

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-507228

(P2016-507228A)

(43) 公表日 平成28年3月10日(2016.3.10)

(51) Int.Cl.

A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

F 1

A01K 67/027
C12N 15/00
C12N 5/10

Z N A

A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2015-552881 (P2015-552881)
(86) (22) 出願日 平成26年1月14日 (2014.1.14)
(85) 翻訳文提出日 平成27年8月24日 (2015.8.24)
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/011418
(87) 国際公開番号 WO2014/110552
(87) 国際公開日 平成26年7月17日 (2014.7.17)
(31) 優先権主張番号 61/752,232
(32) 優先日 平成25年1月14日 (2013.1.14)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 61/870,570
(32) 優先日 平成25年8月27日 (2013.8.27)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 513214088
リコンビネティクス・インコーポレイテッド
RE COMBINE TICS, INC.
アメリカ合衆国55114ミネソタ州セン
ト・ポール、ユニバーシティ・アベニュー
・ウエスト1246番、スウィート301
(74) 代理人 100081422
弁理士 田中 光雄
(74) 代理人 100084146
弁理士 山崎 宏
(74) 代理人 100122301
弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】無角家畜

(57) 【要約】

無角対立遺伝子を有する家畜を作製するための組成物および方法が提供されており、他の遺伝子または染色体部分を変化させることなく無角対立遺伝子をウシ種に移入することが含まれる。動物は角を持たないように遺伝子改変され得る。1つのこのようなプロセスは、ウシ無角対立遺伝子の遺伝子移入を含む。従って、家畜品種は、家畜の他の形質を変化させることなく無角対立遺伝子を受け入れるように作製される。本発明の実施形態は、有角対立遺伝子から無角対立遺伝子へのゲノム改変を含む、遺伝子改変家畜動物である。

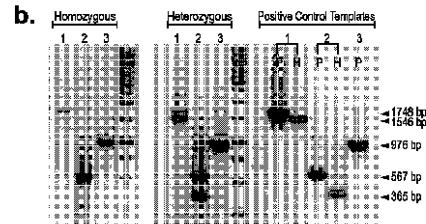
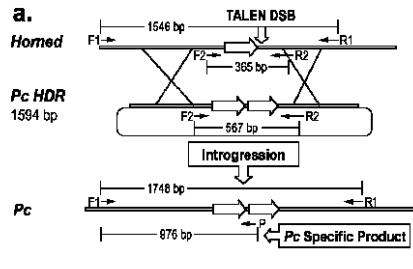


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有角対立遺伝子から無角対立遺伝子へのゲノム改変を含む、遺伝子改変家畜動物。

【請求項 2】

前記動物が前記有角対立遺伝子を有する第1の動物品種であり、前記無角対立遺伝子が第2の動物品種において見出される、請求項1に記載の動物。

【請求項 3】

前記無角対立遺伝子が、天然対立遺伝子および合成対立遺伝子からなる群から選択される、請求項1または2に記載の動物。

【請求項 4】

前記天然対立遺伝子が前記品種に特有であるか、または前記品種の突然変異対立遺伝子である、請求項3に記載の動物。

【請求項 5】

前記第1の品種が、ヘレフォード、アンガス、ショートホーン、シャロレー、リムザン、シンメンタール、ブラーマン、ブランガス、和牛、およびサンタ・ガートルーディス、エアシャー、ブラウン・スイス、カナディアンヌ、ダッチ・ベルテッド、ガーンジー、ホルスタイン（ホルスタイン・フリーシアン）、ジャージー、ケリー、ミルキング・デボン、ミルキング・ショートホーン、ノルウェージャン・レッド、ブサ、カナディアンヌ、エストニアン・レッド、フレックフー、フリーイアン、ジロランド、イラワラ、アイリッシュ・モイルド、ラインバッック、ムーズ・ライン・イッセル、モンベリアルド、ノルマンド、ランドール、サヒワール、オーストラリアン・ミルキング・ゼブ、シンメンタール、キアニーナ・マルキジーナ、ロマニヨーラからなる群から選択される、請求項1～4のいずれかに記載の動物。

【請求項 6】

前記第2の品種が、アンガス、レッド・アンガス、レッド・ポール、ギャロウェイ、ベルテッド・ギャロウェイ、アメリカン・ホワイト・パーク、ブリティッシュ・ホワイト、アメリカン・ブックス、ジャマイカ・ブラック、ジャマイカ・レッド、マレー・グレイ、ブランガス、レッド・ブランガス、セノポール、ボア・ヤギからなる群から選択される、請求項1～5のいずれかに記載の動物。

【請求項 7】

前記無角対立遺伝子が、 P_c ケルト起源および P_f フリーシアン起源からなる群から選択される、請求項1～6のいずれかに記載の動物。

【請求項 8】

ファウンダー動物またはファウンダー動物の子孫である、請求項1～7のいずれかに記載の動物。

【請求項 9】

マーカーを含まない、および/またはレポーターを含まない、請求項1～8のいずれかに記載の動物。

【請求項 10】

前記ゲノム改変が前記無角対立遺伝子においてのみ成されている、請求項1～9のいずれかに記載の動物。

【請求項 11】

前記遺伝子改変生物が、ウシ、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄類からなる群から選択される、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

請求項1～11のいずれかに記載の動物または前記動物の子孫の、家畜としての使用。

【請求項 13】

細胞の有角対立遺伝子に対するゲノム改変を含むインビトロ細胞。

【請求項 14】

前記有角遺伝子座における前記改変が、前記有角対立遺伝子から無角対立遺伝子への改

10

20

30

40

50

変である、請求項 1 3 に記載の細胞。

【請求項 1 5】

前記細胞が家畜細胞である、請求項 1 3 または 1 4 に記載の細胞。

【請求項 1 6】

前記細胞がウシ、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄類からなる群から選択される、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 1 7】

前記細胞が、ヘレフォード、アンガス、ショートホーン、シャロレー、リムザン、シンメンタール、ブラーマン、ブランガス、和牛、およびサンタ・ガートルーディス、エアシヤー、ブラウン・スイス、カナディアンヌ、ダッチ・ベルテッド、ガーンジー、ホルスタイン（ホルスタイン・フリーシアン）、ジャージー、ケリー、ミルкиング・デボン、ミルкиング・ショートホーン、ノルウェージャン・レッド、ブサ、カナディアンヌ、エストニア・レッド、フレックフィー、フリーイアン、ジロランド、イラワラ、アイリッシュ・モイルド、ラインバッカ、ムーズ・ライン・イッセル、モンベリアルド、ノルマンド、ランドール、サヒワール、オーストラリアン・ミルкиング・ゼブ、シンメンタール、キアニーナ・マルキジャーナ、およびロマニヨーラからなる群から選択される家畜細胞である、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれかに記載の細胞。

10

【請求項 1 8】

前記細胞が、初代細胞、初代体細胞、または接合体である、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれかに記載の細胞。

20

【請求項 1 9】

家畜の幹細胞または始原生殖細胞である、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 2 0】

前記細胞が前記改変を受ける場合、無角対立遺伝子をコードする相同性依存型組換え錆型を含む、請求項 1 3 ~ 1 9 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 2 1】

前記細胞の前記有角対立遺伝子において染色体 DNA を切断するために、部位特異的エンドヌクレアーゼをさらに含む、請求項 2 0 に記載の細胞。

【請求項 2 2】

動物をクローニングするための、請求項 1 2 ~ 2 1 のいずれかに記載の細胞の使用。

30

【請求項 2 3】

無角対立遺伝子をコードし、天然有角対立遺伝子と重複する配列を含む、単離核酸。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の単離核酸を発現させるためのプラスミド。

【請求項 2 5】

遺伝子改変された家畜生物の作製方法であって、家畜初代細胞、家畜初代体細胞、家畜幹細胞、家畜始原生殖細胞、家畜接合体、家畜胚盤胞、または家畜胚の天然有角対立遺伝子を変更することを含み、前記有角対立遺伝子が無角対立遺伝子に変更される、方法。

【請求項 2 6】

前記家畜がウシ、ヤギ、およびヒツジからなる群から選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

40

【請求項 2 7】

前記家畜初代細胞、家畜初代体細胞、家畜幹細胞、家畜始原生殖細胞、家畜接合体、家畜胚盤胞、または家畜胚の天然有角対立遺伝子に、

a. 前記天然有角対立遺伝子内の部位を特異的に切断する部位特異的ヌクレアーゼをコードする核酸と、

b. 前記無角対立遺伝子を含む核酸相同性依存型組換え錆型とを導入することを含む、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 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（ZFN）、転写活性

50

化因子様エフェクタースクレアーゼ (T A L E N) および規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列 (C R I S P R) からなる群から選択される、請求項 25～27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

前記初代体細胞が変更される、請求項 25～28 のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

前記胚が変更される、請求項 25～28 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

前記接合体、胚盤胞、または胚を妊娠母動物に移植することをさらに含む、請求項 25～28 または 30 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 32】

前記初代細胞、初代体細胞、または接合体をクローニングして動物全体を作製することをさらに含む、請求項 25～29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

請求項 25～32 のいずれかに記載の方法によって作製された家畜動物。

【請求項 34】

無角表現型を有する家畜ファウンダー動物を作製するための、請求項 25～32 のいずれかに記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2013年1月14日に出願された米国仮特許出願第 61/752,232 号明細書および2013年8月27日に出願された米国仮特許出願第 61/870,570 号明細書（これらはそれぞれ参照によって本明細書中に援用される）に対する優先権を主張する。

【0002】

政府支援の陳述

本明細書に記載される研究の態様は、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) からの助成金 1R43RR033149-01A および USDA (米国国立食品・農業研究所 (National Institute of Food and Agriculture)) からのバイオテクノロジー・リスク・アセスメント・プログラム (Biotechnology Risk Assessment Program) 競争的助成金番号 2012-33522-19766 による支援を受けた。米国政府は、これらの発明において一定の権利を有し得る。

30

【0003】

技術分野は、角を持たない細胞または動物などの遺伝子改変された生物に関連する。

【背景技術】

【0004】

家畜の角は、動物の飼育をより容易にするために様々な種において除去される。これらの角を除去するためにいくつかのアプローチがある。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

動物は、角を有さないように遺伝子改変され得る。1つのこのようなプロセスは、ウシ無角 (polled) 対立遺伝子の遺伝子移入を含む。従って、家畜品種は、家畜の他の形質を変化させることなく無角対立遺伝子を受け入れるように作製される。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の実施形態は、有角 (horned) 対立遺伝子から無角対立遺伝子へのゲノム

50

改变を含む遺伝子改变家畜動物である。これらは有角対立遺伝子を有する第1の動物品種であることができ、無角対立遺伝子は第2の動物品種において見出される。無角対立遺伝子は天然でも合成でもよい。

【0007】

本発明の実施形態は、細胞の有角対立遺伝子に対するゲノム改变を含むインビトロ細胞である。有角対立遺伝子（有角遺伝子座）における改变は、有角対立遺伝子から無角対立遺伝子への改变である。細胞は、家畜細胞であり得る。

【0008】

本発明の実施形態は遺伝子改变された家畜生物の作製方法であって、家畜初代細胞、家畜初代体細胞、家畜幹細胞、家畜始原生殖細胞、家畜接合体、家畜胚盤胞、または家畜胚の天然有角対立遺伝子を変更することを含み、有角対立遺伝子は無角対立遺伝子に変更される。

10

【0009】

実施形態には、レポーター遺伝子を用いずに細胞をホーミングエンドヌクレアーゼ（部位特異的エンドヌクレアーゼ）にさらすことと、クローン細胞のコロニーを形成することと、コロニーのメンバーのサブセットを試験して、標的染色体部位で改变を取り込んだコロニーを同定することとを含む、上記の方法のいずれかが含まれる。

【0010】

さらなる実施形態は、これらの方法の1つまたは複数に従って作製された生物（遺伝子改变動物、遺伝子改变ファウンダー（founder）動物、または遺伝子改变細胞）に関する。実施形態には、これらの技術に関するプラスミド、ベクター、および単離核酸、例えば、部位特異的エンドヌクレアーゼおよびHDR鑄型ならびにこれらの発現のためのベクターが含まれる。

20

【0011】

本発明の実施形態には、家畜動物を作製するための改变細胞の使用が含まれる。クローニングは、動物を作製するための1つの技術である。

【0012】

実施形態には、改变動物またはその子孫の家畜としての使用が含まれる。細胞または動物を作製するための方法は、無角表現型を有する家畜ファウンダー動物を作製するためのものであり得る。

30

【0013】

以下の特許出願は全ての目的のために参照によって本明細書に援用され、矛盾する場合には本明細書が支配する：米国特許出願公開第2010/0146655号明細書、米国特許出願公開第2010/0105140号明細書、米国特許出願公開第2011/0059160号明細書、米国特許出願公開第2011/0197290号明細書、2月24日に出願された米国特許出願第13/404,662号明細書、2011年2月25日に出願された米国特許出願第61/446,651号明細書、2012年6月21日に出願された米国特許出願第61/662,767号明細書、および2012年8月24日に出願された米国特許出願第13/594,694号明細書。これらの特許出願のそれぞれは、全ての目的のために参照によって本明細書に援用される。

40

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】パネルa）は、ウシ有角／無角遺伝子座の概略図である。TALENは、矢じりで示される有角変異体を切斷するように設計した。パネルb）は、4つのTALENのセンス鎖配列である。パネルc）は、各TALENペアをコードするmRNAによるトランスフェクションの3日後の有角ホルスタイン線維芽細胞のサーベイラー（Surveyor）アッセイである。TALEN IDおよびトランスフェクション後のインキュベーション温度は、ゲルの上側に示される。配列識別子は以下の通りである：HP1.1 leftおよびright（配列番号1および2）、HP1.2 leftおよびright（配列番号3および4）、HP1.3 leftおよびright（配列番号5および6）

50

)、H P 1 . 4 l e f t および r i g h t (配列番号7および8)。

【図2】TALEN媒介によるPOLE Dの遺伝子移入。パネルa)は、無角対立遺伝子をホルスタイン(HORNED)細胞へ遺伝子移入するための戦略の概略図である。POLE D対立遺伝子(一番下)は、10bp欠失を有する212bpのタンデム反復(赤色矢印)である(図示せず)。POLE D HDRプラスミドを用いた相同組換えによって修復され得るHORNED対立遺伝子(緑色の鉛直矢印)を特異的に標的にするようにTALENを開発した。パネルb)は、POLE Dのホモ接合型またはヘテロ接合型遺伝子移入を有するコロニーの代表的な画像である。候補コロニーの陽性分類のために3つのプライマーセットを使用した: F1+R1、F2+R2およびF1+P(POLE D特異的)。PCR産物の同一性は、F1+R1アンプリコンの配列決定によって確認した。

【図3】単離したコロニーの無角変換の例である。個々のコロニーは、図2に記載される細胞集団から増殖させた。図2に記載されるPCR法によって各コロニーを分析した。クローン3は、無角対立遺伝子へのヘテロ接合型変換を示す389および591bpの両方の産物を有する(矢印)。使用した修復鋳型は長さ591の残基であった。

【図4】パネルa)は、有角対立遺伝子を無角対立遺伝子へ変換するための概略図である。HP1.3TALENおよび短い修復鋳型が有角細胞に導入される。修復鋳型を無角アンガス(Angus)ゲノムDNAからPCRにより作製した; 相同性の長さが示される。パネルb)は、2μgのTALEN mRNA + Gal4:RecAで被覆された500ngのssDNAによりトランسفェクトされた有角ホルスタイン線維芽細胞における無角変換のPCR評価である。各レーン/PCR反応は、トランسفェクトされた集団から希釈された約3細胞当量からなる。有角細胞からのプライマー-btHP-F1およびbtHP-R1を用いるPCRの結果、389bpの産物が得られる。無角への変換は202塩基対の正味の挿入をもたらし、従って、同じプライマーのPCR産物は、591bp産物をもたらす(左側余白の矢印)。無角変換を示す産物を有する反応の数は右上の角に示される。パネルc)は、2ugのTALEN mRNA + 1, 500ngのssDNAによりトランسفェクトされた有角ホルスタイン線維芽細胞における無角変換のPCR評価である。無角変換を示す産物を有する反応の数は右上の角に示される。

【図5】ブタAPCにおけるTALENおよびCRISPR/Cas9媒介のHDRの比較である。パネルa)では、APC14.2TALEN(配列番号9および10)およびgRNA配列APC14.2G1a(配列番号12)が野生型APC配列(配列番号11)に対して示される。下側には、新規の Hind III 部位をもたらす4bpの挿入を送達するHDR oligo(配列番号13)が示される。次に、2μMのoligo-HDR鋳型と、1μgのTALEN mRNA、hCas9をコードする1μgの各プラスミドDNA、およびgRNA発現プラスミドか、あるいはhCas9をコードする1μgのmRNAおよび0.5μgのgRNA発現プラスミドのいずれかとによってトランسفェクトされたブタ線維芽細胞を分割し、30または37のいずれかで3日間培養し、その後37で10日目まで増殖させた。パネルb)は、RFLPおよびサーベイヤーアッセイ結果を示すチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

詳細な説明

本明細書において報告されるように、遺伝子操作を用いて無角家畜動物が作製された。通常は角を有するが、自然突然変異のために角を有さない動物は、無角動物と呼ばれる。酪農場経営者および牛の快適な生活を守るために、米国、ヨーロッパ、およびその他の地域において、日常的に手作業で乳牛の大部分から角が除去される。除角は痛みを伴い、動物のストレスの一時的な上昇を引き起こし、動物生産に追加費用がかかり、その後の傷害から動物を保護する意図にもかかわらずその実施を残酷であると見なす人もいる。いくつかの肉牛品種は天然に無角であり(例えば、アンガス)、POLE Dと呼ばれる優性の形質である。本明細書に記載される技術は、除角を受ける必要がない動物を提供すること

10

20

30

40

50

によって、動物の幸せ (well-being) を向上させる。無角性を付与する2つの対立遺伝子変異体が染色体1において最近同定された。これらの突然変異のいずれかを有する乳牛は稀であり、一般に、酪農遺伝子選択指数 (dairy genetic selection indices) においてその有角対応物よりもはるかに低いランクである。P O L L E D 対立遺伝子の有角品種への減数分裂遺伝子移入は従来の交雑によって達成することができるが、交雑動物の遺伝的メリットは、生産性を回復するために多数の長期にわたる世代の選択的繁殖を経験および必要とするであろう。

【0016】

遺伝学者は、数十年間、無角性の遺伝子座を探してきた。手短に言うと、無角性は20年間、熱心な現代の研究の目的であった。A l l a i s - B o n n e t et al. (2013) 「ウシ無角表現型および角の個体発生についての新規の洞察 (Novel Insights into the Bovine Polled Phenotype and Horn Ontogenesis)」, B o v i d a e . P L o S O N E 8 (5) : e 6 3 5 1 2 を参照されたい。

無角突然変異は多数の品種のウシ染色体1に迅速にマッピングされたが、無角性の遺伝的原因の実際の部位は、種々の理由からなかなか見つけられなかった。しかしながらごく最近、少なくとも2つの無角対立遺伝子 (1つは「ケルト (Celtic)」であり、1つは「フリーシアン (Friesian)」である) が存在することが示され、これらのそれぞれについて候補突然変異が提示された。M e d u g o r a c et al. (2012) 「ウシ無角性 - 対立遺伝子異質性を有する常染色体優性形質 (Bovine polledness - an autosomal dominant trait with allelic heterogeneity)」, P L o S O n e 7 : e 3 9 4 7 7 。これらの突然変異はどれも、既知のコーディングまたは調節領域に位置しなかった。本明細書において、本発明者らは、非無角 (有角) 動物の同等の部位において遺伝子変化を起こすことにより、無角表現型を生じさせることができることを示す。

【0017】

しかしながら、動物において無角性を作り出すこと、および動物のゲノムを妨害することなくそれを行なうことが可能である。ケルト P O L L E D 対立遺伝子 (P_c 対立遺伝子とも呼ばれる) の非減数分裂遺伝子移入 (10 b p を置換する212 b p の重複) は、有角乳用雄牛由来の線維芽細胞において達成した。ケルト P O L L E D 対立遺伝子を含む1594 b p 断片を含有するプラスミドH D R 鑄型をアンガス品種から採取した (図1パネルa)。T A L E N は、H O R N E D 対立遺伝子を切断するが P O L L E D 対立遺伝子には影響を与えないでおくように設計した。驚くことに、この実験は、m R N A として送達された一対のT A L E N が、プラスミド発現力セットと比べて同様の活性を有することを示した (データは示さず)。従って、T A L E N 発現プラスミドの可能性のあるゲノムの組込みを除外するためにm R N A としてT A L E N を送達する実験を実施した。226のうち5つのコロニー (2%) が、P O L L E D の遺伝子移入を確認するための図1のパネルbに示される各P C R 試験に合格した。5つのうち3つのクローンは P O L L E D 遺伝子移入に対してホモ接合型であり、対象とする対立遺伝子と100%同一であることを配列決定により確認した (データは示さず)。

【0018】

動物交配または人工生殖技術に基づく従来の繁殖プログラムは、望ましい形質を作り出しか、あるいは結合させる遺伝子の良好な組み合わせを最終的に生じることを願って、多数の遺伝子を混合することを含む。トランスジェニック技術は従来の繁殖プロセスを加速する見込みを与える。トランスジェニックプロセスのいくつかの欠点は、このプロセスが改善はあるものの、依然として遅く、コストがかかり、大きな労力を必要とすることである。低効率および結果の予測が不可能なことが通常である。さらに、対象とするゲノム部位にのみ変化を起こすプロセスはこれまで知られていない。

【0019】

本発明者らは、農業、研究手段、または生物医学的な目的のために有用である種々の家

10

20

30

40

50

畜細胞および／または動物において、様々な遺伝子の正確で高頻度の編集を開発した。これらの家畜遺伝子編集プロセスには、プラスミド、r A A V およびオリゴヌクレオチド鑄型を用いる、T A L E N および C R I S P R / C a s 9 により刺激される相同性指向修復 (homology-directed repair) (H D R) が含まれる。本発明者らは、本明細書において、ウシ P O L L E D 対立遺伝子を有角ホルスタイン線維芽細胞に遺伝子移入したことを示す。この実施例は、角を有さない種々の品種の乳牛を作製できることを実証する。この変化はまた、動物のゲノムの他の遺伝子または他の部分を妨害することなく行うことができる。これらのプロセスは、レポーターを用いずに、および／または選択マーカーを用いずに遺伝子変化を起こすことができるよう十分に高い効率を達成するために本発明者らによって開発された。さらに、本プロセスは、対象とする部位においてのみ対象とする変化を有する遺伝子改変動物を作製するためにファウンダー世代において使用することができる。これらの方法は、研究、農業および生物医学用途のために、家畜細胞、大型哺乳類、および家畜において、無角および有角対立遺伝子の非減数分裂の種内および種間遺伝子移入を実証する。

【0020】

図1には、ウシDNA内の適切な部位に結合して切断する部位特異的ヌクレアーゼを作製できるかどうかを決定するための実験が記載される。問題の1つは、分子間組換えの可能性が高いために、所望の結合部位で繰り返される配列がターゲティングを混乱させ得ることを踏まえて、タンデム反復を結合できるかどうかを決定することであった。さらに、これらの結合は培養中の生きた細胞において効率的であり、相互に協同しなければならない。有角対立遺伝子は、特に、無角対立遺伝子と有角対立遺伝子との高類似性のために難題である。T A L E N 結合部位の選択位置は明らかでなかった；成功したT A L E N の設計は、有角遺伝子座を切断および結合することができるが、T A L E N が無角対立遺伝子を切断することは許可しない。これらの設計の発見は、本発明の研究において重要な成果であった。このアプローチの成功は予測し得なかった。図1に示されるように、標的として選択される有角対立遺伝子は212残基を有し、無角対立遺伝子は、これらの212残基の反復を有した。無角対立遺伝子はさらに、反復の間に10塩基対 (b p) の欠失を有した。パネルa)は212b p配列を示し、left T A L E N (黒い逆三角形でマークされる)とright T A L E N (黒い三角形でマークされる)との間で、端部において欠失される10b pを有する。従って、T A L E Nペアは10b p欠失部位の縁部に配置された。T A L E Nペアは、10b p欠失領域において有角対立遺伝子を切断する。相同性依存型組換え (homologous dependent recombination) (H D R) 鑄型を用いて、T A L E N が結合している場所の間に、212残基反復 (10b p欠失を有する反復なので、実際には202残基) の挿入を導いた。パネルa)に示されるように、無角では、Left T A L E N および Right T A L E N は次に202残基によって分離される。また、無角対立遺伝子の再切断が低減される。結合および切断を適度に達成できるかどうかを決定するために、種々のT A L E Nを作製した。パネルb)の表は、試験したT A L E Nのいくつかを記載する。パネルc)は試験結果を示し、その有効性はN H E J %によって測定される。3番目のレーンのT A L E N、H P 1 . 3を続いて無角対立遺伝子の遺伝子移入のために使用した。

【0021】

部位特異的（標的化とも呼ばれる）エンドヌクレアーゼの再結合を低減するための実施形態には、外因性無角対立遺伝子を細胞の染色体DNAに遺伝子移入するための相同性指向修復 (H D R) の方法が含まれ、この方法は、標的化ヌクレアーゼ系、および外因性対立遺伝子を含むH D R 鑄型を細胞に導入することを含み、標的化ヌクレアーゼ系は、染色体DNAの内在性同族有角対立遺伝子配列と特異的に結合するためのDNA結合メンバーを含み、ここで、標的化ヌクレアーゼ系およびH D R 鑄型は、H D R 鑄型配列に対する同一性を有するため、および内在性対立遺伝子の代わりに外因性対立遺伝子を染色体DNAに遺伝子移入するために、染色体DNAを変更するように動作し、H D R 鑄型配列は、DNA結合メンバーのH D R 鑄型配列に対する特異的結合を低減するように設計される。

【0022】

図2は、有角対立遺伝子を有する細胞への無角対立遺伝子の遺伝子移入のための研究戦略および結果を示す。有角対立遺伝子はPCRプライマーF1およびR1間に1546bpを有する。この配列には、PCRプライマーF2およびR2間に365bpが存在する。矢印によって示される212bp配列を有する有角対立遺伝子はこの領域にある。POLLED対立遺伝子(一番下)は、10bpの欠失(図示せず)を有する212bpのタンデム反復(2つの矢印で示される)を有する。PCRプライマーF2およびR2間の長さは567bpである; 567bpは、有角対立遺伝子の365bpに、212bpの反復を加え、10bpの欠失を差し引いた値に等しい。HDR鑄型の長さは1594bpであった。鑄型配列が細胞の染色体に遺伝子移入されたら、プライマーF1およびR1間に1746bpが存在する; 1746は、有角対立遺伝子の1546bpに反復の212bpを加え、10bpの欠失を差し引いた値に等しい。さらに、無角対立遺伝子に特有のPCR産物は、タンデム反復領域においてPで示される。TALENは、HDR鑄型を用いて相同組換えにより修復され得るHORNED対立遺伝子(図1)を特異的に標的とするように開発された。TALENおよびHDR鑄型を受け入れた細胞を希釈し、単一の細胞としてプレーティングし、これを培養して、クローンコロニーにおいて複製させた。コロニーのメンバーを無角対立遺伝子について試験した。パネルbは、POLLEDがホモ接合型またはヘテロ接合型遺伝子移入されたコロニーの代表的な画像を示す。候補コロニーの陽性分類のために3つのプライマーセットを使用した: F1 + R1、F2 + R2およびF1 + P (POLLED特異的)。PCR産物の同一性は、F1 + R1アンブリコンの配列決定によって確認した。

10

20

30

【0023】

図3は、無角変換の一例である。異なるHDR鑄型を使用したことを除いて図1および2について記載されたものと同様にして、無角対立遺伝子を細胞に遺伝子移入した。鑄型は591bpの長さであった: 5'gtctggggtgagatagttttcttgtaggcgtgtgaaatgaagagatacgtggtagccaaactttctgagctcacgcacagctggacgtctgcgcgcctttcttgcataactgcagatgaaaaacatttatacagatgtttgcctaaatggattacatttaagatacatattttctttcttgcgtctgaaagtctttagtgagagcaggctggaaattatgtctggggtagatagtttcttgccttttagatcaaaaactctctttcattttaagtcataccaaaaagtgtagggaggtagtccttgcattgttgcatttttaggcag(配列番号14)。矢じりによって示されるように、12のうちの1つのコロニーは、無角対立遺伝子の遺伝子移入を実証するPCR産物を有した。

40

【0024】

図4は、無角対立遺伝子の細胞への遺伝子移入のための別のスキームを示す。325bpのHDR鑄型を使用した。遺伝子移入された対立遺伝子は、レッド・アンガス(RED Angus)無角であり、レシピエントは有角ホルスタイン線維芽細胞であった。鑄型は、29bpの上流重複部分および84bpの下流重複部分を有した。212bpの反復が重複部分の間にあった。反復を天然の212bp配列の10bpの欠失の置換として使用した。このプロセスは、TALENの熱変性(一本鎖)オリゴマーを使用したことについて、図1~3に記載されるものと同様であった。図4のパネルbおよびcに示されるように、2つの条件を試験した。パネルb)では、2μgのTALEN mRNA + Gal4: RecAでコートされた500ngのssDNAにより細胞をトランスフェクトした。各レーン/PCR反応は、トランスフェクトされた集団から希釈された約3細胞当量からなる。有角細胞からのプライマー-btHP-F1およびbtHP-R1を用いるPCRの結果、389bpの産物が得られる。無角への変換は202の塩基対の正味の挿入をもたらし、従って、同じプライマーのPCR産物は、591bp産物をもたらす(左側余白の矢印)。無角変換を示す産物を有する反応の数は右上の角に示される。パネルc)は、

50

2 μ gのTALEN mRNA + 1,500ngのssDNAによりトランスクレアーゼによってトランスクレアーゼされた有角ホルスタイン線維芽細胞における無角変換のPCR評価である。無角変換を示す産物を有する反応の数は右上の角に示される。

【0025】

図5は、CRISPR/Cas9による対立遺伝子の遺伝子移入を示す。この方法はTALEN法と比較される。遺伝子移入された対立遺伝子は大腸腺腫症(APC)であった。パネルa)において、APC14.2TALENおよびgRNA配列APC14.2G1aは野生型APC配列に対して示される。下側には、新規のHindIII部位をもたらす4bp挿入(囲まれた部分を参照)を送達するHDR oligoが示される。次に、2 μ Mのoligo HDR 鑄型と、1 μ gのTALEN mRNA、hCas9をコードする1 μ gの各プラスミドDNA、およびガイダンスRNA(gRNA)発現プラスミドか、あるいはhCas9をコードする1 μ gのmRNAおよび0.5 μ gのgRNA発現プラスミドのいずれかとによってトランスクレアーゼされたブタ線維芽細胞を分割し、30または37のいずれかで3日間培養し、その後37で10日目まで増殖させた。パネルb)において、チャートは、RFLPおよびサーベイアッセイ結果を示す。既に決定されたように、TALEN刺激HDRは30で最も効率的であったが、CRISPR/Cas9媒介によるHDRは37において最も効果的であった。この遺伝子座について、サーベイアッセイにより測定されるDNA切断頻度は同様であるにもかかわらず、TALENは、HDRの刺激のためにCRISPR/Cas9系よりも効果的であった。TALENとは対照的に、hCas9を、プラスミドに対してmRNAとして送達する場合、HDRの差異はほとんどなかった。

10

20

30

30

40

【0026】

本明細書の開示を鑑みて、TALENなどの部位特異的エンドヌクレアーゼによる無角動物の作製が教示される。遺伝子改変家畜を作製する際の障壁の1つは、動物細胞に改変を行う効率が従来の最良の実施でもわずか数パーセントであることである。低効率でも、遺伝子改変された下等動物(例えば、ミバエまたはマウスなど)の作製のためには有用であり得る、何故なら、これらの動物は短く多産な生殖サイクルを有し、改変が成功した少數の動物が存在するかどうかを決定するために数百の動物の作製、試験、および選別を提供するからである。しかしながら、従来通りに達成されるこれらの効率レベルは、遙かにより長い妊娠期間を有し、妊娠当たりの子孫の数が比較的少ない家畜偶蹄類には適さない。遺伝的手段を用いて家畜を改変する際の別の障壁は、初代細胞が不安定であるため、初代細胞におけるエンドヌクレアーゼ媒介のDNAの改変が困難なことである。実際、TALEN改変細胞の頻度は、濃縮または選択方法が存在しなければ時間とともに著しく低下する。特定の理論に束縛されないが、対象とされない部位におけるDNA切断は、アポトーシスの誘発または非標的遺伝子の無効化によって細胞の安定性を損ない得ると理論化される。初代細胞という用語は生きている動物から単離された細胞を意味し、この細胞は、組織から単離された後に0~2回の複製を経験している。結果として、遺伝子改変の成功のために形質転換細胞を作製および試験するために習慣的に使用される技術は、初代細胞においては、その老化傾向のために使用することができない。結果として、体細胞核移植または他の動物クローニング技術のために初代細胞を改変することを含む従来のアプローチを使用する場合、高い成功率を期待することは非現実的である。しかしながら、本明細書において報告されるように、TALENおよび他の部位特異的ヌクレアーゼ手段を使用して、遺伝子改変された家畜初代細胞が作製された。これらの改変は、クローニングまたは直接胚注入による遺伝子改変動物系統のファウンダーを作製するのに適する。

30

40

【0027】

本発明の実施形態は、部位特異的エンドヌクレアーゼを使用して、動物およびその子孫が角を有さないように、ウシ、水牛、偶蹄類、ヤギ、またはヒツジなどの家畜を遺伝子改変するための組成物および方法である。従来のプロセスを用いてこれらの動物を作製する際の問題の多くは上記で議論した。遺伝子改変は、例えば、挿入、欠失、外因性核酸断片の挿入またはそれに対する変化、反転、トランスクレアーション、種間対立遺伝子移動、種

50

内対立遺伝子移動、天然、合成、または新規の対立遺伝子への遺伝子変換からなるリストから選択され得る。例えば、染色体または染色体対における望まれない突然変異は正常な配列で置換され得る。一般に、標的DNA部位が同定され、その部位へ特異的に結合し得るTALENペアが作製される。TALENは、例えば、タンパク質、mRNAとして、またはTALENをコードするベクターによって、細胞または胚へ送達される。TALENは、DNAを切断して二重鎖切断を行い、これは次に修復され、その結果多くの場合、インデルが作製されるか、あるいは変更された配列による切断の修復のための鋳型として挿入されるか機能する、付随的な外因性核酸に含有される配列または多型が取り込まれる。外因性核酸という用語は、核酸が細胞中に天然に存在する核酸配列と同一であるかまたは異なるかにかかわらず、細胞または胚に付加される核酸を意味する。外因性配列は、配列が実際に染色体DNAに挿入される核酸であるかどうか、あるいは配列が細胞DNAを変化させるための鋳型として使用されるかどうかにかかわらず、標的細胞を変化させるために使用される配列を指す。核酸断片という用語は広義であり、染色体、発現カセット、遺伝子、DNA、RNA、mRNA、またはこれらの一部を含む。ssDNAという用語は、ss-オリゴヌクレオチドを含む。細胞または胚は、例えば、家畜、偶蹄類、ウシ、ブタ、ヒツジ、およびヤギからなる群から選択され得る。家畜という用語は、食物または生物材料の商品として飼育される飼養化動物を意味する。偶蹄類という用語は、各足に偶数の指、通常2本、または時には4本の指を有するウシ、シカ、ラクダ、カバ、ヒツジ、およびヤギを含む、偶蹄(Artiodactyla)目の有蹄哺乳類を意味する。

10

20

30

40

50

【0028】

一実施形態は、有角の代わりに無角である遺伝子改変家畜を作製する組成物または方法に関し、部位特異的ヌクレアーゼ（例えば、TALENペア）によって特異的に結合される部位において細胞または胚のDNAに遺伝子改変を行うTALENペアまたは他の部位特異的ヌクレアーゼ系を細胞または胚に導入することと、細胞から家畜動物を生産することとを含む。細胞または胚に対して、例えば、接合体、胚盤胞、または胚への直接注入が使用され得る。あるいは、部位特異的ヌクレアーゼ、HDR鋳型、および/または他の因子は、タンパク質、RNA、mRNA、DNA、またはベクターの導入のための多数の既知の技術のいずれかを用いて細胞に導入され得る。遺伝子改変動物は、既知のプロセス、例えば、妊娠宿主への胚の移植、または種々のクローニング方法に従って、胚または細胞から作製され得る。「TALENによって特異的に結合される部位における細胞のDNAに対する遺伝子改変」、または「標的染色体部位における」などという語句は、TALENがその標的部位に特異的に結合する際に、TALENのヌクレアーゼによって切断された部位で遺伝子改変が行われることを意味する。ヌクレアーゼはTALENペアが結合したところを正確に切断するのではなく、むしろ2つの結合部位の間の画定された部位で切断する。

【0029】

別のこのような実施形態は、有角対立遺伝子の代わりに無角対立遺伝子を作製するための組成物または細胞または胚の処理を含む。細胞または動物胚は、研究のため、または動物のクローニングのために使用され得る。細胞は、家畜、偶蹄類、ウシ、ヤギ、ヒツジの細胞、培養細胞、不死化細胞、初代細胞、初代体細胞、接合体、生殖細胞、始原生殖細胞、胚盤胞、または幹細胞であり得る。例えば、実施形態は、遺伝子改変を作製する組成物または方法であり、培養中の複数の初代細胞を、TALENまたはTALENをコードするTALENタンパク質または核酸にさらすことを含む。TALENは、タンパク質として、あるいは例えばベクター中のmRNAまたはDNA配列によってコードされる核酸断片として導入され得る。

【0030】

無角であるような動物の遺伝子改変は、レポーターを用いてまたは用いずに行うことができる。レポーターの回避は、後で除去する必要がないため、あるいは除去されない場合には許容的である必要がないために有用である。しかしながら、胚/細胞レベルの改変段階におけるレポーターの発現は、レポーターを発現しない細胞の排除を可能にする。ある

いは、レポーターを発現する細胞を、クローニングまたは他のトランスジェニック動物技術により動物で使用するために培養物から移動することを可能にするか、あるいはさらなる培養および／もしくは数の拡大のため、ならびに／またはさらなるベクターおよび／もしくは核酸および／もしくはT A L E Nの付加のため、ならびに／または他の遺伝子改変のために第2の培養物へ移動することを可能にする。対象とする遺伝子に依存しないレポーターの発現に基づいた細胞の選択は、ある種の共選択プロセスである。レポーターという用語は、本明細書で使用される場合、レポーターおよび選択マーカーを含む。選択マーカーという用語は、本明細書で使用される場合、正または負のいずれかの生存選択基準による単離を可能にする形質を付与する、遺伝子発現生体分子を指す。レポーターは、例えば、蛍光マーカー、例えば、緑色蛍光タンパク質および黄色蛍光タンパク質であり得る。レポーターは、選択マーカー、例えば、ピューロマイシン、ガンシクロビル、アデノシンデアミナーゼ(A D A)、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(n e o 、 G 4 1 8 、 A P H)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(D H F R)、ハイグロマイシン - B - ホスホトランスフェラーゼ、チミジンキナーゼ(T K)、またはキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(X G P R T)であり得る。他の表現型マーカーは動物を選択するために使用することができ、このようなマーカーは、識別可能な物理的形質(例えば、エピトープまたは色)、成長速度、および／または生存率に基づいている。遺伝子改変細胞、胚、または動物の作製プロセスは、ヌクレアーゼを取り込んだ系、例えば、C a s 9 またはT A L E Nにさらした細胞または胚をレポーターの発現についてアッセイすることと、遺伝子改変家畜および／または偶蹄類または他の動物(魚、ゼブラフィッシュ、イヌ、マウス、トリ、ニワトリ、ラットまたは実験動物)を作製するための方法または組成物においてその細胞または胚を使用することとを含む。例えば、初代細胞を細胞培養物から取り出し、クローニングのために使用することができる。あるいは、初代細胞を培養物から取り出し、クローン系統を作製するため、またはさらなるプロセスのために第2の培養物中に入れることができる。あるいは、レポーターを発現する胚または接合体は、代理雌親に移植するために使用されてもよいし、あるいはクローニングのために使用することもできるが、レポーターを発現しない他の胚または接合体はクローニングのために使用することができない。いくつかの実施形態では、レポーターは、マーカーを発現する細胞または胚を選択するために使用される選択マーカーである。

【 0 0 3 1 】

いくつかの家畜形質は、多型(大または小)、一塩基多型、欠失、挿入、または他の変異などの対立遺伝子に関連する。例えば、ベルジャン・ブルー(B e l g i a n B l u e)牛からのミオスタチン対立遺伝子(1 1 - b p 欠失)は筋肉肥大(d o u b l e - m u s c l i n g)表現型を引き起こすことがよく知られている。ベルジャン・ブルー対立遺伝子は正常な発達を妨害しない。

【 0 0 3 2 】

同様に、無角対立遺伝子のために、本明細書で教示される方法は、他の遺伝子を破壊することなく、および外因性遺伝子を取り込むことなく対立遺伝子を正確に配置する。無角対立遺伝子は角の非発生に関連するので、無角であるように改変された(直接注入またはクローニングによる)胚はうまく懐胎して、健康な動物の出生をもたらすことが期待される。細胞は有角対立遺伝子から無角対立遺伝子に改変されており、出願の時点で、これらの細胞から動物をクローニングして、生きて生まれる動物を生じさせるためのステップが行われている。

【 0 0 3 3 】

本発明の実施形態は、第1の家畜系統または品種から第2の家畜系統または品種への無角対立遺伝子の移植方法であり、第1の家畜系統／品種の無角対立遺伝子を含有する核酸の存在下、第2の家畜系統／品種の細胞または胚において一対のT A L E Nまたは部位特異的エンドヌクレアーゼによりD N Aを切断することを含む。胚または細胞を使用して、第1の系統／品種の無角対立遺伝子を有する第2の系統／品種の動物を作製することができる。対立遺伝子を含有するD N Aは、相同性依存型修復のための鋳型を提供する。鋳型

10

20

30

40

50

として、このDNAは切断の両側のDNAの部分に対して相同性を有し、所望の対立遺伝子も含有する。

【0034】

本発明の実施形態は、無角対立遺伝子を1つの品種から別の品種に移動させることを含む。例えば、対立遺伝子は、アンガス牛から他の牛に移動され得る。有角品種には、ヘレフォード(Hereford)、ショートホーン(Shorthorn)、シャロレー(Charolais)、リムザン(Limousin)、シンメンタール(Simmental)、ブラーマン(Brahman)、ブランガス(Brangus)、和牛(Wagyu)、およびサンタ・ガートルーディス(Santa Gertrudis)、エアシャー(Ayrshire)、ブラウン・スイス(Brown Swiss)、カナディアンヌ(Canadienne)、ダッチ・ベルテッド(Dutch Belted)、ガーンジー(Guernsey)、ホルスタイン(Holstein)(ホルスタイン-フリーザン(Holstein-Friesian))、ジャージー(Jersey)、ケリー(Kerry)、ミルキング・デボン(Milking Devon)、ミルキング・ショートホーン(Milking Shorthorn)、ノルウェージャン・レッド(Norwegian Red)、ブサ(Busa)、カナディアンヌ、エストニアント・レッド(Estonian Red)、フレックフィー(Fleckvieh)、フリーアン(Friean)、ジロランド(Girolando)、イラワラ(Illawarra)、アイリッシュ・モイルド(Irish Moiled)、ラインバック(Lineback)、ムーズ・ライン・イッセル(Meuse Rhine Isse)、モンベリアルド(Montbeliared)、ノルマンド(Normande)、ランドール(Randall)、サヒワール(Sahhiwal)、オーストラリアン・ミルキング・ゼブ(Australian Milking Zebu)、シンメンタール、キアニーナ・マルキジャーナ(Chianina Marchigiana)、ロマニヨーラ(Romagnola)が含まれる。上記リストの品種のいくつかは無角変異体も有するが、これらの系統は遺伝的性質が有角バージョンよりも劣っていることが多い。無角品種の例としては、アンガス、レッド・アンガス、レッド・ポール(Red Poll)、ギャロウェイ(Galloway)、ベルテッド・ギャロウェイ(Belted Galloway)、アメリカン・ホワイト・パーク(American White Park)、ブリティッシュ・ホワイト(British White)、アメリカックス(American Black)、ジャマイカ・ブラック(Jamaica Black)、ジャマイカ・レッド(Jamaica Red)、マレー・グレイ(Murray Grey)、ブランガス、レッド・ブランガス(Red Brangus)、セノポール(Senopoli)が挙げられる。本明細書において他で記載したように、部位特異的エンドヌクレアーゼ手段、例えばTALENはタンパク質として送達されてもよいし、核酸、例えばmRNAまたはベクターによってコードされてもよい。品種という用語は、均質な外観、挙動、および同じ種の他の動物または植物と区別する他の特徴を有する家畜または植物の群を意味する。特定の品種に属する動物は、当業者に知られている。

【0035】

対立遺伝子という用語は、遺伝子または遺伝子座の2つ以上の形態のうちの1つを意味する。生物の集団または種は、通常、種々の個体の間で各遺伝子座に多数の対立遺伝子を含む。遺伝子座における対立遺伝子の変異は、存在する対立遺伝子(多型)の数として、あるいは集団におけるヘテロ接合体の割合として測定可能である。天然対立遺伝子という用語は、本明細書で使用される場合、天然に見出される対立遺伝子を意味する。新規の対立遺伝子という用語は、非天然対立遺伝子を意味する。合成対立遺伝子という用語は、天然には見出されない対立遺伝子を意味する。外因性対立遺伝子は生物に導入されたものであり、内在性対立遺伝子は天然に細胞内にあるものであり、通常は、生物内でその野生型非変更状態で存在するものである。ヘテロ接合型である動物は2つの対立遺伝子を有する。場合によっては、外因性対立遺伝子を導入して、ヘテロ接合型動物内に既に存在する対立遺伝子にホモ接合型の動物を作製することが望ましい。対立遺伝子の種間移動は動物の

10

20

30

40

50

1つの種から別の種への移動を意味し、種内移動は同種の動物間の移動を意味する。

【0036】

無角のための2つのウシ対立遺伝子は、ウシの染色体1において同定されている（M e d u g o r a c , 2012）。P_c、ケルト起源（212bp、1,705,834-1,706,045bp）は重複される（および、10bp（1,706,051-1,706,060bp）の配列を置換する）。この対立遺伝子を有するいくつかの品種には、アンガス、ギャロウェイ、フレックフィー（Fleckvieh）、ゲルプフィー（Gelbvieh）およびムルナウ・ヴェルデンフェルザー（Murnau-Werdenfelser）が含まれる。第2の無角対立遺伝子P_fはフリーシアン起源を有し、以下のP5ID（7bpの置換（TTCTCAGAATAG（配列番号26）によるCGCATCAの置換；1,649,163-1,649,169）、および80,128bpの重複（1,909,352-1,989,480bp P80kbID、さらにその場所における5つの点突然変異（G1654405A、C1655463T、T1671849G、T1680646C、C1768587A）を特徴とする。これらの変化は、通常、固定ブロックとして遺伝性である。全ての染色体座標は、UMD3.1ウシゲノムビルドからのものである。

10

【0037】

レポーターを全く使用せずに遺伝子改変された動物；T A L E N 技術；対立遺伝子の移動
本発明の特定の実施形態は、レポーターおよび／または選択マーカーを使用することなく細胞または胚を改変するプロセスに関する。一般に、レポーター遺伝子の使用などの濃縮または選択方法が存在しないと、T A L E N 改変細胞の頻度は時間と共に著しく低下することが観察された。この観察は、レポーター遺伝子を含む、本明細書で報告されるコトランスクエクション、共選択技術などのアプローチなどを導く。

20

【0038】

しかしながら、T A L E N 改変は、レポーターを必要としないほど高い効率で実施することができ、その使用はトランスジェニック動物系統の作製を遅延させるだけであることが発見された。特定の理論に束縛されないが、いくつかの因子が、独立して、レポーターを含まない実施形態の発明に寄与した。1つは、T A L E N が迅速かつ高効率で作用する傾向があるという認識である。しかしながら、T A L E N 改変は数日の期間の間に不安定になる傾向があるので、効率はサンプリングの時間に応じて低くなると考えができる。さらに、一般通念では、安定して改変された生物のみを使用して、トランスジェニック動物を作製すべきであるため、短期間の改変を理解する誘因はほとんどない。他の系で従来通りに行われるよう、安定な取込みを選択するために細胞生存遺伝子を使用する誘因が存在する。別の因子は、T A L E N を発現するベクターと比較して、T A L E N mRNA が予想外に効果的なことである。T A L E N をコードするmRNAの直接的な導入は一般に有用であり、実施例8および9で使用した。

30

【0039】

レポーターを含まない実施形態の発見に寄与する別の因子は、ssDNA（ssオリゴヌクレオチド）鋳型とT A L E N 活性との間に予期せぬ相乗効果があることであった。この相乗効果の根拠は分かっていない。例えば、ヌクレオフェクション（nucleofection）により500,000～750,000の細胞にT A L E N をコードするmRNA 0.5～1.0マイクログラムを送達した後、30で3日間培養すると、一貫したレベルの改変が得られる。しかしながら、サーベイヤーアッセイによりアッセイされる場合にNHEJの増大で観察されるように、0.2～1.6nMolのssODNによりこれらの同じ条件を補充すると、T A L E N 活性の増大が得られた。通常、トランスクエクションは、1～4マイクログラムのT A L E N mRNAおよび0.2～0.4nMolのssDNAからなる。実施形態は、500,000細胞あたり約0.05μgよりも多い、または500,000細胞あたり約0.05μg～約100μgの範囲の量のT A L E N mRNAを細胞または胚に導入することを含み、当業者は、明確に示される範囲内の範囲および値の全てが考慮されることを直ちに認識するであろう。実施形態はさらに、

40

50

約 0.02 nMol よりも高い濃度の ssDNA、または約 0.01 ~ 約 10 nMol の範囲の ssDNA を導入することを含む。

【 0040 】

直接導入、例えば直接 mRNA 導入という用語は、mRNA 材料の導入を指す。対照的に、mRNA をコードするベクターによる導入は間接導入と呼ばれる。直接導入の多数のプロセス、例えば、エレクトロポレーション、トランスフェクション、リポフェクション、リポソーム、ヌクレオフェクション、遺伝子銃粒子、ナノ粒子、脂質トランスフェクション、電気融合、および直接注入が知られている。

【 0041 】

ファウンダー無角動物は、改変された細胞または胚から直ちに作製することができ、最初に改変された動物を作製し、その後これを繁殖させて新しいトランスジェニック系統の基礎を作製することを必要としない。ファウンダーまたはファウンダー動物という用語は、クローニングされた細胞または処置 / 注入された胚（改変されている）から直接発生する第 1 世代（「F0」）のトランスジェニック動物を指すために使用される。本明細書で報告される方法は、繁殖および / または近親交配の中間ステップを伴わずに、染色体の標的部位においてのみ遺伝子改変されたファウンダーの作製を提供する。さらに、実施形態は、改変に対してホモ接合型であるファウンダーを含む。ファウンダーは、細胞および / または胚をレポーター遺伝子（および / または選択マーカー遺伝子）に全くさらすことなく調製され得る。

【 0042 】

実施形態は、遺伝子改変された無角動物の作製方法を含み、前記方法は、TALEN をコードする mRNA に胚または細胞をさらす（TALEN は胚または細胞の染色体の標的部位に特異的に結合する）ことと、代理母において細胞をクローニングするか、あるいは代理母に胚を移植することとを含み、代理母は、レポーター遺伝子を用いずに、および TALEN が結合した染色体の標的部位においてのみ遺伝子改変された動物を懐胎する。動物は全てのレポーター遺伝子を含まなくてもよいし、あるいは選択マーカーを含まなくてもよく、例えば、選択マーカーを含まないが、蛍光タンパク質などのレポーターを有する。選択肢には、mRNA としての TALEN および / または遺伝子改変のための鋳型、例えば対立遺伝子を提供する ss オリゴヌクレオチドの直接導入が含まれる。

【 0043 】

遺伝子改変された無角動物の作製方法は、TALEN および / またはベクターを培養細胞、例えば初代家畜細胞に導入することを含む。TALEN は特定の染色体部位に向けられ、その部位で遺伝子変異を引き起こす。また HDR 鋳型は、例えば二本鎖ベクターとして、一本鎖 DNA として、あるいは直接 ss ヌクレオチドとして細胞に導入されてもよい。培養細胞は続いて培養され、クローニング細胞のコロニーを形成する。好ましくはレポーター遺伝子を用いず、および / もしくは選択マーカーを用いずに、コロニーは PCR によって試験され、および / もしくは配列決定されるか、または他の方法で遺伝子改変についてアッセイされる。対象とする部位で遺伝子改変されたコロニーから細胞が採取され、クローニングにおいて使用される。例えば、代理母に移植される 10 ~ 50,000 の胚（例えば、代理母あたり 1 ~ 500 の胚のセット）を作製するために 10 ~ 50,000 の細胞が使用され、当業者は、明確に示される範囲内の範囲および値の全てが考慮されることを直ちに認識するであろう。実施形態は、レポーター遺伝子を用いずに細胞を TALEN にさらすことと、クローニング細胞のコロニーを作製することと、コロニーメンバーのサブセットを試験して染色体の標的部位に改変が取り込まれたコロニーを同定することとを含む。

【 0044 】

培養細胞からクローニング細胞のコロニーを作製するプロセスは既知である。このような方法の 1 つは、第 1 の培養物からの細胞を第 2 の培養物に分散させることを含み、例えば、その中に入れられる細胞の数に対して比較的大きい表面積を有するマルチウェルプレートまたはプレート内に細胞を希釈することによって、種々の細胞は互いに接触されない。細

10

20

30

40

50

胞は、細胞が増殖可能になる期間培養される。増殖する細胞は、細胞がその最初の場所から遠く離れて移動する可能性が低い条件下で培養される。結果として、ユーザーは、その期間の後に細胞を観察して、全てが単一の細胞およびその子孫で作製された種々のコロニーを見ることができる。コロニー内の細胞のサブセットは、コロニー内の他の細胞を破壊することなくサンプリングすることができる。

【0045】

部位特異的ヌクレアーゼ系

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) およびジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) などのゲノム編集手段は、多数の生物においてバイオテクノロジー、遺伝子治療および機能性ゲノム研究の分野に影響を与えており、さらに最近、RNA誘導性エンドヌクレアーゼ (REGEN) が、相補的RNA分子によってその標的部位に向かっている。Cas9/CRISPR系はREGENである。tracrRNAは、別のこのような手段である。これらは標的化ヌクレアーゼ系の例であり、これらの系は、ヌクレアーゼを標的部位に局在化させるDNA結合メンバーを有する。次に、この部位はヌクレアーゼにより切断される。TALENおよびZFNは、DNA結合メンバーに融合したヌクレアーゼを有する。Cas9/CRISPRは、標的DNAにおいて互いを見出す同族である。DNA結合メンバーは染色体DNAにおいて同族配列を有する。DNA結合メンバーは、通常、対象となる同族配列を考慮して、対象となる部位あるいはその近くで核酸分解作用を得るように設計される。特定の実施形態は、このような系の全てに制限なしに適用可能であり、ヌクレアーゼの再切断を最小限にする実施形態、対象となる残基においてSNPを正確に作製するための実施形態、およびDNA結合部位において遺伝子移入されている対立遺伝子の配置が含まれる。

10

20

30

40

【0046】

TALEN

本明細書で使用される場合、TALENという用語は広義であり、別のTALENの助けがなくても二本鎖DNAを切断することができる単量体TALENを含む。またTALENという用語は、同一の部位で協同してDNAを切断するように操作された一対のTALENの一方または両方のメンバーを指すためにも使用される。協同するTALENは、left-TALENおよびright-TALEN (DNAの左右方向(handedness)を参照する)、またはTALENペアと呼ばれることがある。

【0047】

TALENのコードが報告されており (PCT出願国際公開第2011/072246号パンフレット)、各DNA結合反復は、標的DNA配列内の1つの塩基対の認識に関与している。残基はDNA配列を標的とするように構築され得る。簡単に言うと、TALENの結合のための標的部位が決定され、ヌクレアーゼと、標的部位を認識する一連のRVDとを含む融合分子が作製される。結合すると、ヌクレアーゼはDNAを切断し、その結果、切断末端において遺伝子変更を行うように細胞修復機構が作動し得る。TALENという用語は、転写活性化因子様(TAL)エフェクター結合ドメインおよびヌクレアーゼドメインを含むタンパク質を意味し、それ自体機能性である単量体TALENと、別の単量体TALENによる二量体化を必要とする他のTALENとが含まれる。二量体化は、両方の単量体TALENが同一である場合はホモ二量体TALENをもたらし、単量体TALENが異なる場合はヘテロ二量体TALENをもたらすことができる。TALENは、2つの主要な真核生物DNA修復経路、非相同末端結合(NHEJ)および相同性指向修復によって、不死化ヒト細胞において遺伝子変更を誘導することが示されている。

50

【0048】

細胞または胚へのTALEN導入およびこれらに由来する動物の形成の種々の実施例が本明細書において提供される。TALENにより処理するための細胞には、培養細胞、不死化細胞、初代細胞、初代体細胞、接合体、生殖細胞、始原生殖細胞、胚盤胞、または幹細胞が含まれる。実施例10には、精原幹細胞の変更についての実験結果が詳述される。これらの細胞は、動物、例えば家畜の遺伝子変更のための別な方法を提供する。遺伝子改

変または遺伝子編集は、ドナー精巣から単離した精原幹細胞（オス生殖系幹細胞、本明細書ではGSCと略される）においてインビトロで実行することができる。変異細胞は、レシピエントの生殖細胞減損精巣に移植される。移植された精原幹細胞は遺伝子変異を有する精子を生成し、これを人工授精（AI）またはインビトロ受精（IVF）による繁殖のために使用して、ファウンダー動物を得ることができる。この方法は、遺伝子変異ファウンダーの産生を超えた利点を有する。このような利点の1つは、特定の疾患モデルのためのファウンダーが健康でなく、生殖年齢まで成長するのに適さない場合に明らかである。従って、GSCに導入された同じ変異は、健康な個体の精巣に移植することができ、健康な動物からの系統を繁殖させて新生子ブタにおいて疾患モデルを生じさせることが可能になる。

10

【0049】

精原幹細胞においてTALEN媒介のインデルを生じさせる可能性および効率は、最初に、ブタデュシェンヌ型筋ジストロフィー遺伝子座（DMD）のエクソン7に標的化されたTALENをコードするプラスミドのトランスフェクションによって研究された。いくつかのヌクレオフェクション条件、プラスミド量およびインキュベーション温度の試験により、生殖細胞トランスフェクション率が25%であるにもかかわらず最大効率19%のNHEJが得られ、TALEN活性は30で培養された複製物において最高であった。GSCは、30で5日間を超えて培養した後でも生存したままであったが、全体的に見て、生殖細胞の生存率は37の方が高かった。TALENをコードするmRNAのトランスフェクションでは、プラスミドDNAに対して、より大きい活性と、家畜体細胞およびGSCのより高い生存率とが得られた。特に、mRNAトランスフェクションのピーク活性は、この実験ではプラスミドDNAトランスフェクションを超えていたが、同じレベルの変異を達成するために必要とされるmRNAの量は著しくより少なかった。実施例11には、始原生殖細胞（トリ）において成功したTALEN刺激HDRが詳述される。

20

【0050】

いくつかの実施形態では、単量体TALENを使用することができる。TALENは、通常、2つのTALEエフェクタードメインがそれぞれFokI制限酵素の触媒ドメインに融合され、得られた各TALENのDNA認識部位がスペーサー配列によって分離され、各TALEN単量体が認識部位へ結合することにより、FokIが二量体化し、スペーサー内で二重鎖切断を作製することができるよう、スペーサーを有する二分認識部位（bipartite recognition site）にわたる二量体として機能する。しかしながら、単量体TALENは、機能するのに二量体化を必要としないヌクレアーゼに单一のTALEエフェクターが融合されるように構築することもできる。このようなヌクレアーゼの1つは、例えば、2つの単量体が单一のポリペプチドとして発現されるFokIの短鎖変異体である。その他の天然に存在するかあるいは操作された単量体ヌクレアーゼもこの役割を果たすことができる。単量体TALENのために使用されるDNA認識ドメインは、天然に存在するTALEエフェクターから得ることができる。あるいは、DNA認識ドメインは、特定のDNA標的を認識するように操作することができる。操作された短鎖TALENは、ただ1つの操作されたDNA認識ドメインしか必要としないので、構築および配置がより容易であり得る。二量体DNA配列特異的ヌクレアーゼは、2つの異なるDNA結合ドメイン（例えば、1つのTALEエフェクター結合ドメインおよび他の種類の分子からの1つの結合ドメイン）を用いて作製することができる。TALENは、スペーサーを有する二分認識部位にわたる二量体として機能することができる。このヌクレアーゼ構造は、例えば、1つのTALEN単量体および1つのジンクフィンガーヌクレアーゼ単量体から作製される標的特異的ヌクレアーゼのためにも使用することができる。このような場合、TALENおよびジンクフィンガーヌクレアーゼ単量体のDNA認識部位は、適切な長さのスペーサーによって分離させることができる。2つの単量体を結合すると、FokIは二量体化し、スペーサー配列内で二重鎖切断を作製できるようになる。機能性ヌクレアーゼを作製するために、ホメオドメイン、mybリピートまたはロイシンジッパーなどのジンクフィンガー以外のDNA結合ドメインをFokIに融合させて

30

40

50

、TALEN単量体とのパートナーとして機能させることもできる。

【0051】

ヌクレアーゼという用語は、エキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼを含む。エンドヌクレアーゼという用語は、DNAまたはRNA分子、好ましくはDNA分子内で核酸間の結合の加水分解（切断）を触媒することができる任意の野生型または変異体酵素を指す。エンドヌクレアーゼの非限定的な例としては、Fok I、Hha I、Hind l I I、Not I、Bbv C 1、Eco R I、Bgl I I、およびAlw IなどのII型制限エンドヌクレアーゼが挙げられる。エンドヌクレアーゼは、通常約12～45塩基対(b p)、より好ましくは14～45bpの長さのポリヌクレオチド認識部位を有する場合、レアカッティング(rare-cutting)エンドヌクレアーゼも含む。レアカッティングエンドヌクレアーゼは、画定された遺伝子座においてDNA二重鎖切断(DSB)を誘導する。レアカッティングエンドヌクレアーゼは、例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼ、操作されたジンクフィンガードメインとFok Iなどの制限酵素触媒ドメインとの融合から得られるキメラジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、または化学エンドヌクレアーゼであり得る。化学エンドヌクレアーゼにおいて、化学的またはペプチド性切断因子は、特定の標的配列を認識する核酸のポリマーまたは別のDNAのいずれかに結合されることにより、切断活性を特定の配列に対して標的化する。また化学エンドヌクレアーゼは、特定のDNA配列に結合することが知られている、オルトフェナントロリン、DNA切断分子、および三重鎖形成オリゴヌクレオチド(TFO)の結合体のような合成ヌクレアーゼも包含する。このような化学エンドヌクレアーゼは、本発明に従う「エンドヌクレアーゼ」という用語に含まれる。このようなエンドヌクレアーゼの例としては、I-See I、I-Chu L I-Cre I、I-Csm I、PI-See L PI-Tti L PI-Mtu I、I-Ceu I、I-See IL 1-See III、HO、PI-Civ I、PI-Ctr L PI-Aae I、PI-Bsu I、PI-Dha I、PI-Dra L PI-Mav L PI-Meh I、PI-Mfu L PI-Mfl I、PI-Mga L PI-Mgo I、PI-Min L PI-Mka L PI-Mle I、PI-Mma I、PI-30 Msh L PI-Msm I、PI-Mth I、PI-Mtu I、PI-Mxe I、PI-Npu I、PI-Pfu L PI-Rma I、PI-Spb I、PI-Ssp L PI-Fae L PI-Mja I、PI-Pho L PI-Tag L PI-Thy I、PI-Tko I、PI-Tsp I、I-Mso Iが挙げられる。

【0052】

相同性指向修復(HDR)

相同性指向修復(HDR)は、ssDNAおよび二本鎖DNA(dsDNA)損傷を修復するための細胞内のメカニズムである。この修復メカニズムは、損傷部位に対して著しい相同性を有する配列を有するHDR鑄型が存在する場合に細胞によって使用することができる。特異的結合（この用語は、生物学分野において一般的に使用される）は、非標的組織と比べて比較的高い親和性で標的に結合する分子を指し、一般に、静電相互作用、ファンデルワールス相互作用、水素結合などの複数の非共有結合性の相互作用を含む。特異的ハイブリダイゼーションは、相補的配列を有する核酸間の特異的結合の一種である。またタンパク質も、例えば、TALENまたはCRISPR/Cas9系において、またはGal4モチーフによって、DNAに特異的に結合することができる。対立遺伝子の遺伝子移入は、鑄型誘導性プロセスにより内在性対立遺伝子よりも外因性対立遺伝子を複写するプロセスを指す。場合により、内在性対立遺伝子は実際に切除されて外因性核酸対立遺伝子により置換され得るが、本理論では、プロセスは複写メカニズムである。対立遺伝子は遺伝子対であるため、これらの間には著しい相同性が存在する。対立遺伝子は、タンパク質をコードする遺伝子である可能性もあるし、あるいは、生物活性RNA鎖のコード化、または制御タンパク質またはRNAを受け入れる部位の提供などの他の機能を有することもある。

【0053】

10

20

30

40

50

H D 鑄型は、遺伝子移入されている対立遺伝子を含む核酸である。鑄型は d s D N A でも一本鎖 D N A (s s D N A) でもよい。s s 鑄型 D N A は、好ましくは、約 20 ~ 約 500 の残基であるが、他の長さを使用することもできる。当業者は、例えば、500 ~ 1500 の残基、20 ~ 100 の残基など、明確に示される範囲内の範囲および値の全てが考慮されることを直ちに認識するであろう。鑄型は、さらに、置換すべき内在性対立遺伝子または D N A に隣接する D N A に相同性を提供する隣接配列を含むことができる。また鑄型は、標的化ヌクレアーゼ系に結合され、従って、この系の D N A 結合メンバーの同族結合部位である配列を含むこともできる。同族という用語は、通常は相互作用をする 2 つの生体分子を指し、例えば、受容体とそのリガンドなどである。H D R プロセスとの関連において、生体分子の 1 つは、対象とされる、すなわち同族の D N A 部位またはタンパク質部位と結合するような配列で設計され得る。

10

【 0 0 5 4 】

標的化ヌクレアーゼ系に対する特異的結合を低減するための一実施形態は、その内在性 D N A とのアライメントに対して H D R 鑄型に変化を加えることを含む。1つのタイプの変化は、同族メンバー間のミスマッチを作成するように設計される。1つの変化は、1つまたは複数の残基の挿入または欠失である。別の変化は、結合を促進しない、1つの残基による別の残基の置換である。残基という用語は、分子鎖内の単位、例えば、タンパク質内のアミノ酸または核酸内の塩基を指す。変化を加える 1 つの場所は、系の D N A 結合メンバーの同族結合部位である。

20

【 0 0 5 5 】

別のタイプの変化は、スペーサーと共に動作する系、例えば T A L E N ペアにおいて、スペーサーに変化を加えることによって、ヌクレアーゼの作用を妨害するように設計され、変化はスペーサー領域で行われる。これらの変化は、欠失、例えばヌクレアーゼが切断を行うのを妨害するような欠失を含み得る。これらの種々の変化は配列がアラインされる際にミスマッチを作るので、本明細書では通常ミスマッチと呼ばれ、この文脈では、欠失、挿入、または置換がミスマッチである。ヌクレアーゼのペアは協同性を提供するスペーシングを必要とし、これらの活性は、スペーサーへの付加または置換によって妨害することができる。

【 0 0 5 6 】

さらなる実施形態は、外因性対立遺伝子にミスマッチを配置する。系の D N A 結合メンバーは、内在性対立遺伝子と少なくとも部分的に重複する部位で結合するように設計される。外因性対立遺伝子と同一性を有するように遺伝子移入されれば、D N A 結合メンバーは結合が低減されている。従って、D N A 結合メンバーの同族部位は、好ましい内在性対立遺伝子から好ましくない外因性対立遺伝子へ変化する。同族部位は、対立遺伝子の全て、またはその一部だけを包含し得る。外因性対立遺伝子の遺伝子移入を安定化するために外因性対立遺伝子へのミスマッチの導入が必要とされることとは、驚くべきである。明らかに、再切断の問題は、遺伝子移入された対立遺伝子の安定性に対して非常に大きい影響を与える。この影響を示すデータは、従来法では同等の効率を有するプロセスが利用できないので、これまで他者によって得られることはなかった。

30

【 0 0 5 7 】

実施形態は、H D R 鑄型プロセスを用いて、残基の挿入、欠失、または置換によりこれらの種々の場所におけるミスマッチを作製することを含む。例えば、1 ~ 1000 の残基が挿入、欠失、または置換され得る；当業者は、例えば、1 ~ 3 の残基、少なくとも 10 の残基、4 の残基、4 ~ 20 の残基、1 ~ 205 の残基、1 ~ 220 の残基、1 ~ 300 の残基、1 ~ 500 の残基、10 ~ 1000 の残基など、明確に示される範囲内の範囲および値の全てが考慮されることを直ちに認識するであろう。これらのうちの 1 つまたは複数が結合されてもよく、例えば、1 つの場所における挿入、別の場所における欠失、およびその他の場所による置換などである。

40

【 0 0 5 8 】

これらの種々の実施形態は、レポーターを含まない系において、S N P または S N P に

50

関連する実施形態を作製するために実施することができる。細胞または動物は、例えば、家畜、ブタ、雌ウシ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ウサギ、魚、ゼブラフィッシュ、イヌ、マウス、ネコ、ラット、および実験動物であり得る。

【0059】

組成物およびキット

本発明は、例えば、部位特異的なエンドヌクレアーゼ、C R I S P R、C a s 9、Z N F、T A L E Nをコードする核酸分子、これらのポリペプチド、このような核酸分子もしくはポリペプチドを含有する組成物、または操作された細胞株を含む組成物およびキットも提供する。また、無角対立遺伝子の遺伝子移入に有効なH D Rも提供され得る。このような品目は、例えば、研究手段として、あるいは治療的に使用することができる。

10

【0060】

ベクターおよび核酸

ノックアウトのため、または他の目的で遺伝子の発現を得るために、様々な核酸を偶蹄類または他の細胞に導入することができる。トランスジェニック動物を作製するために使用することができる核酸構築物には、標的核酸配列が含まれる。本明細書で使用される場合、核酸という用語は、D N A、R N A、および核酸類似体、ならびに二本鎖または一本鎖（すなわち、センスまたはアンチセンス一本鎖）である核酸を含む。核酸類似体は、例えば、核酸の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解度を改善するために、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格において修飾することができる。塩基部分における修飾は、デオキシチミジンに対するデオキシリジン、ならびにデオキシシチジンに対する5-メチル-2'-デオキシシチジンおよび5-ブロモ-2'-デオキシシチジンを含む。糖部分の修飾は、2'-O-メチルまたは2'-O-アリル糖を形成するためのリボース糖の2'ヒドロキシルの修飾を含む。デオキシリボースリン酸骨格は、各塩基部分が6員モルホリノ環に連結されたモルホリノ核酸、またはデオキシリリン酸骨格が偽ペプチド骨格で置換され、4つの塩基が保持されたペプチド核酸を生成するために修飾することができる。Summerston and Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7(3): 187、およびHyrup et al. (1996) *Bioorgan. Med. Chem.* 4: 5を参照されたい。さらに、デオキシリリン酸骨格は、例えば、ホスホロチオ酸もしくはホスホロジチオ酸骨格、ホスホロアミダイト、またはアルキルホスホトリエステル骨格で置換することができる。

20

【0061】

標的核酸配列は、プロモーターなどの調節領域に動作可能に連結させることができる。調節領域はブタ調節領域であっても、または他の種に由来するものであってもよい。本明細書で使用される場合、動作可能に連結とは、標的核酸の転写を可能または容易にするような形で核酸配列に対して調節領域を配置することを指す。

30

【0062】

任意のタイプのプロモーターを標的核酸配列に対して動作可能に連結させることができる。プロモーターの例としては、組織特異的プロモーター、構成的プロモーター、および特定の刺激に応答性または非応答性のプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。適切な組織特異的プロモーターはベータ細胞において核酸転写物を優先的に発現させることができ、例えばヒトインスリンプロモーターが含まれる。その他の組織特異的プロモーターは、例えば、肝細胞または心臓組織において優先的に発現させることができ、それぞれ、アルブミンまたはアルファ-ミオシン重鎖プロモーターを含むことができる。他の実施形態では、組織特異性または時間特異性がほとんどなく、核酸分子の発現を容易にするプロモーター（すなわち、構成的プロモーター）を使用することができる。例えば、ニワトリ アクチン遺伝子プロモーターなどの アクチンプロモーター、ユビキチンプロモーター、m i n i C A G s プロモーター、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H) プロモーター、または3-ホスホグリセレートキナーゼ (P G K) プロモーターを使用することができ、同様に、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V - T K) プロモーター、S V 4 0 プロモーター、またはサイトメガロウイルス (C

40

50

MV) プロモーターなどのウイルスプロモーターも使用することができる。いくつかの実施形態では、ニワトリ アクチン遺伝子プロモーターおよびCMVエンハンサーの融合物がプロモーターとして使用される。例えば、Xu et al. (2001) *Hum. Gene Ther.* 12: 563、およびKiwaki et al. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7: 821を参照されたい。

【0063】

誘導性プロモーターの一例はテトラサイクリン (tet) - on プロモーター系であり、これは、核酸の転写を調節するために使用することができる。この系では、突然変異 Tetリプレッサー (TetR) が単純ヘルペスウイルスVP16trans-活性化因子タンパク質の活性化ドメインに融合されて、tetまたはドキシサイクリン (dox) により調節されるテトラサイクリン制御転写活性化因子 (tTA) が作製される。抗生物質の非存在下で転写は最小であるが、tetまたはdoxの存在下では、転写が誘導される。代替的な誘導系には、エクジソンまたはラパマイシン系が含まれる。エクジソンは昆虫の脱皮ホルモンであり、その産生は、エクジソンの受容体のヘテロ二量体およびウルトラスピラカル (ultrraspiracle) 遺伝子 (USP) の産物によって制御される。発現は、エクジソンまたはエクジソンの類似体 (例えば、ムリステロンAなど) による処理によって誘導される。誘導系を引き起こすために動物に投与される薬剤は、誘導剤と呼ばれる。

【0064】

核酸構築物において有用であり得る付加的な調節領域には、ポリアデニル化配列、翻訳制御配列 (例えば、配列内リボソーム進入セグメント、IRES)、エンハンサー、誘導性エレメント、またはイントロンが含まれるが、これらに限定されない。このような調節領域は必須でないこともあるが、これらは、転写、mRNAの安定性、翻訳効率などに影響を与えることにより発現を増大させ得る。このような調節領域は、細胞内で核酸の最適な発現を得るために所望される場合に核酸構築物内に包含させることができる。しかしながら、このような付加的なエレメントがなくても十分な発現が得られることもある。

【0065】

シグナルペプチドまたは選択可能なマーカーをコードする核酸構築物が使用されてもよい。シグナルペプチドは、コードされたポリペプチドが特定の細胞位置 (例えば、細胞表面) に移動されるように使用することができる。選択可能なマーカーの非限定的な例としては、ピューロマイシン、ガンシクロビル、アデノシンデアミナーゼ (ADA)、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (neo、G418、APH)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR)、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ、チミジンキナーゼ (TK)、およびキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGprt) が挙げられる。このようなマーカーは、培養物中の安定な形質転換体を選択するために有用である。他の選択可能なマーカーには、緑色蛍光タンパク質または黄色蛍光タンパク質などの蛍光ポリペプチドが含まれる。

【0066】

いくつかの実施形態では、選択可能なマーカーをコードする配列は、例えば、CreまたはF1pなどのリコンビナーゼの認識配列によって隣接され得る。例えば、選択可能なマーカーは、選択可能なマーカーが構築物から切除されるように、loxP認識部位 (Creリコンビナーゼにより認識される34bp認識部位) またはFRT認識部位によって隣接され得る。Orban, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1992) 89: 6861 (Cre/lox技術の概説)、およびBrand and Dymecki, Dev. Cell (2004) 6: 7を参照されたい。また、選択可能なマーカー遺伝子により中断されたCreまたはF1pを活性化可能な導入遺伝子を含有するトランスポゾンを使用して、導入遺伝子の条件的発現によりトランスジェニック動物を得ることもできる。例えば、マーカー/導入遺伝子の発現を駆動するプロモーターは遍在性でも組織特異的でもよく、F0動物 (例えば、ブタ) においてマーカーの遍在性または組織特異的な発現を引き起こし得る。導入遺伝子の組織特異的な活性化は、例えば、マ

10

20

30

40

50

マークで中断された導入遺伝子を遍在的に発現するブタと、CreまたはF1pを組織特異的に発現するブタとを交雑させることによって、あるいは、マークで中断された導入遺伝子を組織特異的に発現するブタと、CreまたはF1pリコンビナーゼを遍在的に発現するブタとを交雫させることによって達成することができる。導入遺伝子の制御された発現またはマークの制御された切除により、導入遺伝子の発現が可能になる。

【0067】

いくつかの実施形態では、標的核酸はポリペプチドをコードする。ポリペプチドをコードする核酸配列は、コードされるポリペプチドのその後の操作を容易にする（例えば、局在化または欠失を容易にする）ように設計された「タグ」をコードするタグ配列を含むことができる。タグ配列は、コードされるタグがポリペプチドのカルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかに配置されるように、ポリペプチドをコードする核酸配列に挿入することができる。コードされるタグの非限定的な例としては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)およびFLAG(商標)タグ(Kodak, New Haven, CT)が挙げられる。

10

【0068】

他の実施形態では、標的核酸配列は、標的核酸の発現が低減されるように標的核酸に対してRNA干渉を誘導する。例えば、標的核酸配列は、囊胞性線維症膜コンダクタンス制御(CFTR)ポリペプチドをコードする核酸に対してRNA干渉を誘導することができる。例えば、CFTR DNAと相同の二本鎖低分子干渉RNA(siRNA)または低分子ヘアピン型RNA(shRNA)は、そのDNAの発現を低減するために使用することができる。siRNAの構築物は、例えば、Fire et al. (1998) *Nature* 391: 806、Romano and Masino (1992) *Mol. Microbiol.* 6: 3343、Cogoni et al. (1996) *EMBO J.* 15: 3153、Cogoni and Masino (1999) *Nature* 399: 166、Misquitta and Paterson (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1451、およびKennerdell and Carthew (1998) *Cell* 95: 1017に記載されるように作製することができる。shRNAの構築物は、McIntyre and Fanning (2006) *BMC Biotechnology* 6: 1によって記載されるように作製することができる。一般に、shRNAは、アニールして低分子ヘアピンを形成することができる相補領域を含有する一本鎖RNA分子として転写される。

20

【0069】

核酸構築物は、SssI CpGメチラーゼ(New England Biolabs, Ipswich, MA)を用いてメチル化することができる。一般に、核酸構築物は、緩衝液中37において、S-アデノシルメチオニンおよびSssI CpG-メチラーゼと共にインキュベートすることができる。過剰メチル化は、構築物を1単位のHinP1Iエンドヌクレアーゼと共に37で1時間インキュベートし、アガロースゲル電気泳動によりアッセイすることによって確認することができる。

30

【0070】

核酸構築物は、様々な技術を用いて、例えば生殖細胞、例えば卵母細胞もしくは卵など、前駆細胞、成体もしくは胚幹細胞、始原生殖細胞、腎細胞、例えばPK-15細胞など、島細胞、ベータ細胞、肝細胞、または線維芽細胞、例えば皮膚線維芽細胞などを含む、あらゆる種類の胚細胞、胎児細胞、または成体偶蹄類細胞に導入することができる。技術の非限定的な例としては、トランスポゾン系の使用、細胞を感染させることができる組換えウイルス、もしくはリポソーム、または核酸を細胞に送達することができる他の非ウイルス方法、例えばエレクトロポレーション、マイクロインジェクション、またはリン酸カルシウム沈殿などが挙げられる。

40

【0071】

トランスポゾン系において、核酸構築物の転写単位、すなわち標的核酸配列に動作可能に連結された調節領域は、トランスポゾンの逆方向反復によって隣接される。マウス、ヒ

50

ト、およびブタ細胞を含む細胞に核酸を導入するために、例えば、Sleeping Beauty (米国特許第6,613,752号明細書および米国特許出願公開第2005/0003542号明細書を参照) ; Frog Prince (Miskey et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31: 6873) ; Tol2 (Kawakami (2007) ゲノム Biology 8 (Suppl. 1) : S7 ; Minos (Pavlopoulos et al. (2007) Genome Biology 8 (Suppl. 1) : S2) ; Hsmar1 (Miskey et al. (2007) Mol Cell Biol. 27: 4589) ; およびPassport を含むいくつかのトランスポゾン系が開発されている。Sleeping Beauty およびPassport トランスポゾンは特に有用である。トランスポザーゼは、標的核酸と同じ核酸構築物上にコードされたタンパク質として送達することもできるし、別の核酸構築物上に導入することもできるし、あるいは、mRNA (例えば、インビトロ転写およびキャップ化mRNA) として提供することもできる。

【0072】

核酸は、ベクターに取り込まれてもよい。ベクターは、キャリアから標的DNAへ移動するように設計された任意の特定のDNAセグメントを含む広義の用語である。ベクターは、発現ベクター、またはベクター系と呼ばれることもあり、エピソーム、プラスミド、またはさらにはウイルス/ファージDNAセグメントなどの、ゲノムまたは他の標的化DNA配列にDNAの挿入をもたらすために必要とされる一連の構成要素である。動物において遺伝子を送達するために使用される、ウイルスベクター (例えば、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスおよび組込みファージウイルス) および非ウイルスベクター (例えば、トランスポゾン) などのベクター系は、2つの基本構成要素：1) DNA (またはcDNAに逆転写されるRNA) で構成されるベクターと、2) ベクターおよびDNA標的配列の両方を認識して、標的DNA配列にベクターを挿入する、トランスポザーゼ、リコンビナーゼ、または他のインテグラーゼ酵素とを有する。ベクターは、ほとんどの場合、1つまたは複数の発現制御配列を含む1つまたは複数の発現カセットを含有しており、発現制御配列は、別のDNA配列またはmRNAの転写および/または翻訳をそれぞれ制御および調節するDNA配列である。

【0073】

多数の異なるタイプのベクターが知られている。例えば、プラスミドおよびウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターが知られている。哺乳類発現プラスミドは、通常、複製開始点、適切なプロモーターおよび任意選択のエンハンサー、またさらに、任意の必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列、ならびに5'隣接非転写配列を有する。ベクターの例としては、プラスミド (別のタイプのベクターのキャリアであってもよい)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、レンチウイルス (例えば、HIV-1、SIVまたはFIV)、レトロウイルス (例えば、ASV、ALVまたはMMLV)、およびトランスポゾン (例えば、Sleeping Beauty、P-エレメント、Tol-2、Frog Prince、piggyBac) が挙げられる。

【0074】

本明細書で使用される場合、核酸という用語は、RNAおよびDNAの両方を指し、例えば、cDNA、ゲノムDNA、合成 (例えば、化学合成) DNA、ならびに天然に存在する核酸および化学修飾された核酸、例えば、合成塩基または代替骨格が含まれる。核酸分子は二本鎖または一本鎖 (すなわち、センスまたはアンチセンス一本鎖) であり得る。トランスジェニックという用語は本明細書では広義に使用され、遺伝子操作技術を用いてその遺伝子材料が変更された遺伝子改変生物または遺伝子操作生物を指す。従って、ノックアウト偶蹄類は、外因性遺伝子または核酸が動物またはその子孫において発現されるか否かに關係なくトランスジェニックである。

【0075】

本明細書に記載される核酸配列は、DNAまたはRNAの場合により、略語「T」が「

10

20

30

40

50

T」または「U」を表すことを可能にする従来の慣例に従って、DNAおよびRNAの両方の配列を表すことが意図される。ポリヌクレオチドは、少なくとも3つのヌクレオチドサブユニットの核酸分子である。ポリヌクレオチド類似体またはポリ核酸は、化学的に修飾されたポリヌクレオチドまたはポリ核酸である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド類似体は、ポリヌクレオチドの糖-リン酸骨格の一部を代替官能基で置換することによって作製することができる。本明細書において「モルホリノ」と呼ばれるモルホリノ修飾ポリヌクレオチドは、塩基がモルホリノ-ホスホジアミダート骨格により連結されたポリヌクレオチド類似体である（例えば、米国特許第5,142,047号明細書および米国特許第5,185,444号明細書を参照）。モルホリノに加えて、ポリヌクレオチド類似体の他の例としては、塩基がポリビニル骨格によって連結された類似体、偽ペプチド2-アミノエチル-グリシン基で形成されたアミド結合によって塩基が連結されたペプチド核酸（PNA）、ヌクレオシドサブユニットがメチルホスホナート基によって連結された類似体、ヌクレオシドサブユニットに連結するリン酸残基がホスホロアミダート基によって置換された類似体、およびホスホロチオ酸化DNA、2'-O-メチル基を有する糖部分を含有する類似体が挙げられる。本発明のポリヌクレオチドは、周知の日常的に使用される固相合成技術によって作製することができる。あるいは、このような合成のための他の適切な方法を使用することができる（例えば、一般的な分子クローニングおよび化学的な核酸合成技術）。また同様の技術を使用して、モルホリノまたはホスホロチオ酸誘導体などのポリヌクレオチド類似体を作製することもできる。さらに、ポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチド類似体は、商業的に入手することもできる。オリゴヌクレオチドについて、薬学的に許容可能な組成物の例は、例えば、（a）ナトリウム、カリウム、アンモニウムなどのカチオンにより形成される塩；（b）無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸などにより形成される酸付加塩；（c）有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸などにより形成される塩；および（d）元素アニオン、例えば、塩素、臭素、およびヨウ素から形成される塩を含む塩である。

【0076】

配列アライメントは、類似性の領域を同定するためにDNA、RNA、またはタンパク質の配列を配置する手段である。ヌクレオチドまたはアミノ酸残基のアラインされた配列は、通常、マトリックス内の列として表わされ、連続カラムにおいて同一または類似の特徴がアラインされるように、残基間にギャップが挿入される。

【0077】

ポリペプチド

活性を変化させることなく一般にアミノ酸配列に成され得る様々な保存的変化が存在する。これらの変化は保存的置換または突然変異と呼ばれる；すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸分類に属するアミノ酸が別のアミノ酸で置換され得る。アミノ酸配列の置換は、そのアミノ酸が属する種類の他のメンバーから選択され得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンが含まれる。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが含まれる。正帯電（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが含まれる。負帯電（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。このような変化はポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定される見かけの分子量または等電点に実質的に影響を与えないと思われる。例示的な保存的置換には、正電荷を保持するためにLysによるArgの置換およびその逆；負電荷を保持するためのGluによるAspの置換およびその逆；遊離-OHが保持されるようにSerによるThrの置換；ならびに遊離NH₂を保持するためのGlnによるAsnの置換が含まれるが、これらに限定されない。さらに、ポリペプチド配列または対応する核酸配列の点突然変異、欠失、および挿入は、場合により、ポリペプチドまたは核酸断片の機能を損失することなく行うことができる。置換は、例えば、1個、2個、3個、またはそれ以上の残基を含むことができる。本明細書に記載されるアミノ酸残基は、1文字アミノ酸指示語または3文字

10

20

30

40

50

略語のいずれかを使用する。本明細書において使用される略語は、標準ポリペプチド命名法、J. Biol. Chem., (1969), 243, 3552-3559に従っている。全てのアミノ酸残基配列は、本明細書において、左右の方向性を有する式によって、アミノ末端からカルボキシ末端への慣習的な方向で表される。

【0078】

場合により、本明細書に記載される配列に対するペプチドの同一性パーセントの決定が必要とされることもある。このような場合、同一性パーセントは、ペプチド、またはペプチドの一部の残基の数について測定される。例えば、90%同一性のポリペプチドは、より大きいペプチドの一部でもあり得る。実施形態は、本明細書に記載される配列について指示される同一性および/または保存的置換を有するこのようなポリペプチドを含む。

10

【0079】

精製という用語は、ポリペプチドに関連して本明細書で使用される場合、天然に存在する対応物を有さないポリペプチド（例えば、ペプチド模倣物）、または化学的に合成され、従って他のポリペプチドにより実質的に汚染されていないポリペプチド、または天然で付随される他の大部分の細胞成分（例えば、他の細胞タンパク質、ポリヌクレオチド、または細胞成分）から分離または精製されたポリペプチドのいずれかを指す。精製ポリペプチドの一例は、乾燥重量で少なくとも70%が、天然で関連しているタンパク質および天然起源有機分子を含まないものである。従って、精製ポリペプチドの調製物は、例えば、乾燥重量で少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも99%がポリペプチドであり得る。またポリペプチドは、ポリペプチドの精製または標識を容易にする（例えば、親和性マトリックス上への捕獲、顕微鏡下での可視化）タグ配列（例えば、ポリヒスチジンタブグ、mycタグ、またはFLAG（登録商標）タグ）を含有するように操作することもできる。従って、ポリペプチドを含む精製組成物は、他に記載されない限り、精製ポリペプチドを指す。

20

【0080】

ポリペプチドは、化学修飾を含むことができ、化学修飾という用語は、この文脈では、天然に存在するアミノ酸の化学構造の変化を指す。このような修飾は側鎖または末端に対して行うことができ、例えば、アミノ末端またはカルボキシル末端を変化させる。いくつかの実施形態では、修飾は、ポリペプチドを他の材料に連結させるか、または治療薬に結合するために便利に使用され得る化学基を作製するために有用である。

30

【0081】

リコンビナーゼ

本発明の実施形態は、リコンビナーゼ（例えば、RecAタンパク質、RAD51）またはDNA組換えに関連する他のDNA結合タンパク質と共に、標的化ヌクレアーゼ系の投与を含む。リコンビナーゼは核酸断片とフィラメントを形成し、事実上、細胞DNAを探索して、その配列に対して実質的に相同であるDNA配列を見出す。例えば、リコンビナーゼは、HDRの錆型としての役割を果たす核酸配列と結合され得る。リコンビナーゼは次にHDR錆型と結合されてフィラメントを形成し、細胞に挿入される。リコンビナーゼおよび/またはリコンビナーゼと結合するHDR錆型は、タンパク質、mRNAとして、リコンビナーゼをコードするベクターにより、細胞または胚内に挿入され得る。米国特許出願公開第2011/0059160号明細書（米国特許出願第12/869,232号明細書）の開示は、あらゆる目的のために参照によって本明細書中に援用されており、矛盾する場合には、本明細書が支配する。リコンビナーゼという用語は、細胞内で、2本の比較的長いDNA鎖の間における比較的短いDNA片の連結を酵素的に触媒する遺伝子組換え酵素を指す。リコンビナーゼには、Creリコンビナーゼ、Hinリコンビナーゼ、RecA、RAD51、Cre、およびFLPが含まれる。Creリコンビナーゼは、loxP部位間のDNAの部位特異的組換えを触媒するP1バクテリオファージからのI型トポイソメラーゼである。Hinリコンビナーゼは、サルモネラ（Salmonella）細菌において見出される198のアミノ酸で構成される21kDのタンパク質である。Hinは、活性部位セリンに依存してDNA切断および組換えを開始するDNAインベ

40

50

ルターゼのセリンリコンビナーゼファミリーに属する。R A D 5 1はヒト遺伝子である。この遺伝子によりコードされるタンパク質は、D N A二本鎖切断の修復を支援するR A D 5 1タンパク質ファミリーのメンバーである。R A D 5 1ファミリーメンバーは、細菌R e c Aおよび酵母R a d 5 1と相同である。C r eリコンビナーゼは、l o x P部位が隣接する特定の配列を欠失させるために実験で使用される酵素である。F L Pは、パン酵母サッカロミセス・セレビシエ(*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e*)の2 μ プラスミドに由来するフリッパー(*F l i p p a s e*)組換え酵素(F L PまたはF l p)を指す。

【0082】

本明細書では、「R e c A」または「R e c Aタンパク質」は、同じ機能、特に、(i)その後のD N Aポリメラーゼによる伸長のために、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをその相同標的に適切に配置する能力と、(ii)D N A合成のために二本鎖核酸を形態的に調製する能力と、(iii)R e c A / オリゴヌクレオチドまたはR e c A / ポリヌクレオチド複合体が効率的に相補的配列を見出して結合する能力とを本質的に全て、またはその大部分を有するR e c A様組換えタンパク質のファミリーを指す。最もよく特徴付けられたR e c Aタンパク質は、大腸菌(*E. c o l i*)に由来するものである。タンパク質の元の対立遺伝子型に加えて、いくつかの突然変異体R e c A様タンパク質、例えばR e c A 8 0 3が同定されている；さらに、例えば、酵母、ドロソフィラ属(*D r o s o p h i l a*)、哺乳類(ヒトを含む)、および植物を含む多数の生物は、R e c A様ストランド転移タンパク質を有する。これらのタンパク質は、例えば、R e c 1、R e c 2、R a d 5 1、R a d 5 1 B、R a d 5 1 C、R a d 5 1 D、R a d 5 1 E、X R C C 2およびD M C 1を含む。組換えタンパク質の実施形態は、大腸菌(*E. c o l i*)のR e c Aタンパク質である。あるいは、R e c Aタンパク質は、大腸菌(*E. c o l i*)の突然変異体R e c A - 8 0 3タンパク質、別の細菌源由来のR e c Aタンパク質、または別の生物由来の相同組換えタンパク質で得あり得る。

【0083】

遺伝子改変動物

核酸構築物を非ヒト動物に導入して、核酸構築物がゲノムに組み込まれたファウンダーアニメを作製するために、当該技術分野において既知の種々の技術を使用することができる。このような技術には、前核マイクロインジェクション(米国特許第4,873,191号明細書)、レトロウイルス媒介による胚への遺伝子導入、胚幹細胞への遺伝子ターゲティング、胚のエレクトロポレーション、精子媒介による遺伝子導入(L a v i t r a n o e t a l. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99, 14230-14235、L a v i t r a n o e t a l. (2006) Reprod. Fert. Develop. 18, 19-23)、および卵丘もしくは乳腺細胞、または成体、胎児、もしくは胚幹細胞などの体細胞のインビトロ形質転換とその後の核移植が含まれるが、これらに限定されない。前核マイクロインジェクション、精子媒介による遺伝子導入、および体細胞核移植は、細胞質インジェクション、始原生殖細胞移植、および生殖細胞が胚で増殖される胚盤胞キメラ産生と共に、特に有用な技術である。

【0084】

通常、前核マイクロインジェクションでは、核酸構築物は受精卵に導入される；精子頭部および卵からの遺伝子材料を含有する前核は原形質内で目に見えるので、1または2細胞受精卵が使用される。前核段階の受精卵は、インビトロまたはインビボで(すなわち、ドナー動物の卵管から外科的に回収される)得ることができ、インビトロ受精卵を作製することができる。例えば、ブタでは、成熟卵母細胞は、M i n i t u b e 5 ウエル受精ディッシュにおいて500 μ lのM i n i t u b e P O R C P R O I V F M E D I U M S Y S T E M(M i n i t u b e, Verona, WI)中で受精させることができる。インビトロ受精(I V F)の調製において、新たに採取するかまたは凍結した雄ブタ精液を洗浄し、P O R C P R O I V F M e d i u m中に4 \times 10⁵精子になるように再懸濁させることができる。精子濃度は、コンピュータ支援精液分析(S P E R M V I S

10

20

30

40

50

ION、Minitube, Verona, WI)によって分析することができる。最終インビトロ授精は、雄ブタに応じて約40の運動精子/卵母細胞の最終濃度において10μl容積で実施することができる。全ての受精卵母細胞を38.7、5.0%CO₂雰囲気中で6時間インキュベートする。授精の6時間後、推定の接合体をNCSSU-23中で2回洗浄して、0.5mLの同じ培地に移すことができる。この系は、ほとんどの雄ブタに対して常に20~30%の胚盤胞を生じることができ、多精授精率(poly spermic insemination rate)は10~30%である。

【0085】

体細胞核移植では、遺伝子改変細胞または割球、例えば、胚割球、胎児線維芽細胞、成体の耳の線維芽細胞、または顆粒膜細胞を除核卵母細胞に導入して、結合細胞を確立することができる。慣習では、第2減数分裂で停止された卵母細胞は「卵」と呼ばれる。胚の作製後(例えば、卵母細胞の融合および活性化によって)、活性化の約20~24時間後に胚はレシピエントの雌成体の卵管に移植される。標準的な繁殖技術を用いて、最初のヘテロ接合型ファウンダー動物から標的核酸にホモ接合型である動物を作製することができる。

10

【実施例】

【0086】

実施例1 TALENの設計および作製

オンラインツール「TAL EFFECTOR NUCLEOTIDE TARGETER」を用いて、TALEN標的DNA配列およびRVD配列の候補を同定した。次に、最終目的ベクターとしてpCGOLDYTALEN(Addgene ID 38143)およびRCI Script-GOLDYTALEN(Addgene ID 38143)を用いて、Golden Gate Assemblyプロトコルに従って、TALEN DNAトランスフェクションまたはインビトロTALEN mRNA転写のためのプラスミドを構築した(Carlson 2012)。PureLink(登録商標)HiPURE PLASMID MIDIPREPキット(Life Technologies)を用いて最終pCGoldyTALENベクターを作製し、使用の前に配列決定した。以前に示されたように(Carlson, 2010)、mMESSAGE mACHINE(登録商標)T3Kit(Ambion)を用いて、QIAPREP SPIN MINIPREPキット(Qiagen)を用いて作製した構築RCI ScriptベクターをSacIによって直線化し、インビトロTALEN mRNA転写のための鋳型として使用した。以前に示されたように(Carlson 2012)、3'-0-Mem7G(5')ppp(5')G RNAキャップアナログ(New England Biolabs)、5'-メチルシチジン三リン酸ブソイドウリジン三リン酸(Trilink Biotechnologies, San Diego, CA)およびアデノシン三リン酸グアノシン三リン酸からなるリボヌクレオチド混合物を代わりに用いて、RCI Script-GOLDYTALENベクターから改変mRNAを合成した。最終ヌクレオチド反応濃度は、キャップアナログについては6mM、グアノシン三リン酸については1.5mM、および他のヌクレオチドについては7.5mMである。得られたmRNAは、MEGACLEAR REACTION CLEANUPキット(Applied Biosciences)を用いて精製前に処理されたデオキシリボヌクレアーゼであった。

20

【0087】

実施例2 CRISPR/Cas9の設計および作製

方法(Mali, 2013)に従って、遺伝子特異的gRNA配列をChurch lab gRNAベクター(Addgene ID: 41824)にクローニングした。Cas9ヌクレアーゼは、hCas9プラスミド(Addgene ID: 41815)のコトランスフェクション、またはRCI Script-hCas9から合成されるmRNAのいずれかによって提供した。このRCI Script-hCas9は、hCas9プラスミド(hCas9 cDNAを包含する)からRCI ScriptプラスミドへのX

30

40

50

b a I - A g e I 断片のサブクローニングによって構築した。m R N A の合成は、K p n I を用いて直線化を実施したことを除いて上記のように行った。

【0088】

実施例3 ドナー修復鑄型の調製

A) B B - H D R (1 , 6 2 3 b p) プラスミド。ベルジャン・ブルーゲノムD N A からのベルジャン・ブルー対立遺伝子を包含する 1 , 6 9 5 b p 断片をP C R 増幅し (b t G D F 8 B B 5 - 1 : 5 ' - C A A A G T T G G T G A C G T G A C A G A G G T C (配列番号 1 5) ; b t G D F 8 B B 3 - 1 : 5 ' - G T G T G C C A T C C C T A C T T T G T G G A A (配列番号 1 6)) 、 P C R 2 . 1 ベクター (L i f e T e c h n o l o g i e s) にT O P O クローニングした。このプラスミドは、分析プライマー-セットの陽性対照の鑄型として、および以下のプライマー (B B d e l H R 1 6 2 3 5 - 1 : 5 ' - G A T G T A T T C C T C A G A C T T T T C C (配列番号 1 7) ; B B d e l H R 1 6 2 3 3 - 1 : 5 ' - G T G G A A T C T C A T C T T A C C A A (配列番号 1 8)) を用いたP C R よる 1 , 6 2 3 b p のB B - H D R 鑄型の誘導のために使用し、上記と同様にT O P O クローニングした。各プラスミドは、使用の前に配列を確認した。F a s t - I o n M I D I P L A S M I D E N D O - F R E E キット (I B I S c i e n t i f i c) を用いてトランスフェクショングレードのプラスミドを調製した。r A A V パッケージング。A D E N O - A S S O C I A T E D V I R U S H E L P E R - F R E E システム (A g i l e n t) を用いて、B B - H D R をp A A V - M C S にクローニングし、パッケージングした。簡単に言うと、1 0 c m ディッシュのA A V - 2 9 3 細胞をそれぞれ 5 μ g のp A A V - H e l p e r 、p A A V - R C およびA A V - B B - H D R プラスミドによりトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後、スクレ-ピングにより細胞をプレートから 1 m l の成長培地に取り出した。3回の凍結融解サイクルによりウイルス粒子を遊離させた後、微量遠心機において最大速度で5分間遠心分離した。上澄みを吸引し、標的細胞の感染のために直接使用した。

【0089】

B) 無角 1 5 9 4 鑄型。アンガスゲノムD N A からの 3 8 3 のP O L L E D 対立遺伝子を包含する 1 , 7 8 4 b p 断片をP C R 増幅し (F 1 : 5 ' - G G G C A A G T T G C T C A G C T G T T T T G (配列番号 1 9) ; R 1 - 5 ' - T C C G C A T G G T T T A G C A G G A T T C A (配列番号 2 0)) 、 P C R 2 . 1 ベクター (L i f e T e c h n o l o g i e s) にT O P O クローニングした。このプラスミドは、分析プライマー-セットのための陽性対照の鑄型として、および以下のプライマー (1 5 9 4 F : 5 ' - A T C G A A C C T G G G T C T T C T G C A T T G (配列番号 2 1) ; R 1 : 5 ' - T C C G C A T G G T T T A G C A G G A T T C A (配列番号 2 2)) を用いたP C R よる 1 , 5 9 2 b p のH D R 鑄型の誘導のために使用し、上記と同様にT O P O クローニングした。各プラスミドは、使用の前に配列を確認した。F a s t - I o n M I D I P l a s m i d E n d o - F r e e キット (I B I S c i e n t i f i c) を用いてトランスフェクショングレードのプラスミドを調製し、5 μ g または 1 0 μ g を、2 μ g のH P 1 . 3 T A L E N m R N A と共にトランスフェクトした。全てのオリゴヌクレオチド鑄型を、I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s によって合成し、1 0 0 n m o l e の合成を標準的な脱塩により精製し、T E 中 4 0 0 μ M で再懸濁した。

【0090】

実施例4 組織培養およびトランスフェクション

ブタまたはウシ線維芽細胞は、1 0 % ウシ胎児血清、1 0 0 I . U . / m l のペニシリンおよびストレプトマイシン、および 2 m M のL - グルタミンが補充されたD M E M 中 5 % のC O 2 で、3 7 または 3 0 (指示通り) において保持した。トランスフェクションについては、他に記載されない限り、全てのT A L E N およびH D R 鑄型を、N E O N トランスフェクション系 (L i f e T e c h n o l o g i e s) を用いるトランスフェクションによって送達した。簡単に言うと、1 0 0 % コンフルエンスに達している低継代数のオッサバウ (O s s a b a w) 、ランドレース (L a n d r a c e) 、和牛、または

10

20

30

40

50

ホルスタイン線維芽細胞を1:2に分割し、70~80%のコンフルエンスで次の日に回収した。各トランスフェクションは、プラスミドDNAまたはmRNAおよびオリゴ(oligo)と混合した緩衝液「R」中に500,000~600,000細胞を再懸濁し、以下のパラメータ：入力電圧1800V、パルス幅20ms、およびパルス数1により100μlチップを用いて電気穿孔することで構成された。通常、各トランスフェクションには、2~4μgのTALEN発現プラスミドまたは1~2μgのTALEN mRNAおよび2~3μMの対象とする遺伝子に特異的なオリゴが含まれた。これらの量からの偏差は図面の説明文に示される。トランスフェクションの後、細胞を60:40に分割して6ウェルディッシュの2つの別々のウェルに入れ、それぞれ30または37のいずれかで3日間培養した。3日後に細胞集団は増殖され、37で少なくとも10日目まで、編集の安定性を評価した。10

【0091】

実施例5 希釀クローニング

トランスフェクションの3日後、50~250の細胞を10cmディッシュに播種し、個々のコロニーが直径約5mmに達するまで培養した。この時点で、PBS中に1:5(vol/vol)で希釀した6mlのTRYPLE(Life Technologies)を添加し、コロニーを吸引し、24ウェルディッシュウェルのウェルに移植し、同じ420条件下で培養した。コンフルエンスに達したコロニーを捕集し、凍結保存および遺伝子型同定のために分割した。サンプルの調製：3日目および10日目にトランスフェクトされた細胞集団を6ウェルディッシュのウェルから採取し、10~30%を、50μlの1XPCR適合性溶解緩衝液：200μg/mlのプロテイナーゼKが新たに補充された、10mMのTris-Cl pH8.0、2mMのEDTA、0.45%のTryton X-100(vol/vol)、0.45%のTween-20(vol/vol)中に再懸濁させた。以下のプログラム：55で60分間、95で15分間を用いて、ライセートを熱サイクルで処理した。希釀クローニングからのコロニーサンプルは、20~30μlの溶解緩衝液を用いて上記のように処理した。20

【0092】

実施例6

POLLED遺伝子移入の検出は、1X MyTaq Redミックス(Bioline)を用いて38サイクル(95で25s、62で25s、72で60s)、F1プライマー(上記の実施例3を参照)および「P」プライマー(5'-ACGTACCTCTTCATTTCACAGCCTAC)(配列番号23)を用いるPCRによって実施した。第2のPCRアッセイは、(F2:5'-GTCCTGGGGTGAGATAGTTTCTTGG(配列番号24)；R2-5'-GGCAGAGATGTTGGTCTTGCGGTGT)(配列番号：25)を用いて実施した。両方の試験に合格した候補を、隣接するF1およびR1プライマーを用いるPCRと、その後のTOPOクローニング、ならびに配列決定により分析した。30

【0093】

実施例7 アンプリコンの配列決定および分析

トランスフェクトした集団からDNAを単離し、100~250ngを、製造業者の推薦に従って構築された50μlのPLATINUM TAQ DNA POLYMERASE HIGH FIDELITY(Life Technologies)に添加した。各サンプルは、多重配列決定を可能にするために独自のバーコードを有するプライマーセットに割り当てた。PCR産物の一部を2.5%アガロースゲルで分解して大きさを確認し、その後MINELUTE PCR PURIFICATION Kit(Qiagen)を用いるPCRクリーンアップを行った。サンプルを定量し、配列決定のための单一サンプルにプールした。混ぜ合わせた単一のサンプルに25%PhiXを入れ(配列多様性のため)、 Illumina MISEQ配列決定装置において配列決定し、150塩基対のペアードエンド読み取り(pair read-end read)が生じた。FASTQC Read-pairsを用いて読み取り品質を評価し、重複端部は、EA-UTIL40

10

20

30

40

50

SパッケージからのFASTQ-JOINを用いて連結した。カスタムPERLスクリプトを用いて、連結された読み取りを逆多重化し、インサートタイプをカウントした。逆多重化(demultiplexing)ステップでは順方向および逆方向プライマーの正確な一致が必要とされた。RFLPアッセイおよび配列決定によりクローン化動物の遺伝子型を同定した。

【0094】

実施例8 TALENをコードするmRNAによる家畜細胞のトランスフェクションは効率的な標的切断をもたらす。

TALEN cDNA (TALENペアP6511.1およびDMD7.1)を、以前に記載された(Carlson, 2010)ように転写されるpT3TSクローニングベクター内のT3プロモーターの下流にクローニングし、MINELUTE PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製した後、製造業者のプロトコルに従ってMESSAGE MACHINE T3キット(Applied Biosciences)を用いて、mRNA合成を行った。Carlson 2013も参照されたい。3'-0-Me-m⁷G(5')ppp(5')G mRNAキャップアナログ(New England Biolabs)、5-メチルシチジン三リン酸ブソイドウリジン三リン酸(Trilink Biotechnologies, San Diego, CA)および2つの標準リボヌクレオチド、アデノシン三リン酸およびグアノシン三リン酸からなるリボヌクレオチド混合物を代わりに用いてMESSAGE MACHINE T3キット(Applied Biosciences)によって、同じベクターから改変mRNAを合成した。mRNA合成反応をデオキシリボヌクレアーゼ処理した後、MEGACLEAR REACTION CLEANUPキット(Applied Biosciences)を用いて精製した。a)以下の設定: 1パルス、1800v; 20ms幅および1000ulチップでNEONヌクレオフェクション系(Life Technologies)を用いて、指示される量のp6511.1 TALENをブタ線維芽細胞にトランスフェクトした(複製物あたり500,000~750,000細胞)。トランスフェクト細胞を30または37で3日間培養した後、サーベイヤーアッセイ(Transgenomic)によりインデル分析を行った。Guischinet al., 2010において記載されるようにNHEJパーセントを計算し、グラフにプロットした。NHEJ%の比較のために、p6511.1 TALENをコードする4マイクログラムのプラスミドDNA(pDNA)も同じ条件下でトランスフェクトした。b)mRNAの構造、組成またはインビトロ合成反応スキームは、TALEN活性に対してあまり影響を与えない。DMD7.1 TALENをコードするmRNAは、標準または改変リボヌクレオチドを用いて、個々に(「I」、別々の反応におけるleftおよびright TALEN)、または同じ反応(Dual 「D」)のいずれかによって合成した。次に、反応を2つの複製物に分割し、その一方に、製造業者のプロトコルに従ってPoly(A) Tailing Kit(Ambion)を用いて付加的なpolyAテイルを付加した。

【0095】

プラスミドDNAからのTALENの発現は、家畜細胞におけるTALEN媒介によるインデルの誘導のために有効な方法であった; しかしながら、TALENをコードするプラスミドを細胞のゲノムへ組込むことが可能である。対照的に、mRNAを宿主細胞のゲノムに組み込むことはできない。TALENをコードするプラスミドの組込みを回避するために、TALENをコードするmRNAのトランスフェクションによって同様のレベルのTALEN活性が達成され得るかどうかを決定するための実験を実施した。標準または改変リボヌクレオチドのいずれかを用いて、p6511.1 TALENペアをコードするTALENのためのmRNAを作製した。2つの量の各TALEN mRNA調製物をヌクレオフェクションによりブタ線維芽細胞にトランスフェクトし、30または37で3日間培養した後、インデルの分析を行った。30でインキュベートした全てのmRNAトランスフェクションについてNHEJパーセントは同様であったが、37でインキュベートしたトランスフェクト細胞については用量応答が観察された。改変リボヌクレ

10

20

30

40

50

オチドと標準リボヌクレオチドとの間のNHEJパーセントの著しい違いはこの複製物では検出できなかったが、同等の量を使用しなかった。特に、30でインキュベートした全ての群におけるmRNAトランスフェクションは、同じ条件下でプラスミドDNAとしてトランスフェクトされたp6511.1 TALENよりも著しく優れていた。

【0096】

第2の遺伝子座、ブタDMDにおいて改変ヌクレオチド対標準ヌクレオチドで合成されたmRNAの影響を調査するために別の実験を実施した。この実験は、polyAテイルの付加がTALEN活性に影響を与えるかどうか、および各TALEN単量体(leftおよびright単量体)が同じ転写反応(Dual)で合成できるかどうか、あるいはこれらを個々に合成して、トランスフェクションの前に混合しなければならないかどうかを評価した。1または4マイクログラムのDMD7.1 TALEN mRNAをブタ線維芽細胞にトランスフェクトし、30または37で3日間培養した。p6511.1

TALENと同様に、30で培養した細胞において、TALEN活性の違いはほとんど観察されず、改変ヌクレオチド、mRNAのインビトロポリアデニル化またはmRNAの二重転写はいずれも活性に影響を与えないことが示唆された。4μgのmRNAが1μgのトランスフェクションよりも優れていたので、この場合も用量応答性が37培養の複製物において観察できた。また、ポリアデニル化mRNAは、37の複製物において非アデニル化mRNAよりも優れているようであった。

【0097】

特に、DMD7.1 TALENをコードするプラスミドDNAをブタ線維芽細胞にトランスフェクトする場合、14日目まで培養された細胞に対して3日目に測定されたNHEJ%レベルの著しい低下(40~60%)が認められた。このようなNHEJ%の低下は、本明細書に示されるmRNAトランスフェクト複製物のいずれについても観察されなかった、14日目の改変レベルについてのデータは示されない。従って、mRNAトランスフェクションは、TALEN活性についてだけでなく、長期間の培養後に高比率の改変細胞を維持することについても、DNAトランスフェクションよりも優れているようである。特定の理論に束縛されないが、この結果は、プラスミドDNAに対して、mRNAでトランスフェクトされた場合に、細胞生存率が改善されるためであると考えられる。

【0098】

実施例9 選択せずにmRNAトランスフェクションにより作製されたコロニーの分析

実施例8と同様に、TALENをコードする1~4マイクログラムのmRNAをウシまたはブタ初代線維芽細胞に添加した。TALENに暴露した後3日間、細胞を30で成長させ、細胞の数を数え、10cmのディッシュに1~20細胞/cm²の密度範囲でプレーティングした。直径3~4mmの個々のコロニーが観察されるまで、細胞を10~15日間培養した。p-200ピペッタを用いて穏やかな吸引の下でコロニーを吸引し、500μlの成長培地(Carlson, 2011)を有する24ウェルプレートのウェルに排出した。明確に画定されるコロニー(約10~30/プレート)を有するプレートをコロニー吸引のために選択し、複数のコロニーから細胞を吸引する可能性を制限した。24ウェルディッシュにおいてコロニーが70~90パーセントコンフルエントに到達したら、インデル分析のために一部を回収し、残りを凍結保存した。インデルの結果は線維芽細胞クローンにおける遺伝子型分布の表の最後の5行に示される。これらの結果は、選択マーカーを使用することなく、TALEN mRNAがトランスフェクトされた線維芽細胞からコロニーを容易に単離できることを実証する。分析されたクローンの突然変異頻度は、3日目のソース集団の改変レベルによって正確に予測された。2対立遺伝子の改変を有するクローンも容易に同定することができた。

【0099】

10

20

30

40

【表1】

線維芽細胞クローンにおける遺伝子型分布の表

TALEN ベア	選択	3 日目 改変	予測された	予測された	観察された	観察された
			改変 クローン%	2 対立遺伝子 改変%	(%)	2 対立遺伝子 改変(%)
LDLRE2.1	Puro	ブタ ♂	19	34.5	10.5	30/81 (37)
LDLRE2.1	Puro	ブタ ♀	21.5	38.3	12	23/76 (30)
LDLRE2.1	Puro	ブタ ♂	14.4	26.7	7.7	12/94 (13)
LDLRE2.1-2x ^B	Puro	ブタ	19.7	35.5	10.9	8/24 (33)
LDLRE4.2	Puro	ブタ ♂	20	36	11.1	4/48 (8.3)
LDLRE4.2	Puro	ブタ ♀	19	34.4	10	8/47 (17)
DMDE6	Puro	ブタ	25	43.8	15.6	17/35 (49)
DMDE7.1	Puro	ブタ	27	47	15.6	12/29 (41)
DMDE7.1-2x ^B	Puro	ブタ	22	39.2	12.4	22/41 (54)
GHRHR2.3	G-418	ブタ	29	50	17	26/43 (60)
ACAN12	Puro	雌ウシ	29	50	17	27/35 (77)
btGDF83.1	Puro	雌ウシ	17	31	9.3	7/24 (29)
GHRHR2.3	なし	ブタ ♂	32.5	55	19.4	21/25 (84)
GHRHR2.3	なし	ブタ ♀	35	58	21	13/13 (100)
LDLR2.1	なし	ブタ ♀	34	57	20	88/166 (53)
btGDF83.1	なし	雌ウシ	29	50	17	23/45 (51)
btGDF83.1	なし	雌ウシ	35	58	21	23/41 (56)

^A 2 対立遺伝子 KO を PCR 産物の配列決定により同定した。この技術を使用して重複またはホモ接合型欠失のみを同定することができる。

^B 同じ TALEN ベアを用いて 2 週間以内に 2 回線維芽細胞を移植および回収した。

^C 5/15 の 2 対立遺伝子コロニーをダブルフレームシフト対立遺伝子と確認した。

^D PCR アンプリコンにおいて識別可能な大規模欠失を有するコロニーのみを分析した。

^E 2 対立遺伝子 KO コロニーを高解像度融解分析により同定した。ホモ接合型改変のみを同定することができる。

†- 95%信頼区間が期待される 2 対立遺伝子帰無仮説を超える

【0100】

実施例 10 DNA および mRNA コード化 T A L E N は精原幹細胞において活性である。

ブタ生殖細胞を 10 週齢の雄ブタから単離し、分画 (d i f f e r e n t i a l) により濃縮した。プログラム X - 001 および X - 005 を使用し、A M A X A N U C L E O F F E C T O R 系 A m a x a 溶液「V」- および「L」および「B」を用いて、e G F P および D M D 特異的 T A L E N をコードするプラスミドを生殖細胞にトランスフェクトした。C a r l s o n 2 0 1 3 も参照されたい。各トランスフェクション反応は、10⁶ の濃縮生殖細胞、および指示されるマイクログラムの T A L E N コードプラスミド D N A により実施した。同じ方法を用いて、D M D 7 . 1 T A L E N をコードする m R N A を送達した。スクレオフェクションの後、これらを 5 % C O₂ 霧囲気中、37 または 30

で 5 日間培養した。G F P および U C H - L 1 の発現の共局在化について免疫蛍光分析によりトランスフェクション効率を評価した。細胞生存率は、トリパンブルー排除によって評価した。

【0101】

実施例 11 始原生殖細胞における T A L E N 刺激 H D R

また T A L E N 刺激 H D R は、ニワトリ始原生殖細胞 (P G C) において、ニワトリ D

10

20

30

40

50

d × 4 遺伝子座で試験した。2つのT A L E Nペアをイントロン1 (T a 1 1 . 1) およびエクソン7 (T a 1 7 . 1) 上に構築し、これらの機能をD F 1ニワトリ細胞において確認した。実施例8およびCarlson 2013も参照されたい。続いて、G F PをD *d* × 4 遺伝子のエクソン2と融合させるように設計したドナーターゲティングベクターにより、各T A L E Nペアをコトランスフェクトした。予想されるように、T a 1 1 . 1 による切断は相同組換えを刺激したが、ドナーターゲティングベクター内の相同配列の外側にあるT a 1 7 はH D Rを刺激しなかった。

【0102】

実施例12 T A L E N刺激H Rによる有角細胞へのウシ無角対立遺伝子の遺伝子移入

無角対立遺伝子は最近同定された (Medugorac, Seichter et al. 2012) (図1の略図)。無角において重複される領域の3'を切断するために4つのT A L E Nペアを設計した (図1)。T A L E Nペアをコードするm R N Aを用いて有角ホルスタイン線維芽細胞をトランスフェクトし、トランスフェクションの3日後の活性について分析した。サーベイヤーアッセイにより、各T A L E Nペアの活性が明らかになった (図1)。ピーク活性はH P 1 . 3により観察され、従って次の実験のためにこれを選択した。有角ホルスタイン初代線維芽細胞を、指示される量および処理で、s s D N A修復鋳型と共に2マイクログラムH P 1 . 3 T A L E N m R N Aによりトランスフェクトした (図4)。トランスフェクションの3日後に、P C Rによる無角への変換について細胞の集団を分析した。N L S - R e c A - G a 1 4による修復鋳型のコーティング (Liao and Essner 2011)は、無角変換の頻度に対して著しい効果を有した (図4パネルbおよびc)。無角変換は個々のコロニーにおいて明白であった (図3)。

10

20

20

30

30

【0103】

方法: N E O Nトランスフェクション系を用いて、以下のパラメータ (1パルス; 1800 v; 20 ms幅) 下で約600,000の細胞をトランスフェクトした。各トランスフェクションは、指示される修復鋳型と共に、2マイクログラムのT A L E N m R N Aで構成した。以下の方法により修復鋳型をG a 1 4 : R e c Aでコートした。500ナノグラム (全部で3 u l) の修復鋳型P C R産物を95 °で10分間インキュベートし、氷上に2分間置いた後、0.8 u lの緩衝液 [100 mMのTris-OAc、pH 7.5; 500 mMのNaOAc; 10 mMのDTT; 10 mMのMg(OAc)₂]、0.6 u lの16.2 mMのA T P S (Sigma) および1,250 ngのN L S - R e c A - G a 1 4を8 u lの全反応容積で添加した。次に、この反応を37 °で30分間インキュベートし、氷上に置いた。全容積を单一のトランスフェクションで使用した。以前に記載された方法 (Carlson, Tan et al. 2012) を用いて細胞を培養し、分析した。591 bpのH D R鋳型を使用した。

【0104】

実施例13

無角対立遺伝子を遺伝子移入するために本明細書に記載される方法によって作製した細胞、またはそれにより改変した胚をクローニングし、および/または代理雌に移植し、懷胎させ、無角対立遺伝子を含む生きた動物として誕生させる。

40

【0105】

さらなる開示

1. 有角対立遺伝子から無角対立遺伝子へのゲノム改変を含む、遺伝子改変家畜動物。
2. 動物が有角対立遺伝子を有する第1の動物品種であり、無角対立遺伝子が第2の動物品種において見出される、1の動物。
3. 無角対立遺伝子が天然対立遺伝子および合成対立遺伝子からなる群から選択される、1または2の動物。
4. 天然対立遺伝子がその品種に特有であるか、あるいはその品種の突然変異対立遺伝子である、3の動物。
5. 第1の品種が、ヘレフォード、アンガス、ショートホーン、シャロレー、リムザン、シンメンタール、ブラーマン、ブランガス、和牛、およびサンタ・ガートルーディス、エアシャー、ブラウン・スイス、カナディアンヌ、ダッチ・ベルテッド、ガーンジー、ホルスタイン (

50

ホルスタイン・フリーシアン)、ジャージー、ケリー、ミルキング・デボン、ミルキング・ショートホーン、ノルウェージャン・レッド、ブサ、カナディアンヌ、エストニアン・レッド、フレックフィー、フリーイアン、ジロランド、イラワラ、アイリッシュ・モイルド、ラインバック、ムーズ・ライン・イッセル、モンベリアルド、ノルマンド、ランドール、サヒワール、オーストラリアン・ミルキング・ゼブ、シンメンタール、キアニーナ・マルキジャーナ、ロマニヨーラからなる群から選択される、1～4のいずれかの動物。6
 10. 第2の品種が、アンガス、レッド・アンガス、レッド・ポール、ギャロウェイ、ベルテッド・ギャロウェイ、アメリカン・ホワイト・パーク、ブリティッシュ・ホワイト、アメリカン・ブックス、ジャマイカ・ブラック、ジャマイカ・レッド、マレー・グレイ、ブランガス、レッド・ブランガス、セノポール、ボア (Boer) ヤギからなる群から選択される、1～5のいずれかの動物。7. 無角対立遺伝子が、P_c ケルト起源およびP_f フリーシアン起源からなる群から選択される、1～6のいずれかの動物。8. ファウンダー動物またはファウンダー動物の子孫である、1～7のいずれかの動物。9. マーカーを含まない、および/またはレポーターを含まない、1～8のいずれかの動物。10. ゲノム改変が無角対立遺伝子においてのみ成されている、1～9のいずれかの動物。11. 遺伝子改変生物がウシ、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄類からなる群から選択される、10の方法。12. 1～11のいずれかの動物または前記動物の子孫の家畜としての使用。13. 細胞の有角対立遺伝子に対するゲノム改変を含むインビトロ細胞。14. 有角遺伝子座における改変が、有角対立遺伝子から無角対立遺伝子への修飾である、13の細胞。15. 細胞が家畜細胞である、13または14の細胞。16. 細胞が、ウシ、ヤギ、ヒツジ、および偶蹄類からなる群から選択される13～15のいずれかの細胞。17. 細胞が、ヘレフォード、アンガス、ショートホーン、シャロレー、リムザン、シンメンタール、ブラーマン、ブランガス、和牛、およびサンタ・ガートルーディス、エアシャー、ブラウン・スイス、カナディアンヌ、ダッチ・ベルテッド、ガーンジー、ホルスタイン(ホルスタイン・フリーシアン)、ジャージー、ケリー、ミルキング・デボン、ミルキング・ショートホーン、ノルウェージャン・レッド、ブサ、カナディアンヌ、エストニアン・レッド、フレックフィー、フリーイアン、ジロランド、イラワラ、アイリッシュ・モイルド、ラインバック、ムーズ・ライン・イッセル、モンベリアルド、ノルマンド、ランドール、サヒワール、オーストラリアン・ミルキング・ゼブ、シンメンタール、キアニーナ・マルキジャーナ、およびロマニヨーラからなる群から選択される家畜細胞である、13～15のいずれかの細胞。18. 細胞が、初代細胞、初代体細胞、または接合体である、13～17のいずれかの細胞。19. 家畜の幹細胞または始原生殖細胞である、13～17のいずれかの細胞。20. 細胞が改変を受ける場合、無角対立遺伝子をコードする相同性依存型組換え錠型を含む、13～19のいずれかの細胞。21. 細胞の有角対立遺伝子において染色体DNAを切断するために、部位特異的なエンドヌクレアーゼをさらに含む、20の細胞。22. 動物をクローニングするための、12～21のいずれかの細胞の使用。23. 例えば、mRNAおよび/またはHDR錠型のように、無角対立遺伝子をコードし、天然有角対立遺伝子と重複する配列を含む単離(または合成、または天然から分離された)核酸。24. 23の単離核酸を発現させるためのプラスミドまたは他のベクター。核酸は、例えばキットとして、他の成分と混合することができる。25. 遺伝子改変された家畜生物の作製方法であって、家畜初代細胞、家畜初代体細胞、家畜幹細胞、家畜始原生殖細胞、家畜接合体、家畜胚盤胞、または家畜胚の天然有角対立遺伝子を変更することを含み、有角対立遺伝子が無角対立遺伝子に変更される、方法。26. 家畜がウシ、ヤギ、およびヒツジからなる群から選択される、25の方法。27. 家畜初代細胞、家畜初代体細胞、家畜幹細胞、家畜始原生殖細胞、家畜接合体、家畜胚盤胞、または家畜胚の天然有角対立遺伝子に、天然有角対立遺伝子内の部位を特異的に切断する部位特異的ヌクレアーゼをコードする核酸と、無角対立遺伝子を含む核酸相同性依存型組換え錠型とを導入することを含む、25または26の方法。28. 部位特異的ヌクレアーゼが、ジンクフィンガヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)および規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列(Clustered Regular

10

20

30

40

50

ly Interspaced Short Palindromic Repeat) (CRISPR) からなる群から選択される、25～27の方法。29. 初代体細胞が変更される、25～28のいずれかの方法。30. 胚が変更される、25～28のいずれかの方法。31. 接合体、胚盤胞、または胚を妊娠母動物に移植することをさらに含む、25～28、または30のいずれかの方法。33. 初代細胞、初代体細胞、または接合体をクローニングして動物全体を作製することをさらに含む、25～29のいずれかの方法。34. 25～32のいずれかの方法で作製された家畜動物。34. 無角表現型を有する家畜ファウンダー動物を作製するための、25～32のいずれかの方法の使用。

【0106】

参考文献

10

本明細書内のいずれかに記載される特許出願、特許、刊行物、および雑誌論文は、全ての目的のために参照によって本明細書に援用され、矛盾する場合には本明細書が支配する。

M. CHRISTIAN, et al., Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases, 186 Genetics (2010).

J. C. MILLER, et al., A TALE nuclease architecture for efficient genome editing, 29 Nature Biotech. (2011).

D. A. MCGREW & K. L. KNIGHT, Molecular design and functional organization of the RecA protein, 38 Crit Rev Biochem Mol Biol (2003).

M. M. COX, Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein, 63 Prog Nucleic Acid Res Mol Biol (1999).

B. REISS, et al., RecA protein stimulates homologous recombination in plants, 93 Proc Natl Acad Sci USA (1996).

B. REISS, et al., RecA stimulates sister chromatid exchange and the fidelity of double-strand break repair, but not gene targeting, in plants transformed by Agrobacterium, 97 Proc Natl Acad Sci USA (2000).

O. G. SCHERBAKOVA, et al., Overexpression of bacterial RecA protein stimulates homologous recombination in somatic mammalian cells, 459 Mutat Res (2000).

R. J. YANEZ & A. C. PORTER, Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRAD51, 6 Gene Ther (1999).

Z. CUI, et al., RecA-mediated, targeted mutagenesis in zebrafish, 5 Mar Biotechnol (NY) (2003).

N. TAKAHASHI & I. B. DAWID, Characterization of zebrafish Rad52 and replication protein A for oligonucleotide-mediated mutagenesis, 33 Nucleic Acids Res (2005).

T. CERMAK, et al., Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL eff

50

ector-based constructs for DNA targeting, (in press) *Nucl. Acids Res.* (2011).

D. F. CARLSON, et al., Strategies for selection marker-free swine transgenesis using the Sleeping Beauty transposon system, 20 *Transgenic Res.* (2011).

A. M. GEURTS, et al., Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases, 325 *Science* (2009).

I. D. CARBERY, et al., Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases, 186 *Genetics* (2010). 10

T. MASHIMO, et al., Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases, 5 *PLoS One* (2010).

L. TESSON, et al., Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs, 29 *Nat Biotechnol* (2011).

C. J. PALGRAVE, et al., Species-specific variation in RELA underlies differences in NF-kappab activity: a potential role in African swine fever pathogenesis, 85 *J Virol* (2011). 20

C. MUSSOLINO, et al., A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity, *Nucleic Acids Res.* (2011).

D. Y. GUSCHIN, et al., A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification, 649 *Methods Mol Biol.* (2010). 30

Y. DOYON, et al., Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption, 7 *Nat Methods* (2010).

H. J. KIM, et al., Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly, 19 *Genome Res.* (2009).

H. J. LEE, et al., Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases, 20 *Genome Res.* (2010). 40

E. E. PEREZ, et al., Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases, 26 *Nat Biotechnol* (2008).

D. J. BLAKE, et al., Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle, 82 *Physiol Rev* (2002).

L. GROBET, et al., A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscl 50

ed phenotype in cattle, 17 Nat Genet (1997).

R. KAMBADUR, et al., Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle, 7 Genome Res (1997).

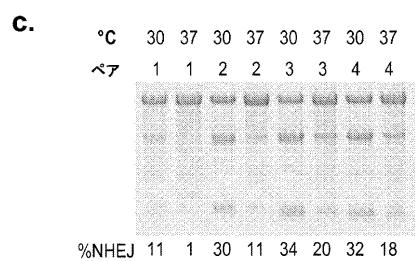
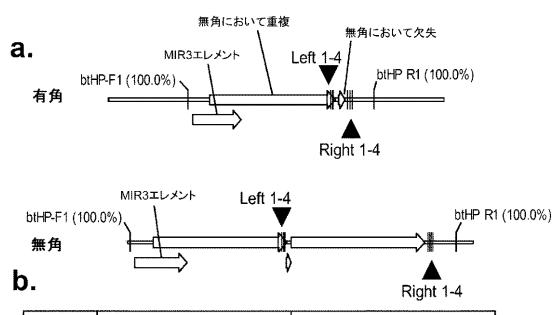
Carlson, D. F., W. Tan, et al. (2012). "Efficient TALEN-mediated gene knockout in live stock." Proceedings of the National Academy of Sciences.

Liao, H. K. and J. J. Essner (2011). "Use of recombinant fusion proteins to induce genomic modifications in zebrafish." Nucleic acids research 39(10):4166-4179. 10

Medugorac, I., D. Seichter, et al. (2012). "Bovine polledness - an autosomal dominant trait with allelic heterogeneity." PLoS one 7(6):e39477.

Carlson et al., (2013) "Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases." Proceedings of the National Academy of Sciences. 20

【図1】



【図2】

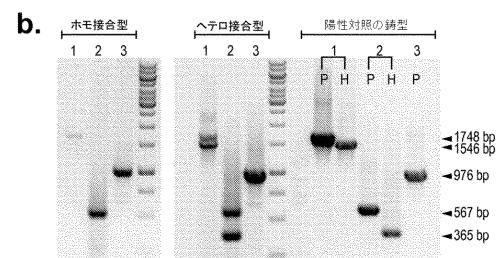
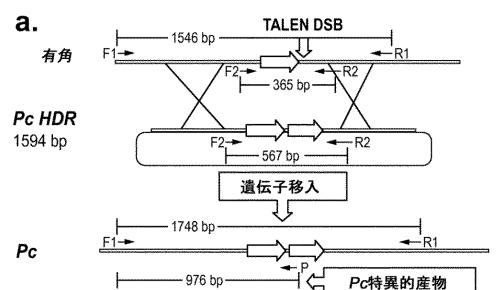


図2

図1

【 図 3 】

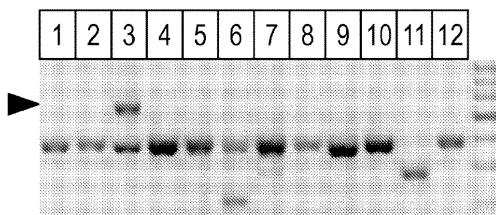
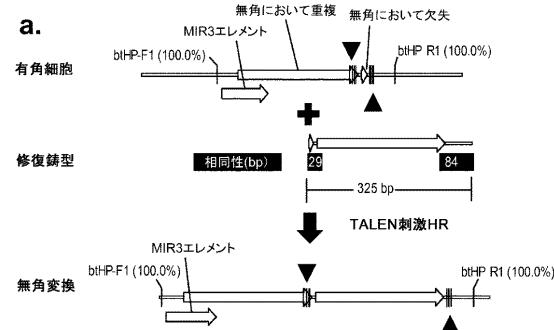


図3

【 図 4 】

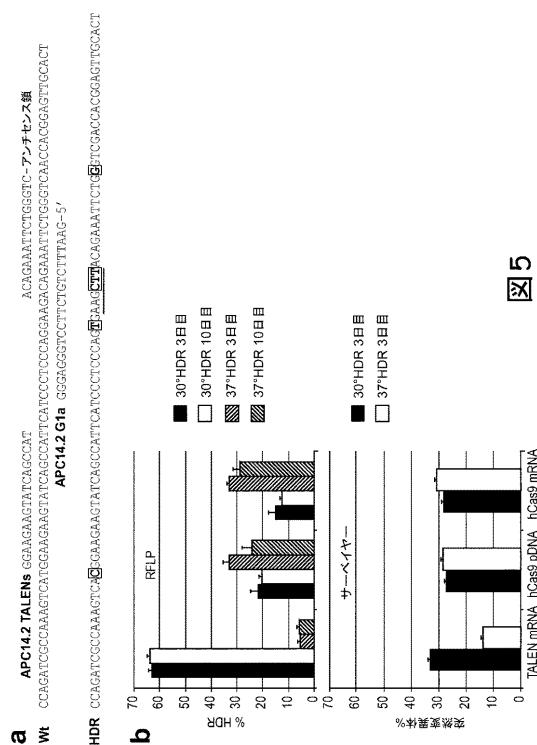


b. HP-5 (500 ng ssDNA+NLS-RecA-Gal4) 25/48

c. HP-1 (1,500 ng ssDNA) 8/48

义 4

【 四 5 】



5

【配列表】

2016507228000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/011418
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01K 67/027 (2014.01) USPC - 800/14 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A01K 67/027, C12N 5/07, 15/63, 15/85 (2014.01) USPC - 800/14, 435/6.1, 435/325, 435/455		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A01K 67/027, C12N 5/10, 15/63, 15/85 (2014.01)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO, Orbit, Google Patent, Google Scholar, Google		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRIEDMANN et al., "Precision Editing of Large Animal Genomes," Advances in Genetics, Vol. 80, Chapter 2, Pgs. 1-97, ISSN 0065-2660. 17 October 2012 (17.10.2012)	1-4, 13-15, 25-27
Y	US 2012/0222143 A1 (FAHRENKRUG et al) 30 August 2012 (30.08.2012) entire document	23, 24
P, X	US 2013/0117870 A1 (FAHRENKRUG et al) 09 May 2013 (09.05.2013) entire document	1-4, 13-15, 23-27
A	US 2011/0262909 A1 (CARGILL et al) 27 October 2011 (27.10.2011) entire document	1-4, 13-15, 23-27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 March 2014	Date of mailing of the international search report 04 APR 2014	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/011418

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 5-12, 16-22, 28-34 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,H,R,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 スコット・シー・ファーレンクラッグ

アメリカ合衆国 5 5 4 1 8 ミネソタ州ミネアポリス、ヘイズ・ストリート 2 7 5
1 番

(72)発明者 ダニエル・エフ・カールソン

アメリカ合衆国 5 5 1 2 5 ミネソタ州ウッドベリー、ジュノー・アルコープ 9 1 2 7 番
F ターム(参考) 4B024 AA10 CA03 CA04 CA11 CA12 CA20 EA04 GA11 HA09 HA20
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA02 CA60