

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成28年6月2日(2016.6.2)

【公表番号】特表2015-514439(P2015-514439A)

【公表日】平成27年5月21日(2015.5.21)

【年通号数】公開・登録公報2015-034

【出願番号】特願2015-509128(P2015-509128)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 N 5/00 1 0 2

【手続補正書】

【提出日】平成28年4月6日(2016.4.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

げっ歯類細胞において標的ゲノム遺伝子座を改変する方法であって、

(a) 該げっ歯類細胞中に、以下：

(i) 標的ゲノム遺伝子座またはその近傍において一本鎖切断または二本鎖切断を作製するジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、および

(ii) 上流相同性アームおよび下流相同性アームに隣接したインサート核酸を含む大きい標的化ベクター (LTVEC) であって、該インサート核酸が、約 5 kb から約 30 kb までの長さ範囲であり、該上流相同性アームおよび該下流相同性アームの総計が少なくとも 10 kb である、LTVEC、

を導入するステップ；ならびに

(b) 該標的ゲノム遺伝子座中に該インサート核酸を含む標的化されたげっ歯類細胞を選択するステップであって、該標的ゲノム遺伝子座中への該インサート核酸の組込みが、該標的ゲノム遺伝子座における、該インサート核酸による内因性核酸配列の置換を生じさせる、ステップ、

を含む、方法。

【請求項2】

原核細胞において細菌相同組換え (BHR) を介してげっ歯類の標的ゲノム遺伝子座を改変する方法であって、

(a) 該げっ歯類の該標的ゲノム遺伝子座を含む該原核細胞中に、以下：

(i) 第1の上流相同性アームおよび第1の下流相同性アームに隣接したインサート核酸を含む第1の大きい標的化ベクター (LTVEC) であって、該インサート核酸が、約 5 kb から約 30 kb までの長さの範囲であり、該第1の上流相同性アームおよび第1の下流相同性アームの総計が少なくとも 10 kb である、第1の LTVEC、および

(ii) 該標的ゲノム遺伝子座またはその近傍において一本鎖切断または二本鎖切断を作製するジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、

を導入するステップ；ならびに

(b) 該インサート核酸を含む標的化された原核細胞を選択するステップであって、該

標的ゲノム遺伝子座中への該インサート核酸の組込みが、該標的ゲノム遺伝子座における、該インサート核酸による内因性核酸配列の置換を生じさせる、ステップ、  
を含み、

ここで、該標的ゲノム遺伝子座は、第2の上流相同性アームおよび第2の下流相同性アームを含む第2のLTVEC中に存在し、

該第2の上流相同性アームおよび該第2の下流相同性アームの総計が少なくとも10kbであり、

該原核細胞が、該BHRを媒介するリコンビナーゼを発現することが可能である、方法。

【請求項3】

前記げっ歯類が、マウス、ラットまたはハムスターである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記げっ歯類細胞が多能性細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記げっ歯類細胞が誘導多能性幹(iPS)細胞、マウス胚性幹(ES)細胞、ラットES細胞、造血幹細胞、または神経幹細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記LTVECと前記ZFNとの併用が、前記LTVEC単独の使用と比較して、増加した標的化効率を生じさせ、必要に応じて、前記標的化効率が、前記LTVEC単独の使用と比較して、少なくとも2倍増加される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記第1のLTVECと前記ZFNとの併用が、前記第1のLTVEC単独の使用と比較して、増加した標的化効率を生じさせ、必要に応じて、該標的化効率が、前記第1のLTVEC単独の使用と比較して、少なくとも2倍増加される、請求項2に記載の方法。

【請求項8】

前記原核細胞が、組換えコンピテント株のE.coliである、請求項2に記載の方法。

【請求項9】

(I) 前記原核細胞が、前記リコンビナーゼをコードする核酸を含むか、または

(II) 前記原核細胞が、前記リコンビナーゼをコードする核酸を含まず、前記リコンビナーゼをコードする該核酸が、前記原核細胞中に導入される、

請求項2に記載の方法。

【請求項10】

(I) 前記ZFNが、ZFNタンパク質をコードする核酸配列を含む発現構築物であり、前記核酸が、前記細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結しているか、または

(II) 前記ZFNが、ZFNタンパク質をコードするmRNAである、  
請求項1または2に記載の方法。

【請求項11】

前記ZFNの標的配列が、前記標的ゲノム遺伝子座中のイントロン、エクソン、プロモーター、プロモーター調節領域またはエンハンサー領域中に位置付けられる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項12】

前記インサート核酸が選択カセット、レポーター遺伝子、ヒト核酸配列、または条件的対立遺伝子を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項13】

前記インサート核酸が、免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結した再編成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域核酸配列を含み、

必要に応じて、該免疫グロブリン重鎖定常領域配列が、マウス免疫グロブリン重鎖定常

領域配列、ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域配列またはそれらの組合せであり、  
必要に応じて、該免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列が、C<sub>H</sub>1、ヒンジ、C<sub>H</sub>2、  
C<sub>H</sub>3およびそれらの組合せから選択される、  
請求項1または2に記載の方法。

【請求項14】

前記インサート核酸が、軽鎖定常領域核酸配列および軽鎖定常領域核酸配列から選択されるマウスまたはヒトの免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結した再編成されていないヒトまたは軽鎖可変領域核酸配列を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項15】

前記インサート核酸が、軽鎖定常領域核酸配列および軽鎖定常領域核酸配列から選択されるマウスまたはヒトの免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結した再編成されたヒトまたは軽鎖可変領域核酸配列を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項16】

(I) 前記インサート核酸が、前記げっ歯類細胞の前記標的ゲノム遺伝子座における置換された核酸配列に対して相同な核酸配列を含むか；

(II) 前記インサート核酸が、前記げっ歯類細胞の前記標的ゲノム遺伝子座における置換された核酸配列に対してオルソロガスな核酸配列を含むか；または

(III) 前記インサート核酸が、異なる種由来の核酸配列を含む、  
請求項1に記載の方法。

【請求項17】

(I) 前記インサート核酸が、前記げっ歯類の前記標的ゲノム遺伝子座における置換された核酸配列に対して相同な核酸配列を含むか；または

(II) 前記インサート核酸が、前記げっ歯類の前記標的ゲノム遺伝子座における置換された核酸配列に対してオルソロガスな核酸配列を含む、  
請求項2に記載の方法。

【請求項18】

前記標的ゲノム遺伝子座中への前記インサート核酸の組込みが、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エクソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップまたはそれらの組合せを生じさせる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項19】

選択するステップ(b)が、対立遺伝子の改変(MOA)アッセイを介して実行される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項20】

(I) 前記LTVECが、約50kbから約75kb、約75kbから約100kb、  
約100kbから約125kb、約125kbから約150kb、約150kbから約175kb、  
約175kbから約200kb、約200kbから約225kb、約225kbから約250kb、  
約250kbから約275kb、または約275kbから約300kbであるか、あるいは

(II) 前記上流相同性アームおよび前記下流相同性アームの総計が、約10kbから約20kb、約20kbから約30kb、約30kbから約40kb、約40kbから約50kb、約50kbから約60kb、約60kbから約70kb、約70kbから約80kb、約80kbから約90kb、約90kbから約100kb、約100kbから約110kb、約110kbから約120kb、約120kbから約130kb、約130kbから約140kb、約140kbから約150kb、約150kbから約160kb、  
約160kbから約170kb、約170kbから約180kb、約180kbから約190kb、または約190kbから約200kbである、  
請求項1に記載の方法。

## 【請求項 2 1】

( I ) 前記第 1 の L T V E C が、約 50 kb から約 75 kb、約 75 kb から約 100 kb、約 100 kb から約 125 kb、約 125 kb から約 150 kb、約 150 kb から約 175 kb、約 175 kb から約 200 kb、約 200 kb から約 225 kb、約 225 kb から約 250 kb、約 250 kb から約 275 kb、または約 275 kb から約 300 kb であるか、あるいは

( I I ) 前記第 1 の上流相同性アームおよび前記第 1 の下流相同性アームの総計が、約 10 kb から約 20 kb、約 20 kb から約 30 kb、約 30 kb から約 40 kb、約 40 kb から約 50 kb、約 50 kb から約 60 kb、約 60 kb から約 70 kb、約 70 kb から約 80 kb、約 80 kb から約 90 kb、約 90 kb から約 100 kb、約 100 kb から約 110 kb、約 110 kb から約 120 kb、約 120 kb から約 130 kb、約 130 kb から約 140 kb、約 140 kb から約 150 kb、約 150 kb から約 160 kb、約 160 kb から約 170 kb、約 170 kb から約 180 kb、約 180 kb から約 190 kb、または約 190 kb から約 200 kb である、

請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 2】

前記げっ歯類細胞が多能性細胞であって、

( c ) 改変されたげっ歯類多能性細胞を

```
桑実胚期
```

の胚に導入するステップ；

( d ) 胚盤胞期まで該胚をインキュベートし、代理母に該胚を移植して F 0 げっ歯類を生成するステップ；および

( e ) 前記遺伝子改変されたゲノム遺伝子座を保有するげっ歯類を同定するステップ、をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

( c ) 遺伝子改変された第 2 の L T V E C を単離するステップ；

( d ) 該遺伝子改変された第 2 の L T V E C を前記げっ歯類の多能性細胞に導入して、目的のゲノム遺伝子座において前記インサート核酸を含む遺伝子改変された多能性細胞を生成するステップ；

( e ) 該遺伝子改変された多能性細胞を選択するステップ；

( f ) 該遺伝子改変された多能性細胞を

```
桑実胚期
```

における前記げっ歯類の宿主胚に導入するステップ；および

( g ) 該遺伝子改変された多能性細胞を含む該宿主胚を代理母に移植して、該改変された多能性細胞に由来する F 0 世代を生成するステップ、をさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

( I ) 前記げっ歯類がマウスであるか；

( I I ) 単離するステップ ( c ) が、前記遺伝子改変された第 2 の L T V E C を線状化することをさらに含むか；

( I I I ) 導入するステップ ( d ) が、ZFN を前記多能性細胞に導入することをさらに含むか；または

( I V ) 選択するステップ ( e ) が、対立遺伝子の改変 ( MOA ) アッセイを介して実行される、

請求項 2 3 に記載の方法。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 3】

一実施形態では、選択するステップ( b )および/または( e )は、本明細書に記載される対立遺伝子の改変( m o d i f i c a t i o n o f a l l e l e ) ( M O A ) アッセイを介して実行される。

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目1)

哺乳動物細胞において標的ゲノム遺伝子座を改変する方法であって、

(a) 哺乳動物細胞中に、以下：

(i) 標的ゲノム遺伝子座またはその近傍において一本鎖切断または二本鎖切断を作製するヌクレアーゼ剤、および

(ii) 上流相同性アームおよび下流相同性アームに隣接したインサート核酸を含む大きい標的化ベクター( L T V E C )、

を導入するステップ；ならびに

(b) 該標的ゲノム遺伝子座中に前記インサート核酸を含む標的化された哺乳動物細胞を選択するステップ、

を含む、方法。

(項目2)

前記哺乳動物細胞が多能性細胞である、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記哺乳動物細胞が誘導多能性幹( i P S )細胞である、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記多能性細胞がマウス胚性幹( E S )細胞である、項目2に記載の方法。

(項目5)

前記多能性細胞が造血幹細胞である、項目2に記載の方法。

(項目6)

前記多能性細胞が神経幹細胞である、項目2に記載の方法。

(項目7)

前記哺乳動物細胞がヒト線維芽細胞である、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記哺乳動物細胞が、疾患を有する患者から単離されたヒト細胞であり、該ヒト細胞が、そのゲノム中に少なくとも1つのヒト疾患対立遺伝子を含む、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記標的ゲノム遺伝子座中への前記インサート核酸の組込みが、前記ゲノム中の前記少なくとも1つのヒト疾患対立遺伝子を置換する、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記 L T V E C と前記ヌクレアーゼ剤との併用が、前記 L T V E C 単独の使用と比較して、増加した標的化効率を生じさせる、項目1に記載の方法。

(項目11)

前記 L T V E C の前記標的化効率が、前記 L T V E C 単独の使用と比較して、少なくとも2倍増加される、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記ヌクレアーゼ剤が、ヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む発現構築物であり、前記核酸が、前記哺乳動物細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結している、項目1に記載の方法。

(項目13)

前記ヌクレアーゼ剤が、ヌクレアーゼをコードする m R N A である、項目1に記載の方法。

(項目14)

前記ヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼ( Z F N )である、項目12に記載の方法。

(項目15)

前記スクレアーゼが転写アクチベータ様エフェクタースクレアーゼ( T A L E N )である、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 1 6 )

前記スクレアーゼがメガスクレアーゼである、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 1 7 )

前記スクレアーゼ剤の標的配列が、前記標的ゲノム遺伝子座中のイントロン、エクソン、プロモーター、プロモーター調節領域またはエンハンサー領域中に位置付けられる、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 8 )

前記上流相同性アームおよび前記下流相同性アームの総計が少なくとも 1 0 k b である、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 9 )

前記インサート核酸が、約 5 k b から 3 0 0 k b までの範囲の長さである、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 0 )

前記インサート核酸が選択カセットを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 1 )

前記インサート核酸がレポーター遺伝子を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 2 )

前記標的ゲノム遺伝子座中への前記インサート核酸の組込みが、前記標的ゲノム遺伝子座における内因性遺伝子の欠失を生じさせる、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 3 )

前記標的ゲノム遺伝子座中への前記インサート核酸の組込みが、前記標的ゲノム遺伝子座における外因性配列の付加を生じさせる、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 4 )

前記標的ゲノム遺伝子座中への前記インサート核酸の組込みが、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エクソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップまたはそれらの組合せを生じさせる、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 5 )

前記インサート核酸が、ヒト核酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 6 )

前記インサート核酸が、免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結した再編成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域核酸配列を含む、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7 )

前記免疫グロブリン重鎖定常領域配列が、マウス免疫グロブリン重鎖定常領域配列、ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域配列またはそれらの組合せである、項目 2 6 に記載の方法。

。

(項目 2 8 )

前記免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列が、C<sub>H</sub> 1、ヒンジ、C<sub>H</sub> 2、C<sub>H</sub> 3 およびそれらの組合せから選択される、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 9 )

前記インサート核酸が、軽鎖定常領域核酸配列および軽鎖定常領域核酸配列から選択されるマウスまたはヒトの免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結した再編成されていないヒト または 軽鎖可変領域核酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 0 )

前記インサート核酸が、軽鎖定常領域核酸配列および軽鎖定常領域核酸配列から選択されるマウスまたはヒトの免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結した再編成されたヒト または 軽鎖可変領域核酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 1 )

選択するステップ( b )が、対立遺伝子の改変( M O A )アッセイを介して実行される、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 2 )

前記インサート核酸が、前記哺乳動物細胞のゲノム中の核酸配列に対して相同な核酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 3 )

前記インサート核酸が、前記哺乳動物細胞のゲノム中の核酸配列に対してオルソロガスな核酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 4 )

前記インサート核酸が、異なる種由来の核酸配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 5 )

前記標的化された哺乳動物細胞が、そのゲノム中に、約 5 k b から約 3 0 0 k b までの範囲の前記インサート核酸を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 6 )

原核細胞において細菌相同組換え( B H R )を介して哺乳動物の標的ゲノム遺伝子座を改変する方法であって、

( a ) 哺乳動物の標的ゲノム遺伝子座を含む原核細胞中に、以下：

( i ) 第 1 の上流相同性アームおよび第 1 の下流相同性アームに隣接したインサート核酸を含む標的化ベクター、および

( i i ) 前記標的ゲノム遺伝子座またはその近傍において一本鎖切断または二本鎖切断を作製するヌクレアーゼ剤、

を導入するステップ、ならびに

( b ) 前記インサート核酸を含む標的化された原核細胞を選択するステップ、を含み、

ここで、前記標的ゲノム遺伝子座は、第 2 の上流相同性アームおよび第 2 の下流相同性アームを含む大きい標的化ベクター( L T V E C )中に存在し、

前記原核細胞が、前記 B H R を媒介するリコンビナーゼを発現することが可能である、方法。

(項目 3 7 )

前記哺乳動物がヒトである、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8 )

前記哺乳動物がげっ歯類である、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 9 )

前記げっ歯類が、マウス、ラットまたはハムスターである、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0 )

前記標的化ベクターと前記ヌクレアーゼ剤との併用が、前記標的化ベクター単独の使用と比較して、増加した標的化効率を生じさせる、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 4 1 )

前記標的化効率が、前記標的化ベクター単独の使用と比較して、少なくとも 2 倍増加される、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2 )

前記原核細胞が、組換えコンピテント株の E . c o l i である、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 4 3 )

前記原核細胞が、前記リコンビナーゼをコードする核酸を含む、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 4 4 )

前記原核細胞が、前記リコンビナーゼをコードする核酸を含まず、前記リコンビナーゼをコードする該核酸が、前記原核細胞中に導入される、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 4 5 )

前記ヌクレアーゼ剤が、ヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む発現構築物であり、該核酸が、前記原核細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結している、項目36に記載の方法。

(項目46)

前記ヌクレアーゼ剤が、ヌクレアーゼをコードするmRNAである、項目36に記載の方法。

(項目47)

前記ヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)である、項目45に記載の方法。

(項目48)

前記ヌクレアーゼが転写アクチベータ様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)である、項目45に記載の方法。

(項目49)

前記ヌクレアーゼがメガヌクレアーゼである、項目45に記載の方法。

(項目50)

前記ヌクレアーゼ剤の標的配列が、前記標的ゲノム遺伝子座中のイントロン、エクソン、プロモーター、プロモーター調節領域またはエンハンサー領域中に位置付けられる、項目36に記載の方法。

(項目51)

前記第2の上流相同性アームおよび前記第2の下流相同性アームの総計が少なくとも10kbである、項目36に記載の方法。

(項目52)

前記インサート核酸が、約5kbから300kbまでの範囲の長さである、項目36に記載の方法。

(項目53)

前記インサート核酸が選択カセットを含む、項目36に記載の方法。

(項目54)

前記インサート核酸がレポーター遺伝子を含む、項目36に記載の方法。

(項目55)

前記標的ゲノム遺伝子座中への前記インサート核酸の組込みが、前記標的ゲノム遺伝子座における内因性遺伝子の欠失を生じさせる、項目36に記載の方法。

(項目56)

前記標的ゲノム遺伝子座中への前記インサート核酸の組込みが、前記標的ゲノム遺伝子座における外因性配列の付加を生じさせる、項目36に記載の方法。

(項目57)

前記標的ゲノム遺伝子座中への前記インサート核酸の組込みが、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エクソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップまたはそれらの組合せを生じさせる、項目36に記載の方法。

(項目58)

前記インサート核酸が、ヒト核酸配列である、項目36に記載の方法。

(項目59)

前記インサート核酸が、免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結した再編成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域核酸配列を含む、項目58に記載の方法。

(項目60)

前記免疫グロブリン重鎖定常領域配列が、マウス免疫グロブリン重鎖定常領域配列、ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域配列またはそれらの組合せである、項目59に記載の方法。

(項目61)

前記免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列が、C<sub>H</sub>1、ヒンジ、C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3および

それらの組合せから選択される、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 2 )

前記インサート核酸が、 軽鎖定常領域核酸配列および 軽鎖定常領域核酸配列から選択されるマウスまたはヒトの免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結した再編成されていないヒト または 軽鎖可変領域核酸配列を含む、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 6 3 )

前記インサート核酸が、 軽鎖定常領域核酸配列および 軽鎖定常領域核酸配列から選択されるマウスまたはヒトの免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結した再編成されたヒト または 軽鎖可変領域核酸配列を含む、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 6 4 )

選択するステップ ( b ) が、対立遺伝子の改変 ( M O A ) アッセイを介して実行される、項目 3 6 に記載の方法。