

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成30年11月22日(2018.11.22)

【公表番号】特表2017-535258(P2017-535258A)

【公表日】平成29年11月30日(2017.11.30)

【年通号数】公開・登録公報2017-046

【出願番号】特願2017-519646(P2017-519646)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)
C 0 7 K	16/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	16/00	

【手続補正書】

【提出日】平成30年10月15日(2018.10.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞のゲノムの遺伝子座内に組み込まれた外因性核酸配列を含む単離された細胞であつて、前記遺伝子座は、

(a) 配列番号1または配列番号4に対して少なくとも90%同一であり、

(b) 外因性核酸配列によってコードされるタンパク質の発現を、ゲノム中へのランダム組込みによって典型的に観察される発現と比較して少なくとも1.5倍増強することができる

ヌクレオチド配列を含む、細胞。

【請求項2】

前記細胞がCHO細胞である、請求項1に記載の細胞。

【請求項3】

前記外因性核酸配列が、1または複数の組換え認識配列を含み、

任意選択で、前記外因性核酸配列が、少なくとも2つの組換え認識配列と、前記2つの組換え認識配列間に配置された選択可能なマーカーとを含み、

任意選択で、前記1または複数の組換え認識配列が、LoxP部位、Lox511部位、Lox2272部位、Lox2372部位、Lox5171部位、Loxm2部位、Lox71部位、Lox66部位、LoxFas部位およびfrt部位からなる群から選択

される、

請求項 1 または 2 に記載の細胞。

**【請求項 4】**

前記外因性核酸配列が第 1 の外因性の目的の遺伝子 (G O I) および第 1 の外因性プロモーターを含み、前記第 1 の外因性 G O I が前記第 1 の外因性プロモーターに作動可能に連結している、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞。

**【請求項 5】**

前記外因性核酸配列が、

( a ) 第 2 の外因性 G O I および第 2 の外因性プロモーターであって、前記第 2 の外因性 G O I が前記第 1 の G O I の 3' 側に位置し、前記第 2 の外因性プロモーターに作動可能に連結している、第 2 の外因性 G O I および第 2 の外因性プロモーター、ならびに

( b ) 前記第 1 の外因性 G O I の 5' 側の第 1 の組換え認識配列、前記第 1 の外因性 G O I の 3' 側の第 2 の組換え認識配列および前記第 2 の外因性 G O I の 3' 側の第 3 のリコンビナーゼ認識配列

をさらに含み、任意選択で、前記第 1 および第 2 の組換え認識配列は異なり、かつ L o x P 部位、L o x 5 1 1 部位、L o x 2 2 7 2 部位、L o x 2 3 7 2 部位、L o x 5 1 7 1 部位、L o x m 2 部位、L o x 7 1 部位、L o x 6 6 部位、L o x F a s 部位および f r t 部位からなる群から選択される、

請求項 4 に記載の細胞。

**【請求項 6】**

前記第 1 の外因性 G O I が抗体の軽鎖またはその断片をコードし、前記第 2 の外因性 G O I が抗体の重鎖またはその断片をコードする、請求項 5 に記載の細胞。

**【請求項 7】**

前記外因性核酸配列が第 3 の外因性 G O I をさらに含み、

任意選択で、前記第 3 の外因性 G O I が前記第 2 の外因性 G O I の 3' 側に位置し、任意選択で、前記第 1 、第 2 および第 3 の G O I が ( i ) 抗体の第 1 の軽鎖もしくはその抗原結合性断片、抗体の第 2 の軽鎖もしくはその抗原結合性断片および抗体の重鎖もしくはその抗原結合性断片、または ( i i ) 抗体の軽鎖もしくはその抗原結合性断片、抗体の第 1 の重鎖もしくはその抗原結合性断片および抗体の第 2 の重鎖もしくはその抗原結合性断片からなる群から選択されるポリペプチドをコードする、

請求項 5 または請求項 6 に記載の細胞。

**【請求項 8】**

C H O 細胞ゲノムを改変する方法であって、C H O 細胞中に外因性核酸を導入するステップを含み、前記外因性核酸は前記細胞のゲノムの遺伝子座に組み込まれ、前記遺伝子座は、

( a ) 配列番号 1 または配列番号 4 に対して少なくとも 90 % 同一であり、

( b ) 外因性核酸配列によってコードされるタンパク質の発現を、ゲノム中へのランダム組込みによって典型的に観察される発現と比較して少なくとも 1.5 倍増強することが可能である

スクレオチド配列を含む、方法。

**【請求項 9】**

前記外因性核酸が、1 または複数の組換え認識配列を含み、

任意選択で、前記外因性核酸が、少なくとも 2 つの組換え認識配列と、前記 2 つの組換え認識配列間に配置された選択可能なマーカーとを含み、

任意選択で、前記 1 または複数の組換え認識配列が、L o x P 部位、L o x 5 1 1 部位、L o x 2 2 7 2 部位、L o x 2 3 7 2 部位、L o x 5 1 7 1 部位、L o x m 2 部位、L o x 7 1 部位、L o x 6 6 部位、L o x F a s 部位および f r t 部位からなる群から選択される、

請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記外因性核酸が第1の外因性の目的の遺伝子（G O I）を含み、  
任意選択で、前記外因性核酸は第2の外因性G O Iをさらに含み、かつ、前記第1の外因  
性G O Iの3'側に配置され、  
任意選択で、前記第1の外因性G O Iは抗体の軽鎖またはその抗原結合性断片をコードし  
、前記第2の外因性G O Iは抗体の重鎖またはその抗原結合性断片をコードする、  
請求項9に記載の方法。

**【請求項11】**

前記外因性核酸がベクターを含むビヒクルを使用して導入され、前記ベクターは、  
a)配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な  
5'相同アーム、  
b)前記外因性核酸、および  
c)配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な  
3'相同アーム  
を含む、請求項8～10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項12】**

前記外因性核酸が、少なくともさらなるベクターまたはmRNA分子を含むビヒクルを  
使用して導入され、  
任意選択で、前記さらなるベクターは、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウ  
イルス、アデノ随伴ウイルス、組込みファージベクター、非ウイルスベクター、トランスポ  
ゾンおよび／もしくはトランスポザーゼ、インテグラーゼ基質ならびにプラスミドからな  
る群から選択され、ならびに／または前記さらなるベクターは部位特異的ヌクレアーゼを  
コードする核酸を含み、前記部位特異的ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ  
(ZFN)、ZFNダイマー、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALE)  
、TALEエフェクタードメイン融合タンパク質およびRNAガイドDNAエンド  
ヌクレアーゼからなる群から任意選択で選択される、  
請求項11に記載の方法。

**【請求項13】**

前記外因性核酸を導入するステップの前に、前記CHO細胞は前記遺伝子座に組み込  
まれた1または複数の組換え認識配列を含み、前記外因性核酸は、前記遺伝子座の前記1ま  
たは複数の組換え認識配列に導入され、

任意選択で、前記外因性核酸を導入するステップの前に、CHO細胞は前記遺伝子座に  
組み込まれた少なくとも2つの組換え認識配列と、前記2つの組換え認識配列間に配置さ  
れた選択可能なマーカーとを含み、任意選択で、前記少なくとも2つの組換え認識配列は  
異なり、かつLoxP部位、Lox511部位、Lox2272部位、Lox2372部位、  
Lox5171部位、Loxm2部位、Lox71部位、Lox66部位、LoxF  
as部位およびfrt部位からなる群から選択される、  
請求項8～12のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項14】**

前記外因性核酸は第1の外因性プロモーターに作動可能に連結した第1の外因性の目的の  
遺伝子(G O I)、前記第1の外因性プロモーターの5'において配置された第1の組換  
え認識配列、および前記第1の外因性G O Iの3'において配置された第2の組換  
え認識配列を含み、前記第1および第2の組換え認識配列はそれぞれ、前記外因性核酸を導入す  
るステップの前にゲノムの前記遺伝子座に存在する前記少なくとも2つの組換え認識配列  
と同一であり、

任意選択で、前記第1および第2の組換え認識配列は異なり、かつLoxP部位、Lox  
511部位、Lox2272部位、Lox2372部位、Lox5171部位、Lox  
m2部位、Lox71部位、Lox66部位、LoxF  
as部位およびfrt部位からなる  
群から選択される、  
請求項8～13のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項15】**

前記外因性核酸は、第2の外因性プロモーターに作動可能に連結した第2の外因性G O Iをさらに含み、前記第2の外因性G O Iは前記第1の外因性G O Iの3'側かつ前記第2の組換え認識配列の5'側に配置され、

任意選択で、前記第1の外因性G O Iは抗体の軽鎖またはその抗原結合性断片をコードし、前記第2の外因性G O Iは抗体の重鎖またはその抗原結合性断片をコードする、  
請求項14に記載の方法。

【請求項16】

細胞において目的の遺伝子(G O I)を発現させる方法であって、

a) 前記細胞のゲノムの遺伝子座内に組み込まれた外因性核酸配列を含む細胞を提供するステップであって、前記外因性核酸配列は第1のプロモーターに作動可能に連結した第1の外因性G O Iを含み、前記遺伝子座は、(i)配列番号1または配列番号4に対して少なくとも90%同一であり、(ii)外因性核酸配列によってコードされるタンパク質の発現を、ゲノム中へのランダム組込みによって典型的に観察される発現と比較して少なくとも1.5倍増強することが可能であるヌクレオチド配列を含み、前記第1の外因性G O Iは第1の目的のタンパク質(P O I)をコードする、ステップ；

b) (a)の前記細胞を、前記第1の外因性G O Iの発現を可能にする条件下で培養するステップ；および

c) 前記第1のP O Iを回収するステップを含む、方法。

【請求項17】

前記細胞がC H O細胞である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記外因性核酸が第2のプロモーターに作動可能に連結した第2の外因性G O Iをさらに含み、前記条件は前記第1の外因性G O Iおよび前記第2の外因性G O Iの発現を可能にし、

任意選択で、前記第1の外因性G O Iは抗体の軽鎖をコードし、前記第2の外因性G O Iは抗体の重鎖をコードする、

請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

C H O細胞ゲノムを改変して、(i)目的のタンパク質を発現させるか、または(ii)認識配列を組み込むためのビヒクルであって、

a. 配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な5'相同アーム、

b. それぞれ、(i)前記目的のタンパク質をコードするか、または(ii)前記認識配列を含む外因性核酸配列、および

c. 配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な3'相同アーム、

を含むベクターを含む、ビヒクル。

【請求項20】

前記外因性核酸配列は、選択可能なマーカーに隣接する1つもしくは複数の組換え認識配列を含み、および/または第1の外因性の目的の遺伝子(G O I)を含み、

任意選択で、前記ビヒクルは少なくともさらなるベクターまたはm R N A分子を含み、前記さらなるベクターは、任意選択で、前記認識配列を組み込みための部位特的ヌクレアーゼをコードする核酸を含み、前記部位特異的ヌクレアーゼは、任意選択で、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(Z F N)、Z F Nダイマー、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(T A L E N)、T A Lエフェクタードメイン融合タンパク質またはR N AガイドD N Aエンドヌクレアーゼからなる群から選択される、

請求項19に記載のビヒクル。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0146

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0146】

本発明は、本明細書に記載される具体的実施形態によって範囲が限定されない。実際、本明細書に記載されるものに加えて、本発明の種々の改変が、上述の説明および添付の図面から当業者に明らかとなる。かかる改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

遺伝子座内の特異的部位において組み込まれた外因性核酸配列を含む細胞であって、前記遺伝子座は、配列番号1または配列番号4に対して少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列を含む、細胞。

(項目2)

第2の核酸配列内の特異的部位中に組み込まれた第1の核酸配列を含むポリヌクレオチドであって、前記第2の核酸配列は、配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。

(項目3)

前記特異的部位が、配列番号1内の位置に位置するか、または配列番号1内の位置に隣接して位置し、前記位置が、配列番号1の10~4,000;100~3,900;200~3,800;300~3,700;400~3,600;500~3,500;600~3,400;700~3,300;800~3,200;900~3,100;1,000~3,000;1,100~2,900;1,200~2,800;1,300~2,700;1,200~2,600;1,300~2,500;1,400~2,400;1,500~2,300;1,600~2,200;1,700~2,100;1,800~2,050;1,900~2,040;2,000~2,020、2,002~2,021~2,010~2,015、2,001~2,002、2,009~2,010および2,021~2,022と番号付けされた位置に及ぶヌクレオチドから選択される、項目2に記載のポリヌクレオチド。

(項目4)

配列番号1内の前記特異的部位または配列番号1内の位置に隣接する前記特異的部位が、配列番号1の10~500;500~1,000;500~2,100;1,000~1,500;1,000~2,100;1,500~2,000;1,500~2,500;2,000~2,500;2,500~3,000;2,500~3,500;3,000~3,500;3,000~4,000;および3,500~4,000と番号付けされた位置に及ぶヌクレオチドからなる群から選択される、項目3に記載のポリヌクレオチド。

(項目5)

改変されたゲノムを含む改変された細胞であって、前記ゲノムは、前記ゲノムの遺伝子座内の外因性核酸配列の挿入によって改変され、前記遺伝子座は、配列番号1または配列番号4に対して少なくとも90%同一である発現増強性ヌクレオチド配列を含む、細胞。

(項目6)

前記細胞がCHO細胞である、項目5に記載の改変された細胞。

(項目7)

前記外因性核酸配列が、1または複数の組換え認識配列を含む、項目5または6に記載の改変された細胞。

(項目8)

前記外因性核酸配列が、少なくとも2つの組換え認識配列と、前記2つの組換え認識配

列間に配置された選択可能なマークーとを含む、項目7に記載の改変された細胞。

(項目9)

前記1または複数の組換え認識配列が、LoxP部位、Lox511部位、Lox2272部位、Lox2372部位、Lox5171部位、Loxm2部位、Lox71部位、Lox66部位、LoxFas部位およびfrt部位からなる群から選択される、項目7に記載の改変された細胞。

(項目10)

前記外因性核酸配列が、前記発現増強性ヌクレオチド配列に作動可能に連結した少なくとも1つの外因性の目的の遺伝子(GOI)を含む、項目5または6に記載の改変された細胞。

(項目11)

前記少なくとも1つの外因性GOIが、ヒト遺伝子であり、前記ヒト遺伝子が、外因性プロモーターに作動可能に連結している、項目10に記載の改変された細胞。

(項目12)

第1のGOIの3'側に第2のGOIをさらに含み、前記第2のGOIが、外因性プロモーターに作動可能に連結している、項目11に記載の改変された細胞。

(項目13)

前記第1のGOIが抗体の軽鎖をコードし、前記第2のGOIが抗体の重鎖をコードする、項目12に記載の改変された細胞。

(項目14)

抗体の軽鎖をコードする前記遺伝子の5'側に第1のリコンビナーゼ部位と、抗体の重鎖をコードする前記遺伝子に直接隣接し、かつ3'側にある第2のリコンビナーゼ部位とをさらに含む、項目13に記載の改変された細胞。

(項目15)

前記第1のリコンビナーゼ認識部位と前記第2のリコンビナーゼ認識部位とが異なり、前記第1および第2のリコンビナーゼ認識部位が、LoxP部位、Lox511部位、Lox2272部位、Lox2372部位、Lox5171部位、Loxm2部位、Lox71部位、Lox66部位、LoxFas部位およびfrt部位からなる群から選択される、項目14に記載の改変された細胞。

(項目16)

CHO細胞ゲノムを改変する方法であって、前記CHO細胞中に、外因性配列を含むビヒクルを導入するステップを含み、前記外因性配列は、配列番号1または配列番号4に対して少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列を含む前記ゲノムの遺伝子座中に組み込まれる、方法。

(項目17)

目的のタンパク質を発現するようにCHO細胞ゲノムを改変する方法であって、CHO細胞中に、前記目的のタンパク質の発現のための配列を含む外因性核酸を前記CHO細胞のゲノム中に導入するためのビヒクルを導入するステップを含み、前記ビヒクルはベクターを含み、前記ベクターは、

a. 配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な5'相同アーム、

b. 前記目的のタンパク質をコードする核酸、および

c. 配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な3'相同アーム

を含む、方法。

(項目18)

前記ビヒクルが、少なくともさらなるベクターまたはmRNA分子を含む、項目17に記載の方法。

(項目19)

前記さらなるベクターが、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノ

随伴ウイルス、組込みファージベクター、非ウイルスベクター、トランスポゾンおよび／またはトランスポザーゼ、インテグラーゼ基質ならびにプラスミドからなる群から選択される、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記5'相同アームが、配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同的な配列を含み、前記目的のタンパク質をコードする前記核酸と連続している、項目17に記載の方法。

(項目21)

前記3'相同アームが、配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同的な配列を含み、前記目的のタンパク質をコードする前記核酸と連続している、項目17に記載の方法。

(項目22)

目的のタンパク質を発現するようにCHO細胞ゲノムを改変するためのビヒクルであって、

a. 配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同である5'相同アーム、

b. 前記目的のタンパク質をコードする核酸、および

c. 配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同的な3'相同アーム

を含むベクターを含むビヒクル。

(項目23)

少なくともさらなるベクターまたはmRNA分子を含む、項目22に記載のビヒクル。

(項目24)

前記さらなるベクターが、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、組込みファージベクター、非ウイルスベクター、トランスポゾンおよび／またはトランスポザーゼ、インテグラーゼ基質、ならびにプラスミドからなる群から選択される、項目23に記載のビヒクル。

(項目25)

前記5'相同アームが、配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同的な配列を含み、前記目的のタンパク質をコードする前記核酸と連続している、項目22に記載のビヒクル。

(項目26)

前記3'相同アームが、配列番号1または配列番号4のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同的な配列を含み、前記目的のタンパク質をコードする前記核酸と連続している、項目22に記載のビヒクル。

(項目27)

目的のタンパク質を作製するための方法であって、

a. 細胞中に目的の遺伝子(GOI)を導入するステップであって、前記GOIは、配列番号1または配列番号4の発現増強性配列に対して少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列を含む特異的遺伝子座中に組み込まれる、ステップ；

b. (a)の細胞を、前記GOIの発現を可能にする条件下で培養するステップ；および

c. 前記目的のタンパク質を回収するステップ  
を含む方法。

(項目28)

前記GOIが、前記発現増強性配列に作動可能に連結し、少なくとも1つのリコンビナーゼ認識部位が、前記GOIと直接隣接する、項目27に記載の方法。

(項目29)

前記GOIが、免疫グロブリンまたはその抗原結合性断片、および受容体またはそのリガンド結合性断片から選択されるタンパク質をコードする、項目28に記載の方法。

(項目30)

前記免疫グロブリンが、抗体軽鎖もしくはその抗原結合性断片、抗体重鎖もしくはその抗原結合性断片、Fc融合タンパク質、またはFc-受容体融合タンパク質から選択される、項目29に記載の方法。

(項目31)

前記少なくとも1つのリコンビナーゼ認識部位が、LoxP部位、Lox511部位、Lox2272部位、Lox2372部位、Lox5171部位、Loxm2部位、Lox71部位、Lox66部位、LoxFas部位およびfrt部位からなる群から選択される、項目30に記載の方法。

(項目32)

前記GOIが前記リコンビナーゼ認識部位に直接隣接し、かつ5'側にあり、そして前記GOIに直接隣接し、かつ3'側にある第2のリコンビナーゼ認識部位をさらに含む、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記第2のリコンビナーゼ認識部位に直接隣接し、かつ3'側にある第2のGOIをさらに含む、項目32に記載の方法。

(項目34)

前記第2のGOIに直接隣接し、かつ3'側にある第3のリコンビナーゼ認識部位をさらに含む、項目33に記載の方法。

(項目35)

前記第2のリコンビナーゼ認識部位と前記第2のGOIとの間に少なくとも1つのマークー遺伝子をさらに含む、項目34に記載の方法。

(項目36)

前記少なくとも1つのマークー遺伝子が、薬物耐性遺伝子および発現レポーター遺伝子からなる群から選択される、項目35に記載の方法。

(項目37)

前記第1のGOIに作動可能に連結したプロモーターおよび前記第2のGOIに作動可能に連結したプロモーターをさらに含む、項目36に記載の方法。

(項目38)

前記第2および前記第3のリコンビナーゼ認識部位が、前記第1のリコンビナーゼ認識部位と反対の配向である、項目37に記載の方法。

(項目39)

前記第1、第2および第3のリコンビナーゼ認識部位が異なる、項目38に記載の方法。

(項目40)

目的のタンパク質を作製するための方法であって、

(a) CHO細胞中に、配列番号1または配列番号4に対して少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列を含む発現増強性配列と、目的のタンパク質をコードする外因性GOIとを含む核酸構築物を導入するステップであって、前記GOIは、前記発現増強性配列に作動可能に連結している、ステップ；

(b) (a)のCHO細胞を、前記GOIの発現を可能にする条件下で培養するステップ；および

(c) 前記目的のタンパク質を回収するステップを含む方法。

(項目41)

前記GOIが、プロモーターに作動可能に連結している、項目40に記載の方法。

(項目42)

前記GOIが、免疫グロブリンまたはその抗原結合性断片をコードする、項目41に記載の方法。

(項目43)

前記 G O I が、抗体、受容体もしくはそのリガンド結合性断片、F c - 受容体融合タンパク質または F c 融合タンパク質をコードする、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4 )

認識配列が組み込まれるように C H O 細胞ゲノムを改変する方法であって、C H O 細胞中に、認識配列を含む外因性核酸を前記 C H O 細胞のゲノム中に導入するためのビヒクルを導入するステップを含み、前記ビヒクルはベクターを含み、前記ベクターは、

a . 配列番号 1 または配列番号 4 のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な 5 ' 相同アーム、

b . 認識配列を含む外因性核酸、および

c . 配列番号 1 または配列番号 4 のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な 3 ' 相同アーム

を含み、前記認識配列が、配列番号 1 または配列番号 4 に対して少なくとも 9 0 % 同一であるヌクレオチド配列を有する前記ゲノムの遺伝子座内に組み込まれる、方法。

(項目 4 5 )

前記外因性核酸配列が、少なくとも 2 つの組換え認識配列と、前記 2 つの組換え認識配列間に配置された選択可能なマーカーとを含む、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6 )

前記ビヒクルが、少なくともさらなるベクターまたは m R N A 分子を含む、項目 4 4 または 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7 )

前記さらなるベクターが、前記認識配列を組み込むための部位特異的ヌクレアーゼをコードする核酸を含む、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8 )

前記部位特異的ヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ ( Z F N ) 、 Z F N ダイマー、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ ( T A L E N ) 、 T A L エフェクタードメイン融合タンパク質または R N A ガイド D N A エンドヌクレアーゼからなる群から選択される、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9 )

認識配列が組み込まれるように C H O 細胞ゲノムを改変するためのビヒクルであって、

a . 配列番号 1 または配列番号 4 のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な 5 ' 相同アーム、

b . 前記認識配列を含む核酸、および

c . 配列番号 1 または配列番号 4 のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な 3 ' 相同アーム

を含むベクターを含む、ビヒクル。

(項目 5 0 )

前記核酸が、少なくとも 2 つの組換え認識配列と、前記 2 つの組換え認識配列間に配置された選択可能なマーカーとを含む、項目 4 9 に記載のビヒクル。

(項目 5 1 )

少なくともさらなるベクターまたは m R N A 分子を含む、項目 4 9 または 5 0 に記載のビヒクル。

(項目 5 2 )

前記さらなるベクターが、前記認識配列を組み込むための部位特異的ヌクレアーゼをコードする核酸を含む、項目 5 1 に記載のビヒクル。

(項目 5 3 )

前記部位特異的ヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ ( Z F N ) 、 Z F N ダイマー、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ ( T A L E N ) 、 T A L エフェクタードメイン融合タンパク質または R N A ガイド D N A エンドヌクレアーゼからなる群から選択される、項目 5 2 に記載のビヒクル。

(項目 5 4 )

前記 5' 相同アームが、配列番号 1 または配列番号 4 のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な配列を含み、前記認識配列を含む前記核酸と連続している、項目 4 9 に記載のビヒクル。

(項目 5 5)

前記 3' 相同アームが、配列番号 1 または配列番号 4 のヌクレオチド配列中に存在する配列に対して相同な配列を含み、前記認識配列を含む前記核酸と連続している、項目 4 9 に記載のビヒクル。