【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25年11月7日(2013.11.7)

【公表番号】特表2013-505013(P2013-505013A)
【公表日】平成25年2月14日(2013.2.14)
【年通号数】公開・登録公報2013-008
【出願番号】特願2012-529354(P2012-529354)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)
Ｃ１２Ｐ　21/02　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ｃ１２Ｎ　5/00　１０２
Ｃ１２Ｐ　21/02　Ｃ

【手続補正書】
【提出日】平成25年9月19日(2013.9.19)
【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】
導入遺伝子発現のための方法であって：
（ａ）真核生物、好ましくは、ほ乳類宿主細胞を提供し（ここで、前記宿主細胞は、相同性組換え（ＨＲ）の増大、非相同的末端結合（ＮＨＥＪ）の減少および／または前記細胞におけるＨＲ／ＮＨＥＪ比の増強のために修飾または処理されている）、そして
（ｂ）前記細胞を、
前記導入遺伝子を含む少なくとも１つのベクター、およびマトリックス付着領域（ＭＡＲ）エレメント（ここで、前記ＭＡＲエレメントは前記導入遺伝子にシスまたはトランスで提供される）
でトランスフェクトすることを含む、方法。
【請求項２】
前記（ｂ）におけるトランスフェクションが後続トランスフェクションであり、ベクターまたは核酸フラグメントなどの核酸での初期トランスフェクションが先行する、請求項１記載の方法。
【請求項３】
前記細胞の集団の３０％超がＧ１期にある場合、前記初期および後続トランスフェクションがある時点で起こる、請求項２記載の方法。
【請求項４】
前記初期トランスフェクションの前記核酸が、導入遺伝子を含む少なくとも１つのベクターであり、前記初期トランスフェクションの少なくとも１つの前記ベクターおよび前記少なくとも１つの後続トランスフェクションの少なくとも１つのベクターが前記細胞のゲノム中への組み込み前および／または組み込み後に１つまたはそれ以上のコンカテマー構造を形成する、請求項２または３に記載の方法。
【請求項５】
前記細胞の前記ＨＲ／ＮＨＥＪ比が、前記トランスジェニック配列を含まず、突然変異

していない前記細胞において見いだされる比よりもそれぞれ２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０倍まで高いか、または前記ＮＨＥＪの活性が０に等しい、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記少なくとも１つの初期トランスフェクションがシングルトランスフェクションである、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記初期トランスフェクションの前記核酸が、ＭＡＲエレメントおよび前記導入遺伝子を含むベクターであり、前記初期トランスフェクション後に、前記導入遺伝子の前記発現が初期レベルに達し、前記後続トランスフェクション後の前記導入遺伝子の前記発現が、付加的であるよりも高い後続レベルに達し、好ましくは１回の後続トランスフェクション後に、前記初期レベルの２倍、３倍または４倍を越える後続レベルに達する、請求項６記載の方法。
【請求項８】
前記（ａ）における核酸が、ＭＡＲエレメントおよび前記導入遺伝子を含むベクターであり、前記初期トランスフェクション後に、前記細胞のゲノム中に組み込まれる前記導入遺伝子のコピー数が（ｎ）に等しく、前記少なくとも１つの後続トランスフェクション後に、前記ゲノム中に組み込まれる前記導入遺伝子コピー数が２（ｎ）、３（ｎ）または４（ｎ）を越える、請求項６記載の方法。
【請求項９】
前記少なくとも１つの第１トランスフェクションの前記ベクターのベクター配列が、前記後続トランスフェクション（複数可）の少なくとも第１のもののベクターのベクター配列と１００％または少なくとも９５％、９０％、８５％もしくは８０％の配列同一性を有する、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記初期トランスフェクションの前記ベクターがＭＡＲエレメントを含み、前記ＭＡＲエレメントが前記後続トランスフェクション（複数可）の少なくとも第１のもののベクターの前記ＭＡＲエレメントと１００％または少なくとも９５％、９０％、８５％もしくは８０％の配列同一性を有する、請求項２～９のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
前記初期トランスフェクションの前記ベクターが導入遺伝子を含み、前記導入遺伝子が前記後続トランスフェクション（複数可）の少なくとも第１のもののベクターの導入遺伝子と１００％または少なくとも９５％、９０％、８５％もしくは８０％の配列同一性を有する、請求項２～１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
前記ＭＡＲエレメントが前記導入遺伝子のプロモーター／エンハンサー配列の上流に位置する、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記ＭＡＲ配列が配列番号１～３と少なくとも９０％の配列同一性を有するか、またはその変異体である、前記請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
（ａ）ＮＨＥＪサプレッサー、たとえばＮＵ７０２６および／またはワートマニンを発現するトランスジェニック配列、
（ｂ）たとえばＲａｄ　５１、Ｒａｄ　５２、ＲｅｃＡ、Ｒａｄ　５４、ＲｕｖＣもしくはＢＲＣＡ２といった１つまたはそれ以上のＨＲ酵素またはたとえばＲＳ－１といったＨＲアクチベーターを発現するトランスジェニック配列、
（ｃ）ＮＨＥＪ遺伝子を不活性化または下方調節する突然変異、たとえば、ｘｒｃｃ４遺伝子、ＲＡＤ５１鎖トランスフェラーゼ遺伝子、ＤＮＡ依存性タンパク質キナーゼ遺伝子、Ｒａｄ５２遺伝子、ＲｅｃＡ遺伝子、Ｒａｄ５４遺伝子、ＲｕｖＣ遺伝子および／または、ＢＲＣＡ２遺伝子における突然変異ならびに／または

（ｄ）ＨＲ酵素、ＨＲアクチベーターもしくはＮＨＥＪサプレッサーの発現もしくは活性を増強する突然変異、たとえば、ＲＡＤ５１鎖トランスフェラーゼ遺伝子、ＤＮＡ依存性タンパク質キナーゼ遺伝子、Ｒａｄ５２遺伝子、ＲｅｃＡ遺伝子、Ｒａｄ５４遺伝子、ＲｕｖＣ遺伝子および／または、ＢＲＣＡ２遺伝子における突然変異、ならびに
前記細胞の前記ゲノム中に組み込まれた導入遺伝子
を含む組換え真核生物、好ましくはほ乳類宿主細胞であって、
（ａ）および／または（ｂ）の前記トランスジェニック配列を含まない前記細胞において見いだされる比よりも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０倍よりも高いＨＲ／ＮＨＥＪ比を有し、
マトリックス付着領域（ＭＡＲ）エレメントを含む、
組換え真核生物の宿主細胞。

【請求項１５】

前記導入遺伝子が前記細胞のゲノムの１つの座中に組み入れられ、そしてコンカテマー構造、好ましくは、少なくとも２００、３００、４００、５００または６００コピーの前記導入遺伝子を含むコンカテマー構造を形成する、請求項１４記載の細胞。

【請求項１６】

前記少なくとも１つのＭＡＲエレメントが配列番号１～３と少なくとも９０％の配列同一性を有するか、または配列番号１～３の変異体である、請求項１４または１５に記載の細胞。

【請求項１７】

前記ＭＡＲエレメントが前記導入遺伝子のプロモーター／エンハンサー配列の上流に位置する、請求項１４～１６のいずれかに記載の細胞。

【請求項１８】

前記導入遺伝子の発現における請求項１４～１７のいずれかに記載のいずれか１つの組換え真核生物宿主細胞の使用。

【請求項１９】

ａ．第１容器中に、場合によってＭＡＲエレメントおよび前記ベクター中への導入遺伝子の組み込みのための制限部位を含むベクター、
ｂ．第２容器中に、請求項１４～１７のいずれかに記載の組換え真核生物宿主細胞、および
ｃ．導入遺伝子発現のために前記細胞をトランスフェクトする際の前記ベクターの使用法の説明書
を含むキット。