

【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26年2月27日(2014.2.27)

【公表番号】特表2013-535202(P2013-535202A)

【公表日】平成25年9月12日(2013.9.12)

【年通号数】公開・登録公報2013-049

【出願番号】特願2013-521899(P2013-521899)

【国際特許分類】

A 01 K 67/027 (2006.01)  
C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

A 01 K 67/027  
C 12 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成26年1月10日(2014.1.10)

【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】

非ヒト脊椎動物宿主において導入された免疫グロブリン領域を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト脊椎動物であって、

前記導入された領域がヒト免疫グロブリン可変領域コード配列および非ヒト脊椎動物宿主の内在性免疫グロブリン可変領域遺伝子座に基づいた非コード配列を含む、トランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【請求項2】

非ヒト脊椎動物宿主の免疫グロブリン可変領域遺伝子座における内在性可変遺伝子の一部または全部が除去される、

請求項1に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【請求項3】

導入される免疫グロブリン領域遺伝子座がヒトのV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>、およびJ<sub>H</sub>コード配列を含み、または、V<sub>L</sub>およびJ<sub>L</sub>コード配列を含み前記Lはまたはに関連する

請求項1または2に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【請求項4】

前記非ヒト脊椎動物宿主が齧歯類である、

請求項1～3のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【請求項5】

前記非ヒト脊椎動物宿主がマウスである、

請求項1～4のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【請求項6】

請求項1に記載のトランスジェニック脊椎動物を產生する方法であって、

a) 1以上の部位特異的リコンビナーゼのための2以上の標的部位を非ヒト脊椎動物細胞内に導入し、前記細胞のゲノムにおいて内在性免疫グロブリン可変遺伝子を含むゲノム領域の上流の少なくとも1つの部位と、内在性免疫グロブリン可変遺伝子を含むゲノム領域の下流の少なくとも1つの部位とを統合する導入ステップであって、前記内在性免疫グロブリン可変遺伝子セグメントは、V、D、およびJ遺伝子セグメント、または、Vおよ

び J 遺伝子セグメントを含む、導入ステップ；

b ) 部位特異的組換え部位に挟まれた、ヒトコード配列と、内在性免疫グロブリン可変領域遺伝子座に基づいた非コード配列とを含む部分的ヒト免疫グロブリン可変領域を含むベクターを提供する提供ステップであって、前記組換え部位は、前記ステップ a ) において脊椎動物細胞に導入された前記部位と組換え可能である、提供ステップ；

c ) 前記ステップ b ) の前記ベクターと、その中のリコンビナーゼ部位を認識できる部位特異的リコンビナーゼとを導入するステップ；

d ) 前記細胞のゲノムと前記部分的ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子座との間で組換え事象が起こることを可能にし、結果的に前記内在性免疫グロブリン可変領域遺伝子座と前記部分的ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子座との置換を生じさせるステップ；

e ) 前記ステップ d ) において作成された、部分的ヒト免疫グロブリン領域を含む細胞を選択するステップ；および

f ) 前記細胞を利用して、部分的ヒト免疫グロブリン領域を含むトランスジェニック動物を作り出すステップ；

を含む、方法。

【請求項 7】

前記導入ステップの後且つ前記提供ステップの前に、第 1 組の部位特異的組換え部位を認識するリコンビナーゼの導入により内在性免疫グロブリン領域の一部を欠失するステップをさらに含み、前記ゲノムにおける前記欠失は、互いに組換えができない第 2 組の部位特異的組換え部位を残す、

請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞が哺乳類胚性幹 ( E S ) 細胞である、

請求項 6 または 7 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 9 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 9 8】

形質移入クローンを G 4 1 8 選択にかけ、リコンビナーゼ - 仲介カセット交換方法を受けた細胞のクローンをリッチ化する。リコンビナーゼ - 仲介カセット交換方法により、部分的ヒトドナー D N A ( 8 0 9 ) が全体として、 1 0 × P 部位と 1 0 × 5 1 7 1 部位との間の欠失された免疫グロブリン重鎖遺伝子座に組込まれて、 8 1 1 に図示された D N A 領域が作り出される。 5 ' ベクター ( 8 0 3 ) 由来の残りの要素が、 F L P - 仲介組換え ( 8 0 6 ) で除去されて、結果的に、 8 1 3 に示す最終的なヒト化遺伝子座が生じる。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 4】

E S 細胞クローンであって、それらの免疫グロブリン 鎖遺伝子座の 2 つの相同コピーの一方における配列が欠失された E S 細胞クローンに、 V 、 D および J 領域遺伝子セグメントを含む部分的ヒト免疫グロブリン 遺伝子座を含む D N A 片 ( 9 0 9 ) と、 C r e リコンビナーゼ発現ベクターとを用いて、再形質移入する ( 9 0 4 ) 。この D N A 片 ( 「 K - K 」 と呼ばれる ) の重要な特徴は以下の通りである： 1 0 × 5 1 7 1 部位；ネオマイシン耐性遺伝子オープンリーディングフレーム ( イニシエータメチオニンコドンを欠くが、インフレームであり 1 0 × 5 1 7 1 部位における連続したオープンリーディングフレームと隣接している ) ；転写終結 / ポリアデニル化配列； F R T 部位； 3 9 のヒト 可変領域

遺伝子セグメントのアレイであって、それぞれ、マウス非コード配列に組込まれたヒトコード配列から成る。；マウス鎖遺伝子座におけるJ領域遺伝子セグメントの集団のすぐ上流由来の13.5KbのゲノムDNA片；マウス非コードDNAに組込まれた5つのヒトJ領域遺伝子セグメントを含む2KbのDNA片；10×5171部位と逆相対配向の10×P部位。

#### 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0115

【補正方法】変更

【補正の内容】

#### 【0115】

第2の独立した実験では、K-K DNAの代わりに部分的ヒトDNAの代替片(909)を使用する。このDNA(「L-K」と呼ばれる)の重要な特徴は以下の通りである：10×5171部位；ネオマイシン耐性遺伝子オーブンリーディングフレーム(イニシエータメチオニンコドンを欠くが、インフレームであり10×5171部位における連続したオーブンリーディングフレームと隣接している)；転写終結/ポリアデニル化配列；FR T部位；38のヒト可変領域遺伝子セグメントのアレイであって、それぞれ、マウス非コード配列に組込まれたヒトコード配列から成る。；マウス鎖遺伝子座におけるJ領域遺伝子セグメントの集団のすぐ上流由来の13.5KbのゲノムDNA片；マウス非コードDNAに組込まれた5つのヒトJ領域遺伝子セグメントを含む2KbのDNA片；10×5171部位と逆相対配向の10×P部位。

#### 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

【補正方法】変更

【補正の内容】

#### 【0116】

K-KおよびL-K形質移入実験からの形質移入クローンをG418選択にかけ、リコンビナーゼ-仲介カセット交換方法を受けていた細胞のクローンをリッチ化する。リコンビナーゼ-仲介カセット交換方法により、部分的ヒトドナーDNAが全体として、10×P部位と10×5171部位(それぞれ3'ベクター(905)および5'ベクター(903)によって配置された)との間の、欠失された免疫グロブリン鎖遺伝子座に組込まれる。K-K配列を使用して作り出されたDNA領域を図9の911に図示する。5'ベクター(903)由来の残りの要素を、FLP-仲介組換え(906)で除去し、結果的に、913に示す最終的なヒト化遺伝子座を生じる。

#### 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0128

【補正方法】変更

【補正の内容】

#### 【0128】

免疫グロブリン鎖遺伝子座の2つの相同コピーの一方に欠失を有するES細胞クローンに、V、JおよびC領域遺伝子セグメントを含む部分的ヒト免疫グロブリン鎖遺伝子座を含むDNA片(1007)と、Creリコンビナーゼ発現ベクターとを用いて、再形質移入する(1004)。このDNA片(1007)の重要な特徴は以下の通りである：10×5171部位；ネオマイシン耐性遺伝子オーブンリーディングフレーム(イニシエータメチオニンコドンを欠くが、インフレームであり10×5171部位における連続したオーブンリーディングフレームと隣接している)；転写終結/ポリアデニル化配列；FR T部位；38のヒト可変領域遺伝子セグメントのアレイであって、それぞれ、マウス非コード配列に組込まれたヒトコード配列から成る；J~Cユニットのアレイであつ

て、マウス 遺伝子座由来の非コード配列内に組込まれたヒト J 領域遺伝子セグメントおよびマウス 定常ドメイン遺伝子セグメントから成る（ヒト J 領域遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 6 および J 7 をコード化するものであるが、マウス 定常ドメイン遺伝子セグメントは、C 1 および / または C 2 および / または C 3 である）；「F 3」部位として知られる F 1 p リコンビナーゼ用の変異型認識部位；ハイグロマイシン耐性を与えるオープンリーディングフレーム；そのオープンリーディングフレームは、構築物において、情報をコードしている免疫グロブリン遺伝子セグメントに関してアンチセンス鎖上に位置する；1 o x 5 1 7 1 部位と逆相対配向の 1 o x P 部位。