

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6688231号  
(P6688231)

(45) 発行日 令和2年4月28日(2020.4.28)

(24) 登録日 令和2年4月7日(2020.4.7)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 0 0
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0
A O 1 K 67/027 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
	A O 1 K 67/027

請求項の数 38 (全 77 頁)

(21) 出願番号	特願2016-571271 (P2016-571271)	(73) 特許権者	597160510
(86) (22) 出願日	平成27年6月5日(2015.6.5)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2017-520243 (P2017-520243A)		・インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成29年7月27日(2017.7.27)		REGENERON PHARMACEU
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/034503		TICALS, INC.
(87) 国際公開番号	W02015/188109		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(87) 国際公開日	平成27年12月10日(2015.12.10)		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
審査請求日	平成30年5月18日(2018.5.18)		・ミル・リバー・ロード777番
(31) 優先権主張番号	62/008,832	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成26年6月6日(2014.6.6)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	62/017,916		
(32) 優先日	平成26年6月27日(2014.6.27)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的遺伝子座を修飾するための方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞内の標的遺伝子座の連続的修飾方法であって、

( a ) 前記標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、前記標的遺伝子座が、( 1 ) 第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする核酸、および( 2 ) 第1ヌクレアーゼ剤のための第1ヌクレアーゼ認識部位を含む第1選択カセットを含み、前記第1ヌクレアーゼ認識部位は、前記第1選択マーカをコードする領域又は前記第1選択マーカのいずれかの非タンパク質コード領域に位置する、工程と、

( b ) 前記細胞に、

( i ) 前記第1ヌクレアーゼ剤又は前記第1ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドであって、前記第1ヌクレアーゼ剤は、前記第1ヌクレアーゼ認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する、第1ヌクレアーゼ剤又はポリヌクレオチドと、

( i i ) 前記標的遺伝子座に位置する第1標的部位に対応する第1ホモロジーアームおよび前記標的遺伝子座に位置する第2標的部位に対応する第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲティングベクターであって、前記第1挿入ポリヌクレオチドは、( 1 ) 第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードする核酸、および( 2 ) 第2ヌクレアーゼ剤のための第2ヌクレアーゼ認識部位を含む第2選択カセットを含み、前記第1選択マーカと前記第2選択マーカが異なり、前記第1ヌクレアーゼ剤が前記第2ヌクレアーゼ剤と異なり、前記第2ヌクレアーゼ認識部位は、前記第2選択マーカをコードする領域又は前記第2選択マーカのいずれか

10

20

の非タンパク質コード領域に位置する、第 1 ターゲティングベクターと、  
を導入する工程と、

(c) 前記標的遺伝子座に前記第 1 挿入ポリヌクレオチドを含む修飾された細胞を同定する工程であって、前記修飾された細胞は、前記第 2 選択マーカの活性を有するが、前記第 1 選択マーカの活性を有しない、工程と、

(d) 前記修飾された細胞に、

(i) 前記第 2 ヌクレアーゼ剤又は前記第 2 ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドであって、前記第 2 ヌクレアーゼ剤は、前記第 2 ヌクレアーゼ認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する、第 2 ヌクレアーゼ剤又はポリヌクレオチドと、

(i i) 前記標的遺伝子座に位置する第 3 標的部位に対応する第 3 ホモロジーアームおよび前記標的遺伝子座に位置する第 4 標的部位に対応する第 4 ホモロジーアームに隣接する第 2 挿入ポリヌクレオチドを含む第 2 ターゲティングベクターであって、前記第 2 挿入ポリヌクレオチドは、(1) 第 3 選択マーカをコードする核酸、および(2) 第 3 ヌクレアーゼ剤のための第 3 ヌクレアーゼ認識部位を含む第 3 選択カセットを含み、前記第 1 選択マーカと前記第 3 選択マーカが同一であり、前記第 3 ヌクレアーゼ認識部位は、前記第 1 ヌクレアーゼ認識部位と同一であって、前記第 2 ヌクレアーゼ認識部位とは異なり、かつ、前記第 1 ヌクレアーゼ剤と前記第 3 ヌクレアーゼ剤とが互いに同一であって、前記第 2 ヌクレアーゼ剤とは異なる、第 2 ターゲティングベクターと、  
を導入する工程と、

(e) 前記標的遺伝子座に組み込まれた前記第 2 挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの細胞を同定する工程であって、前記少なくとも 1 つの細胞は、前記第 3 選択マーカの活性を有するが、前記第 2 選択マーカの活性を有しない、工程と、  
を含む、方法。

#### 【請求項 2】

(I) 前記同定する工程(c)が、

(i) 前記第 1 選択マーカの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で前記細胞を培養すること、又は

(i i) 前記第 1 及び第 2 標的部位に組み込まれた前記第 1 挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの細胞を同定すること、を含む、かつ/又は

(II) 前記同定する工程(e)が、

(i) 前記第 2 選択マーカの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で前記細胞を培養すること、又は

(i i) 前記第 3 及び第 4 標的部位に組み込まれた前記第 2 挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの細胞を同定すること、を含む、

請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 3】

前記同定する工程(c)が対立遺伝子の修飾(MOA)アッセイを経て実施される、かつ/又は前記同定する工程(e)がMOAアッセイを経て実施される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

#### 【請求項 4】

工程(a)の第 1 選択カセットが、前記第 1 標的部位と前記第 2 標的部位に隣接しており、かつ/又は、工程(c)の前記修飾された細胞における前記第 2 選択カセットが、前記第 3 標的部位及び前記第 4 標的部位に隣接している、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 5】

前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 選択マーカが、抗生物質耐性を付与し、

任意選択で、前記抗生物質が、G418、ハイグロマイシン、プラスチジン、ネオマイシン又はピューロマイシンを含み、

任意選択で、前記第 1 および前記第 3 選択マーカがネオマイシン耐性を付与し、かつ前記第 2 選択マーカがハイグロマイシン耐性を付与するか、又は前記第 1 および前記第

10

20

30

40

50

3 選択マーカがハイグロマイシン耐性を付与し、かつ前記第 2 選択マーカがネオグロマイシン耐性を付与する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 選択マーカが、誘導性プロモーターに作動可能に連結され、前記選択マーカの発現が、前記細胞に対して毒性であり、

任意選択で、前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 選択マーカが、ヒポキサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-TK) を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1ヌクレアーゼ剤と前記第 1ターゲッティングベクターとの併用により、前記第 1ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、ターゲッティング効率の向上をもたらす、

任意選択で、前記第 1ターゲッティングベクターの前記ターゲッティング効率が、前記第 1ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、少なくとも 2 倍向上している、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1ヌクレアーゼ認識部位が、前記第 1選択マーカのイントロン、エキソン、プロモーター、プロモーター調節領域又はエンハンサー領域に位置しており、前記第 2ヌクレアーゼ認識部位が、前記第 2選択マーカのイントロン、エキソン、プロモーター、プロモーター調節領域又はエンハンサー領域に位置している、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 1ヌクレアーゼ剤、前記第 2ヌクレアーゼ剤又は前記第 3ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ剤をコードする核酸配列を含む発現コンストラクトを含み、前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記核酸配列が、前記細胞内で活性化プロモーターに作動可能に連結されているか、又は前記第 1ヌクレアーゼ剤、前記第 2ヌクレアーゼ剤又は前記第 3ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ剤をコードする mRNA を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1ヌクレアーゼ剤、前記第 2ヌクレアーゼ剤又は前記第 3ヌクレアーゼ剤が、  
 (I) ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、  
 (II) 転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、  
 (III) メガヌクレアーゼ、又は  
 (IV) クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列 (CRISPR) - 関連 (Cas) タンパク質及びガイド RNA (gRNA) である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1ヌクレアーゼ剤、前記第 2ヌクレアーゼ剤又は前記第 3ヌクレアーゼ剤が、前記ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) であり、前記第 1ヌクレアーゼ認識部位、前記第 2ヌクレアーゼ認識部位又は前記第 3ヌクレアーゼ認識部位が、配列番号 9 ~ 12 のいずれか 1 つを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 1ヌクレアーゼ剤、前記第 2ヌクレアーゼ剤又は前記第 3ヌクレアーゼ剤が、前記 Cas タンパク質及び前記 gRNA であり、前記 Cas タンパク質が、Cas 9 であり、前記 gRNA が、

(I) プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列に直接隣接している前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 ヌクレアーゼ認識部位 を標的とする、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列 (CRISPR) RNA (crRNA) と、

(II) トランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) と、を含み、

任意選択で、前記標的遺伝子座が、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、

10

20

30

40

50

請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 g R N A が、配列番号 1 3 ~ 2 0 のいずれか 1 つを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記 g R N A が、配列番号 2、3、4、5、6、7 又は 8 を含み、任意選択で、前記ガイド R N A が、配列番号 3 又は 7 を含む、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記第 1 ヌクレアーゼ剤が前記 C a s タンパク質及び第 1 g R N A を含み、前記第 2 ヌクレアーゼ剤が前記 C a s タンパク質及び第 2 g R N A を含み、前記第 1 g R N A と前記第 2 ヌクレアーゼ剤とが異なる、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

前記第 1 選択マーカがネオマイシン耐性を付与し、前記第 1 ヌクレアーゼ剤がジンクフィンガーヌクレアーゼであり、かつ前記第 1 ヌクレアーゼ認識部位が配列番号 9 又は 1 0 を含み、前記第 2 選択マーカがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第 2 ヌクレアーゼ剤がジンクフィンガーヌクレアーゼであり、かつ前記第 2 ヌクレアーゼ認識部位が配列番号 1 1 又は 1 2 を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記第 1 選択マーカがネオマイシン耐性を付与し、前記第 1 ヌクレアーゼ剤が C a s 9 タンパク質および配列番号 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 つを含むガイド R N A であり、前記第 2 選択マーカがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第 2 ヌクレアーゼ剤が C a s 9 タンパク質および配列番号 1 7 ~ 2 0 のいずれか 1 つを含むガイド R N A であり、

20

任意選択で、前記第 1 選択マーカがネオマイシン耐性を付与し、前記第 1 ヌクレアーゼ剤が前記 C a s 9 タンパク質および配列番号 1 3 を含む前記ガイド R N A であり、前記第 2 選択マーカがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第 2 ヌクレアーゼ剤が前記 C a s 9 タンパク質および配列番号 1 7 を含む前記ガイド R N A である、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記第 1 選択マーカがネオマイシン耐性を付与し、前記第 1 ヌクレアーゼ剤がジンクフィンガーヌクレアーゼであり、かつ前記第 1 ヌクレアーゼ認識部位が配列番号 9 又は 1 0 を含み、前記第 2 選択マーカがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第 2 ヌクレアーゼ剤がジンクフィンガーヌクレアーゼであり、かつ前記第 2 ヌクレアーゼ認識部位が配列番号 1 1 又は 1 2 を含み、前記第 3 選択マーカがネオマイシン耐性を付与し、前記第 3 ヌクレアーゼ剤がジンクフィンガーヌクレアーゼであり、かつ前記第 3 ヌクレアーゼ認識部位が配列番号 9 又は 1 0 を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

30

【請求項 1 9】

前記第 1 選択マーカがネオマイシン耐性を付与し、前記第 1 ヌクレアーゼ剤が C a s 9 タンパク質および配列番号 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 つを含むガイド R N A であり、前記第 2 選択マーカがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第 2 ヌクレアーゼ剤が C a s 9 タンパク質および配列番号 1 7 ~ 2 0 のいずれか 1 つを含むガイド R N A であり、前記第 3 選択マーカがネオマイシン耐性を付与し、前記第 3 ヌクレアーゼ剤が C a s 9 タンパク質および配列番号 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 つを含むガイド R N A であり、

40

任意選択で、前記第 1 選択マーカがネオマイシン耐性を付与し、前記第 1 ヌクレアーゼ剤が前記 C a s 9 タンパク質および配列番号 1 3 を含む前記ガイド R N A であり、前記第 2 選択マーカがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第 2 ヌクレアーゼ剤が前記 C a s 9 タンパク質および配列番号 1 7 を含む前記ガイド R N A であり、前記第 3 選択マーカがネオマイシン耐性を付与し、前記第 3 ヌクレアーゼ剤が前記 C a s 9 タンパク質および配列番号 1 3 を含む前記ガイド R N A である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

50

(I) 前記第 1 標的部位及び前記第 2 標的部位が、前記第 1 ヌクレアーゼ認識部位に直接隣接している、

(II) 前記第 1 標的部位及び前記第 2 標的部位が、前記第 1 ヌクレアーゼ認識部位から約 10 ヌクレオチド～約 14 kb に位置しているか、

(III) 前記第 3 標的部位及び前記第 4 標的部位が、前記第 2 ヌクレアーゼ認識部位に直接隣接しているか、又は

(IV) 前記第 3 標的部位及び前記第 4 標的部位が、前記第 2 ヌクレアーゼ認識部位から約 10 ヌクレオチド～約 14 kb に位置している、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

(I) 前記第 1 ホモロジーアームと前記第 2 ホモロジーアームの合計が、少なくとも約 10 kb であり、かつ/又は前記第 3 ホモロジーアームと前記第 4 ホモロジーアームの合計が、少なくとも約 10 kb である、かつ/又は

(II) 前記第 1 ホモロジーアームと前記第 2 ホモロジーアームがそれぞれ、約 5 kb～約 100 kb の範囲であり、かつ/又は前記第 3 ホモロジーアームと前記第 4 ホモロジーアームがそれぞれ、約 5 kb～約 100 kb の範囲である、かつ/又は

(III) 前記第 1 ターゲティングベクターが、少なくとも約 10 kb であるか、若しくは、約 20 kb～約 300 kb であり、かつ/又は前記第 2 ターゲティングベクターが、少なくとも約 10 kb であるか、若しくは、約 20 kb～約 300 kb である、かつ/又は

(IV) 前記第 1 挿入ポリヌクレオチドが、約 5 kb～約 300 kb の長さの範囲であり、かつ/又は前記第 2 挿入ポリヌクレオチドが、約 5 kb～約 300 kb の長さの範囲である、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第 1 挿入ポリヌクレオチドが目的の第 1 ポリヌクレオチドを更に含む、かつ/又は前記第 2 挿入ポリヌクレオチドが目的の第 2 ポリヌクレオチドを含み、

任意選択で、前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び/又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、ヒトポリヌクレオチドを含む、請求項 1～21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び/又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、T細胞受容体の領域をコードするポリヌクレオチドを含み、

任意選択で、前記T細胞受容体がT細胞受容体 であり、

任意選択で、前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び/又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、前記T細胞受容体 遺伝子座の少なくとも1つの可変領域遺伝子セグメント及び/又は連結領域遺伝子セグメントを含む、

請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び/又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含み、

任意選択で、前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び/又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に作動可能に連結された、再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の核酸配列を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び/又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含み、

任意選択で、前記ゲノム核酸配列が、再構成されていないヒト 及び/又は 軽鎖可変領域の核酸配列を含むか、又は前記ゲノム核酸配列が、再構成されたヒト 及び/又は 軽鎖可変領域の核酸配列を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 6】

10

20

30

40

50

前記目的の第1ポリヌクレオチド及び/又は前記目的の第2ポリヌクレオチドが、少なくとも1つの疾患対立遺伝子を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項27】

(I) 前記目的の第1ポリヌクレオチドが、

(i) 前記細胞のゲノム内の核酸配列に相同若しくはオルソロガスな核酸配列、又は  
(ii) 外来の核酸配列、を含む、かつ/又は

(II) 前記目的の第2ポリヌクレオチドが、

(i) 前記細胞のゲノム内の核酸配列に相同若しくはオルソロガスな核酸配列、又は  
(ii) 外来の核酸配列、を含む、請求項22～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

(I) 前記第1ターゲティングベクターが、前記標的遺伝子座から約5kb～約3Mbの配列を欠失するように設計される、かつ/又は

(II) 前記第2ターゲティングベクターが、前記標的遺伝子座から約5kb～約3Mbの配列を欠失するように設計される、

請求項1～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

(I) 前記第1挿入ポリヌクレオチドの前記標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はその組み合わせをもたらす、かつ/又は

(II) 前記第2挿入ポリヌクレオチドの前記標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はその組み合わせをもたらす、請求項1～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

請求項1～29のいずれか一項に記載の方法であって、

(I) 前記方法によって作製された細胞が、前記標的遺伝子座における、内在性核酸配列の、目的の外来ポリヌクレオチドでの置換を含む遺伝的修飾を含む、かつ/又は

(II) 前記方法によって作製された細胞が、内在性核酸配列の欠失、及び/又は、前記標的遺伝子座へのオルソロガスなポリヌクレオチドの挿入を含む遺伝的修飾を含む、方法。

【請求項31】

前記標的遺伝子座が、前記細胞のゲノム中に存在しているか、又は前記細胞内のベクターに位置している、請求項1～30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

前記標的遺伝子座が、免疫グロブリン遺伝子座を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記標的ゲノム遺伝子座が、T細胞受容体遺伝子座を含み、任意選択で、前記T細胞受容体遺伝子座がT細胞受容体遺伝子座である、請求項31に記載の方法。

【請求項34】

(I) 前記第1ヌクレアーゼ剤によって誘導される前記ニック又は二本鎖切断が、前記第1選択マーカの活性を破壊する、かつ/又は

(II) 前記第2ヌクレアーゼ剤によって誘導される前記ニック又は二本鎖切断が、前記第2選択マーカの活性を破壊する、

請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

(I) 前記第1挿入ポリヌクレオチドの挿入が、前記第1選択マーカの活性を破壊する、かつ/又は

(II) 前記標的遺伝子座における前記第2挿入ポリヌクレオチドの挿入が、前記第2選択マーカの活性を破壊する、

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記細胞が真核生物細胞であり、任意選択で、前記細胞が哺乳動物細胞であり、任意選択で、前記細胞が、

( I ) 非ヒト哺乳動物細胞、

( I I ) 多能性細胞、

( I I I ) ヒト人工多能性幹細胞、

( I V ) ヒト線維芽細胞、

( V ) 非ヒト胚性幹 ( E S ) 細胞、

( V I ) マウス胚性幹 ( E S ) 細胞又はラット胚性幹 ( E S ) 細胞、

( V I I ) 造血幹細胞、

( V I I I ) 神経幹細胞、又は

( I X ) 齧歯動物細胞である、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

前記細胞が、前記マウス E S 細胞又は前記ラット E S 細胞である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

( f ) 前桑実胚期の宿主胚に工程 ( c ) で作製された細胞を導入して、修飾された宿主胚を作製する工程、及び

( g ) 前記修飾された宿主胚を仮親に移植して、工程 ( e ) で作製された細胞に由来する F 0 世代を作製する工程、を更に含む、請求項 3 7 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

( 関連出願の相互参照 )

本出願は、2014年6月6日に出願の米国仮特許出願第62/008832号、及び2014年6月27日に出願の米国仮特許出願第62/017916号の優先権を主張するものであり、これらの全開示内容を参照により本発明に援用する。

【0002】

( 発明の分野 )

本発明の方法及び組成物は、分子生物学の分野に関する。具体的には、細胞内の標的遺伝子座を修飾するための方法及び組成物の提供に関する。

30

【0003】

( E F S ウェブによるテキストファイルとして )

配列表の公式なコピーは、A S C I I フォーマットの配列表 ( 2015年6月5日作成、5KBのサイズ、461003 S E Q L I S T . T X T というファイル名 ) として、E F S - ウェブで電子的に提出し、また本願明細書と共に提出する。この A S C I I フォーマットの文書に含まれる配列表は本願明細書の一部をなし、その全開示内容を参照により本発明に援用する。

【背景技術】

【0004】

ゲノム遺伝子座で特定の核酸配列を挿入、削除、置換するように特異的に設計されたターゲティングベクターを使用した相同組換えは、望ましいゲノム修飾を細胞内において実現する一般的な方法である。標的遺伝子座内若しくはその近傍で、ニック又は二本鎖切断を導入するために特異的に操作されたヌクレアーゼをターゲティングベクターと組み合わせて用いることにより、標的遺伝子座での相同組換え効率を向上させることができる。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

50

相同組換えを通じた標的修飾方法が、この20年間非常に進歩したにもかかわらず、ターゲットベクターを使用して好ましいターゲット効率を実現する、という点で未だ課題が残されている。標的修飾の有効性及び効率を改善する方法に対するニーズが存在する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

細胞内の1つ以上の標的遺伝子座を修飾するための方法及び組成物が提供される。

【0007】

幾つかの実施形態では、細胞内の標的遺伝子座の修飾方法が提供され、当該方法は、(a)細胞内で活性な第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする第1ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、第1ポリヌクレオチドが、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む、工程と、(b)細胞に、(i)第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第1ヌクレアーゼ剤と、(ii)第1認識部位の充分近傍に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲットベクターと、を導入する工程と、(c)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を含む。

【0008】

幾つかの実施形態では、細胞内の標的遺伝子座の修飾方法は、(a)第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする第1ポリヌクレオチドを含む第1標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、第1ポリヌクレオチドが、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む、工程と、(b)細胞に、(i)細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結された第1ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、第1ヌクレアーゼ剤が第1ポリヌクレオチド内の第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第1選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii)第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードする第2ポリヌクレオチドを含む第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲットベクターであって、第1挿入核酸が、第1標的遺伝子座に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接している、第1ターゲットベクターと、を導入する工程と、(c)第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞を同定する工程であって、修飾された細胞は、第2選択マーカの活性を有するが、第1選択マーカの活性を有さず、第1及び第2選択マーカが異なる、工程と、を含む。

【0009】

一実施形態では、標的遺伝子座は、細胞のゲノム中に存在している。他の実施形態では、標的遺伝子座は、細胞内のベクターに位置している。一実施形態では、第1認識部位のニック又は二本鎖切断は、第1選択マーカの活性を損なわせる。更なる実施形態では、同定する工程(c)は、第1選択マーカの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で細胞を培養することを含む。一実施形態では、第1選択マーカを含む第1ポリヌクレオチドは、第1標的部位と第2標的部位に隣接している。一実施形態では、同定する工程(c)は、第1及び第2標的部位に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定することを含む。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、(a)目的の第1ポリヌクレオチドと、(b)細胞内で活性な第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードする第2ポリヌクレオチドであって、第2ヌクレアーゼ剤のための第2認識部位を含む、前記第2ポリヌクレオチドと、を含む。

【0010】

一実施形態では、本方法は、(a)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む細胞に、(i)第2認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第2ヌクレアーゼ剤と、(ii)第2認識部位の充分近傍に位置する第3及び第4標的部位に対応する第3及び第4ホモロジーアームに隣接する第2挿入ポリヌクレオチドを含む第2ターゲッ

10

20

30

40

50



ティングベクターと、を導入する工程と、(b)標的遺伝子座に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を更に含む。一実施形態では、第2認識部位のニック又は二本鎖切断は、第2選択マーカの活性を損なわせる。一実施形態では、同定する工程(b)は、第2選択マーカの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で細胞を培養することを含む。一実施形態では、第2選択可能マーカを含む第2ポリヌクレオチドは、第3標的部位と第4標的部位に隣接している。一実施形態では、同定する工程(b)は、第3及び第4標的部位に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定することを含む。

【0011】

一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、(a)目的の第2ポリヌクレオチドと、(b)細胞内で活性な第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカをコードする第3ポリヌクレオチドと、を含み、第3ポリヌクレオチドは、第3ヌクラーゼ剤のための第3認識部位を含む。一実施形態では、第1ヌクラーゼ剤は、第2ヌクラーゼ剤と異なる。一実施形態では、第1選択マーカは、第2選択マーカと異なる。一実施形態では、第1及び第3ヌクラーゼ認識部位は、互いに同一であり、かつ第2ヌクラーゼ認識部位と異なり、第1及び第3ヌクラーゼ剤は、互いに同一であり、かつ第2ヌクラーゼ剤と異なる。一実施形態では、第1及び第3選択マーカは同一である。一実施形態では、第1、第2又は第3選択マーカのうちの1つは、抗生物質耐性を付与する。一実施形態では、抗生物質は、G418、ハイグロマイシン、ブラストジジン、ネオマイシン又はピューロマイシンを含む。一実施形態では、第1、第2又は第3選択マーカのうちの1つは、誘導性プロモーターに作動可能に連結され、選択マーカの発現は、細胞に対する毒性を示す。一実施形態では、第1、第2又は第3選択マーカは、ヒポ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(HGPRT)又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-TK)を含む。一実施形態では、前記細胞は、原核細胞である。一実施形態では、細胞は、真核生物細胞である。一実施形態では、真核生物細胞は、哺乳動物細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、非ヒト哺乳動物細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、齧歯動物由来である。一実施形態では、齧歯動物は、ラット又はマウスである。

【0012】

一実施形態では、細胞は、多能性細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト人工多能性幹(iPS)細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、非ヒト胚性幹(ES)細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、マウス胚性幹(ES)細胞又はラット胚性幹(ES)細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、造血幹細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、神経幹細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト線維芽細胞である。

【0013】

一実施形態では、第1ヌクラーゼ剤と第1ターゲッティングベクターとの併用により、第1ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、ターゲッティング効率の向上をもたらす。一実施形態では、第1ターゲッティングベクターのターゲッティング効率は、第1ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、少なくとも2倍向上している。

【0014】

一実施形態では、第1又は第2ヌクラーゼ剤は、ヌクラーゼ剤をコードする核酸配列を含む発現コンストラクトを含み、当該核酸は、細胞内で活性な第4プロモーターに作動可能に連結されている。一実施形態では、第1又は第2ヌクラーゼ剤は、ヌクラーゼをコードするmRNAである。一実施形態では、第1又は第2ヌクラーゼ剤は、ジンクフィンガーヌクラーゼ(ZFN)である。一実施形態では、第1又は第2ヌクラーゼ剤は、転写活性化因子様エフェクターヌクラーゼ(TALEN)である。一実施形態では、第1又は第2のヌクラーゼ剤は、メガヌクラーゼである。

【0015】

10

20

30

40

50

一実施形態では、第1又は第2のヌクレアーゼ剤は、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列(CRISPR)-関連(Cas)タンパク質及びガイドRNA(gRNA)を含む。一実施形態では、ガイドRNA(gRNA)が、(a)第1、第2又は第3認識部位を標的とする、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列(CRISPR)RNA(crRNA)と、(b)トランス活性化CRISPR RNA(tracrRNA)と、を含む。一実施形態では、第1又は第2認識部位は、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に直接隣接している。一実施形態では、目的のゲノム遺伝子座は、配列番号1のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、Casタンパク質は、Cas9である。一実施形態では、gRNAは、(a)配列番号2の核酸配列のキメラRNA、又は(b)配列番号3の核酸配列のキメラRNAを含む。一実施形態では、crRNAは、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含む。一実施形態では、tracrRNAは、配列番号7又は配列番号8を含む。

10

## 【0016】

一実施形態では、第1、第2及び/又は第3認識部位は、第1、第2又は第3選択マーカのイントロン、エキソン、プロモーター、プロモーター調節領域又はエンハンサー領域に位置している。一実施形態では、第1標的部位及び第2標的部位は、第1認識部位に直接隣接している。一実施形態では、第1標的部位及び第2標的部位は、第1認識部位から約10ヌクレオチド~約14kbに位置している。一実施形態では、第3標的部位及び第4標的部位は、第2認識部位に直接隣接している。一実施形態では、第3標的部位及び第4標的部位は、第2認識部位から約10ヌクレオチド~約14kbに位置している。

20

## 【0017】

一実施形態では、第1ホモロジーアームと第2ホモロジーアームの合計は、少なくとも約10kbである。一実施形態では、第3ホモロジーアームと第4ホモロジーアームの合計は、少なくとも約10kbである。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、約5kb~約300kbの長さの範囲である。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、約5kb~約300kbの長さの範囲である。

## 【0018】

一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドの標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はそれらの組み合わせをもたらす。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドの標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はそれらの組み合わせをもたらす。

30

## 【0019】

一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、ヒトポリヌクレオチドを含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、ヒトポリヌクレオチドを含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、T細胞受容体 遺伝子座の領域を含む目的のポリヌクレオチドを含む。

## 【0020】

一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、T細胞受容体 遺伝子座の領域を含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第1又は第2挿入ポリヌクレオチドは、T細胞受容体 遺伝子座の少なくとも1つの可変領域遺伝子セグメント及び/又は連結領域遺伝子セグメントを含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、T細胞受容体 遺伝子座の領域は、ヒト由来である。

40

## 【0021】

一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に作動可能に連結された、再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む。

## 【0022】

一実施形態では、同定する工程は、対立遺伝子の修飾(MOA)アッセイで実施される

50

。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、細胞のゲノム内の核酸配列に相同又はオルソロガスな核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、細胞のゲノム内の核酸配列に相同又はオルソロガスな核酸配列を含む。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、外来の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、外来の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む。

#### 【0023】

幾つかの実施形態では、細胞内の標的遺伝子座の修飾方法は、(a)第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする核酸を含む第1標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程と、(b)細胞に、(i)Casタンパク質及び第1ガイドRNA (gRNA)をコードし、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結された、1つ以上の発現コンストラクトであって、Casタンパク質が第1核酸中の第1gRNA標的部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第1選択マーカの発現又は活性をそれによって損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii)第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードする第2核酸を含む第1挿入核酸を含む第1ターゲティングベクターであって、第1挿入核酸が、第1標的遺伝子座に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接している、第1ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(c)第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞を同定する工程であって、修飾された細胞が、第2選択マーカの活性を有するが、第1選択マーカの活性を有さず、第1及び第2選択マーカが異なる、工程と、を含む。一実施形態では、第1gRNAは、第1挿入核酸とハイブリダイズしない。一実施形態では、目的の標的遺伝子座は、細胞のゲノム中に位置している。他の実施形態では、目的の標的遺伝子座は、細胞内のベクターに位置している。一実施形態では、同定する工程(c)は、第2選択マーカの活性を有するが、第1選択マーカの活性を有さない、修飾された細胞の同定を可能にする条件下で細胞を培養することを含む。

#### 【0024】

一実施形態では、本方法は、(d)第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞に、(i)修飾された細胞内で活性なプロモーターに各々作動可能に連結された、Casタンパク質及び第2gRNAをコードする1つ以上の核酸であって、Casタンパク質が第2核酸を含む第1挿入核酸内の第2gRNA標的部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第2選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の核酸と、(ii)第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカをコードする第3核酸を含む第2挿入核酸を含む第2ターゲティングベクターであって、第2挿入核酸が、第2標的遺伝子座に位置する第3及び第4標的部位に対応する第3及び第4ホモロジーアームに隣接している、第2ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(e)第2標的遺伝子座内に第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞を同定する工程であって、第2の修飾された細胞が第3選択マーカの活性を有するが、第2選択マーカの活性を有さず、第2及び第3選択マーカが異なる、工程と、を更に含む。一実施形態では、第1及び第2標的遺伝子座は、各々直接隣接している。他の実施形態では、第1又は第2標的遺伝子座は、第1又は第2gRNA標的部位から約10ヌクレオチド~14kb、約10ヌクレオチド~約100ヌクレオチド、約100ヌクレオチド~約500ヌクレオチド、約500ヌクレオチド~約1000ヌクレオチド、約1kb~約5kb、約5kb~約10kb、又は約10kb~約14kbに位置している。一実施形態では、第2gRNAは、第2挿入核酸とハイブリダイズしない。一実施形態では、同定する工程(e)は、第3選択マーカの活性を有するが、第2選択マーカの活性を有さない第2の修飾された細胞の同定を可能にする条件下で、修飾された細胞を培養することを含む。

#### 【0025】

一実施形態では、本方法は、(f)第2標的遺伝子座に第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞に、(i)第2の修飾された細胞内で活性なプロモーターに各々作動可能に連

10

20

30

40

50

結された、C a s タンパク質及び第3 g R N A をコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、C a s タンパク質が第3核酸を含む第2挿入核酸内の第3 g R N A 標的部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第3選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、( i i ) 第4プロモーターに作動可能に連結された第4選択マーカをコードする第4核酸を含む第3挿入核酸を含む第3ターゲティングベクターであって、第3挿入核酸が、第3標的遺伝子座に位置する第5及び第6標的部位に対応する第5及び第6ホモロジーアームに隣接している、第3ターゲティングベクターと、を導入する工程と、( g ) 第3標的遺伝子座内に第3挿入核酸を含む第3の修飾された細胞を同定する工程であって、第3の修飾された細胞が第4選択マーカの活性を有するが、第3選択マーカの活性を有さず、第3及び第4選択マーカが異なる、工程と、を更に含む。一実施形態では、第2及び第3標的遺伝子座は、各々直接隣接している。他の実施形態では、第2又は第3標的遺伝子座は、第1又は第2 g R N A 標的部位から10ヌクレオチド~約14kbに位置している。

10

## 【0026】

一実施形態では、第1、第2、第3又は第4マーカは、抗生物質耐性を付与する。一実施形態では、抗生物質は、G418、ハイグロマイシン、ブラストシジン、ネオマイシン又はピューロマイシンを含む。一実施形態では、第1、第2、第3又は第4選択マーカは、ヒポ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(HGPRT)又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-TK)を含む。一実施形態では、第1、第2又は第3 g R N A は、( i ) 第1、第2又は第3 g R N A 標的部位とハイブリダイズするヌクレオチド配列と、( i i ) トランス活性化CRISPR RNA ( t r a c r R N A ) と、を含む。一実施形態では、第1、第2又は第3標的遺伝子座は、第1、第2又は第3 g R N A 標的部位の近傍に位置し、それにより、ニック又はg R N A 標的部位の二本鎖切断により、標的遺伝子座でのターゲティングベクターの相同組換えが促進される。一実施形態では、C a s タンパク質は、C a s 9である。一実施形態では、第1、第2又は第3 g R N A 標的部位は、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列が直接隣接している。

20

## 【0027】

一実施形態では、細胞は、原核細胞である。他の実施形態では、細胞は、真核生物細胞である。一実施形態では、真核生物細胞は、哺乳動物細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、線維芽細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト線維芽細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、非ヒト哺乳動物細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、齧歯動物由来である。一実施形態では、齧歯動物は、ラット、マウス又はハムスターである。

30

## 【0028】

一実施形態では、真核生物細胞は、多能性細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、造血幹細胞又はニューロン幹細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、ヒト人工多能性幹(iPS)細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、マウス胚性幹(ES)細胞又はラット胚性幹(ES)細胞である。

40

## 【0029】

一実施形態では、第1、第2又は第3 g R N A 標的部位は、第1、第2又は第3選択マーカをコードする第1、第2又は第3核酸内のイントロン、エキソン、プロモーター又はプロモーター調節領域に位置している。一実施形態では、第1、第2、又は第3ターゲティングベクターは、少なくとも約10kbである。一実施形態では、第1、第2又は第3挿入核酸は、約5kb~約300kbの範囲である。

## 【0030】

一実施形態では、第1、第2又は第3挿入核酸は、ヒトT細胞受容体 遺伝子座のゲノム領域を含む。一実施形態では、ゲノム領域は、ヒトT細胞受容体 遺伝子座の少なくとも1つの可変領域遺伝子セグメント及び/又は連結領域遺伝子セグメントを含む。

## 【0031】

50

一実施形態では、第1及び第3選択マーカ―は同じである。一実施形態では、第1及び第3選択マーカ―は同じであり、第2及び第4選択マーカ―は同じである。一実施形態では、第1及び第3 gRNAは同じである。

【0032】

本発明は更に、細胞内の標的遺伝子座を修飾するための方法及び組成物を提供する。かかる方法は、細胞内で活性な第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカ―をコードする第1ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程を含み、第1ポリヌクレオチドは、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む。第1ヌクレアーゼ剤は、細胞に導入され、第1ヌクレアーゼ剤は、第1認識部位でのニック又は二本鎖切断を誘導する。第1認識部位の充分近傍に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲッティングベクターが、細胞に更に導入される。次に、標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含むものとして、少なくとも1つの細胞が同定される。

10

【0033】

本発明はまた、以下の工程を含む細胞内の標的遺伝子座の修飾方法の提供に関する：(a)細胞内で活性な第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカ―をコードする第1ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、第1ポリヌクレオチドが、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む、工程と、

(b)細胞に、(i)第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第1ヌクレアーゼ剤と、(ii)第1認識部位の充分近傍に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲッティングベクターと、を導入する工程と、(c)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を含む。一実施形態では、標的遺伝子座は、細胞のゲノム中に存在している。他の実施形態では、標的遺伝子座は、細胞内のベクターに位置している。一実施形態では、第1認識部位のニック又は二本鎖切断は、第1選択マーカ―の活性を損なわせる。更なる実施形態では、同定する工程(c)は、第1選択マーカ―の活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で細胞を培養することを含む。一実施形態では、第1選択マーカ―を含む第1ポリヌクレオチドは、第1標的部位と第2標的部位に隣接している。一実施形態では、同定する工程(c)は、第1及び第2標的部位に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定することを含む。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、(a)目的の第1ポリヌクレオチドと、(b)細胞内で活性な第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカ―をコードする第2ポリヌクレオチドであって、第2ヌクレアーゼ剤のための第2認識部位を含む、第2ポリヌクレオチドと、を含む。

20

30

【0034】

一実施形態では、本方法は、(a)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む細胞に、(i)第2認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第2ヌクレアーゼ剤と、(ii)第2認識部位の充分近傍に位置する第3及び第4標的部位に対応する第3及び第4ホモロジーアームに隣接する第2挿入ポリヌクレオチドを含む第2ターゲッティングベクターと、を導入する工程と、(b)標的遺伝子座に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を更に含む。一実施形態では、第2認識部位のニック又は二本鎖切断は、第2選択マーカ―の活性を損なわせる。一実施形態では、同定する工程(b)は、第2選択マーカ―の活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で細胞を培養することを含む。一実施形態では、第2選択マーカ―を含む第2ポリヌクレオチドは、第3標的部位及び第4標的部位に隣接している。一実施形態では、同定する工程(b)は、第3及び第4標的部位に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定することを含む。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、(a)目的の第2ポリヌクレオチドと、(b)細胞内で活性な第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカ―をコードする第3ポリヌクレオチドと、を含み、第3ポリヌクレオチドは、第3ヌクレアーゼ剤のための第3認識部位を含

40

50

む。一実施形態では、第1ヌクレアーゼ剤は、第2ヌクレアーゼ剤と異なる。一実施形態では、第1選択マーカ―は、第2選択マーカ―と異なる。一実施形態では、第1及び第3ヌクレアーゼ剤認識部位は、互いに同一であり、かつ第2ヌクレアーゼ剤認識部位と異なり、第1及び第3ヌクレアーゼ剤は、互いに同一であり、かつ第2ヌクレアーゼ剤と異なる。一実施形態では、第1及び第3選択マーカ―は、同一である。一実施形態では、第1、第2又は第3選択マーカ―のうちの1つは、抗生物質耐性を付与する。一実施形態では、抗生物質は、G418、ハイグロマイシン、ブラストシジン、ネオマイシン又はピューロマイシンを含む。一実施形態では、第1、第2又は第3選択マーカ―のうちの1つは、誘導性プロモーターに作動可能に連結され、当該選択マーカ―の発現は、細胞に対する毒性を示す。一実施形態では、第1、第2又は第3選択マーカ―は、ヒポキサンチン Guanine 10  
 ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPR T) 又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (H S V - T K) を含む。一実施形態では、細胞は、原核細胞である。一実施形態では、細胞は、真核生物細胞である。一実施形態では、真核生物細胞は、哺乳動物細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、非ヒト哺乳動物細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、齧歯動物由来である。一実施形態では、齧歯動物は、ラット又はマウスである。一実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト線維芽細胞である。

#### 【0035】

一実施形態では、細胞は、多能性細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト人工多能性幹 (i P S) 細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、非ヒト胚性幹 (E S) 細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、マウス胚性幹 (E S) 細胞又はラット胚性幹 (E S) 細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、造血幹細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、神経幹細胞である。 20

#### 【0036】

一実施形態では、第1ヌクレアーゼ剤と第1ターゲッティングベクターとの併用により、第1ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、ターゲッティング効率の向上をもたらす。一実施形態では、第1ターゲッティングベクターのターゲッティング効率は、第1ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、少なくとも2倍向上している。

#### 【0037】

一実施形態では、第1又は第2ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む発現コンストラクトを含み、当該核酸は細胞内で活性化第4プロモーターに作動可能に連結されている。一実施形態では、第1又は第2ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ剤をコードする mRNA である。一実施形態では、第1又は第2ヌクレアーゼ剤は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) である。一実施形態では、第1又は第2ヌクレアーゼ剤は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) である。一実施形態では、第1又は第2ヌクレアーゼ剤は、メガヌクレアーゼである。 30

#### 【0038】

一実施形態では、第1又は第2ヌクレアーゼ剤は、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列 (C R I S P R) - 関連 (C a s) タンパク質及びガイド RNA (g R N A) を含む。一実施形態では、ガイド RNA (g R N A) は、(a) 第1、第2又は第3認識部位を標的とする、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列 (C R I S P R) RNA (c r RNA) と、(b) トランス活性化 C R I S P R RNA (t r a c r RNA) を含む。一実施形態では、第1又は第2認識部位は、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 配列に直接隣接している。一実施形態では、目的のゲノム遺伝子座は、配列番号1のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、C a s タンパク質は、C a s 9 である。一実施形態では、g R N A は、(a) 配列番号2の核酸配列のキメラ RNA、又は (b) 配列番号3の核酸配列のキメラ RNA を含む。一実施形態では、c r RNA は、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含む。一実施形態では、t r a c r RNA は、配列番号7又は配列番号8を含む。一実施形態では、第1、第2及び/又は第3認識部位は、第1、第2又は第3選択マーカ―のイントロン、エ 40  
 50

キソン、プロモーター、プロモーター調節領域又はエンハンサー領域に位置している。一実施形態では、第1標的部位及び第2標的部位は、第1認識部位に直接隣接している。一実施形態では、第1標的部位及び第2標的部位は、第1認識部位から約10ヌクレオチド～約14kbに位置している。一実施形態では、第3標的部位及び第4標的部位は、第2認識部位に直接隣接している。一実施形態では、第3標的部位及び第4標的部位は、第2認識部位から約10ヌクレオチド～約14kbに位置している。一実施形態では、第1ホモロジーアームと第2ホモロジーアームの合計は、少なくとも約10kbである。一実施形態では、第3ホモロジーアームと第4ホモロジーアームの合計は、少なくとも約10kbである。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、約5kb～約300kbの長さの範囲である。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、約5kb～約300kbの長さの範囲である。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドの標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はそれらの組み合わせをもたらす。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドの標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はそれらの組み合わせをもたらす。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、ヒトポリヌクレオチドを含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、ヒトポリヌクレオチドを含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、T細胞受容体 遺伝子座の領域を含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、T細胞受容体 遺伝子座の領域を含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第1又は第2挿入ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの可変領域遺伝子セグメント及び/又はT細胞受容体 遺伝子座の連結領域遺伝子セグメントを含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、T細胞受容体 遺伝子座の領域は、ヒト由来である。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に作動可能に連結された、再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、同定する工程は、対立遺伝子の修飾(MOA)アッセイで実施される。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、細胞内のゲノムの核酸配列に相同又はオルソロガスな核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、細胞内のゲノムの核酸配列に相同又はオルソロガスな核酸配列を含む。一実施形態では、第1挿入ポリヌクレオチドは、外来の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、第2挿入ポリヌクレオチドは、外来の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

細胞内の標的遺伝子座の修飾方法であって、

(a) 第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする第1ポリヌクレオチドを含む第1標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、前記第1ポリヌクレオチドが、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む、工程と、

(b) 前記細胞に、

(i) 前記第1ヌクレアーゼ剤であって、前記第1ポリヌクレオチド内の前記第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、前記第1選択マーカを発現又は活性を損なわせる、前記第1ヌクレアーゼ剤と、

(ii) 第1ターゲティングベクターであって、第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードする第2ポリヌクレオチドを含む第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲティングベクターであって、前記第1挿入ポリヌクレオチドが、前記第1標的遺伝子座に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接している、第1ターゲティングベクターと、を導入する工程と、

(c) 前記第1標的遺伝子座に前記第1挿入ポリヌクレオチドを含む修飾された細胞を

10

20

30

40

50

同定する工程であって、前記修飾された細胞は、前記第 2 選択マーカの活性を有するが、前記第 1 選択マーカの活性を有さず、

前記第 1 及び前記第 2 選択マーカが異なる、工程と、を含む、方法。

(項目 2)

前記標的遺伝子座が、

( a ) 前記細胞のゲノム中に存在しているか、又は

( b ) 前記細胞内のベクターに位置している、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記同定する工程 ( c ) が、

( a ) 前記第 1 選択マーカの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で前記細胞を培養すること、又は

( b ) 前記第 1 及び第 2 標的部位に組み込まれた前記第 1 挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの細胞を同定すること、を含む、項目 1 又は 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記第 1 挿入ポリヌクレオチドが、目的の第 1 ポリヌクレオチドを更に含む、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5)

前記第 2 ポリヌクレオチドが、第 2 ヌクレアーゼ剤のための第 2 認識部位を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6)

前記方法が、

( a ) 前記標的遺伝子座に組み込まれた前記第 1 挿入ポリヌクレオチドを含む前記細胞に、

( i ) 前記第 2 ヌクレアーゼ剤であって、前記第 2 ポリヌクレオチド内の前記第 2 認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、前記第 2 選択マーカの発現又は活性を損なわせる、前記第 2 ヌクレアーゼ剤と、

( i i ) 前記第 2 認識部位の充分近傍に位置する第 3 及び第 4 標的部位に対応する第 3 及び第 4 ホモロジーアームに隣接する第 2 挿入ポリヌクレオチドを含む第 2 ターゲティングベクターと、を導入する工程と、

( b ) 前記標的遺伝子座に組み込まれた前記第 2 挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの細胞を同定する工程と、を更に含む、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

前記同定する工程 ( b ) が、

( a ) 前記第 2 選択マーカの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で前記細胞を培養すること、又は

( b ) 前記第 3 及び第 4 標的部位に組み込まれた前記第 2 挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも 1 つの細胞を同定すること、を含む、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

前記第 2 選択マーカを含む前記第 2 ポリヌクレオチドが、前記第 3 標的部位及び前記第 4 標的部位に隣接している、項目 6 又は 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記第 2 挿入ポリヌクレオチドが、

( a ) 目的の第 2 ポリヌクレオチドと、

( b ) 前記細胞内で活性な第 3 プロモーターに作動可能に連結された第 3 選択マーカをコードする第 3 ポリヌクレオチドと、を含み、

前記第 3 ポリヌクレオチドが、第 3 ヌクレアーゼ剤のための第 3 認識部位を含む、項目 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 10)

前記第 1 ヌクレアーゼ剤が、前記第 2 ヌクレアーゼ剤と異なる、項目 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50



(項目 1 1)

前記第 1 及び前記第 3 ヌクレアーゼ認識部位が、互いに同一であり、かつ前記第 2 ヌクレアーゼ認識部位と異なり、前記第 1 及び前記第 3 ヌクレアーゼ剤が、互いに同一であり、かつ前記第 2 ヌクレアーゼ剤と異なる、項目 9 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記第 1 及び前記第 3 選択マーカ―が、同一である、項目 9 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 選択マーカ―が、抗生物質耐性を付与する、項目 9 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 4)

前記抗生物質が、G 4 1 8、ハイグロマイシン、プラスチジジン、ネオマイシン又はピユーロマイシンを含む、項目 1 3 に記載の方法。

10

(項目 1 5)

前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 選択マーカ―が、誘導性プロモーターに作動可能に連結され、前記選択マーカ―の発現が、前記細胞に対する毒性を示す、項目 9 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6)

前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 選択マーカ―が、ヒポ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 (HGPRT) 又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-TK) を含む、項目 1 5 に記載の方法。

20

(項目 1 7)

前記細胞が、原核細胞又は真核生物細胞である、項目 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 8)

前記真核生物細胞が、哺乳動物細胞である、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記哺乳動物細胞が、

(a) 非ヒト哺乳動物細胞、

(b) 多能性細胞、

(c) ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞、

(d) ヒト線維芽細胞、又は

(e) 齧歯動物細胞である、項目 1 8 に記載の方法。

30

(項目 2 0)

前記齧歯動物が、ラット又はマウスである、項目 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記多能性細胞が、

(a) 非ヒト胚性幹 (ES) 細胞、

(b) マウス胚性幹 (ES) 細胞又はラット胚性幹 (ES) 細胞、

(c) 造血幹細胞、又は

(d) 神経幹細胞である、項目 1 9 に記載の方法。

40

(項目 2 2)

前記第 1 ヌクレアーゼ剤と前記第 1 ターゲッティングベクターとの併用により、前記第 1 ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、ターゲッティング効率の向上をもたらす、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記第 1 ターゲッティングベクターの前記ターゲッティング効率が、前記第 1 ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、少なくとも 2 倍向上している、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ剤をコードする

50

核酸配列を含む発現コンストラクトを含み、前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記核酸配列が、前記細胞内で活性な第4プロモーターに作動可能に連結されている、項目9~23のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

前記第1、前記第2又は前記第3ヌクレアーゼ剤が、

(a)ヌクレアーゼをコードするmRNA、

(b)ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、

(c)転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、

(d)メガヌクレアーゼ、又は

(e)クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列(CRISPR)-関連(Cas)タンパク質及びガイドRNA(gRNA)である、項目9~24のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目26)

前記Casタンパク質が、Cas9であり、前記ガイドRNA(gRNA)が、

(a)プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に直接隣接している前記第1、前記第2又は前記第3認識部位を標的とする、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列(CRISPR)RNA(crRNA)と、

(b)トランス活性化CRISPR RNA(tracrRNA)と、を含む、項目25に記載の方法。

(項目27)

前記標的遺伝子座が、配列番号1のヌクレオチド配列を含む、項目26に記載の方法。

20

(項目28)

前記gRNAが、

(a)配列番号2若しくは配列番号3の核酸配列を有するキメラRNA、

(b)配列番号4、配列番号5若しくは配列番号6を含むcrRNA、又は

(c)配列番号7若しくは配列番号8を含むtracrRNAを含む、項目26に記載の方法。

(項目29)

前記第1、前記第2及び/又は前記第3認識部位が、前記第1、前記第2又は前記第3選択マーカのイントロン、エキソン、プロモーター、プロモーター調節領域又はエンハンサー領域に位置している、項目9~28のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目30)

前記第1標的部位及び前記第2標的部位が、前記第1認識部位に直接隣接している、項目1~29のいずれか一項に記載の方法。

(項目31)

(a)前記第1標的部位及び前記第2標的部位が、前記第1認識部位から約10ヌクレオチド~約14kbに位置しているか、

(b)前記第3標的部位及び前記第4標的部位が、前記第2認識部位に直接隣接しているか、又は

(c)前記第3標的部位及び前記第4標的部位が、前記第2認識部位から約10ヌクレオチド~約14kbに位置している、項目6~12のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目32)

(a)前記第1ホモロジーアームと前記第2ホモロジーアームの合計が、少なくとも約10kbであり、かつ/又は

(b)前記第3ホモロジーアームと前記第4ホモロジーアームの合計が、少なくとも約10kbである、項目6~31のいずれか一項に記載の方法。

(項目33)

(a)前記第1挿入ポリヌクレオチドが、約5kb~約300kbの長さの範囲であり、かつ/又は

(b)前記第2挿入ポリヌクレオチドが、約5kb~約300kbの長さの範囲である

50

、項目 6 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

(補正有)

( a ) 前記第 1 挿入ポリヌクレオチドの前記標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はその組み合わせをもたらす、かつ/又は

( b ) 前記第 2 挿入ポリヌクレオチドの前記標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はその組み合わせをもたらす、項目 6 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 3 5)

( a ) 前記第 1 挿入ポリヌクレオチドが、

( i ) ヒトポリヌクレオチドを含む目的のポリヌクレオチド、若しくは

( i i ) T 細胞受容体 遺伝子座の領域を含む目的のポリヌクレオチドを含み、

かつ/又は

( b ) 前記第 2 挿入ポリヌクレオチドが、

( i ) ヒトポリヌクレオチドを含む目的のポリヌクレオチド、若しくは

( i i ) T 細胞受容体 遺伝子座の領域を含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目

6 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 6)

前記第 1 又は前記第 2 挿入ポリヌクレオチドが、前記 T 細胞受容体 遺伝子座の少なくとも 1 つの変領域遺伝子セグメント及び/又は連結領域遺伝子セグメントを含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目 3 5 に記載の方法。

20

(項目 3 7)

前記 T 細胞受容体 遺伝子座の前記領域が、ヒト由来である、項目 3 5 又は 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記第 1 挿入ポリヌクレオチドが、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に作動可能に連結された、再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 3 9)

前記同定する工程が、対立遺伝子の修飾 ( M O A ) アッセイを経て実施される、項目 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 0)

( a ) 前記第 1 挿入ポリヌクレオチドが、

( i ) 前記細胞のゲノム内の核酸配列に相同若しくはオルソロガスな核酸配列を含む目的のポリヌクレオチド、

( i i ) 外来の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチド、を含むか、又は

( b ) 第 2 挿入ポリヌクレオチドが、

( i ) 前記細胞のゲノム内の核酸配列に相同若しくはオルソロガスな核酸配列、又は

( i i ) 外来の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチド、を含む、項目 6 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

**【図面の簡単な説明】**

**【 0 0 3 9 】**

**【図 1】**マウスの第 1 4 染色体上の T C R 遺伝子座のヘテロ接合の修飾を有する細胞中のゲノムターゲティングイベントの概略図を提供する。1 つの対立遺伝子は、8 つのヒト可変 ( V ) 遺伝子セグメントの上流に位置するネオマイシン選択カセットを含むヒト化 T C R A - n e o 対立遺伝子であり、6 1 個のヒト連結 ( J ) 遺伝子セグメントは、ハイグロマイシン選択カセットと、1 1 個の追加のヒト可変遺伝子セグメントを含む 1 0

50

0 kb 超の断片を含む、ヒト化 TCR 対立遺伝子 B - h y g ターゲティングベクターの標的とされる。対立遺伝子 B - h y g ターゲティングベクターと、TCR A - n e o 対立遺伝子のネオマイシンカセットを標的とするジンクフィンガーヌクレアーゼ ( Z F N ) ペアの 2 つの単量体を発現するプラスミドと、のエレクトロポレーションにより、5 ' から 3 ' にかけて、ハイグロマイシンカセット、19 個のヒト V 遺伝子セグメント、及び内在の定常領域のヌクレオチド配列の上流に位置する 61 個のヒト J 遺伝子セグメントを含む、修飾された TCR 遺伝子座 ( 対立遺伝子 B - h y g ) が生成された。ターゲティングイベントにより、100 kb を超えるヒト TCR 遺伝子配列がマウス TCR 遺伝子座に正確に挿入された。

【図 2】マウスの第 14 染色体上の TCR 遺伝子座のヘテロ接合の修飾を有する細胞中のゲノムターゲティングイベントの概略図を提供する。1 つの対立遺伝子は、19 個のヒト V 遺伝子セグメントの上流に位置するハイグロマイシン選択カセットを含むヒト化 TCR B - h y g 対立遺伝子であり、61 個のヒト J 遺伝子セグメントは、ネオマイシン選択カセットと、11 個の追加のヒト可変遺伝子セグメントを含む 100 kb 超の断片を含む、ヒト化 TCR 対立遺伝子 C - n e o ターゲティングベクターの標的とされる。対立遺伝子 C - ネオターゲティングベクターと、TCR B - h y g 対立遺伝子のハイグロマイシンカセットを標的とするジンクフィンガーヌクレアーゼ ( Z F N ) ペアの 2 つの単量体を発現するプラスミドのエレクトロポレーションにより、5 ' から 3 ' にかけて、ネオマイシンカセット、30 個のヒト V 遺伝子セグメント、及び内在の定常領域のヌクレオチド配列の上流に位置する 61 個のヒト J 遺伝子セグメントを含む、修飾された TCR 遺伝子座 ( 対立遺伝子 C - ネオ ) が生成された。ターゲティングイベントにより、100 kb を超えるヒト TCR 遺伝子配列がマウス TCR 遺伝子座に正確に挿入された。

【図 3】n e o 「 ( ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする ) 及び h y g 「 ( ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼをコードする ) の薬剤選択カセットの略図を提供する。n e o 「 を標的とする N e o - Z F N ( 1 , 2 ) 及び N e o - Z F N ( 3 , 4 ) ジンクフィンガーヌクレアーゼ ( Z F N s 、 図 3 A ) 、並びに h y g 「 を標的とする H y g - Z F N ( 1 , 2 ) 及び H y g - Z F N ( 3 , 4 ) Z F N s ( 図 3 B ) の認識部位 ( 以下に配列を示す ) の位置を、各々のホスホトランスフェラーゼのコード配列を表す太い矢印の上下の長方形で示す。

【発明を実施するための形態】

【0040】

添付の図面を参照しつつ、本発明の幾つかの態様を以下に詳細に説明するが、本発明はそれらの態様が全てではない。実際、これらの発明は多くの異なる形態で実施される可能性があり、本明細書に示す実施形態に限定されるものと解釈すべきではなく、むしろ、これらの実施形態は、適用される法的要件を満たすように提供されたものである。本明細書では、同様の数字は同様の構成要件を意味する。

【0041】

本発明の属する技術分野の当業者であれば、上記の説明及び関連する図面に示される教示を利用することにより、本明細書に示される本発明の多くの改良形態及び他の実施形態を想起するであろう。したがって、本発明は、開示される特定の実施形態に限定されるものではなく、その改良形態及び他の実施形態も、添付の特許請求の範囲に含まれることを理解すべきである。本明細書では特定の用語を使用するが、それらは一般的及び記述的な意味において用いられるものであり、限定を目的として用いられるものではない。

【0042】

I . 概要

本発明は、細胞内の標的遺伝子座 ( 例えば、ゲノム遺伝子座 ) を修飾するための方法及び組成物の提供に関する。本方法及び組成物は、ヌクレアーゼ剤及びヌクレアーゼ剤認識部位を用いることにより、標的遺伝子座への挿入ポリヌクレオチドの相同組換えイベントを促進する。本明細書で提供される様々な方法及び組成物は、ヌクレアーゼ剤認識部位を

、選択マーカ、リポーター又は外来のタンパク質（例えば、eGFP又はマウス細胞内のヒト配列）をコードするポリヌクレオチド内に戦略的に位置させる。

【0043】

更に、標的遺伝子座（すなわちゲノム遺伝子座）の目的のポリヌクレオチドの連続的修飾（すなわちタイリング）を可能にする方法が提供される。より詳細に以下で説明するように、標的遺伝子座（すなわちゲノム遺伝子座）中に目的のポリヌクレオチドを連続的にタイリングするために方法が提供され、当該方法では、使用される標的遺伝子座（すなわちゲノム遺伝子座）及び様々なターゲティングベクターが、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を含む第1選択マーカと、第2ヌクレアーゼ剤のための第2認識部位を含む第2選択マーカと、の使用を交替させる。その際、本方法は、新しい認識部位を認識するために操作されたヌクレアーゼ剤の恒常的な供給を必要としない。その代わりに、特定の実施形態では、標的とされた連続的なタイリングは、2つのヌクレアーゼ剤及び当該2つのヌクレアーゼ剤が対応する認識部位を必要とするだけである。更に、ヌクレアーゼ剤が外来の配列（すなわち選択マーカをコードするポリヌクレオチド内の認識部位）を標的とし、いかなる所与の認識部位の有効性及び非特異的な効果もこれまで確認されているため、タイリングプロセスの時間及び対費用効果を増加させつつ、内在のゲノム配列の非特異的な切断を最小化することができる。

10

【0044】

II. 標的組み込みシステム

本発明は、細胞内の標的遺伝子座を修飾するための方法及び組成物の提供に関する。システムは、ヌクレアーゼ剤、ヌクレアーゼ剤のための認識部位、標的遺伝子座、選択マーカ、ターゲティングベクター及び挿入ポリヌクレオチドを用いる。これらの構成要素の各々を以下に詳述する。

20

【0045】

A. ヌクレアーゼ剤及びヌクレアーゼ剤のための認識部位：

用語「ヌクレアーゼ剤のための認識部位」には、ニック又は二本鎖切断がヌクレアーゼ剤によって誘導されるDNA配列が含まれる。ヌクレアーゼ剤のための認識部位は、細胞に内在（又は生来）のものであってもよく、又は当該認識部位は細胞に対して外来のものであってもよい。具体的実施形態では、認識部位は、細胞に対して外来のものであり、ゆえに、細胞のゲノム内で天然に生じない。なお更なる実施形態では、認識部位は、細胞に対して、及び、標的遺伝子座に挿入しようとする目的のポリヌクレオチドに対して外来のものである。更なる実施形態では、外来若しくは内在の認識部位は、宿主細胞のゲノム内に1つだけ存在している。具体的実施形態では、ゲノム内に1つだけ存在する内在若しくは生来の部位が同定される。かかる部位は次に、内在の認識部位でニック又は二本鎖切断を行うヌクレアーゼ剤を設計するのに使用できる。

30

【0046】

認識部位の長さは、変化させてもよく、例えば、認識部位は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）ペアの場合は約30～36bp（すなわち各ZFNについて約15～18bp）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）の場合は約36bp、又は、CRISPR/Cas9ガイドRNAの場合は約20bpである。

40

【0047】

目的の認識部位にニック又は二本鎖切断を誘導するいかなるヌクレアーゼ剤でも、本明細書に開示される方法及び組成物において使用できる。天然に存在するか又は生来のヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ剤が目的の認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する限り、使用できる。あるいは、修飾された又は操作されたヌクレアーゼ剤を使用できる。「操作されたヌクレアーゼ剤」には、目的の認識部位を特異的に認識し、ニック又は二本鎖切断を誘導するために、その生来の形態から操作された（修飾又は誘導された）ヌクレアーゼ剤が含まれる。このように、操作されたヌクレアーゼ剤は、生来の天然に存在するヌクレアーゼ剤から誘導することができ、又は、人工的に作製若しくは合成することができる。ヌクレアーゼ剤の修飾は、タンパク質の切断剤のわずか1つのアミノ酸、又は核酸の切

50

断剤の1つのヌクレオチドにおける修飾であってもよい。幾つかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ剤は、認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導し、当該認識部位は、生来の（操作又は修飾されない）ヌクレアーゼ剤によって認識される配列ではなかった。認識部位又は他のDNAにおける、ニック又は二本鎖切断は、本明細書では認識部位又は他のDNAの「カッティング」又は「開裂」と称することもある。

#### 【0048】

本発明では、例示された認識部位の活性型の変異体及び断片も提供される。かかる活性型の変異体は、所与の認識部位に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有してもよく、その際、活性型の変異体は生物学的活性を保持し、ゆえに、ヌクレアーゼ剤によって認識され、配列特異的な態様で切断されうる。ヌクレアーゼ剤による認識部位の二本鎖切断を測定する分析は、当分野で公知である（例えば、TaqMan（登録商標）qPCR分析、Friendewey D.ら、Methods in Enzymology, 2010, 476:295~307、全内容を参照により本発明に援用する）。

10

#### 【0049】

具体的実施形態では、認識部位は、選択マーカをコードするポリヌクレオチド内に配置される。かかる位置は、選択マーカのコード領域内、又は、調節領域の中に位置してもよく、それは選択マーカの発現に影響する。このように、ヌクレアーゼ剤の認識部位は、選択マーカのイントロン、プロモーター、エンハンサー、調節領域、又は選択マーカをコードするポリヌクレオチドのいかなる非タンパク質コード領域にも位置させることができる。具体的実施形態では、認識部位のニック又は二本鎖切断は、選択マーカの活性を損なわせる。機能性選択マーカの有無のアッセイ方法は公知である。

20

#### 【0050】

一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）である。TALエフェクターヌクレアーゼは、配列特異的ヌクレアーゼの一種であり、原核若しくは真核生物のゲノムにおける特異的標的配列の二本鎖切断に使用できる。TALエフェクターヌクレアーゼは、生来の若しくは操作された転写活性化因子様（TAL）エフェクター又はその機能性部分を、エンドヌクレアーゼ（例えばFokI）の触媒ドメインに融合させることにより作製される。ユニークな、モジュラーTALエフェクターDNA結合ドメインは、潜在的に、いかなる所与のDNA認識特異性を有するタンパク質の設計を可能にする。このように、TALエフェクターヌクレアーゼ剤のDNA結合ドメインは、特定のDNA標的部位を認識するために操作することができ、ゆえに、所望する標的配列における二本鎖切断に使用できる。国際公開第2010/079430号、Morbiterら（2010）PNAS 10.1073/pnas.1013133107、Scholze & Boch（2010）Virulence 1:428~432、Christianら、Genetics（2010）186:757~761、Liら（2010）Nuc. Acids Res.（2010）doi:10.1093/nar/gkq704、及びMillerら（2011）Nature Biotechnology 29:143~148を参照（これらの全内容を参照により本発明に援用する）。

30

40

#### 【0051】

適切なTALヌクレアーゼの例、及び適切なTALヌクレアーゼの調製方法が、米国特許出願第2011/0239315 A1号、同第2011/0269234 A1号、同第2011/0145940 A1号、同第2003/0232410 A1号、同第2005/0208489 A1号、同第2005/0026157 A1号、同第2005/0064474 A1号、同第2006/0188987 A1号、及び同第2006/0063231 A1号で開示される（各々、参照により本発明に援用する）。様々な実施形態では、TALエフェクターヌクレアーゼは、例えば目的の遺伝子座又は目的のゲノム遺伝子座などの標的核酸配列又はその近傍で切断するよう操作され、当該標的核

50

酸配列は、その配列で、又はその近傍で、ターゲッティングベクターによって修飾される。本明細書で提供される様々な方法及び組成物の用途に適するTALヌクレアーゼとしては、本明細書で記載されるターゲッティングベクターによって修飾される標的核酸配列で、又はその近傍で結合するよう特異的に設計されたものが挙げられる。

#### 【0052】

一実施形態では、TALENの各モノマーは、2つの超可変性の残基を経て1つの塩基対を認識する33~35のTALリピートを含む。一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、一個のヌクレアーゼと、それに作動可能に連結されたTALリピートベースのDNA結合ドメインとを含むキメラタンパク質である。一実施形態では、当該一個のヌクレアーゼは、FokIエンドヌクレアーゼである。一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、第1のTAL-リピートベースのDNA結合ドメインと、第2のTAL-リピートベースのDNA結合ドメインを含み、第1及び第2TAL-リピートベースのDNA結合ドメインの各々は、FokIヌクレアーゼサブユニットに作動可能に連結し、第1及び第2TAL-リピートベースのDNA結合ドメインは、様々な長さ(12~20bp)のスペーサー配列によって分離された標的DNA配列の各鎖中の2つの連続する標的DNA配列を認識し、FokIヌクレアーゼサブユニットは二量体化し、標的配列で二本鎖切断をする活性ヌクレアーゼ剤を形成する。

10

#### 【0053】

本明細書に開示される様々な方法及び組成物で使用されるヌクレアーゼ剤は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を更に含むことができる。一実施形態では、ZFNの各モノマーは、3つ以上のZnフィンガーベースのDNA結合ドメインを含み、各ZnフィンガーベースのDNA結合ドメインは、3bpのサブサイトと結合する。他の実施形態では、ZFNは作動可能に独立ヌクレアーゼ剤に結合したZnフィンガーベースのDNA結合ドメインを含むキメラタンパク質である。一実施形態では、一個のエンドヌクレアーゼは、FokIエンドヌクレアーゼである。一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、第1ZFNと第2ZFNとを含み、第1ZFNと第2ZFNの各々は、FokIヌクレアーゼサブユニットに作動可能に連結し、第1及び第2ZFNは、約5~7bpのスペーサーで分離された標的DNA配列の各鎖中の2つの連続する標的DNA配列を認識し、FokIヌクレアーゼサブユニットは二量体化し、二本鎖切断をする活性ヌクレアーゼ剤を形成する。例えば、米国特許出願公開第20060246567号、同第20080182332号；同第20020081614号；同第20030021776号、国際公開第2002/057308A2号、米国特許出願公開第20130123484号、同第20100291048号、国際公開第2011/017293A2号、及びGajら、(2013) Trends in Biotechnology, 31(7): 397~405を参照(各々、参照により本発明に援用する)。

20

30

#### 【0054】

更に他の実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、メガヌクレアーゼである。メガヌクレアーゼは、保存された配列モチーフに基づき4つのファミリーに分類され、当該ファミリーは、LAGLIDADG、GIY-YIG、H-N-H及びHis-Cys boxファミリーである。これらのモチーフは、金属イオンの配位及びホスホジエステル結合の加水分解に関与する。メガヌクレアーゼは、それらの長い認識部位、及びそれらのDNA基質における若干の配列多型の許容性が特徴である。メガヌクレアーゼのドメイン、構造及び機能は公知であり、例えばGuhan及びMuniyappa(2003) Crit Rev Biochem Mol Biol 38: 199~248、Lucasら(2001) Nucleic Acids Res 29: 960~9、Jurica及びStoddard(1999) Cell Mol Life Sci 55: 1304~26、Stoddard(2006) Q Rev Biophys 38: 49~95及びMoureら(2002) Nat Struct Biol 9: 764を参照。幾つかの例では、天然に生じる変異体及び/又は操作されたメガヌクレアーゼ誘導体が用いられる。動力学、補因子との相互作用、発現、最適条件及び/又は認識部位の特異性の修飾、並

40

50

びに活性のスクリーニング方法は公知であり、例えば、Epinatら(2003) *Nucleic Acids Res* 31:2952~62、Chevalierら(2002) *Mol Cell* 10:895~905、Gimbleら(2003) *Mol Biol* 334:993~1008、Seligmanら(2002) *Nucleic Acids Res* 30:3870~9、Sussmanら(2004) *J Mol Biol* 342:31~41、Rosenら(2006) *Nucleic Acid Res* 34:4791~800、Chamesら(2005) *Nucleic Acids Res* 33:e178、Smithら(2006) *Nucleic Acids Res* 34:e149、Gruenら(2002) *Nucleic Acids Res* 30:e29、Chen及びZhao, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e154、国際公開第2005105989号、同第2003078619号、同第2006097854号、同第2006097853号、同第2006097784号、及び同第2004031346号を参照。

10

## 【0055】

いかなるメガヌクレアーゼも本発明中に使用でき、限定されないが、I-SceI、I-SceII、I-SceIII、I-SceIV、I-SceV、I-SceVI、I-SceVII、I-CeuI、I-CeuAIIIP、I-CreI、I-CrepsbIP、I-CrepsbIIP、I-CrepsbIIIP、I-CrepsbIVP、I-TliI、I-PpoI、PI-PspI、F-SceI、F-SceII、F-SuvI、F-TevI、F-TevII、I-AmaI、I-AniI、I-ChuI、I-CmoeI、I-CpaI、I-CpaII、I-CsmI、I-CvuI、I-CvuAIP、I-DdiI、I-DdiII、I-DirI、I-DmoI、I-HmuI、I-HmuII、I-HsNIP、I-LlaI、I-MsoI、I-NaaI、I-NanI、I-NcIIP、I-NgrIP、I-NitI、I-NjaI、I-Nsp236IP、I-PakI、I-PboIP、I-PcuIP、I-PcuAI、I-PcuVI、I-PgrIP、I-PobIP、I-PorI、I-PorIIP、I-PbpIP、I-SpBetaIP、I-ScaI、I-SexIP、I-SneIP、I-SpomI、I-SpomCP、I-SpomIP、I-SpomIIP、I-SquIP、I-Ssp6803I、I-SthPhiJP、I-SthPhiST3P、I-SthPhiSTe3bP、I-TdeIP、I-TevI、I-TevII、I-TevIII、I-UarAP、I-UarHGPAIP、I-UarHGPA13P、I-VinIP、I-ZbiIP、PI-MtuI、PI-MtuHIP、PI-MtuHIIP、PI-PfuI、PI-PfuII、PI-PkoI、PI-PkoII、PI-Rma43812IP、PI-SpBetaIP、PI-SceI、PI-TfuI、PI-TfuII、PI-ThyI、PI-TliI、PI-TliII、又はそれらのあらゆる活性型の変異体又は断片が含まれる。

20

30

## 【0056】

一実施形態では、メガヌクレアーゼは、12~40の塩基対の二本鎖DNA配列を認識する。一実施形態では、メガヌクレアーゼは、ゲノム内の1つの完全一致した標的配列を認識する。一実施形態では、メガヌクレアーゼは、ホーミングヌクレアーゼである。一実施形態では、ホーミングヌクレアーゼは、LAGLIDADGファミリーのホーミングヌクレアーゼである。一実施形態では、LAGLIDADGファミリーのホーミングヌクレアーゼ剤は、I-SceI、I-CreI及びI-DmoIから選択される。

40

## 【0057】

ヌクレアーゼ剤は制限エンドヌクレアーゼを更に含むことができ、それにはI型、II型、III型及びIV型エンドヌクレアーゼが含まれる。I型及びIII型制限エンドヌクレアーゼは、特定の認識部位を認識するが、典型的にはヌクレアーゼ結合部位から離れた様々な位置で切断し、それ(認識部位)は切断部位から何百塩基対も離れることもある。II型のシステムでは、制限酵素活性はいかなるメチラーゼ活性からも独立し、典型的には結合部位、又はその近傍の特定の部位で切断がなされる。大部分のII型酵素は、パ

50



リンドローム配列を切断するが、I I a型酵素は、非パリンドローム認識部位を認識し、認識部位の外側で切断し、I I b型酵素は、認識部位の外側の両方の部位で配列を2回切断し、またI I s型酵素は、非対称の認識部位を認識し、認識部位から約1~20ヌクレオチドの定義された距離で1つの側で切断する。I V型制限酵素は、メチル化DNAを標的とする。制限酵素は更に、例えばREBASEデータベース(ウェブページ [rebase.neb.com](http://rebase.neb.com)、Robertson(2003) *Nucleic Acids Res* 31:418~20)、Robertson(2003) *Nucleic Acids Res* 31:1805~12、及びBelfort(2002) *Mobile DNA II*, pp.761~783, Eds. Craigie(ASM Press, Washington, DC)に記載され、分類されている。

10

## 【0058】

様々な方法及び組成物で使用されるヌクレアーゼ剤はまた、CRISPR/Casシステムを含むこともできる。かかるシステムは、Cas9ヌクレアーゼ剤を使用することができ、若干の例では、それが発現される望ましい細胞型に従いコドン最適化される。システムは更に、コドン最適化されたCas9と共に機能する融合crRNA-tracrRNAコンストラクトを使用する。この1つのRNAは、ガイドRNA又はgRNAとしばしば称される。gRNAの中で、crRNA部分は所与の認識部位の「標的配列」として同定され、tracrRNAは「スキヤフォールド」としばしば称される。このシステムは、種々の真核生物及び原核細胞内で機能することが示されている。手短には、標的配列を含む短いDNA断片が、ガイドRNA発現プラスミドに挿入される。gRNA発現プラスミドは、標的配列(幾つかの実施形態では約20ヌクレオチド)と、tracrRNA配列の形態(スキヤフォールド)と、細胞内で活性な適切なプロモーターと、真核生物細胞内での適当なプロセッシングに必要なエレメントと、を含む。システムの多くは、アニールして二本鎖DNAを形成し、次にgRNA発現プラスミド中にクローニングするための、カスタムメイドの相補的なオリゴDNAに依存する。次にgRNA発現カセット及びCas9発現カセットが細胞に導入される。例えば、Mali(2013) *Science* 2013 Feb 15;339(6121):823~6、Jinek(2012) *Science* 2012 Aug 17;37(6096):816~21、Hwang(2013) *Nat Biotechnol* 2013 Mar;31(3):227~9、Jiang(2013) *Nat Biotechnol* 2013 Mar;31(3):233~9、及びCong(2013) *Science* 2013 Feb 15;339(6121):819~23を参照(各々を参照によって本発明に援用する)。

20

30

## 【0059】

本明細書に開示される方法及び組成物は、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列(CRISPR)/CRISPR関連(Cas)システム又はかかるシステムの構成要素を利用して、細胞内のゲノムを修飾することができる。CRISPR/Casシステムは、Cas遺伝子発現に関係するか、又は、その活性を制御する転写物及び他の要素を含む。CRISPR/Casシステムは、I型、II型又はIII型システムでありうる。本明細書に開示される方法及び組成物は、CRISPR複合体(Casタンパク質と複合したガイドRNA(gRNA)を含む)を核酸の部位特異的切断に利用することで、CRISPR/Casシステムを使用する。

40

## 【0060】

本明細書に開示される方法で用いられる幾つかのCRISPR/Casシステムは、非天然に生じたものである。「非天然に生じた」システムには、人間の手が関与するいかなるものも含まれ、例えば、システムの1つ以上の構成要素が、天然に生じる状態から変更若しくは変異したか、事実上、天然に関連する少なくとも1つの他の構成要素を少なくとも実質的に含まないか、又は、天然に関連しない少なくとも1つの他の構成要素と関連すること、が含まれる。例えば、幾つかのCRISPR/Casシステムは、天然では生じないgRNAとCasタンパク質とを共に含む非天然のCRISPR複合体を使用する。

## 【0061】

50

i . C a s RNAにガイドされるエンドヌクラーゼ

C a sタンパク質は通常、少なくとも1つのRNA認識又は結合ドメインを含む。かかるドメインは、ガイドRNA ( g RNA、下記で詳述する ) と相互作用できる。C a sタンパク質は、ヌクラーゼドメイン ( 例えば、D N a s e又はR N a s eドメイン )、D N A結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質 - タンパク質相互作用ドメイン、二量体化ドメイン及び他のドメインを含むこともできる。ヌクラーゼドメインは、核酸を切断する触媒活性を有する。切断には、核酸分子の共有結合の切断が含まれる。切断により、平滑末端又は粘着末端が生じ、それらは一本鎖又は二本鎖である。

【 0 0 6 2 】

C a sタンパク質の例としては、C a s 1、C a s 1 B、C a s 2、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 5 e ( C a s D )、C a s 6、C a s 6 e、C a s 6 f、C a s 7、C a s 8 a 1、C a s 8 a 2、C a s 8 b、C a s 8 c、C a s 9 ( C s n 1又はC s x 1 2 )、C a s 1 0、C a s 1 0 d、C a s F、C a s G、C a s H、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1 ( C a s A )、C s e 2 ( C a s B )、C s e 3 ( C a s E )、C s e 4 ( C a s C )、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 1 7、C s x 1 4、C s x 1 0、C s x 1 6、C s a X、C s x 3、C s x 1、C s x 1 5、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4及びC u 1 9 6 6、並びにその相同物又は修飾誘導体が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

C a sタンパク質は、I I型C R I S P R / C a sシステムに由来してもよい。例えば、C a sタンパク質は、C a s 9タンパク質であってもよく、C a s 9タンパク質の誘導体であってもよい。C a s 9タンパク質は典型的には、保存された構造の4つのモチーフを共有する。モチーフ1、2及び4は、R u v C様モチーフであり、モチーフ3はH N Hモチーフである。C a s 9タンパク質は、例えばS t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s、S t r e p t o c o c c u s t h e r m o p h i l u s、S t r e p t o c o c c u s s p .、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s、N o c a r d i o p s i s d a s s o n v i l l e i、S t r e p t o m y c e s p r i s t i n a e s p i r a l i s、S t r e p t o m y c e s v i r i d o c h r o m o g e n e s、S t r e p t o m y c e s v i r i d o c h r o m o g e n e s、S t r e p t o s p o r a n g i u m r o s e u m、S t r e p t o s p o r a n g i u m r o s e u m、A l i c y c l o b a c h l u s a c i d o c a l d a r i u s、B a c i l l u s p s e u d o m y c o i d e s、B a c i l l u s s e l e n i t i r e d u c e n s、E x i g u o b a c t e r i u m s i b i r i c u m、L a c t o b a c i l l u s d e l b r u e c k i i、L a c t o b a c i l l u s s a l i v a r i u s、M i c r o s c i l l a m a r i n a、B u r k h o l d e r i a l e s b a c t e r i u m、P o l a r o m o n a s n a p h t h a l e n i v o r a n s、P o l a r o m o n a s s p .、C r o c o s p h a e r a w a t s o n i i、C y a n o t h e c e s p .、M i c r o c y s t i s a e r u g i n o s a、S y n e c h o c o c c u s s p .、A c e t o h a l o b i u m a r a b a t i c u m、A m m o n i f e x d e g e n s i i、C a l d i c e l u l o s i r u p t o r b e c s c i i、C a n d i d a t u s D e s u l f o r u d i s、C l o s t r i d i u m b o t u l i n u m、C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e、F i n e g o l d i a m a g n a、N a t r a n a e r o b i u s t h e r m o p h i l u s、P e l o t o m a c u l u m t h e r m o p r o p i o n i c u m、A c i d i t h i o b a c i l l u s c a l d u s、A c i d i t h i o b a c i l l u s f e r r o o x i d a n s、A l l o c h r o m a t i u m v i n o s u m、M a r i n o b a c t e r s p .、N i t r o s o c o c c u s h a l o p h i l u s、N i t r o s o c o c c u s w a t s o n i、P s e u d o a l t e r o m o n a s h a l o p l a n k t i s、K t e d o n o b a c t e r r a c e m i f e r、M e t h a n o h a l o b i u m

e v e s t i g a t u m、A n a b a e n a v a r i a b i l i s、N o d u l a r i a s p u m i g e n a、N o s t o c s p .、A r t h r o s p i r a m a x i m a、A r t h r o s p i r a p l a t e n s i s、A r t h r o s p i r a s p .、L y n g b y a s p .、M i c r o c o l e u s c h t h o n o p l a s t e s、O s c i l l a t o r i a s p .、P e t r o t o g a m o b i l i s、T h e r m o s i p h o a f r i c a n u s、又はA c a r y o c h l o r i s m a r i n a由来でありうる。C a s 9ファミリーの更なる例は、全内容を参照により本発明に援用する国際公開第2014/131833号に記載されている。S . p y o g e n e s由来のC a s 9タンパク質又はその誘導体が、好ましい酵素である。S . p y o g e n e s由来のC a s 9タンパク質は、S w i s s P r o t アクセション番号Q 9 9 Z W 2を有する。

10

## 【0064】

C a s タンパク質は、野生型タンパク質（すなわち天然起源）、修飾C a s タンパク質（すなわちC a s タンパク質変異体）又は野生型又は修飾C a s タンパク質の断片であってもよい。C a s タンパク質は、野生型又は修飾C a s タンパク質の活性型変異体又は断片でもよい。当該活性型変異体又は断片は、野生型又は修飾C a s タンパク質又はその部分に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有し、当該活性型変異体は、望ましい部位で切断する能力を保持し、ゆえに切断の誘導若しくは二本鎖切断の誘導に関する活性を保持する。切断の誘導又は二本鎖切断の誘導に関する活性のアッセイ方法は公知であり、通常、切断部位を含むDNA基質上でのC a s タンパク質の全体活性及び特異性を測定する。

20

## 【0065】

C a s タンパク質を修飾することにより、核酸結合親和性、核酸結合特異性及び/又は酵素活性を増減させることができる。C a s タンパク質を修飾することにより、他のいかなる活性又はタンパク質の特性（例えば安定性）も変化させることもできる。例えば、C a s タンパク質の1つ以上のヌクレアーゼドメインを、修飾、削除、不活性化することができ、又は、C a s タンパク質から、タンパク質の機能に不可欠でないドメインを除去して、C a s タンパク質の活性を最適化（例えば強化又は低減）することができる。

## 【0066】

幾つかのC a s タンパク質は、少なくとも2つのヌクレアーゼドメイン（例えばD N a s eドメイン）を含む。例えば、C a s 9タンパク質は、R u v C様ヌクレアーゼドメイン及びH N H様ヌクレアーゼドメインを含むことができる。R u v C及びH N Hドメインの各々は、DNAの二本鎖を切断する際、二本鎖DNAの各々異なる鎖を切断できる。例えばJ i n e k ら（2012）S c i e n c e 337:816~821を参照（全内容を参照により本発明に援用する）。

30

## 【0067】

ヌクレアーゼの1つ又は両ドメインを、削除又は変異させることにより、それらは機能を失うか、又はヌクレアーゼ活性が減少する。ヌクレアーゼドメインのうちの1つが削除又は変異した場合、得られるC a s タンパク質（例えばC a s 9）はニッカーゼ（nickase）と称され、二本鎖DNA内のC R I S P R RNA認識配列で、二本鎖切断でなく一本鎖切断を行う（すなわち、相補鎖又は非相補鎖を切断できるが、両方ではない）。ヌクレアーゼドメインの両方とも削除若しくは変異した場合、得られるC a s タンパク質（例えばC a s 9）は、二本鎖DNAの両鎖を切断する能力が低減する。C a s 9をニッカーゼに変換する変異の例は、S . p y o g e n e s由来のC a s 9のR u v CドメインのD 1 0 A変異（C a s 9の位置10のアスパラギン酸のアラニンへの変異）である。同様に、S . p y o g e n e s由来のC a s 9のH N HドメインのH 9 3 9 A（アミノ酸位839のヒスチジンのアラニンへの変異）又はH 8 4 0 A（アミノ酸位840のヒスチジンのアラニンへの変異）によってもC a s 9をニッカーゼに変換できる。C a s 9をニッカーゼに変換する突然変異の他の例には、S . t h e r m o p h i l u sからC a s 9への対応する突然変異が含まれる。S a p r a n a u s k a s ら、（2011）N u c l e i c

40

50

Acids Research 39:9275~9282及び国際公開第2013/141680号を参照(各々の内容を参照により本発明に援用する)。かかる変異は、例えば部位特異的変異導入、PCRによる変異導入、又は完全な遺伝子合成を用いることにより生じさせることができる。ニッカーゼを生じさせる他の変異の例は、例えば国際公開第2013/176772A1号及び国際公開第2013/142578A1号に記載され、各内容を参照により本発明に援用する。

【0068】

Casタンパク質は、融合タンパク質であってもよい。例えば、Casタンパク質は、切断ドメイン、後成的修飾ドメイン、転写活性化ドメイン又は転写リプレッサドメインと融合させることができる。国際公開第2014/089290号を参照(全内容を参照により本発明に援用する)。Casタンパク質を異種ポリペプチドと融合させ、安定性を向上又は低下させることもできる。融合したドメイン又は異種ポリペプチドは、Casタンパク質内のN末端、C末端、又は内部に位置させることができる。

10

【0069】

Casタンパク質は、細胞内局在化のための異種ポリペプチドと融合させることができる。当該異種ペプチドとしては、例えば、核内ターゲティングのためのSV40 NLSのような核局在化シグナル(NLS)、ミトコンドリアへのターゲティングのためのミトコンドリア局在シグナル、ER保留シグナルなどが挙げられる。Langera(2007) J. Biol. Chem. 282:5101~5105を参照。かかる細胞内局在化シグナルは、Casタンパク質内のN末端、C末端又は内部のいずれにも位置させることができる。NLSは、塩基性アミノ酸のストレッチを含んでもよく、一分節の配列又は二分節の配列であってもよい。

20

【0070】

Casタンパク質は、細胞貫通ドメインに結合してもよい。例えば、細胞貫通ドメインは、HIV-1 TATタンパク質(ヒトB型肝炎ウイルス由来の、TLM細胞貫通モチーフ)、MPG、Pep-1、VP22、単純ヘルペスウイルス由来の細胞貫通ペプチド、又はポリアルギニンペプチド配列に由来してもよい。国際公開第2014/089290号を参照(全内容を参照により本発明に援用する)。細胞貫通ドメインは、Casタンパク質内のN末端、C末端、又は内部のいずれにも位置させることができる。

30

【0071】

Casタンパク質は、トラッキング又は精製を容易にするため、例えば蛍光タンパク質、精製タグ又はエピトープタグなどの異種ポリペプチドを含んでもよい。蛍光タンパク質の例としては、緑色蛍光タンパク質(例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、eGFP、Emerald、Azami Green、モノマー状のAzami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1)、黄色蛍光タンパク質(例えば、YFP、eYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、青色蛍光タンパク質(例えば、eBFP、eBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire)、シアン蛍光タンパク質(例えば、eCFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan)、赤色蛍光タンパク質(mKate、mKate2、mPlum、DsRedモノマー、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred)、オレンジ蛍光タンパク質(mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato)、並びに他の適切な蛍光タンパク質が挙げられる。タグの例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、キチン結合タンパク質(CBP)、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン(TRX)、ポリ(NANP)、タンデム親和性精製(TAP)タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、ヘマグルチニン(HA)、nus、Softag 1

40

50

、Softag 3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、ヒスチジン(His)、ビオチンカルボキシルキャリアータンパク質(BCCP)及びカルモジュリンが挙げられる。

【0072】

Casタンパク質は、いかなる形で提供してもよい。例えば、Casタンパク質は、例えばgRNAと複合体を形成するCasタンパク質の形で提供されてもよい。あるいは、Casタンパク質は、Casタンパク質をコードする核酸の形(例えばRNA、例えば伝令RNA(mRNA)又はDNA)で提供されてもよい。任意に、Casタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞又は生物におけるタンパク質への効果的な翻訳のためにコドン最適化されてもよい。

10

【0073】

Casタンパク質をコードする核酸は、細胞のゲノムに安定的に組み込まれ、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結されてもよい。あるいは、Casタンパク質をコードする核酸は、発現コンストラクト内のプロモーターに作動可能に連結されてもよい。当該発現コンストラクトは、目的遺伝子(例えばCas遺伝子)の発現を誘導でき、当該目的の核酸配列を標的細胞へ導入できるいかなる核酸コンストラクト又はその他の核酸配列を含んでもよい。発現コンストラクトで使用できるプロモーターとしては、例えば、多能性ラット、真核生物、哺乳動物、非ヒト哺乳動物、ヒト、齧歯動物、マウス又はハムスターの細胞で活性なプロモーターが挙げられる。他のプロモーターの例は、本明細書で随所に述べる。

20

【0074】

ii. ガイドRNA(gRNA)

「ガイドRNA」又は「gRNA」には、Casタンパク質と結合して、標的DNA内の特定の位置にCasタンパク質をターゲティングするRNA分子が含まれる。ガイドRNAは、「DNA-ターゲティングセグメント」と「タンパク質結合セグメント」の2つのセグメントを含みうる。「セグメント」には、分子のセグメント、セクション又は領域(例えばRNA内のヌクレオチドの連続したストレッチ)が含まれる。幾つかのgRNAは、「アクチベーターRNA」と「ターゲッターRNA」の2つの別々のRNA分子を含む。他のgRNAとしては、単一RNA分子(単一のRNAポリヌクレオチド)であり、それは「単分子gRNA」、「単一ガイドRNA」又は「sgRNA」とも称される。

30

。国際公開第2013/176772A1号、同第2014/065596A1号、同第2014/089290A1号、同第2014/093622A2号、同第2014/099750A2号、同第2013142578A1号、及び同第2014/131833A1号を参照(各内容を参照により本発明に援用する)。用語「ガイドRNA」及び「gRNA」には、二分子gRNAと一分子gRNAが含まれる。

【0075】

例示的な二分子gRNAには、crRNA様(「CRISPR RNA」又は「ターゲッターRNA」又は「crRNA」又は「crRNAリピート」)分子、及び対応するtracrRNA様(「trans-作用型CRISPR RNA」又は「アクチベーターRNA」又は「tracrRNA」又は「スキヤフォールド」)分子が含まれる。crRNAは、gRNAのDNAターゲティングセグメント(一本鎖)と、gRNAのタンパク質結合セグメントのdsRNA二重鎖の片半分を形成するヌクレオチドのストレッチの両方を含む。

40

【0076】

対応するtracrRNA(アクチベーターRNA)は、gRNAのタンパク質結合セグメントのdsRNA二重鎖の残り半分を形成するヌクレオチドのストレッチを含む。crRNAのヌクレオチドのストレッチは、tracrRNAのヌクレオチドのストレッチと相補的であり、それらはハイブリダイズし、gRNAのタンパク結合ドメインのdsRNA二重鎖を形成する。

【0077】

50

このように、各 crRNA は、対応する tracrRNA を有するといえる。crRNA と対応する tracrRNA はハイブリダイズして、gRNA を形成する。crRNA は、CRISPR RNA 認識配列にハイブリダイズする一本鎖の DNA ターゲティングセグメントを更に提供する。細胞内での修飾のために用いられる場合、所与の crRNA 又は tracrRNA 分子の正確な配列は、RNA 分子が用いられる種に特異的であるよう設計することができる。例えば、Mali ら (2013) Science 339: 823 ~ 826、Jinek ら (2012) Science 337: 816 ~ 821、Hwang ら (2013) Nat. Biotechnol. 31: 227 ~ 229、Jiang ら (2013) Nat. Biotechnol. 31: 233 ~ 239、及び Cong ら (2013) Science 339: 819 ~ 823 を参照 (各内容を参照により本発明に援用する)。

10

## 【0078】

所与の gRNA の DNA ターゲティングセグメント (crRNA) は、標的 DNA 内の配列と相補的なヌクレオチド配列を含む。gRNA の DNA ターゲティングセグメントは、ハイブリダーゼーション (すなわち塩基対形成) を経て、配列特異の様式で標的 DNA と相互作用する。このように、DNA ターゲティングセグメントのヌクレオチド配列を変化させることにより、gRNA と標的 DNA が相互作用する標的 DNA 内の位置が適宜決定される。本発明の gRNA の DNA ターゲティングセグメントを修飾することにより、標的 DNA 内のいかなる目的の配列とハイブリダイズさせることができる。天然起源の crRNA は、Cas9 システム及び生物により異なるが、通常、21 ~ 46 のヌクレオチド長の 2 つのダイレクトリピート (DR) が隣接する、21 ~ 72 のヌクレオチド長のターゲティングセグメントを含む (国際公開第 2014/131833 号参照)。Spyogenes の場合、DR は 36 ヌクレオチド長であり、ターゲティングセグメントは 30 ヌクレオチド長である。3' に位置する DR は、対応する tracrRNA と相補的であり、それらはハイブリダイズし、次に Cas9 タンパク質と結合する。

20

## 【0079】

DNA ターゲティングセグメントは、約 12 ヌクレオチド ~ 約 100 ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、DNA ターゲティングセグメントは、約 12 ヌクレオチド (nt) ~ 約 80 nt、約 12 nt ~ 約 50 nt、約 12 nt ~ 約 40 nt、約 12 nt ~ 約 30 nt、約 12 nt ~ 約 25 nt、約 12 nt ~ 約 20 nt、又は約 12 nt ~ 約 19 nt の長さを有し得る。あるいは、DNA ターゲティングセグメントは、約 19 nt ~ 約 20 nt、約 19 nt ~ 約 25 nt、約 19 nt ~ 約 30 nt、約 19 nt ~ 約 35 nt、約 19 nt ~ 約 40 nt、約 19 nt ~ 約 45 nt、約 19 nt ~ 約 50 nt、約 19 nt ~ 約 60 nt、約 19 nt ~ 約 70 nt、約 19 nt ~ 約 80 nt、約 19 nt ~ 約 90 nt、約 19 nt ~ 約 100 nt、約 20 nt ~ 約 25 nt、約 20 nt ~ 約 30 nt、約 20 nt ~ 約 35 nt、約 20 nt ~ 約 40 nt、約 20 nt ~ 約 45 nt、約 20 nt ~ 約 50 nt、約 20 nt ~ 約 60 nt、約 20 nt ~ 約 70 nt、約 20 nt ~ 約 80 nt、約 20 nt ~ 約 90 nt、又は約 20 nt ~ 約 100 nt の長さを有し得る。

30

## 【0080】

標的 DNA のヌクレオチド配列 (CRISPR RNA 認識配列) と相補的な DNA ターゲティングセグメントのヌクレオチド配列は、少なくとも約 12 nt の長さを有し得る。例えば、DNA ターゲティング配列 (すなわち、標的 DNA 内の CRISPR RNA 認識配列と相補的な DNA ターゲティングセグメント中の配列) は、少なくとも約 12 nt、少なくとも約 15 nt、少なくとも約 18 nt、少なくとも約 19 nt、少なくとも約 20 nt、少なくとも約 25 nt、少なくとも約 30 nt、少なくとも約 35 nt、又は少なくとも約 40 nt の長さを有し得る。あるいは、DNA ターゲティング配列は、約 12 ヌクレオチド (nt) ~ 約 80 nt、約 12 nt ~ 約 50 nt、約 12 nt ~ 約 45 nt、約 12 nt ~ 約 40 nt、約 12 nt ~ 約 35 nt、約 12 nt ~ 約 30 nt、約 12 nt ~ 約 25 nt、約 12 nt ~ 約 20 nt、約 12 nt ~ 約 19 nt、約

40

50

19 nt ~ 約20 nt、約19 nt ~ 約25 nt、約19 nt ~ 約30 nt、約19 nt ~ 約35 nt、約19 nt ~ 約40 nt、約19 nt ~ 約45 nt、約19 nt ~ 約50 nt、約19 nt ~ 約60 nt、約20 nt ~ 約25 nt、約20 nt ~ 約30 nt、約20 nt ~ 約35 nt、約20 nt ~ 約40 nt、約20 nt ~ 約45 nt、約20 nt ~ 約50 nt、又は約20 nt ~ 約60 ntの長さを有し得る幾つの場合、DNAターゲティング配列は、約20 ntの長さを有し得る。

【0081】

tracrRNAは、いかなる形状（例えば全長tracrRNA又は活性型の部分tracrRNA）でもよく、いかなる長さでもよい。それらは、一次転写物でもよく、又はプロセシングされた形状であってもよい。例えば、tracrRNA（単一のガイドRNAの一部として、又は二分子のgRNAの一部としての単離された分子として）は、野生型tracrRNA配列の全部又は一部を含んでもよく、又はそれからなってもよい（例えば、野生型tracrRNA配列の約20、26、32、45、48、54、63、67、85又はそれ以上のヌクレオチド）。S. pyogenesからの野生型tracrRNA配列の例としては、171ヌクレオチド、89ヌクレオチド、75ヌクレオチド及び65ヌクレオチドのバージョンが挙げられる。Deltchevaら（2011）Nature 471:602~607、国際公開第2014/093661号を参照（それらの全内容を参照により本発明に援用する）。単一のガイドRNA（sgRNA）内のtracrRNAの例としては、sgRNAの+48、+54、+67及び+85バージョン内に存在するtracrRNA部分が挙げられる。なお、「+n」は、野生型+nヌクレオチドまでのtracrRNAがsgRNAに含まれることを意味する。米国特許第8,697,359号を参照（全内容を参照により本発明に援用する）。

【0082】

DNAターゲティング配列と標的DNA内のCRISPR RNA認識配列との間の相補性（%）は、少なくとも60%とすることができる（例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%）。DNAターゲティング配列と標的DNA内のCRISPR RNA認識配列との間の相補性（%）は、連続する約20ヌクレオチドにわたって少なくとも60%とすることができる。一例を挙げると、DNAターゲティング配列と標的DNA内のCRISPR RNA認識配列との間の相補性（%）は、標的DNAの相補鎖内のCRISPR RNA認識配列の5'末端の連続する14ヌクレオチドにわたって100%であり、その他に対しては0%である。この場合、DNAターゲティング配列は、14ヌクレオチド長であると考えられる。他の例を挙げると、DNAターゲティング配列と標的DNA内のCRISPR RNA認識配列との間の相補性（%）は、標的DNAの相補鎖内のCRISPR RNA認識配列の5'末端の連続する7ヌクレオチドにわたって100%であり、その他に対しては0%である。この場合、DNAターゲティング配列は、7ヌクレオチド長であると考えられる。

【0083】

gRNAのタンパク質結合セグメントは、互いに相補的な2つのヌクレオチドのストレッチを含んでもよい。タンパク質結合セグメントの相補ヌクレオチドはハイブリダイズし、RNA二重鎖（dsRNA）を形成する。本発明のgRNAのタンパク質結合セグメントは、Casタンパク質と相互に作用する、そして、gRNAはDNAターゲティングセグメントを経て標的DNA内で特異的なヌクレオチド配列へ結合されたCasタンパク質を導く。

【0084】

ガイドRNAは、望ましい特徴（例えば、安定性の修飾若しくは調節、細胞内のターゲティング、蛍光ラベルによるトラッキング、タンパク質又はタンパク質複合体への結合部位、等）を提供する修飾又は配列を更にも含む。当該修飾の例としては、例えば、5'キャップ（例えば、7メチルグアニレートキャップ（m7G））、3'ポリアダ

10

20

30

40

50

ニル化テイル（すなわち3'ポリ(A)テイル）、リボスイッチ配列（例えば、タンパク質及び/又はタンパク質複合体による安定性及び/又はアクセス可能性の調節を容易にする）、安定性制御配列、dsRNA二重鎖（すなわちヘアピン）形成配列）、RNAを細胞内局在（例えば核、ミトコンドリア、葉緑体等）に標的化させる修飾又は配列、トラッキング用の修飾又は配列（例えば蛍光分子との直接的なコンジュゲート形成、蛍光検出を可能にする部分とのコンジュゲーション、蛍光検出を可能にする配列等）、タンパク質結合部位を提供する修飾又は配列（例えば、転写活性化因子、転写リプレッサー、DNAメチルトランスフェラーゼ、DNAメチルトランスフェラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ等などの、DNAに作用するタンパク質）、並びにそれらの組み合わせが挙げられる。

10

## 【0085】

ガイドRNAは、いかなる形状で提供されてもよい。例えば、gRNAはRNAの形で、2分子（別個のcrRNA及びtracrRNA）として、又は1分子（sgRNA）として、また任意でCasタンパク質との複合体の形状で提供することができる。gRNAは、RNAをコードするDNAの形状で提供されてもよい。gRNAをコードするDNAは、単一のRNA分子（sgRNA）又は別個のRNA分子（例えば別個のcrRNA及びtracrRNA）をコードするものであってもよい。後者の場合、gRNAをコードするDNAは、それぞれcrRNA及びtracrRNAをコードする別個のDNA分子として提供されてもよい。

## 【0086】

gRNAをコードするDNAは、細胞のゲノム内に安定的に組み込まれて、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結されてもよい。あるいは、gRNAをコードするDNAは、発現コンストラクト内のプロモーターに作動可能に連結されてもよい。かかるプロモーターは、例えば、多能性のラット、真核生物、哺乳動物、非ヒト哺乳動物、ヒト、齧歯動物、マウス又はハムスターの細胞内で活性なものであってもよい。幾つかの場合、当該プロモーターは、RNAポリメラーゼIIIプロモーター（例えばヒトU6プロモーター、ラットU6ポリメラーゼIIIプロモーター又はマウスU6ポリメラーゼIIIプロモーター）である。他のプロモーターの例は、本明細書で随所に述べる。

20

## 【0087】

あるいは、gRNAは、様々な他の方法によって調製されてもよい。例えば、gRNAは、T7 RNAポリメラーゼ等を使用したin vitro転写によって調製されてもよい（国際公開第2014/089290号及び国際公開第2014/065596号参照）。ガイドRNAは、化学合成によって調製された合成分子であってもよい。

30

## 【0088】

## iii. CRISPR RNA 認識配列

「CRISPR RNA 認識配列」という用語には、結合のための十分な条件の存在下で、gRNAのDNAターゲティングセグメントが結合する、標的DNA内に存在する核酸配列が含まれる。例えば、CRISPR RNA 認識配列は、ガイドRNAが相補性を有するよう設計される配列を含み、その際、CRISPR RNA 認識配列とDNAターゲティング配列との間のハイブリダイゼーションがCRISPR複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションを生じさせ、CRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性が存在する場合には、完全な相補性が必ずしも必要とされるというわけではない。CRISPR RNA 認識配列はまた、以下に詳述するように、Casタンパク質のための切断部位を含む。CRISPR RNA 認識配列は、いかなるポリヌクレオチドを含んでもよく、例えば、細胞の核若しくは原形質内に、又は細胞のオルガネラ内（例えばミトコンドリア又は葉緑体）に位置してもよい。

40

## 【0089】

標的DNA内のCRISPR RNA 認識配列は、Casタンパク質又はgRNAによって標的とされる（すなわち、結合する、又はハイブリダイズする、又は相補的である）ことができる。適切なDNA/RNA結合条件には、細胞内の通常の生理的条件が含まれ

50



る。他の適切なDNA/RNA結合条件(例えば、無細胞系の条件)は、当分野で公知である(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrookら、Harbor Laboratory Press 2001)を参照)。Casタンパク質又はgRNAと相補的で、ハイブリダイズする標的DNAの鎖は、「相補鎖」と称され、「相補鎖」と相補的である標的DNAの鎖(したがって、Casタンパク質又はgRNAと相補的でない)は、「非相補的鎖」又は「テンプレート鎖」と称される。

#### 【0090】

Casタンパク質は、gRNAのDNAターゲティングセグメントが結合する標的DNA中に存在する核酸配列の範囲内又は外側の部位で核酸を切断することができる。「切断部位」は、Casタンパク質が一本鎖切断又は二本鎖切断をする核酸の位置を含む。例えば、CRISPR複合体の形成(CRISPR RNA認識配列とハイブリダイズし、Casタンパク質と複合体を形成するgRNAを含む)により、片方若しくは両方の鎖において、gRNAのDNAターゲティングセグメントが結合する標的DNA内に存在する核酸配列又はその近傍(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50若しくはそれ以上の塩基対内)が切断される。切断部位がgRNAのDNAターゲティングセグメントが結合する核酸配列の外側に存在する場合、切断部位は未だ、「CRISPR RNA認識配列」中に存在すると考えられる。切断部位は、核酸の1つの鎖上、又は両方の鎖上に存在してもよい。切断部位は、核酸の両鎖の(平滑断端を生じさせる)同じ位置に存在してもよく、又は、各鎖上の(粘着末端を生じさせる)異なる部位に存在してもよい。粘着末端は、例えば、2つのCasタンパク質を用いて生じさせることができ、その際、各々が各鎖上の異なる切断部位で一本鎖を切断し、それにより二本鎖を切断する。例えば、第1ニッカーゼが二本鎖DNA(dsDNA)の第1鎖上で一本鎖を切断し、第2ニッカーゼが、dsDNAの第2鎖上で、突出鎖が生じるように一本鎖を切断することができる。幾つかの場合、第1鎖上のニッカーゼのCRISPR RNA認識配列は、第2鎖上のニッカーゼのCRISPR RNA認識配列から、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100、250、500又は1,000塩基対離れている。

#### 【0091】

Cas9による標的DNAの部位特異的切断は、標的DNA内の、(i)gRNAと標的DNAとの間の塩基対形成の相補性、及び(ii)プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と称される短いモチーフ、の両方により決定される位置で生じうる。PAMは、CRISPR RNA認識配列に隣接してもよい。任意には、CRISPR RNA認識配列は、PAMに隣接してもよい。例えば、Cas9の切断部位は、PAM配列の上流又は下流の、約1~約10又は約2~約5塩基対(例えば、3塩基対)の位置に存在してもよい。幾つかの場合(例えば、S.pyogenes由来のCas9又は近い関係のCas9を用いる場合)、非相補鎖のPAM配列は、5'-N1GG-3'であってもよく、ここで、N1は、DNAヌクレオチドであり、標的DNAの非相補鎖のCRISPR RNA認識配列の直後の3'側に位置している。ゆえに、相補鎖のPAM配列は、5'-CCN2-3'であり、ここで、N2はいかなるDNAヌクレオチドであってもよく、標的DNAの相補鎖のCRISPR RNA認識配列の直前の5'側に位置している。そのような幾つかの場合において、N1とN2とは相補的であり、N1-N2塩基対はいかなる塩基対であってもよい(例えば、N1=CとN2=G; N1=GとN2=C; N1=AとN2=T、N1=TとN2=A)。

#### 【0092】

CRISPR RNA認識配列の例には、gRNAのDNAターゲティングセグメントと相補的なDNA配列、又はPAM配列が追加された当該DNA配列が含まれる。例えば、標的モチーフは、Casタンパク質によって認識されるNGGのモチーフの直前の20ヌクレオチドのDNA配列であってもよい(例えば国際公開第2014/165825号を参照)。5'末端のグアニンは、細胞内のRNAポリメラーゼによる転写を促進す

10

20

30

40

50

ることができる。CRISPR RNA認識配列の他の例としては、5'末端に2つのグアニンヌクレオチドを含むものが挙げられ(例えばGGN<sub>2</sub>0NGG、配列番号21)、*in vitro*でT7ポリメラーゼによる効果的な転写を促進することができる。例えば国際公開第2014/065596号を参照。

#### 【0093】

CRISPR RNA認識配列は、細胞に内在の若しくは外来のいかなる核酸配列であってもよい。CRISPR RNA認識配列は、遺伝子産物(例えばタンパク質)をコードする配列、非翻訳配列(例えば調節配列)、又はその両方を含む配列であってもよい。一実施形態では、標的配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列が直接隣接している。一実施形態では、目的の遺伝子座は、配列番号1のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、gRNAは、(CRISPR)RNA(crRNA)と、トランス活性化CRISPR RNA(tracrRNA)と、をコードする第3核酸配列を含む。他の実施形態では、多能性ラット細胞のゲノムは、標的配列と相補的な標的DNA領域を含む。かかる方法では、Casタンパク質は、Cas9である。幾つかの実施形態では、gRNAは、(a)配列番号2の核酸配列のキメラRNA、又は、(b)配列番号3の核酸配列のキメラRNAを含む。かかる方法では、crRNAは、配列番号4、配列番号5又は配列番号6に示す配列を含む。かかる方法では、tracrRNAは、配列番号7又は配列番号8に示す配列を含む。

#### 【0094】

また、ヌクレアーゼ剤の活性型の変異体及び断片(すなわち操作されたヌクレアーゼ剤)も提供される。かかる活性型の変異体は、生来のヌクレアーゼ剤に対し、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性であってもよく、当該活性型の変異体は、目的の認識部位を切断する能力を保持し、ゆえにニック又は二本鎖切断を誘導する活性を保持する。例えば、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤のいずれかは、生来のエンドヌクレアーゼの配列から修飾されることにより、生来のヌクレアーゼ剤によって認識されない認識部位を認識し、ニック又は二本鎖切断を誘導できるよう設計されうる。ゆえに、幾つかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ剤は、対応する生来のヌクレアーゼ剤認識部位と異なる認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する特異性を有する。ニック又は二本鎖切断を誘導する活性のアッセイ方法は公知であり、通常、認識部位を含むDNA基質上におけるエンドヌクレアーゼ剤の全体活性及び特異性を測定する。

#### 【0095】

例えば、図3は、ZFNの選択カセット上の結合部位及び切断部位の位置を表す。当該部位は、以下の通りである：Neo-ZFN(1,2)：ヌクレアーゼ結合部位/切断部位：

#### 【化1】

GGGCGCCCGTTCTTTTT/gtcaag/ACCGACCTGTCCGGTG (配列番号9)

Neo-ZFN(3,4)：ヌクレアーゼ結合部位/切断部位：

CCGGTCTTTTTGTC/aagacc/GACCTGTCCGGTGCC (配列番号10)

Hyg-ZFN(1,2)：ヌクレアーゼ剤結合部位/切断部位：

TGCGATCGCTGCGGCCGA/tcttag/CCAGACGAGCGGGTTCGG (配列番号11)

及びHyg-ZFN(3,4)：ヌクレアーゼ剤結合部位/切断部位：

CGCTGCGGCCGATCT/tagcca/GACGAGCGGGTTCGG (配列番号12)。

#### 【0096】

ヌクレアーゼ剤は、当分野で知られているあらゆる手段で細胞に導入されうる。ヌクレアーゼ剤をコードするポリペプチドを細胞に直接導入してもよい。あるいは、ヌクレアー

ゼ剤をコードするポリヌクレオチドを、細胞に導入してもよい。ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドが細胞に導入されるとき、当該ヌクレアーゼ剤は細胞内で、一過性に、条件に応じて、又は構成的に発現しうる。ゆえに、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは発現カセットに含めることができ、条件に応じるプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター又は組織特異的プロモーターに作動可能に連結されうる。目的のかかるプロモーターは、本発明で更に詳述する。あるいは、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ剤をコードする mRNA として細胞に導入される。

#### 【0097】

具体的実施形態では、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、細胞のゲノム内に安定的に組み込まれ、細胞内で活性化プロモーターに作動可能に連結される。他の実施形態では、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、挿入ポリヌクレオチドを含む同じターゲティングベクターに存在し、一方、他の例では、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、挿入ポリヌクレオチドを含むターゲティングベクターとは別のベクター又はプラスミドに存在している。

#### 【0098】

ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドの導入を通じてヌクレアーゼ剤が細胞に提供されるとき、そのようなヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、ヌクレアーゼ剤をコードする天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、目的の細胞内での高い使用頻度のコドンに置換する修飾がなされてもよい。例えば、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、目的の所与の原核又は真核生物細胞（目的の細菌細胞、酵母菌、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞、ラット細胞又は他のあらゆる宿主細胞が含まれる）内にて高い使用頻度のコドンに置換する修飾がなされてもよい。

#### 【0099】

##### B．選択マーカー

本明細書で提供される様々な方法及び組成物では、選択マーカーとの組み合わせにおいて、ヌクレアーゼ剤及びその対応する認識部位を使用する。本明細書に記載のように、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド内への認識部位の配置により、標的遺伝子座での組み込みイベントの効率的な確認方法が提供されうる。更に、本明細書に記載の様々な方法では、ヌクレアーゼ認識部位を有する交替される選択マーカーが、導入効率及び効果の改善のために使用され、それにより、目的の複数のポリヌクレオチドが、所与の標的遺伝子座内に組み込まれる。

#### 【0100】

様々な選択マーカーが、本明細書に開示される方法及び組成物で使用できる。かかる選択マーカーは、例えば、抗生物質（例えば G 4 1 8、ハイグロマイシン、ブラストシジン、ネオマイシン又はピューロマイシン）に対する抵抗性を付与できる。かかる選択マーカーとしては、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（neo<sup>r</sup>）、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ（hyg<sup>r</sup>）、ピューロマイシン - N - アセチルトランスフェラーゼ（pur<sup>r</sup>）及びブラスチシジン S デアミナーゼ（bsr<sup>r</sup>）が挙げられる。更に他の実施形態では、選択マーカーは、誘導性プロモーターに作動可能に連結され、選択マーカーの発現は、細胞に対する毒性を示す。かかる選択マーカーの非限定的な例としては、キサントシン/グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（gpt）、ヒポキサントシン/グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPR T）又は単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV - TK）が挙げられる。

#### 【0101】

選択マーカーをコードするポリヌクレオチドは、細胞内で活性化プロモーターに作動可能に連結される。かかる発現カセット及びそれらの様々な調節要素は、本明細書で更に詳述する。

#### 【0102】

##### C．標的遺伝子座

本発明では、標的遺伝子座への少なくとも1つの挿入ポリヌクレオチドの組み込みを可能にする、様々な方法及び組成物が提供される。用語「標的遺伝子座」には、挿入ポリヌクレオチドを組み込もうとするDNAのいかなるセグメント又は領域も含まれる。一実施形態では、標的遺伝子座は、ゲノム遺伝子座である。標的遺伝子座は、細胞の生来のものであってもよく、あるいは異種又は外来のDNAセグメントを含んでもよい。かかる異種又は外来のDNAセグメントは、トランスジーン、発現カセット、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド、又は異種若しくは外来のDNA領域（すなわちゲノムDNAの異種若しくは外来の領域）を含んでもよい。例えば、標的遺伝子座は、認識部位、選択マーカー、以前に組み込まれた挿入ポリヌクレオチド、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチド、プロモーター等、標的導入システムのいずれを含んでもよい。あるいは、標的

10 遺伝子座は、酵母人工染色体（YAC）、大腸菌人工染色体（BAC）、ヒト人工染色体

内、又は、適当な宿主細胞に含まれる他の任意の操作されたゲノム領域に位置させることができる。ゆえに、特定の実施形態では、標的遺伝子座は、生来の、異種の又は外来のゲノム核酸配列を含んでもよく、その由来としては、原核生物、真核細胞、酵母、細菌、非ヒト哺乳動物、非ヒト細胞、齧歯動物、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えばマーモセット、アカゲザル）、家畜化された哺乳動物若しくは農業用の哺乳動物、又は他のいかなる目的生物、又はそれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0103】

標的遺伝子座の非限定的な例としては、B細胞で発現されるタンパク質をコードするゲノム遺伝子座、未成熟のB細胞でポリペプチドを発現するゲノム遺伝子座、成熟したB細胞でポリペプチドを発現するゲノム遺伝子座、免疫グロブリン（Ig）遺伝子座、又はT細胞受容体遺伝子座（例えばT細胞受容体遺伝子座を含む）が挙げられる。かかる遺伝子座は、鳥類（例えばニワトリ）、非ヒト哺乳類、齧歯動物、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えばマーモセット、アカゲザル）、家畜化された哺乳類若しくは農業用の哺乳動物、又は他のいかなる目的生物、又はそれらの組み合わせに由来してもよい。

20

#### 【0104】

更なる実施形態では、標的遺伝子座は、ヌクレアーゼ剤により誘導されるニック又は二本鎖切断がない場合に、従来法では標的とできないか、又は、誤って、又は、顕著に低い

30 効率で標的とされうるのみである。

#### 【0105】

D. ターゲティングベクター及び挿入ポリヌクレオチド：

上記で概説したように、本明細書で提供される方法及び組成物は、ヌクレアーゼ剤と、選択カセット内のヌクレアーゼ剤の認識部位との戦略的なポジショニングを、相同組換えイベントとの組み合わせにおいて利用する。かかる方法は、相同組換えとの組み合わせにおいて認識部位でのニック又は二本鎖切断を用い、それにより、挿入ポリヌクレオチドの標的遺伝子座への組み込みを標的とする。「相同組換え」は従来、相同領域中の交差部位における、2つのDNA分子の間でのDNA断片の交換を行う際に用いられる。

40

#### 【0106】

i. 挿入ポリヌクレオチド

用語「挿入ポリヌクレオチド」は、標的遺伝子座に組み込まれることが所望されるDNAのセグメントを含む。一実施形態では、挿入ポリヌクレオチドは、1つ以上の目的のポリヌクレオチドを含む。他の実施形態では、挿入ポリヌクレオチドは、1つ以上の発現カセットを含んでもよい。所与の発現カセットは、発現に影響する様々な調節因子に加えて、目的のポリヌクレオチド、並びに選択マーカー及び/又はリポーター遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含んでもよい。挿入ポリヌクレオチド内に含めることができる、目的のポリヌクレオチド、選択マーカー及びリポーター遺伝子（例えばeGFP）の非限定的な例は、本明細書で詳述する。

40

#### 【0107】

10

20

30

40

50

具体的実施形態では、挿入ポリヌクレオチドは、ゲノム核酸を含んでもよい。一実施形態では、当該ゲノム核酸は、マウス、ヒト、齧歯動物、非ヒトのラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、鶏、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えばマーモセット、アカゲザル）、家畜化された哺乳動物若しくは農業用哺乳動物、又は他のいかなる目的生物、又はそれらの組み合わせに由来する。

#### 【0108】

更なる実施形態では、挿入ポリヌクレオチドは、条件付き対立遺伝子を含む。一実施形態では、条件付き対立遺伝子は、参照により本発明に援用する米国特許出願公開第2011/0104799号に記載のような多機能対立遺伝子である。具体的実施形態では、条件付き対立遺伝子は、以下を含む：(a) 標的遺伝子の転写に関するセンス方向の作用配列、及びセンス又はアンチセンス方向の薬剤選択カセット、(b) アンチセンス方向の目的ヌクレオチド配列(NSI)、及び逆位による条件付きモジュール(conditional by inversion module)(COIN、エキソン分割イントロン及び可逆的遺伝子トラップモジュール)を利用する。参照により本発明に援用する米国特許出願公開第2011/0104799号参照)、及び(c) 第1リコンビナーゼへの暴露に応じて組換えを行い、条件付き対立遺伝子を形成する、(i) 作用配列及びDSCを有さず、(ii) センス方向のNSI及びアンチセンス方向のCOINを含む、組換え可能ユニット。

#### 【0109】

挿入ポリヌクレオチドは、約5 kb～約200 kb、約5 kb～約10 kb、約10 kb～約20 kb、約20 kb～約30 kb、約30 kb～約40 kb、約40 kb～約50 kb、約60 kb～約70 kb、約80 kb～約90 kb、約90 kb～約100 kb、約100 kb～約110 kb、約120 kb～約130 kb、約130 kb～約140 kb、約140 kb～約150 kb、約150 kb～約160 kb、約160 kb～約170 kb、約170 kb～約180 kb、約180 kb～約190 kb、又は約190 kb～約200 kbであってもよい。

#### 【0110】

具体的実施形態では、挿入ポリヌクレオチドは、部位特異的な組換え標的配列に隣接する核酸を含む。全挿入ポリヌクレオチドが、かかる部位特異的な組換え標的配列に隣接することができるが、挿入ポリヌクレオチド内の目的のいかなる領域又は個々のポリヌクレオチドが、かかる部位に隣接してもよい。「組換え部位」という用語には、部位特異的リコンビナーゼによって認識され、組換えイベントのための基質として使用できるヌクレオチド配列が含まれる。「部位特異的リコンビナーゼ」という用語には、組換え部位(1つの核酸分子内で、又は別々の核酸分子上で、2つの組換え部位が物理的に切り離される部位)間での組換えを可能にすることができる一群の酵素が含まれる。部位特異的リコンビナーゼの例としては、限定されないが、Cre、Flp及びDreリコンビナーゼが挙げられる。部位特異的リコンビナーゼは、細胞にリコンビナーゼポリペプチドを導入するか、又は宿主細胞に部位特異的なリコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドを導入するなど、いかなる手段で細胞に導入してもよい。部位特異的リコンビナーゼをコードするポリヌクレオチドは、挿入ポリヌクレオチド内に、又は、別々のポリヌクレオチド内に位置させることができる。部位特異的リコンビナーゼは、例えば、誘導性プロモーター、細胞に内在のプロモーター、細胞に対し異種のプロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター又は発生段階特異的プロモーターなどの、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結することができる。挿入ポリヌクレオチド又は挿入ポリヌクレオチド内のいかなる目的のポリヌクレオチドと隣接する部位特異的組換え標的配列としては、限定されないが、loxP、lox511、lox2272、lox66、lox71、loxM2、lox5171、FRT、FRT11、FRT71、attP、att、FRT、rox及びそれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0111】

他の実施形態では、部位特異的組換え部位は、挿入ポリヌクレオチド内に含まれる選択

マーカー及びノ又はリポーター遺伝子をコードするポリヌクレオチドに隣接する。かかる例においては、標的遺伝子座への挿入ポリヌクレオチドの組み込み後、部位特異的組換え部位間の配列は除去されうる。

#### 【0112】

一実施形態では、挿入ポリヌクレオチドは、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを含む。限定されないが、かかる選択マーカーとしては、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (neo<sup>r</sup>)、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ (hyg<sup>r</sup>)、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ (puro<sup>r</sup>)、プラスチジンSデアミナーゼ (bsr<sup>r</sup>)、キサントシン/グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (gpt)、又は単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-k)、又はそれらの組み合わせが挙げられる。一実施形態では、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドは、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結されている。標的遺伝子座 (すなわちゲノム遺伝子座) 中に目的のポリヌクレオチドを連続的にタイリングするとき、上記で概説したように、選択マーカーはヌクレアーゼ剤のための認識部位を含んでもよい。一実施形態では、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドは、部位特異的組換え標的配列に隣接している。

10

#### 【0113】

挿入ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結されたりリポーター遺伝子を更に含んでもよく、当該リポーター遺伝子は、LacZ、mPlum、mCherry、tdTomato、mStrawberry、J-Red、DsRed、mOrange、mKO、mCitrine、Venus、YPet、強化黄色蛍光タンパク質 (EYFP)、Emerald、強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、CyPet、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、Cerulean、T-Sapphire、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるリポータータンパク質をコードする。かかるリポーター遺伝子は、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結されうる。かかるプロモーターは、誘導性プロモーター、リポーター遺伝子又は細胞に内在のプロモーター、リポーター遺伝子又は細胞に対して異種のプロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター又は発生段階特異的プロモーターであってもよい。

20

#### 【0114】

##### ii. ターゲッティングベクター

ターゲッティングベクターは、標的遺伝子座に挿入ポリヌクレオチドを導入するために使用される。ターゲッティングベクターは、挿入ポリヌクレオチドと、挿入ポリヌクレオチドに隣接する、上流及び下流側のホモロジーアームを更に含む。挿入ポリヌクレオチドに隣接するホモロジーアームは、標的遺伝子座内の領域に対応する。説明の便宜のため、標的遺伝子座内の対応する領域を本発明では「標的的部位」と称する。すなわち、一例では、ターゲッティングベクターは、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド内の第1認識部位の充分近傍に位置する第1及び第2標的に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含んでもよい。したがって、ターゲッティングベクターは、細胞のゲノム内のホモロジーアームと対応する標的的部位との間で生じる相同組換えイベントを通じて、挿入ポリヌクレオチドの標的遺伝子座への組み込みを促進する。

30

40

#### 【0115】

ターゲッティングベクターのホモロジーアームは、対応する標的的部位との相同組換えイベントを促進するのに十分ないかなる長さであってもよく、例えば、50~100塩基、100~1000塩基、又は少なくとも5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、5~40、5~45、5~50、5~55、5~60、5~65、5~70、5~75、5~80、5~85、5~90、5~95、5~100、100~200、又は200~300kb若しくはそれ以上の長さである。下記で概説するように、大型ターゲッティングベクターはより長いターゲッティングアームを使用できる。

#### 【0116】

50

ターゲティングベクターの上流及び下流のホモロジーアームに対応する標的遺伝子座内の標的部位は、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドに位置する「認識部位の十分近傍」に位置している。ターゲティングベクターの上流及び下流のホモロジーアームは、認識部位に対して「十分近傍に位置」し、その距離は、認識部位におけるニック又は二本鎖切断の際に、標的部位とホモロジーアームとの間における相同組換えイベントの発生を促進する距離である。このように具体的実施形態では、ターゲティングベクターの上流及び/又は下流のホモロジーアームに対応する標的部位は、所与の認識部位から少なくとも1ヌクレオチド内、所与の認識部位から10ヌクレオチド～約14kb内、又は所与の認識部位から約10ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約100ヌクレオチド～約500ヌクレオチド、約500ヌクレオチド～約1000ヌクレオチド、約1kb～約5kb、約5kb～約10kb、又は約10kb～約14kbの範囲内である。具体的実施形態では、認識部位は、標的部位の少なくとも1つ若しくは両方と直接隣接している。

10

## 【0117】

ターゲティングベクターのホモロジーアームに対応する標的部位と、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド内の認識部位との位置関係は、適宜異なってもよい。例えば、標的部位は認識部位に対して5'に位置してもよく、両方の標的部位が認識部位に対して3'に位置してもよく、又は、標的部位は認識部位に隣接してもよい。

## 【0118】

ホモロジーアーム及び標的部位は、2つの領域が相同組換え反応の基質として相互に機能するのに十分な配列同一性を有するとき、相互に「対応する」又は「対応している」という。「相同性」とは、対応する配列と同一であるか、又は配列同一性を共有するDNA配列を意味する。所与の標的部位と、対応するターゲティングベクターに存在するホモロジーアームとの間の配列同一性は、相同組換えを生じさせることができるいかなる配列同一性の程度であってもよい。ターゲティングベクター(又はその断片)のホモロジーアームと、標的部位(又はその断片)との間で共有される配列同一性の程度としては、当該配列が相同組換えに供されうる、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性であってもよい。更に、ホモロジーアームと対応する標的部位との間の対応する相同性の領域は、切断される認識部位における相同組換えを促進するのに十分な長さであればよい。例えば、所与のホモロジーアーム及び/又は対応する標的部位は、少なくとも約50～100塩基、100～1000塩基、又は5～10、5～15、5～20、5～25、5～30、5～35、5～40、5～45、5～50、5～55、5～60、5～65、5～70、5～75、5～80、5～85、5～90、5～95、5～100、100～200、又は200～300kb、又はそれ以上の長さに対応する相同性の領域を含んでもよく(例えば本明細書に記載のLTVECベクター)、当該ホモロジーアームは、細胞のゲノム内の対応する標的部位と相同組換えを行うのに十分な相同性を有する。

20

30

## 【0119】

説明の利便性のため、ホモロジーアームには、上流及び下流のホモロジーアームが含まれる。この用語は、ターゲティングベクター内の挿入ポリヌクレオチドに対するホモロジーアームの相対的な位置に関するものである。

40

## 【0120】

ターゲティングベクターのホモロジーアームは、したがって、標的遺伝子座の標的部位に対応するよう設計される。ゆえに、ホモロジーアームは細胞の生来の遺伝子座に対応しうるか、又は、それらはDNAの異種若しくは外来のセグメントの領域に対応しうるものであり、それは導入遺伝子、発現カセット又はDNAの異種の若しくは外来の領域などの細胞のゲノムに組み込まれる。あるいは、ターゲティングベクターホモロジーアームは、酵母人工染色体(YAC)、大腸菌人工染色体(BAC)若しくはヒト人工染色体の領域、又は適当な宿主細胞に含まれる他の操作された領域に対応させてもよい。更に、タ

50

ーゲッティングベクターのホモロジーアームは、BACライブラリー、コスミドライブラリー又はP1ファージライブラリーの領域に対応してもよく、又は由来してもよい。すなわち、特定の実施形態では、ターゲットベクターのホモロジーアームは、生来の遺伝子座に対応するか、異種であるか、又は原核生物、酵母、鳥類（例えばニワトリ）、非哺乳動物、齧歯動物、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えばマーモセット、アカゲザル）家畜用哺乳動物若しくは農業用哺乳動物、又は他の目的生物由来の外来のものでありうる。更なる実施形態では、ホモロジーアームは、ヌクレアーゼ剤によって誘導されるニック又は二本鎖切断がなければ、従来法を用いてターゲットできないか、又は、誤った若しくは顕著に低い効率でのみターゲットされうる、細胞内の遺伝子座に対応する。一実施形態では、ホモロジーアームは、合成DNAに由来する。

10

## 【0121】

他の実施形態では、上流及び下流のホモロジーアームは、標的とされたゲノムと同じゲノムに対応する。一実施形態では、ホモロジーアームは、関連するゲノムに由来し、例えば、標的ゲノムは第1種のマウスゲノムであり、ターゲットアームは第2種のマウスゲノムに由来し、第1種と第2種とは異なる。他の実施形態では、ホモロジーアームは同じ動物のゲノム由来であるか、又は同じ種のゲノム由来であり、例えば、標的ゲノムは第1株のマウスゲノムであり、ターゲットアームは同じマウス由来のマウスゲノム由来、又は同じ種由来である。

## 【0122】

本明細書の他の部分で述べるように、ターゲットベクター（例えば大型ターゲットベクター）は、選択カセット又はリポーター遺伝子を含んでもよい。選択カセットは、選択マーカーをコードする核酸配列を含んでもよく、当該核酸配列はプロモーターに作動可能に連結されている。プロモーターは、目的の原核細胞及び/又は真核生物細胞内で活性であり得る。かかるプロモーターは、誘導性プロモーター、リポーター遺伝子若しくは細胞に内在のプロモーター、リポーター遺伝子若しくは細胞に対して異種であるプロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター又は発生段階特異的プロモーターであってもよい。一実施形態では、選択マーカーは、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（neo<sup>r</sup>）、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ（hyg<sup>r</sup>）、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ（pur<sup>r</sup>）、プラスチジンSデアミナーゼ（bsr<sup>r</sup>）、キサントシン/グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（gpt）、及び単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV-k）、及びそれらの組み合わせから選択される。ターゲットベクターの選択マーカーは、上流及び下流のホモロジーアームと隣接させてもよく、ホモロジーアームに対して5'又は3'に配置してもよい。

20

30

## 【0123】

一実施形態では、ターゲットベクター（例えば大型ターゲットベクター）は、プロモーターに作動可能に連結されたリポーター遺伝子を含み、当該リポーター遺伝子は、LacZ、mPlum、mCherry、tdTomato、mStrawberry、J-Red、DsRed、mOrange、mKO、mCitrine、Venus、YPet、強化黄色蛍光タンパク質（EYFP）、Emerald、強化緑色蛍光タンパク質（EGFP）、CyPet、シアン蛍光タンパク質（CFP）、Cerulean、T-Sapphire、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるリポータータンパク質をコードする。かかるリポーター遺伝子は、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結されうる。かかるプロモーターは、誘導性プロモーター、レポーター遺伝子若しくは細胞に内在のプロモーター、リポーター遺伝子若しくは細胞に対して異種のプロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター又は発生段階特異的プロモーターであってもよい。

40

## 【0124】

一実施形態では、ターゲットベクター（例えば大型ターゲットベクターを

50



含む)とヌクレアーゼ剤との併用により、ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、ターゲッティング効率が増加する。一実施形態では、ターゲッティングベクターがヌクレアーゼ剤との組み合わせで使用されるとき、ターゲッティングベクターの単独での使用と比較して、ターゲッティングベクターのターゲッティング効率は、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、又は少なくとも10倍増加している。

#### 【0125】

##### iii. 大型ターゲッティングベクター

用語「大型ターゲッティングベクター」又は「LTVEC」には、細胞内での相同組換えを実施しようとする他のアプローチにおいて典型的に用いられるものよりも大きな核酸配列に対応及び由来するホモロジーアーム、並びに/又は細胞内での相同組換えを実施しようとする他のアプローチにおいて典型的に用いられるものよりも大きな核酸配列を含む挿入ポリヌクレオチド、を含む、大型ターゲッティングベクターが含まれる。具体的実施形態では、LTVECのホモロジーアーム及び/又は挿入ポリヌクレオチドは、真核生物細胞のゲノム配列を含む。LTVECのサイズは、従来のアッセイ(例えばサザンブロットティング及びロングレンジ(例えば1kb~5kb)PCR)によるターゲッティングイベントのスクリーニングを行うにはあまりに大きい。LTVECの例としては、限定されないが、大腸菌人工染色体(BAC)、ヒト人工染色体又は酵母人工染色体(YAC)に由来するベクターが挙げられる。LTVECの非限定的な例及びそれらの作製方法は、例えば、米国特許第6,586,251号、同第6,596,541号、同第7,105,348号及び国際公開第2002/036789号(PCT/US01/45375)に記載されている(各内容を参照により本発明に援用する)。

#### 【0126】

LTVECはいかなる長さでもよく、限定されないが、約20kb~約300kb、約20kb~約30kb、約30kb~約40kb、約40kb~約50kb、約50kb~約75kb、約75kb~約100kb、約100kb~125kb、約125kb~約150kb、約150kb~約175kb、約175kb~約200kb、約200kb~約225kb、約225kb~約250kb、約250kb~約275kb、又は約275kb~約300kbの長さが挙げられる。

#### 【0127】

一実施形態では、LTVECは、約5kb~約200kb、約5kb~約10kb、約10kb~約20kb、約20kb~約30kb、約30kb~約40kb、約40kb~約50kb、約60kb~約70kb、約80kb~約90kb、約90kb~約100kb、約100kb~約110kb、約120kb~約130kb、約130kb~約140kb、約140kb~約150kb、約150kb~約160kb、約160kb~約170kb、約170kb~約180kb、約180kb~約190kb、又は約190kb~約200kbの挿入ポリヌクレオチドを含む。

#### 【0128】

一実施形態では、LTVECホモロジーアームは、BACライブラリー、コスミドライブラリー又はP1ファージライブラリーに由来する。他の実施形態では、ホモロジーアームは、細胞の標的遺伝子座(すなわちゲノム遺伝子座)に由来し、幾つかの例では、LTVECが標的とするよう設計されている当該標的遺伝子座は、従来法を用いた場合にはターゲッティングできない。更に他の実施形態では、ホモロジーアームは、合成DNAに由来する。一実施形態では、LTVECの上流のホモロジーアームと下流のホモロジーアームの合計は、少なくとも10kbである。一実施形態では、上流のホモロジーアームは、約1kb~約100kbの範囲である。他の実施形態では、上流のホモロジーアームは、約5kb~約100kbの範囲である。一実施形態では、下流のホモロジーアームは、約1kb~約100kbの範囲である。一実施形態では、下流のホモロジーアームは、約5kb~約100kbの範囲である。他の実施形態では、上流と下流のホモロジーアームの合計は、約1kb~約5kb、約5kb~約10kb、約10kb~約20kb、約20kb~約30kb、約30kb~約40kb、約40kb~約50kb、約50kb~約

10

20

30

40

50

60 kb、約60 kb～約70 kb、約70 kb～約80 kb、約80 kb～約90 kb、約90 kb～約100 kb、約100 kb～約110 kb、約110 kb～約120 kb、約120 kb～約130 kb、約130 kb～約140 kb、約140 kb～約150 kb、約150 kb～約160 kb、約160 kb～約170 kb、約170 kb～約180 kb、約180 kb～約190 kb又は約190 kb～約200 kbである。

【0129】

他の実施形態では、LTVECの5'と3'のホモロジーアームの合計は、約10 kb～約30 kb、約20 kb～約40 kb、約40 kb～約60 kb、約60 kb～約80 kb、約80 kb～約100 kb、約100 kb～約120 kb、又は約120 kb～150 kbである。他の例において、5'と3'のホモロジーアームの合計は、約16 kb～約150 kbである。

10

【0130】

更なる実施形態では、LTVEC及び挿入ポリヌクレオチドは、標的遺伝子座での削除を可能にするため、約5 kb～約10 kb、約10 kb～約20 kb、約20 kb～約40 kb、約40 kb～約60 kb、約60 kb～約80 kb、約80 kb～約100 kb、約100 kb～約150 kb、又は約150 kb～約200 kb、約200 kb～約300 kb、約300 kb～約400 kb、約400 kb～約500 kb、約500 kb～約1 Mb、約1 Mb～約1.5 Mb、約1.5 Mb～約2 Mb、約2 Mb～約2.5 Mb又は約2.5 Mb～約3 Mbであるよう設計される。

【0131】

他の例では、LTVEC及び挿入ポリヌクレオチドは、外来の核酸配列の標的遺伝子座への挿入を可能にするため、約5 kb～約10 kb、約10 kb～約20 kb、約20 kb～約40 kb、約40 kb～約60 kb、約60 kb～約80 kb、約80 kb～約100 kb、約100 kb～約150 kb、約150 kb～約200 kb、約200 kb～約250 kb、約250 kb～約300 kb、約300 kb～約350 kb、又は約350 kb～約400 kbであるよう設計される。一実施形態では、挿入ポリヌクレオチドは、約130 kb又は約155 kbである。

20

【0132】

一実施形態では、本明細書で他に述べるように、LTVECは、選択カセット又はリポーター遺伝子を含む。

30

【0133】

III. 標的遺伝子座への目的のポリヌクレオチドの組み込み方法

A. 相同組換えによる認識部位付近への挿入ポリヌクレオチドの組み込み方法

本発明では、細胞内の標的遺伝子座の修飾方法が提供される。当該方法は、(a)細胞内で活性な第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカーをコードする第1ポリヌクレオチドを含む細胞を提供する工程であって、第1ポリヌクレオチドが第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む、工程と、(b)細胞に、(i)第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第1ヌクレアーゼ剤と、(ii)第1認識部位の十分近傍に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(c)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を含む。具体的実施形態では、第1選択マーカーを含む第1ポリヌクレオチドは、第1標的部位及び第2標的部位に隣接し、第1標的部位は、第1ターゲティングベクターの第1ホモロジーアームに対応し、第2標的部位は、第1ターゲティングベクターの第2ホモロジーアームに対応する。

40

【0134】

挿入ポリヌクレオチドが標的遺伝子座に組み込まれた細胞を同定するのに、様々な方法が使用できる。一実施形態では、第1認識部位のニック又は二本鎖切断は、第1選択マーカーの活性を損なわせる。ゆえに、一実施形態では、かかる細胞は、細胞を同定する条件下で細胞を培養することによって同定され、当該細胞は、認識部位を有するポリヌクレオ

50

チドによってコードされた選択マーカが、ヌクレアーゼ剤によって切断されたため、当該マーカの活性を有さない。かかる選択マーカの使用方法及びそれらの活性のアッセイ方法は公知である。標的遺伝子座に挿入ポリヌクレオチドを有する細胞を同定する更なる方法は、望ましい標的部位に挿入ポリヌクレオチドが組み込まれた少なくとも1つの細胞を同定することを含んでもよい。かかる方法は、第1及び第2標的部位に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドをそのゲノム中に含む、少なくとも1つの細胞を同定することを含んでもよい。

#### 【0135】

更なる方法を用いて、挿入ポリヌクレオチドが標的遺伝子座に組み込まれた細胞を同定してもよい。標的遺伝子座への挿入ポリヌクレオチドの挿入により、「遺伝子座の修飾」がなされる。用語「遺伝子座の修飾」又は「MOA」には、ゲノム内の遺伝子又は染色体遺伝子座（遺伝子座）の1つの対立遺伝子の正確なDNA配列の修飾が含まれる。「遺伝子座の修飾（MOA）」の例としては、限定されないが、1ヌクレオチドの欠失、置換若しくは挿入、又は、数千ベースにわたる目的の遺伝子若しくは染色体遺伝子座（遺伝子座）の欠失、並びにこれらの2つの両極端の間の全ての考えられる修飾、が挙げられる。

#### 【0136】

様々な実施形態では、標的修飾の同定を容易にするために、ハイスループットの定量的アッセイ（すなわち対立遺伝子の修飾（MOA）アッセイ）を使用する。本明細書に記載のMOA分析は、遺伝的修飾後の、親の染色体内の修飾された対立遺伝子の大規模なスクリーニングを可能にする。MOA分析は、様々な解析手法で実施でき、限定されないが定量的PCR（例えばリアルタイムPCR（qPCR））が例示される。例えば、リアルタイムPCRは、標的遺伝子座を認識する第1プライマーセットと、標的でない参照遺伝子座を認識する第2プライマーセットと、を含む。更に、当該プライマーセットは、増幅された配列を認識するための蛍光プローブを含む。定量的分析は、様々な解析手法で実施でき、限定されないが、蛍光媒介in situハイブリダイゼーション（FISH）、比較ゲノムハイブリダイゼーション、等温DNA増幅、固定プローブへの定量的ハイブリダイゼーション、インベダープローブ（Invader Probes（登録商標））、MMPアッセイ（登録商標）、TaqMan（登録商標）モレキュラービーコン、及びEclipse（商標）プローブ法が挙げられる（参照により全内容を本発明に援用する、米国特許出願公開第2005/0144655号を参照）。

#### 【0137】

選択マーカ内の認識部位へのニック又は二本鎖切断の存在は、様々な実施形態では、ターゲティングベクター（例えばLTVEC）と標的遺伝子座との間の組換えの効率及び/又は頻度を増加させる。一実施形態では、組換えは相同組換えである。様々な実施形態では、二本鎖のニック又は切断の存在において、標的遺伝子座でのターゲティングベクター（例えばLTVEC）のターゲティング効率は、ニック又は二本鎖切断がない場合（例えば、目的の遺伝子座において同じターゲティングベクターと同じホモロジーアームに対応する標的部位を使用するが、ニック又は二本鎖切断を生じさせるヌクレアーゼ剤が添加されない場合）と比較して、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約10倍高い。

#### 【0138】

B. 標的遺伝子座への複数の目的のポリヌクレオチドの組み込み方法

本明細書で提供される様々な方法及び組成物は、所与の標的遺伝子座への複数の目的のポリヌクレオチドの標的組み込みを可能にする。当該方法は、本明細書に記載の標的組み込みシステムを使用するものであり、それは、選択マーカをコードするポリヌクレオチド内にヌクレアーゼ剤認識部位を戦略的に配置することを採用する。具体的実施形態では、選択マーカ及び認識部位は、各挿入ポリヌクレオチド内で交替されている。その際、所与の標的遺伝子座内の連続的な挿入ポリヌクレオチドのタイリングが、高い効率及び有効性で生じる。

#### 【0139】

一実施形態では、細胞内の標的遺伝子座の修飾方法は、(a)細胞内で活性な第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする第1ポリヌクレオチドを含む遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、第1ポリヌクレオチドが、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む、工程と、(b)細胞に、第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第1ヌクレアーゼ剤を導入し、細胞に、第1認識部位の十分近傍に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲティングベクターを導入する工程であって、第1挿入ポリヌクレオチドが、(1)目的の第1ポリヌクレオチドと、(2)細胞内で活性な第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードし、第2ヌクレアーゼ剤のための第2認識部位を含む第2ポリヌクレオチドと、を含む、工程と、(c)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を含む。

10

## 【0140】

更なる実施形態では、追加の目的のポリヌクレオチドを標的遺伝子座に組み込むこともできる。細胞内の標的遺伝子座を修飾する上記方法は、(a)細胞内で活性な第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする第1ポリヌクレオチドを含む遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、第1ポリヌクレオチドが、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む、工程と、(b)細胞に、第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第1ヌクレアーゼ剤を導入し、細胞に、第1認識部位の十分近傍に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲティングベクターを導入する工程であって、第1挿入ポリヌクレオチドが、(1)目的の第1ポリヌクレオチドと、(2)細胞内で活性な第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードし、第2ヌクレアーゼ剤のための第2認識部位を含む第2ポリヌクレオチドと、を更に含む、工程と、(c)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、(d)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドをそのゲノム中に含む細胞に、(i)第2認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第2ヌクレアーゼ剤と、(ii)第3及び第4ホモロジーアームに隣接する第2挿入ポリヌクレオチドを含む第2ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(b)標的遺伝子座に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を含む。具体的実施形態では、第2認識マーカのニック又は二本鎖切断は、第2選択マーカの活性を損なわせる。更なる実施形態では、標的遺伝子座に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞の同定は、第2選択マーカの活性を有さない細胞を同定する条件下で細胞を培養することを含む。更なる実施形態では、第2選択マーカを含む第2ポリヌクレオチドは、第3標的部位及び第4標的部位に隣接し、第3標的部位は第2ターゲティングベクターの第3ホモロジーアームに対応し、第4標的部位は第2ターゲティングベクターの第4ホモロジーアームに対応する。更なる実施形態では、標的遺伝子座に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞の同定は、第3及び第4標的部位に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定することを含む。

20

30

40

## 【0141】

細胞内の標的遺伝子座を修飾する更なる方法は、(a)細胞内で活性な第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする第1ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、第1ポリヌクレオチドが、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む、工程と、(b)細胞に、(i)第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第1ヌクレアーゼ剤と、(ii)第1認識部位の十分近傍に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲティングベクターと、を導入する工程であって、第1挿入ポリヌクレオチドが、(1)目的の第1ポリヌクレオチドと、(2)細胞内で活性な第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードする第2

50

ポリヌクレオチドと、を更に含み、第2ポリヌクレオチドが、第2ヌクレアーゼ剤のための第2認識部位を含み、第2選択マーカを含む第2ポリヌクレオチドが、第3標的部位及び第4標的部位に隣接し、第3標的部位が、第2ターゲティングベクター内の第3ホモロジーアームに対応し、第4標的部位が、第2ターゲティングベクター内の第4ホモロジーアームに対応する、工程と、(c)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、(d)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む細胞に、(i)第2認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第2ヌクレアーゼ剤と、(ii)第3及び第4ホモロジーアームに隣接する第2挿入ポリヌクレオチドを含む第2ターゲティングベクターと、を導入する工程であって、第2挿入ポリヌクレオチドが、(1)目的の第2ポリヌクレオチドと、(2)細胞内で活性な第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカをコードし、第3ヌクレアーゼ剤のために第3認識部位を含む第3ポリヌクレオチドと、を含む、工程と、(b)標的遺伝子座に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を含む。具体的実施形態では、第2認識メーカーのニック又は二本鎖切断は、第2選択マーカの活性を損なわせる。更なる実施形態では、標的遺伝子座に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドをゲノム中に含む少なくとも1つの細胞の同定は、第2選択マーカの活性を有さない細胞を同定する条件下で細胞を培養することを含む。更なる実施形態では、標的遺伝子座に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドをゲノム中に含む少なくとも1つの細胞の同定は、第3及び第4標的部位に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドをゲノム中に含む少なくとも1つの細胞を同定することを含む。

10

20

## 【0142】

上記の様々な方法は、連続的に繰り返すことにより、所与の標的遺伝子座への任意の数の挿入ポリヌクレオチドの標的組み込みが可能となる。ゆえに、様々な方法により、標的遺伝子座に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上の数の挿入ポリヌクレオチドを挿入しうる。具体的実施形態では、かかる連続的タイリング方法は、哺乳動物(すなわちヒト、非ヒト、齧歯動物、マウス、サル、ラット、ハムスター、家畜用哺乳動物又は農業用家畜)の細胞由来の大規模なゲノム領域の標的遺伝子座(すなわちゲノム遺伝子座)中への再構築を可能にする。このような場合、コーディング及び非コーディング領域を含むゲノム領域の転移及び再構築は、少なくとも部分的に、生来のゲノム領域中に存在するコーディング領域、非コーディング領域及びコピー数変動、を保存することによって、所与の領域の複雑度の維持を可能にする。ゆえに、例えば、目的のいかなる哺乳動物細胞又は動物内に「異種の」又は「外来の」ゲノム領域を生成するために様々な方法が提供される。1つの非限定的な例では、非ヒト動物内に「ヒト化された」ゲノム領域が生成する。

30

## 【0143】

所与の標的遺伝子座内への複数の挿入ポリヌクレオチドの組み込みを行う場合、選択マーカをコードし、ヌクレアーゼ剤認識部位を含むポリヌクレオチドを、組み込みラウンドの間に交替させることができる。例えば、特定の方法では、第1ヌクレアーゼ剤は第2ヌクレアーゼ剤と異なり、及び/又は、第1選択マーカは第2選択マーカと異なる。他の例では、3つの挿入ポリヌクレオチドを標的遺伝子座に挿入する場合、第1及び第3選択マーカは、互いに同一であってもよく、具体的実施形態では、同じ認識部位を更に含み、第2選択マーカは、第1及び第3選択マーカと異なってもよく、異なる認識部位を含んでもよい。このような選択マーカ及び認識部位の選択により、生成させるヌクレアーゼ剤の数を最小化することができ、それにより、組み込みイベントの効率及び有効性が改善される。

40

## 【0144】

C. CRISPR/Casシステムを用いた1つ以上の目標遺伝子座の修飾方法

本発明は、本明細書に記載のCRISPR/Casシステムを利用した、細胞内の1つ以上の目的の標的遺伝子座を修飾するための方法及び組成物の提供に関する。CRISPR/Casシステムについて、用語「標的部位」又は「標的配列」は交換可能に用いられ

50

、ガイドRNA (gRNA) のDNAターゲティングセグメントが、結合のための十分な条件が提供された場合に結合する、標的DNA内に存在する核酸配列を含むものとする。例えば、標的DNA内の標的部位 (又は標的配列) は、Casヌクレアーゼ又はgRNAによって標的とされる (又は結合され、又はハイブリダイズされ、又は相補的である)。適切なDNA/RNA結合条件としては、細胞内に通常存在する生理的条件が挙げられる。他の適切なDNA/RNA結合条件 (例えば無細胞系の条件) は、当分野で公知である (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrookら、Harbor Laboratory Press 2001) を参照)。Casタンパク質又はgRNAと相補的であり、ハイブリダイズする標的DNAの鎖は、「相補鎖」と称され、「相補鎖」と相補的である標的DNAの鎖 (したがって、Casタンパク質又はgRNAと相補的でない) は「非相補鎖」又は「鋳型鎖」と称される。

10

## 【0145】

Casタンパク質は、標的配列内の部位、又は標的配列の外側で核酸を切断しうる。「切断部位」には、Casタンパク質が一本鎖切断又は二本鎖切断を行う核酸の位置が含まれる。各鎖上の切断部位で一本鎖切断する2つのCas9タンパク質を用いて、粘着末端を生じさせてもよい。Cas9による標的DNAの部位特異的な切断は、(i) ガイドRNAと標的DNAとの間の相補的な塩基対合、及び(ii) 標的DNA中の短モチーフ (プロト Spacer-隣接モチーフ (PAM) と称する) の両方により決定される位置で生じる。例えば、Cas9の切断部位は、PAM配列の上流で、約1~約10、又は約2~約5塩基対 (例えば3塩基対) であってもよい。幾つかの実施形態では (例えば、S. pyogenes由来のCas9又は近縁のCas9を用いる場合)、非相補鎖のPAM配列は、5'-XGG-3'であってもよく、配列中、XはいずれかのDNAヌクレオチドであり、Xは標的DNAの非相補鎖の標的配列の3'に直接位置している。すなわち、相補鎖のPAM配列は、5'-CCY-3'であり、Yは任意のDNAヌクレオチドであり、Yは標的DNAの相補鎖の標的配列の5'に直接位置している。そのような実施形態では、XとYは相補的であり、X-Y塩基対はいかなる塩基対であってもよい (例えばX=CとY=G、X=GとY=C、X=AとY=T、X=TとY=A)。

20

## 【0146】

すなわち、幾つかの実施形態では、細胞内の目的の標的遺伝子座の修飾方法は、(a) 第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカークをコードする核酸を含む第1標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程と、(b) 細胞に、(i) 各々が細胞内で活性化プロモーターに作動可能に連結されたCasタンパク質と第1ガイドRNA (gRNA) をコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、Casタンパク質が第1核酸内の第1gRNA標的部位でのニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第1選択マーカークの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii) 第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカークをコードする第2核酸を含む第1挿入核酸を含む第1ターゲティングベクターであって、第1挿入核酸が、第1標的遺伝子座に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接している、第1ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(c) 第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞を同定する工程であって、修飾された細胞が、第2選択マーカークの活性を有するが、第1選択マーカークの活性を有さず、第1及び第2選択マーカークが異なる、工程と、を含む。一実施形態では、第1gRNAは、第1挿入核酸とハイブリダイズしない。一実施形態では、目的の標的遺伝子座は、細胞のゲノムに位置している。他の実施形態では、目的の標的遺伝子座は、細胞内のベクターに位置している。一実施形態では、同定する工程(c)は、第2選択マーカークの活性を有するが、第1選択マーカークの活性を有さない、修飾された細胞の同定を可能にする条件下で細胞を培養することを含む。

30

40

## 【0147】

一実施形態では、本方法は、(d) 第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された

50

細胞に、(i) 修飾された細胞内で活性化プロモーターに各々作動可能に連結された、Cas タンパク質及び第2 gRNA をコードする1つ以上の核酸であって、Cas タンパク質が第2核酸を含む第1挿入核酸内の第2 gRNA 標的部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第2選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の核酸と、(ii) 第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカをコードする第3核酸を含む第2挿入核酸を含む第2ターゲティングベクターであって、第2挿入核酸が、第2標的遺伝子座に位置する第3及び第4標的部位に対応する第3及び第4ホモロジーアームに隣接している、第2ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(e) 第2標的遺伝子座内に第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞を同定する工程であって、第2の修飾された細胞が第3選択マーカの活性を有するが、第2選択マーカの活性を有さず、第2及び第3選択マーカが異なる、工程と、を更に含む。一実施形態では、第1及び第2標的遺伝子座は、各々直接隣接している。他の実施形態では、第1又は第2標的遺伝子座は、第1又は第2 gRNA 標的部位から、約10ヌクレオチド~約14kbに位置している。一実施形態では、第2 gRNA は、第2挿入核酸とハイブリダイズしない。一実施形態では、同定する工程(e)は、第3選択マーカの活性を有するが、第2選択マーカの活性を有さない第2の修飾された細胞の同定を可能にする条件下で、修飾された細胞を培養することを含む。

10

## 【0148】

一実施形態では、本方法は、(f) 第2標的遺伝子座に第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞に、(i) 第2の修飾された細胞内で活性化プロモーターに各々作動可能に連結された、Cas タンパク質及び第3 gRNA をコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、Cas タンパク質が第3核酸を含む第2挿入核酸内の第3 gRNA 標的部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第3選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii) 第4プロモーターに作動可能に連結された第4選択マーカをコードする第4核酸を含む第3挿入核酸を含む第3ターゲティングベクターであって、第3挿入核酸が、第3標的遺伝子座に位置する第5及び第6標的部位に対応する第5及び第6ホモロジーアームに隣接している、第3ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(g) 第3標的遺伝子座内に第3挿入核酸を含む第3の修飾された細胞を同定する工程であって、第3の修飾された細胞が第4選択マーカの活性を有するが、第3選択マーカの活性を有さず、第3及び第4選択マーカが異なる、工程と、を更に含む。一実施形態では、第2及び第3標的遺伝子座は、各々直接隣接している。他の実施形態では、第2又は第3標的遺伝子座は、第1又は第2 gRNA 標的部位から10ヌクレオチド~約14kbに位置している。

20

30

## 【0149】

一実施形態では、第1、第2、第3又は第4マーカは、抗生物質耐性を付与する。一実施形態では、抗生物質は、G418、ハイグロマイシン、ブラストシジン、ネオマイシン又はピューロマイシンを含む。一実施形態では、第1、第2、第3又は第4選択マーカは、ヒポ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(HGPRT)又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-TK)を含む。一実施形態では、第1、第2又は第3 gRNA は、(i) 第1、第2又は第3 gRNA 標的部位とハイブリダイズするヌクレオチド配列と、(ii) トランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) と、を含む。一実施形態では、第1、第2又は第3標的遺伝子座は、第1、第2又は第3 gRNA 標的部位の近傍に位置し、それにより、gRNA 標的部位のニック又は二本鎖切断が、標的遺伝子座でのターゲティングベクターの相同組換えを促進する。一実施形態では、Cas タンパク質は、Cas9である。一実施形態では、第1、第2又は第3 gRNA 標的部位は、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列が直接隣接している。

40

## 【0150】

具体的実施形態では、gRNA は、第2選択マーカ(例えばNeo<sup>r</sup>)をコードする第1挿入核酸の挿入のために、第1抗生物質選択マーカ(例えばHyg<sup>r</sup>)を標的とす

50

るよう設計され、それにより、第1挿入核酸の挿入により、第1抗生物質選択マーカの活性が損なわれる。第2 gRNA発現プラスミドは、第1選択マーカをコードする第2挿入核酸の挿入のために、第2選択マーカを標的とするgRNAを発現するよう設計されてもよく、それにより、第2挿入核酸の挿入により、第2抗生物質選択マーカの活性が損なわれる。このように、gRNAは、核酸挿入物の交替で使用できる2つの抗生物質選択マーカの各々を標的とする設計であればよい。Ne<sup>o</sup>耐性選択マーカに特異的なgRNAをコードする核酸の例としては、配列番号13、14、15及び16に記載のものが挙げられる。Hy<sup>g</sup>耐性選択マーカに特異的なgRNAをコードする核酸の例としては、配列番号17、18、19及び20に記載のものが挙げられる。

10

## 【0151】

一実施形態では、細胞は、原核細胞である。他の実施形態では、細胞は、真核生物細胞である。一実施形態では、真核生物細胞は、哺乳動物細胞又は非ヒト哺乳動物細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、線維芽細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト線維芽細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト成体幹細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、発生的に限定された前駆細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、発生的に限定されたヒト前駆細胞である。

## 【0152】

一実施形態では、哺乳動物細胞は、非ヒト哺乳動物細胞である。一実施形態では、哺乳動物細胞は、齧歯動物由来である。一実施形態では、齧歯動物はラット、マウス又はハムスターである。一実施形態では、真核生物細胞は、多能性細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、造血幹細胞又は神経幹細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、ヒト誘導多能性幹(iPS)細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、非ヒトES細胞、ヒトES細胞、齧歯動物胚性幹(ES)細胞、マウス胚性幹(ES)細胞又はラット胚性幹(ES)細胞である。

20

## 【0153】

一実施形態では、第1、第2又は第3 gRNA標的部位は、第1、第2又は第3選択マーカをコードする第1、第2又は第3核酸内のイントロン、エキソン、プロモーター又はプロモーター調節領域に位置している。一実施形態では、第1、第2又は第3ターゲットベクターは、少なくとも約10kbである。一実施形態では、第1、第2又は第3挿入核酸は、約5kb~約300kbの範囲である。

30

## 【0154】

一実施形態では、第1、第2又は第3挿入核酸は、ヒトT細胞受容体 遺伝子座のゲノム領域を含む。一実施形態では、ゲノム領域は、ヒトT細胞受容体 遺伝子座の少なくとも1つの可変領域遺伝子セグメント及び/又は連結領域遺伝子セグメントを含む。

## 【0155】

一実施形態では、第1及び第3選択マーカは同じである。一実施形態では、第1及び第3選択マーカは同じであり、第2及び第4選択マーカは同じである。一実施形態では、第1及び第3 gRNAは同じである。

## 【0156】

幾つかの実施形態では、細胞内の標的遺伝子座の修飾方法は、(a)第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする核酸を含む第1標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程と、(b)細胞に、(i)細胞内で活性なプロモーターに各々作動可能に連結されたCa<sup>s</sup>タンパク質及び第1 gRNAをコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、Ca<sup>s</sup>タンパク質が第1核酸内で第1 gRNA標的部位でのニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第1選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii)第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードする第2核酸を含む第1挿入核酸を含む第1ターゲットベクターであって、第1挿入核酸が、第1標的遺伝子座に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接している、第1ターゲットベクタ

40

50



ーと、を導入する工程と、(c)第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞を同定する工程であって、修飾された細胞が、第2選択マーカの活性を有するが、第1選択マーカの活性を有さず、第1及び第2選択マーカが異なる、工程と、(d)第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞に、(i)修飾された細胞内で活性プロモーターと各々作動可能に連結されたCasタンパク質及び第2gRNAをコードする1つ以上の核酸であって、Casタンパク質が第2核酸を含む第1挿入核酸で第2gRNA標的部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第2選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の核酸と、(ii)第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカをコードする第3核酸を含む第2挿入核酸を含む第2ターゲティングベクターであって、第2挿入核酸が、第2標的遺伝子座に位置する第3及び第4標的部位に対応する第3及び第4ホモロジーアームに隣接している、第2ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(e)第2標的遺伝子座に第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞を同定する工程であって、第2の修飾された細胞が、第3選択マーカの活性を有するが、第2選択マーカの活性を有さず、第1及び第3選択マーカが同じであり、第2及び第3選択マーカが異なる、工程を含む。

【0157】

他の実施形態では、細胞内の目的の標的遺伝子座の修飾方法は、(a)第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする核酸を含む第1標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程と、(b)細胞に、(i)細胞内で活性なプロモーターに各々作動可能に連結されたCasタンパク質及び第1gRNAをコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、Casタンパク質が第1核酸内で第1gRNA標的部位でのニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第1選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii)第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードする第2核酸を含む第1挿入核酸を含む第1ターゲティングベクターであって、第1挿入核酸が、第1標的遺伝子座に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接している、第1ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(c)第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞を同定する工程であって、修飾された細胞が、第2選択マーカの活性を有するが、第1選択マーカの活性を有さず、第1及び第2選択マーカが異なる、工程と、(d)第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞に、(i)修飾された細胞内で活性なプロモーターと各々作動可能に連結されたCasタンパク質及び第2gRNAをコードする1つ以上の核酸であって、Casタンパク質が、第2核酸を含む第1挿入核酸で第2gRNA標的部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第2選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の核酸と、(ii)第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカをコードする第3核酸を含む第2挿入核酸を含む第2ターゲティングベクターであって、第2挿入核酸が、第2標的遺伝子座に位置する第3及び第4標的部位に対応する第3及び第4ホモロジーアームに隣接している、第2ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(e)第2標的遺伝子座に第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞を同定する工程であって、第2の修飾された細胞が、第3選択マーカの活性を有するが、第2選択マーカの活性を有さず、第2及び第3選択マーカが異なる、工程と、(f)第2標的遺伝子座で第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞に、(i)第2の修飾された細胞内で活性なプロモーターと各々作動可能に連結されたCasタンパク質及び第3gRNAをコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、Casタンパク質が第3核酸を含む第2挿入核酸で第3gRNA標的部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第3選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii)第4プロモーターに作動可能に連結された第4選択マーカをコードする第4核酸を含む第3挿入核酸を含む第3ターゲティングベクターであって、第3挿入核酸が、第3標的遺伝子座に位置する第5及び第6標的部位に対応する第5及び第6ホモロジーアームに隣接している、第3ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(g)第3標的遺伝子座に第3挿入核酸を含む第3の修飾された細胞を

10

20

30

40

50

同定する工程であって、第3の修飾された細胞が第4選択マーカの活性を有するが、第3選択マーカの活性を有さず、第3及び第4選択マーカが異なる、工程と、を含む。幾つかの実施形態では、第1及び第3選択マーカは同じであり、第2及び第4選択マーカは同じである。一実施形態では、第1及び第3選択マーカは同じであり、第2及び第4選択マーカは同じであり、第1及び第3 gRNAは同じである。

【0158】

IV. 目的のポリヌクレオチド

様々な挿入ポリヌクレオチドにいかなる目的のポリヌクレオチドを含め、それにより標的遺伝子座に組み込むことができる。本明細書に開示される方法により、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又はそれ以上の目的のポリヌクレオチドが標的遺伝子座に組み込まれる。

10

【0159】

挿入ポリヌクレオチド内の目的のポリヌクレオチドは、標的遺伝子座に組み込まれたとき、1つ以上の遺伝的修飾を細胞に導入することができる。遺伝的修飾は、内在の核酸配列の欠失及び/又は標的遺伝子座への外来の若しくは異種の若しくはオルソロガスなポリヌクレオチドの追加を含むことができる。一実施形態では、遺伝的修飾は、標的遺伝子座での目的の外来のポリヌクレオチドによる、内在の核酸配列の置換を含む。すなわち、本明細書で提供される方法は、ノックアウト、欠失、挿入、置換(「ノックイン」)、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はそれらの組み合わせを含む遺伝的修飾を可能にする。かかる修飾は、第1、2、3、4、5、6、7又はそれ以降の挿入ポリヌクレオチドの標的遺伝子座への組み込みにより生じる。

20

【0160】

挿入ポリヌクレオチド内に、及び/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、それが導入される細胞に生来のもの若しくは相同なものであってもよく、目的のポリヌクレオチドは、それが導入される細胞に異種であってもよく、目的のポリヌクレオチドは、それが導入される細胞に対して外来であってもよく、目的のポリヌクレオチドは、それが導入される細胞にオルソロガスであってもよく、又は、目的のポリヌクレオチドは、それが導入される細胞とは異なる種に由来してもよい。配列に関する用語「相同な」は、細胞の生来の配列を含む。配列に関する用語「異種の」は、無縁の種に起源を有する配列を含むか、又は、同じ種に由来する場合、構成及び/又は遺伝子座内の生来の形状から、慎重な人為的介入によって実質的に修飾されている。配列に関する用語「外来の」は、無縁の種に起源を有する配列を含む。用語「オルソロガス」は、他の種(すなわち種変異体)において既知の参照配列に機能的に同等の、ある種からのポリヌクレオチドを含む。目的のポリヌクレオチドは、非ヒト、齧歯動物、ハムスター、マウス、ラット、ヒト、サル、農業用哺乳類又は非農業用哺乳類を含むがこれに限らず、目的のいかなる生物に由来してもよい。目的のポリヌクレオチドは、コーディング領域、非コーディング領域、調節領域又はゲノムDNAを更に有してもよい。すなわち、第1、2、3、4、5、6、7及び/又はそれ以降のいかなる挿入ポリヌクレオチドのいずれも、かかる配列を含んでもよい。

30

40

【0161】

一実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に位置し、及び/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、マウス核酸配列、ヒト核酸、非ヒト核酸、齧歯動物の核酸、ラット核酸、ハムスター核酸、サル核酸、農業用哺乳類核酸又は非農業用哺乳動物核酸と相同である。更なる実施形態では、標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、ゲノム核酸の断片である。一実施形態では、ゲノム核酸は、マウスゲノム核酸、ヒトゲノム核酸、非ヒト核酸、齧歯動物の核酸、ラット核酸、ハムスター核酸、サル核酸、農業用哺乳類の核酸若しくは非農業用の哺乳動物核酸又はそれらの組み合わせである。

【0162】

50

一実施形態では、目的のポリヌクレオチドは、上述のように約500～約200kbの範囲であってもよい。目的のポリヌクレオチドは、約500ヌクレオチド～約5kb、約5kb～約200kb、約5kb～約10kb、約10kb～約20kb、約20kb～約30kb、約30kb～約40kb、約40kb～約50kb、約60kb～約70kb、約80kb～約90kb、約90kb～約100kb、約100kb～約110kb、約120kb～約130kb、約130kb～約140kb、約140kb～約150kb、約150kb～約160kb、約160kb～約170kb、約170kb～約180kb、約180kb～約190kb、又は約190kb～約200kbであってもよい。

#### 【0163】

挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に挿入された目的のポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードしてもよく、miRNAをコードしてもよく、又は、それは目的のいかなる調節領域若しくは非コーディング領域を含んでもよく、例えば調節配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、転写リプレッサー結合配列又は非タンパク質コード配列の欠失が挙げられる。挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に挿入された目的のポリヌクレオチドは、神経系、骨格系、消化器系、循環系、筋系、呼吸器系、心臓血管系、リンパ系、内分泌系、泌尿器系、生殖器系又はそれらの組み合わせにおいて発現するタンパク質をコードしてもよい。一実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に挿入された目的のポリヌクレオチドは、骨髄又は骨髄由来細胞内に発現されるタンパク質をコードする。一実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に挿入された目的のポリヌクレオチドは、脾臓細胞内に発現されるタンパク質をコードする。更なる実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に挿入された目的のポリヌクレオチドは、B細胞内に発現されるタンパク質をコードするか、未成熟のB細胞内に発現されるタンパク質をコードするか、成熟B細胞内に発現されるタンパク質をコードする。

#### 【0164】

一実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に挿入された目的のポリヌクレオチドは、免疫グロブリン重鎖可変領域アミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含む。用語「重鎖」又は「イムノグロブリン重鎖」には、いかなる生物由来の免疫グロブリン重鎖定常領域配列を含む免疫グロブリン重鎖配列も含まれる。特に明記しない限り、重鎖可変ドメインは、3つの重鎖CDR及び4つのフレームワーク(FR)領域を含む。重鎖の断片は、CDR、CDR及びFRs、並びにそれらの組み合わせを含む。典型的な重鎖は、可変ドメイン(N末端からC末端に向かって)、CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン及びCH3ドメインを有する。重鎖の機能性断片は、エピートープを特異的に認識(例えばμM、nM又はpMの範囲のKDでエピートープを認識)できる断片を含み、発現された後細胞から分泌され、少なくとも1つのCDRを含む。重鎖可変ドメインは、可変領域ヌクレオチド配列によってコードされ、通常、生殖細胞系に存在するVH、DH及びJHセグメントのレパートリーに由来するVH、DH及びJHセグメントを含む。様々な生物のV、D及びJ重鎖セグメントの配列、位置及び命名法は、IMGTデータベースで検索でき、インターネットのワールドワイドウェブ(www)のURL「imgt.org」でアクセス可能である。

#### 【0165】

一実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に挿入された目的のポリヌクレオチドは、ゲノム核酸配列を含み、それはヒト免疫グロブリン重鎖可変領域アミノ酸配列をコードする。一実施形態では、ゲノム核酸配列は、免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に作動可能に連結された、再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の核酸配列を含む。一実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列は、マウス免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列、又はヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列又はそれらの組み合わせである。一実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列は、CH1、ヒンジ、CH2、CH3及びそれらの組み合わせから

10

20

30

40

50

選択される。一実施形態では、重鎖定常領域の核酸配列は、C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 を含む。一実施形態では、ゲノム核酸配列は、免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に作動可能に連結された、再構成されたヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の核酸配列を含む。一実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列は、マウス免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列、又はヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列又はそれらの組み合わせである。一実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列は、C H 1、ヒンジ、C H 2、C H 3 及びそれらの組み合わせから選択される。一実施形態では、重鎖定常領域の核酸配列は、C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 を含む。

【 0 1 6 6 】

一実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、免疫グロブリン軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含む。用語「軽鎖」には、いかなる生物由来の免疫グロブリン軽鎖配列が含まれ、特に明記しない限り、ヒトのカッパ( )及びラムダ( )軽鎖及びV p r e B、並びに代替軽鎖が含まれる。特に明記しない限り、軽鎖可変ドメインは典型的には3つの軽鎖C D R 及び4つのF R s を含む。通常、全長軽鎖は、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 を含む可変ドメインと、軽鎖定常領域アミノ酸配列と、を含む。軽鎖可変ドメインは、軽鎖可変領域ヌクレオチド配列によってコードされ、それは通常、生殖細胞系に存在する軽鎖V 及びJ 遺伝子セグメントのレパートリーに由来する軽鎖V L と軽鎖J L 遺伝子セグメントを含む。様々な生物の軽鎖V 及びJ 遺伝子セグメントの配列、位置及び命名法は、I M G T データベースで検索でき、インターネットのワールドワイドウェブ( w w w ) のU R L 「i m g t . o r g . 」でアクセス可能である。軽鎖には、例えば、それが配置されるエピトープ結合タンパク質によって選択的に結合される第1 又は第2 エピトープのいずれかと選択的に結合しないものが含まれる。軽鎖にはまた、それが配置されるエピトープ結合タンパク質によって選択的に結合される1 つ以上のエピトープと結合及び認識するもの、又は重鎖が当該エピトープを結合及び認識することを補助するものが含まれる。

【 0 1 6 7 】

一実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域アミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含む。一実施形態では、ゲノム核酸配列は、再構成されていないヒト 及び/又は 軽鎖可変領域の核酸配列を含む。一実施形態では、ゲノム核酸配列は、再構成されたヒト 及び/又は 軽鎖可変領域の核酸配列を含む。一実施形態では、再構成されていない若しくは再構成された 及び/又は 軽鎖可変領域の核酸配列は、マウス、ラット又はヒト免疫グロブリンの、 軽鎖定常領域の核酸配列及び 軽鎖定常領域の核酸配列から選択される、軽鎖定常領域の核酸配列に作動可能に連結されている。

【 0 1 6 8 】

挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、受容体の細胞外タンパク質又はリガンドをコードしてもよい。具体的実施形態では、コードされたリガンドは、サイトカインである。目的のサイトカインには、C C L、C X C L、C X 3 C L 及びX C L から選択されるケモカインが含まれる。サイトカインは、腫瘍壊死因子( T N F ) を含んでもよい。更に他の実施形態では、サイトカインは、インターロイキン( I L ) である。一実施形態では、インターロイキンは、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 11、I L - 12、I L - 13、I L - 14、I L - 15、I L - 16、I L - 17、I L - 18、I L - 19、I L - 20、I L - 21、I L - 22、I L - 23、I L - 24、I L - 25、I L - 26、I L - 27、I L - 28、I L - 29、I L - 30、I L - 31、I L - 32、I L - 33、I L - 34、I L - 35 及びI L - 36 から選択される。一実施形態では、インターロイキンはI L - 2 である。具体的実施形態では、かかる挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、ヒト由来であり、より具体的な実施形態では、ヒト

10

20

30

40

50

配列を含んでもよい。

【0169】

挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、細胞質タンパク質又は膜タンパク質をコードしてもよい。一実施形態では、膜タンパク質は受容体であり、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、インターロイキン2受容体、インターロイキン2受容体又はインターロイキン2受容体が挙げられる。

【0170】

挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、少なくともT細胞受容体（T細胞受容体を含む）の領域をコードするポリヌクレオチドを含む。具体的な方法では、各挿入ポリヌクレオチドは、T細胞受容体の遺伝子座（すなわちT細胞受容体の遺伝子座）の領域を含み、連続的な組み込みの完了後、T細胞受容体遺伝子座の部分又は全部が標的遺伝子座に組み込まれる。かかる挿入ポリヌクレオチドは、T細胞受容体遺伝子座（すなわちT細胞受容体遺伝子座）の1つ以上の可変セグメント又は連結セグメントを含んでもよい。更なる態様では、T細胞受容体の領域をコードするポリヌクレオチドは、例えば、哺乳類、非哺乳類、齧歯動物、マウス、ラット、ヒト、サル、農業用哺乳類又は家畜哺乳類の変異体タンパク質をコードするポリヌクレオチドに由来してもよい。

10

【0171】

他の実施形態では、標的遺伝子座に組み込まれたポリヌクレオチドは、核タンパク質をコードする。一実施形態では、当該核タンパク質は、核受容体である。具体的実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、ヒト由来であり、より具体的な実施形態では、ヒトゲノム配列を含んでもよい。

20

【0172】

挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、コーディング配列内に遺伝的修飾を有してもよい。かかる遺伝的修飾としては、限定されないが、コーディング配列の欠失変異、又は2つのコーディング配列の融合が挙げられる。

【0173】

挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれる目的のポリヌクレオチドは、変異タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含んでもよい。一実施形態では、当該変異タンパク質は、結合特性の変化、局在性の変化、発現の変化、発現パターンの変化を示すことを特徴とする。一実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの疾患遺伝子座を含み、例えば、神経性疾患の遺伝子座、心血管の遺伝子座、腎臓疾患の遺伝子座、筋肉疾患の遺伝子座、血液疾患の遺伝子座、発癌性遺伝子の遺伝子座、又は免疫疾患の遺伝子座が挙げられる。かかる疾患において、当該疾患遺伝子座は優性遺伝子座であってもよく、又は当該疾患遺伝子座は劣性遺伝子座である。更に、当該疾患遺伝子座は、1ヌクレオチド多形（SNP）遺伝子座を含んでもよい。変異タンパク質をコードする目的のポリヌクレオチドは、いかなる生物に由来してもよく、例えば、哺乳類、非哺乳類、齧歯動物、マウス、ラット、ヒト、サル、農業用哺乳類又は家畜用哺乳類の変異体タンパク質をコードするポリヌクレオチドが例示される。

30

40

【0174】

挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、調節配列を含んでもよく、例えば、プロモーター、エンハンサー又は転写リプレッサー結合配列が挙げられる。具体的実施形態では、挿入ポリヌクレオチド内に存在し、かつ/又は標的遺伝子座に組み込まれた目的のポリヌクレオチドは、非タンパク質コーディング配列の欠失を有するが、タンパク質をコードする配列の欠失は有さないヌクレオチドを含む。一実施形態では、非タンパク質コーディング配列の欠失には、調節配

50

列の欠失が含まれる。他の実施形態では、調節エレメントの欠失には、プロモーター配列の欠失が含まれる。一実施形態では、調節エレメントの欠失には、エンハンサー配列の欠失が含まれる。かかる目的のポリヌクレオチドは、いかなる生物に由来してもよく、限定されないが、哺乳類、非哺乳類、齧歯動物、マウス、ラット、ヒト、サル、農業用哺乳類又は家畜用哺乳類の変異体タンパク質をコードするポリヌクレオチドが例示される。

【0175】

V. 配列の導入及びトランスジェニック動物の作製方法

上記で概説したように、本発明では、1つ以上の目的のポリヌクレオチドの標的組み込みを可能にする方法及び組成物が提供される。かかるシステムは、様々な要素を使用し、説明の便宜のため、本発明における用語「標的組み込みシステム」は、広義に、導入イベントに必要とされる全ての成分（様々なヌクレアーゼ剤、認識部位、挿入DNAポリヌクレオチド、ターゲティングベクター、標的遺伝子座、及び目的のポリヌクレオチド）のことを指すものとする。

【0176】

本明細書で提供される方法は、1つ以上のポリヌクレオチド又は標的組み込みシステムの様々な要素を含むポリペプチドコンストラクトを細胞に導入することを含む。用語「導入する」には、細胞に配列（ポリペプチド又はポリヌクレオチド）を提供して、配列を細胞内部にアクセスさせることが含まれる。本明細書で提供される方法では、標的組み込みシステムのいずれかの要素を細胞に導入する方法は、ポリヌクレオチドが少なくとも1つの細胞内部にアクセスする限り、特に限定されない。様々なタイプの細胞にポリヌクレオチドを導入する方法は、当分野で公知であり、限定されないが、安定的トランスフェクション法、一時的トランスフェクション法及びウイルスを用いた方法が例示される。

【0177】

幾つかの実施形態では、本発明の方法及び組成物で使用される細胞は、ゲノム中に安定的に組み込まれるDNAコンストラクトを含む。用語「安定的に取り込まれる」又は「安定的に導入される」は、ヌクレオチド配列が細胞のゲノム中に組み込まれ、その子孫によって遺伝される、細胞へのポリヌクレオチドの導入を意味する。DNAコンストラクト又は標的組み込みシステムの様々な要素の安定的な取り込みに用いられるいかなるプロトコルを使用してもよい。

【0178】

トランスフェクションのプロトコル、並びに細胞へのポリペプチド又はポリヌクレオチド配列の導入のためのプロトコルには、様々なものが存在する。限定されないが、トランスフェクション法として、化学ベースのトランスフェクション法、例えばポソーム、ナノ粒子、リン酸カルシウム (Grahamら (1973) *Virology* 52 (2) : 456 ~ 67、Bacchettiら (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (4) : 1590 ~ 4 及び Kriegler, M (1991) *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company. pp. 96 ~ 97)、 dendriマー又はカチオン性ポリマー (例えば DEAE-デキストラン又はポリエチレンジアミン) を用いた方法が挙げられる。非化学ベースの方法として、エレクトロポレーション、ソノポレーション、及び光学的トランスフェクションが挙げられる。粒子ベースのトランスフェクションとしては、遺伝子銃、磁石を用いたトランスフェクション (Bertram, J. (2006) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 277 ~ 28) が挙げられる。ウイルスを用いた方法をトランスフェクションに用いてもよい。

【0179】

一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、ターゲティングベクター又は大型ターゲティングベクター (LTVEC) と同時に細胞に導入される。あるいは、ヌクレアーゼ剤は、ターゲティングベクター又は LTVEC とは別に一定の時間を置いて導入される。一実施形態では、ヌクレアーゼ剤は、ターゲティングベクター又は LTVEC の導入の前に

導入され、一方他の実施形態では、ヌクレアーゼ剤はターゲティングベクター又はLTVECの導入の後に導入される。

【0180】

本明細書に開示される様々な方法を使用して、非哺乳動物を作製できる。かかる方法は、(1)本明細書に開示される方法を用いて、非ヒト動物の多能性細胞の標的遺伝子座に1つ以上のポリヌクレオチドを組み込んで、標的遺伝子座に目的のポリヌクレオチドを含む、遺伝的に修飾された多能性細胞を作製する工程と、(2)標的遺伝子座に1つ以上の目的のポリヌクレオチドを有する、遺伝的に修飾された多能性細胞を選択する工程と、(3)前桑実胚期の非ヒト動物の宿主胚に、遺伝的に修飾された多能性細胞を導入する工程と、(4)遺伝的に修飾した多能性細胞を含む宿主胚を仮親に移植して、遺伝的に修飾した多能性細胞に由来するF0世代を作製する工程と、を含む。非ヒト動物としては、非哺乳動物、齧歯動物(例えばマウス、ラット、ハムスター)、サル、農業用哺乳類又は家畜用哺乳類が例示される。多能性細胞としては、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、非ヒトES細胞、齧歯動物のES細胞(例えば、マウスES細胞、ラットES細胞又はハムスターES細胞)、サルES細胞、農業用哺乳動物のES細胞又は家畜用哺乳動物のES細胞が例示される。米国特許公開第2014/0235933号、同第2014/0310828号、及びTongら(2010)Nature, 467(7312):211~213を参照(各々の全開示内容を参照により本発明に援用する)。

10

【0181】

核移植技術を用いて、非哺乳動物を作製してもよい。端的には、核移植方法は、以下の工程を含む:(1)卵母細胞を除核する工程、(2)除核した卵母細胞と組み合わせるドナー細胞又は核を単離する工程、(3)細胞又は核を、除核した卵母細胞に挿入して、再構成した細胞を形成する工程、(4)再構成した細胞を動物の子宮に移植し、胚を形成させる工程、及び、(5)胚を発生させる工程。かかる方法では、卵母細胞は通常、動物死体から摘出されるが、動物生体の輸卵管及び/又は卵巣から単離してもよい。卵母細胞は、当業者に公知の様々な培地を用いて、除核前に成熟させることができる。卵母細胞の除核は、当業者に公知の様々な方法で実施できる。ドナー細胞又は核を除核した卵母細胞へ挿入して再構成した細胞を形成する工程は、通常、融合前に、透明帯下でドナー細胞をマイクロインジェクションすることにより実施される。融合は、接触/融合平面へのDC電気パルスの適用(電気融合)、細胞融合を促進する化学物質(例えばポリエチレングリコール)への暴露、又は不活性化ウイルス(例えばセンダイウイルス)の使用により、誘導することができる。再構成した細胞は通常、核ドナーとレシピエント卵母細胞の融合前、融合の間及び/又は融合の後に、電氣的及び/又は非電氣的な手段で活性化される。活性化方法としては、電氣的パルス、化学的に誘導したショック、精子の貫通、卵母細胞内の二価カチオン濃度の増加、及び卵母細胞内の細胞タンパク質リン酸化の減少(キナーゼ阻害剤による)が例示される。活性化され再構成された細胞又は胚は通常、当業者に公知の培地で培養し、動物の子宮へ移植する。例えば、米国特許公開第20080092249号、国際公開第1999/005266A2号、米国特許公開第20040177390号、国際公開第2008/017234A1号及び米国特許第7,612,250号を参照(各々の全開示内容を参照により本発明に援用する)。

20

30

40

【0182】

本発明では、生殖細胞系に1つ以上の遺伝的修飾を有する非ヒト動物を作製する他の方法が提供され、当該方法は、以下を含む:(a)本明細書に記載の様々な方法を使用して、非ヒト動物の標的遺伝子座を原核細胞内で修飾する工程、(b)標的遺伝子座に遺伝的修飾を含む原核細胞を選択する工程、(c)当該原核細胞から、遺伝的に修飾されたターゲティングベクターを単離する工程、(d)遺伝的に修飾されたターゲティングベクターを非ヒト動物の多能性細胞に導入して、標的遺伝子座に核酸挿入物を有する遺伝的に修飾された多能性細胞を作製する工程、(e)遺伝的に修飾された多能性細胞を選択する工程、(f)前桑実胚期の非ヒト動物の宿主胚に、遺伝的に修飾された多能性細胞を導入する工程、及び(g)遺伝的に修飾された多能性細胞を含む宿主胚を仮親に移植して、遺

50

伝的に修飾された多能性細胞に由来する F 0 世代を作製する工程。かかる方法では、ターゲットベクターは、大型ターゲットベクターを含んでもよい。非ヒト動物は、非哺乳動物、齧歯動物、マウス、ラット、ハムスター、サル、農業用哺乳動物又は家畜用哺乳動物であってもよい。多能性細胞は、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞、非ヒト ES 細胞、齧歯動物の ES 細胞（例えばマウス ES 細胞、ラット ES 細胞又はハムスター ES 細胞）、サル ES 細胞、農業用哺乳動物の ES 細胞又は家畜用哺乳動物の ES 細胞であってもよい。

#### 【0183】

更なる方法では、単離工程 (c) は、遺伝的に修飾されたターゲットベクター（すなわち遺伝的に修飾された LTVEC）を直線化する工程 (c1) を更に含む。更なる実施形態では、導入工程 (d) は、多能性細胞に本明細書に記載のヌクレアーゼ剤を導入する工程 (d1) を更に含む。他の実施形態では、導入工程 (d) は、非ヒト哺乳動物の多能性細胞が、細胞内で活性な第 1 プロモーターに作動可能に連結された第 1 選択マーカをコードする第 1 ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子座を含み、第 1 ポリヌクレオチドが、第 1 ヌクレアーゼ剤のための第 1 認識部位を更に含む場合において、多能性細胞にヌクレアーゼ剤を導入して、第 1 ヌクレアーゼ剤が第 1 認識部位におけるニック又は二本鎖切断を誘導する工程 (d2) を更に含む。多能性細胞に更に導入されるものは、修飾された原核細胞のゲノムから得た、遺伝的に修飾されたターゲットベクターを含む第 1 ターゲットベクターである。修飾されたターゲットベクターは、非哺乳類の多能性細胞のゲノム内の第 1 認識部位の十分な近くで第 1 及び第 2 の標的部位に対応する第 1 及び第 2 のホモロジーアームを含む。一実施形態では、選択工程 (b) 及び / 又は (d) は、原核細胞又は多能性細胞に、本明細書に記載の選択剤を投与することにより実施される。一実施形態では、選択工程 (b) 及び / 又は (d) は、本明細書に記載の対立遺伝子の修飾 (MOA) 分析で実施される。

#### 【0184】

本発明では、原核細胞内に細菌相同組換え (BHR) を経て哺乳動物細胞の標的遺伝子座を修飾する更なる方法が提供され、当該方法は、(a) 原核細胞内で活性な第 1 プロモーターに作動可能に連結された第 1 選択マーカをコードする第 1 ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子座を含む原核細胞を提供する工程であって、第 1 ポリヌクレオチドが第 1 ヌクレアーゼ剤のための第 1 認識部位を更に含む、工程と、(b) 原核細胞に、第 1 上流ホモロジーアームと第 1 下流ホモロジーアームに隣接する挿入ポリヌクレオチドを含むターゲットベクターを導入する工程であって、挿入ポリヌクレオチドが、哺乳類の領域を含む工程と、原核細胞に、第 1 認識部位でニック又は二本鎖切断をするヌクレアーゼ剤を導入する工程と、(c) 標的遺伝子座に挿入ポリヌクレオチドを含む標的細胞を選択する工程であって、当該原核細胞が BHR を媒介する組換え誘導性タンパク質及び酵素を発現できる、工程と、を含む。本明細書で開示されるように、工程 (a) ~ (c) を連続的に繰り返して、原核細胞内の標的遺伝子座への複数の挿入ポリヌクレオチドの導入を行うこともできる。標的遺伝子座が原核細胞により「構築」された後、修飾された標的遺伝子座を含むターゲットベクターを当該原核細胞から単離し、非ヒト哺乳動物細胞内の標的遺伝子座に導入することができる。修飾された遺伝子座を含む哺乳動物細胞は、次に、非ヒトトランスジェニック動物へと作製することができる。

#### 【0185】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載の標的遺伝子座の様々な遺伝的修飾は、VELOCIGENER (登録商標) 遺伝子操作技術を使用して、細菌人工染色体 (BAC) DNA を使用し、細菌細胞内における一連の相同組換え反応 (BHR) を通じて実施できる (米国特許第 6586251 号、Valenzuela, D. M. 5 (2003), High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis (Nature Biotechnology 21(6): 652 ~ 659) を参照 (全開示内容を参照により本発明に援用する)。



## 【0186】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載の様々な遺伝的修飾を含む、標的とされた哺乳類のES細胞（すなわち非哺乳動物、齧歯動物（例えばマウス、ラット又はハムスター）、農業用哺乳動物、家畜用哺乳動物、サルなどに由来）は、VELOCI M O U S E R（登録商標）法により、対応する生物に由来する前桑実期胚（例えば8細胞期マウス胚）に導入される（米国特許第7,576,259号、同第7,659,442号、同第7,294,754号及び米国特許公開第2008/0078000 A1号を参照、全開示内容を参照により本発明に援用する）。遺伝的に修飾されたES細胞を含む非ヒト哺乳類の胚を、胚盤胞期までインキュベートし、次に仮親に移植し、F0を作製する。幾つかの他の実施形態では、本明細書に記載の様々な遺伝的修飾を含む標的哺乳動物のES細胞を、胚盤胞期の胚に導入する。本明細書に記載のように、遺伝的に修飾された遺伝子座を有する非ヒト哺乳動物は、対立遺伝子の修飾(MOA)分析を経て同定できる。遺伝的に修飾されたES細胞に由来する、得られたF0世代の非ヒト哺乳動物を、野生型の非ヒト哺乳動物と交配させ、F1子孫を得る。特異的プライマー及び/又はプローブによる遺伝型決定の後、遺伝的に修飾された遺伝子座がヘテロ接合であるF1非ヒト哺乳動物を互いに交配し、遺伝的に修飾された遺伝子座がホモ接合である非ヒト哺乳動物を作製する。

10

## 【0187】

## VI.細胞

本明細書に記載の様々な方法では、細胞内における遺伝子座ターゲティングシステムを用いる。かかる細胞としては、原核細胞（例えば大腸菌などの細菌細胞）、又は真核生物細胞（例えば酵母、昆虫、両生類、鳥（例えばニワトリ細胞）、植物）、又は、限定されないが、マウス細胞、ラット細胞、ウサギ細胞、ブタ細胞、ウシ細胞、シカ細胞、ヒツジ細胞、ヤギ細胞、ネコ細胞、イヌ細胞、フェレット細胞、霊長類（例えばマーモセット、アカゲザル）細胞など、並びに、家畜用哺乳動物由来の細胞若しくは農業用哺乳動物由来の細胞などの、哺乳動物細胞が挙げられる。幾つかの細胞は、非ヒト細胞、具体的には非ヒト哺乳動物細胞である。幾つかの実施形態では、適切な遺伝的に修飾可能な多能性細胞が容易に得られない哺乳動物の場合、他の方法として、体細胞を用いて、例えば、限定されないが、Oct3/4、Sox2、KLF4、Myc、Nanog、LIN28及びGls1などの多能性誘導因子の組み合わせを体細胞へ導入することにより、多能性細胞に再プログラムする方法が存在する。

20

30

## 【0188】

一実施形態では、真核生物細胞は、多能性細胞である。一実施形態では、多能性細胞は、胚性幹(ES)細胞である。「胚性幹細胞」又は「ES細胞」という用語には、*in vitro*で未分化増殖できる、胚由来の全能性若しくは多能性細胞が含まれ、胚への導入により、発生中の胚のいかなる組織にも寄与することができる。用語「多能性細胞」には、複数の分化細胞のタイプへと発生する能力を有する未分化細胞が含まれる。ポリヌクレオチド配列に関する用語「生殖細胞系」には、子孫に継承できる核酸配列が含まれる。

## 【0189】

多能性細胞は、非ヒトES細胞又は誘導多能性幹(iPS)細胞であってもよい。一実施形態では、誘導多能性(iPS)細胞は、線維芽細胞に由来する。具体的実施形態では、誘導多能性(iPS)細胞は、ヒト線維芽細胞に由来する。幾つかの実施形態では、多能性細胞は、造血幹細胞(HSC)、神経幹細胞(NSC)又は胚盤葉上層幹細胞である。多能性細胞はまた、発生的に限定された前駆細胞であってもよい。更なる実施形態では、多能性細胞は齧歯動物の多能性細胞である。一実施形態では、齧歯動物の多能性細胞は、ラット多能性細胞又はラットES細胞である。他の実施形態では、齧歯動物の多能性細胞は、マウス多能性細胞又はマウスES細胞である。

40

## 【0190】

他の実施形態では、哺乳動物細胞は、不死化したマウス細胞、ラット細胞又はヒト細胞であってもよい。一実施形態では、哺乳動物細胞はヒト線維芽細胞であり、一方他の実施形態では、哺乳動物細胞はヒト癌細胞などの癌細胞である。

50

## 【0191】

更なる実施形態では、哺乳動物はヒトであり、ターゲティングは *ex vivo* のヒト細胞を使用して行われる。

## 【0192】

一実施形態では、哺乳動物細胞は、疾患に罹患する患者から単離したヒト細胞であり、及び/又は、変異タンパク質をコードするヒトポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、変異ヒトタンパク質は、結合特性の変化、局在性の変化、発現の変化、及び/又は、発現パターンの変化を特徴とする。一実施形態では、ヒト核酸配列は、少なくとも1つのヒト疾患対立遺伝子を含む。一実施形態では、ヒト核酸配列は、少なくとも1つのヒト疾患対立遺伝子を含む。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は、神経性疾患の対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は、心血管疾患の対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は、腎臓疾患の対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は、筋肉疾患の対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は、血液疾患の対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は、発癌遺伝子の対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は、免疫性器官系疾患の対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は、優性対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は、劣性対立遺伝子である。一実施形態では、ヒト疾患対立遺伝子は、一塩基多型 (SNP) 対立遺伝子を含む。

10

## 【0193】

細胞として原核細胞を用いるとき、具体的実施形態では、当該原核細胞は、組換えに対してコンピテントな大腸菌株である。一実施形態では、原核細胞は遺伝子組換えタンパク質及び酵素をコードする核酸を含む。一実施形態では、前記原核細胞は遺伝子組換えタンパク質と酵素をコードする核酸を含まず、遺伝子組換えタンパク質及び酵素をコードする核酸を当該原核細胞に導入する。一実施形態では、核酸は、遺伝子組換えタンパク質及び酵素をコードするDNA又はmRNAを含む。一実施形態では、遺伝子組換えタンパク質及び酵素をコードする核酸は、pA B Gである。一実施形態では、遺伝子組換えタンパク質及び酵素は、誘導性プロモーターの制御下で発現される。一実施形態では、遺伝子組換えタンパク質及び酵素の発現は、アラビノースによって制御される。

20

## 【0194】

## VII. 発現カセット

本発明では、本明細書で提供される標的組み込みシステムの様々な要素(すなわちヌクレアーゼ剤、認識部位、挿入ポリヌクレオチド、目的のポリヌクレオチド、ターゲティングベクター、選択マーカー及び他の要素)を含むポリヌクレオチド又は核酸分子が提供される。

30

## 【0195】

用語「ポリヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」、「核酸配列」及び「核酸断片」は、本明細書において交換可能に用いられる。これらの用語には、ヌクレオチド配列などが含まれる。ポリヌクレオチドは、一本鎖若しくは二本鎖のRNA又はDNAのポリマーであってもよく、任意に合成若しくは非天然若しくは変形型のヌクレオチド塩基を含んでもよい。DNAポリマーの形のポリヌクレオチドは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA又はその混合物の1つ以上のセグメントからなってもよい。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含んでもよく、天然の分子及び合成アナログ、並びにそれらの組み合わせを含んでもよい。本明細書で提供されるポリヌクレオチドはまた、限定されないが、一本鎖の形状、二本鎖の形状、ヘアピン、ステムループ構造、などのあらゆる形状の配列を含む。

40

## 【0196】

本発明では、標的組み込みシステムの様々な要素を含む組換えポリヌクレオチドが更に提供される。用語「組換えポリヌクレオチド」及び「組換えDNAコンストラクト」は、本明細書において交換可能に用いられる。組換えコンストラクトは、核酸配列の人工的若しくは異種の組み合わせ(例えば、天然には共存しない調節配列及びコーディング配列)

50

を含む。他の実施形態では、組換えコンストラクトは、異なる給源に由来する調節配列及びコーディング配列を含んでもよく、又は、当該調節配列及びコーディング配列は、同じ給源由来であっても、天然に存在するものとは異なる態様にアレンジされてもよい。かかるコンストラクトは、単独で用いてもよく、ベクターとの組み合わせで用いてもよい。ベクターを用いる場合、ベクターの選択は、当業者に周知のように、宿主細胞の形質転換に用いる方法に依存する。例えば、プラスミドベクターが使用できる。本発明においては、宿主細胞を好適に形質転換し、選択し、増殖させるのに必要な、何らかの単離された核酸断片を含む遺伝的要素が提供される。特に、DNAのサザン解析、mRNA発現のノーザン解析、タンパク質発現のイムノプロット解析又は表現型解析により、スクリーニングを実施することができる。

10

**【0197】**

具体的実施形態では、本明細書に記載の標的組み込みシステムの要素の1つ以上を、原核細胞、真核生物細胞、細菌、酵母細胞、又は哺乳動物細胞、又は目的の他のタイプの生物体若しくは細胞における発現用の発現カセットとして提供することができる。当該カセットは、本明細書で提供されるポリヌクレオチドに作動可能に連結された5'及び3'の調節配列を含んでもよい。「作動可能に連結された」の用語には、2つ以上の要素の機能性連結が含まれる。例えば、目的のポリヌクレオチドと調節配列(すなわちプロモーター)との作動可能な連結とは、目的のポリヌクレオチドの発現を可能にする機能的な連結のことを指す。作動可能に連結された要素は、連続していてもよく、又は連続していなくてもよい。2つのタンパク質コーディング領域の連結の場合、作動可能に連結するとは、コーディング領域が同じ読み枠であることを意味する。別の例において、タンパク質をコードする核酸配列は、調節配列(例えばプロモーター、エンハンサー、サイレンサー配列等)に作動可能に連結させてもよく、それにより、適切な転写調節が維持される。1つの例において、可変領域(又はV(D)Jセグメント)の核酸配列は、免疫グロブリン定常部の核酸配列に作動可能に連結されてもよく、それにより、それらの配列間での、免疫グロブリンの重鎖若しくは軽鎖配列への適切な組換えが可能となる。

20

**【0198】**

カセットは、生物に共導入される少なくとも1つの追加の目的のポリヌクレオチドを追加で含んでもよい。あるいは、追加の目的のポリヌクレオチドは、複数の発現カセット上で提供されてもよい。かかる発現カセットは、組換えポリヌクレオチドを調節領域の転写調節下となるように挿入するための、複数の制限部位及び/又は組換え部位を有する。発現カセットは、選択マーカー遺伝子を追加で含んでもよい。

30

**【0199】**

発現カセットは、5'-3'の転写方向に向かって、哺乳動物細胞又は目的の宿主細胞内において機能的な、転写及び翻訳開始領域(すなわちプロモーター)、本明細書で提供される組換えポリヌクレオチド、並びに転写及び翻訳終結領域(すなわち終結領域)を含んでもよい。調節領域(すなわちプロモーター、転写調節領域及び翻訳終結領域)及び/又は、本明細書で提供されるポリヌクレオチドは、宿主細胞に対して、又は互いに、生来のものであっても類似のものであってもよい。あるいは、調節領域及び/又は本明細書で提供されるポリヌクレオチドは、宿主細胞に対して、又は互いに、異種のものであってもよい。例えば、異種ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターは、当該ポリヌクレオチドが由来する種と異なる種に由来するか、又は同じ/類縁の種に由来するか、それらの1つ又は両方が、それらの元の形態及び/又は遺伝子座から実質的に修飾されるか、又は、プロモーターは、作動可能に連結されたポリヌクレオチドについての生来のプロモーターでない。あるいは、調節領域及び/又は本明細書で提供される組換えポリヌクレオチドは、完全合成物であってもよい。

40

**【0200】**

終結領域は、転写開始領域に生来のものであってもよく、作動可能に連結された組換えポリヌクレオチドに生来のものであってもよく、宿主細胞に生来のものであってもよく、又は、プロモーター、組換えポリヌクレオチド、宿主細胞又はそれらのあらゆる組み合わせ

50

せとは別の給源に由来する（すなわち無縁の若しくは異種の）ものであってもよい。

【0201】

発現カセットの調製の際、様々なDNA断片をマニピュレーションして、適切な方向性を有するDNA配列を提供してもよい。この際、アダプター又はリンカーを用いてDNA断片を連結してもよく、又は他のマニピュレーションを行って、適切な制限酵素部位の提供、余分なDNAの除去、制限酵素部位の除去等を行ってもよい。この場合、*in vitro*変異導入、プライマー修復、制限酵素処理、アニーリング、再置換（例えば塩基転移及び塩基転換を行ってもよい）。

【0202】

本明細書で提供される発現カセットでは、多くのプロモーターを使用できる。当該プロモーターは、所望する用途に基づき選択できる。発現カセット中のプロモーターを変更して用い、目的のポリヌクレオチドの発現のタイミング、位置及び/又はレベルを調整することにより、様々な応用が可能になることが理解できる。かかる発現コンストラクトは、必要に応じて、プロモーター調節領域（例えば、誘導的、構成的、環境的若しくは発生段階的に調節された、又は細胞若しくは組織特異的/選択的な発現に關与するもの）、転写開始部位、リボソーム結合部位、RNAプロセッシングシグナル、転写終結部位及びポリアダニル化部位、を含んでもよい。

10

【0203】

本明細書で提供されるポリヌクレオチドを含む発現カセットは、形質転換された細胞の選択用の選択マーカーを含んでもよい。当該選択マーカー遺伝子は、形質転換された細胞又は組織の選択に利用される。

20

【0204】

必要に応じて、本発明の方法及び組成物で使用される配列（すなわち目的のポリヌクレオチド、ヌクレアーゼ剤等）は、細胞内での更なる発現のために最適化されうる。すなわち、目的遺伝子の発現向上のために、哺乳動物に好適なコドン、ヒトに好適なコドン、齧歯動物に好適なコドン、マウスに好適なコドン、ラットに好適なコドン等、所与の目的の細胞内での好ましいコドンを使用して合成されうる。

【0205】

VIII. 配列同一性

本明細書で提供される方法及び組成物では、標的組み込みシステムの様々な要素（すなわちヌクレアーゼ剤、認識部位、挿入ポリヌクレオチド、目的のポリヌクレオチド、ターゲティングベクター、選択マーカー及び他の要素）を使用する。明細書の全体から、標的組み込みシステムの幾つかの要素は、活性型の変異体及び断片を有してもよいことが理解される。かかる要素としては、例えば、ヌクレアーゼ剤（すなわち操作されたヌクレアーゼ剤）、ヌクレアーゼ剤認識部位、目的のポリヌクレオチド、標的部位及びターゲティングベクターの対応するホモロジーアームが例示される。これらの要素の生物学的活性については、他で述べる通りである。

30

【0206】

2つのポリヌクレオチド又はポリペプチドの配列の「配列同一性」又は「同一性」とは、特定の比較ウィンドウにおいて最大限整合させて整列させた場合に同一な、2つの配列内の残基のことを指す。タンパク質において配列同一性（%）を用いるとき、アミノ酸の保存的置換により、しばしば同一でない残基位置が存在するが、それは、アミノ置換が、類似する化学的特性（例えば電荷又は疎水性）を有するアミノで置換され、分子の機能的特性を変更しないものである。配列が保存的置換において異なる場合、配列同一性（%）は、置換による保存的性質を補正するように高めに調整される場合がある。かかる保存的置換により異なる配列は、「配列類似性」又は「類似性」があると称される。この調整方法は、当分野の当業者に公知である。この方法は典型的には、保存的置換を、完全なミスマッチではなく、むしろ一部としてスコアに含めることを含み、それにより、配列同一性（%）が高くなる。すなわち、例えば同一のアミノ酸をスコア1とし、非保存的置換をスコア0とした場合、保存的置換は、0～1の間のスコアとなる。保存的置換のスコアリン

40

50

グは、例えばプログラムPC/GENE (Intelligenetics社、マウンテンビュー、カリフォルニア)で実行されるように算出される。

【0207】

「配列同一性 (%)」は、比較ウィンドウ上の、最適に整列された2つの配列を比較することにより測定される値を意味し、2つの配列の最適アラインメントの場合、比較ウィンドウのポリヌクレオチド配列の部分は、参照配列 (付加又は欠失を含まない) と比較して、付加若しくは欠失 (すなわちギャップ) を含むこともある。パーセンテージは、核酸又はアミノ酸の両配列内に存在する同一の残基を有する位置の数を決定して、マッチする位置の数を得、当該マッチ位置数を、比較ウィンドウの全位置数で除算し、結果に100を乗算し、配列同一性 (%) を得ることにより、算出される。

10

【0208】

特に明記しない限り、本明細書で提供される配列同一性/類似性の数値は、以下のパラメータを使用し、GAP Version 10を使用して得られる値のことを指す:ヌクレオチド配列の同一性 (%) 及び類似性 (%) の場合、ギャップのウエイトを50とし、長さのウエイトを3とし、nws gap dna . cmpのスコアリングマトリックス、ヌクレオチド配列の同一性 (%) 及び類似性 (%) の場合、ギャップのウエイトを8とし、長さのウエイトを2とし、BLOSUM62のスコアリングマトリックス、又はそのいずれかの同等のプログラム。対象となる2つの配列に関する「同等のプログラム」とは、GAP Version 10によって得られた対応する配列と比較して、同一のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の一致を有するアラインメントを作成し、同一の配列同一性を (%) を算出する、配列比較プログラムを意味する。

20

【0209】

非限定的な実施形態には、以下が含まれる。

1. 細胞内の標的遺伝子座の修飾方法であって、(a) 細胞内で活性な第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする第1ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、第1ポリヌクレオチドが、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む、工程と、(b) 細胞に、(i) 第1ヌクレアーゼ剤であって、第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する、第1ヌクレアーゼ剤と、(ii) 第1認識部位の充分近傍に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(c) 標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を含む。

30

2. 細胞内の標的遺伝子座の修飾方法であって、(a) 第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカをコードする第1ポリヌクレオチドを含む第1標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、第1ポリヌクレオチドが、第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を更に含む、工程と、(b) 細胞に、(i) 細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結された第1ヌクレアーゼ剤をコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、第1ヌクレアーゼ剤が第1ポリヌクレオチド内の第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第1選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii) 第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードする第2ポリヌクレオチドを含む第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲティングベクターであって、第1挿入核酸が、第1標的遺伝子座に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接している、第1ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(c) 第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞を同定する工程であって、修飾された細胞は、第2選択マーカの活性を有するが、第1選択マーカの活性を有さず、第1及び第2選択マーカが異なる、工程と、を含む。

40

3. 標的遺伝子座が、細胞のゲノム中に存在している、実施形態1又は2に記載の方法。

4. 標的遺伝子座が、細胞内のベクターに位置している、実施形態1又は2に記載の方

50

法。

5. 第1認識部位のニック又は二本鎖の切断が、第1選択マーカの活性を損なわせる、実施形態1~4のいずれか1つに記載の方法。

6. 同定する工程が、第1選択マーカの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で細胞を培養することを含む、実施形態1、2、3、4又は5に記載の方法。

7. 第1選択マーカを含む第1ポリヌクレオチドが、第1標的部位及び第2標的部位に隣接している、実施形態1~6のいずれか1つに記載の方法。

8. 同定する工程が、第1及び第2標的部位に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定することを含む、実施形態7に記載の方法。

9. 第1挿入ポリヌクレオチドが、(a)目的の第1ポリヌクレオチドと、(b)細胞内で活性な第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカをコードする第2ポリヌクレオチドであって、第2ヌクレアーゼ剤のための第2認識部位を含む、第2ポリヌクレオチドと、を含む、実施形態1~8のいずれか1つに記載の方法。

10. (a)標的遺伝子座に組み込まれた第1挿入ポリヌクレオチドを含む細胞に、(i)第2認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導する第2ヌクレアーゼ剤と、(ii)第2認識部位の充分近傍に位置する第3及び第4標的部位に対応する第3及び第4ホモロジーアームに隣接する、第2挿入ポリヌクレオチドを含むターゲティングベクターと、を導入する工程と、(b)標的遺伝子座に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を更に含む、実施形態9に記載の方法。

11. 第2認識部位におけるニック又は二本鎖切断が、第2選択マーカの活性を損なわせる、実施形態10に記載の方法。

12. 同定する工程が、第2選択マーカの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で細胞を培養することを含む、実施形態11に記載の方法。

13. 第2選択マーカを含む第2ポリヌクレオチドが、第3標的部位及び第4標的部位に隣接している、実施形態10、11又は12に記載の方法。

14. 前記同定する工程が、第3及び第4標的部位に組み込まれた第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定することを含む、実施形態13に記載の方法。

15. 第2挿入ポリヌクレオチドが、(a)目的の第2ポリヌクレオチドと、(b)細胞内で活性な第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカをコードする第3ポリヌクレオチドと、を含み、第3ポリヌクレオチドは、第3ヌクレアーゼ剤のための第3認識部位を含む、実施形態10~14のいずれか1つに記載の方法。

16. 第1ヌクレアーゼ剤が、第2ヌクレアーゼ剤と異なる、実施形態9~15のいずれか1つに記載の方法。

17. 第1選択マーカが、第2選択マーカと異なる、実施形態9~16のいずれか1つに記載の方法。

18. 第1及び第3ヌクレアーゼ認識部位が、互いに同一であり、かつ第2ヌクレアーゼ認識部位と異なり、第1及び第3ヌクレアーゼ剤が、互いに同一であり、かつ第2ヌクレアーゼ剤と異なる、実施形態15に記載の方法。

19. 第1及び第3選択マーカが、同一である、実施形態15に記載の方法。

20. 第1、第2又は第3選択マーカのうちの1つが、抗生物質耐性を付与する、実施形態1~19のいずれか1つに記載の方法。

21. 抗生物質が、G418、ハイグロマイシン、ブラストシジン、ネオマイシン又はピューロマイシンを含む、実施形態20に記載の方法。

22. 第1、第2又は第3選択マーカのうちの1つが、誘導性プロモーターに作動可能に連結され、選択マーカの発現が、細胞に対する毒性を示す、実施形態1~19のいずれか1つに記載の方法。

23. 第1、第2又は第3選択マーカが、ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-TK)を含む、実施形態22に記載の方法。

24. 細胞が、原核細胞である、実施形態1~23のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

25. 細胞が、真核生物細胞である、実施形態1～23のいずれか1つに記載の方法。
26. 真核生物細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態25に記載の方法。
27. 哺乳動物細胞が、非ヒト細胞である、実施形態26に記載の方法。
28. 哺乳動物細胞が、齧歯動物由来である、実施形態27に記載の方法。
29. 齧歯動物が、ラット又はマウスである、実施形態28に記載の方法。
30. 細胞が、多能性細胞である、実施形態26～29のいずれか1つに記載の方法。
31. 哺乳動物細胞が、ヒト人工多能性幹(iPS)細胞である、実施形態26に記載の方法。
32. 多能性細胞が、非ヒト胚性幹(ES)細胞である、実施形態30に記載の方法。
33. 多能性細胞が、マウス胚性幹(ES)細胞又はラット胚性幹(ES)細胞である、実施形態30に記載の方法。 10
34. 多能性細胞が、造血幹細胞である、実施形態30～33のいずれか1つに記載の方法。
35. 多能性細胞が、神経幹細胞である、実施形態30～33のいずれか1つに記載の方法。
36. 哺乳動物細胞が、ヒト線維芽細胞である、実施形態26に記載の方法。
37. 第1ヌクレアーゼ剤と第1ターゲティングベクターとの併用により、第1ターゲティングベクター単独での使用と比較して、ターゲティング効率の向上をもたらす、実施形態1又は2に記載の方法。
38. 第1ターゲティングベクターのターゲティング効率が、第1ターゲティングベクター単独での使用と比較して、少なくとも2倍向上している、実施形態37に記載の方法。 20
39. 第1又は第2ヌクレアーゼ剤が、ヌクレアーゼ剤をコードする核酸配列を含む発現コンストラクトを含み、核酸が、細胞内で活性な第4プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態1～38のいずれか1つに記載の方法。
40. 第1又は第2ヌクレアーゼ剤が、ヌクレアーゼをコードするmRNAである、実施形態1～39のいずれか1つに記載の方法。
41. 第1又は第2ヌクレアーゼ剤が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)である、実施形態1～39のいずれか1つに記載の方法。
42. 第1又は第2ヌクレアーゼ剤が、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)である、実施形態1～39のいずれか1つに記載の方法。 30
43. 第1又は第2ヌクレアーゼ剤が、メガヌクレアーゼである、実施形態1～39のいずれか1つに記載の方法。
44. 第1又は第2ヌクレアーゼ剤が、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列(CRISPR)-関連(Cas)タンパク質及びガイドRNA(gRNA)を含む、実施形態1～43のいずれか1つに記載の方法。
45. ガイドRNA(gRNA)が、(a)第1、第2又は第3認識部位を標的とする、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列(CRISPR)RNA(crRNA)と、(b)トランス活性化CRISPR RNA(tracrRNA)を含む、実施形態44に記載の方法。 40
46. 第1又は第2認識部位が、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に直接隣接している、実施形態45に記載の方法。
47. 目的のゲノム遺伝子座が、配列番号1のヌクレオチド配列を含む、実施形態44、45又は46に記載の方法。
48. Casタンパク質が、Cas9である、実施形態44、45、46又は47に記載の方法。
49. gRNAが、(a)配列番号2の核酸配列のキメラRNA、又は(b)配列番号3の核酸配列のキメラRNAを含む、実施形態44～46のいずれか1つに記載の方法。
50. crRNAが、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含む、実施形態44～46のいずれか1つに記載の方法。 50

51. *tracrRNA*が、配列番号7又は配列番号8を含む、実施形態44~46のいずれか1つに記載の方法。

52. 第1、第2及び/又は第3認識部位が、第1、第2又は第3選択マーカのイントロン、エキソン、プロモーター、プロモーター調節領域又はエンハンサー領域に位置している、実施形態1~51のいずれか1つに記載の方法。

53. 第1標的部位及び第2標的部位が、第1認識部位に直接隣接している、実施形態1~52のいずれか1つに記載の方法。

54. 第1標的部位及び第2標的部位が、第1認識部位から約10ヌクレオチド~約14kbに位置している、実施形態10~19のいずれか1つに記載の方法。

55. 第3標的部位及び第4標的部位が、第2認識部位に直接隣接している、実施形態10~19のいずれか1つに記載の方法。

56. 第3標的部位及び第4標的部位が、第2認識部位から約10ヌクレオチド~約14kbに位置している、実施形態10~19のいずれか1つに記載の方法。

57. 第1ホモロジーアームと第2ホモロジーアームの合計が、少なくとも約10kbである、実施形態1~56のいずれか1つに記載の方法。

58. 第3ホモロジーアームと第4ホモロジーアームの合計が、少なくとも約10kbである、実施形態10~57のいずれか1つに記載の方法。

59. 第1挿入ポリヌクレオチドが、約5kb~約300kbの長さの範囲である、実施形態1~58のいずれか1つに記載の方法。

60. 第2挿入ポリヌクレオチドが、約5kb~約300kbの長さの範囲である、実施形態10~59のいずれか1つに記載の方法。

61. 第1挿入ポリヌクレオチドの遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はそれらの組み合わせをもたらす、実施形態1~60のいずれか1つに記載の方法。

62. 第1挿入ポリヌクレオチドの遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はそれらの組み合わせをもたらす、実施形態10~61のいずれか1つに記載の方法。

63. 第1挿入ポリヌクレオチドが、ヒトポリヌクレオチドを含む目的のポリヌクレオチドを含む、実施形態1~62のいずれか1つに記載の方法。

64. 第2挿入ポリヌクレオチドが、ヒトポリヌクレオチドを含む目的のポリヌクレオチドを含む、実施形態8~63のいずれか1つに記載の方法。

65. 第1挿入ポリヌクレオチドが、T細胞受容体 遺伝子座の領域を含む目的のポリヌクレオチドを含む、実施形態1~64のいずれか1つに記載の方法。

66. 第2挿入ポリヌクレオチドが、T細胞受容体 遺伝子座の領域を含む目的のポリヌクレオチドを含む、実施形態8~65のいずれか1つに記載の方法。

67. 第1又は第2挿入ポリヌクレオチドが、T細胞受容体 遺伝子座の少なくとも1つの可変領域遺伝子セグメント及び/又は連結領域遺伝子セグメントを含む目的のポリヌクレオチドを含む、実施形態65又は66に記載の方法。

68. T細胞受容体 遺伝子座の領域が、ヒト由来である、実施形態65~67のいずれか1つに記載の方法。

69. 第1挿入ポリヌクレオチドが、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に作動可能に連結された、再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む、実施形態1~64のいずれか1つに記載の方法。

70. 同定する工程が、対立遺伝子の修飾(MOA)アッセイを経て実施される、実施形態1~69のいずれか1つに記載の方法。

71. 第1挿入ポリヌクレオチドが、細胞のゲノム内の核酸配列に相同若しくはオルソログな核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む、実施形態1~65のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50



72. 第2挿入ポリヌクレオチドが、細胞のゲノム内の核酸配列に相同若しくはオルソログな核酸配列を含む、実施形態10~71のいずれか1つに記載の方法。

73. 第1挿入ポリヌクレオチドが、外来の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む、実施形態1~70のいずれか1つに記載の方法。

74. 第2挿入ポリヌクレオチドが、外来の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む、実施形態10~70又は73のいずれか1つに記載の方法。

#### 【0210】

他の非限定的な実施形態には、以下のものが含まれる。

1. 細胞内の目的の標的遺伝子座の修飾方法であって、(a)第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカークをコードする核酸を含む第1標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程と、(b)細胞に、(i)Casタンパク質と第1ガイドRNA(gRNA)をコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、各々が、細胞内で活性化プロモーターに作動可能に連結され、Casタンパク質が第1核酸中の第1gRNA標的部位でのニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第1選択マーカークの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii)第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカークをコードする第2核酸を含む第1挿入核酸を含む第1ターゲティングベクターであって、第1挿入核酸が、第1標的遺伝子座に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接している、第1ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(c)第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞を同定する工程であって、修飾された細胞は、第2選択マーカークの活性を有するが、第1選択マーカークの活性を有さず、第1及び第2選択マーカークが異なる、工程と、を含む、方法。

2. 第1gRNAが、第1挿入核酸とハイブリダイズしない、実施形態1に記載の方法。

3. 目的の標的遺伝子座が、細胞のゲノム中に位置している、実施形態1に記載の方法。

4. 目的の標的遺伝子座が、細胞内のベクターに位置している、実施形態1に記載の方法。

5. 同定する工程(c)が、第2選択マーカークの活性を有するが、第1選択マーカークの活性を有さない、修飾された細胞の同定を可能にする条件下で細胞を培養することを含む、実施形態1に記載の方法。

6. (d)第1標的遺伝子座で第1挿入核酸を含む修飾された細胞に、(i)Casタンパク質及び第2gRNAをコードする1つ以上の核酸であって、各々が修飾された細胞内で活性化プロモーターに作動可能に連結し、Casタンパク質が、第2核酸を含む第1挿入核酸内の第2gRNA標的部位でのニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第2選択マーカークの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の核酸と、(ii)第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカークをコードする第3核酸を含む第2挿入核酸を含む第2ターゲティングベクターであって、第2挿入核酸が、第2標的遺伝子座に位置する第3及び第4標的部位に対応する第3及び第4ホモロジーアームに隣接している、第2ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(e)第2標的遺伝子座内に第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞を同定する工程であって、第2の修飾された細胞が、第3選択マーカークの活性を有するが、第2選択マーカークの活性を有さず、第2及び第3選択マーカークが異なる工程と、を更に含む、実施形態1に記載の方法。

7. 第1及び第2標的遺伝子座が、各々に隣接して位置している、実施形態6に記載の方法。

8. 第1又は第2標的遺伝子座が、第1又は第2gRNA標的部位から10ヌクレオチド~約14kbに位置している、実施形態6に記載の方法。

9. 第2gRNAが、第2挿入核酸とハイブリダイズしない、実施形態8に記載の方法。

10. 同定する工程(e)が、第3選択マーカークの活性を有するが、第2選択マーカーク

10

20

30

40

50

の活性を有さない第2の修飾された細胞の同定を可能にする条件下で、修飾された細胞を培養することを含む、実施形態6に記載の方法。

11. (f) 第2標的遺伝子座に第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞に、(i) 第2の修飾された細胞内で活性なプロモーターと各々作動可能に連結されたCasタンパク質及び第3gRNAをコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、Casタンパク質が第3核酸を含む第2挿入核酸で第3gRNA標的的部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第3選択マーカの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii) 第4プロモーターに作動可能に連結された第4選択マーカをコードする第4核酸を含む第3挿入核酸を含む第3ターゲティングベクターであって、第3挿入核酸が、第3標的遺伝子座に位置する第5及び第6標的的部位に対応する第5及び第6ホモロジーアームに隣接している、第3ターゲティングベクターと、を導入する工程と、(g) 第3標的遺伝子座に第3挿入核酸を含む第3の修飾された細胞を同定する工程であって、第3の修飾された細胞が第4選択マーカの活性を有するが、第3選択マーカの活性を有さず、第3及び第4選択マーカが異なる、工程と、を含む。

10

12. 第2及び第3標的遺伝子座が、各々直接隣接して位置している、実施形態11に記載の方法。

13. 第2又は第3標的遺伝子座が、第1又は第2gRNA標的的部位から10ヌクレオチド～約14kbに位置している、実施形態11に記載の方法。

14. 第1、第2、第3又は第4マーカが、抗生物質耐性を付与する、実施形態1～13のいずれか1つに記載の方法。

20

15. 抗生物質が、G418、ハイグロマイシン、ブラストジジン、ネオマイシン又はピューロマイシンを含む、実施形態14に記載の方法。

16. 第1、第2、第3又は第4選択マーカが、ヒポ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(HGPRT)又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-TK)を含む、実施形態1～13のいずれか1つに記載の方法。

17. 第1、第2又は第3gRNAが、(i) 第1、第2又は第3gRNA標的的部位とハイブリダイズするヌクレオチド配列と、(ii) トランス活性化CRISPR RNA(tracrRNA)と、を含む、実施形態1、6又は11に記載の方法。

18. 第1、第2又は第3標的遺伝子座が、第1、第2又は第3gRNA標的的部位の近傍に位置し、gRNA標的的部位のニック又は二本鎖切断が、標的遺伝子座でのターゲティングベクターの相同組換えを促進する、実施形態1、6又は11に記載の方法。

30

19. Casタンパク質が、Cas9である、実施形態1、6又は11に記載の方法。

20. 第1、第2又は第3gRNA標的的部位が、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に直接隣接している、実施形態19に記載の方法。

21. 細胞が、原核細胞である、実施形態1、6又は11に記載の方法。

22. 細胞が、真核生物細胞である、実施形態1、6及び11のいずれか1つに記載の方法。

23. 真核生物細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態22に記載の方法。

24. 哺乳動物細胞が、線維芽細胞である、実施形態23に記載の方法。

25. 哺乳動物細胞が、非ヒト哺乳動物細胞である、実施形態23に記載の方法。

40

26. 哺乳動物細胞が、齧歯動物由来である、実施形態23に記載の方法。

27. 齧歯動物が、ラット、マウス又はハムスターである、実施形態26に記載の方法。

28. 真核生物細胞が、多能性細胞である、実施形態22に記載の方法。

29. 多能性細胞が、造血幹細胞又は神経幹細胞である、実施形態28に記載の方法。

30. 多能性細胞が、ヒト人工多能性幹(iPS)細胞である、実施形態28に記載の方法。

31. 多能性細胞が、マウス胚性幹(ES)細胞又はラット胚性幹(ES)細胞である、実施形態28に記載の方法。

32. 第1、第2又は第3gRNA標的的部位が、第1、第2又は第3選択マーカを

50

コードする第 1、第 2 又は第 3 核酸のイントロン、エキソン、プロモーター又はプロモーター調節領域に位置している、実施形態 1、6 及び 11 のいずれか 1 つに記載の方法。

33. 第 1、第 2 又は第 3 ターゲティングベクターが、少なくとも約 10 kb である、実施形態 1、6 又は 11 に記載の方法。

34. 第 1、第 2 又は第 3 挿入核酸が、約 5 kb ~ 約 300 kb の範囲である、実施形態 1、6 又は 11 に記載の方法。

35. 第 1、第 2 又は第 3 挿入核酸が、ヒト T 細胞受容体 遺伝子座のゲノム領域を含む、実施形態 1、6 又は 11 に記載の方法。

36. ゲノム領域が、ヒト T 細胞受容体 遺伝子座の少なくとも 1 つの可変領域遺伝子セグメント及び/又は連結領域遺伝子セグメントを含む、請求項 35 に記載の方法。

37. 第 1 及び第 3 選択マーカージが同じである、実施形態 6 に記載の方法。

38. 第 1 及び第 3 選択マーカージが同じであり、第 2 及び第 4 選択マーカージが同じである、実施形態 11 に記載の方法。

39. 第 1 及び第 3 gRNA が同じである、実施形態 38 に記載の方法。

40. gRNA がハイグロマイシン又はネオマイシン抵抗性遺伝子に特有である実施形態 1、6、37、38 又は 39 に記載の方法。

41. ネオマイシン抵抗性遺伝子に特異的な gRNA が、配列番号 13、14、15 又は 16 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、実施形態 40 に記載の方法。

42. ハイグロマイシン抵抗性遺伝子に特異的な gRNA が、配列番号 17、18、19 又は 20 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、実施形態 40 に記載の方法。

43. a) 第 1 gRNA が、配列番号 13、14、15 又は 16 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされ、第 2 gRNA が、配列番号 17、18、19 又は 20 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされるか、又は b) 第 1 gRNA が、配列番号 17、18、19 又は 20 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされ、第 2 gRNA が、配列番号 13、14、15 又は 16 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によりコード化される、実施形態 6、37、38 又は 39 に記載の方法。

【0211】

以下の実施例は、実例として提供されるものであり、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0212】

図 1 及び 2 で表す連続的な遺伝子ターゲティング実験により、薬剤選択カセット内の標的配列を認識し切断するよう設計された、大型の BAC ベースのターゲティングベクター (LTVEC) とジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) との組み合わせの価値を示す。

【0213】

連続的なターゲティングの第一段階では (図 1)、ヒト T 細胞受容体 (TCR) の 11 個の可変的な (V) ドメインをコードする 136 kb の DNA を、対応するマウス TCR 遺伝子座に挿入して、修飾型の LTVEC (TCR B-hyg 対立遺伝子) を構築した。構築された 0.02 mg の LTVEC を、事前に TCR 遺伝子座に設置した、マウス可変 (V) セグメント及び連結 (J) 遺伝子セグメントがヒト Vs 及び Js に置換された修飾 (TCR A-neo 対立遺伝子) を有する 1000 万個のマウス胚性幹 (ES) 細胞にエレクトロポレーションした。増殖培養液中のエレクトロポレーションされた ES 細胞の回収後、ハイグロマイシンを添加し、LTVEC がゲノムに取り込まれた細胞に由来するコロニーを選択した。単離されたコロニーの対立遺伝子の修飾 (MOA) スクリーニングにより、スクリーニングされた 136 個のハイグロマイシン耐性コロニーのうち、4 個の正しくターゲティングされたクローンを同定した。すなわち 2.9% のターゲティング効率であった (表 1、実験 1)。正しくターゲティングされたクローンは、更なる 11 個の Vs の挿入に加えて、ネオマイシン (G418) 抵抗性カセット (

neo<sup>r</sup>)で置換されたハイグロマイシン抵抗性カセット(hyg<sup>r</sup>)を有した。

【0214】

実験2は、neo<sup>r</sup>遺伝子中の認識配列と結合し、DNAを二本鎖切断する2量体のNeo-ZFN(1,2)の単量体を各々発現する各0.02mgの2つのプラスミドを添加したことを除き、実験1と同様に実施した。Neo-ZFN(1,2)の添加により、スクリーニングされた568個のハイグロマイシン耐性クローンのうち、55個の正しくターゲティングされたクローンを得た。すなわち、9.7%のターゲティング効率であり、LTVEC単独でのエレクトロポレーションと比較して、3.3倍高いターゲティング効率を表す(表1、実験1及び2の比較より)。

【0215】

実験3は、Neo-ZFN(3,4)をコードするプラスミドを、Neo-ZFN(1,2)のそれに置換したことを除き、実験2と同様に実施した。Neo-ZFN(3,4)の添加により、スクリーニングされた360個のハイグロマイシン耐性クローンのうち、42個の正しくターゲティングされたクローンを得た。すなわち、11.7%のターゲティング効率であり、LTVEC単独でのエレクトロポレーションと比較して、4倍高いターゲティング効率を表す(表1、実験1及び3の比較より)。

【0216】

連続的なターゲティングにおける第2段階では(図2)、更なる11個の、TCRA-neo又はB-hyg対立遺伝子の場合と異なるヒトTCR可変(V)ドメインをコードする、157kbのDNAが挿入された修飾(TCRA-neo対立遺伝子)を生じるよう設計された、LTVECを0.002mg用い、連続的なターゲティングの第1段階(図1)で作製したTCRB-hyg対立遺伝子を有する、1000万個のマウス胚性幹(ES)細胞にエレクトロポレーションし、ES細胞にLTVECを導入した。増殖培養液中のエレクトロポレーションされたES細胞の回収後、G418を添加し、LTVECがゲノムに取り込まれた細胞に由来するコロニーを選択した。単離されたコロニーのMOAスクリーニングにより、スクリーニングされた192個のG418耐性コロニーのうち、2個の正しくターゲティングされたクローンを同定した。1.0%のターゲティング効率であった(表1、実験4)。正しくターゲティングされたクローンは、更なる11個のVsの挿入に加えて、hygrカセットで置換されたneorカセットを有していた。

【0217】

実験5は、hygr中の認識配列と結合し、DNAを二本鎖切断する2量体のHyg-ZFN(1,2)の単量体を各々発現する各0.02mgの2つのプラスミドを添加したことを除き、実験4と同様に実施した。Hyg-ZFN(1,2)の添加により、スクリーニングされた192個のG418耐性クローンのうち、40個の正しくターゲティングされたクローンを得た。すなわち、21%のターゲティング効率であり、LTVEC単独でのエレクトロポレーションと比較して、2.1倍高いターゲティング効率を表す(表1、実験4及び5の比較より)。

【0218】

実験6は、Hyg-ZFN(3,4)をコードするプラスミドを、Hyg-ZFN(1,2)で置換したことを除き、実験5と同様に実施した。Hyg-ZFN(3,4)の添加により、スクリーニングされた192個のハイグロマイシン耐性クローンのうち、42個の正しくターゲティングされたクローンを得た。すなわち、22%のターゲティング効率であり、LTVEC単独でのエレクトロポレーションと比較して、2.2倍高いターゲティング効率を表す(表1、実験4及び6の比較より)。

【0219】

表1にまとめる実験結果から、連続的なターゲティング実験における、neor又はhygr選択カセットを標的とするZFNsと組み合わせたLTVECsの添加により、LTVECのみを含むターゲティング実験と比較し3~20倍ターゲティング効率を強化できることが明らかとなった。連続的なターゲティング実験において、ZFNsの

10

20

30

40

50

添加によってなされたターゲッティング効率の強化は、事前に修飾された対立遺伝子の所望する染色体位置への、ヒトDNAの非常に大きな断片(136kb及び157kb)の、意図する通りの正確な挿入を促進した。ZFNにより強化されたターゲッティングは、ターゲッティングプロジェクトにおける成功確率を飛躍的に向上させ、ES細胞スクリーニングのための時間、労力及び材料費の顕著な節約をもたらす。

【0220】

【表1】

表1. neo<sup>r</sup>及びhyg<sup>r</sup>配列を認識するジンクフィンガーヌクレアーゼによる連続的なターゲッティングの強化

実験	エレクトロポレーションされたDNA	レシピエントES細胞	ターゲッティング効率 <sup>1</sup> (%)	ターゲッティングの増加 <sup>2</sup>
1	ヒト化TCR $\alpha$ 対立遺伝子 B-hygLTVEC <sup>3</sup>	ヒト化TCR $\alpha$ A-neo 対立遺伝子 <sup>3</sup>	2.9 (4/136)	n. a.
2	ヒト化TCR $\alpha$ 対立遺伝子 B-hygLTVEC ii. Neo-ZFN1プラスミド <sup>4</sup> iii. Neo-ZFN2プラスミド <sup>4</sup>	ヒト化TCR $\alpha$ A-neo 対立遺伝子	9.7 (55/568)	3.3X
3	ヒト化TCR $\alpha$ 対立遺伝子 B-hygLTVEC ii. Neo-ZFN3プラスミド <sup>5</sup> iii. Neo-ZFN4プラスミド <sup>5</sup>	ヒト化TCR $\alpha$ A-neo 対立遺伝子	11.7 (42/360)	4.0X
4	ヒト化TCR $\alpha$ 対立遺伝子 C-neoLTVEC <sup>6</sup>	ヒト化TCR $\alpha$ B-hyg 対立遺伝子 <sup>6</sup>	1.0 (2/192)	n. a.
5	ヒト化TCR $\alpha$ 対立遺伝子 C-neoLTVEC ii. Hyg-ZFN1プラスミド <sup>7</sup> iii. Hyg-ZFN2プラスミド <sup>7</sup>	ヒト化TCR $\alpha$ B-hyg 対立遺伝子	21 (40/192)	21X
6	ヒト化TCR $\alpha$ 対立遺伝子 B-hygLTVEC ii. Hyg-ZFN3プラスミド <sup>8</sup> iii. Hyg-ZFN4プラスミド <sup>8</sup>	ヒト化TCR $\alpha$ B-hyg 対立遺伝子	22 (42/192)	22X

<sup>1</sup>スクリーニングされた全クローンに対する、正しくターゲッティングされたクローンの比(括弧内に示す)をパーセンテージで表す。

<sup>2</sup>ターゲッティングベクター単独での使用による実験と、ターゲッティングベクターとZFNプラスミドとの組み合わせによる実験との、ターゲッティング効率の比を表す。

<sup>3</sup>図1を参照。

<sup>4</sup>Neo-ZFN(1, 2)(図3を参照)ヌクレアーゼ結合部位/切断部位:  
GGGCGCCCGGTTCTTTTT/gtcaag/ACCGACCTGTCCGGTG(配列番号9)

<sup>5</sup>Neo-ZFN(3, 4)(図3を参照)ヌクレアーゼ結合部位/切断部位:  
CCGGTTCTTTTTGTC/aagacc/GACCTGTCCGGTGCC(配列番号10)

<sup>6</sup>図2を参照。

<sup>7</sup>Hyg-ZFN(1, 2)(図3を参照)ヌクレアーゼ結合部位/切断部位:  
TGCGATCGCTGCGGCCGA/tcttag/CCAGACGAGCGGGTTCGG(配列番号11)

<sup>8</sup>Hyg-ZFN(3, 4)(図3を参照)ヌクレアーゼ結合部位/切断部位:  
CGCTGCGGCCGATCT/tagcca/GACGAGCGGGTTCGG(配列番号12)

【0221】

10

20

30

40

## 【表 2】

表 2. ネオマイシン及びハイグロマイシン耐性マーカーのターゲッティングに用いたサンプル gRNA

配列番号		gRNA
13	Neo Crispr#1	UGC GCAAGGAACGCCCGUCG
14	Neo Crispr#2	GGCAGCGCGGCUAUCGUGGC
15	Neo Crispr#3	ACGAGGCAGCGCGGCUAUCG
16	Neo Crispr#4	GCUCUGAUGCCGCGUGUUC
17	Hyg Crispr#1	ACGAGCGGGUUCGGCCCAUU
18	Hyg Crispr#6	CUUAGCCAGACGAGCGGGUU
19	Hyg Crispr#10	GCCGAUCUUAGCCAGACGAG
20	Hyg Crispr#16	CGACCUGAUGCAGCUCUCGG

10

## 【0222】

明細書に記載の全ての公報及び特許出願は、本発明が関連する当業者の技術水準を表す。全ての公報及び特許出願は、個々の刊行物又は特許出願が、参照により具体的かつ個人的に援用されているのと同程度に、参照により本発明に援用する。さもなければ、当該発明のあらゆる実施形態、態様、工程又は特徴は、他のものとの組み合わせで使用できる。範囲への言及には、当該範囲内のあらゆる整数、及び当該範囲内のあらゆる範囲部分をも含まれる。複数の範囲への言及には、かかる範囲の組み合わせも含まれる。

## 【0223】

20

例えば、以下の項目が提供される。

## (項目 1)

細胞内の標的遺伝子座の修飾方法であって、

(a) 第 1 プロモーターに作動可能に連結された第 1 選択マーカーをコードする第 1 ポリヌクレオチドを含む第 1 標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、前記第 1 ポリヌクレオチドが、第 1 ヌクレアーゼ剤のための第 1 認識部位を更に含む、工程と、

(b) 前記細胞に、

(i) 前記細胞内で活性化プロモーターに作動可能に連結された第 1 ヌクレアーゼ剤をコードする 1 つ以上の発現コンストラクトであって、前記第 1 ヌクレアーゼ剤が前記第 1 ポリヌクレオチド内の第 1 認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、前記第 1 選択マーカーの発現又は活性を損なわせる、1 つ以上の発現コンストラクトと、

30

(ii) 第 2 プロモーターに作動可能に連結された第 2 選択マーカーをコードする第 2 ポリヌクレオチドを含む第 1 挿入ポリヌクレオチドを含む第 1 ターゲッティングベクターであって、第 1 挿入核酸が、前記第 1 標的遺伝子座に位置する第 1 及び第 2 標的部位に対応する第 1 及び第 2 ホモロジーアームに隣接している、第 1 ターゲッティングベクターと、を導入する工程と、

(c) 前記第 1 標的遺伝子座に前記第 1 挿入核酸を含む修飾された細胞を同定する工程であって、前記修飾された細胞は、前記第 2 選択マーカーの活性を有するが、前記第 1 選択マーカーの活性を有さず、

前記第 1 及び前記第 2 選択マーカーが異なる、工程と、を含む、方法。

40

## (項目 2)

前記標的遺伝子座が、前記細胞のゲノム中に存在している、項目 1 に記載の方法。

## (項目 3)

前記標的遺伝子座が、前記細胞内のベクターに位置している、項目 1 に記載の方法。

## (項目 4)

前記同定する工程 (c) が、前記第 1 選択マーカーの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で前記細胞を培養することを含む、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## (項目 5)

前記同定する工程 (c) が、前記第 1 及び前記第 2 標的部位に組み込まれた前記第 1 挿

50

入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定することを含む、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

(項目6)

前記第1挿入ポリヌクレオチドが、目的の第1ポリヌクレオチドを更に含む、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

前記第2選択マーカをコードする前記第2ポリヌクレオチドが、前記細胞内で活性化第2プロモーターに作動可能に連結され、前記第2ポリヌクレオチドが、第2ヌクレアーゼ剤のための第2認識部位を含む、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記方法が、

(a)前記標的遺伝子座に組み込まれた前記第1挿入ポリヌクレオチドを含む前記細胞に、

(i)第2ヌクレアーゼ剤であって、前記第2ポリヌクレオチド内の前記第2認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、前記第2選択マーカの発現又は活性を損なわせる、第2ヌクレアーゼ剤と、

(ii)前記第2認識部位の充分近傍に位置する第3及び第4標的部位に対応する第3及び第4ホモロジーアームに隣接する第2挿入ポリヌクレオチドを含む第2ターゲティングベクターと、を導入する工程と、

(b)前記標的遺伝子座に組み込まれた前記第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、を更に含む、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記同定する工程(b)が、前記第2選択マーカの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で前記細胞を培養することを含む、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記第2選択可能マーカを含む前記第2ポリヌクレオチドが、前記第3標的部位及び前記第4標的部位に隣接している、項目8又は9に記載の方法。

(項目11)

前記同定する工程(b)が、前記第3及び前記第4標的部位に組み込まれた前記第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定することを含む、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記第2挿入ポリヌクレオチドが、

(a)目的の第2ポリヌクレオチドと、

(b)前記細胞内で活性化第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカをコードする第3ポリヌクレオチドと、を含み、

前記第3ポリヌクレオチドが、第3ヌクレアーゼ剤のための第3認識部位を含む、項目8～11のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記第1ヌクレアーゼ剤が、前記第2ヌクレアーゼ剤と異なる、項目7～12のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

前記第1選択マーカが、前記第2選択マーカと異なる、項目7～13のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記第1及び前記第3ヌクレアーゼ認識部位が、互いに同一であり、かつ前記第2ヌクレアーゼ認識部位と異なり、前記第1及び前記第3ヌクレアーゼ剤が、互いに同一であり、かつ前記第2ヌクレアーゼ剤と異なる、項目12に記載の方法。

(項目16)

前記第1及び前記第3選択マーカが、同一である、項目12に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 17)

前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 選択マーカーのうちの 1 つが、抗生物質耐性を付与する、項目 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 18)

前記抗生物質が、G418、ハイグロマイシン、ブラストシジン、ネオマイシン又はピユーロマイシンを含む、項目 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 選択マーカーのうちの 1 つが、誘導性プロモーターに作動可能に連結され、前記選択マーカーの発現が、前記細胞に対する毒性を示す、項目 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 20)

前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 選択マーカーが、ヒポ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 (HGPRT) 又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-TK) を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

前記細胞が、原核細胞である、項目 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 22)

前記細胞が、真核生物細胞である、項目 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 23)

前記真核生物細胞が、哺乳動物細胞である、項目 22 に記載の方法。

20

(項目 24)

前記哺乳動物細胞が、非ヒト哺乳動物細胞である、項目 23 に記載の方法。

(項目 25)

前記哺乳動物細胞が、齧歯動物由来である、項目 24 に記載の方法。

(項目 26)

前記齧歯動物が、ラット又はマウスである、項目 25 に記載の方法。

(項目 27)

前記細胞が、多能性細胞である、項目 23 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 28)

前記哺乳動物細胞が、ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞である、項目 23 に記載の方法

30

(項目 29)

前記多能性細胞が、非ヒト胚性幹 (ES) 細胞である、項目 27 に記載の方法。

(項目 30)

前記多能性細胞が、マウス胚性幹 (ES) 細胞又はラット胚性幹 (ES) 細胞である、項目 27 に記載の方法。

(項目 31)

前記多能性細胞が、造血幹細胞である、項目 27 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 32)

前記多能性細胞が、神経幹細胞である、項目 27 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 33)

前記哺乳動物細胞が、ヒト線維芽細胞である、項目 23 に記載の方法。

(項目 34)

前記第 1 ヌクレアーゼ剤と前記第 1 ターゲッティングベクターとの併用により、前記第 1 ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、ターゲッティング効率の向上をもたらす、項目 1 に記載の方法。

(項目 35)

前記第 1 ターゲッティングベクターの前記ターゲッティング効率が、前記第 1 ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、少なくとも 2 倍向上している、項目 34 に記載の方法。

50



(項目36)

前記第2又は前記第3ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ剤をコードする核酸配列を含む発現コンストラクトを含み、前記核酸が、前記細胞内で活性な第4プロモーターに作動可能に連結されている、項目12～35のいずれか一項に記載の方法。

(項目37)

前記第1又は前記第2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1～36のいずれか一項に記載の方法。

(項目38)

前記第1又は前記第2ヌクレアーゼ剤が、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)である、項目1～36のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目39)

前記第1又は前記第2ヌクレアーゼ剤が、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)である、項目1～36のいずれか一項に記載の方法。

(項目40)

前記第1又は前記第2ヌクレアーゼ剤が、メガヌクレアーゼである、項目1～36のいずれか一項に記載の方法。

(項目41)

前記第1又は前記第2ヌクレアーゼ剤が、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列(CRISPR)-関連(Cas)タンパク質及びガイドRNA(gRNA)を含む、項目1～38のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目42)

前記ガイドRNA(gRNA)が、(a)前記第1、前記第2又は前記第3認識部位を標的とする、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列(CRISPR)RNA(crRNA)と、

(b)トランス活性化CRISPR RNA(tracrRNA)と、を含む、項目41に記載の方法。

(項目43)

前記第1又は前記第2認識部位が、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に直接隣接している、項目42に記載の方法。

(項目44)

前記標的遺伝子座が、配列番号1のヌクレオチド配列を含む、項目41、42又は43に記載の方法。

30

(項目45)

前記Casタンパク質が、Cas9である、項目41、42、43又は44に記載の方法。

(項目46)

前記gRNAが、

(a)配列番号2の核酸配列のキメラRNA、又は

(b)配列番号3の核酸配列のキメラRNAを含む、項目41～43のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目47)

前記crRNAが、配列番号4、配列番号5又は配列番号6を含む、項目41～43のいずれか一項に記載の方法。

(項目48)

前記tracrRNAが、配列番号7又は配列番号8を含む、項目41～43のいずれか一項に記載の方法。

(項目49)

前記第1、前記第2及び/又は前記第3認識部位が、前記第1、前記第2又は前記第3選択マーカのイントロン、エキソン、プロモーター、プロモーター調節領域又はエンハンサー領域に位置している、請求1～48のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目50)

前記第1標的部位及び前記第2標的部位が、前記第1認識部位に直接隣接している、項目1~49のいずれか一項に記載の方法。

(項目51)

前記第1標的部位及び前記第2標的部位が、前記第1認識部位から約10ヌクレオチド~約14kbに位置している、項目8~16のいずれか一項に記載の方法。

(項目52)

前記第3標的部位及び前記第4標的部位が、前記第2認識部位に直接隣接している、項目8~16のいずれか一項に記載の方法。

(項目53)

前記第3標的部位及び前記第4標的部位が、前記第2認識部位から約10ヌクレオチド~約14kbに位置している、項目8~16のいずれか一項に記載の方法。

(項目54)

前記第1ホモロジーアームと前記第2ホモロジーアームの合計が、少なくとも約10kbである、項目1~53のいずれか一項に記載の方法。

(項目55)

前記第3ホモロジーアームと前記第4ホモロジーアームの合計が、少なくとも約10kbである、項目8~54のいずれか一項に記載の方法。

(項目56)

前記第1挿入ポリヌクレオチドが、約5kb~約300kbの長さの範囲である、項目1~55のいずれか一項に記載の方法。

(項目57)

前記第2挿入ポリヌクレオチドが、約5kb~約300kbの長さの範囲である、項目8~56のいずれか一項に記載の方法。

(項目58)

前記第1挿入ポリヌクレオチドの前記標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はそれらの組み合わせをもたらす、項目1~57のいずれか一項に記載の方法。

(項目59)

前記第2挿入ポリヌクレオチドの前記標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はそれらの組み合わせをもたらす、項目8~58のいずれか一項に記載の方法。

(項目60)

前記第1挿入ポリヌクレオチドが、ヒトポリヌクレオチドを含む目的のポリヌクレオチドを含む、請求1~59のいずれか一項に記載の方法。

(項目61)

前記第2挿入ポリヌクレオチドが、ヒトポリヌクレオチドを含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目8~60のいずれか一項に記載の方法。

(項目62)

前記第1挿入ポリヌクレオチドが、T細胞受容体 遺伝子座の領域を含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目1~61のいずれか一項に記載の方法。

(項目63)

前記第2挿入ポリヌクレオチドが、前記T細胞受容体 遺伝子座の領域を含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目8~62のいずれか一項に記載の方法。

(項目64)

前記第1又は前記第2挿入ポリヌクレオチドが、前記T細胞受容体 遺伝子座の少なくとも1つの可変領域遺伝子セグメント及び/又は連結領域遺伝子セグメントを含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目62又は63に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目65)

前記T細胞受容体 遺伝子座の前記領域が、ヒト由来である、項目62~64のいずれか一項に記載の方法。

(項目66)

前記第1挿入ポリヌクレオチドが、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に作動可能に連結された、再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目1~61のいずれか一項に記載の方法。

(項目67)

前記同定する工程が、対立遺伝子の修飾(MOA)アッセイを経て実施される、項目1~66のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目68)

前記第1挿入ポリヌクレオチドが、前記細胞のゲノム内の核酸配列に相同又はオルソロガスな前記核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目1~62のいずれか一項に記載の方法。

(項目69)

前記第2挿入ポリヌクレオチドが、前記細胞のゲノム内の核酸配列に相同又はオルソロガスな前記核酸配列を含む、項目8~68のいずれか一項に記載の方法。

(項目70)

前記第1挿入ポリヌクレオチドが、外来の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目1~67のいずれか一項に記載の方法。

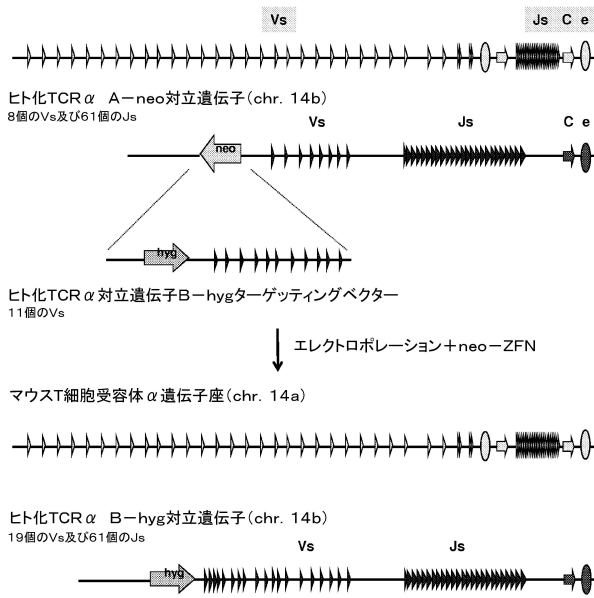
20

(項目71)

前記第2挿入ポリヌクレオチドが、外来の核酸配列を含む目的のポリヌクレオチドを含む、項目8~67又は70のいずれか一項に記載の方法。

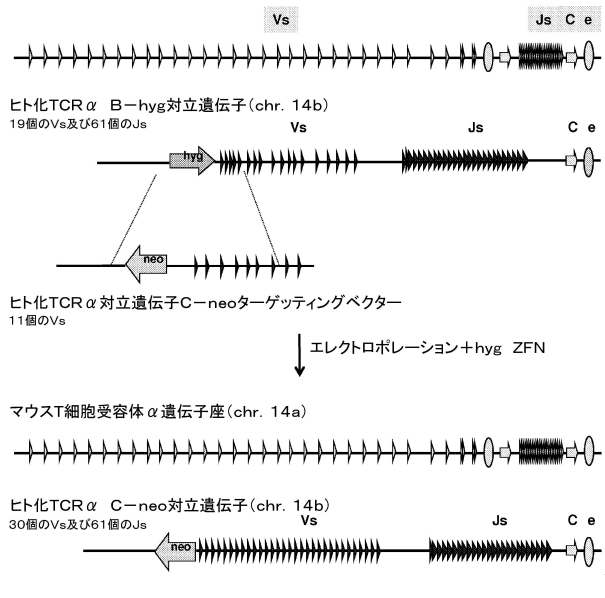
【図1】

マウスT細胞受容体α遺伝子座(chr. 14a)



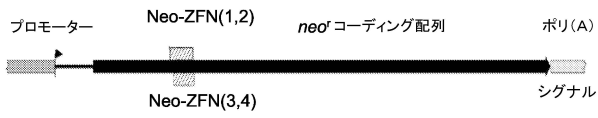
【図2】

マウスT細胞受容体α遺伝子座(chr. 14a)

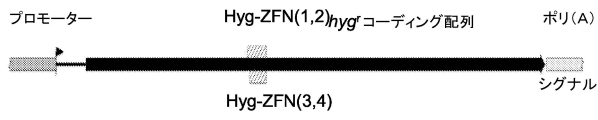


【 図 3 】

A



B



【 配列表 】

0006688231000001 . app

## フロントページの続き

- (72)発明者 オーバツハ, ボイテック  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー  
ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 フレンドウェイ, デイビッド  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー  
ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ドロケット, グスターボ  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー  
ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ガリアルディ, アントニー  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー  
ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 久野 淳子  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー  
ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 バレンズエラ, デイビッド エム.  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー  
ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 国際公開第2013/063361(WO, A1)  
国際公開第2013/163394(WO, A1)  
特表2004-524841(JP, A)  
特表2012-532598(JP, A)  
国際公開第2011/158009(WO, A1)  
Nat. Protoc. (2013) vol.8, no.11, p.2281-2308

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
DWPI(Derwent Innovation)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq