【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】令和3年5月6日(2021.5.6)

【公開番号】特開2021-45174(P2021-45174A)
【公開日】令和3年3月25日(2021.3.25)
【年通号数】公開・登録公報2021-015
【出願番号】特願2020-219029(P2020-219029)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/63　　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　 5/10　　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　 5/0735　(2010.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/09　　１００
Ｃ１２Ｎ　15/63　　ＺＮＡＺ
Ｃ１２Ｎ　 5/10
Ｃ１２Ｎ　 5/0735

【手続補正書】
【提出日】令和3年2月9日(2021.2.9)
【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】
インビトロでマウス胚性幹（ＥＳ）細胞中の標的ゲノム遺伝子座を修飾するための方法であって、
（ａ）前記標的ゲノム遺伝子座内で一本鎖又は二本鎖切断を行うヌクレアーゼ剤または前記ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドを、前記マウスＥＳ細胞に導入することであって、前記ヌクレアーゼ剤が、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質とガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、又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、導入することと、
（ｂ）長さが少なくとも１０ｋｂであり、第１の５’ホモロジーアーム及び第１の３’ホモロジーアームが隣接した第１の核酸挿入物を含む、第１の大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）と、長さが少なくとも１０ｋｂであり、第２の５’ホモロジーアーム及び第２の３’ホモロジーアームが隣接した第２の核酸挿入物を含む、第２のＬＴＶＥＣとを、前記マウスＥＳ細胞に導入することであって、
前記第１の核酸挿入物及び前記第２の核酸挿入物の組み合わせたサイズが１００ｋｂ～５００ｋｂであり、
前記第１のＬＴＶＥＣの前記第１の３’ホモロジーアームが、前記第２のＬＴＶＥＣの前記第２の５’ホモロジーアームとの第１の重複配列を有し、前記第１のＬＴＶＥＣの前記第１の５’ホモロジーアーム及び前記第２のＬＴＶＥＣの前記第２の３’ホモロジーアームが、前記標的ゲノム遺伝子座内の対応するゲノムセグメントに相同であり、
前記第１の重複配列が、少なくとも１ｋｂであり、
前記標的ゲノム遺伝子座が、前記対応するゲノムセグメント間の前記第１の核酸挿入物及び前記第２の核酸挿入物の組み込みによって修飾される、導入することと、

（ｃ）前記標的ゲノム遺伝子座に組み込まれた前記第１の核酸挿入物及び前記第２の核酸挿入物を含む標的化されたマウスＥＳ細胞を選択することと、を含む、方法。

【請求項２】

前記第１のＬＴＶＥＣと前記第２のＬＴＶＥＣが、前記標的ゲノム遺伝子座内への前記第１の核酸挿入物及び前記第２の核酸挿入物の組み込みによって再形成される、連続核酸の重複断片を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記第１の核酸挿入物及び／又は前記第２の核酸挿入物がゲノムＤＮＡを含み、

任意選択的に、前記第１の核酸挿入物及び／又は前記第２の核酸挿入物が、条件付き対立遺伝子、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド、レポーター遺伝子、１つ以上の発現カセット、又は部位特異的組み換え標的配列が隣接した核酸を含み、

任意選択的に、前記ゲノムＤＮＡが、前記標的ゲノム遺伝子座における欠失のために標的化される配列に相同であるか、又はオルソロガスであり、

任意選択的に、前記第１の核酸挿入物及び前記第２の核酸挿入物の挿入が相同又はオルソロガスヒト核酸配列での非ヒト核酸配列の置き換えをもたらす、

請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】

（Ｉ）前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、若しくは両方が前記マウスＥＳ細胞の種とは異なる種由来であり、及び／又は

（ＩＩ）前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、若しくは両方がヒト核酸である、

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の核酸挿入物、及び前記第２の核酸挿入物の組み合わせたサイズが２００ｋｂ～５００ｋｂであり、任意選択的に、前記第１の核酸挿入物、及び前記第２の核酸挿入物の組み合わせたサイズが３００ｋｂである、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６】

（Ｉ）前記第１のＬＴＶＥＣの前記第１の３’ホモロジーアームが、前記第２のＬＴＶＥＣの前記第２の５’ホモロジーアームと同一であり、及び／又は

（ＩＩ）前記第１の重複配列の前記サイズが１ｋｂ～７０ｋｂであり、及び／又は

（ＩＩＩ）前記第１の重複配列の前記サイズが１０ｋｂ～３００ｋｂであり、任意選択的に、前記第１の重複配列の前記サイズが２０ｋｂ～３００ｋｂである、

請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７】

前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、又は両方の前記標的ゲノム遺伝子座への組み込みが、

（Ｉ）前記標的ゲノム遺伝子座における外因性配列の付加、

（ＩＩ）前記標的ゲノム遺伝子座における内因性配列の欠失であって、任意選択的に、前記欠失が５ｋｂ～１０ｋｂ、１０ｋｂ～２０ｋｂ、２０ｋｂ～４０ｋｂ、４０ｋｂ～６０ｋｂ、６０ｋｂ～８０ｋｂ、８０ｋｂ～１００ｋｂ、１００ｋｂ～１５０ｋｂ、１５０ｋｂ～２００ｋｂ、２００ｋｂ～３００ｋｂ、３００ｋｂ～４００ｋｂ、４００ｋｂ～５００ｋｂ、５００ｋｂ～６００ｋｂ、６００ｋｂ～７００ｋｂ、又は７００ｋｂ～８００ｋｂである、欠失及び

（ＩＩＩ）ノックイン、ノックアウト、点変異、ドメインスワップ、エクソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ、又はこれらの組み合わせ、のうちの１つ以上をもたらす、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

（Ｉ）前記第１のＬＴＶＥＣ又は前記第２のＬＴＶＥＣの前記５’及び前記３’ホモロジーアームの合計が１０ｋｂ～２０ｋｂ、２０ｋｂ～４０ｋｂ、４０ｋｂ～６０ｋｂ、６０ｋｂ～８０ｋｂ、８０ｋｂ～１００ｋｂ、１００ｋｂ～１２０ｋｂ、又は１２０ｋｂ～

１５０ｋｂであり、及び／又は
（ＩＩ）前記第１のＬＴＶＥＣが５０ｋｂ～３００ｋｂであり、かつ前記第２のＬＴＶＥＣが５０ｋｂ～３００ｋｂであり、任意選択的に、前記第１のＬＴＶＥＣが１００ｋｂ～３００ｋｂであり、かつ前記第２のＬＴＶＥＣが１００ｋｂ～３００ｋｂである、
請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
インビトロでマウス胚性幹（ＥＳ）細胞中の標的ゲノム遺伝子座を修飾するための方法であって、
（ａ）前記標的ゲノム遺伝子座内で一本鎖又は二本鎖切断を行うヌクレアーゼ剤または前記ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドを、前記マウスＥＳ細胞に導入することであって、前記ヌクレアーゼ剤が、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質とガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、又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、導入することと、
（ｂ）長さが少なくとも１０ｋｂであり、第１の５’ホモロジーアーム及び第１の３’ホモロジーアームが隣接した第１の核酸挿入物を含む、第１の大型標的化ベクター（ＬＴＶＥＣ）と、長さが少なくとも１０ｋｂであり、第２の５’ホモロジーアーム及び第２の３’ホモロジーアームが隣接した第２の核酸挿入物を含む、第２のＬＴＶＥＣと、長さが少なくとも１０ｋｂであり、第３の５’ホモロジーアーム及び第３の３’ホモロジーアームが隣接した第３の核酸挿入物を含む、第３のＬＴＶＥＣとを、前記マウスＥＳ細胞に導入することであって、
前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物及び前記第３の核酸挿入物の組み合わせたサイズが１００ｋｂ～７００ｋｂであり、
前記第１のＬＴＶＥＣの前記第１の３’ホモロジーアームが、前記第２のＬＴＶＥＣの前記第２の５’ホモロジーアームとの第１の重複配列を有し、前記第２のＬＴＶＥＣの前記第２の３’ホモロジーアームが、前記第３のＬＴＶＥＣの前記第３の５’ホモロジーアームとの第２の重複配列を有し、前記第１のＬＴＶＥＣの前記第１の５’ホモロジーアーム及び前記第３のＬＴＶＥＣの前記第３の３’ホモロジーアームが、前記標的ゲノム遺伝子座内の対応するゲノムセグメントに相同であり、
前記第１の重複配列が、少なくとも１ｋｂであり、前記第２の重複配列が、少なくとも１ｋｂであり、
前記標的ゲノム遺伝子座が、前記対応するゲノムセグメント間の前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、及び前記第３の核酸挿入物の組み込みによって修飾される、導入することと、
（ｃ）前記標的ゲノム遺伝子座に組み込まれた前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、及び前記第３の核酸挿入物を含む標的化されたマウスＥＳ細胞を選択することと、を含む、方法。
【請求項１０】
前記第１のＬＴＶＥＣ、前記第２のＬＴＶＥＣ、及び前記第３のＬＴＶＥＣが、前記標的ゲノム遺伝子座内への前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、及び前記第３の核酸挿入物の組み込みによって再形成される、連続核酸の重複断片を含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記第１の核酸挿入物及び／又は前記第２の核酸挿入物及び／又は前記第３の核酸挿入物がゲノムＤＮＡを含み、
任意選択的に、前記第１の核酸挿入物及び／又は前記第２の核酸挿入物及び／又は前記第３の核酸挿入物が、条件付き対立遺伝子、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド、レポーター遺伝子、１つ以上の発現カセット、又は部位特異的組み換え標的配列が隣接した核酸を含み、
任意選択的に、前記ゲノムＤＮＡが、前記標的ゲノム遺伝子座における欠失のために標

的化される配列に相同であるか、又はオルソロガスであり、
　任意選択的に、前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物及び前記第３の核酸挿入物の挿入が相同又はオルソロガスヒト核酸配列での非ヒト核酸配列の置き換えをもたらす、
請求項９または１０に記載の方法。
【請求項１２】
　（Ｉ）前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、及び前記第３の核酸挿入物のうちの１つ以上が前記マウスＥＳ細胞の種とは異なる種由来であり、及び／又は
　（ＩＩ）前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、及び前記第３の核酸挿入物のうちの１つ以上がヒト核酸である、
請求項９～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
　前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、及び前記第３の核酸挿入物の組み合わせたサイズが２００ｋｂ～７００ｋｂであり、任意選択的に、前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、及び前記第３の核酸挿入物の組み合わせたサイズが４００ｋｂである、請求項９～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
　（Ｉ）前記第１のＬＴＶＥＣの前記第１の３’ホモロジーアームが、前記第２のＬＴＶＥＣの前記第２の５’ホモロジーアームと同一であり、かつ／若しくは前記第２のＬＴＶＥＣの前記第２の３’ホモロジーアームが前記第３のＬＴＶＥＣの前記第３の５’ホモロジーアームと同一であり、及び／又は
　（ＩＩ）前記第１の重複配列の前記サイズが１ｋｂ～７０ｋｂであり、かつ／若しくは前記第２の重複配列の前記サイズが１ｋｂ～７０ｋｂであり、及び／又は
　（ＩＩＩ）前記第１の重複配列の前記サイズが１０ｋｂ～３００ｋｂであり、かつ／若しくは、前記第２の重複配列の前記サイズが１０ｋｂ～３００ｋｂであり、任意選択的に、前記第１の重複配列の前記サイズが２０ｋｂ～３００ｋｂであり、かつ／若しくは、前記第２の重複配列の前記サイズが２０ｋｂ～３００ｋｂである、
請求項９～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
　前記標的ゲノム遺伝子座への前記第１の核酸挿入物、前記第２の核酸挿入物、及び前記第３の核酸挿入物のうちの１つ以上の組み込みが、
　（Ｉ）前記標的ゲノム遺伝子座における外因性配列の付加、
　（ＩＩ）前記標的ゲノム遺伝子座における内因性配列の欠失であって、任意選択的に、前記欠失が５ｋｂ～１０ｋｂ、１０ｋｂ～２０ｋｂ、２０ｋｂ～４０ｋｂ、４０ｋｂ～６０ｋｂ、６０ｋｂ～８０ｋｂ、８０ｋｂ～１００ｋｂ、１００ｋｂ～１５０ｋｂ、１５０ｋｂ～２００ｋｂ、２００ｋｂ～３００ｋｂ、３００ｋｂ～４００ｋｂ、４００ｋｂ～５００ｋｂ、５００ｋｂ～６００ｋｂ、６００ｋｂ～７００ｋｂ、又は７００ｋｂ～８００ｋｂである、欠失あるいは、
　（ＩＩＩ）ノックイン、ノックアウト、点変異、ドメインスワップ、エクソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ、又はこれらの組み合わせ、のうちの１つ以上をもたらす、請求項９～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
　（Ｉ）前記第１のＬＴＶＥＣ、前記第２のＬＴＶＥＣ、又は前記第３のＬＴＶＥＣの前記５’及び前記３’ホモロジーアームの合計が１０ｋｂ～２０ｋｂ、２０ｋｂ～４０ｋｂ、４０ｋｂ～６０ｋｂ、６０ｋｂ～８０ｋｂ、８０ｋｂ～１００ｋｂ、１００ｋｂ～１２０ｋｂ、又は１２０ｋｂ～１５０ｋｂであり、及び／又は
　（ＩＩ）前記第１のＬＴＶＥＣが５０ｋｂ～３００ｋｂであり、前記第２のＬＴＶＥＣが５０ｋｂ～３００ｋｂであり、かつ前記第３のＬＴＶＥＣが５０ｋｂ～３００ｋｂであり、任意選択的に、前記第１のＬＴＶＥＣが１００ｋｂ～３００ｋｂであり、前記第２のＬＴＶＥＣが１００ｋｂ～３００ｋｂであり、かつ前記第３のＬＴＶＥＣが１００ｋｂ～

３００ｋｂである、
請求項９～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記ヌクレアーゼ剤が、ＺＦＮ、又はＴＡＬＥＮである、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記ヌクレアーゼ剤が、Ｃａｓタンパク質と、ｇＲＮＡとであり、前記Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９である、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
マウス宿主胚に前記マウスＥＳ細胞を導入することをさらに含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
マウス代理母において前記マウス宿主胚を懐胎させることをさらに含み、前記マウス代理母が前記修飾された標的ゲノム遺伝子座を含むＦ０世代マウスを生産する、請求項１９に記載の方法。