有する、請求項 13 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記標的化エンドヌクレアーゼが T A L E N および C R I S P R の組み合わせである、請求項 13 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 26】

前記標的部位配列の 1 つ以上が、以下のリスト： I L 2 R g y / - 、 R A G 2 - / - 、 I L 2 R g - / - 、 R A G 2 - / - 、 I L 2 R g y / - 、 R A G 2 - / - 、 I L 2 R g + / - 、 R A G 2 + / - 、 I L 2 R g y / + 、 R A G 2 + / - 、 I L 2 R g + / - 、 R A G 2 + / - 、 D G A T 、 A B C G 2 、 A C A N 、 A M E L Y 、 B L G 、 B M P 1 B (F e c B) 、 D A Z L 、 D G A T 、 E i f 4 G I 、 G D F 8 、 H o r n - p o l l 1 o c u s 、 I G F 2 、 C W C 1 5 、 K i s s R / G R P 5 4 、 O F D 1 Y 、 p 6 5 、 P R L R 、 P r m d 1 4 、 P R N P 、 R o s a 、 S o c s 2 、 S R Y 、 Z F Y 、 - ラクトグロブリン 、 C L P G 、 M O D Y 1 (H N F 4) 、 M O D Y 2 (G C K) 、 M O D Y 3 (H N F 1) 、 M O D Y 4 (P d x 1) 、 M O D Y 5 (H N F - 1) 、 M O D Y 6 (神経原性分化 1) 、 M O D Y 7 (K L F 1 1) 、 M O D Y 8 (C E L) 、 M O D Y 9 (P A X 4) 、 M O D Y 1 0 (I N S) 、 M O D Y 1 1 (B L K) 、 A P C 、 A p o E 、 D M D 、 G H R H R 、 H R 、 H S D 1 1 B 2 、 L D L R 、 N F 1 、 N P P A 、 N R 3 C 2 、 p 5 3 、 P K D 1 、 R b m 2 0 、 S C N N 1 G 、 t P 5 3 、 D A Z L 、 F A H 、 H B B 、 I L 2 R G 、 P D X 1 、 P I T X 3 、 R u n x 1 、 R A G 2 、 G G T A 、 D A Z L 、 V A S A 、 M I W I 、 P I W I 、 D C A F 1 7 、 V D R 、 P N P L A 1 、 H R A S 、 T e l o m e r a s e - v e r t 、 D S P 、 S N R P E 、 R P L 2 1 、 L A M A 3 、 U R O D 、 E D A R 、 O F D 1 、 P E X 7 、 C O L 3 A 1 、 A L O X 1 2 B 、 H L C S 、 N I P A L 4 、 C E R S 3 、 A N T X R 1 、 B 3 G A L T 6 、 D S G 4 、 U B R 1 、 C T C 1 、 M B T P S 2 、 U R

40

50

O S、A B H D 5、N O P 1 0、A L M S 1、L A M B 3、E O G T、S A T 1、R B P J、A R H G A P 3 1、A C V R 1、I K B K G、L P A R 6、H R、A T R、H T R A 1、A I R E、B C S 1 L、M C C C 2、D K C 1、P O R C N、E B P、S L I T R K 1、B T K、D O C K 6、A P C D D 1、Z I P 4、C A S R、T E R T、E D A R A D D、A T P 6 V 0 A 2、P V R L 1、M G P、K R T 8 5、R A G 2、R A G - 1、R O R 2、C L A U D I N 1、A B C A 1 2、S L A - D R A 1、B 4 G A L T 7、C O L 7 A 1、N H P 2、G N A 1 1、W N T 5 A、U S B 1、L M N A、E P S 8 L 3、N S D H L、T R P V 3、K R A S、T I N F 2、T G M 1、D C L R E 1 C、P K P 1、W R A P 5 3、K D M 5 C、E C M 1、T P 6 3、K R T 1 4、R I P K 4、P R K D C、B C L 1 1 a、B M I 1、C C R 5、C X C R 4、D K K 1、E T V 2、F L I 1、F L K 1、G A T A 2、G A T A 4、H H E X、キット、L M X 1 A、M Y F 5、M Y O D 1、M Y O G、N K X 2 - 5、N R 4 A 2、P A X 3、P D X 1、P I T X 3、R u n x 1、R A G 2、G G T A、H R、H A N D I I、T B X 5、E T V 2、P D X 1、T B X 4、I D 2 S O X 2、T T F 1 / N K X 2 - 1、M E S P 1、G A T A 4、N K X 2 - 5、F A H、P R K D C、R U N X 1、F L I 1、P I T X 3、L M X 1 A、D K K 1、N R 4 A 2 / N U R R 1、F L K 1、H H E X 1、B C L 1 1 A、R A G 2、R A G 1、I L 2 R G、c - キット / S C F R、B M I 1、H A N D I I、T B X 5、G A T A 2、D A Z L、O L I G 1、O L I G 2、それらのヘテロ接合体、それらのホモ接合体、およびそれらの組み合わせ、から選択される、請求項 1 3 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 2 7】

初代脊椎動物の細胞または胚において多重遺伝子ノックアウトを行う方法であって、異なる標的遺伝子に標的化された複数のT A L E Nを、前記異なる標的遺伝子に対する相同性を有するH D R 鑄型の存在下で前記細胞または胚に導入するステップを含む、方法。 20

【請求項 2 8】

宿主細胞およびドナー細胞におけるキメラである脊椎動物胚であって、異なる染色体D N A部位で複数の宿主細胞の遺伝子編集を伴う宿主胚、および前記キメラ胚を形成するため、前記宿主細胞に組み込まれたドナー細胞を含む、脊椎動物胚。 30

【請求項 2 9】

前記ドナー細胞が、靈長類、齧歯類、または偶蹄目に由来する胚性幹細胞、多能性幹細胞、割球などである、請求項 2 8 に記載の胚。 30

【請求項 3 0】

前記宿主またはキャリア細胞の遺伝子編集が、遺伝子のノックアウトまたは天然対立遺伝子と脊椎動物の別品種もしくは動物の別種の外因性対立遺伝子との置換を含む、請求項 2 8 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の胚。 40

【請求項 3 1】

前記宿主細胞の遺伝子編集の数が、2、3、4、5、6、もしくは7、または少なくとも2、3、4、5、6、もしくは7である、請求項 2 8 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の胚。 40

【請求項 3 2】

天然対立遺伝子と脊椎動物の別品種もしくは動物の別種の外因性対立遺伝子との置換の数が、2、3、4、5、6、もしくは7、または少なくとも2、3、4、5、6、もしくは7である、請求項 2 8 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の胚。 40

【請求項 3 3】

発現可能なレポーター遺伝子および/または合成遺伝子および/または外因性蛍光タンパク質を含まない、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の胚。 50

【請求項 3 4】

前記遺伝子編集のすべてが両アレルであるか、または前記編集の少なくとも2、3、4、もしくは5つが両アレルであるか、または前記遺伝子編集の少なくとも2、3、4、もしくは5つが単アレルであるか、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 2 8 ~ 50

3 3 のいずれか一項に記載の胚。

【請求項 3 5】

前記宿主胚が高度虚弱 (F T T) 表現型として運命づけられている、請求項 2 8 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の胚。

【請求項 3 6】

宿主細胞およびドナー細胞におけるキメラである脊椎動物であって、異なる染色体 D N A 部位での複数の宿主細胞の遺伝子編集、および前記キメラ動物を形成するための前記宿主細胞に組み込まれたドナー細胞を含む、脊椎動物。

【請求項 3 7】

宿主細胞およびドナー細胞におけるキメラである脊椎動物胚を作製する方法であって、
宿主の脊椎動物細胞に、
10

第 1 の標的染色体 D N A 部位に特異的な第 1 の標的化エンドヌクレアーゼおよび前記第 1 の標的部位配列に相同な第 1 の相同組換え修復 (H D R) 鑄型；および

第 2 の標的染色体 D N A 部位に特異的な第 2 の標的化エンドヌクレアーゼおよび前記第 2 の標的部位配列に相同な第 2 の H D R 鑄型
を導入するステップと、

宿主胚を発生させるため、前記細胞をクローニングするステップと、

ドナー細胞を前記宿主胚内に配置するステップと、
を含み、前記第 1 の H D R 鑄型配列は前記第 1 の標的部位で前記天然染色体 D N A 配列を置換し、また前記第 2 の H D R 鑄型配列は前記第 2 の標的部位配列で前記天然染色体 D N A 配列を置換する、方法。
20

【請求項 3 8】

前記細胞が初代細胞である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

大型脊椎動物、家畜、サル、イヌ、ネコ、トリ、鳥類、魚類、ウサギ、ブタ、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄目からなる群から選択される、請求項 3 7 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

宿主細胞およびドナー細胞を含むキメラ大型脊椎動物であって、前記宿主細胞が、前記ドナー細胞の遺伝子によって補完される、配偶子形成または精子形成遺伝子に対する少なくとも 1 つの非減数分裂の遺伝子編集を含み、前記動物は前記ドナー細胞の遺伝子型を有する配偶子を含む、キメラ大型脊椎動物。
30

【請求項 4 1】

宿主細胞およびドナー細胞を含むキメラ大型脊椎動物であって、前記宿主細胞は、高度虚弱 (F T T) 宿主細胞の遺伝子型を樹立するための少なくとも 1 つの非減数分裂の遺伝子編集を含み、前記 F T T 遺伝子型は前記ドナー細胞によって補完される、キメラ大型脊椎動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、2014年4月28日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 9 8 5 , 3 2 7 号明細書（ここで参照により本明細書中に援用される）に対する優先権を主張する。
40

【0 0 0 2】

本技術分野は、複数の部位での遺伝子編集、脊椎動物細胞内での複数の遺伝子編集、およびその使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

細胞、およびかかる細胞から作製された動物に対する遺伝子変化は、遺伝子の発現を変化するのに有用である。遺伝子操作の分野は極めて盛んである。
50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

大型脊椎動物を單一世代にてそれらの遺伝暗号に対して複数の変化を有するように作製する場合、非常に有用となる。本明細書で開示されるとき、同作製は、細胞または胚における複数の遺伝子を同時に編集することによって可能である。複数の遺伝子が、脊椎動物の細胞または胚において標的化ヌクレアーゼおよび相同組換え修復（H D R）鑄型を用いて編集するため、標的化され得る。これらの細胞または胚は、研究用に、または全動物を作製するため、用いることができる。複数の編集は、例えば繁殖または遺伝子操作改変を順次行うことにより、單一世代にて実施可能でも、それ以外では行うことができない。

10

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1A】2つのノックアウトについてホモ接合性の動物を單一の編集を用いて作製するための方法を示す。

【図1B】單一の編集を同時に行うことによる複数の編集を用いて動物を作製する仮定上的方法を示す。

【図2】F0世代のファウンダーを樹立するために用いられる多重遺伝子編集を示す。

【図3】ブタRAG2およびIL2Rの多重遺伝子編集。パネルa) 遺伝子導入後3日目の細胞集団に対する非相同末端結合（NHEJ）および相同依存性修復（homology dependent repair）H D Rの効率を判定するためのSurveyorおよびRFLP分析。パネルb) 遺伝子導入後11日目の細胞集団に対する相同組換え修復についてのRFLP分析。パネルc) IL2R、RAG2または双方でのH D Rが陽性であるコロニーの百分率。細胞は、パネルaの「C」で表示される集団から薄かれた。パネルd) IL2RおよびRAG2に対して2 μgおよび1 μgの量のT A L E N mRNAならびに各々に対して1 μMのH D R鑄型が遺伝子導入された細胞からのコロニー分析。コロニー遺伝子型の分布が下方に示される。

20

【図4】ブタAPCおよびp53の多重遺伝子編集。パネルa) 遺伝子導入後3日目の細胞集団に対する非相同末端結合（NHEJ）および相同依存性修復H D Rの効率を判定するためのSurveyorおよびRFLP分析。パネルb) 遺伝子導入後11日目の細胞集団に対する相同組換え修復についてのRFLP分析。パネルcおよびd) 表示される細胞集団（パネルaの「C」および「D」で表示される）に由来する、APC、p53または双方でのH D Rが陽性のコロニーの百分率。3以上のH D R対立遺伝子を有するコロニーが下方に列挙される。

30

【図5】5遺伝子多重H D R効率に対するオリゴヌクレオチドH D R鑄型濃度の効果。ブタRAG2、IL2Rg、p53、APCおよびLDLRに特異的な表示量のT A L E N mRNAが、2 uM（パネルa）または1 uM（パネルb）の各々の同族H D R鑄型とともにブタ線維芽細胞に同時遺伝子導入された。パーセントNHEJおよびH D Rは、SurveyorおよびRFLPアッセイにより測定された。

【図6】5遺伝子多重H D R効率に対するオリゴヌクレオチドH D R鑄型濃度の効果についての実験データのプロットを示す、5遺伝子多重データセットである。ブタRAG2、IL2Rg、p53、APCおよびLDLRに特異的な表示量のT A L E N mRNAが、2 uM（パネルa）または1 uM（パネルb）の各々の同族H D R鑄型とともにブタ線維芽細胞に同時遺伝子導入された。パーセントNHEJおよびH D Rは、SurveyorおよびRFLPアッセイにより測定された。（5遺伝子多重H D Rからのコロニー遺伝子型）コロニー遺伝子型はRFLP分析により評価された。パネルa) 各ラインは、各々の特定の遺伝子座での1つのコロニーの遺伝子型を表す。3つの遺伝子型、すなわち、ヘテロ接合性またはホモ接合性H D Rの想定されるRFLP遺伝子型を有するもの、ならびにRFLP陽性断片とともに挿入または欠失（インデル）対立遺伝子を示すサイズ的に可視的変化を有する第2の対立遺伝子を有するものが同定され得る。特定の遺伝子座に編集を有するコロニーの百分率は、各カラムの下部に示される。パネルb) 0～5の遺伝子座

40

50

で編集されたコロニーの総数。

【図7】5遺伝子多重H D R効率に対するオリゴヌクレオチドH D R錆型濃度の効果を含む、第2の実験における実験データのプロットを示す別の5遺伝子多重データセットである。第2の5遺伝子多重試験でのコロニー遺伝子型。パネルa)各ラインは、各々の特定の遺伝子座での1つのコロニー遺伝子型を表す。3つの遺伝子型、すなわち、ヘテロ接合性またはホモ接合性H D Rの想定されるR F L P遺伝子型を有するもの、ならびにR F L P陽性断片とともに挿入または欠失(インデル)対立遺伝子を示すサイズ的に可視的变化を有する第2の対立遺伝子を有するものが同定され得る。特定の遺伝子座に編集を有するコロニーの百分率は、各カラムの下部に示される。パネルb)0~5の遺伝子座で編集されたコロニーの総数。

【図8】コロニー遺伝子型を示す別の5遺伝子多重試験データセットである。パネルa)各ラインは、各々の特定の遺伝子座での1つのコロニーの遺伝子型を表す。3つの遺伝子型、すなわち、ヘテロ接合性またはホモ接合性H D Rの想定されるR F L P遺伝子型を有するもの、ならびにR F L P陽性断片とともに挿入または欠失(インデル)対立遺伝子を示すサイズ的に可視的变化を有する第2の対立遺伝子を有するものが同定され得る。特定の遺伝子座に編集を有するコロニーの百分率は、各カラムの下部に示される。パネルb)0~5の遺伝子座で編集されたコロニーの総数。

【図9】所望される遺伝子ノックアウトまたは対立遺伝子の選択をもたらす標的化ヌクレアーゼを用いてF0世代キメラを作製する方法を示す。

【図10】正常な表現型を有するF0世代動物ならびに高度虚弱(F T T)表現型および遺伝子型を有する子孫の樹立を示す。

【図11】ドナー胚の遺伝的性質を有する配偶子とのキメラ動物を作製するための方法を示す。

【図12】N K X - 2、G A T A 4、およびM E S P 1の3つの標的化遺伝子座での多重編集を示す。パネルa)は実験の模式図であり、パネルb)は、配列番号1~3として各々列挙されるN K X 2 - 5、G A T A 4、およびM E S P 1の場合での遺伝子の標的化を示す。パネルc)実験におけるアッセイの結果を示す。各標的遺伝子に対するオリゴ配列。新規なヌクレオチドは大文字で表される。P T Cはボックス状の明色文字で表され、新規なH i n d I I I R F L P部位は下線が引かれる。

【図13】T A L E NおよびR G E Nの組み合わせを用いる多重遺伝子編集を示し、R F L Pによって評価される遺伝子導入細胞のアッセイにより、両方の部位でのH D Rが明示された。

【発明を実施するための形態】

【0 0 0 6】

多重遺伝子編集のための方法が記載される。複数の遺伝子は、研究用または全動物の作製に使用可能な細胞または胚にて改変され得る。他の実施形態は、宿主微小環境の選択的過疎による細胞または器官の欠損の補完を含む。これらの発明は、産業や医療における細胞および無細胞産物のモデルや食物として、また供給源として機能するような動物の迅速な作出を提供する。

【0 0 0 7】

図1Aは、2つの編集された対立遺伝子のみを有する家畜を作製するのに単一の編集を用いて数年かかる(同期間はウシにおいて約6年である)理由を図示するタイムラインを有する。この文脈において、編集は、遺伝子を選択し、それを改変することを指す。まず、目的の遺伝子は、標的化K Oを伴うヘテロ接合性の子ウシを作出するためにクローン化される培養体細胞内で編集され、例えばノックアウト(K O)される必要がある。ヘテロ接合体であれば、第一世代(F 1)の雄および雌のヘテロ接合性子ウシを作製するため、繁殖のために成熟期(ウシの場合で約2歳)まで飼育され、その場合、ホモ接合性ノックアウト子ウシ(F 2)を作製するため、互いに繁殖させられる。ウシにおける従来手法を用いて複数の標的化突然変異に関連したホモ接合体を作製するとしたら、非実用的なものとなる。図1Bに図示される通り、さらなる編集を行うのに必要とされる年数および必要

10

20

30

40

50

とされる動物数は、用いられる特定のスキームに応じて、ほぼ指数関数的に増加する。にもかかわらず、脊椎動物の中で、たとえ1世代あたりより多くの子孫を有しかつウシよりも短い妊娠期間を有する動物であっても、複数の編集を達成するには過剰に長い期間を要することになる。例えばブタは、1回の交配あたりより多くの子孫とウシの場合の約半分の妊娠期間とを有するが、複数の編集を行うための期間は長年を必要とし得る。さらに、積極的な近親交配で時間を最小化するスキームは、複数の編集にとって妥当でない可能性がある。また、連続クローニングは、方法およびアウトカムの立場から、特に動物が家畜または実験モデルとして有用とされる場合には望ましくない。

【0008】

本発明によって提示される機会は図2に図示され、それは複数の編集が第一世代動物(F0)で行われていることを示す。胚は、直接的に、またはヘテロ接合体もしくはホモ接合体であるように独立に選択された2つ以上の編集を伴うクローニングにより調製され、懐胎するように代理雌に移される。得られた動物はF0世代ファウンダーである。複数の胚を調製し、両方の性別の子孫を産むように1つ以上の代理に移してもよく、または複数のクローン胚を作製するため、胚分割に関する周知の技術を用いてもよい。典型的には両方の性別を有する同腹仔を産むブタなどの家畜を交雑させ、増殖させてもよい。

【0009】

複数の対立遺伝子は、破壊され得るか、またはそれ以外では、細胞または胚において標的化エンドヌクレアーゼおよび相同組換え修復(HDR)を用いて本明細書に記載のように編集され得る。実施形態は、脊椎動物の細胞または胚における複数の標的染色体DNA部位で遺伝子編集を行う方法であって、脊椎動物の細胞または胚に、第1の標的染色体DNA部位に特異的な第1の標的化エンドヌクレアーゼおよび第1の標的部位配列に相同な第1の相同組換え修復(HDR)鋳型；ならびに第2の標的染色体DNA部位に特異的な第2の標的化エンドヌクレアーゼおよび第2の標的部位配列に相同な第2のHDR鋳型を導入するステップを含み、第1のHDR鋳型配列は第1の標的部位で天然染色体DNA配列を置換し、かつ第2のHDR鋳型配列は第2の標的部位配列で天然染色体DNA配列を置換する、方法である。

【0010】

ノックアウトまたは置換などの複数の編集が得られ得ることを知ることは、意外な驚くべき予測不能な結果であった。1つの学説的な機構は、細胞周期内のある特定のステージであることが理由で、複数の編集に受容性がある細胞が少数存在することである。それらは、エンドヌクレアーゼおよびHDR鋳型に曝露される場合、容易に応答する。操作に関する理論は、1つの標的化部位における細胞修復機構の活性化が、他の部位でも同様に修復すなわちHDR鋳型を支持することから、HDR鋳型による方法が複数の置換に適合するということである。HDRは、複数のHDR編集が明らかに試行、観察、または認識されることがなく、歴史的には低効率な方法とされてきた。

【0011】

本明細書中の結果は、過多または過少のエンドヌクレアーゼおよび/またはHDR鋳型が負の効果を有し得、それがこの領域における先行研究に混乱を来し得ることを示す。事実、本発明者らは、標的化エンドヌクレアーゼが、正確に設計し、作製することができるにもかかわらず、過度に効率的であることから奏功しないことを認めていた。さらに、巧みに改変された細胞の集団は、長期的に改善しないことが多い。細胞を改変する当業者は通常、細胞の寿命および改変を、巧みなクローン化または他の使用における安定性および健全性の指標として追及する。しかしその期待は、本明細書中の多重化方法において有用でなかつたことが多い。さらに、本発明者らは、相同組換え(HR)の遺伝子移入効率が多重化手法において単一遺伝子座の遺伝子移入と比べて変動することを認めていた。一部の遺伝子座は非常に感受性が高かったが、それ以外は効率が極めて低かった。エンドヌクレアーゼ間で明らかに干渉が認められるが、正味の効果を、例えばエンドヌクレアーゼが共通の資源を求めて競合していると仮定することによって単純に説明することはできない。

10

20

30

40

50

【0012】

多数の遺伝子を染色体DNA中の複数の位置に無作為または不正確に挿入するか、または複数の遺伝子を破壊する多数のランダム編集を行うには、様々な周知の技法がある。明らかに、ランダムまたは不正確な方法は、効果を得ようと複数の特異的に標的化された遺伝子を編集する必要がある科学者を支援することを意図するものではない。したがって、本明細書で教示されるHDR方法は、編集によって容易に区別することができ、得られる生物は意図される標的部位に限って作製され得る。1つの違いは、本発明のHDR編集の実施形態が、余分な遺伝子コピーの挿入なしに、かつ/またはエンドヌクレアーゼによって標的化される以外の遺伝子の破壊なしに実施され得ることである。また、HDR錫型配列が適切な相同性を伴わない部位にコピーされないことから、特異的編集は1つの位置で行われる。実施形態は、外因性対立遺伝子が染色体DNAにその同族対立遺伝子の部位に限りコピーされる場合の生物および方法を含む。

10

【0013】

HDRに基づく編集の利点は、編集が選択可能である点である。それに対し、非相同末端結合(NHEJ)法による他の試みでは、フレームシフトを生じさせることなくインデルが互いに打ち消し合うように、複数の位置にインデルを設けることができる。この問題は、多重化が関係する場合に顕著になる。しかし、HDRの巧みな使用により、必要に応じて標的遺伝子が意図されるフレームシフトを確実に有するように編集可能であることが示される。さらに、対立遺伝子置換は、HDRを必要とし、NHEJ、核酸のベクター駆動による挿入、トランスポゾン挿入などにより達成することができない。さらに、望まれない編集を含まない生物を選択することは、さらに困難度を上げる。

20

【0014】

しかし一般に、本明細書に記載の多重編集は、家畜または大型脊椎動物に関連した細胞または動物における標的化部位で先行的に達成されていないと考えられている。高継代細胞からの動物のクローニングにより、実験モデルまたは家畜のF0ファウンダーとして有用でない程度に遺伝子損傷が大きい動物が作出されることは周知である。

20

【0015】

また、遺伝子編集は確率過程であり、結果として、同分野では、巧みに編集されている数パーセントの細胞を同定するような様々なスクリーニング技術を伝統的に重視している。それが確率過程であることから、複数の編集を行う困難さが、意図される編集の数が増加するにつれて指数関数的に増えることが当業者によって想定され得る。

30

【0016】

本発明の実施形態は、単細胞または胚において複数の標的化遺伝子ノックアウトまたは他の編集を作出するための方法、つまり本明細書中で多重遺伝子ノックアウトまたは編集と称される方法を提供する。標的化遺伝子という用語は、エンドヌクレアーゼ系、例えばTALENまたはCRISPRの設計による、エンドヌクレアーゼの攻撃用に選択される染色体DNAの部位を指す。ノックアウト、不活性化される、および破壊されるという用語は、標的化部位が、遺伝子発現産物が除去されるように改変されるか、または遺伝子の発現がもはや全体として動物に対する有意な影響を有しないように大幅に低減されることを意味するように、本明細書中で交換可能に用いられる。これらの用語は時として、遺伝子の役割を、その役割を本質的に排除することなく観察できる程度に低下させることを指すように他所で用いられる。

40

【0017】

遺伝子編集は、同用語が本明細書で用いられるとき、遺伝子を選択し、それを改変することを指す。ランダム挿入、ジントラップなどは遺伝子編集ではない。遺伝子編集の例として、標的化部位での、遺伝子ノックアウト、核酸の付加、核酸の除去、すべての機能の排除、対立遺伝子の遺伝子移入、ハイパーモルフィック変化、ハイポモルフィック変化、および1つ以上の対立遺伝子の置換が挙げられる。

【0018】

対立遺伝子の置換は、内因性対立遺伝子を上回って外因性対立遺伝子をコピーする非減

50

数分裂過程を指す。対立遺伝子の置換という用語は、インデルまたは場合によっては縮重置換を除く他の改変でない、天然対立遺伝子から外因性対立遺伝子への改変がなされることを意味する。縮重置換という用語は、コドン中の塩基がコードされるアミノ酸を改変することなく別の塩基に改変されることを意味する。縮重置換は、エクソン中またはインtron中に存在するように選択してもよい。縮重置換についての1つの用途は、遺伝子移入配列の存在の簡易な試験のために制限部位を作出することである。内因性対立遺伝子はまた、本明細書で天然対立遺伝子と称される。遺伝子という用語は広義であり、機能的産物を作製するために発現される染色体DNAを指す。遺伝子は対立遺伝子を有する。遺伝子型は、2つの同一の対立遺伝子が特定の遺伝子座に存在する場合、ホモ接合性であり、2つの対立遺伝子が異なる場合、ヘテロ接合性である。対立遺伝子は、特定の染色体上の特定の位置に位置する遺伝子の他方の形態（1対の一方のメンバー）である。対立遺伝子は、特徴的な形質を決定する。対立遺伝子は、特徴的な形質を生じさせるそれらのDNA配列内の特定の位置（識別位置またはbp）に塩基対（bp）差を有し、それらを相互に識別し、またこれらの識別位置は対立遺伝子マーカーとして機能する。対立遺伝子は、一般に説明されており、本明細書では識別位置に同じ塩基を有する場合に同一であると説明され、動物は天然に他の位置における他のbpに特定の変異を有する。当業者は通常、対立遺伝子を比較するとき、天然変異を受け入れる。正確に同一であるという用語は、DNAの整列化においてbp差またはインデルが全くないことを意味するように本明細書で用いられる。

10

20

30

40

50

【0019】

対立遺伝子の同一性に対する類似試験は、天然に認識されるものとしての外因性対立遺伝子の染色体DNAを有する改変生物において染色体DNAを整列させることである。外因性対立遺伝子は、1つ以上の対立遺伝子マーカーを有することになる。マーカーの上流および下流でのDNAの整列化は、特定の距離において同一となる。所望される試験に応じて、この距離は、例えば10～4000bpであってもよい。HDR鑄型が正確に同一である配列を作出することが想定され得る一方、鑄型面積の片側の塩基は、当然ながら、幾つかの天然変異を有することになる。当業者は通常、天然変異が存在しても対立遺伝子を識別する。当業者は、明示される境界（bounds）の間のすべての範囲および値が検討されるとともに、以下の距離、すなわち、15、25、50、100、200、300、400、500、600、800、1000、1200、1400、1600、1800、2000、4000のいずれかが上限または下限として利用可能であることを直ちに理解するであろう。

【0020】

当業者はまた、遺伝子編集の結果である、対立遺伝子に対する遺伝子編集を有性生殖に對して識別することができる。対立遺伝子が対立遺伝子を混合するように性的に繁殖できない別種に由来する場合、それは平凡なことである。また、多数の編集が単純に天然に見出されることはない。編集はまた、対立遺伝子がある品種から次の品種に移される場合、たとえ別品種中に天然に見出される対立遺伝子を正確に複製する置換が行われる場合であっても容易に識別され得る。対立遺伝子は、ほぼ常時、DNA上に安定に配置される。しかし、配偶子形成中の減数分裂は時折、雄および雌のDNAで、クロスオーバーと称される事象である、対立遺伝子の交換を引き起こす。クロスオーバー頻度および遺伝学的地図は、広範に研究され、開発されている。家畜の場合、動物の家系は、多世代にわたり極めて詳細に追跡され得る。遺伝学では、センチモルガン（cM、図単位（m.u.）とも称される）は、遺伝連鎖を評価する単位である。それは、単一世代での染色体クロスオーバーに介在する想定される平均数が0.01である場合の染色体位置（遺伝子座または遺伝子座のマーカー）間の距離と定義される。相互に近縁の遺伝子は、染色体に対して相互に遠縁の遺伝子と比べてより低いクロスオーバー率を有する。2つの遺伝子が染色体上で相互に隣接する場合、クロスオーバーは極めて希少な事象である。単一の対立遺伝子のその2つの隣接する対立遺伝子に対するクロスオーバーの可能性が極めて低いことから、かかる事象は遺伝子操作の産物でなければならない。たとえ同じ品種の動物に關係する場合で

あっても、天然に対して操作される対立遺伝子置換は、両親が既知である場合、容易に判定され得る。また、親子関係は、潜在的な親の遺伝子型判定により、高精度に判定され得る。親判定は、ウシおよびヒトでは日常的である。

【0021】

実施形態は、同時になされる多重遺伝子編集方法を含む。同時という用語は、連続ノックアウトまたは連続クローニングまたは動物繁殖の介在周期など、複数の編集を行うための細胞を複数回処理する仮定上の方法とは対照的である。同時に、例えば複数の標的化エンドヌクレアーゼが存在するなど、同時に有用な濃度で存在することを意味する。同方法は、すべての細胞または本質的にすべての細胞が編集された対立遺伝子またはノックアウトを有するような生物を作製するため、接合子および胚に適用され得る。本質的にすべての細胞は、例えばノックアウトとの関連では、遺伝子が、その遺伝子産物が生物の機能にとって無効であることから実用目的では不在であるように、多数の細胞から遺伝子をノックアウトすることを指す。同方法は、細胞、および胚内の細胞を、最小数の細胞分裂、好ましくは約0～約2回の分裂にわたり改変する。実施形態は、迅速な方法または様々な回数にわたって行われる方法を含むか、あるいは細胞分裂の数、例えば0～20回の複製（細胞分裂）が検討される。当業者は、明示される制限内のすべての値および範囲、例えば、約0～約2回の複製、約0～約3回の複製、約4回以下の複製、約0～約10回の複製、10～17回；約7日未満、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、もしくは約6日未満、約0.5～約18日などが検討されることを直ちに理解するであろう。低継代という用語は、約20回以下の複製を経ている初代細胞を指す。

10

20

20

【0022】

その他として、本発明者らは、ウシ胚およびブタ胚における母系性、父系性または双方の対立遺伝子が单一の胚内で編集され得ること、またそれ故に両方の対立遺伝子の鑄型編集が胚内でHDRを用いて生じ得ることを示している。これらの編集は、同じ遺伝子座で行われた。詳細には、姉妹染色分体からの遺伝子移入が検出された。Carlson et al., PNAS 43 (109) : 17382-17387, 2012を参照のこと。

30

【0023】

実施例1（図3を参照）は、2つの遺伝子を直ちにノックアウトし、さらに両方のノックアウトについてホモ接合性であるかまたは各ノックアウトについてヘテロ接合性である細胞を選択できるように、HDR編集を用いる試みが奏効した実験を説明する。選択するという用語は、さらなる使用のため、細胞を同定しつつ単離する能力を指すように用いられ、同方法において発現可能なレポーター遺伝子は全く存在せず、これはこの方法を多数の他の手法と区別する極めて有意な利点である。細胞は、第1の遺伝子（組換え活性化遺伝子2、RAG2）および第2の遺伝子標的（インターロイキン受容体2、IL2R^gまたはIL2R^l）に各々特異的な第1および第2の標的化エンドヌクレアーゼ（各々がTALENペアである）を導入するように処理された。TALENは、目的部位を標的化するように設計し、適量で作製される必要があった。細胞の処理には5分未満を要した。エレクトロポレーションが用いられたが、本明細書に記載の多数の他の好適なタンパク質またはDNAを導入する方法がある。次に、細胞は、各々が単一の処理細胞に由来し、個別の細胞のコロニーを形成するように培養された。様々なコロニー由来の細胞が、3日後または11日後に試験された。RAG2のノックアウトの比率はIL2R^gのノックアウトの比率よりも約6倍高かったが、明らかに一部の遺伝子はその他よりもノックアウトするのがより困難である。両方の遺伝子をノックアウトする効率は高く、両方のノックアウトについてヘテロ接合性またはホモ接合性の細胞の同定は奏功した。有意には、TALEN mRNAおよびHDR鑄型の用量は、特異的および非特異的効果を有した。IL2R^gに対するTALEN mRNAの増加は、IL2R^gに対するNHEJおよびHDRの双方の増加をもたらしたが、RAG2に対するNHEJレベルは不变であった。IL2R^g HDR鑄型の増加はRAG2遺伝子座でのHDRを低下させたが、これはオリゴヌクレオチドの濃度の増大による相同組換え修復の非特異的阻害を示唆している。この用量

40

50

感受性は、特にこれらの低用量では、おそらく他方を多重方法の追及から除外する方に導いている。実施例1からの細胞はクローニングされており、出願時には、2つの動物がそれに由来する胚で妊娠している。

【0024】

実施例2(図4を参照)は、多重H D R編集での、異なる遺伝子であっても同じ目標を有した実験を説明する。第1の遺伝子標的は腺腫様多発結腸ポリープ(A P C)であった。第2の遺伝子標的はp 5 3(T P 5 3遺伝子)であった。両方のノックアウトについてホモ接合性の細胞および両方のノックアウトについてヘテロ接合性の細胞が検出され、単離された。

【0025】

実施例3(図5~8を参照)は、2~5の遺伝子をノックアウトするための多重H D R編集を説明する。遺伝子型について試験される細胞コロニーの数が各実験につき72~192の範囲である場合の3つの実験が行われた。細胞は、遺伝子A P C、p 5 3、R A G 2、低密度リボタンパク質受容体(L D L R)、I L 2 R g、キスペプチン受容体(K I S S RまたはG P R 5 4)、および真核生物翻訳開始因子4 G I(E I F 4 G I)の様々な組み合わせの多重ノックアウトについて処理された。遺伝子L D L Rは、一貫して改変に対して他の遺伝子よりも適しなかった。結果から明らかのように、複数の対立遺伝子は、T A L E Nに特異的な相同組換え修復(H D R)を用いて同時に破壊され得る。各々が20%を超えるH D R/部位をもたらした5つのT A L E Nペアおよびそれらの同族H D R鑄型は、3つの組み合わせで同時に同時遺伝子導入された(表A)。ある比率の各複製物由来のコロニーは少なくとも4つの遺伝子におけるH D R事象が陽性であり、複製物Aからの2つのコロニーは5つすべての遺伝子においてH D R事象を有した。5つの遺伝子における同時的なインデルの形成がマウス胚性幹細胞内でのC a s 9 / C R I S P R刺激性のN H E Jによって実証されているが、標的化ヌクレアーゼ刺激性のH D Rによる5つの遺伝子(最大で7つの対立遺伝子)の正確な改変は想定外で意外であり、他に例がない。複製物のT A L E NがC a s 9 / C R I S P Rに置き換えられると(発現のため、ベクターが細胞に導入された)、改変レベルは検出未満であったが(データは示さず)、他のデータはR G E N多重を示す(例えば下の実施例9)。4つの遺伝子がすべての実験で、また5つの遺伝子が1つの実験で編集されることが見出された。

10

20

30

【0026】

この方法の速度および効率は、5つを超える遺伝子の多重ノックアウトがその方法の性質を変化させることなく達成可能であるようなスケールアップに適合する。表Aを参照すると、約72~192の細胞が試験されたが、今やこの方法が確立されていることから、より多数の遺伝子/対立遺伝子の多重を想定できるように、試験数を極めてより多数の細胞数まで増やすことは不合理なことではない。多重遺伝子または対立遺伝子の数は2~25であってもよく、当業者は、明示される境界(b o u n d s)の間のすべての範囲および値が検討されるとともに、以下、すなわち、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、16、18、20、25のいずれかを、相互に組み合わせて上限または下限として利用可能であることを直ちに理解するであろう。

【0027】

40

【表1】

表A: プタ線維芽細胞における多重HDR

編集された遺伝子	Rep A #(パーセント)	Rep B #(パーセント)	Rep C #(パーセント)	
5	2 (3)	0	0	
4	0	5 (5)	4 (2)	
3	3 (4)	7 (7)	14 (7)	10
2	12 (17)	23 (24)	41 (21)	
1	24 (33)	29 (30)	47 (24)	
1+	41 (57)	63 (66)	106 (55)	
各複製物中の標的化された遺伝子:				
A.	<i>APC, LDLR, RAG2, IL2Rg, p53.</i>			
B.	<i>APC, LDLR, RAG2, KISSR, EIF4G1</i>			
C.	<i>APC, LDLR, RAG2, KISSR, DMD</i>			

10

20

30

40

50

【0028】

明らかなように、多重ノックアウトを伴う細胞および胚、ならびにそれにより作製される動物は、本発明の実施形態である。

【0029】

実施例4は、様々な動物を作製するための幾つかの詳細な方法を説明し、例として特異的遺伝子を指す。実施例5は、C R I S P R / C a s 9 の設計および作製の例を説明する。

【0030】

実施例6は、H D R法を駆動する、標的化ヌクレアーゼを用いた多重遺伝子編集のさらなる例を提供する。フレームシフト突然変異および中途での終止コドンを各遺伝子に導くため、G A T A 結合タンパク質4 (G A T A 4) ; ホメオボックスタンパク質N K X 2 - 5 (N K X 2 - 5) および中胚葉後方タンパク質1 (M E S P 1) が、T A L E N およびH D R 鑄型を用いて同時に標的化された。目的は、相補性試験で用いるため、各遺伝子に対する二対立遺伝子ノックアウトを作出することであった。2 クローンが各遺伝子で意図される二対立遺伝子H D R を有したことで、同方法は約0.5%効率的であった。単独でまたは遺伝子の組み合わせとしてノックアウトされた所与の遺伝子は、高度虚弱遺伝子型および初期胚の致死性を補完なしに生じさせることになる。当業者は、F T T および相補性試験用に三重ノックアウトを得るための(約1/66の確率)、個別でのこれらの遺伝子のノックアウトおよびヘテロ接合体の交配が、家畜では実行不能であることを理解するであろう。

【0031】

実施例7は、遺伝子の多重編集を行うため、T A L E N およびC a s 9 / C R I S P R が混合され得るというデータを提供する。一部の遺伝子/対立遺伝子は、T A L E N またはC a s 9 / C R I S P R により一層容易に標的化され、また多重化がこれらのツールの組み合わせを用いて行われる必要があるという状況が生じ得る。この例では、真核生物翻訳開始因子4 G I (E I F 4 G I) がT A L E N によって標的化され、p 65 (R E L A) 遺伝子がC a s 9 / C R I S P R によって標的化された。細胞は、H D R事象を示すR F L P アッセイによって分析され、H D R は両方の部位で明白であった。したがって、T A L E N およびR G E N は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10

の T A L E N と 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 もしくは 1 0 の R G E N 試薬を含む組み合わせを任意の組み合わせで多重化するため、一緒にまたは別々に用いてもよい。

【 0 0 3 2 】

キメラ

キメラは、宿主胚盤胞を調製し、ドナー動物由来のドナー細胞を加えることによって作製され得る。得られた動物は、宿主およびドナーの双方に由来する細胞を有するキメラとなる。一部の遺伝子は、特定種の細胞および細胞系譜を作出するための胚にとって必要とされる。かかる遺伝子が宿主細胞内でノックアウトされると、欠損遺伝子を有するドナー細胞の導入により、それら細胞および細胞系譜が宿主胚に回復され、回復された細胞がドナー遺伝子型を有する事態が生じ得る。かかる方法は補完法と称される。

10

【 0 0 3 3 】

M a t s u n a r i e t a l . , P N A S 1 1 0 : 4 5 5 7 - 4 5 6 2 , 2 0 1 3 は、ドナー由来のブタ臍臍を作製するための補完法について記述した。彼らは、機能的臍臍の形成を阻止するように改変された宿主ブタ胚盤胞を作製した。彼らは、宿主胚盤胞を体細胞クローニングにより作製した。体細胞は、臍臍の発生を阻害することで公知の P d x 1 (臍臍および十二指腸ホメオボックス 1) のプロモーター下で H e s 1 を過剰発現するように改変されていた。この改変を有していない宿主胚盤胞に加えられたドナー細胞であるドナー細胞は、臍臍を作製するのに必要な細胞系譜を供給した。彼らは他に、機能的器官が、器官形成不全マウス胚における胚盤胞補完により、インビボで多能性幹細胞 (P S C) から作製され得ることを既に実証していた。彼らは、ヒト誘導性 P S C を含む異種間多能性幹細胞 (P S C) を用いる未来研究について提起した。確かに、異種移植は、40 年を超える間、器官 / 組織不足に対する有望な解決策であると考えられている。臍臍の形成を不能にするのに遺伝子が全くノックアウトされなかつたという事実は重大である。

20

【 0 0 3 4 】

大型脊椎動物におけるたとえ 1 つでも遺伝子をノックアウトすることは、従来の方法の利用では資源の多大な投資である。それに対し、細胞内での遺伝子産物の過剰発現は、例えは複数の遺伝子カセットコピーをゲノムに挿入するプラスミドまたはベクターを伴う、現行の最先端技術を用いると容易に達成される。遺伝子の発現を追加することは、遺伝子を標的化し、それをノックアウトするよりも容易である。遺伝子産物の過剰発現によって器官形成を阻止する能力は、現時点では普通ではないと考えられている。事実、大型動物ゲノムを操作する能力における制限は重大であり得る。にもかかわらず、ブタは、ヒトに対するサイズおよび生理学におけるその類似性ならびにその高い繁殖力および成長速度が原因で、異種移植にとって好ましいドナー動物である。

30

【 0 0 3 5 】

図 9 は、キメラとの関連で適用されるとき、遺伝子ノックアウトまたは他の遺伝子編集を行うための、本明細書で用いられる多重方法を示す。低継代の初代体細胞は、遺伝子ノックアウトを用いて作製される。ノックアウトのため、正確にヘテロ接合性およびホモ接合性の所望される分布を伴う細胞が単離される。これらの細胞は、宿主胚盤胞として発生することが可能になる胚を作製するためのクローニングにおいて用いられる。胚盤胞という用語は、2 個の細胞から約 3 週目までの胚を指すように本明細書で広義に用いられる。胚という用語は、接合子から出生までの動物を指すように広義に用いられる。ノックアウトによって作出される微小環境を集合させるための遺伝子を提供するドナー細胞の供給源として、ドナー胚が樹立され、用いられる。宿主およびドナー細胞の双方を有するキメラを形成するため、ドナー細胞は宿主胚盤胞に導入され、宿主細胞とともに再生する。胚は代理雌に移植され、懐胎がなされる。キメラの子孫は、宿主細胞が配偶子を形成するとき、宿主遺伝子型を有する。キメラは、それらの宿主胚盤胞によって決定されるそれらの性別を有する。

40

【 0 0 3 6 】

図 1 0 は、高度虚弱表現型 (F T T) の補完法を図示する。F T T は、性的成熟の年齢まで生存することが想定されない動物を指す。宿主胚には、F T T 遺伝子型および表現型

50

が提供される。多重法は、ただ1つの遺伝子のノックアウトによって利用可能なFTTは限られており、いくつかの臓器および組織については知られていないため、多重プロセスが理想的である。ドナー細胞は、FTTにおいて欠損する遺伝子を提供し、欠損細胞型を提供する。胚は大型脊椎動物であり得、ノックアウトは多重、例えば2~25の遺伝子であり得る。さらに、ノックアウトを得るため、標的化エンドヌクレアーゼを用いることができる。免疫不全の実施形態では、IL2Rg-/-y RAG2-/-ノックアウトは、宿主における免疫機能が本質的に損なわていることからFTTである。しかし、ドナー細胞はこうした欠損遺伝子を有することなく、得られたキメラは、動物を飼育し、維持できることを目的として、本質的に正常な表現型を有する。しかし、子孫はFTT表現型を有する。このように、動物は維持され、FTT動物は容易に作製され得る。キメラは、ノックアウトについてヘテロ接合性およびホモ接合性の任意の組み合わせであり得る。したがって、高度虚弱(FTT)表現型を産むF0世代動物であるキメラを作製するための方法が、他の方法が追加的な作製またはそれ以外を必要とする場合には説明される。

10

20

30

40

50

【0037】

キメラは通常、宿主細胞の遺伝的性質を伝える。しかし、本明細書で開示されるのは、宿主細胞の遺伝的性質ではなくドナー細胞の遺伝的性質をそれらの子孫に伝える別のキメラである。遺伝的形質を転換することにより、幾つかの有用な機会が創出され得ることが判明している。図11を参照すると、G宿主と命名された胚が示される。胚は、非機能的配偶子を用いて調製されている。ドナー胚盤胞は、ドナー細胞の供給源として調製され、用いられる。ドナー細胞は、ドナー配偶子を作製するのに必要とされる遺伝子および細胞系譜を提供する。得られたキメラは、ドナー細胞の配偶子を有し、ドナー細胞の遺伝的性質を有する子孫を作出する。図面では、宿主胚は雄のブラフマン牛(Brahman bull)である。ドナー細胞は、筋肉肥大した雄ウシから得られる。キメラは、ブラフマン牛表現型を有するが、その子孫は筋肉肥大している。宿主およびドナーは、同品種もしくは異品種または同種もしくは異種から得られ得る。宿主は不稔性であるように調製されており、それは宿主が性的に繁殖できないことを意味している。一部の不稔動物は、非機能性の配偶子、例えば不動精子を作製するか、または例えば早期配偶子形成が破壊された状態で配偶子を全く作製しないように用いてもよい。ドナー細胞は、例えば、野生型細胞、望ましい形質を有する動物品種由来の細胞、または遺伝子組換え細胞であってもよい。

【0038】

本発明の実施形態は、配偶子形成または精子形成を阻止する染色体に対して遺伝子改変を有するキメラ不稔動物、例えばキメラ家畜を含む。染色体は、X染色体、Y染色体、または常染色体であってもよい。改変は、既存の遺伝子の破壊を含んでもよい。破壊は、既存の染色体遺伝子を、それが発現できないように改変することにより、または遺伝子の転写または翻訳を阻害する因子を遺伝的に発現することにより、作出され得る。配偶子形成という用語は、各々が各親の胚芽細胞系由来の両親の遺伝的相補物の半分を保有する一倍体生殖細胞(卵および精子)の産生を意味する。精子の産生は精子形成である。受精中の精子および卵の融合は、二倍体ゲノムを有する接合体細胞をもたらす。配偶子形成細胞という用語は、卵または精子に対する前駆細胞、典型的には胚細胞または精原細胞を指す。1つの実施形態は、宿主内での精原幹細胞(SSC)のノックアウトである。動物は、望ましい遺伝的性質を有するドナー細胞を用いて作製してもよく、ドナー遺伝子型を有する配偶子を作製するSSC細胞を供給する。一部の遺伝子は、不妊を引き起こす1つ以上の効果をもたらすように組み合わせて、例えば、Acr/H1.1/SmcP、Acr/Tnpl2/SmcP、Tnpl2/H1.1/SmcP、Acr/H1t/SmcP、Tnpl2/H1t/SmcP(Nayernia K; Drabent B; Meinhardt A; Adham IM; Schwandt I; Muller C; Sancken U; Kleene KC; Engel W Triple knockouts reveal gene interactions affecting fertility of male mice. Mol. Reprod. Dev 70(4): 406-16, 2005)を組み合わせて破壊される。実施形態は、第1の1つもしくは複数の遺

伝子のノックアウトを有する第1の動物系統および第2の1つもしくは複数の遺伝子のノックアウトを有する第2の動物系統であって、両系統の雄子孫が不妊であるものを含む。

【0039】

遺伝子組換え大型脊椎動物を作出するための遺伝子操作の使用は、望ましい形質を有する動物の作出を促進することになる。伝統的家畜の繁殖は、世代的再生産のための遺伝的形質および待機時間 (lengthy waits) の慎重な選択を含む、高価で時間がかかる方法である。慎重な形質選択の場合であっても、有性生殖の多様性が、望ましい形質の組み合わせに対して培養および継代を行う上で多くの課題を提示する。しかし、ドナー形質を伝えるキメラの作出は、望ましい遺伝的形質の迅速な散在、ならびに形質の独自制御の保護を可能にする動物生殖の方法を創出する。実施形態は、供与された遺伝子材料における宿主として機能し得る遺伝的かつゲノム的に不穏性の動物の作製を含む。宿主による性交は、ドナーの遺伝子材料の再生をもたらすことになる。遺伝的不穏性の動物群は、単一ドナー由来の同一遺伝子を有性生殖により散在させることで、多数のドナー子孫が迅速に作製され得るように、用いることができる。実施形態は、一方の性別のみの動物を作製するように改変された動物を含み、それにより動物を受け取る利用者はその形質を有する動物を容易には繁殖させられないことになる。

10

【0040】

実施形態は、配偶子形成または精子の活性に対して選択的な1つもしくは複数の遺伝子を不活性化するため、細胞または胚に遺伝子改変を施すことを含む。遺伝子改変の1つの方法は、遺伝子に特異的に結合する標的化ヌクレアーゼ、例えばCas9 / CRISPRまたはTALENペアに対するmRNAの導入を含む。動物が細胞からクローン化されるか、または改変された胚が代理母において直接的に產生される。動物は、家畜動物または他の動物であってもよい。配偶子形成は早期段階で遮断してもよい。あるいは、穏性に必須であるが、それ以外では動物にとって必須でない精子の活性は破壊してもよい。それ故、動物は、性的に繁殖できないことから不穏性であるが、改変された精子から子孫を作出するため、ARTを用いてもよい。(繁殖および/または遺伝子操作の結果として) 望ましい遺伝的形質を有するドナー動物が選択される。

20

【0041】

2つ以上のノックアウトを有するF0世代ファウンダー動物系統の迅速な樹立

30

多重の場合、所望される組み合わせの対立遺伝子を有するF0世代を作製するため、2つ、3つ、またはそれより多くの遺伝子(2~25)を同時にノックアウトしてもよい。ノックアウトのすべてについてのホモ接合性はFTTを作出し、次いで1つの選択肢は、ノックアウトの1つ(状況に応じて最低限のヘテロ接合性が必要であるべきあらゆる場合など)を除くすべてについてホモ接合性であるファウンダーを作製することである。その1つのヘテロ接合性遺伝子は、非FTT表現型を許容し得る。あるいは、FTT子孫を有するキメラを繁栄させるため、多重ノックアウトは相補性と併用され得る。この方法は、複数のノックアウト動物の作出において世代を排除させ得る。

【0042】

いずれの場合でも、その利点は大きく、それにより多数の方法が実際に達成可能な領域まで移行される。F2世代の場合、子孫の約6%しか所望される表現型を有することにならないことから、2つの遺伝子座のノックアウトを有する動物を従来式繁殖により作製するには法外な費用がかかる(表B)。それに対し、多重手法は、F0世代における所望される遺伝子型の作製を可能にすることから、従来式のノックアウトおよび繁殖をしのぐ大きな利点がある。時間および動物の節約が非理論的であることは強調されるべきであるが、失敗よりも成功が想定されることから、ある種の改変を可能にすることは進歩である。さらに、その例を踏まえると、1つまたは2つのキメラRG-KO親の間での繁殖は、RG-KO子孫の作製率を各々、25および100パーセントに有意に高めることになる(表B)。

40

【0043】

【表2】

表B: キメラブタの繁殖の利点			
雄		雌	RG-KO%
キメラ- <i>IL2Rg</i> ^{y/-} ; <i>RAG2</i> ^{-/-}	X	キメラ- <i>IL2Rg</i> ^{-/-} ; <i>RAG2</i> ^{-/-}	100%
キメラ- <i>IL2Rg</i> ^{y/-} ; <i>RAG2</i> ^{+/+}	X	<i>IL2Rg</i> ^{+/+} ; <i>RAG2</i> ^{+/+}	25%
<i>IL2Rg</i> ^{y/+} ; <i>RAG2</i> ^{+/+}	X	<i>IL2Rg</i> ^{+/+} ; <i>RAG2</i> ^{+/+}	6.3%

10

【0044】

免疫不全動物

実施形態の1群は、免疫不全ブタまたは他の家畜およびそれらを作製する方法に関する。これらの実施形態は、ホモ接合性およびヘテロ接合性のノックアウト遺伝子型の選択を管理するための機会を利用する、多重編集例、例えばノックアウトである。これらは、ファウンダー系統を迅速に樹立するための多重の能力を示している。それらはまた、キメラの作製を含む本発明の態様をさらに含む。

【0045】

ブタは、ヒトのサイズおよび生理学を模倣する、最も関連性の高い非霊長類動物モデルである。残念ながら、(1)複数の遺伝子ノックアウト(KO)が必要とされる、(2)複数の遺伝子座マル動物を作製するための交雑に極めてコストがかかり、ノックアウトの数に左右され得る、また(3)ブタに対しては小規模の無菌施設のみが利用可能であることから、完全に免疫不全のブタは広範に利用可能ではない。本明細書では、実施形態は、*RAG2*および*IL2Rg*の双方のノックアウト(すなわちRG-KO)を伴う大型脊椎動物を含む。大型脊椎動物という用語は、サル、家畜、イヌ、およびネコを指す。家畜という用語は、習慣的に食用に飼育された動物、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、トリ(ニワトリ、シチメンチョウ)、ブタ、水牛、および魚類を指す。遺伝子は、体細胞でノックアウトされ得、次いで全動物を作製するためのクローニングに用いられる。あるいは、胚は遺伝子をノックアウトするように処理され得、ここで動物は直接的に胚に由来する。多重遺伝子の標的化プラットフォームは、ブタにおけるT、BおよびNK細胞の発生を同時に破壊し得る。したがって、かかる細胞なしに作製される動物は、F0ファウンダーとして、本明細書中の方法を用いて直接的に作製され得るが、表現型はFTTである。

20

【0046】

多重編集における農業標的

食用動物ゲノムの編集は、極めて多数の遺伝子座を同時に編集し、同時に1つでなく作製される対立遺伝子を結び付けることが必要となる動物の繁殖で世代を保存することにより、大いに促進され得る。さらに、一部の農業形質は複雑であり、2つ以上(2から数百)の遺伝子での対立遺伝子の影響の結果として顕現することをそれは意味する。例えば、*DGAT*、*ABC G2*での多型、および染色体18での多型は、併せて、乳牛における*Net Dairy Merit*の変動の大部分を占める。家畜の細胞または胚は、様々な農業標的、すなわち、*ACAN*、*AMELY*、*BLG*、*BMP1B*(*FecB*)、*DAZL*、*DGAT*、*Eif4GI*、*GDF8*、*Horn-pol11 locus*、*IGF2*、*CWC15*、*Kiss5R/GRP54*、*OFD1Y*、*p65*、*PRLR*、*Prmd14*、*PRNP*、*Rosa*、*Socs2*、*SRY*、*ZFY*、-ラクトグロブリン、*CLPG*の1つ以上を含む、極めて多数の遺伝子の多重編集がなされ得る。

30

【0047】

多重化するための疾患モデリング標的

がんのような一部の形質は、複数の遺伝子での突然変異に基づいて引き起こされる(APC/p53を参照)。さらに、極めて多数の疾患形質は、2つ以上の遺伝子で対立遺伝子の影響の結果として現れる、いわゆる複合形質である。例えば、糖尿病、代謝、心疾患

40

50

、および神経性疾患は複合形質と考えられる。実施形態は、個別の対立遺伝子において、または他の遺伝子での対立遺伝子と異なる組み合わせで組み合わせて、ヘテロ接合性およびホモ接合性である動物モデルを含む。例えば、MODY1 (HNF4)、MODY2 (GCK)、MODY3 (HNF1)、MODY4 (Pdx1)、MODY5 (HNF-1)、MODY6 (神経原性分化1)、MODY7 (KLF11)、MODY8 (CEL)、MODY9 (PAX4)、MODY10 (INS)、MODY11 (BLK)を含む、若年成人発症型糖尿病 (MODY) の遺伝子座は、糖尿病を個別かつ相加的に引き起こす。家畜の細胞または胚は、様々な疾患モデリング標的を含む動物モデリングのため、極めて多数の遺伝子、すなわち、APC、APOE、DMD、GHRHR、HR、HS 11B2、LDLR、NF1、NPPA、NR3C2、p53、PKD1、Rbm20 10、SCNN1G、tP53、DAZL、FAH、HBB、IL2RG、PDX1、PITX3、Runx1、RAG2、GGTAの多重編集が施され得る。実施形態は、上記標的の1つ以上が編集、例えばノックアウトされている、細胞、胚、および動物を含む。

【0048】

1つの種における遺伝子は常に、他種においてオルソログを有する。ヒトおよびマウス遺伝子は常に、家畜、特に雌ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、およびウサギにおいてオルソログを有する。これらの種と魚類との間の遺伝子オルソログは、遺伝子の機能に応じて一致することが多い。生物学者は、遺伝子オルソログを見出すための方法に精通していることから、遺伝子は、他種のオルソログを列挙することなく、それらの種の1つという観点で本明細書に記載され得る。したがって、遺伝子の破壊について説明する実施形態は、他種における同じまたは異なる名称を有するオルソログの破壊を含む。一般的な遺伝子データベース、ならびに遺伝子オルソログの同定に特化されたデータベースが存在する。さらに、当業者は、遺伝子について一般的に用いられる略称や、ある遺伝子に対して2つ以上の略称があるかまたは2つの遺伝子が同じ略称によって参照される場合、いずれの遺伝子が参照されているかを文脈を活用して同定することに精通している。

【0049】

精原幹細胞は、第2の方法として家畜の遺伝子改変を提示する。遺伝子改変または遺伝子編集は、ドナー精巣から単離された精原幹細胞においてインビトロで実行され得る。改変細胞は、レシピエントの生殖細胞が枯渇した精巣に移植される。移植された精原幹細胞は、ファウンダー動物を誘導するため、人工授精または体外受精 (IVF) を介して繁殖に使用可能な1つもしくは複数の遺伝子改変を保有する精子を産生する。

【0050】

宿主微小環境の選択的過疎による形態欠損 (nulloomorphic) 細胞または器官欠損の補完

多重編集は、細胞または器官を特定の胚または動物の微小環境から意図的に切り出し、より優れたドナー細胞の組込み、増殖、および分化に寄与する環境を作出し、胚、胎児または動物におけるオルソロガスな細胞、組織または器官での補完によりそれらの寄与を増強するように用いることができる。空の微小環境を有する動物は、ドナー細胞および遺伝子によって満たされ得る欠損を有するように作出されていることから、欠損キャリアである。具体的な例として、レシピエントの除去、および配偶子形成細胞系譜 (DAZL、VASA、MIWI、PIWIなど) のドナーレスキュ (donor-rescue) を含む。

【0051】

別の実施形態では、多重遺伝子編集は、先天性脱毛症を誘導し、ドナー由来細胞が毛髪での濾胞形成に関与するための機会を提供するために用いることができる。脱毛症を引き起こす、多重遺伝子編集において検討される遺伝子は、OMIMおよびHuman Phenotype Ontology データベースの中で同定されたもの；DCAF17、VDR、PNPLA1、HRAS、Telomerase-vert、DSP、SNRPE、RPL21、LAMA3、UROD、EDAR、OFD1、PEX7、COL3A1、ALOX12B、HLCS、NIPAL4、CERS3、ANTXR1、B3GALT 50

6、 D S G 4、 U B R 1、 C T C 1、 M B T P S 2、 U R O S、 A B H D 5、 N O P 1 0、 A L M S 1、 L A M B 3、 E O G T、 S A T 1、 R B P J、 A R H G A P 3 1、 A C V R 1、 I K B K G、 L P A R G 6、 H R、 A T R、 H T R A 1、 A I R E、 B C S 1 L、 M C C C 2、 D K C 1、 P O R C N、 E B P、 S L I T R K 1、 B T K、 D O C K 6、 A P C D D 1、 Z I P 4、 C A S R、 T E R T、 E D A R A D D、 A T P 6 V 0 A 2、 P V R L 1、 M G P、 K R T 8 5、 R A G 2、 R A G - 1、 R O R 2、 C L A U D I N 1、 A B C A 1 2、 S L A - D R A 1、 B 4 G A L T 7、 C O L 7 A 1、 N H P 2、 G N A 1 1、 W N T 5 A、 U S B 1、 L M N A、 E P S 8 L 3、 N S D H L、 T R P V 3、 K R A S、 T I N F 2、 T G M 1、 D C L R E 1 C、 P K P 1、 W R A P 5 3、 K D M 5 C、 E C M 1、 T P 6 3、 K R T 1 4、 R I P K 4 を含む。濾胞形成 (f o l l i c u l o g e n i c) の可能性を有するドナー細胞とのキメラ化は、ヒト毛包を成長させるため、用いてよい。ブタまたは他の脊椎動物における器官または組織の切り出しあおよびヒトに由来する器官または組織の成長は、医療用の器官または組織の供給源として特に有用である。
10

【 0 0 5 2 】

さらに、多重化のための相補標的は、P R K D C、B C L 1 1 a、B M I 1、C C R 5、C X C R 4、D K K 1、E T V 2、F L I 1、F L K 1、G A T A 2、G A T A 4、H H E X、K I T、L M X 1 A、M Y F 5、M Y O D 1、M Y O G、N K X 2 - 5、N R 4 A 2、P A X 3、P D X 1、P I T X 3、R u n x 1、R A G 2、G G T A、H R、H A N D I I、T B X 5 である。

【 0 0 5 3 】

実施形態は、多重手法で、または他の手法により、上記標的の 1 つ、2 つ、またはそれより多く (2 ~ 2 5) を標的化することを含む。

【 0 0 5 4 】

編集された遺伝子

特定の標的および標的化エンドヌクレアーゼに関連する本明細書に記載の方法および発明は、幅広く適用可能である。本発明者らは、以下の遺伝子のすべてを用いた編集を伴うクローニングに適した初代家畜細胞を調製している。

【 0 0 5 5 】

【表3】

表C: ブタおよび/または ウシ線維芽細胞内で標的化エンドスクレアーゼ (TALEN)および HDR ノックアウトにより作製される、クローン化に適した初代家畜細胞		
遺伝子 ID	遺伝子名称	種
		S: ブタ B: ウシ
ETV2	Ets 変異体 2	S
PDX1	胰臓および十二指腸ホメオボックス 1	S
TBX4	T ボックス転写因子 TBX4	S
ID2	DNA 結合タンパク質阻害剤	S
SOX2	SRY (性決定領域 Y)-ボックス 2	S
TTF1/NKX2-1	甲状腺転写因子 1/NK2 ホメオボックス 1	S
MESP1	中胚葉後方タンパク質 1 相同体	S
GATA4	GATA 結合タンパク質 4	S
NKX2-5	NK2 ホメオボックス 5	S
FAH	フマリルアセト酢酸ヒドローゼ	S
PRKDC	タンパク質キナーゼ, DNA 活性化, 触媒ポリペプチド	S
RUNX1	Runt 関連転写因子 1	S

【0056】

【表4】

FLII	フレンド白血病複合体 1 転写因子	S
PITX3	下垂体ホメオボックス 3	S
LMX1A	LIM ホメオボックス転写因子 1, α	S
DKK1	ディックコップ関連タンパク質 1	S
NR4A2/NURR1	核内受容体サブファミリー4, グループ A, メンバー2/核内受容体関連 1 タンパク質	S
FLK1	胎児肝キナーゼ 1	S
HHEX1	造血系発現ホメオボックスタンパク質	S
BCL11A	B 細胞リンパ腫/白血病 11A	S
RAG2	組換え活性化遺伝子 2	S
RAG1	組換え活性化遺伝子 1	S
IL2RG	インターロイキン 2 受容体, γ	S
c-KIT/SCFR	マスト/幹細胞成長因子受容体	S
BMI1	ポリコームリングフィンガー癌遺伝子	S
HANDII	心臓および神経冠誘導体発現タンパク質 2	S
TBX5	T ボックス転写因子 5	S
GATA2	GATA 結合タンパク質 2	S
DAZL	無精子症様における欠失	S, B
OLIG1	オリゴデンドロサイト転写因子 1	S
OLIG2	オリゴデンドロサイト転写因子 2	S

【0057】

遺伝子改变動物

遺伝的に発現可能なマーカーを定位置に残し、動物外でのその交配を可能とする方法を用い、または動物中にマーカーを配置しない方法により、染色体改変について単アレル性または両アレル性の動物が作製され得る。例えば、本発明者らは、動物の染色体の変化、または動物の染色体中への外因性遺伝子の挿入を作製するため、相同依存性組換え（H D R）の方法を用いている。T A L E N およびリコンビナーゼ融合タンパク質などのツール、ならびに従来の方法が、本明細書の他の箇所で考察される。本明細書に開示の遺伝子改変を支持する実験データの一部が次のようにまとめられる。本発明者らは、改変細胞の多遺伝子集団からクローニングする場合の例外的なクローニング効率を先行的に実証し、単離コロニーについての体細胞核移植（S C N T）によるクローニング効率の変動を回避するためにこの手法を提唱している（Carlsonら, 2011）。しかしさらに、T A L E N 媒介ゲノム改変、およびリコンビナーゼ融合分子による改変は、単一世代における両アレル

10

20

30

40

50

ル改变の達成をもたらす。例えば、ノックアウト遺伝子についてホモ接合性の動物は、S C N Tにより、ホモ接合性をもたらすための同系交配を伴わずに作製され得る。ブタおよびウシなどの家畜についての妊娠期間および生殖齢への成熟は、研究および生産に対する大きな障壁である。例えば、クローン化および交配によるヘテロ接合性突然変異細胞（両方の性）からのホモ接合性ノックアウトの作製には、ブタおよびウシの各々について16および30カ月が必要となる。一部は、遺伝子改变およびS C N T（K u r o i w a ら、2004）の連続サイクルによりこの負荷を低減させているが、これは技術的に困難であり、法外な費用がかかり、その上、大型脊椎動物実験モデルまたは家畜に対して実際に有用であるべき、F 0動物を作製するための連続クローンングを回避するのに多くの理由がある。S C N T前に両アレルK O細胞を定型的に作製する能力は、大型動物の遺伝子操作における大きな進歩である。両アレルノックアウトは、Z F Nおよび希釈クローン化などの他の方法を用いて不死細胞系において達成されている（L i u ら、2010）。別のグループは近年、市販のZ F N試薬を用いてブタG G T A 1の両アレルK Oを実証し（H a u s c h i l d ら、2011）、両アレルヌル細胞をG G T A 1依存性表面エピトープの不存在についてF A C Sにより濃縮することができる。これらの研究は、ある有用な概念を実証する一方、彼らは動物または家畜が改变され得ることを示すものではない。というのは、簡易なクローン希釈は一般に初代線維芽細胞単離株に適しておらず（線維芽細胞は低密度における成長が不十分である）、ヌル細胞についての生物学的濃縮が大多数の遺伝子に利用可能でないためである。

10

20

30

40

50

【0058】

標的化ヌクレアーゼに誘導される相同組換えは、関連する選択マーカーに対する必要性を失くすために用いることができる。相同組換え修復（H D R）によって特定の対立遺伝子を家畜ゲノムに正確に導入するため、T A L E Nを用いてもよい。パイロット研究では、特定の11bpの欠失（ベルギアン・ブルー（B e l g i a n B l u e）対立遺伝子）（G r o b e t ら、1997；K a m b a d u r ら、1997）がウシG D F 8遺伝子座に導入された（米国特許出願公開第2012/0222143号明細書を参照）。単独での遺伝子導入時、b t G D F 8 . 1 T A L E Nペアは標的遺伝子座で最大16%の染色体を切断した。11bpの欠失を内包するスーパークイルの相同D N A修復錆型との同時導入の結果、所望される事象についての選択なしに、3日目に最大5%の遺伝子変換頻度（H D R）が得られた。遺伝子変換は、スクリーニングされた、単離コロニーの1.4%で同定された。これらの結果により、関連する選択マーカーの援助なしにH D Rを効率的に誘導するため、T A L E Nを用いることができるが実証された。

【0059】

相同組換え修復（H D R）

相同性指向修復（H D R）は、s s D N Aおよび二本鎖D N A（d s D N A）損傷を修復するための細胞内機構である。この修復機構は、損傷部位と有意な相同性を有する配列を有するH D R錆型が存在する場合、細胞により用いられ得る。特異的結合は、生物学分野において一般に使用される用語であり、非標的組織と比べて相対的に高い親和性で標的に結合し、一般に複数の非共有結合性相互作用、例えば、静電相互作用、ファンデルワールス相互作用、水素結合などを含む分子を指す。特異的ハイブリダイゼーションは、相補配列を有する核酸間の特異的結合の形態である。タンパク質もまた、例えば、T A L E NもしくはC R I S P R / C a s 9系において、またはG a l 4モチーフによりD N Aに特異的に結合し得る。対立遺伝子の遺伝子移入は、テンプレートガイド型プロセスを用いて内因性対立遺伝子を上回って外因性対立遺伝子をコピーするプロセスを指す。内因性対立遺伝子は実際に切り出され、一部の状況において外因性核酸対立遺伝子により置換され得るが、現行の理論では同プロセスはコピー機構であるということである。対立遺伝子は遺伝子対であるため、それらの間には有意な相同性が存在する。対立遺伝子は、タンパク質をコードする遺伝子であり得るか、あるいはそれは他の機能、例えば生物活性R N A鎖をコードすることまたは調節タンパク質もしくはR N Aを受容するための部位を提供することを有し得る。

【0060】

HDR 鑄型は、遺伝子移入されている対立遺伝子を含む核酸である。鑄型は、d s DNA または一本鎖DNA (ssDNA) であり得る。ssDNA 鑄型は、好ましくは約20 ~ 約5000残基であるが、他の長さを用いることができる。当業者は、明示範囲内のすべての範囲および値、例えば500 ~ 1500残基、20 ~ 100残基などが企図されることを直ちに理解するであろう。鑄型は、内因性対立遺伝子に隣接したDNAまたは置換されるべきDNAとの相同性を提供するフランキング配列をさらに含み得る。鑄型はまた、標的化ヌクレアーゼ系に結合される配列を含み得、したがって、その系のDNA結合メンバーについての同族結合部位である。同族という用語は、典型的には、相互作用する2つの生体分子、例えば受容体およびそのリガンドを指す。HDRプロセスに関して、生体分子の一方は目的の、すなわち、同族DNA部位またはタンパク質部位と結合する配列を用いて設計され得る。

10

【0061】

標的化エンドヌクレアーゼ系

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) および亜鉛フィンガーヌクレアーゼ (ZFN) などのゲノム編集ツールは、バイオテクノロジー、遺伝子療法および多くの生物における機能的ゲノム研究の分野に影響を及ぼしている。ごく最近、RNAガイド型エンドヌクレアーゼ (RGEN) が、相補的RNA分子によりその標的部位に誘導される。Cas9 / CRISPR系は、REGENである。tracrRNAは、別のそのようなツールである。これらは、標的化ヌクレアーゼ系の例であり：これらの系は、ヌクレアーゼを標的部位に局在化させるDNA結合メンバーを有する。次に、同部位はヌクレアーゼによって切断される。TALENおよびZFNは、DNA結合メンバーに融合されたヌクレアーゼを有する。Cas9 / CRISPRは同族であり、標的DNA上で互いに遭遇する。DNA結合メンバーは、染色体DNA中に同族配列を有する。DNA結合メンバーは、典型的には、目的部位においても、その近傍においても核酸分解作用が生じないように意図される同族配列に照らして設計される。ある実施形態は、全てのかかる系、例として限定されないが、ヌクレアーゼ再切断を最小化する実施形態、目的残基において正確にSNPを作製するための実施形態、およびDNA結合部位において遺伝子移入されつつある対立遺伝子の配置に適用可能である。

20

【0062】

TALEN

TALENという用語は、本明細書で用いられるとき、広義であり、別のTALENからの支援なしで二本鎖DNAを切断し得る単量体TALENを含む。TALENという用語はまた、同一部位においてDNAを切断するために一緒に機能するように遺伝子操作されたTALENのペアの一方または両方のメンバーを指すために用いられる。一緒に機能するTALENは、DNAまたはTALENペアの掌性を参照する左側TALENおよび右側TALENと称される場合がある。

30

【0063】

各々のDNA結合リピートが標的DNA配列中の1つの塩基対の認識を担うTALについての暗号が報告されている（PCT公開の国際公開第2011/072246号パンフレット）。残基は、DNA配列を標的化するようにアセンブルされ得る。手短に述べると、TALENの結合のための標的部位が決定され、ヌクレアーゼおよび標的部位を認識する一連のRVDを含む融合分子が作出される。結合時、ヌクレアーゼがDNAを切断し、その結果、切断末端における遺伝子改変を行うように細胞修復機構が作動し得る。TALENという用語は、転写活性化因子様 (TAL) エフェクター結合ドメインおよびヌクレアーゼドメインを含むタンパク質を意味し、本質的に機能的な単量体TALENおよび別の単量体TALENとの二量体化を要求する他のものを含む。二量体化は、両方の単量体TALENが同一である場合にはホモ二量体TALENを生じ得るか、または単量体TALENが異なる場合にはヘテロ二量体TALENを生じ得る。TALENは、2つの主要な真核DNA修復経路、非相同末端結合 (NHEJ) および相同組換え修復により不死化

40

50

ヒト細胞における遺伝子改変を誘導することが示されている。TALENは、ペアで用いられることが多いが、単量体TALENも公知である。TALEN（および他の遺伝子ツール）による処理のための細胞として、培養細胞、不死化細胞、初代細胞、初代体細胞、接合子、生殖細胞、始原生殖細胞、胚盤胞、または幹細胞が挙げられる。一部の実施形態では、TALENエフェクターは、他のタンパク質ドメイン（例えば非ヌクレアーゼタンパク質ドメイン）を特異的ヌクレオチド配列に標的化するために用いることができる。例えば、TALENエフェクターは、限定されないが、DNA20相互作用酵素（例えば、メチラーゼ、トポイソメラーゼ、インテグラーゼ、トランスポゼース、またはリガーゼ）、転写活性化因子もしくはリプレッサー、またはヒストンなどの他のタンパク質と相互作用し、またはそれを改変するタンパク質からのタンパク質ドメインに連結され得る。かかるTALENエフェクター融合物の適用として、例えば、エピジェネティック調節エレメントの作出または改変、DNA中の部位特異的挿入、欠失、または修復の作製、遺伝子発現の制御、およびクロマチン構造の改変が挙げられる。

【0064】

ヌクレアーゼという用語は、エキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼを含む。エンドヌクレアーゼという用語は、DNAまたはRNA分子、好ましくはDNA分子内の核酸間の結合の加水分解（切断）を触媒し得る任意の野生型または変異体酵素を指す。エンドヌクレアーゼの非限定例として、FokI、HhaI、HindIII、NotI、BbvCI、EcoRI、BglII、およびAlwIなどのII型制限エンドヌクレアーゼが挙げられる。エンドヌクレアーゼはまた、典型的には約12～45塩基対（bp）長、より好ましくは14～45bp長のポリヌクレオチド認識部位を有する場合でのレアカットエンドヌクレアーゼを含む。レアカットエンドヌクレアーゼは、規定の遺伝子座におけるDNA二本鎖分解（DSB）を誘導する。レアカットエンドヌクレアーゼは、例えば、標的化エンドヌクレアーゼ、遺伝子操作された亜鉛フィンガードメインとFokIなどの制限酵素または化学エンドヌクレアーゼの触媒ドメインとの融合物から得られるキメラ亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）であり得る。化学エンドヌクレアーゼでは、化学またはペプチド性切断因子は、核酸のポリマーまたは特異的標的配列を認識する別のDNAのいずれかにコンジュゲートされ、それにより切断活性を特異的配列に標的化する。化学エンドヌクレアーゼはまた、特異的DNA配列に結合することが公知のオルトフェナントロリン、DNA切断分子、および三重鎖形成オリゴヌクレオチド（TFO）の合成ヌクレアーゼ様コンジュゲートを包含する。かかる化学エンドヌクレアーゼは、本発明による用語「エンドヌクレアーゼ」に含まれる。かかるエンドヌクレアーゼの例として、I-SceI、I-ChuLI-CreI、I-CsmI、PI-SeeLPI-TtilPI-MtulI、I-CeuI、I-SeeIL1-SeeIII、HO、PI-CivI、PI-CtrLPI-AaeI、PI-BsuI、PI-DhaI、PI-DralPI-MavLPI-MehI、PI-MfulPI-MflI、PI-MgalPI-MgoI、PI-MinLPI-MkalPI-MleI、PI-MmaI、PI-30MsHLPI-MsmI、PI-MthI、PI-MtulI、PI-MxeI、PI-NpuI、PI-PfulPI-Rmai、PI-SpbI、PI-SsplPI-FaelPI-Mjai、PI-PholPI-TagLPI-ThyI、PI-TkoI、PI-TsplI、I-MsoIが挙げられる。

【0065】

TALENまたは他のツールによって作製される遺伝子改変は、例えば、挿入、欠失、外因性核酸断片の挿入、および置換からなるリストから選択してもよい。挿入という用語は、染色体中への文字どおりの挿入または修復のための鋳型としての外因性配列の使用のいずれかを意味するように広義に用いられる。一般に、標的DNA部位が同定され、同部位に特異的に結合することになるTALENペアが作出される。TALENは、例えば、タンパク質、mRNAとして、またはTALENをコードするベクターにより、細胞または胚に送達される。TALENは、DNAを切断して二本鎖分解を作製し、次いでそれを修復し、多くの場合にインデルの作出がもたらされ、または染色体中に挿入され、もしく

10

20

30

40

50

は改変配列による分解の修復のための鋳型として機能する、同伴する外因性核酸中に含有される配列もしくは多型が取り込まれる。この鋳型に駆動される修復は、染色体を変化させるための有用なプロセスであり、細胞染色体に対して効率的な変化をもたらす。

【0066】

外因性核酸という用語は、細胞または胚に付加される核酸を意味し、核酸が天然に細胞内に存在する核酸配列と同じかまたは異なるかとは無関係である。核酸断片という用語は広義であり、染色体、発現カセット、遺伝子、DNA、RNA、mRNA、またはそれらの一部を含む。細胞または胚は、例えば、非ヒト脊椎動物、非ヒト靈長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ニワトリ、トリ、ウサギ、ヤギ、イヌ、ネコ、実験動物、および魚類からなる群から選択してもよい。

10

【0067】

一部の実施形態は、TALENペアを家畜および/または偶蹄目細胞または胚中に導入し、TALENペアにより特異的に結合される部位における細胞または胚のDNAの遺伝子改変を行い、細胞から家畜動物/偶蹄目を生産することを含む、遺伝子改変家畜動物および/または偶蹄目を作製する組成物または方法を含む。例えば、接合子、線維芽細胞、または胚への直接注射を、細胞または胚に対して用いてもよい。あるいは、TALENおよび/または他の要素は、タンパク質、RNA、mRNA、DNA、またはベクターを導入するための多数の公知の技術のいずれかを用いて細胞に導入してもよい。遺伝子改変動物は、公知の方法、例えば妊娠宿主への胚の移植、または様々なクローン化法に従い、胚または細胞から作製してもよい。「TALENにより特異的に結合される部位での細胞のDNAに対する遺伝子改変」などの語句は、TALENがその標的部位に特異的に結合されるとき、TALEN上のヌクレアーゼにより切断される部位で遺伝子改変が行われることを意味する。ヌクレアーゼは、TALENペアが結合する場所を正確に切断するのではなく、2つの結合部位間の規定部位にて切断する。

20

【0068】

一部の実施形態は、動物のクローン化に用いられる細胞の組成物または処理を含む。細胞は、家畜および/または偶蹄目細胞、培養細胞、初代細胞、初代体細胞、接合子、生殖細胞、始原生殖細胞、または幹細胞であってもよい。例えば、実施形態は、培養下の複数の初代細胞をTALENタンパク質または1つもしくは複数のTALENをコードする核酸に曝露することを含む、遺伝子改変を作出する組成物または方法である。TALENは、mRNAまたはベクター内のDNA配列によりコードされるタンパク質として、または核酸断片として導入してもよい。

30

【0069】

亜鉛フィンガーヌクレアーゼ

亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)は、亜鉛フィンガー-DNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合させることにより生成される人工的制限酵素である。亜鉛フィンガードメインは、所望のDNA配列を標的化するように遺伝子操作することができ、これにより、亜鉛フィンガーヌクレアーゼが複合体ゲノム内のユニーク配列を標的化することが可能となる。内因性DNA修復機構を利用することにより、これらの試薬は、高等生物のゲノムを改変するために用いることができる。ZFNは、遺伝子を不活性化させる方法において用いてもよい。

40

【0070】

亜鉛フィンガー-DNA結合ドメインは、約30アミノ酸を有し、安定的構造にフォールドする。各フィンガーは主に、DNA基質内のトリプレットに結合する。キー位置でのアミノ酸残基は、DNA部位との配列特異的相互作用の大部分に寄与する。これらのアミノ酸は、必要な構造を保つために残存アミノ酸を維持しながら変化し得る。長い方のDNA配列への結合は、幾つかのドメインをタンデムに連結することにより達成される。非特異的Fok I切断ドメイン(N)、転写活性化因子ドメイン(A)、転写リプレッサーードメイン(R)およびメチラーゼ(M)のような他の機能性は、ZFPに融合されることで、各々のZFN、亜鉛フィンガー転写活性化因子(ZFA)、亜鉛フィンガー転写抑制因子

50

(Z F R 、および亜鉛フィンガーメチラーゼ (Z F M) が形成され得る。遺伝子改変動物の作製のために亜鉛フィンガーおよび亜鉛フィンガーヌクレアーゼを用いるための材料および方法は、例えば、米国特許第 8,106,255 号明細書、米国特許出願公開第 2012/0192298 号明細書、米国特許出願公開第 2011/0023159 号明細書、および米国特許出願公開第 2011/0281306 号明細書に開示されている。

【 0071 】

ベクターおよび核酸

種々の核酸は、ノックアウト目的のため、遺伝子の不活性化のため、遺伝子の発現を得るために、または他の目的のため、細胞に導入してもよい。本明細書で用いられるとき、核酸という用語は、DNA、RNA、および核酸アナログ、および二本鎖または一本鎖（すなわちセンスまたはアンチセンス一本鎖）である核酸を含む。核酸アナログは、例えば、核酸の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解度を改善するため、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格において改変され得る。デオキシリボースリン酸骨格は、各々の塩基部分が六員のモルホリノ環に連結しているモルホリノ核酸、またはデオキシリリン酸骨格がシュードペプチド骨格により置換され、かつ 4 つの塩基が保持されたペプチド核酸を生産するように改変され得る。

【 0072 】

標的核酸配列は、プロモーターなどの調節領域に作動可能に連結され得る。調節領域は、ブタ調節領域であり得るかまたは他種由来であり得る。本明細書で用いられるとき、作動可能に連結させると、標的核酸の転写を可能にするかまたは容易にするような方法で核酸配列に対する調節領域を位置づけることを指す。

【 0073 】

一般に、あるタイプのプロモーターは、標的核酸配列に作動可能に連結可能である。プロモーターの例として、限定はされないが、組織特異的プロモーター、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、および特定の刺激に応答性または不応答性のプロモーターが挙げられる。一部の実施形態では、顕著な組織または時間的特異性を伴わずに核酸分子の発現を容易にするプロモーターを用いてもよい（すなわち構成的プロモーター）。例えば、ニワトリ - アクチン遺伝子プロモーターなどの - アクチンプロモーター、ユビキチンプロモーター、ミニ CAG プロモーター、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーター、または 3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーターを用いることができるとともに、単純ヘルペスウイルスミジンキナーゼ (HSV - TK) プロモーター、SV40 プロモーター、またはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターなどのウイルスプロモーターを用いることができる。一部の実施形態では、ニワトリ アクチン遺伝子プロモーターと CMV エンハンサーとの融合物がプロモーターとして用いられる。例えば、Xu et al. , Hum. Gene Ther. 12 : 563, 2001 ; および Kiwaki et al. , Hum. Gene Ther. 7 : 821, 1996 を参照のこと。

【 0074 】

核酸構築物において有用であり得る追加的な調節領域として、限定はされないが、ポリアデニル化配列、翻訳調節配列（例えば、内部リボソーム進入セグメント、IRES）、エンハンサー、誘導性エレメント、またはイントロンが挙げられる。かかる調節領域は、必須でない場合があるが、それらは mRNA の転写、安定性、翻訳効率などに影響することにより発現を増大させ得る。かかる調節領域は、1 つもしくは複数の細胞内での核酸の最適な発現を得ることが望まれる核酸構築物中に含めることができる。しかし、十分な発現は、時としてかかる追加的な要素がなくても得られ得る。

【 0075 】

シグナルペプチドまたは選択可能な発現マーカーをコードする核酸構築物を用いてもよい。シグナルペプチドは、コードポリペプチドが特定の細胞位置（例えば細胞表面）に特異的であるように用いることができる。選択可能なマーカーの非限定例として、ピューロマイシン、ガンシクロビル、アデノシンデアミナーゼ (ADA) 、アミノグリコシドホス

ホトランスフェラーゼ (neo、G 4 1 8、APH)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DH FR)、ハイグロマイシン - B - ホスフランスフェラーゼ、チミジンキナーゼ (TK)、およびキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (X G P R T) が挙げられる。かかるマーカーは、培養下の安定的な形質転換体を選択するのに有用である。他の選択マーカーとして、蛍光ポリペプチド、例えば、緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質が挙げられる。

【0076】

一部の実施形態では、選択可能なマーカーをコードする配列は、例えばCreもしくはF1pなどのリコンビナーゼについての認識配列により隣接され得る。例えば、選択可能なマーカーは、選択可能なマーカーを構築物から切り出すことができるよう¹⁰にloxP認識部位 (Creリコンビナーゼにより認識される34bp認識部位) またはFRT認識部位により隣接され得る。Cre/loxP技術の概説については、Orban, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 6861, 1992、およびBrand and Dymecski, Dev. Cell, 6: 7, 2004を参照のこと。選択可能なマーカー遺伝子により中断されるCreもしくはF1pを活性化可能な導入遺伝子を含有するトランスポゾンもまた、導入遺伝子の条件的発現を有するトランスジェニック動物を得るために用いることができる。例えば、マーカー/導入遺伝子の発現を駆動するプロモーターは、偏在的または組織特異的のいずれかであり得、その場合、F0動物(例えばブタ)におけるマーカーの偏在的または組織特異的発現をもたらすことになる。導入遺伝子の組織特異的な活性化は、例えば、マーカーに中断された導入遺伝子を偏在的発現するブタと、CreもしくはF1pを組織特異的方法で発現するブタとを掛け合わせることにより、またはマーカーに中断された導入遺伝子を組織特異的方法で発現するブタと、CreもしくはF1pリコンビナーゼを偏在的に発現するブタとを掛け合わせることにより達成され得る。導入遺伝子の発現の制御またはマーカーの切り出しの制御により、導入遺伝子の発現が可能となる。

【0077】

一部の実施形態では、外因性核酸は、ポリペプチドをコードする。ポリペプチドをコードする核酸配列は、後続するコードポリペプチドの操作を容易にするため(例えば、局在化または検出を容易にするため)に設計された「タグ」をコードするタグ配列を含み得る。タグ配列は、コードされるタグがポリペプチドのカルボキシもしくはアミノ末端のいずれか位置するようにポリペプチドをコードする核酸配列内に挿入され得る。コードされるタグの非限定例として、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) およびFLAG(商標)タグ (Kodak, New Haven, CT) が挙げられる。

【0078】

核酸構築物は、任意のタイプの胚、胎児または生体偶蹄目/家畜細胞、例えば、卵母細胞または卵などの生殖細胞、前駆細胞、成体または胚性幹細胞、始原生殖細胞、PK-15細胞などの腎細胞、島細胞、細胞、肝細胞、または皮膚線維芽細胞などの線維芽細胞などに種々の技術を用いて導入され得る。技法の非限定例として、トランスポゾン系、細胞に感染し得る組換えウイルス、もしくはリポソームまたは核酸を細胞に送達し得る、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、もしくはリン酸カルシウム沈殿などの他の非ウイルス的方法の使用が挙げられる。

【0079】

トランスポゾン系では、核酸構築物の転写単位、すなわち外因性核酸配列に作動可能に連結される調節領域は、トランスポゾンの反転リピートにより隣接される。幾つかのトランスポゾン系、例として、例えば、Sleeping Beauty(米国特許第6,613,752号明細書および米国特許出願公開第2005/0003542号明細書を参照)；Frog Prince(Miskey et al., Nucleic Acids Res., 31: 6873, 2003)；Tol2(Kawakami, Genome Biology, 8(Suppl. 1): S7, 2007；Minos(Pavlopoulos et al., Genome Biology, 8(Suppl. 1)

10

20

30

40

50

: S 2 , 2 0 0 7) ; H s m a r 1 (M i s k e y e t a l . , M o l C e l l B i o l . , 2 7 : 4 5 8 9 , 2 0 0 7) ; および P a s s p o r t などが、核酸をマウス、ヒト、およびブタ細胞を含む細胞に導入するために開発されている。 S l e e p i n g B e a u t y トランスポゾンが特に有用である。トランスポゼースは、外因性核酸と同じ核酸構築物上でコードされるタンパク質として送達され得るか、別個の核酸構築物上で導入され得るか、または m R N A (例えは、インビトロ転写およびキャップ化 m R N A) として提供され得る。

【 0 0 8 0 】

核酸は、ベクター中に取り込むことができる。ベクターは、担体から標的 D N A 中に移動するように設計された任意の特定の D N A セグメントを含む広義語である。ベクターは、発現ベクター、またはゲノムもしくは他の標的化 D N A 配列、例えは、エピソーム、プラスミド、もしくはさらにはウイルス / ファージ D N A セグメントへの D N A 挿入を生じさせるために必要とされる構成要素のセットであるベクター系と称してもよい。動物における遺伝子送達用に用いられるベクター系、例えは、ウイルスベクター (例えは、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスおよび統合ファージウイルス) 、および非ウイルスベクター (例えは、トランスポゾン) は、2 つの基本構成要素、すなわち、1) D N A (または c D N A に逆転写される R N A) からなるベクターと、2) トランスポゼース、リコンビナーゼ、またはベクターおよび D N A 標的配列の双方を認識し、ベクターを標的 D N A 配列に挿入する他のインテグラー酵素とを有する。ベクターは、1 つ以上の発現調節配列を含む 1 つ以上の発現カセットを有することが最も多く、発現調節配列は、それぞれ別の D N A 配列または m R N A の転写および / または翻訳を調節および制御する D N A 配列である。

10

20

30

40

【 0 0 8 1 】

多くの異なるタイプのベクターが公知である。例えは、プラスミドおよびウイルスベクター、例えはレトロウイルスベクターが公知である。哺乳動物発現プラスミドは、典型的には、複製起点、好適なプロモーターおよび任意選択的なエンハンサーとともに、任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列、ならびに 5 ' フランкиング非転写配列を有する。ベクターの例として、プラスミド (別のタイプのベクターの担体でもあり得る) 、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (A A V) 、レンチウイルス (例えは、改変 H I V - 1 、 S I V または F I V) 、レトロウイルス (例えは、 A S V 、 A L V または M o M L V) 、およびトランスポゾン (例えは、 S l e e p i n g B e a u t y 、 P エレメント、 T o l - 2 、 F r o g P r i n c e 、 p i g g y B a c) が挙げられる。

【 0 0 8 2 】

本明細書で用いられるとき、核酸という用語は、 R N A および D N A の双方を指し、例えは、 c D N A 、ゲノム D N A 、合成 (例えは化学合成) D N A 、ならびに天然および化学修飾核酸、例えは合成塩基または他の骨格を含む。核酸分子は、二本鎖または一本鎖 (すなわちセンスまたはアンチセンスの一本鎖) であり得る。トランスジェニックという用語は、本明細書で広義に用いられ、遺伝子材料が遺伝子操作技術を用いて改変されている遺伝子組換え生物または遺伝子操作生物を指す。それ故、ノックアウト偶蹄目は、外因性遺伝子または核酸が動物またはその子孫において発現されるか否かに無関係にトランスジェニックである。

【 0 0 8 3 】

遺伝子改変動物

動物は、 T A L E N または他の遺伝子操作ツール、例として、リコンビナーゼ融合タンパク質、または公知の種々のベクターを用いて改変してもよい。かかるツールによって行われる遺伝子改変は、遺伝子の破壊を含んでもよい。遺伝子の破壊という用語は、機能的遺伝子産物の形成を阻止することを指す。遺伝子産物は、その正常な (野生型) 機能を実行する場合に限り機能的である。遺伝子の破壊は、遺伝子によりコードされる機能的因子の発現を阻止し、遺伝子によりコードされる配列ならびに / または動物における遺伝子の

50

発現に必要なプロモーターおよび／もしくはオペレーターの中での1つ以上の塩基の挿入、欠失、または置換を含む。破壊される遺伝子は、例えば、動物のゲノムからの遺伝子の少なくとも一部の除去、遺伝子によりコードされる機能的因子の発現を阻止するための遺伝子の改変、干渉RNA、または外因性遺伝子によるドミナントネガティブ因子の発現により破壊してもよい。遺伝子改変動物の材料および方法は、全ての目的のために参照により本明細書中に援用される、米国特許第8,518,701号明細書；米国特許出願公開第2010/0251395号明細書；および米国特許出願公開第2012/0222143号明細書にさらに詳述されており、矛盾する場合、本明細書が優先する。トランス作用性という用語は、異なる分子からの標的遺伝子に対して（すなわち分子間で）作用するプロセスを指す。トランス作用因子は通常、遺伝子を有するDNA配列である。この遺伝子は、標的遺伝子の調節において用いられるタンパク質（またはマイクロRNAもしくは他の拡散性分子）をコードする。トランス作用性遺伝子は、標的遺伝子と同じ染色体上に存在し得るが、活性は、中間タンパク質またはそれがコードするRNAを介するものである。トランス作用性遺伝子の実施形態は、例えば標的化エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子である。ドミナントネガティブを用いた遺伝子の不活性化は、一般にトランス作用因子を含む。シス調節性またはシス作用性という用語は、タンパク質もRNAもコードしない場合の作用を意味する一方、遺伝子不活性化との関連では、これは一般に、遺伝子のコード部分、または機能的遺伝子の発現に必要なプロモーターおよび／もしくはオペレーターの不活性化を意味する。

10

20

30

40

50

【0084】

ノックアウト動物を作製するのに遺伝子を不活性化するため、および／またはファウンダー動物を作製するのに核酸構築物を動物に導入するため、ノックアウトまたは核酸構築物がゲノム中に組み込まれている動物系列を作製するため、当該技術分野で公知の様々な技術を用いることができる。かかる技術として、限定はされないが、前核マイクロインジェクション（米国特許第4,873,191号明細書）、生殖系列へのレトロウイルス媒介遺伝子導入（Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6148-1652, 1985）、胚性幹細胞への遺伝子標的化（Thompson et al., Cell, 56:313-321, 1989）、胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol., 3:1803-1814, 1983）、精子媒介遺伝子導入（Lavitrano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:14230-14235, 2002; Lavitrano et al., Reprod. Fertil. Develop., 18:19-23, 2006）、および体細胞、例えば卵丘もしくは乳腺細胞、または生体、胎児、もしくは胚性幹細胞のインビトロ形質転換とそれに続く核移植（Wilmut et al., Nature, 385:810-813, 1997；およびWakayama et al., Nature, 394:369-374, 1998）が挙げられる。前核マイクロインジェクション、精子媒介遺伝子導入、および体細胞核移植が特に有用な技術である。ゲノム改変されている動物は、その生殖系列細胞を含むその細胞のすべてが遺伝子改変を有する動物である。遺伝子改変がモザイクである動物を作製する方法が用いられる場合、動物を同系交配してもよく、ゲノム改変されている子孫を選択してもよい。例えば、モザイク動物を作製する上で、その細胞が胚盤胞状態で改変される場合、クローニングを用いてもよく、または単一細胞が改変される場合、ゲノム改変が生じ得る。性的に成熟しないように改変されている動物は、用いられる特定の手法に応じて改変についてホモ接合性またはヘテロ接合性であり得る。特異的遺伝子がノックアウト改変により不活性化される場合、ホモ接合性が通常要求される。特異的遺伝子がRNA干渉またはドミナントネガティブ法により不活性化される場合、ヘテロ接合性が適切であることが多い。

【0085】

典型的には、前核マイクロインジェクションでは、核酸構築物が受精卵に導入され、精子頭部および卵に由来する遺伝子材料を有する前核が原形質内で可視的であるため、1または2つの細胞受精卵が用いられる。前核段階の受精卵は、インビトロまたはインビボ（

すなわち、ドナー動物の卵管から外科的に回収される)で得ることができる。体外受精卵は、以下のとおり作製され得る。例えば、ブタ卵巣は、食肉処理場において回収され、輸送の間22~28で維持され得る。卵巣が洗浄され、卵胞吸引のために単離され得、4~8mmに及ぶ卵胞が、50mLのコニカル遠心管中に18ゲージ針を用いて真空下で吸引され得る。卵胞液および吸引された卵母細胞は、市販のTL-HEPES(Minitube, Verona, WI)によりプレフィルターに通してリンスされ得る。コンパクトな卵丘塊により包囲される卵母細胞を選択し、0.1mg/mLのシスティン、10ng/mLの上皮成長因子、10%のブタ卵胞液、50μMの2-メルカプトエタノール、0.5mg/mLのcAMP、10IU/mLずつの妊馬血清ゴナドトロピン(PMSG)およびヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を添加したTCM-199卵母細胞成熟培地(Minitube, Verona, WI)中に加湿空気下で38.7および5%のCO₂において約22時間配置することができる。続いて、卵母細胞は、cAMPも、mPMSGも、hCGをも含有しない新たなTCM-199成熟培地に移され、さらに22時間インキュベートされ得る。成熟卵母細胞は、それらの卵丘細胞から、0.1%のヒアルロニダーゼ中の1分間のボルテックス処理により剥がされ得る。

【0086】

ブタにおいては、成熟卵母細胞を、Minitube製5ウェル受精用ディッシュ内、500μlのMinitube PORC PRO IVF MEDIUM SYSTEM(Minitube, Verona, WI)で受精させることができる。体外受精(IVF)の準備では、新たに採取したまたは凍結した成熟雄精液を洗浄し、PORC PRO IVF Medium中に4×10⁵個の精子になるよう再懸濁することができる。精子濃度は、コンピューター支援精液分析(SPERMVISION, Minitube, Verona, WI)により分析することができる。最終的な体外授精は、成熟雄に応じて約40運動精子/卵母細胞の最終濃度にて、10μlの量で実施することができる。すべての授精卵母細胞を38.7、5.0%CO₂雰囲気で6時間インキュベートする。授精から6時間後、推定される接合体をNC SU-23で2回洗浄し、0.5mLの同じ培地に移すことができる。この系では通常、大部分の成熟雄において20~30%胚盤胞を作製することができ、多精受精率は10~30%である。

【0087】

線状核酸構築物は、前核の1つに注射され得る。次に、注射された卵を、レシピエント雌に(たとえば、レシピエント雌の卵管に)導入し、レシピエント雌での発生を可能にすることで、トランスジェニック動物を作製することができる。特に、インビトロ受精胚は、15,000×gで5分間遠心して脂質を沈降させ、前核を可視化することができる。胚は、Eppendorf FEMTOJECT注射器を用いて注射することができ、胚盤胞が形成されるまで培養することができる。胚の卵割および胚盤胞形成の割合ならびに品質は記録され得る。

【0088】

胚は、非同調性レシピエントの子宮に外科的に移植され得る。典型的には、100~200(例えば150~200)個の胚が、5.5インチTOMCAT(登録商標)カテーテルを用いて、卵管の膨大部-峡部接合部に堆積され得る。手術後、妊娠のリアルタイム超音波検査が実施され得る。

【0089】

体細胞核移植では、複合細胞を樹立するため、上記の核酸コンストラクトを含むトランスジェニック偶蹄目細胞(例えば、トランスジェニックブタ細胞またはウシ細胞)、例えば胚割球、胎仔線維芽細胞、成体耳部線維芽細胞、または顆粒膜細胞が、除核卵母細胞に導入され得る。卵母細胞は、極体近傍の透明帯部分切開後、切開領域で細胞質を押し出すことにより除核され得る。典型的には、鋭い斜角先端を有するインジェクションピペットを用いて、トランスジェニック細胞が第2減数分裂時に停止した除核卵母細胞に注射される。慣習として、第2減数分裂時に停止した卵母細胞は「卵」と称される。ブタまたはウシ胚の作製後(例えば卵母細胞の融合および活性化により)、活性化から約20~24時

10

20

30

40

50

間後、胚はレシピエント雌の輸卵管に移植される。例えば、Cibelli et al. , Science 280, 1256-1258, 1998 および米国特許第6,548,741号明細書を参照のこと。ブタにおいては、胚の移植から約20~21日後にレシピエント雌における妊娠を確認することができる。

【0090】

標準的な繁殖技術は、初期のヘテロ接合型ファウンダー動物から外因性核酸のホモ接合体である動物を作製するため、用いることができる。しかし、ホモ接合型が必要とされない場合がある。本明細書に記載のトランスジェニックブタは、他の目的のブタと交配され得る。

【0091】

一部の実施形態では、目的の核酸および選択可能なマーカーは、別々のトランスポゾン上に提供され、選択可能なマーカーを有するトランスポゾンの量が目的の核酸を有するトランスポゾンを大きく上回る(5~10倍過剰)同等でない量で胚または細胞のいずれかに提供され得る。目的の核酸を発現するトランスジェニック細胞または動物は、選択可能なマーカーの存在および発現に基づいて単離され得る。トランスポゾンが正確かつ非連鎖的(独立した転位事象)にゲノムに組み込まれるため、目的の核酸および選択可能なマーカーは遺伝的に連鎖しておらず、標準的な繁殖を介した遺伝的分離により容易に分離され得る。したがって、その後の世代において選択可能なマーカーを保持すること(公共の安全の立場からある程度懸念される課題)に制約されないトランスジェニック動物が作製され得る。

10

20

【0092】

一旦トランスジェニック動物が作製されると、外因性核酸の発現は、標準的な技術を用いてアッセイされ得る。最初のスクリーニングは、構築物の組込みが行われているか否かを判定するためのサザンプロット分析により、達成され得る。サザン分析の説明については、Sambrook et al. , 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press, Plainview; NYのセクション9.37-9.52を参照のこと。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術もまた、初期スクリーニングで用いることができる。PCRとは、標的核酸を増幅する手順または技術を指す。一般に、目的の領域またはそれを超える領域の末端の配列情報が、増幅されるべき鑄型の逆鎖と配列が同一または類似するオリゴヌクレオチドプライマーを設計するのに利用される。PCRは、全ゲノムDNAまたは全細胞RNAに由来する配列を含むDNAおよびRNAの特定の配列を増幅するため、用いることができる。プライマーは典型的には、14~40ヌクレオチド長であるが、10ヌクレオチド長から数百ヌクレオチド長の範囲であり得る。PCRは、例えば、PCR Primer: A Laboratory Manual編, Diefenbach and Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995に記載されている。核酸はまた、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、自己保持配列複製、または核酸配列に基づく増幅により増幅され得る。たとえば、Lewis, Genetic Engineering News 12:1, 1992; Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874, 1990; およびWeiss, Science, 254:1292, 1991を参照すること。胚は、胚盤胞期に、PCR、サザンハイブリダイゼーション、およびsplinkerette PCRによる分析用に個別に処理され得る(例えば、Dupuy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:4495, 2002を参照)。

30

40

【0093】

トランスジェニックブタの組織内でのポリペプチドをコードする核酸配列の発現は、例えば、動物から得られる組織試料のノーザンプロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション分析、ウエスタン分析、酵素結合免疫吸着アッセイなどの免疫測定、および逆転写酵素PCR(RT-PCR)を含む技術を用いて評価され得る。

50

【0094】

干渉RNA

種々の干渉RNA (RNAi) は公知である。二本鎖RNA (dsRNA) は、相同遺伝子転写物の配列特異的分解を誘導する。RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) は、dsRNAを低分子の21~23ヌクレオチドの低分子干渉RNA (siRNA) に代謝する。RISCは、二本鎖リボヌクレアーゼ (dsRNase、例えばダイサー) およびssRNase (例えば、Argonaut 2またはAgo 2) を有する。RISCは、切斷可能な標的を見出すためのガイドとしてアンチセンス鎖を利用する。siRNAおよびマイクロRNA (miRNA) の双方は公知である。遺伝子改変動物における遺伝子を破壊する方法は、標的遺伝子および/または核酸の発現が低減するように、標的遺伝子および/または核酸に対するRNA干渉を誘導することを含む。

【0095】

例えば、外因性核酸配列は、ポリペプチドをコードする核酸に対するRNA干渉を誘導し得る。例えば、標的DNAと相同な二本鎖低分子干渉RNA (siRNA) または低分子ヘアピンRNA (shRNA) は、そのDNAの発現を低下させるため、用いることができる。siRNAにおける構築物は、例えば、Fire et al., *Nature*, 391: 806, 1998; Romano and Masino, *Mol. Microbiol.*, 6: 3343, 1992; Cogoni et al., *EMBO J.*, 15: 3153, 1996; Cogoni and Masino, *Nature*, 399: 166, 1999; Misquitta and Paterson *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 1451, 1999; およびKennerdell and Carthew, *Cell*, 95: 1017, 1998に記載の通りに作製され得る。shRNAにおける構築物は、McIntyre and Fanning (2006) *BMC Biotechnology*, 6: 1によって記載の通りに作製され得る。一般に、shRNAは、アニールし、短鎖ヘアピンを形成し得る相補的領域を有する一本鎖RNA分子として転写される。

【0096】

特異的遺伝子に特異的な単一の個別の機能的siRNAまたはmiRNAを見出す確率は高い。siRNAの特異的配列の予測可能性は、例えば約50%であるが、多数の干渉RNAが、それらの少なくとも1つが効率的な良好な信頼性で作製可能である。

【0097】

実施形態は、遺伝子、例えば発生段階において選択的な遺伝子に対して特異的なRNAiを発現する、インビトロ細胞、インビオ細胞、および家畜動物などの遺伝子改変動物を含む。RNAiは、例えば、siRNA、shRNA、dsRNA、RISCおよびmiRNAからなる群から選択してもよい。

【0098】

誘導性系

誘導性系は、遺伝子の発現を制御するため、用いてもよい。遺伝子の発現の時空間的調節を可能とする様々な誘導性系が公知である。幾つかは、トランスジェニック動物においてインビオで機能的であることが判明している。誘導性系という用語は、慣習的なプロモーターおよび誘導性遺伝子発現因子を含む。

【0099】

誘導性系の一例は、核酸の転写を制御するために用いることができるテトラサイクリン (tetr) - onプロモーター系である。この系では、突然変異Tetリプレッサー (TetR) が単純ヘルペスウイルスVP16トランス活性化因子タンパク質の活性化ドメインに融合されることで、テトラサイクリン制御性転写活性化因子 (tTA) を作出し、これはtetrまたはドキシサイクリン (dox) により制御される。抗生物質の不在下では転写が最小限である一方、tetrまたはdoxの存在下では転写が誘導される。代替的誘導性系としては、エクジソンまたはラバマイシン系が挙げられる。エクジソンは、エクジソン受容体およびウルトラスピラクル遺伝子 (USP) の産物のヘテロ二量体により生

10

20

30

40

50

産が調節される昆虫脱皮ホルモンである。発現は、エクジソンまたはムリステロンAなどのエクジソンの類似体による処理により誘導される。誘導性系を惹起するために動物に投与される薬剤は、誘導剤と称される。

【0100】

より一般的に用いられる誘導性系の中には、テトラサイクリン誘導性系およびCre/loxPリコンビナーゼ系（構成的または誘導性のいずれか）がある。テトラサイクリン誘導性系は、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子（tTA）/逆tTA（rtTA）を含む。これらの系をインビボで用いるための方法は、2系統の遺伝子改変動物を作製することを含む。1つの動物系統は、選択されたプロモーターの制御下で活性化因子（tTA、rtTA、またはCreリコンビナーゼ）を発現する。トランスジェニック動物の別のセットは、目的の遺伝子（または改変すべき遺伝子）の発現がtTA/rtTAトランス活性化因子についての標的配列の制御下にある（またはloxP配列により隣接されている）アクセプターを発現する。2つのマウス株を交配させることにより、遺伝子発現の調節がもたらされる。

10

【0101】

テトラサイクリン依存性調節系（tet系）は、2つの構成要素、すなわちテトラサイクリン制御性トランス活性化因子（tTAまたはrtTA）および下流cDNAの発現を調節するtTA/rtTA依存性プロモーターに、テトラサイクリンに依存する様式で依存する。テトラサイクリンまたはその誘導体（例えばドキシサイクリン）の不在下では、tTAはtetO配列に結合し、tTA依存性プロモーターの転写活性化を可能とする。しかし、ドキシサイクリンの存在下では、tTAはその標的と相互作用し得ず、転写は生じない。tTAを用いるtet系は、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンが転写下方調節を可能とするため、tet-OFFと称される。テトラサイクリンまたはその誘導体の投与により、インビボでの導入遺伝子発現の時間的制御が可能になる。rtTAは、ドキシサイクリンの不在下では機能的でないが、トランス活性化のためにリガンドの存在を必要とするtTAのバリエントである。したがって、このtet系はtet-ONと称される。tet系は、例えば、レポーター遺伝子、癌遺伝子、またはシグナリングカスケードに関するタンパク質、をコードする幾つかの導入遺伝子の誘導性発現のため、インビボで用いられている。

20

【0102】

Cre/loxP系では、2つの区別されるCre認識配列、すなわちloxP部位の間のクロスオーバーによる部位特異的組換えを触媒するCreリコンビナーゼが用いられる。2つのloxP配列の間に導入されたDNA配列（floxed DNAと称される）がCre媒介組換えにより切り出される。空間的制御（組織特異的または細胞特異的プロモーターによる）または時間的制御（誘導性系による）のいずれかを用いるトランスジェニック動物におけるCre発現の制御は、2つのloxP部位間のDNAの切り出しの制御をもたらす。1つの適用は、条件的遺伝子不活性化（条件的ノックアウト）を対象とする。別の手法は、loxPが導入された終止コドンがプロモーター配列および目的のDNAの間に挿入されるタンパク質過剰発現を対象とする。遺伝子改変動物は、Creが発現されてloxPが導入された終止コドンの切り出しがもたらされるまで導入遺伝子を発現しない。この系は、組織特異的腫瘍形成およびBリンパ球におけるアンチジーン受容体発現の制御に適用されている。誘導性Creリコンビナーゼもまた開発されている。誘導性Creリコンビナーゼは、専ら外因性リガンドの投与により活性化される。誘導性Creリコンビナーゼは、元のCreリコンビナーゼおよび特異的リガンド結合ドメインを有する融合タンパク質である。Creリコンビナーゼの機能的活性は、融合タンパク質中のこの特異的ドメインに結合し得る外部リガンドに依存的である。

30

40

【0103】

実施形態は、誘導性系の制御下にある遺伝子を含むインビトロ細胞、インビボ細胞、および家畜動物などの遺伝子改変動物を含む。動物の遺伝子改変は、ゲノミックまたはモザイクであってもよい。誘導性系は、例えば、Tet-On、Tet-Off、Cre-1

50

o x 、および H i f 1 からなる群から選択してもよい。実施形態は、本明細書に記載の遺伝子である。

【 0 1 0 4 】

ドミナントネガティブ

したがって、遺伝子は、除去または R N A i 抑制だけでなく、その遺伝子産物の通常の機能に対して阻害効果を有するタンパク質のドミナントネガティブバリアントの作出 / 発現によっても破壊され得る。ドミナントネガティブ (D N) 遺伝子の発現は、表現型の変更をもたらし得、 a) タイトレーション効果 ; (D N は、同一の活性を構成せずに内因性遺伝子の協調的因子または通常標的のいずれかについて内因性遺伝子産物と受動的に競合する) 、 b) ドミナントネガティブ遺伝子産物が通常の遺伝子機能に要求されるプロセスと能動的に干渉するポイズンピル (またはモンキーレンチ) 効果、 c) D N が遺伝子機能の負の制御因子を能動的に刺激するフィードバック効果により発揮される。

10

【 0 1 0 5 】

ファウンダー動物、動物系統、形質、および生殖

ファウンダー動物 (F 0 世代) は、クローン化および本明細書に記載の他の方法により作製してもよい。ファウンダーは、接合体または初代細胞がホモ接合性の改変を受ける場合のように、遺伝子改変についてホモ接合性であり得る。同様に、ファウンダーはまた、ヘテロ接合性に作製され得る。ファウンダーはゲノム的に改変されていてもよく、このことは、そのゲノムにおける細胞が改変を受けていることを意味する。ファウンダーは、ベクターが典型的には胚盤胞段階で胚における複数の細胞の 1 つに導入される場合に生じ得るよう、改変についてモザイクであり得る。モザイク動物の子孫は、ゲノム的に改変されている子孫を同定するため、試験してもよい。動物系統は、有性生殖させることができ、または生殖補助技術により生殖させることができ、異種またはホモ接合性の子孫が常に改変を発現する動物のプールが作出されている場合、樹立される。

20

【 0 1 0 6 】

家畜では、多数の対立遺伝子が、生産形質、体型形質、作業性形質、および他の機能的形質などの様々な形質に関連づけられることは公知である。当業者は、これらの形質を監視し、定量化することに慣れている、例えば、 V i s s c h e r e t a l . , L i v e s t o c k P r o d u c t i o n S c i e n c e , 4 0 : 1 2 3 - 1 3 7 , 1 9 9 4 、米国特許第 7,709,206 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 0 1 / 0 0 1 6 3 1 5 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 2 3 1 4 0 号明細書、および米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 5 3 3 1 7 号明細書。動物系統は、生産形質、体型形質、作業性形質、受精能形質、母性形質、および疾患耐性形質からなる群の形質から選択される形質を含んでもよい。さらなる形質としては、組換え遺伝子産物の発現が挙げられる。

30

【 0 1 0 7 】

リコンビナーゼ

本発明の実施形態は、標的化ヌクレアーゼ系を、リコンビナーゼ (例えば、 R e c A タンパク質、 R a d 5 1) または D N A 組換えに関連する他の D N A 結合タンパク質とともに投与することを含む。リコンビナーゼは、核酸断片とフィラメントを形成し、事実上、細胞 D N A を探索してその配列と実質的に相同な D N A 配列を見出す。例えば、リコンビナーゼは、 H D R に対する鑄型として機能する核酸配列と複合し得る。次いで、リコンビナーゼは H D R 鑄型と複合してフィラメントを形成し、細胞内に配置される。リコンビナーゼおよび / またはリコンビナーゼと複合する H D R 鑄型は、細胞または胚の中に、タンパク質、 m R N A として、またはリコンビナーゼをコードするベクターを用いて配置され得る。米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 5 9 1 6 0 号明細書 (米国特許出願第 1 2 / 8 6 9 , 2 3 2 号明細書) の開示は、本明細書によりあらゆる目的のために参照により本明細書中に援用され、矛盾する場合、本明細書が優先する。リコンビナーゼという用語は、細胞内で 2 つの比較的長い D N A 鎖間での比較的短い D N A 片の連結を酵素的に触媒する遺伝子組換え酵素を指す。リコンビナーゼとして、 C r e リコンビナーゼ、 H i n リコンビナーゼ、 R e c A 、 R A D 5 1 、 C r e 、および F L P が挙げられる。 C r e リコンビ

40

50

ナーゼは、 $10 \times P$ 部位間の DNA の部位特異的組換えを触媒する P1 バクテリオファージ由来の I 型トポイソメラーゼである。 Hin リコンビナーゼは、サルモネラ (Salmonella) 菌中に見出される 198 アミノ酸から構成される 21 kD のタンパク質である。 Hin は、DNA 切断および組換えの開始を活性部位セリンに依存する DNA インベルターゼのセリンリコンビナーゼファミリーに属する。 RAD51 はヒト遺伝子である。この遺伝子によりコードされるタンパク質は、DNA 二本鎖分解の修復を支援する RAD51 タンパク質ファミリーのメンバーである。 RAD51 ファミリーメンバーは、細菌 RecA および酵母 Rad51 と相同である。 Cre リコンビナーゼは、 $10 \times P$ 部位により隣接される特定の配列を欠失させるための実験において用いられる酵素である。 FLP は、パン酵母の出芽酵母 (Saccharomyces cerevisiae) の 2 μ プラスミドに由来するフリッパーゼ組換え酵素 (FLP または F1p) を指す。

【0108】

本明細書では、「RecA」または「RecA タンパク質」は、同じ機能、特に：(i) その後の DNA ポリメラーゼによる伸長のために、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをその相同な標的に適切に配置する能力；(ii) DNA 合成のために二本鎖核酸を形態的に調製する能力；および(iii) RecA / オリゴヌクレオチドまたは RecA / ポリヌクレオチド複合体が効率的に相補配列を発見して結合する能力、の本質的に全部または大部分を有する RecA 様組換えタンパク質のファミリーを指す。最も特性が明らかにされた RecA タンパク質は大腸菌 (E. coli) に由来し、そのタンパク質の元の対立遺伝子型に加えて、幾つかの突然変異体 RecA 様タンパク質、例えば RecA803 が同定されている。さらに、多数の生物、例えば、酵母、ショウジョウバエ (Drosophila)、ヒトを含む哺乳動物、および植物などは、RecA 様鎖転移タンパク質を有する。これらのタンパク質として、例えば、Rec1、Rec2、Rad51、Rad51B、Rad51C、Rad51D、Rad51E、XRCC2、およびDMC1 が挙げられる。組換えタンパク質の一実施形態は、大腸菌 (E. coli) の RecA タンパク質である。あるいは、RecA タンパク質は、大腸菌 (E. coli) の突然変異体 RecA-803 タンパク質、別の細菌源由来の RecA タンパク質、または別の生物由来の相同組換えタンパク質であり得る。

【0109】

組成物およびキット

本発明はまた、例えば、部位特異的エンドヌクレアーゼ、CRISPR、Cas9、ZNF、TALEN、RecA-gal4 融合物をコードする核酸分子、そのポリペプチドを含有する組成物およびキット、かかる核酸分子もしくはポリペプチド、または遺伝子操作された細胞系を含有する組成物を提供する。示される対立遺伝子の遺伝子移入に対して有効な HDR もまた、提供され得る。かかるアイテムは、例えば研究ツールとして、または治療的に用いることができる。

【実施例】

【0110】

方法は、特に断りがない限り、次の通りである。

【0111】

組織培養および遺伝子導入。

ブタを、10% ウシ胎仔血清、100 I.U. / ml のペニシリンおよびストレプトマイシン、および 2 mM の L-グルタミンを添加した DMEM 中、5% CO₂、37 °C で維持した。遺伝子導入においては、すべての TALEN および HDR 鑄型を、NEON Transfer system (Life Technologies) を用いて遺伝子導入を介して送達した。つまり、100% コンフルエントに達した低継代の Ossabaw、Landrace を 1:2 に分割し、70~80% コンフルエントで翌日採取した。各遺伝子導入物は、TALEN mRNA およびオリゴと混合した緩衝液「R」に再懸濁される 500,000~600,000 個の細胞からなり、次のパラメータ、すなわち入力電位；1800V；パルス幅；20ms；およびパルス数；1 により 100 μ l の作動

10

20

30

40

50

体積をもたらす 100 μ l の先端部を用いて電気穿孔した。典型的には、目的の遺伝子に特異的な 1 ~ 2 μ g の T A L E N m R N A および 1 ~ 4 μ M の H D R 鑄型（一本鎖オリゴヌクレオチド）を各遺伝子導入物に含めた。それらの量からの偏差を図や説明文に表示する。遺伝子導入後、細胞を 6 ウェルディッシュのウェルに 3 日間蒔き、各々 30 で培養した。編集の安定性を評価するため、3 日後、細胞集団をコロニー分析用に蒔いて、かつ/または 37 で少なくとも 10 日目まで展開した。

【0112】

Surveyor 突然変異検出および R F L P 分析

目的部位に隣接する P C R を、製造業者の推奨に従い、1 μ l の細胞ライセートを有する白金 T a q D N A ポリメラーゼ H i F i (L i f e T e c h n o l o g i e s) を用いて行った。集団内での突然変異の頻度を、上記のように 10 μ l の P C R 産物を用いて、製造業者の推奨に従い、S U R V E Y O R 突然変異検出キット (T r a n s g e n o m i c) を用いて分析した。R F L P 分析は、表示の制限酵素を用いて、10 μ l の上記 P C R 反応物に対して実施した。Surveyor および R F L P 反応は、10 % T B E ポリアクリルアミドゲル上で分解し、臭化エチジウム染色により可視化した。バンドのデンシトメトリー測定を、I M A G E J を用いて実施し、また G u s c h i n r a 、 2010 (1) に記載の通りに Surveyor 反応物の突然変異率を算出した。パーセント相同組換え修復 (H D R) を、R F L P 断片の強度和を親バンド + R F L P 断片の強度和で除することによって算出した。コロニーの R F L P 分析は、P C R 産物が 1 × M Y T A Q R E D M I X (B i o l i n e) により増幅され、2.5 % アガロースゲル上で分解されたことを除けば、同様に扱った。

【0113】

希釈クローニング

遺伝子導入後の 3 日目、50 ~ 250 個の細胞を、10 cm のディッシュ上に播種し、個々のコロニーの直径が約 5 mm に達するまで培養した。この時点で、P B S で希釈した 6 ml の T R Y P L E (L i f e T e c h n o l o g i e s) 1 : 5 (v o l / v o l) を添加し、コロニーを吸引し、24 ウェルディッシュウェルのウェルに移し、同じ条件下で培養した。コンフルエントに達したコロニーを採取し、凍結保存および遺伝子型判定のために分割した。

【0114】

試料の調製

3 日目および 10 日目、遺伝子導入した細胞集団を 6 ウェルディッシュのウェルから採取し、10 ~ 30 % を、200 μ g / ml のプロテイナーゼ K を新たに添加した、50 μ l の 1 × P C R に互換性の溶解用緩衝液：10 mM のトリス - C 1 p H 8.0 、 2 mM の E D T A 、 0.45 % T R Y T O N X - 100 (v o l / v o l) 、 0.45 % ツイーン - 20 (v o l / v o l) に再懸濁した。ライセートを、55 で 60 分間、95 で 15 分間というプログラムを用いて、サーマルサイクラー内で処理した。希釈クローニングからのコロニー試料を、上記のように 20 ~ 30 μ l の溶解用緩衝液を用いて処理した。

【0115】

10

20

30

40

【表5】

表D: エンドヌクレアーゼ結合配列およびHDR鋲型のリスト			
遺伝子	例	エンドヌクレアーゼ	HDR鋲型
例		<p>L: 反復可変性二残基(RVD)は左側TALEN单量体をコードする</p> <p>R: RVDは右側TALEN单量体をコードする</p> <p>または</p> <p>Cas9/CRISPR, sgRNA: gRNA配列, 5'から3'へ</p>	ssDNAオリゴ配列, 5'から3'へ
<i>IL2Rγ</i>	1, 3	<p>L: HD HD HD NI NI NI NN NN NG NG HD NI NN NG NN NG NG (配列番号4)</p> <p>R: HD HD NI NI NN NG NN HD NI NI NG NG HD NI NG NN NG NI HD NG (配列番号5)</p>	TTCCACTCTACCCCCCCCAGG TTCAGTGTGTTGTGTAAGCTCAA TGTTGAGTACATGAATTGCACTT GGGACAGCAGCTCTGAGCTC (配列番号27)
<i>RAG2</i>	1, 3	<p>L: NI HD HD NG NG HD HD NG HD HD NG HD NG HD NN HD NG (配列番号6)</p> <p>R: HD NG NI NI NN HD NG NN HD NG NG NG NG NN NI NI NG (配列番号7)</p>	CTCTAAGGATTCTGCCACCTCC TCCTCTCCGCTACCCAGACTAAG CTTGACACATTCAAAAGCAGCTT AGGGTCTGAAAAACATCAGT (配列番号28)
<i>APC</i>	2, 3	<p>L: NN NN NI NI NN NI NI NN NG NI NG HD NI NN HD HD NI NG (配列番号8)</p> <p>R: NN NI HD HD HD NI NN NI NI NG NG NG HD NG NN NG (配列番号9)</p>	CCAGATGCCAAAGTCACGGAAG AAGTATGCCATTCACTCCCTCC CAGTGAAGCTTACAGAAATTCTG GGTCGACCACGGAGTTGCACT (配列番号29)
<i>P53</i>	2, 3	<p>L: NN NN HD NI HD HD HD NN NG NN NG HD HD NN HD NN HD (配列番号10)</p> <p>R: HD NI NG NN NG NI HD NG HD NG NN NI HD NG NG (配列番号11)</p>	AGCTCGCCACCCCCGCCGGGCAC CCGTGTCCCGGCCATGGCCATCT AAGCTTAAAGAAGTCAGAGTACA TGCCCGAGGTGGTGAGGCGCT (配列番号30)

10

20

30

40

【0116】

【表6】

<i>KISSR</i>	3	L: NN HD NG HD NG NI HD NG HD NG NI HD HD HD HD (配列番号12) R: NN HD NI HD NI NG NN NI NI NN NG HD NN HD HD HD NI (配列番号13)	GTGCTCGTGCCTTACTGCTCT ACTCTACCCCTACCAAGCCTAAG CTTGTGCTGGCGACTTCATGTG CAAGTTCCCTCAACTACATCC (配列番号31)	
<i>EIF4GI</i>	3, 7	L: HD HD NN NG HD HD NG NG NG NN HD HD NI NI HD HD NG NG (配列番号14) R: NG NN NN NN NN NN HD HD NI HD NN NN NG NG NN HD NG (配列番号15)	CCCAGACTTCACTCCGTCCCTTGC CGACTTCGGCCGACCAGCCCTTA GCAACCGTGGGCCCAAGGGGT GGGCCAGGTGGGAGCTGCC (配列番号32)	10
<i>DDL R</i>	3	L: HD NG HD HD NG NI HD NI NI NN NG NN NN NI NG NG NG (配列番号16) R: HD NN NN NI HD HD NN NG HD HD NG NG NN HD NI HD NG (配列番号17)	CCGAGACGGGAAATGCACCTCCT ACAAGTGGATTGTGATGGATCC GAACACCGAGTGCAAGGACGGG TCCGCTGAGTCCCTGGAGACGT (配列番号33)	20
<i>DMD</i>	3	L: NN NN NI HD NG NN NI HD HD NI HD NG NI NG NG (配列番号18) R: NI NN NI NN NI NI NG NN NG NN NN NG HD HD NI NN HD (配列番号19)	AAAGTGGCTGGCCAACCCCTG GAATGACCACTCGAGTATTGAAG CACGTAAGTATGCTGGACCACAT TCTCTATGGCTGTAGACATTC (配列番号34)	
<i>NKX2-5</i>	6	L: HD NN HD NI NN NN HD NI HD NI NN NN NG HD NG NI HD (配列番号20) R: NI HD HD NN HD NG NN HD NG NN HD NG NG NN NI (配列番号21)	CTCTTTCGCAGGCACAGGTCTA CGAGCTGGAGCGACGCTTCTAAG CTTGCAGCAGCGGTACCTGTCGG CTCCCGAGCGTGACCAAGTTGG (配列番号35)	30
<i>MESP1</i>	6	L: NN HD NN NN NG NG NN HD NG HD HD HD HD NN HD HD (配列番号22) R: NN NN HD HD NN NN NN HD NN HD NG NN HD NI HD HD (配列番号23)	TGCGGTTGCTCCCCCGCCTCGTCC CCGTAAGCTTGACTCCTGGTGCA GCGCCCCGGCCAG (配列番号36)	40

【0 1 1 7】

【表7】

<i>GATA4</i>	6	L: NI NG NN NG NG NG NN NI NG NN NI HD NG NG HD (配列番号24) R: NN NN HD HD HD HD NN HD NI NN NG NG NN NI HD NI HD (配列番号25)	AACCCTGTGTCGTTCCCACCCA GTAGATATGTTGATGACTAAGC TTCTCGGAAGGCAGAGAGTGTGT CAACTGCGGGGCCATGTCCAC (配列番号37)
<i>P65</i>	7	Cas9/CRISPR, sgRNA: CGTCACCAACGGTCTCCTC TCGG (配列番号26)	GCTCCCACCTCCCTGGGGGCCTC TGGGCTCACCAACGGTCTCCTCC CGGGGGACGAAGACTTCTCCTCC ATTGCGGACATGGACTTCTCA (配列番号38)

10

【0118】

20

実施例1 多重遺伝子編集

ブタRAG2およびIL2Rに特異的な6つの条件のTALEN mRNAおよびHDR鋲型を、ブタ線維芽細胞に同時遺伝子導入した。各遺伝子導入に対して一定量のRAG2 mRNAおよび鋲型を用いたが、IL2Rg TALEN mRNAおよびHDR鋲型の量は、表示される各条件に応じて変更する。TALEN mRNAおよびHDR鋲型の用量は、的確な効果および的外れの効果の双方を有する。IL2Rに対するTALEN mRNAの増加は、IL2Rに対するNHEJおよびHDRの双方の増加をもたらしたが、RAG2に対するNHEJレベルは不变であった。IL2R HDR鋲型の増加はRAG2遺伝子座でのHDRを低下させたが、これはオリゴヌクレオチドの濃度の増大による相同組換え修復の非特異的阻害を示唆している。RAG2およびIL2Rに両アレルHDRを伴うコロニーが、2つの条件から4および2パーセント（予想された2パーセントの頻度とそれを超える頻度）で得られた（図3パネルc、パネルd）。予想された頻度は、各HDR対立遺伝子を独立事象として扱う、3日目のHDRレベルの掛け算により算出される。（図3を参照）ブタRAG2およびIL2Rの多重遺伝子編集。a) 遺伝子導入後3日目での細胞集団に対する非相同末端結合（NHEJ）および相同組換え修復HDRの効率を判定するためのSURVEYORおよびRFLP分析。b) 遺伝子導入後11日目での細胞集団に対する相同組換え修復におけるRFLP分析。c) IL2R、RAG2または双方でのHDRが陽性であるコロニーの百分率。細胞は、パネルa中の「C」で表示される集団から蒔いた。コロニー遺伝子型の分布を以下に示す。d) IL2RおよびRAG2に対して2μgおよび1μgの量のTALEN mRNAならびに各々に対して1μMでのHDR鋲型を遺伝子導入した細胞からのコロニー分析。コロニー遺伝子型の分布を以下に示す。

30

【0119】

40

実施例2 多重遺伝子編集

40

ブタAPCおよびp53に特異的な4つの条件のTALEN mRNAおよびHDR鋲型を、ブタ線維芽細胞に同時遺伝子導入した。APC mRNAの量は、左から右へ順次減少し（図4パネルb）、その量以外は表示の通り一定のままであった。パーセントHDRは、APC mRNAの減少とともに、線形的に低下した。APC TALENの用量変更に伴うp53 HDRに対する効果はほとんど認められなかった。コロニーの遺伝子型判定によると、11日目の値に関連するAPCおよびp53の双方におけるクローニング HDR対立遺伝子との想定される結合より高く、図4パネルcおよび図4パネルdの場合、13.7および7.1パーセントに対して各々、18および20パーセントであること

50

が示された。（図4を参照）ブタA P Cおよびp 5 3の多重遺伝子編集。パネルa)遺伝子導入後3日目での細胞集団に対する非相同末端結合（N H E J）および相同組換え修復H D Rの効率を判定するためのS U R V E Y O RおよびR F L P分析。パネルb)遺伝子導入後11日目での細胞集団に対する相同組換え修復におけるR F L P分析。パネルc)およびd)A P C、p 5 3または双方でのH D Rに対する表示される細胞集団（パネルaの「C」および「D」で表示される）由来の陽性コロニーの百分率。3以上のH D R対立遺伝子を有するコロニーを以下に示す。

【0120】

実施例3 少なくとも3つの遺伝子での多重

実施例1では、H D Rの非特異的低下が高濃度のH D Rオリゴで認められ、それ故、2 + H D RオリゴがH D Rの非特異的阻害を伴わずに有効であり得るか否かは未知であった。各標的部位に対して2つの濃度、1 u Mおよび2 u Mについて試験した。T A L E N活性は2つの条件間で有意に変化しなかったが、H D Rは各鑄型に対して2 u Mの濃度で有意に平滑末端化された。1 u Mの条件に由来するクローニーは種々の遺伝子型を有し、それらの一部は各遺伝子および最大で7つの対立遺伝子において編集を有した（図6）。独立事象として処理される場合、7つの対立遺伝子が編集された、「a」で表示される予想される遺伝子型の頻度は0.001パーセントである。二項分布は、かかる遺伝子型の2 + コロニーを72のサイズの試料中に同定する尤度を予測し、この場合の予測では、0.00026パーセント未満である。この高い奏効率は予測できなかったが、想定外でかつ意外である。この結果は、T A L E N / H D R鑄型の2つのさらなる組み合わせで繰り返された（図7および8）。最初の試験結果と同様、最大で7つの対立遺伝子および最大で4つの遺伝子においてH D R編集を伴うコロニーが得られた（表A）。幾つかの遺伝子型が偶然、予想をはるかに上回る頻度で回収された。幾つかの遺伝子座での同時二本鎖切断に関する懸念として意図しない染色体再配列の誘導が挙げられるが、試験3の細胞からの試験した50中50の核型が正常であった（データは示さず）。

【0121】

（図5を参照）5遺伝子多重H D R効率に対するオリゴヌクレオチドH D R鑄型濃度の効果。ブタR A G 2、I L 2 R g、p 5 3、A P CおよびL D L Rに特異的な表示量のT A L E N m R N Aを、2 u M（パネルa）または1 u M（パネルb）の各々の同族H D R鑄型とともに、ブタ線維芽細胞に同時遺伝子導入した。パーセントN H E JおよびH D R、S u r v e y o rおよびR F L Pアッセイにより測定した。（図6を参照）5遺伝子多重H D Rから得られたコロニー遺伝子型。コロニー遺伝子型は、R F L P分析により評価した。パネルa)各ラインは、各々の特定の遺伝子座での1つのコロニーの遺伝子型を表す。3つの遺伝子型、すなわちヘテロ接合性またはホモ接合性H D Rの予想されるR F L P遺伝子型を有するもの、ならびにR F L P陽性断片に加え、挿入または欠失（インデル）対立遺伝子を示すサイズ的に可視的変化を有する第2の対立遺伝子を有するものを同定することができた。特定の遺伝子座に編集を有する伴うコロニーの百分率を各カラムの下部に表示する。パネルb)0 ~ 5の遺伝子座で編集されたコロニーの総数。（図7を参照）第2の5遺伝子多重試験のコロニー遺伝子型。パネルa)各ラインは、各々の特定の遺伝子座での1つのコロニーの遺伝子型を表す。3つの遺伝子型、すなわちヘテロ接合性またはホモ接合性H D Rの予想されるR F L P遺伝子型を有するもの、ならびにR F L P陽性断片に加え、挿入または欠失（インデル）対立遺伝子を示すサイズ的に可視的変化を有する第2の対立遺伝子を有するものを同定することができた。特定の遺伝子座に編集を有するコロニーの百分率を各カラムの下部に表示する。パネルb)0 ~ 5の遺伝子座で編集されたコロニーの総数。（図8を参照）第3の5遺伝子多重試験のコロニー遺伝子型。パネルa)各ラインは、各々の特定の遺伝子座での1つのコロニーの遺伝子型を表す。3つの遺伝子型、すなわちヘテロ接合性またはホモ接合性H D Rの予想されるR F L P遺伝子型を有するもの、ならびにR F L P陽性断片に加え、挿入または欠失（インデル）対立遺伝子を示すサイズ的に可視的変化を有する第2の対立遺伝子を有するものを同定することができた。特定の遺伝子座に編集を有するコロニーの百分率を各カラムの下部に表示す

10

20

30

40

50

る。パネルb) 0~5の遺伝子座で編集されたコロニーの総数。

【0122】

実施例4A~4DD

実施例4A: 多重遺伝子編集によりRAG2/IL2Rgヌル(RG-KO)ブタ線維芽細胞を発生させる。

雄ブタ胎児線維芽細胞に、本発明者らが先行的に規定した方法を用いて、RAG2およびIL2Rgの破壊のため、TALENおよびオリゴヌクレオチド鋸型を遺伝子導入することになる(Tan, W., et al., Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. PNAS, 110(41):16526-16531, 2013)。RG-KO候補は、配列決定によって確認される通り、例えば制限酵素長多型(RFLP)により同定することになる。少なくとも約5つの確認されたRG-KOコロニーは、クローニングおよびキメラ作製における資源としてプールすることになる。

【0123】

実施例4B: RG-KO宿主胚盤胞を用いてのキメラ胚の作製。

宿主RG-KO胚および雌EGFP標識ドナー細胞を、クロマチン移植技術とそれに続く胚盤胞段階までのインビトロ培養を用いて作製することになる。実施例1からのRG-KO細胞を用いてもよい。7日目のEGFP胚盤胞由来の細胞間凝集塊を、同期させた雌ブタへの胚移植前、6日目のRG-KO胚に注射することになる。この手法を用いて、Nagashimaおよび同僚は、50パーセントを上回る生産子ブタでキメラ化を認めた(Nagashima, H., et al., Sex differentiation and germ cell production in chimeric pigs produced by inner cell mass injection into blastocysts. Biol Reprod, 70(3):702-707, 2004)。雄表現型は、マウスおよびブタの双方におけるインジェクションキメラにおいて優性である。したがって、雌ドナー細胞を注射したXY RG-KO宿主は、雄宿主の遺伝的性質を排他的に伝えることになる。妊娠検査は、適切な時期、例えば25、50、および100日目に行うことになる。妊娠の約100日目の妊娠雌ブタは、約114日目までに、子ブタの帝王切開出産に先立ち1日4回監視することになる。

【0124】

実施例4C: 非キメラ子孫におけるT、BおよびNK細胞が欠損しているか否かを判定する。

非キメラ子孫は、T、BおよびNK細胞が欠損しているか否かを判定するため、試験することになる。以下の方法は、そのための1つの技法である。帝王切開出産は、推定上のキメラを保有する各雌ブタおよび野生型子ブタを保有する1つの繁殖雌ブタに対して行うことになる。臍帯血は、帝王切開出産の直後、各子ブタから単離することになる。臍帯血白血球は、T、BおよびNK細胞集団ならびにドナーに由来するEGFP発現について、蛍光標示式細胞分取器(FACS)により評価することになる。さらに、キメラ化は、臍帯血、耳および尾の生検からPCRにより評価することになる。この初期分析は、非キメラ子ブタを密に監視し、感染の徴候とともに人道的に安楽死させることができるように、出生から6時間以内に完了することになる。非キメラ動物の一部、または免疫細胞が欠如したものは、剖検用に安楽死されることになる。

【0125】

実施例4D: キメラブタを同定し、T、BおよびNK細胞の起源を判定する。

キメラブタは、T、BおよびNK細胞の起源を判定するため、試験することになる。以下の方法は、そのための1つの技法である。キメラ子ブタは、上記の方法を用いて同定することになる。リンパ球および血清免疫グロブリンの循環に関する週毎の評価では、キメラ、非キメラおよび野生型子ブタの間で2か月の期間にわたり比較することになる。選別されたT、BおよびNK細胞の集団は、ドナーの起源を確認するため、EGFP発現およ

10

20

30

40

50

びマイクロサテライト分析について評価することになる。キメラブタ由来の試料および精液収集物の維持は、第ⅠⅠ相の資金提供が可能になるまで、RCIにより支持されることになる。

【0126】

実施例A～Dにおける試料の手順：

臍帯血および末梢血のFACS

血液リンパ球およびEGFPキメラ化に関する評価は、ブタ標本への適応とともに前述の(2)の通りに実施することになる。臍帯血は、帝王切開出産の直後、各子ブタから採取することになる。臍帯血の一部は、潜在的同種移植片処理のために処理し、凍結保存することになる一方、残りはリンパ球のFACS分析用に用いることになる。末梢血試料は、標準的方法により、2、4、6および8週齢目に採取することになる。RBCを除去し、1-2E+5個の細胞を管に分布させることになる。アリコートは、T細胞(CD4およびCD8)、B細胞(CD45RAおよびCD3)、NK細胞(CD16およびCD3)および骨髄系細胞(CD3)の同定のため、抗ブタ抗体で標識することになる。抗原発現は、LS RII Flow Cytometer(BD Biosciences)で定量化することになる。フルオロフォアは、表面抗原とともにドナー由来のEGFP細胞の多重評価を可能にするように慎重に選択することになる。脾臓由来の単一細胞懸濁液は、同じ方法により分析することになる。

【0127】

試験

すべての主要な器官および組織は、適切な解剖学的発生について全体的に試験することになり、また、脾臓、肝臓、心臓、腎臓、肺、胃腸、免疫系(末梢および粘膜リンパ節および脾臓)、およびCNSを含むすべての主要な器官および組織に由来する適切な試料は、DNA単離用に採取することになる。単一細胞懸濁液は、FACS分析用に脾臓から調製することになる。組織は、キメラ化をさらに評価するための組織学的検査のため、キメラ状態に関連し得る任意の変化のため、また任意の基礎疾患の存在について、調製することになる。

【0128】

キメラ化の評価

定量PCRは、臍帯血、耳、および尾の生検に対して、EGFP導入遺伝子に特異的なプライマーを用いて行い、野生型細胞に対するEGFPの既知の比を用いた検量線と比較することになる。標本におけるRG-KO対立遺伝子についても、前述のRFLPアッセイを介して評価することになる。EGFP+細胞の生着は、すべての動物および器官に対して剖検中に巨視的に評価することになる。宿主細胞に対するドナーの比を決定するため、主要な器官由来の組織は、EGFP免疫組織化学用に切片を作成し、DAPI(4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)で対比染色することになる。

【0129】

マイクロサテライト分析

動物は、宿主およびドナーの遺伝的性質に対して有益なマイクロサテライトについて、我々の研究室で通常用いるものからスクリーニングすることになる。組織および血液由来の試料(選別されたリンパ球または骨髄系、EGFP陽性および陰性)を評価することになる。ドナー対宿主細胞の相対量は、MISEQ装置(Illumina)での多重化アンプリコン配列決定により評価することになる。

【0130】

動物

臍帯血中および末梢血中でT、BおよびNK細胞の不在を有する非キメラブタを作製することになる。キメラブタは、概ね野生型レベルに実質的に類似したレベルを有することになる。さらに、T、BおよびNK細胞が陽性のキメラは、標準的条件下で飼育する場合、実質的に正常な免疫機能を有し、かつ健常性を維持することになる。

【0131】

10

20

30

40

50

実施例 5 C R I S P R / C a s 9 の設計および作製

遺伝子に特異的な g R N A 配列を、 C h u r c h l a b g R N A ベクター (A d d g e n e I D : 4 1 8 2 4) に、その方法に従ってクローン化した。 C a s 9 ヌクレアーゼを、 h C a s 9 プラスミド (A d d g e n e I D : 4 1 8 1 5) または R C I S c r i p t - h C a s 9 から合成した m R N A の同時遺伝子導入のいずれかにより準備した。この R C I S c r i p t - h C a s 9 は、 X b a I - A g e I 断片を (h C a s 9 c D N A を包含する) h C a s 9 プラスミドから R C I S c r i p t プラスミドへサブクローン化することにより構築した。 m R N A の合成は、 K p n I を用いて直線化を行ったこと以外は上記のように行つた。

【 0 1 3 2 】

実施例 6 標的化エンドヌクレアーゼおよび H D R を用いた多重遺伝子編集。パネル (a) は、 (縞模様で表示される c D N A - エクソンとして示される) 多重実験における各遺伝子の模式図であり、 T A L E N によって標的化される部位を示す。各遺伝子における D N A 結合ドメインをコードする配列を下記に示す。ブタ線維芽細胞に、遺伝子型判定のため、中途での終止コドンおよび新規な H i n d I I I R F L P 部位を挿入するように設計した、各遺伝子を標的化する、 1 u g の各 T A L E N m R N A および 0 . 1 n モルの各 H D R オリゴ (図 1 2 パネル b) を同時遺伝子導入した。遺伝子型判定のため、全部で 3 8 4 のコロニーを単離した。 G A T A 4 および N k x 2 - 5 R F L P アッセイを実施し (図 1 2 のパネル c) 、 M E S P 1 を配列決定により評価した (データは示さず) 。 2 つのコロニー (2 / 3 8 4 、 0 . 5 2 %) は、 3 つすべての遺伝子についてホモ接合性 H D R ノックアウトであった。三重ノックアウトはアスターリスクで表示する (図 1 2 パネル c) 。さらなる遺伝子型が、パネル c 、例えば H D R 編集を伴わないコロニー 4 9 ; N K X 2 - 5 に対するヘテロ接合性編集を伴うコロニー 5 2 および 6 3 ; N K X 2 - 5 および G A T A 4 の双方などに対するヘテロ接合性編集を伴うコロニー 5 9 において認めることができる。

【 0 1 3 3 】

実施例 7 T A L E N および R G E N の組み合わせを用いた多重遺伝子編集 (図 1 3 を参照) 。ブタ線維芽細胞に、各遺伝子に対する T A L E N (1 u g の E I F 4 G 1 4 . 1 m R N A) + C a s 9 / C R I S P R 成分 (2 u g の C a s 9 m R N A + 2 u g の p 6 5 G 1 ガイド R N A) および 0 2 n モルの H D R オリゴを同時遺伝子導入した。遺伝子導入細胞は R F L P アッセイにより評価し、両部位で H D R を示した。この集団由来の細胞は、コロニーの単離を意図して薄くことになり、両方の遺伝子中に編集を有する単離物を同定する。

【 0 1 3 4 】

さらなる開示

本明細書中に記載の特許、特許出願、出版物、および論文は、ここで参照により援用され、矛盾する場合、本明細書が優先する。本実施形態は、様々な特徴を有し、これらの特徴は、機能的な実施形態を作成する必要性によって導かれるものとして混合され、一致され得る。見出しおよび副見出しおよび副見出しありは、便宜的に提供されるが、本質的なものではなく、説明内容の範囲を限定するものではない。以下の番号付けされたステートメントは、本発明の実施形態を提示する。

1 A . 複数の標的染色体 D N A 部位で脊椎動物の細胞または胚における遺伝子編集を行う方法であつて、

第 1 の標的染色体 D N A 部位に特異的な第 1 の標的化エンドヌクレアーゼおよび第 1 の標的部位配列に相同な第 1 の相同組換え修復 (H D R) 鑄型；および

第 2 の標的染色体 D N A 部位に特異的な第 2 の標的化エンドヌクレアーゼおよび第 2 の標的部位配列に相同な第 2 の H D R 鑄型
を脊椎動物の細胞または胚に導入するステップを含み、

第 1 の H D R 鑄型配列が第 1 の標的部位で天然染色体 D N A 配列を置換し、かつ第 2 の H D R 鑄型配列が第 2 の標的部位配列で天然染色体 D N A 配列を置換する、

10

20

30

40

50

方法。

1 B . 動物の複数の対立遺伝子を編集する方法であって、

各々が異なる対立遺伝子の遺伝子座を標的にする複数の標的化ヌクレアーゼおよび各々の標的化された対立遺伝子の遺伝子座に対する相同組換え修復鋳型を、初代家畜細胞または家畜胚に導入するステップを含み、

標的化エンドヌクレアーゼは複数の標的化エンドヌクレアーゼの各々と同族の対立遺伝子の遺伝子座において二重鎖分解を作成し、かつ細胞は相同組換え修復（H D R）鋳型核酸配列を各々のH D R鋳型に同族の遺伝子座に複製し、それにより対立遺伝子を編集する、方法。

2 . 第3、第4、第5、第6および第7の標的染色体DNA部位に各々特異的な第3、第4、第5、第6および第7の標的化エンドヌクレアーゼ、ならびに 10

第3、第4、第5、第6および第7の標的染色体DNA部位に各々相同な第3、第4、第5、第6および第7のH D R鋳型

の1つ以上を細胞または胚に導入するステップをさらに含む、1のいずれかに記載の方法。

3 . 標的化エンドヌクレアーゼがT A L E Nを含む、1～2のいずれかに記載の方法。

4 . 標的化エンドヌクレアーゼが亜鉛フィンガーヌクレアーゼまたはC a s 9を含む、1～3のいずれかに記載の方法。

5 . 少なくとも第1の標的染色体DNA部位が対立遺伝子における遺伝子座である、1～4のいずれかに記載の方法。 20

6 . 前記H D R鋳型の少なくとも1つが、鋳型に同族のDNA標的部位のノックアウトをコードする、5に記載の方法。

7 . 前記H D R鋳型の少なくとも1つが、外因性対立遺伝子における、鋳型に同族のDNA標的部位での対立遺伝子の置換をコードする、5に記載の方法。

8 . 細胞または胚が家畜の第一種または第一品種であり、かつ複数の編集が天然対立遺伝子と動物の第二種または第二品種に由来する外因性対立遺伝子との置換を含む、1に記載の方法。

9 . 動物が第二品種または別種の対応する外因性対立遺伝子と置換された少なくとも3つの天然対立遺伝子を有する動物の第一品種であり、前記外因性対立遺伝子は減数分裂組換えを伴わない対応する天然対立遺伝子の置換であり、ここで動物は外因性マークー遺伝子を含まない、1に記載の方法。 30

10 . 少なくとも3つ、4つ、5つ、6つ、または7つの標的染色体DNA部位が各々、異なる対立遺伝子における遺伝子座である、2に記載の方法。

11 . H D R鋳型の1つ以上が、鋳型に同族のDNA標的部位のノックアウトをコードする、10に記載の方法。

12 . 前記H D R鋳型の少なくとも1つが、外因性対立遺伝子における、鋳型に同族のDNA標的部位での対立遺伝子の置換をコードする、10に記載の方法。

13 . 細胞または胚が標的DNA部位での複数の遺伝子編集についてホモ接合性であり、前記編集が前記標的DNA部位に同族のH D R鋳型によってコードされる、1～12のいずれかに記載の方法。 40

14 . 細胞または胚が標的DNA部位での複数の遺伝子編集についてヘテロ接合性であり、前記編集が前記標的DNA部位に同族のH D R鋳型によってコードされる、1～12のいずれかに記載の方法。

15 . 遺伝子編集が、動物の別品種または動物の別種に由来する対立遺伝子のノックアウトまたは遺伝子移入を含む、11～14のいずれかに記載の方法。

16 . 細胞または胚が家畜の第一種または第一品種であり、かつ複数の編集が天然対立遺伝子と動物の第二種または第二品種に由来する外因性対立遺伝子との置換を含む、11～14のいずれかに記載の方法。

17 . 外因性対立遺伝子および天然対立遺伝子のDNA配列が1つ以上の位置で異なり、ここで天然対立遺伝子と外因性対立遺伝子との置換により、動物の第二品種または第二種 50

に対して同一の細胞または胚の染色体DNA配列が、前記位置にわたる整列化による評価によると、前記位置のいずれかの各側で少なくとも200塩基対(bp)の距離で作製される、16に記載の方法。

18. 距離が200~2000bpの間の数である、17に記載の方法。

19. 細胞または胚が標的DNA部位での複数の遺伝子編集についてホモ接合性であり、前記編集が前記標的DNA部位に同族のHDR鑄型によってコードされる、1~17のいずれかに記載の方法。

20. 細胞または胚が標的DNA部位での複数の遺伝子編集についてヘテロ接合性であり、前記編集が前記標的DNA部位に同族のHDR鑄型によってコードされる、1~17のいずれかに記載の方法。

21. 細胞または胚が、大型脊椎動物、家畜、サル、イヌ、ネコ、トリ、鳥類、魚類、ウサギ、ブタ、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄目からなる群から選択される、1~20のいずれかに記載の方法。

22. 細胞が、接合体、幹細胞、成体幹細胞、多能性細胞、前駆細胞、および初代細胞からなる群から選択される、1~21のいずれかに記載の方法。

23. 胚が、接合体、胚盤胞、桑実胚であるか、または1~200の多数の細胞を有する、1~21のいずれかに記載の方法。

24. エンドヌクレアーゼの1つ以上および/またはHDR鑄型の1つ以上をコードするmRNAを導入するステップを含む、1~23のいずれかに記載の方法。

25. エンドヌクレアーゼの1つ以上がタンパク質として細胞または胚に導入される、1~24のいずれかに記載の方法。

26. エンドヌクレアーゼの1つ以上(例えばその各々)が、mRNAとして提供され、0.1ng/ml~100ng/mlの濃度を有する溶液から細胞または胚に導入され(当業者は、明示される制限以内のすべての値および範囲、例えば、約20、約1~約20、約0.5~約50などが検討されることを直ちに理解するであろう);および/またはHDR鑄型の1つ以上(例えばその各々)が、mRNAとして提供され、約0.2μM~約20μMの濃度を有する溶液から細胞または胚に導入される、1~25のいずれかに記載の方法。

27. エンドヌクレアーゼおよび/またはHDR鑄型の導入のためのエレクトロポレーションを含む、1~26のいずれかに記載の方法。

28. エンドヌクレアーゼおよび/またはHDRが、化学に基づく方法、非化学的方法、粒子に基づく方法、およびウイルスによる方法からなる群から選択される方法によって導入される、1~27のいずれかに記載の方法。

29. エンドヌクレアーゼおよび/またはHDR鑄型を発現させるため、1つ以上のベクターを細胞または胚に導入するステップを含む、13~28のいずれかに記載の方法。

30. 標的化エンドヌクレアーゼが、TALEN、またはCRISPR、またはTALENとCRISPRとの組み合わせである、1~29のいずれかに記載の方法。

31. 編集が遺伝子ノックアウトである、30に記載の方法。

32. 標的部位配列の1つ以上が以下のリストから選択されるか、または外因性対立遺伝子または天然対立遺伝子の1つ以上が以下のリスト: IL2Rgy/-、RAG2/-、IL2Rg-/-、RAG2-/-、IL2Rgy/-、RAG2-/-、IL2Rgy/+、RAG2+/-、IL2Rg+/+、RAG2+/+、IL2Rg+/+、RAG2+/+、DGAT(ジグリセリドアシルトランスフェラーゼ)、ABCG2(ATP結合力セットサブファミリーGメンバー2)、ACAN(アグリカン)、AMELY(アメロゲニン、Y連鎖性)、BLG(プロゲスターーゲン関連子宮内膜タンパク質)、BMP1B(FecB)(骨形成タンパク質受容体、1B型)、DAZL(無精子症様における欠失)、Eif4GI(真核生物翻訳開始因子4、1)、GDF8(成長/分化因子8)、Horn-pol11 locus、IGF2(インスリン様成長因子2)、CWC15(CWC15スプライソゾーム関連タンパク質)、Kiss5R/GRP54(キスペチン)、OFD1Y(Y連鎖性口-顔-指症候群1型偽遺伝子)、p65(v-re1細

10

20

30

40

50

網内皮症ウイルス癌遺伝子相同体 A) 、 P R L R (プロラクチン受容体) 、 P r m d 1 4 (P R ドメイン含有 1 4) 、 P R N P (プリオンタンパク質) 、 R o s a 、 S o c s 2 (サイトカインシグナル伝達 2 のサプレッサー) 、 S R Y (Y 染色体の性決定領域) 、 Z F Y (亜鉛フィンガータンパク質、 Y 連鎖性) 、 - ラクトグロブリン、 c a l l i p y g e (C L P G) 、 M O D Y 1 (H N F 4) (肝細胞核内因子 4 、) 、 M O D Y 2 (G C K) (グルコキナーゼ) 、 M O D Y 3 (H N F 1) (肝細胞核内因子 4 、) 、 M O D Y 4 (P d x 1) (脾臓および十二指腸ホメオボックス 1) 、 M O D Y 5 (H N F - 1) (H N F 1 ホメオボックス B) 、 M O D Y 6 (神経原性分化 1) 、 M O D Y 7 (K L F 1 1) (クルッペル様因子 1 1) 、 M O D Y 8 (C E L) (カルボキシルエステルリバーゼ) 、 M O D Y 9 (P A X 4) (ペアードボックス 4) 、 M O D Y 1 0 (I N S) (インスリン) 、 M O D Y 1 1 (B L K) (B L K 癌原遺伝子、 S r c ファミリーチロシンキナーゼ) 、 A P C (腺腫症 (大腸腺腫症)) 、 A p o E (アポリポタンパク質 E) 、 D M D (ジストロフィン筋ジストロフィー) 、 G H R H R (成長ホルモン放出ホルモン受容体) 、 H R (毛髪成長関連) 、 H S D 1 1 B 2 (ヒドロキシステロイド (1 1 -) デヒドロゲナーゼ 2) 、 L D L R (低密度リポタンパク質受容体) 、 N F 1 (ニューロフィプロミン 1) 、 N P P A (ナトリウム利尿ペプチド A) 、 N R 3 C 2 (核受容体サブファミリー - 3 、グループ C 、メンバー 2) 、 p 5 3 (細胞腫瘍抗原 p 5 3 様) 、 P K D 1 (多発性囊胞腎疾患 1) 、 R b m 2 0 (R N A 結合モチーフタンパク質 2 0) 、 S C N N 1 G (ナトリウムチャネル、非電位依存性 1 サブユニット) 、 t P 5 3 (腫瘍タンパク質 p 5 3) 、 F A H (フマリルアセト酢酸ヒドロラーゼ) 、 H B B (ヘモグロビン) 、 I L 2 R G (インターロイキン 2 受容体、ガンマ鎖) 、 P D X 1 (脾臓および十二指腸ホメオボックス 1) 、 P I T X 3 (ペアード様ホメオドメイン転写因子 3) 、 R u n x 1 (r u n t 関連転写因子 1) 、 G G T A (二官能性セファロスボリンアシラーゼ / - グルタミルトランスペプチダーゼ) 、 V A S A (脈管タンパク質) 、 M I W I (p i w i 様 R N A 媒介性遺伝子サイレンシング 1) 、 P I W I (転写物 C G 6 1 2 2 - R A 由来の C G 6 1 2 2 遺伝子産物) 、 D C A F 1 7 (D D B 1 および C U L 4 関連因子 1 7) 、 V D R (ビタミン D 受容体) 、 P N P L A 1 (パタチン様ホスホリバーゼドメイン含有 1) 、 H R A S (ハーベイラット肉腫ウイルス癌遺伝子相同体) 、 T e l o m e r a s e - v e r t 、 D S P (デスモブラキン) 、 S N R P E (小核リボ核タンパク質ポリペプチド E) 、 R P L 2 1 (リボソームタンパク質) 、 L A M A 3 (ラミニン、 3) 、 U R O D (ウロポルフィリノーゲンデカルボキシラーゼ) 、 E D A R (エクトジスプラシン A 受容体) 、 O F D 1 (口 - 顔 - 指症候群 1) 、 P E X 7 (ペルオキシソーム生合成因子 7) 、 C O L 3 A 1 (コラーゲン、 I I I 型、 1) 、 A L O X 1 2 B (アラキドン酸 1 2 0 リポキシゲナーゼ 1 2 R 型) 、 H L C S (ホロカルボキシラーゼシンテターゼ (ビオチン - (プロピオニル - C o A - カルボキシラーゼ) A T P - 加水分解)) リガーゼ)) 、 N I P A L 4 (N I P A 様ドメイン含有 4) 、 C E R S 3 (セラミドシンターゼ 3) 、 A N T X R 1 (炭疽菌毒素受容体 1) 、 B 3 G A L T 6 (U D P - G a l : G a l 1 , 3 ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチド 6) 、 D S G 4 (デスモグレイン 4) 、 U B R 1 (ユピキチンタンパク質リガーゼ E 3 成分 n - レコグニン 1) 、 C T C 1 (C T S テロメア維持複合体成分 1) 、 M B T P S 2 (膜結合転写因子ペプチダーゼ、部位 2) 、 U R O S (ウロポルフィリノーゲン I I I シンターゼ) 、 A B H D 5 (アブヒドロラーゼドメイン含有 5) 、 N O P 1 0 (N O P 1 0 リボ核タンパク質) 、 A L M S 1 (アルストレーム症候群タンパク質 1) 、 L A M B 3 (ラミニン、 3) 、 E O G T (E G F ドメイン特異的 O 結合型 N - アセチルグルコサミン (G l c N A c)) 、 S A T 1 (スペルミジン / スペルミン N 1 - アセチルトランスフェラーゼ 1) 、 R B P J (免疫グロブリン J 領域における組換えシグナル結合タンパク質) 、 A R H G A P 3 1 (R h o G T P アーゼ活性化タンパク質 3 1) 、 A C V R 1 (アクチビン A 受容体、 I 型) 、 I K B K G (B 細胞内の 軽ポリペプチド遺伝子エンハンサーの阻害剤、キナーゼ)) 、 L P A R 6 (リゾホスファチジン酸受容体 6) 、 H R (毛髪成長関連) 、 A T R (A T R セリン / トレオニンキナーゼ) 、 H T R A 1 (H t r A セリンペプチダーゼ 1) 、 A I R E (自己免疫調節遺伝子) 、 B C 10 20 30 40 50

S 1 L (B C 1 (ユビキノール - チトクローム c レダクターゼ) 合成様) 、 M C C C 2 (メチルクロトノイル - C o A カルボキシラーゼ 2 ()) 、 D K C 1 (角化異常症先天性 1 、 ジスケリン) 、 P O R C N (ヤマアラシ相同体) 、 E B P (エモパミル結合タンパク質 (ステロールイソメラーゼ)) 、 S L I T R K 1 (S L I T および N T R K 様ファミリー - 、 メンバー 1) 、 B T K (ブルトン無ガンマグロブリン血症チロシンキナーゼ) 、 D O C K 6 (細胞質分裂のデディケイター 6) 、 A P C D D 1 (腺腫症 (大腸腺腫症) 下方制御 1) 、 Z I P 4 (亜鉛トランスポーター 4 前駆体) 、 C A S R (カルシウムセンシング受容体) 、 T E R T (テロメラーゼ逆転写酵素) 、 E D A R A D D (E D A R (エクトジスプラシン A 受容体) 関連死ドメイン) 、 A T P 6 V 0 A 2 (A T P a s e 、 H + 輸送性 10 、 リソソーム V 0 サブユニット a 2) 、 P V R L 1 (ポリオウイルス受容体関連 1 (ヘルペスウイルス侵入メディエーター C)) 、 M G P (マトリックス G 1 a タンパク質) 、 K R T 8 5 (ケラチン 8 5 、 I I 型) 、 R A G 2 (組換え活性化遺伝子 2) 、 R A G - 1 (組換え活性化遺伝子 1) 、 R O R 2 (受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 2) 、 C L A U D I N 1 (クローディン 7) 、 A B C A 1 2 (A T P 結合力セット、 サブファミリー A (A B C 1) 、 メンバー 1 2) 、 S L A - D R A 1 (M H C クラス I I D R -) 、 B 4 G A L T 7 (キシロシルプロテイン 1 , 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼ 、 ポリペプチド 7) 、 C O L 7 A 1 (コラーゲン V I I 型、 1) 、 N H P 2 (N H P 2 20 リボ核タンパク質) 、 G N A 1 1 (グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (g タンパク質) 、 1 1 (G q クラス)) 、 W N T 5 A (無翅型 M M T V 組込み部位ファミリー - メンバー - 5 A) 、 U S B 1 (U 6 s n R N A 生合成 1) 、 L M N A (ラミン A / C) 、 E P S 8 L 3 (E P S 8 様 3) 、 N S D H L (N A D (P) 依存性ステロイドヒドロゲナーゼ 様) 、 T R P V 3 (一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリー V 、 メンバー 3) 、 K R A S (カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子相同体) 、 T I N F 2 (T E R F 1 30 相互作用核内因子 2) 、 T G M 1 (トランスクルタミナーゼ 1) 、 D C L R E 1 C (D N A 架橋修復 1 C) 、 P K P 1 (プラコフィリン 1) 、 W R A P 5 3 (T P 5 3 に対する W D リピート含有アンチセンス) 、 K D M 5 C (リジン (k) 特異的デメチラーゼ 5 C) 、 E C M 1 (細胞外マトリックスタンパク質 1) 、 T P 6 3 (腫瘍タンパク質 p 6 3) 、 K R T 1 4 (ケラチン 1 4) 、 R I P K 4 (受容体相互作用セリン - トレオニンキナーゼ 4) 、 P R K D C (タンパク質キナーゼ、 D N A 活性化、 触媒ポリペプチド) 、 B C L 1 1 30 a (B 細胞 C L L / リンパ腫 1 1 A (亜鉛フィンガータンパク質)) 、 B M I 1 (B M I 1 癌原遺伝子、 ポリコームリングフィンガー) 、 C C R 5 (ケモカイン (C - C モチーフ) 受容体 5 (遺伝子 / 偽遺伝子)) 、 C X C R 4 (ケモカイン (C - X - C モチーフ) 受容体 4) 、 D K K 1 (ディックコップ (d i c k k o p f) W N T シグナル伝達経路阻害剤 1) 、 E T V 2 (e t s 変異体 2) 、 F L I 1 (F 1 i - 1 癌原遺伝子、 E T S 転写因子) 、 F L K 1 (キナーゼ挿入ドメイン受容体) 、 G A T A 2 (G A T A 結合タンパク質 2) 、 G A T A 4 (G A T A 結合タンパク質 4) 、 H H E X (造血発現ホメオボックス) 、 キット (k i t 癌遺伝子) 、 L M X 1 A (L I M ホメオボックス転写因子 1) 、 M Y F 5 (筋原性因子 5) 、 M Y O D 1 (筋原性分化 1) 、 M Y O G (ミオゲニン) 、 N K X 2 - 5 (N K 2 ホメオボックス 5) 、 N R 4 A 2 (核受容体サブファミリー 4 、 グループ A 、 メンバー 2) 、 P A X 3 (ペアードボックス 3) 、 P D X 1 (脾臓および十二指腸ホメオボックス 1) 、 P I T X 3 (ペアード様ホメオドメイン転写因子 3) 、 R u n x 1 (r u n t 関連転写因子 1) 、 R A G 2 (組換え活性化遺伝子 2) 、 G G T A (二官能性セファロスボリンアシラーゼ / - グルタミルトランスペプチダーゼ) 、 H A N D I I (心臓および神経冠誘導体発現タンパク質 2) 、 T B X 5 (T ボックス 5) 、 E T V 2 (e t s 変異体 2) 、 P D X 1 (脾臓および十二指腸ホメオボックス 1) 、 T B X 4 (T ボックス 4) 、 I D 2 (D N A 結合の阻害剤 2) 、 S O X 2 (S R Y (性決定領域 Y) - ボックス 2) 、 T T F 1 / N K X 2 - 1 (N K 2 ホメオボックス 1) 、 M E S P 1 (中胚葉後方 1) 、 N K X 2 - 5 (N K 2 ホメオボックス 5) 、 F A H (フマリルアセト酢酸ヒドラーーゼ) 、 P R K D C (タンパク質キナーゼ、 D N A 活性化、 触媒ポリペプチド) 、 R U N X 1 (r u n t 関連転写因子 1) 、 F L I 1 (f 1 i - 1 癌原遺伝子、 E T S 転写因子) 、 40

10

20

30

40

50

P I T X 3 (ペアード様ホメオドメイン転写因子3)、L M X 1 A (L I Mホメオボックス転写因子1)、D K K 1 (ディックコップ (d i c k k o p f) W N Tシグナル伝達経路阻害剤1)、N R 4 A 2 / N U R R 1 (核受容体サブファミリー4、グループA、メンバー2)、F L K 1 (キナーゼ挿入ドメイン受容体)、H H E X 1 (造血発現ホメオボックススタンパク質H H E X)、B C L 1 1 A (B細胞C L L / リンパ腫1 1 A (亜鉛フィンガータンパク質)、R A G 2 (組換え活性化遺伝子2)、R A G 1 (組換え活性化遺伝子1)、I L 2 R G (インターロイキン2受容体、ガンマ鎖)、c - K I T / S C F R (v - キットハーディ - ズッカーマン (v - k i t H a r d y - Z u c k e r m a n) 4 ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子相同体)、B M I 1 (B M I 1癌原遺伝子ポリコームリングフィンガー)、T B X 5 (Tボックス5)、O L I G 1 (オリゴデンドロサイト転写因子1)、O L I G 2 (オリゴデンドロサイト転写因子2)、それらのヘテロ接合体、それらのホモ接合体、およびそれらの組み合わせ、から選択される、1 ~ 3 1のいずれかに記載の方法。

3 3 . 初代脊椎動物の細胞または胚において多重遺伝子ノックアウトを作製する方法であって、細胞または胚に、異なる標的遺伝子に標的化された複数のT A L E Nを、前記異なる標的遺伝子に対する相同性を有するH D R 鑄型の存在下で導入するステップを含む、方法。

3 4 . 動物を作製する方法であって、1 ~ 3 3のいずれかに記載の方法を含み、かつ細胞をクローニングするかまたは胚を代理母に配置するステップをさらに含む、方法。

3 5 . 1 ~ 3 4のいずれかに記載の方法によって作製される動物。

3 6 . 細胞が編集され、またキメラ胚を形成するため、細胞をクローニングし、宿主胚を細胞から作製し、ドナー細胞を宿主胚に加えるステップをさらに含む、1 ~ 3 4のいずれかに記載の方法によって作製されるキメラ胚または動物。

3 7 . 宿主細胞およびドナー細胞におけるキメラである脊椎動物胚であって、

異なる染色体D N A部位に複数の宿主細胞の遺伝子編集を伴う宿主胚、および
キメラ胚を形成するため、宿主細胞に組み込まれたドナー細胞
を含む、脊椎動物胚。

3 8 . 異なる染色体D N A部位に複数の多重遺伝子編集を伴う胚を含む脊椎動物欠損キャリアであって、編集がドナー細胞による補完に遺伝的微小環境を提供する、脊椎動物欠損キャリア。

3 9 . ドナー細胞が、靈長類、齧歯類、または偶蹄目に由来する胚性幹細胞、多能性幹細胞、割球などである、3 7 ~ 3 8のいずれかに記載の胚またはキャリア。

4 0 . 宿主またはキャリア細胞の遺伝子編集が、遺伝子のノックアウトまたは天然対立遺伝子と脊椎動物の別品種もしくは動物の別種の外因性対立遺伝子との置換を含む、3 7 ~ 3 9のいずれかに記載の胚。

4 1 . 宿主細胞の遺伝子編集の数が、2、3、4、5、6、もしくは7であるか、または少なくとも2、3、4、5、6、もしくは7である、3 7 ~ 4 1のいずれかに記載の胚。

4 2 . 天然対立遺伝子と脊椎動物の別品種もしくは動物の別種の外因性対立遺伝子との置換の数が、2、3、4、5、6、もしくは7であるか、または少なくとも2、3、4、5、6、もしくは7である、3 7 ~ 4 1のいずれかに記載の胚。

4 3 . 発現可能なレポーター遺伝子および/または合成遺伝子および/または外因性蛍光タンパク質を含まない、3 7 ~ 4 2のいずれかに記載の胚。

4 4 . 遺伝子編集のすべてが両アレルであるか、編集の少なくとも2、3、4、もしくは5が両アレルであるか、遺伝子編集の少なくとも2、3、4、もしくは5が単アレルであるか、またはそれらの任意の組み合わせである、3 7 ~ 4 3のいずれかに記載の胚。

4 5 . ドナー細胞が宿主細胞に対する相補物である、3 7 ~ 4 4のいずれかに記載の胚。

4 6 . 宿主胚が高度虚弱 (F T T) 表現型として運命づけられている、3 7 ~ 4 5のいずれかに記載の胚。

4 7 . ドナー細胞が胚をF T T表現型から救出する、4 6に記載の胚。

4 8 . ドナー細胞が1つ以上の遺伝子編集を含む、3 7 ~ 4 7のいずれかに記載の胚。

10

20

30

40

50

49. 大型脊椎動物、家畜、サル、イヌ、ネコ、トリ、鳥類、魚類、ウサギ、ブタ、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄目からなる群から選択される、37～47のいずれかに記載の胚。

50. 宿主細胞およびドナー細胞におけるキメラである脊椎動物であって、

異なる染色体DNA部位に複数の宿主細胞の遺伝子編集、およびキメラ動物を形成するための宿主細胞に組み込まれたドナー細胞を含む、脊椎動物。

51. 大型脊椎動物、家畜、サル、イヌ、ネコ、トリ、鳥類、魚類、ウサギ、ブタ、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄目からなる群から選択される、50に記載の動物。

52. 宿主細胞およびドナー細胞におけるキメラである脊椎動物胚を作製する方法であって、

10

宿主の脊椎動物細胞に

第1の標的染色体DNA部位に特異的な第1の標的化エンドヌクレアーゼおよび第1の標的部位配列に相同な第1の相同組換え修復(HDR)鑄型；および

第2の標的染色体DNA部位に特異的な第2の標的化エンドヌクレアーゼおよび第2の標的部位配列に相同な第2のHDR鑄型を導入するステップと、

宿主胚を発生させるため、細胞をクローニングするステップと、

ドナー細胞を宿主胚内に配置するステップと、

を含み、第1のHDR鑄型配列は第1の標的部位で天然染色体DNA配列を置換し、また第2のHDR鑄型配列は第2の標的部位配列で天然染色体DNA配列を置換する、方法。

20

53. 細胞が初代細胞である、52に記載の方法。

54. 大型脊椎動物、家畜、サル、イヌ、ネコ、トリ、鳥類、魚類、ウサギ、ブタ、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄目からなる群から選択される、52～53のいずれかに記載の方法。

55. 発現可能なレポーター遺伝子および/または合成遺伝子および/または外因性蛍光タンパク質を含まない、1～54のいずれかに記載の方法、細胞、胚、または動物。

56. 宿主細胞およびドナー細胞を含むキメラ大型脊椎動物であって、宿主細胞が、ドナー細胞の遺伝子によって補完される、配偶子形成または精子形成遺伝子に対する少なくとも1つの非減数分裂の遺伝子編集を含み、動物はドナー細胞の遺伝子型を有する配偶子を含む、キメラ大型脊椎動物。

30

57. 宿主細胞の遺伝子型を有する機能的配偶子を含まない、56に記載の動物。

58. 宿主細胞およびドナー細胞を含むキメラ大型脊椎動物であって、宿主細胞が高度虚弱(FTT)宿主細胞の遺伝子型を樹立するための少なくとも1つの非減数分裂の遺伝子編集を含み、FTT遺伝子型がドナー細胞によって補完される、キメラ大型脊椎動物。

59. 宿主細胞が、高度虚弱(FTT)宿主細胞遺伝子型を樹立する、複数の非減数分裂の遺伝子編集を含む、58に記載の動物。

60. FTT表現型が免疫不全である、58または59のいずれかに記載の動物。

61. 多重遺伝子編集を含む大型脊椎動物。

62. 第二品種または別種の対応する外因性対立遺伝子で置換された少なくとも3つの天然対立遺伝子を有するブタの第一品種またはウシの第一品種であり、前記外因性対立遺伝子は減数分裂組換えを伴わない対応する天然対立遺伝子の置換であり、動物は外因性マークー遺伝子を含まない、61に記載の動物。

40

63. 前記外因性置換対立遺伝子の少なくとも3つ、4つ、5つ、6つ、または7つを含み、各々が減数分裂組換えを伴わない、61または62に記載の動物。

64. 家畜、サル、イヌ、ネコ、トリ、鳥類、魚類、ウサギ、ブタ、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄目からなる群から選択される、61～63のいずれかに記載の動物。

65. 3～25の数の編集を有する、61～64のいずれかに記載の動物。

66. 多重編集についてF0世代である、61～65のいずれかに記載の動物。

67. 2～25の数の対立遺伝子置換を有する、61～66のいずれかに記載の動物。

68. 2～25の数のKO遺伝子編集を有する、61～67のいずれかに記載の動物。

50

69. 第二品種または別種の対応する外因性対立遺伝子で置換された少なくとも3つの天然対立遺伝子を有するブタの第一品種またはウシの第一品種であり、前記外因性対立遺伝子は減数分裂組換えを伴わない対応する天然対立遺伝子の置換であり、動物は外因性マークー遺伝子を含まない、61に記載の動物。

70. 前記外因性置換対立遺伝子の少なくとも3つ、4つ、5つ、6つ、または7つを含み、各々が減数分裂組換えを伴わない、69に記載の動物。

【図1A - 1B】

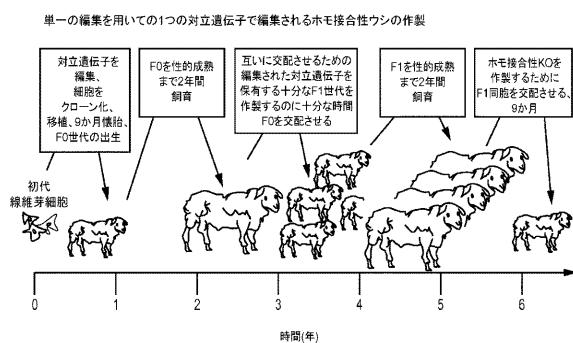


図1A

【図2】

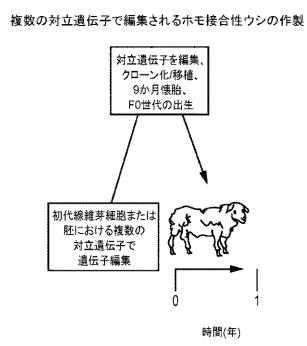


図2

単一の福集を用いての複数の対立遺伝子で遺伝子福集されるウシの作製

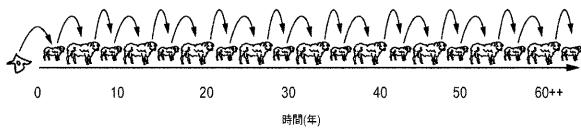


図1B

【図3】

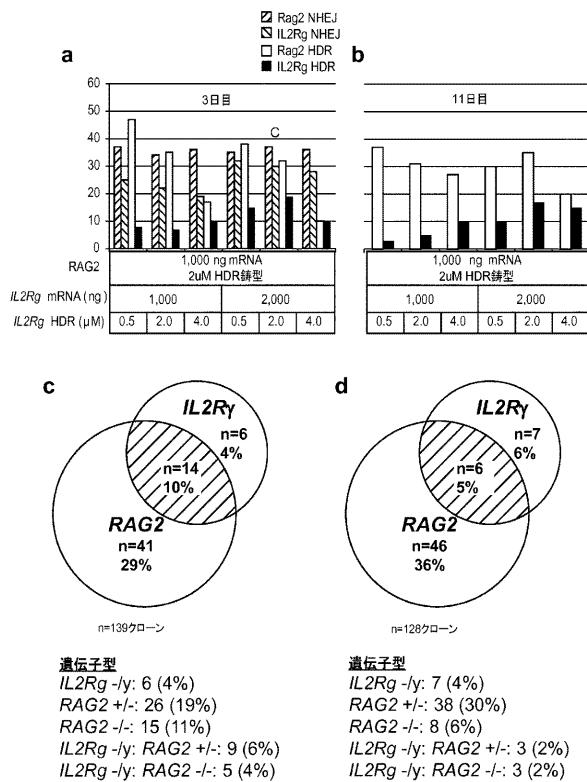


図3

【図4】

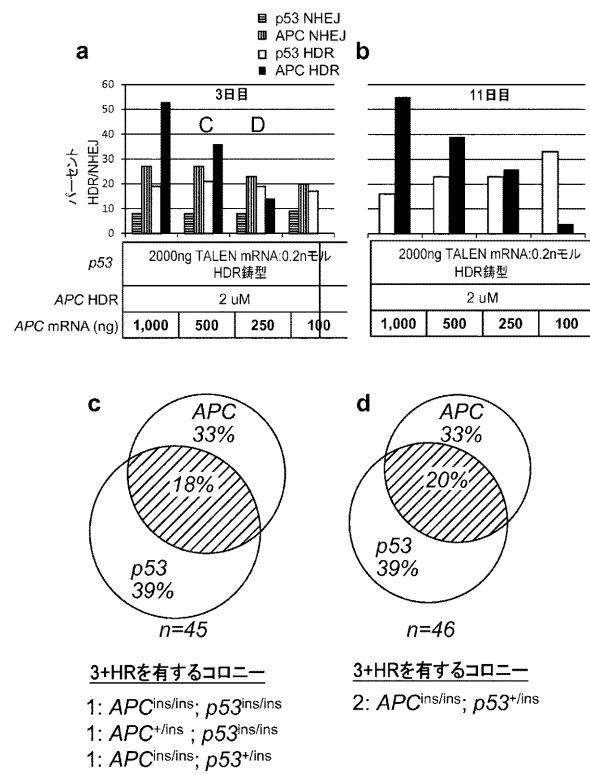


図4

【図5】

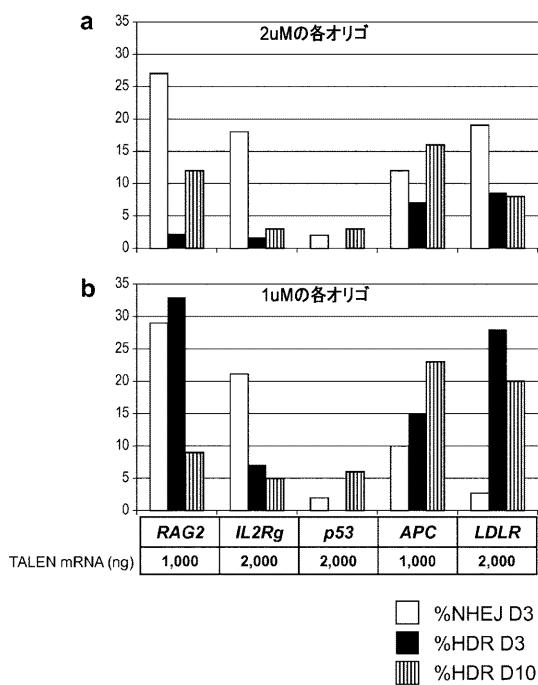
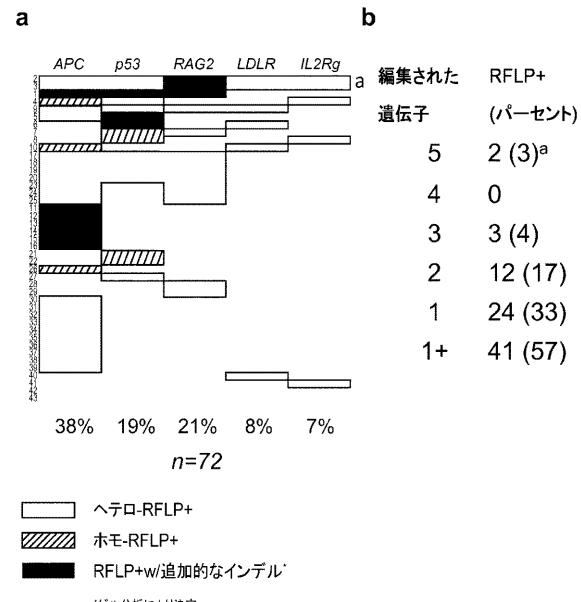


図5

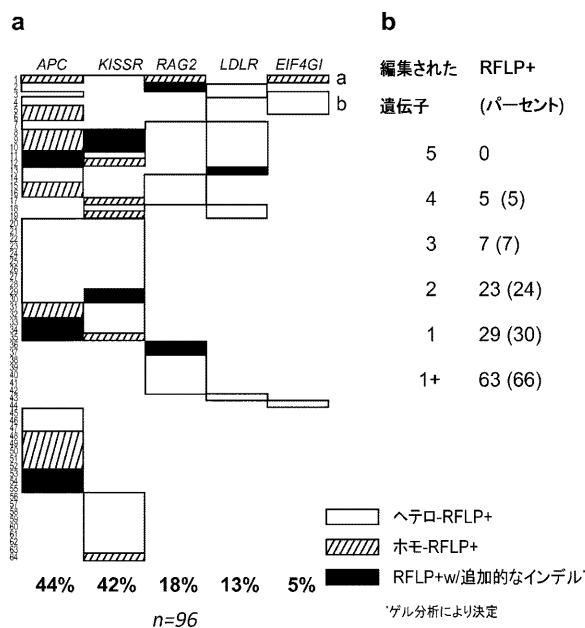
【図6】



a-遺伝子型の確率は0.001%である。この遺伝子型の独立導出における二項予測は
 $K \geq 2, p < 2.55E-7$ または 0.000026% 。

図6

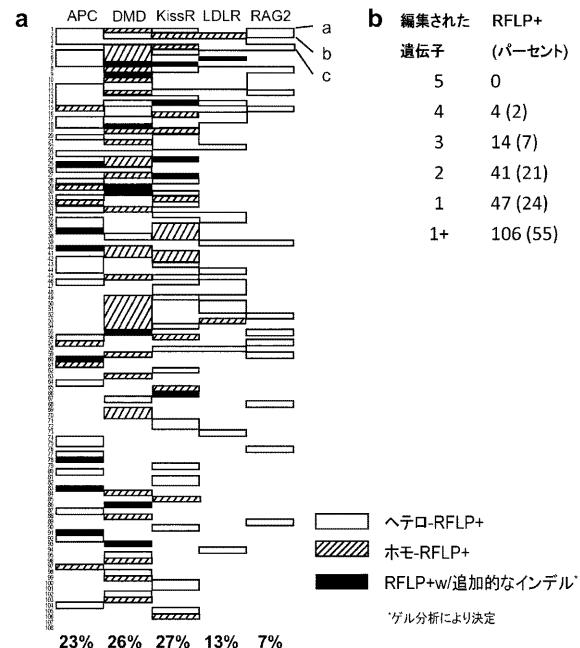
【図7】



a-この遺伝子型の確率:0.0000066%,K \geq 1;p=0.0006または0.06%。
b-ライン5,遺伝子型の確率:0.00073;K \geq 1;p=0.067または6.7%。

図7

【図8】



a-最上ライン、成功確率=0.001(0.1%)、K \geq 1;p=0.17;17%。
b-2番目ライン、成功確率:0.00002、K \geq 1;p=0.0019;または0.19%。
c-4番目ライン、成功確率:0.0025、K \geq 1;p=0.38;または38%。

図8

【図9】

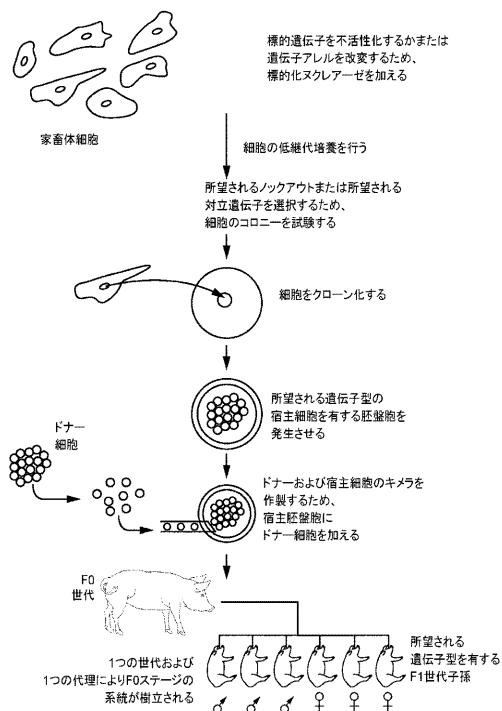


図9

【図10】

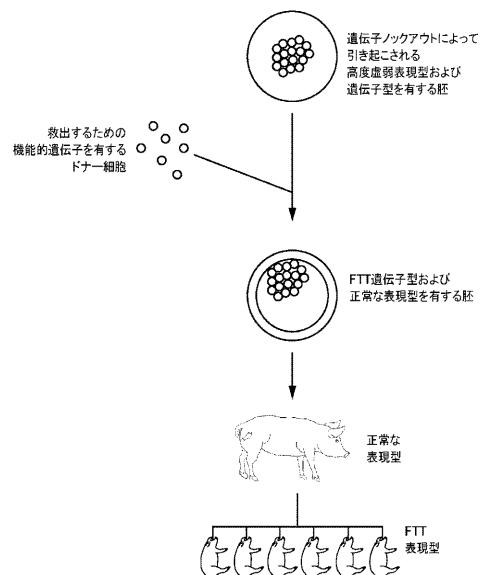


図10

【図11】

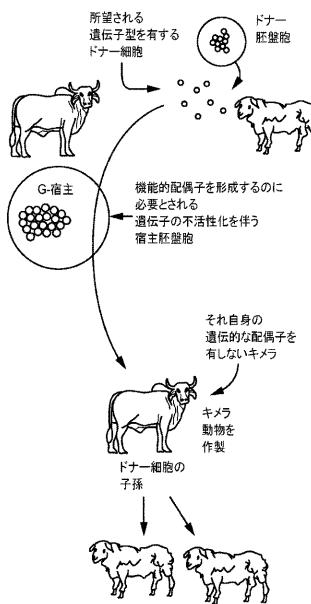


図11

【図12】

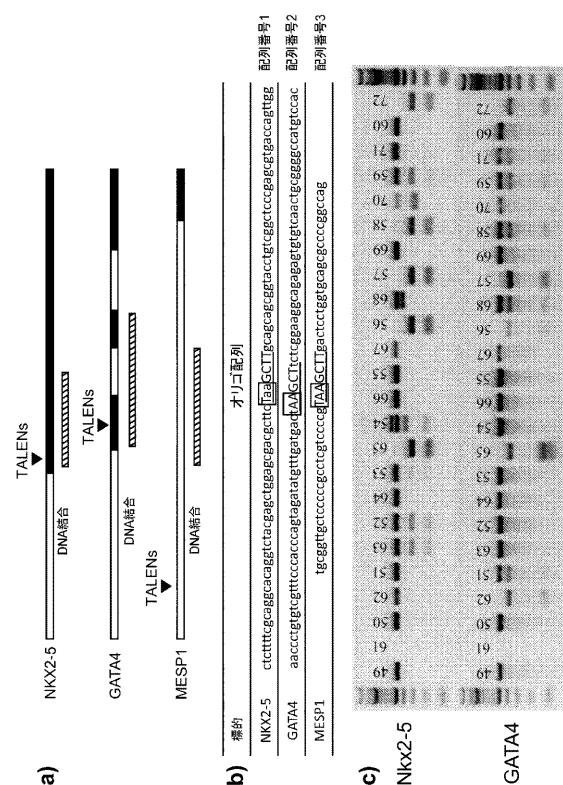


図12

【図13】

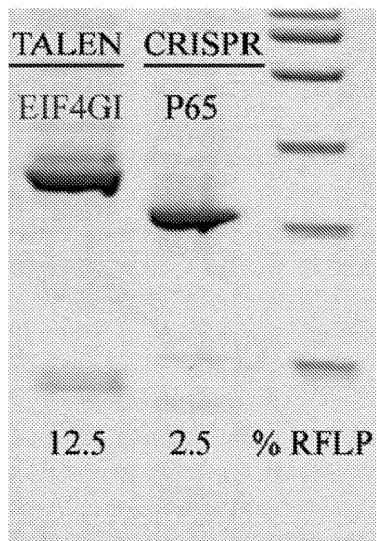


図13

【配列表】

2017513510000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2015/027995									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A01K67/027 ADD.											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">YUYU NIU ET AL: "Generation of Gene-Modified Cynomolgus Monkey via Cas9/RNA-Mediated Gene Targeting in One-Cell Embryos", CELL, vol. 156, no. 4, 30 January 2014 (2014-01-30), pages 836-843, XP055176948, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.027 the whole document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1,6,7, 10-12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">----- -/-</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-7, 10-12</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	YUYU NIU ET AL: "Generation of Gene-Modified Cynomolgus Monkey via Cas9/RNA-Mediated Gene Targeting in One-Cell Embryos", CELL, vol. 156, no. 4, 30 January 2014 (2014-01-30), pages 836-843, XP055176948, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.027 the whole document	1,6,7, 10-12	Y	----- -/-	1-7, 10-12
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	YUYU NIU ET AL: "Generation of Gene-Modified Cynomolgus Monkey via Cas9/RNA-Mediated Gene Targeting in One-Cell Embryos", CELL, vol. 156, no. 4, 30 January 2014 (2014-01-30), pages 836-843, XP055176948, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.027 the whole document	1,6,7, 10-12									
Y	----- -/-	1-7, 10-12									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.									
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 30 June 2015		Date of mailing of the international search report 28/09/2015									
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Chambonnet, F									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/027995

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	L.-E. JAO ET AL: "Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 110, no. 34, 5 August 2013 (2013-08-05), pages 13904-13909, XP055102027, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1308335110 page 13906, left-hand column, paragraph 2nd	1,6,7,11
Y	page 13907, right-hand column, paragraph 2nd - page 13909, last paragraph; figure 6 -----	1-7,10, 11
X	US 2013/117870 A1 (FAHRENKRUG SCOTT C [US] ET AL) 9 May 2013 (2013-05-09) paragraph [0042] - paragraph [0089]; claims 9-26,28-47; examples 1-3 5,7,8,9,11,16,17 -----	1,10-12
Y	W. TAN ET AL: "Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 110, no. 41, 6 September 2013 (2013-09-06), pages 16526-16531, XP055196420, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1310478110 the whole document -----	1-6, 10-12
Y	CARLSON DF1, TAN W, HACKETT PB, FAHRENKRUG SC: "Editing livestock genomes with site-specific nucleases", REPROD FERTIL DEV. 2014, vol. 26, no. 1, 5 December 2013 (2013-12-05), pages 74-82, XP008176713, the whole document -----	1-7, 10-12
Y	D. F. CARLSON ET AL: "Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 43, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 17382-17387, XP055089730, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1211446109 the whole document -----	1,11
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/027995

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SIMON G. LILLICO ET AL: "Live pigs produced from genome edited zygotes", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 3, 10 October 2013 (2013-10-10), XP055196419, DOI: 10.1038/srep02847 the whole document -----	1,11
Y	JIGE XIN ET AL: "Highly Efficient Generation of GGT1 Biallelic Knockout Inbred Mini-Pigs with TALENs", PLOS ONE, vol. 8, no. 12, 17 December 2013 (2013-12-17), page e84250, XP055196413, DOI: 10.1371/journal.pone.0084250 the whole document -----	1,11,12
Y	LI P ET AL: "Biallelic knockout of the alpha-1,3 galactosyltransferase gene in porcine liver-derived cells using zinc finger nucleases", JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, 2013 ACADEMIC PRESS INC., SAN DIEGO, CA, US, vol. 181, no. 1, 3 July 2012 (2012-07-03), pages E39-E45, XP002717543, ISSN: 0022-4804, DOI: 10.1016/J.JSS.2012.06.035 [retrieved on 2012-07-03] the whole document -----	1,11,12
A	WENFANG (SPRING) TAN ET AL: "Chapter Two - Precision Editing of Large Animal Genomes", ADVANCES IN GENETICS, ACADEMIC PRESS, vol. 80, 2012, pages 37-97, XP009170794, ISSN: 0065-2660, DOI: 10.1016/B978-0-12-404742-6.00002-8 the whole document -----	1
A	F. ZHANG ET AL: "CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 23, no. R1, 20 March 2014 (2014-03-20), pages R40-R46, XP055196378, ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddu125 the whole document ----- -----	1 -/-
2		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/027995

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. KEITH JOUNG ET AL: "TALENS: a widely applicable technology for targeted genome editing", NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY, vol. 14, no. 1, 21 November 2012 (2012-11-21), pages 49-55, XP055102236, ISSN: 1471-0072, DOI: 10.1038/nrm3486 the whole document -----	1
A	YUANXI FENG ET AL: "A robust TALENS system for highly efficient mammalian genome editing", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 4, 10 January 2014 (2014-01-10), XP055196360, DOI: 10.1038/srep03632 the whole document -----	1
A	HAILIANG LIU ET AL: "TALEN-Mediated Gene Mutagenesis in Rhesus and Cynomolgus Monkeys", CELL STEM CELL, MARCH 6 2014, vol. 14, no. 3, 13 February 2014 (2014-02-13), pages 323-328, XP055196598, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2014.01.018 the whole document -----	1,11
A	WOONG Y. HWANG ET AL: "Heritable and Precise Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR-Cas System", PLOS ONE, vol. 8, no. 7, 9 July 2013 (2013-07-09), page e68708, XP055196397, DOI: 10.1371/journal.pone.0068708 the whole document -----	1,11
A	HRUSCHA ALEXANDER ET AL: "Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish", DEVELOPMENT, DECEMBER 2013, THE COMPANY OF BIOLOGISTS LTD, GB, vol. 140, no. 24, 20 November 2013 (2013-11-20), pages 4982-4987, XP009177513, ISSN: 0950-1991, DOI: 10.1242/DEV.099085 [retrieved on 2013-11-20] the whole document -----	1
2		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/027995

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-5(completely); 6, 7, 10-12(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2015/ 027995

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5(completely); 6, 7, 10-12(partially)

A large vertebrate animal comprising multiplex gene edits ; said animal being first animal that has at least two native alleles replaced with corresponding exogenous alleles of a second breed or another species, said exogenous alleles being a replacement of the corresponding native allele without meiotic recombination; said animal being a first breed of cattle or a first breed of pig that has at least three native alleles replaced with corresponding exogenous alleles of a second breed or another species, said exogenous alleles being a replacement of the corresponding native allele without meiotic recombination, wherein the animal is free of exogenous marker genes.

2. claims: 6, 7, 10-12(all partially)

A large vertebrate animal comprising multiplex gene edits wherein said animal comprises a number of allele replacements from 3-25; as far as not covered by the previous invention.

3. claims: 6, 7, 10-12(all partially)

A large vertebrate animal comprising multiplex gene edits wherein said animal comprises a number of knockout gene edits from 2-25;

4. claims: 8, 9(completely); 6, 7, 10-12(partially)

A large vertebrate animal comprising multiplex gene edits being a chimera of host cells from a host animal and donor cells from a donor animal, with the host cells comprising the multiplex gene edits, as far as not covered by the previous invention.

5-12. claim: 11(partially)

A large vertebrate animal comprising multiplex gene edits being respectively selected from the group consisting of livestock (including pig, cattle, buffalo, goat, sheep, and artiodactyl), simian, dog, cat, avian, bird, fish and rabbit, as far as not covered by a previous invention.

13-232. claim: 12(partially)

A large vertebrate animal comprising multiplex gene edits

International Application No. PCT/ US2015/ 027995

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

wherein the multiplex gene edits are made in one or more of the following genes: IL2Rg-, RAG2, IL2Rg; RAG2 , IL2Rgy, RAG2, IL2Rg, RAG2, IL2Rg; RAG2, IL2Rg; RAG2, DGAT, ABCG2, ACAN, AMELY, BLG, BMP 1B (FecB), DAZL, DGAT, Eif4GI, GDF8, Horn-poll locus, IGF2, CWC15, KissR/GRP54, OFD1Y, p65, PRLR, Prmd14, PRNP, Rosa, Socs2, SRY, ZFY, β -lactoglobulin, CLPG, MODY 1 (HNF4a), MODY 2 (GCK), MODY 3 (HNF1a), MODY 4 (Pdx1), MODY 5 (HNF-1 ?), MODY 6 (eurogenic differentiation 1), MODY 7 (KLF11), MODY 8 (CEL), MODY 9 (PAX4), MODY 10 (INS), MODY 11 (BLK), APC, ApoE, DMD, GHRHR, HR, HSD11B2, LDLR, NF1, NPPA, NR3C2, p53, PKD1, Rbm20, SCNNIG, tP53, DAZL, FAH, HBB, IL2RG, PDX1, PITX3, Runx1, RAG2, GGTa, DAZL, VASA, MIWI, PIWI, DCAF17, VDR, PNPLA1, HRAS, Telomerase-vert, DSP, SNRPE, RPL21, LAMA3, UROD, EDAR, OFD1, PEX7, COL3A1, ALOX12B, HLCS, NIPAL4, CERS3, ANTXR1, B3GALT6, DSG4, UBR1, CTC1, MBTPS2 , UROS, ABHD5, NOP10, ALMS1, LAMB3, EOGT, SAT1, RBPJ, ARHGAP31, ACVR1, IKBKG, LPAR6, HR, ATR, HTRA1, AIRE, BCS1L, MCCC2, DKC1, P0RCN, EBP, SL1TRK1, BTK, DOCK6, APCDD1, ZIP4, CASR, TERT, EDARADD, ATP6V0A2, PVRL1, MGP, KRT85, RAG2, RAG-1, ROR2, CLAUDIN1, ABCA12, SLA-DRA1, B4GALT7, COL7A1, NHP2, GNA11, WNT5A, USB1, LMNA, EPS8L3, NSDHL, TRPV3, KRAS, TINF2, TGM1, DCLRE1C, PKP1, WRAP53, KDM5C, ECM1, TP63, KRT14, RIPK4, PRKDC, BCL11a, BMI1, CCR5, CXCR4, DKK1, ETV2, FLI1, FLK1, GATA2, GATA4, HHEX, KIT, LMX1A, MYF5, MYOD1, MYOG, NKX2-5, NR4A2, PAX3, PDX1, PITX3, Runx1, RAG2, GGTa, HR, HANDII, TBX5, ETV2, PDX1, TBX4 ,ID2 SOX2, TTF1/NKX2-1, MESP1, GATA4, NKX2-5, FAH, PRKDC, RUNX1, FLI1, PITX3, LMX1A, DKK1, NR4A2/NURR1, FLK1, HHEX1, BCL11A, RAG2, RAG1, IL2RG, c-KIT/SCFR, BMI1, HANDII, TBX5, GATA2, DAZL, OLIG 1, OLIG2, heterozygotes thereof, homozygotes therefore, and combinations thereof; as far as not covered by a previous invention.

233. claims: 13-26

A method of making genetic edits in vitro in a vertebrate cell or embryo at a plurality of target chromosomal DNA sites comprising introducing into a vertebrate cell or embryo: a first targeted endonuclease directed to a first target chromosomal DNA site and a first homology directed repair (HDR) template homologous to the first target site sequence; and a second targeted endonuclease directed to a second target chromosomal DNA site and a second HDR template homologous to the second target site sequence, with the first HDR template sequence replacing the native chromosomal DNA sequence at the first target site and the second HDR template sequence replacing the native chromosomal DNA sequence at the second target site sequence.

234. claim: 27

A method of making multiplex gene knockouts in a primary vertebrate cell or embryo comprising introducing into the

International Application No. PCT/ US2015/ 027995

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

cell or embryo a plurality of TALENs targeted to different target genes in a presence of HDR templates with homology to said different target genes.

235. claims: 28-39

A vertebrate embryo chimeric for host cells and donor cells comprising a host embryo with a plurality of host cell genetic edits at different chromosomal DNA sites, and a donor cell integrated with the host cells to form the chimeric embryo; A vertebrate animal chimeric for host cells and donor cells comprising a plurality of host cell genetic edits at different chromosomal DNA sites, and a donor cell integrated with the host cells to form the chimeric animal.

236. claim: 40

A chimeric large vertebrate animal comprising host cells and donor cells, with the host cells comprising at least one non-meiotic gene edit to a gametogenic or spermatogenic gene that is complemented by a gene of the donor cells, with the animal comprising gametes with a genotype of the donor cells.

237. claim: 41

A chimeric large vertebrate animal comprising host cells and donor cells, with the host cells comprising at least one non-meiotic gene edit to establish a failure to thrive (FTT) host cell genotype, with the FTT genotype being complemented by the donor cells.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/027995

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013117870 A1	09-05-2013	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 スコット・シー・ファーレンクラッグ

アメリカ合衆国55406ミネソタ州ミネアポリス、イースト・トウエンティフィフス・ストリート3433番

(72)発明者 ダニエル・エフ・カールソン

アメリカ合衆国55125ミネソタ州ウッドベリー、ジュノー・アルコーブ9127番

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 BA01 CA60