(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2019-509059
(P2019-509059A)
(43)公表日　平成31年4月4日(2019.4.4)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/877	(2010.01)	C12N	15/877	Z	4B065
A01K 67/027	(2006.01)	A01K	67/027	ZNA	4H045
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		
C12N 5/0735	(2010.01)	C12N	5/0735		
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 84 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-561930 (P2018-561930)
(86)(22)出願日　平成29年2月16日 (2017.2.16)
(85)翻訳文提出日　平成30年8月15日 (2018.8.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/018166
(87)国際公開番号　WO2017/143062
(87)国際公開日　平成29年8月24日 (2017.8.24)
(31)優先権主張番号　62/295,524
(32)優先日　平成28年2月16日 (2016.2.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　597160510
リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
ＲＥＧＥＮＥＲＯＮ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国１０５９１－６７０７ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード７７７番
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田　誠
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100142907
弁理士　本田　淳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】変異型キヌレニナーゼ遺伝子を有する非ヒト動物

(57)【要約】
非ヒト動物、ならびにそれを作製および使用するための方法と組成物が提供され、当該非ヒト動物は、変異型Ｌ－キヌレニン加水分解酵素（またはキヌレニナーゼ）遺伝子を備える。非ヒト動物は、一部の実施形態では、当該非ヒト動物が、ヒト免疫不全ウイルス－１　ｇｐ４１の膜近位外部領域中に存在する当該キヌレニナーゼポリペプチド中のエピトープの除去を生じさせるアミノ酸置換を含むキヌレニナーゼポリペプチドを発現するよう、内因性キヌレニナーゼ遺伝子中に遺伝子改変を有するとして記載される場合がある。

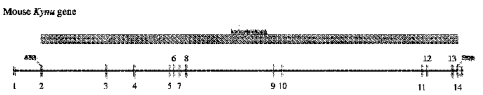


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
そのゲノムが変異型キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子を備えた齧歯類であって、前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子はエクソン３に１つ以上の点変異を備え、かつＤ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする、齧歯類。
【請求項２】
前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子が、エクソン３に５個の点変異を備える、請求項１に記載の齧歯類。
【請求項３】
前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子が、１つ以上の選択マーカーをさらに備える、請求項１または２に記載の齧歯類。
【請求項４】
前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子が、１個以上の部位特異的リコンビナーゼ認識部位をさらに備える、請求項１～３のいずれか１項に記載の齧歯類。
【請求項５】
前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子が、リコンビナーゼ認識部位に隣接したリコンビナーゼ遺伝子と選択マーカーを備え、前記リコンビナーゼ認識部位は、除去を誘導するよう方向づけられる、請求項４に記載の齧歯類。
【請求項６】
前記リコンビナーゼ遺伝子が、分化細胞において前記リコンビナーゼ遺伝子の発現を誘導するが、未分化細胞では前記リコンビナーゼ遺伝子の発現を誘導しないプロモーターに動作可能に連結されるか、または転写によって能力を有し、発生的に制御される、請求項５に記載の齧歯類。
【請求項７】
前記プロモーターが、配列番号３７、配列番号３８、または配列番号３９であるか、またはこれを備える、請求項６に記載の齧歯類。
【請求項８】
前記プロモーターが、配列番号３７であるか、またはこれを備える、請求項７に記載の齧歯類。
【請求項９】
前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子が、配列番号４２に現れる配列を含むエクソン３を備えるか、または配列番号４１に現れる配列を備えたＫｙｎｕポリペプチドをコードする、請求項１～８のいずれか１項に記載の齧歯類。
【請求項１０】
前記齧歯類のゲノムが、１個以上のヒトV_Hセグメント、１個以上のヒトD_Hセグメント、および１個以上のヒトJ_Hセグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入をさらに備え、前記ヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、請求項１～９のいずれか１項に記載の齧歯類。
【請求項１１】
前記イムノグロブリン重鎖定常領域が、齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域である、請求項１０に記載の齧歯類。
【請求項１２】
前記齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域が、内因性齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域である、請求項１１に記載の齧歯類。
【請求項１３】
前記齧歯類のゲノムが、１個以上のヒトV_Lセグメント、および１個以上のヒトJ_Lセグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入をさらに備え、前記ヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、請求項１～１２のいずれか１項に記載の齧歯類。
【請求項１４】

前記齧歯類のゲノムが、１個以上のヒトV_Lセグメント、および１個以上のヒトJ_Lセグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入をさらに備え、前記ヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、請求項１０に記載の齧歯類。

【請求項１５】

前記イムノグロブリン軽鎖定常領域が、齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域である、請求項１３に記載の齧歯類。

【請求項１６】

前記齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域が、内因性齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域である、請求項１５に記載の齧歯類。

【請求項１７】

前記ヒトV_LおよびJ_Lセグメントが、ヒトＶκおよびＪκセグメントであり、内因性κ軽鎖座位に挿入される、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の齧歯類。

【請求項１８】

前記ヒトＶκおよびＪκセグメントが、齧歯類Ｃκ遺伝子に動作可能に連結される、請求項１７に記載の齧歯類。

【請求項１９】

前記ヒトV_LおよびJ_Lセグメントが、ヒトＶλおよびＪλセグメントであり、内因性λ軽鎖座位に挿入される、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の齧歯類。

【請求項２０】

前記ヒトＶλおよびＪλセグメントが、齧歯類Ｃλ遺伝子に動作可能に連結される、請求項１９に記載の齧歯類。

【請求項２１】

Ｄ９３Ｅ置換を含むキヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）ポリペプチドを発現する齧歯類。

【請求項２２】

前記齧歯類が、ヒト可変ドメインと齧歯類定常ドメインを備えた抗体をさらに発現する、請求項２１に記載の齧歯類。

【請求項２３】

前記ヒト可変ドメインが、ヒトV_HおよびＶκドメインを含む、請求項２２に記載の齧歯類。

【請求項２４】

前記ヒトＶκドメインが、齧歯類Ｃκドメインに融合される、請求項２３に記載の齧歯類。

【請求項２５】

前記齧歯類が、前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子に関しホモ接合性である、請求項１に記載の齧歯類。

【請求項２６】

前記齧歯類が、前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子に関しヘテロ接合性である、請求項１に記載の齧歯類。

【請求項２７】

前記齧歯類が、ラットまたはマウスである、請求項１～２６のいずれか１項に記載の齧歯類。

【請求項２８】

そのゲノムが変異型キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子を備えた単離齧歯類細胞または組織であって、前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子はエクソン３に１つ以上の点変異を備え、かつＤ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする、細胞または組織。

【請求項２９】

請求項２８に記載の単離齧歯類細胞から作製された不死化細胞。

【請求項３０】

そのゲノムが変異型キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子を備えた齧歯類胚性幹細胞であ

って、前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子はエクソン３に１つ以上の点変異を備え、かつＤ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする、齧歯類胚性幹細胞。
【請求項３１】
請求項３０に記載の胚性幹細胞から作製された齧歯類胚。
【請求項３２】
そのゲノムが変異型キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子を備えた齧歯類を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）　Ｋｙｎｕ遺伝子のエクソン３を突然変異させ、Ｄ９３Ｅ置換を含むＫｙｎｕポリペプチドをコードさせるように齧歯類胚性幹細胞に核酸配列を導入すること、であって、前記核酸は、Ｋｙｎｕ座位と相同なポリヌクレオチドを備える、導入すること、
（ｂ）　（ａ）から遺伝子改変された齧歯類胚性幹細胞を取得すること、および、
（ｃ）　（ｂ）の前記遺伝子改変された齧歯類胚性幹細胞を使用して齧歯類を作製すること、を含む、方法。
【請求項３３】
前記核酸配列が、１個以上の選択マーカーを備える、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記核酸配列が、１個以上の部位特異的リコンビナーゼ認識部位を備える、請求項３２または３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記核酸配列が、リコンビナーゼ認識部位に隣接したリコンビナーゼ遺伝子と選択マーカーを備え、前記リコンビナーゼ認識部位は、除去を誘導するよう方向づけられる、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記リコンビナーゼ遺伝子が、分化細胞において前記リコンビナーゼ遺伝子の発現を誘導するが、未分化細胞では前記リコンビナーゼ遺伝子の発現を誘導しないプロモーターに動作可能に連結されるか、または転写によって能力を有し、発生的に制御される、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記プロモーターが、配列番号３７、配列番号３８、または配列番号３９であるか、またはこれを備える、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記プロモーターが、配列番号３７であるか、またはこれを備える、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
変異型Ｋｙｎｕ遺伝子に関しホモ接合性の齧歯類が作製されるように（ｃ）で生成された齧歯類を交配させる（ｄ）の工程をさらに含む、請求項３２～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
（ａ）の前記齧歯類の胚性幹細胞が、
（ｉ）　１個以上のヒトV_Hセグメント、１個以上のヒトD_Hセグメント、および１個以上のヒトJ_Hセグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、および／または、
（ｉｉ）　１個以上のヒトV_Lセグメント、および１個以上のヒトJ_Lセグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、を備えたゲノムを有する、請求項３２～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
前記イムノグロブリン重鎖定常領域が、齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域である、請求項４０に記載の方法。

【請求項４２】
前記齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域が、内因性齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記イムノグロブリン軽鎖定常領域が、齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域である、請求項４０～４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４４】
前記齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域が、内因性齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域である、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記ヒトV_LおよびJ_Lセグメントが、ヒトＶκおよびＪκセグメントであり、内因性κ軽鎖座位に挿入され、齧歯類Ｃκ遺伝子に動作可能に連結される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記ヒトV_LおよびJ_Lセグメントが、ヒトＶλおよびＪλセグメントであり、内因性λ軽鎖座位に挿入され、齧歯類Ｃλ遺伝子に動作可能に連結される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４７】
そのゲノムが、変異型キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子を備える齧歯類を作製する方法であって、前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、Ｄ９３Ｅ置換を含むＫｙｎｕポリペプチドをコードし、
そのゲノムがＤ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えるように齧歯類のゲノムを改変することであって、それによって前記齧歯類を作製する、改変することを含む、方法。
【請求項４８】
そのゲノムが配列番号４２に現れる配列を含む変異型Ｋｙｎｕエクソン３を備えるように前記齧歯類のゲノムが改変される、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
そのゲノムがさらにイントロン３にも欠失を備えるように前記齧歯類のゲノムが改変される、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記欠失が約６０ｂｐである、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記方法が、そのゲノムが、
（ｉ）　１個以上のヒトV_Hセグメント、１個以上のヒトD_Hセグメント、および１個以上のヒトJ_Hセグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、および／または
（ｉｉ）　１個以上のヒトV_Lセグメント、および１個以上のヒトJ_Lセグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、を備えるように齧歯類のゲノムを改変することをさらに含む、請求項４７～５０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５２】
それが（ｉ）および／または（ｉｉ）を備えるように前記齧歯類のゲノムを改変することは、Ｄ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えるように前記齧歯類のゲノムを改変する前に行われる、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記方法が、そのゲノムが、第二の齧歯類とＤ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える前記齧歯類を交配させることをさらに含み

、前記第二の齧歯類が、
（ｉ）　１個以上のヒトＶ$_{H}$セグメント、１個以上のヒトＤ$_{H}$セグメント、および１個以上のヒトＪ$_{H}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、および／または、
（ｉｉ）　１個以上のヒトＶ$_{L}$セグメント、および１個以上のヒトＪ$_{L}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、を備えるゲノムを有する、請求項４７～５０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５４】
前記イムノグロブリン重鎖定常領域が、齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域である、請求項５１～５３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５５】
前記齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域が、内因性齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域である、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記イムノグロブリン軽鎖定常領域が、齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域である、請求項５１～５３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５７】
前記齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域が、内因性齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域である、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記ヒトＶ$_{L}$およびＪ$_{L}$セグメントが、ヒトＶκおよびＪκセグメントであり、内因性κ軽鎖座位に挿入され、齧歯類Ｃκ遺伝子に動作可能に連結される、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記ヒトＶ$_{L}$およびＪ$_{L}$セグメントが、ヒトＶλおよびＪλセグメントであり、内因性λ軽鎖座位に挿入され、齧歯類Ｃλ遺伝子に動作可能に連結される、請求項５７に記載の方法。
【請求項６０】
前記齧歯類がラットまたはマウスである、請求項３２～５９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６１】
請求項３２～６０のいずれか１項に記載の方法から取得可能な齧歯類。
【請求項６２】
請求項４０に記載の方法から取得可能な齧歯類。
【請求項６３】
齧歯類において抗体を作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）　抗原で齧歯類を免疫化する工程であって、前記齧歯類が、Ｄ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子を備えたゲノムを有する、免疫化する工程、
（ｂ）　前記齧歯類が、前記抗原に対する免疫応答を生じさせるのに充分な条件下で前記齧歯類を維持する工程、および、
（ｃ）　前記齧歯類、または齧歯類の細胞から、前記抗原に結合する抗体を回収する工程、を含む方法。
【請求項６４】
前記齧歯類細胞が、Ｂ細胞である、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記齧歯類細胞が、ハイブリドーマである、請求項６３に記載の方法。
【請求項６６】

前記抗原が、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１の膜近位外部領域（ＭＰＥＲ）のペプチド（配列番号４３）であるか、またはこれを備える、請求項６３～６５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６７】

前記抗原が、ＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳ（配列番号４０）であるか、またはこれを備える、請求項６６に記載の方法。

【請求項６８】

前記抗原が、ＱＱＥＫＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮ（配列番号３３）であるか、またはこれを備える、請求項６３～６５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６９】

前記抗原が、ＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮＷＦＮＩＴＮＷＬＷＹＩＫ（配列番号３４）であるか、またはこれを備える、請求項６３～６５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７０】

前記齧歯類の前記ゲノムが、

（ｉ）　１個以上のヒトV_Hセグメント、１個以上のヒトD_Hセグメント、および１個以上のヒトJ_Hセグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、および／または、

（ｉｉ）　１個以上のヒトV_Lセグメント、および１個以上のヒトJ_Lセグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、をさらに備える、請求項６３～６９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７１】

前記イムノグロブリン重鎖定常領域が、齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域である、請求項７０に記載の方法。

【請求項７２】

前記齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域が、内因性齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域である、請求項７１に記載の方法。

【請求項７３】

前記イムノグロブリン軽鎖定常領域が、齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域である、請求項７０～７２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７４】

前記齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域が、内因性齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域である、請求項７３に記載の方法。

【請求項７５】

前記ヒトV_LおよびJ_Lセグメントが、ヒトＶκおよびＪκセグメントであり、内因性κ軽鎖座位に挿入され、齧歯類Ｃκ遺伝子に動作可能に連結される、請求項７４に記載の方法。

【請求項７６】

前記ヒトV_LおよびJ_Lセグメントが、ヒトＶλおよびＪλセグメントであり、内因性λ軽鎖座位に挿入され、齧歯類Ｃλ遺伝子に動作可能に連結される、請求項７５に記載の方法。

【請求項７７】

前記（ｃ）の抗体が、ヒトイムノグロブリン重鎖および／または軽鎖の可変ドメインと、齧歯類の定常ドメインを備える、請求項６３～７６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７８】

前記齧歯類がラットまたはマウスである、請求項６３～７７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７９】

そのゲノムが、

（ｉ）　変異型Ｋｙｎｕ遺伝子であって、前記変異型キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子は、エクソン３に１つ以上の点変異を備え、かつＤ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする、遺伝子、

（ｉｉ）　１個以上のヒトV_Hセグメント、１個以上のヒトD_Hセグメント、および１個以上のヒトJ_Hセグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、内因性齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、および／または、

（ｉｉ）　１個以上のヒトV_Lセグメント、および１個以上のヒトJ_Lセグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、内因性齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、

を備える齧歯類。

【請求項８０】

前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子が、イントロン３中に、選択カセットの挿入から生じる欠失をさらに備える、請求項７９に記載の齧歯類。

【請求項８１】

前記欠失が、約６０ｂｐである、請求項８０に記載の齧歯類。

【請求項８２】

前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子が、配列番号４２に現れる配列を含むエクソン３を備える、請求項７９～８１のいずれか１項に記載の齧歯類。

【請求項８３】

前記ヒトV_LおよびJ_Lセグメントが、ヒトＶκおよびＪκセグメントであり、および内因性κ軽鎖座位に挿入され、および前記ヒトＶκおよびＪκセグメントが、齧歯類Ｃκ遺伝子に動作可能に連結される、請求項７９～８２のいずれか１項に記載の齧歯類。

【請求項８４】

前記齧歯類が、ラットまたはマウスである、請求項７９～８３のいずれか１項に記載の齧歯類。

【請求項８５】

齧歯類において抗体を作製する方法であって、前記方法が、

（ａ）　ＨＩＶ－１　ｇｐ４の膜近位外部領域（ＭＰＥＲ）のすべてまたは一部で齧歯類を免疫化する工程であって、前記齧歯類が、

（ｉ）　エクソン３に１つ以上の点変異を含み、およびＤ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子、

（ｉｉ）　１個以上のヒトV_Hセグメント、１個以上のヒトD_Hセグメント、および１個以上のヒトJ_Hセグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、内因性齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、および／または、

（ｉｉ）　１個以上のヒトV_Lセグメント、および１個以上のヒトJ_Lセグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、前記ヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、内因性齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、を含むゲノムを有する、免疫化する工程、

（ｂ）　前記齧歯類が、前記ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲのすべてまたは一部に対する免疫応答を生じさせるのに充分な条件下で前記齧歯類を維持する工程、および、

（ｃ）　前記齧歯類、または齧歯類の細胞から、前記ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲに結合する抗体を回収する工程であって、

前記抗体は、齧歯類C_Hドメインに連結されたヒトV_Hドメインを含むイムノグロブリン重鎖と、齧歯類Ｃκドメインに連結されたヒトＶκドメインを含むイムノグロブリン軽鎖を備える、回収する工程、を含む、方法。

【請求項８６】

前記齧歯類が、配列ＱＱＥＫＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮ（配列番号３３）を有するペプチドで免疫化される、請求項８５に記載の方法。

【請求項８７】
前記齧歯類が、配列ＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮＷＦＮＩＴＮＷＬＷＹＩＫ（配列番号３４）を有するペプチドで免疫化される、請求項８５に記載の方法。
【請求項８８】
（ｉ）の前記変異型Ｋｙｎｕ遺伝子が、イントロン３中に、選択カセットの挿入から生じる欠失をさらに備える、請求項８５～８７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８９】
前記欠失が、約６０ｂｐである、請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
前記齧歯類がラットまたはマウスである、請求項８５～８９のいずれか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１６年２月１６日に出願され、その開示内容は全体で参照により本明細書に援用される米国仮特許出願第６２／２９５，５２４号明細書の優先権を主張するものである。
【０００２】
発明の分野
変異型Ｌ－キヌレニン加水分解酵素（またはキヌレニナーゼ）遺伝子を備えた非ヒト動物。変異型Ｌ－キヌレニン加水分解酵素タンパク質を発現する非ヒト動物。変異型Ｌ－キヌレニン加水分解酵素の核酸配列を備えた非ヒト動物の作製方法および使用方法。
【背景技術】
【０００３】
世界保健機関（ＷＨＯ）によると、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）は世界規模の大きな健康問題であり、３４００万人を超える人々の生命を奪っている。特に全世界のＨＩＶによる死者は、２０１４年で９８万人～１６０万人と推定されている。ＨＩＶは免疫系の重要な細胞、特にＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞に感染し、様々な感染症および癌に対する宿主の防御能力を徐々に衰えさせ、後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）として知られている状態をもたらす。様々な抗ウイルス治療が開発され、ＨＩＶ感染の制御およびさらなる伝染の防御に効果を発揮することが示されているにもかかわらず、治療法はない。近年、ＨＩＶは、免疫寛容により宿主の免疫監視を逃れ、それによって、自己抗原と類似したＨＩＶエピトープの中和に対する免疫応答（たとえば抗体応答）が損なわれていることが示唆されている。
【発明の概要】
【０００４】
本発明は、新たな治療法、一部の実施形態では、ＨＩＶ感染および／もしくは伝染の治療ならびに／または阻止に使用され得る治療レジメンの特定および開発のための改善されたｉｎ　ｖｉｖｏシステムを可能とするよう、非ヒト動物を遺伝子操作することが望ましいという認識を包含する。一部の実施形態では、本明細書に記載されるｉｎ　ｖｉｖｏシステムは、高血圧および／または腎疾患の治療のための新たな治療法の特定および開発に使用され得る。提供される非ヒト動物は、キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子の破損および／または別の手段により機能的にサイレンシングされたＫｙｎｕ遺伝子を備えており、それによって、宿主のＫｙｎｕポリペプチドは発現されず、または産生されず、たとえばＨＩＶ（たとえば、ＨＩＶの感染、伝染、複製、および／またはＨＩＶの血清値）を標的とする治療法の特定および開発における使用に望ましいものとなる。また変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えた非ヒト動物が提供され、それによりバリアントＫｙｎｕポリペプチドが前述の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子により発現または産生され、たとえばＨＩＶ（たとえば、ＨＩ

Ｖの感染、伝染、複製、および／またはＨＩＶの血清値）を標的とする治療法の特定および開発における使用に望ましいものとなる。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、ＨＩＶに関連した疾患、障害および症状のための改善されたｉｎ　ｖｉｖｏシステム（またはモデル）を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、高血圧性の疾患、障害および症状のための改善されたｉｎ　ｖｉｖｏシステム（またはモデル）を提供する。

【０００５】

本発明は、外来性抗原（たとえば病原体）と自己抗原の間に共有されるエピトープに結合する抗体を作製する方法を提供する。特に、本発明は、外来性抗原と自己抗原の共有エピトープに結合する抗体またはその断片を作製する方法を提供するものであり、前述の方法は、非ヒト動物を、外来性抗原と自己抗原で共有されるエピトープ、またはそれらに存在するエピトープ（またはそれらと実質的に同一もしくは同一であるエピトープ）を含有する抗原で免疫化する工程、前述の非ヒト動物が前述の外来性抗原と前述の自己抗原で共有されるエピトープまたはそれらに存在するエピトープに対する免疫応答を生じさせるのに充分な条件下に前述の非ヒト動物を維持する工程、および前述の外来性抗原と前述の自己抗原に共有されるエピトープ、またはそれらに存在するエピトープに結合する抗体を前述の非ヒト動物または非ヒト動物細胞から回収する工程を含み、ここで前述の非ヒト動物は、遺伝子の破損または突然変異を備えたゲノムを有しており、それにより、外来性抗原と共有される、外来性抗原に存在する、または外来性抗原に現れるエピトープを自己抗原から除去させ、ここで前述の外来性抗原は、前述の自己抗原のホモログではない。様々な実施形態では、外来性抗原は、ウイルスである（たとえばＨＩＶ）。様々な実施形態では、本明細書に記載される抗体を作製する方法は、免疫化された非ヒト動物（または非ヒト細胞）から遺伝物質を取得する工程、および前述の遺伝物質から共有エピトープに結合する抗体またはその断片を作製する工程をさらに含む。

【０００６】

一部の実施形態では、破損は、遺伝子産物（たとえばｍＲＮＡまたはポリペプチド）の発現を除去する遺伝子のすべてまたは一部のホモ接合性の欠失であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、突然変異は、たとえば病原体などの外来性抗原（たとえばウイルス、細菌、プリオン、真菌、ウイロイド、または寄生虫）と共有される、またはそれに存在する（またはそれと実質的に同一である、もしくはそれと同一である）遺伝子産物中のエピトープの発現を除去する、遺伝子中の１つ以上の点変異であるか、またはそれらを含む。

【０００７】

一部の実施形態では、本発明は、操作されたＫｙｎｕ遺伝子を備えたゲノムを有する非ヒト動物を提供するものであり、その操作されたＫｙｎｕ遺伝子は、野生型Ｋｙｎｕ遺伝子（たとえば、内因性またはホモログ）と比較して１個以上の突然変異を含んでおり、それにより、バリアントＫｙｎｕポリペプチドの発現が生じる。一部の実施形態では、かかる操作されたＫｙｎｕ遺伝子は、齧歯類のＫｙｎｕポリペプチドのＨ４ドメインをコードする遺伝物質を含み、そのＨ４ドメインは、野生型または親の齧歯類Ｋｙｎｕポリペプチドと比較して、アミノ酸置換を含有する。ゆえに一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物の操作されたＫｙｎｕ遺伝子は、アミノ酸置換を含むＨ４ドメインにより特徴付けられるＫｙｎｕポリペプチド（たとえば、バリアントＫｙｎｕポリペプチド）をコードする。

【０００８】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される操作されたＫｙｎｕ遺伝子と、操作されたイムノグロブリン重鎖および／または軽鎖座位を備えたゲノムを有する非ヒト動物を提供するものであり、その操作されたイムノグロブリン重鎖および／または軽鎖座位は、２個の異なる種に由来する遺伝物質（たとえば、ヒト部分と非ヒト部分）を備える。一部の実施形態では、かかる操作されたイムノグロブリン重鎖および／または軽鎖座位は、１個以上のイムノグロブリン可変領域（すなわち、アセンブリされたＶ、Ｄおよび／

またはＪセグメント）をコードする遺伝物質を含む。一部の実施形態では、遺伝物質は、抗原結合に関与するイムノグロブリン重鎖および／または軽鎖の可変ドメインをコードする。ゆえに一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物の操作されたイムノグロブリン重鎖および／または軽鎖座位は、ヒト部分と非ヒト部分を含有するイムノグロブリン重鎖および／または軽鎖のドメインをコードしており、そのヒト部分と非ヒト部分は、連結され、抗体の機能性イムノグロブリン重鎖および／または軽鎖を形成する。

【０００９】

一部の実施形態では、そのゲノムが変異型キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子を備える非ヒト動物が提供され、その変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、エクソン３に１つ以上の点変異を備えており、それによって、Ｄ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドが生じる（またはコードされる）。

【００１０】

一部の実施形態では、Ｄ９３Ｅ置換を含むＫｙｎｕポリペプチドを発現する非ヒト動物が提供される。

一部の実施形態では、変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、１個、２個、３個、４個、または５個の点変異を備えており、ある実施形態では、エクソン３に５個の点変異を備える。一部の実施形態では、変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、イントロン３にも欠失をさらに備えており、この欠失は選択カセットの挿入（または選択カセットとの相同組み換え）から生じたものであり、一部のある実施形態では、欠失は約６０ｂｐである。一部の実施形態では、変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、１個以上の選択マーカーをさらに備える。一部の実施形態では、変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、１個以上の部位特異的リコンビナーゼ認識部位をさらに備える。一部の実施形態では、変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、リコンビナーゼ遺伝子と、リコンビナーゼ認識部位に隣接した選択マーカーを備えており、そのリコンビナーゼ認識部位は、除去を導くよう方向づけられる。一部の実施形態では、変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号４２に現れる配列を含むエクソン３を備えており、または配列番号３６もしくは配列番号４１に現れる配列を備えたＫｙｎｕポリペプチドをコードする。

【００１１】

一部の実施形態では、リコンビナーゼ遺伝子は、分化細胞においてリコンビナーゼ遺伝子の発現を誘導するが、未分化細胞ではリコンビナーゼ遺伝子の発現を誘導しないプロモーターに動作可能に連結される。一部の実施形態では、リコンビナーゼ遺伝子は、転写によって能力を有し、発生的に制御されるプロモーターに動作可能に連結される。転写によって能力を有し、発生的に制御されるプロモーターの一部の実施形態では、当該プロモーターは、配列番号３７、配列番号３８、または配列番号３９であるか、またはこれを備える。転写によって能力を有し、発生的に制御されるプロモーターの一部の実施形態では、当該プロモーターは、配列番号３７であるか、またはこれを備える。

【００１２】

一部の実施形態では、提供される非ヒト動物は、本明細書に記載されるように変異型Ｋｙｎｕ遺伝子に関しホモ接合性である。一部の実施形態では、提供される非ヒト動物は、本明細書に記載されるように変異型Ｋｙｎｕ遺伝子に関しヘテロ接合性である。一部の実施形態では、提供される非ヒト動物は、本明細書に記載されるように変異型Ｋｙｎｕ遺伝子に関しヘミ接合性である（すなわち、１コピーを有する）。

【００１３】

一部の実施形態では、提供される非ヒト動物のゲノムは、１個以上のヒトV_Hセグメント、１個以上のヒトD_Hセグメント、および１個以上のヒトJ_Hセグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入をさらに備えており、そのヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される。

【００１４】

一部の実施形態では、イムノグロブリン重鎖定常領域は、齧歯類のイムノグロブリン重鎖定常領域であり、一部のある実施形態では、内因性齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域である。

【００１５】
一部の実施形態では、提供される非ヒト動物のゲノムは、１個以上のヒトＶ$_{L}$セグメント、および１個以上のヒトＪ$_{L}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入をさらに備えており、そのヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される。
【００１６】
一部の実施形態では、イムノグロブリン軽鎖定常領域は、齧歯類のイムノグロブリン軽鎖定常領域であり、一部のある実施形態では、内因性齧歯類イムノグロブリン軽鎖定常領域である。一部の実施形態では、ヒトＶ$_{L}$およびＪ$_{L}$セグメントは、ヒトＶκおよびＪκセグメントであり、内因性κ軽鎖座位に挿入されており、ある実施形態では、ヒトＶκおよびＪκセグメントは、内因性齧歯類Ｃκ遺伝子に動作可能に連結される。一部の実施形態では、ヒトＶ$_{L}$およびＪ$_{L}$セグメントは、ヒトＶλおよびＪλセグメントであり、内因性λ軽鎖座位に挿入されており、ある実施形態では、ヒトＶλおよびＪλセグメントは、内因性齧歯類Ｃλ遺伝子に動作可能に連結される。
【００１７】
一部の実施形態では、提供される非ヒト動物は、本明細書に記載されるＫｙｎｕポリペプチドを発現し、およびヒトの可変ドメインと非ヒト（たとえば齧歯類）の定常ドメインを備えた抗体をさらに発現する。一部の実施形態では、ヒトの可変ドメインは、ヒトＶ$_{H}$およびＶκドメインを含む。一部のある実施形態では、ヒトＶκドメインは、齧歯類のＣκドメインに融合される。
【００１８】
一部の実施形態では、単離された非ヒト細胞または組織が提供され、そのゲノムは、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子（または座位）を備える。一部の実施形態では、細胞はリンパ球である。一部の実施形態では、細胞は、Ｂ細胞、樹状細胞、マクロファージ、単球、およびＴ細胞から選択される。一部の実施形態では、組織は、脂肪、膀胱、脳、乳房、骨髄、目、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、筋肉、膵臓、血漿、血清、皮膚、脾臓、胃、胸腺、精巣、卵子、およびこれらの組み合わせから選択される。
【００１９】
一部の実施形態では、本明細書に記載される単離された非ヒトの細胞または組織から作製される、生成される、産生される、または取得される不死化細胞が提供される。
一部の実施形態では、非ヒトの胚性幹（ＥＳ）細胞が提供され、そのゲノムは、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子（または座位）を備える。一部の実施形態では、非ヒト胚性幹細胞は、齧歯類の胚性幹細胞である。一部のある実施形態では、齧歯類の胚性幹細胞はマウス胚性幹細胞であり、１２９系、Ｃ５７ＢＬ系またはこれらの混合物からのものである。一部のある実施形態では、齧歯類の胚性幹細胞はマウス胚性幹細胞であり、１２９系およびＣ５７ＢＬ系の混合物である。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒトＥＳ細胞は、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、および配列番号１４のいずれか１つを備える。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒトＥＳ細胞は、配列番号１５と配列番号１６、配列番号１５と配列番号１７、配列番号２４と配列番号２５または配列番号２６を備える。
【００２０】
一部の実施形態では、非ヒト動物を作るための本明細書に記述された非ヒト胚性幹細胞の利用法が提供される。一部のある実施形態では、非ヒトＥＳ細胞はマウスＥＳ細胞であり、および本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子（または座位）を備えたマウスを作るために使用される。一部のある実施形態では、非ヒトＥＳ細胞はラットＥＳ細胞であり、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子（または座位）を備えたラットを作るために使用される。
【００２１】
一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒトＥＳ細胞から作製される、産生される、生成される、または取得される非ヒト胚が提供される。一部のある実施形態では、非

ヒト胚は齧歯類胚であり、一部の実施形態ではマウス胚、一部の実施形態ではラット胎芽である。

【００２２】

一部の実施形態では、本発明は、非ヒト動物を作るための本明細書に記述された非ヒト胚の利用法を提供する。一部のある実施形態では、非ヒト胚は、マウス胚であり、および本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子（または座位）を備えたマウスを作製するために使用される。一部のある実施形態では、非ヒト胚は、ラット胚であり、および本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子（または座位）を備えたラットを作製するために使用される。

【００２３】

一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、単離非ヒト細胞もしくは組織、不死化細胞、非ヒトＥＳ細胞、または非ヒト胚を備えたキットが提供される。

一部の実施形態では、治療または診断のための薬剤（例えば、抗体またはその抗原結合断片）の製造および／または開発における使用のための、本明細書に記載されるキットが提供される。

【００２４】

一部の実施形態では、疾患、障害もしくは症状の治療、予防、または改善のための薬剤（例えば、抗体またはその抗原結合断片）の製造および／または開発における使用のための、本明細書に記載されるキットが提供される。

【００２５】

一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸構築物、または標的化ベクターが提供される。一部のある実施形態では、提供される核酸構築物、または標的化ベクターは、本明細書に記載されるＫｙｎｕ遺伝子（または座位）の全部または一部を備える。一部のある実施形態では、提供される核酸構築物、または標的化ベクターは、本明細書に記載されるＫｙｎｕ遺伝子（または座位）の全部または一部を含むＤＮＡ断片を備える。一部のある実施形態では、提供される核酸構築物または標的化ベクターは、配列番号９、配列番号１０、配列番号１２、および配列番号１３のいずれか１つを備える。一部のある実施形態では、提供される核酸構築物または標的化ベクターは、配列番号１５と配列番号１６、または配列番号２４と配列番号２５を備える。一部のある実施形態では、提供される核酸構築物または標的化ベクターは、１つ以上の選択マーカーを備える。一部のある実施形態では、提供される核酸構築物または標的化ベクターは、１つ以上の部位特異的組み換え部位（例えば、ｌｏｘＰ、Ｆｒｔ、またはそれらの組み合わせ）を備える。一部のある実施形態では、提供される核酸構築物または標的化ベクターは、図２Ａ、図４Ａまたは図４Ｃに図示される。

【００２６】

一部の実施形態では、非ヒトＥＳ細胞、非ヒト細胞、非ヒト胚、および／または非ヒト動物を作製するための、本明細書に記載される核酸構築物または標的化ベクターの使用が提供される。

【００２７】

一部の実施形態では、そのゲノムが変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える（または内因性Ｋｙｎｕ遺伝子から、Ｄ９３Ｅ置換を含むＫｙｎｕポリペプチドを発現する）非ヒト動物の作製方法が提供され、前述の方法は、（ａ）核酸配列を非ヒト胚性幹細胞に導入し、Ｋｙｎｕ遺伝子のエクソン３を突然変異させ、Ｄ９３Ｅ置換を含むＫｙｎｕポリペプチドをコードする（または生じさせる）工程であって、その核酸は、Ｋｙｎｕ座位と相同であるポリヌクレオチドを備える工程；（ｂ）（ａ）由来の遺伝子改変された非ヒトＥＳ細胞を取得する工程；および（ｃ）（ｂ）の遺伝子改変非ヒトＥＳ細胞を使用して、非ヒト動物を造る工程、を含む。

【００２８】

そのゲノムが変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えた非ヒト動物を作製する方法の一部の実施形態では、前述の方法は、（ｃ）で造られた非ヒト動物を交配させ、前述の変異型Ｋｙｎｕ

遺伝子に関しホモ接合性の非ヒト動物を造る工程をさらに含む。そのゲノムが変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物を作製する方法の一部の実施形態では、（ａ）の非ヒトＥＳ細胞は、（ｉ）１つ以上のヒト$Ｖ_{Ｈ}$セグメント、１つ以上のヒト$Ｄ_{Ｈ}$セグメント、および１つ以上のヒト$Ｊ_{Ｈ}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、このヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、および／または（ｉｉ）１つ以上のヒト$Ｖ_{Ｌ}$セグメント、および１つ以上のヒト$Ｊ_{Ｌ}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、そのヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、を備えたゲノムを有する。そのゲノムが変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物を作製する方法の一部の実施形態では、核酸配列は、１つ以上の選択マーカー、および／または１つ以上の部位特異的リコンビナーゼ認識部位を備える。そのゲノムが変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物を作製する方法の一部の実施形態では、核酸配列は、リコンビナーゼ遺伝子と、リコンビナーゼ認識部位に隣接した選択マーカーを備えており、そのリコンビナーゼ認識部位は、除去を導くよう方向づけられる。

【００２９】

一部の実施形態では、そのゲノムが、Ｄ９３Ｅ置換を含むＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物の作製方法が提供され、前述の方法は、非ヒト動物のゲノムを改変し、それによりゲノムはＤ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備え、前述の非ヒト動物が作製される工程を含む。

【００３０】

そのゲノムが変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物の作製方法の一部の実施形態において、非ヒト動物のゲノムは、配列番号４２に現れる配列を含む変異型Ｋｙｎｕエクソン３を備えるよう改変される。そのゲノムが変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物の作製方法の一部のある実施形態において、非ヒト動物のゲノムは、イントロン３に欠失（たとえば約６０ｂｐ）をさらに備えるよう改変される。

【００３１】

そのゲノムが変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物を作製する方法の一部の実施形態では、前述の方法は、非ヒト動物のゲノムを、（ｉ）１つ以上のヒト$Ｖ_{Ｈ}$セグメント、１つ以上のヒト$Ｄ_{Ｈ}$セグメント、および１つ以上のヒト$Ｊ_{Ｈ}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、このヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、および／または（ｉｉ）１つ以上のヒト$Ｖ_{Ｌ}$セグメント、および１つ以上のヒト$Ｊ_{Ｌ}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、そのヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、を備えるように改変することをさらに含む。一部のある実施形態では、非ヒト動物のゲノムが（ｉ）および／または（ｉｉ）を備えるように改変することは、齧歯類のゲノムを、Ｄ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えるように改変する前に行われる。

【００３２】

そのゲノムが変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物を作製する方法の一部の実施形態では、前述の方法は、そのゲノムが、Ｄ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物と、第二の非ヒト動物を交配させることをさらに含み、この第二の非ヒト動物は、（ｉ）１つ以上のヒト$Ｖ_{Ｈ}$セグメント、１つ以上のヒト$Ｄ_{Ｈ}$セグメント、および１つ以上のヒト$Ｊ_{Ｈ}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、このヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、イムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、および／または（ｉｉ）１つ以上のヒト$Ｖ_{Ｌ}$セグメント、および１つ以上のヒト$Ｊ_{Ｌ}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、そのヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、イムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、を備えるゲノムを有する。

【００３３】
一部の実施形態では、本明細書に記載される方法から作製される、生成される、産生される、取得される、または取得可能である非ヒト動物が提供される。
一部の実施形態では、非ヒト動物において抗体を作製する方法が提供され、前述の方法は、（ａ）非ヒト動物を抗原で免疫化する工程を含み、前述の非ヒト動物は、Ｄ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えたゲノムを有する、免疫化する工程；（ｂ）前述の非ヒト動物が、前述の抗原に対する免疫応答を生じさせるのに充分な条件下で前述の非ヒト動物を維持する工程；および（ｃ）前述の非ヒト動物、または非ヒト細胞から、前述の抗原に結合する抗体を回収する工程、を含む。
【００３４】
非ヒト動物において抗体を作製する方法の一部の実施形態では、非ヒト細胞は、Ｂ細胞またはハイブリドーマである。非ヒト動物において抗体を作製する方法の一部の実施形態では、（ｃ）の抗体は、ヒトイムノグロブリン重鎖および／または軽鎖の可変ドメインと、齧歯類の定常ドメインを備える。
【００３５】
一部の実施形態では、抗原は、ＨＩＶもしくはその断片であるか、またはＨＩＶもしくはその断片を備える。一部のある実施形態では、抗原は、ＨＩＶエンベロープタンパク質（またはポリペプチド）もしくはその断片であるか、またはＨＩＶエンベロープタンパク質（またはポリペプチド）もしくはその断片を備える。一部の実施形態では、抗原は、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１もしくはその断片であるか、またはＨＩＶ－１　ｇｐ４１もしくはその断片を備える。
【００３６】
一部の実施形態では、抗原は、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１の膜近位外部領域（ＭＰＥＲ：ｍｅｍｂｒａｎｅ　ｐｒｏｘｉｍａｌ　ｅｘｔｅｒｎａｌ　ｒｅｇｉｏｎ）（配列番号４３）のペプチドであるか、またはそのペプチドを備える；一部のある実施形態では、抗原は、ＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳ（配列番号４０）であるか、またはＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳ（配列番号４０）を備える。一部の実施形態では、抗原は、ＱＱＥＫＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮ（配列番号３３）であるか、またはＱＱＥＫＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮ（配列番号３３）を備える。一部の実施形態では、抗原は、ＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮＷＦＮＩＴＮＷＬＷＹＩＫ（配列番号３４）であるか、またはＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮＷＦＮＩＴＮＷＬＷＹＩＫ（配列番号３４）を備える。
【００３７】
一部の実施形態では、そのゲノムが、（ｉ）変異型Ｋｙｎｕ遺伝子であって、前述の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、エクソン３に１つ以上の点変異を備え、かつＤ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする、変異型Ｋｙｎｕ遺伝子；（ｉｉ）１つ以上のヒト$Ｖ_{Ｈ}$セグメント、１つ以上のヒト$Ｄ_{Ｈ}$セグメント、および１つ以上のヒト$Ｊ_{Ｈ}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、このヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、内因性非ヒトイムノグロブリン重鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入；および（ｉｉ）１つ以上のヒト$Ｖ_{Ｌ}$セグメント、および１つ以上のヒト$Ｊ_{Ｌ}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、そのヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、内因性非ヒトイムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、を備える非ヒト動物が提供される。
【００３８】
一部の実施形態では、非ヒト動物において抗体を作製する方法が提供され、前述の方法は、（ａ）非ヒト動物を、ＨＩＶ－１　ｇｐ４の膜近位外部領域（ＭＰＥＲ）のすべてまたは一部で免疫化する工程であって、この非ヒト動物は、（ｉ）エクソン３に１つ以上の点変異を含み、Ｄ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子；（ｉｉ）１つ以上のヒト$Ｖ_{Ｈ}$セグメント、１つ以上のヒト$Ｄ_{Ｈ}$セグメント、および１つ以上のヒト$Ｊ_{Ｈ}$セグメントを含むヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の挿入であって、このヒトイムノグロブリン重鎖可変領域は、内因性非ヒトイムノグロブリン重鎖定常

領域に動作可能に連結される、挿入；および（ｉｉ）１つ以上のヒトV_Lセグメント、および１つ以上のヒトJ_Lセグメントを含むヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域の挿入であって、そのヒトイムノグロブリン軽鎖可変領域は、内因性非ヒトイムノグロブリン軽鎖定常領域に動作可能に連結される、挿入、を備えたゲノムを有する、免疫化する工程；（ｂ）前述の非ヒト動物が、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲに対する免疫応答を生じさせるのに充分な条件下で前述の非ヒト動物を維持する工程；および（ｃ）前述の非ヒト動物または非ヒト細胞から、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲに結合する抗体を回収する工程、を含み、この場合において前述の抗体は、非ヒトC_Hドメインに連結されたヒトV_Hドメインを含むイムノグロブリン重鎖と、非ヒトＣκドメインに連結されたヒトＶκドメインを含むイムノグロブリン軽鎖を備える。

【００３９】

非ヒト動物において抗体を作製する方法の一部の実施形態では、非ヒト動物は、配列ＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳ（配列番号４０）を有するペプチドで免疫化される。非ヒト動物において抗体を作製する方法の一部の実施形態では、非ヒト動物は、配列ＱＱＥＫＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮ（配列番号３３）を有するペプチドで免疫化される。非ヒト動物において抗体を作製する方法の一部の実施形態では、非ヒト動物は、配列ＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮＷＦＮＩＴＮＷＬＷＹＩＫ（配列番号３４）を有するペプチドで免疫化される。

【００４０】

一部の実施形態では、非ヒト動物のＨＩＶモデルが提供され、当該非ヒト動物は、Ｄ９３Ｅ置換を有するＫｙｎｕポリペプチドを発現する。

一部の実施形態では、非ヒト動物のＨＩＶモデルが提供され、当該非ヒト動物は、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えたゲノムを有する。

【００４１】

一部の実施形態では、非ヒト動物のＨＩＶモデルが提供され、当該動物は、（ａ）そのゲノムが本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物を提供すること；および（ｂ）（ａ）の非ヒト動物をＨＩＶに暴露すること；それにより、当該非ヒト動物のＨＩＶモデルを提供すること、により取得される。

【００４２】

一部の実施形態では、治療または診断のための薬剤の製造および／または開発における使用のための、本明細書に記載される非ヒト動物または細胞が提供される。

一部の実施形態では、疾患、障害または症状の治療、予防または改善のための医薬の製造における使用のための、本明細書に記載される非ヒト動物または細胞が提供される。

【００４３】

一部の実施形態では、薬品としての使用など医療で使用するための薬剤またはワクチンの製造および／または開発における、本明細書に記載される非ヒト動物または細胞の使用が提供される。

【００４４】

一部の実施形態では、ＨＩＶ（たとえばＨＩＶエンベロープまたはその一部）に結合する抗体の製造および／または開発における、本明細書に記載される非ヒト動物または細胞の使用が提供される。

【００４５】

一部の実施形態では、疾患、障害、または症状は、高血圧に関連した疾患、障害または症状である。一部の実施形態では、疾患、障害、または症状は、ＨＩＶに関連した疾患、障害、または症状であるか、またはＨＩＶの感染および／または伝染から生じる。

【００４６】

様々な実施形態では、提供される非ヒト動物のゲノム中に存在するＫｙｎｕ遺伝子は、配列番号８に現れる配列を有するＫｙｎｕポリペプチドをコードするか、または配列番号３６もしくは配列番号４１に現れる配列を含むＨ４ドメインを含有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする。

【００４７】
様々な実施形態では、提供される非ヒト動物により発現されるＫｙｎｕポリペプチドは、配列番号８と実質的に同一であるか、または同一である配列を有するか、または配列番号３６もしくは配列番号４１に現れる配列を含むＨ４ドメインを含有する。
【００４８】
様々な実施形態で、本明細書に記載の非ヒト動物は齧歯類であり、一部の実施形態ではマウスであり、一部の実施形態ではラットである。一部の実施形態では、本明細書に記載のマウスは、１２９系、ＢＡＬＢ／Ｃ系、Ｃ５７ＢＬ／６系、および混合１２９ｘＣ５７ＢＬ／６系から成る群から選択され、一部のある実施形態ではＣ５７ＢＬ／６系である。
【００４９】
本明細書で使用される場合、「約」および「およそ」という用語は同意義として使用される。約／およその有無に関わらず、本明細書で使用される任意の数字は、当業者によって理解される任意の正常変動を網羅することが意図される。
【図面の簡単な説明】
【００５０】
以下の図から成る本明細書に含まれる図面は、例示目的のみであり限定を目的としない。
【図１】図１は、非ヒト（例えば、マウス）のキヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子のゲノム構造の、正確な縮尺ではない図を示す。エクソンは、各エクソンの上または下に番号を付与される。非翻訳領域（オープンボックス）とコード配列（縞模様の長方形）もまた示される。
【図２Ａ】図２Ａは、実施例１に記載される、齧歯類においてキヌレニナーゼ遺伝子の欠失を生成するための例示的な標的化ベクターの、正確な縮尺ではない図を示す。ｌａｃＺレポーター遺伝子は、マウスＫｙｎｕエクソン２の開始（ＡＴＧ）コドンに動作可能に連結されて挿入され、マウスＫｙｎｕ座位のエクソン２～エクソン６の残りの部分を欠失させる（３９．４ｋｂの欠失）。ｌａｃＺ－ＳＤＣ標的化ベクターは、自動削除薬剤選択カセット（例えば、ｌｏｘＰ配列に隣接したネオマイシン耐性遺伝子、米国特許第８，６９７，８５１号、第８，５１８，３９２号および第８，３５４，３８９号を参照のこと。これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる）を含む。相同組み換えが行われると、示されるように、標的化ベクター中に含有される配列は、内因性マウスＫｙｎｕ座位のエクソン２～６の位置に挿入される。薬剤選択カセットは発生依存性の様式で除去される。すなわち、その生殖系細胞に上述のＫｙｎｕ座位の破損を含むマウスから派生した子孫は、発生中に分化細胞から選択マーカーを脱落させる。連続的なエクソン（垂直な斜線）は、各エクソンの上下の数値により示されており、非翻訳領域（オープンボックス）とコード配列（上の縞模様の長方形）も示される。ｌａｃＺ：β－ガラクトシダーゼ遺伝子；Ｃｒｅ：Ｃｒｅリコンビナーゼ遺伝子；Ｎｅｏ：ネオマイシン抵抗性遺伝子。
【図２Ｂ】図２Ｂは、実施例１に記載される例示的な破損（たとえば、エクソン２～６の３９．４ｋｂの欠失）を図示する、マウスＫｙｎｕ遺伝子のゲノム構造の正確な縮尺ではない図を示す。エクソン（垂直な斜線）は、各エクソンの上または下に番号を付与される。非翻訳領域（オープンボックス）、コード配列（縞模様の長方形）、およびＡＴＧ開始コドンもまた示される。実施例１に記載されるスクリーニングアッセイに使用されるプローブ（すなわち、４２４９ｍＴＵ、４２４９ｍＴＤ２）のおよその位置は、太い垂直斜線により示される。
【図２Ｃ】図２Ｃは、実施例１に記載される例示的な破損されたＫｙｎｕ遺伝子の正確な縮尺ではない図を示す。マウスＫｙｎｕ開始（ＡＴＧ）コドンに動作可能に連結されたｌａｃＺレポーター遺伝子の挿入から生じた、マウスＫｙｎｕ座位のエクソン２～６の欠失（３９．４ｋｂ）が示される。残りのエクソン（垂直な斜線）は、各エクソンの上下に数値が付され、非翻訳領域（オープンボックス）と残りのコード配列（縞模様の長方形）も示される。選択されたヌクレオチド接合部の場所は各接合部の下の線で示され、配列番号で示される。

【図３】図３は、ヒトＫＹＮＵ（ｈＫＹＮＵ、配列番号２）、マウスＫｙｎｕ（ｍＫｙｎｕ、配列番号４）、ラットＫｙｎｕ（ｒＫｙｎｕ、配列番号６）および変異型マウスＫｙｎｕ（ｍｕｔＫｙｎｕ、配列番号８）の代表的なアミノ酸配列のアライメントを示す。モノクローナル抗体２Ｆ５（たとえば、Ｙａｎｇ，Ｇ．ｅｔ　ａｌ．，２０１３，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２１０（２）：２４１－５６を参照のこと）に結合されるエピトープは、オープンボックスで示されており、ｍｕｔＫｙｎｕにおいてＤ９３Ｅアミノ酸置換を示す（実施例の項を参照のこと）。アスタリスク（＊）は、同一のアミノ酸を示す；コロン（：）は、保存的置換を示す；ピリオド（．）は、半保存的置換を示す；空白は、非保存的置換を示す。

【図４Ａ】図４Ａは、実施例２に記載される、齧歯類（たとえばマウス）において変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を生成するための例示的な標的化ベクターの、正確な縮尺ではない図を示す。連続的なエクソン（垂直の斜線）は、各エクソンの上下の数値により示される（エクソン１１～１４は示されていない。図１を参照のこと）。エクソン３の点変異の例は、白丸と黒丸により示されており（たとえば、ＧＣＣからＧＣＴなど）、ならびに相同組み換えによる選択カセットの挿入によるイントロン３の６０ｂｐの欠失も示される。選択されたヌクレオチド接合部の場所は各接合部の下の線で示され、配列番号で示される。ＳＤＣ：自動削除カセット。

【図４Ｂ】図４Ｂは、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲの一部、実施例２に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子のエクソン３の３’部分、および変異型Ｋｙｎｕ遺伝子のエクソン３の３’部分によりコードされるアミノ酸配列の配列アライメントを示す。モノクローナル抗体（ｍＡｂ）２Ｆ５のエピトープは、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１配列上のボックスにより示される。変異型Ｋｙｎｕ遺伝子のエクソン３の最後の１０個のコドンに対するヌクレオチドは、コードされるアミノ酸配列の下に示される。変異したヌクレオチド（ｎｔ）は、下線を引かれた太字で示される。変異したアミノ酸（ＡＡ）は、下線を引かれた斜体文字で示される。ＨＩＶ－１　ｇｐ４１（配列番号４０）；ｍｕｔＫｙｎｕ　ＡＡ（配列番号４１）；ｍｕｔＫｙｎｕ　ｎｔ（配列番号４２）。

【図４Ｃ】図４Ｃは、実施例２に記載される、齧歯類（たとえばマウス）において変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を生成するための例示的な標的化ベクターの、正確な縮尺ではないクローズアップ図を示す。エクソン３（灰色の長方形）と、イントロン３（灰色の長方形の後ろ、または３’の黒線）は、選択マーカーとリコンビナーゼ遺伝子を含有するカセットの例とともに示される。相同組み換えによるカセットの組み込みにより、イントロン３において６０ｂｐの欠失が生じる。実施例２に記載されるスクリーニングアッセイに使用されるプローブ（すなわち、４２４７ｍＴＵ＿Ｄ９３Ｅ）のおよその位置は、太い垂直斜線により示される。

【図４Ｄ】図４Ｄは、実施例２に記載される、標的化ベクター内に含有されるカセットがリコンビナーゼ介在性除去された後に生成された、齧歯類（たとえばマウス）中の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子の、正確な縮尺ではないクローズアップ図を示す。残りのｌｏｘＰ部位とともに、エクソン３（灰色の長方形）と、イントロン３（灰色の長方形の後ろの、または３’の黒線）が示される。カセットのリコンビナーゼ介在除去後に残留したヌクレオチド接合部の位置は、その接合部の下の線で示され、および配列番号２６により示される。

【発明を実施するための形態】

【００５１】

用語の定義

本発明の範囲は、本明細書に添付される請求の範囲により規定されるものであり、本明細書に記載される特定の実施形態により限定されない。当分野の当業者は、本開示を読むことで、かかる記載される実施形態に対し均等であり得る様々な改変、または別の手段で請求の範囲内にあり得る様々な改変を認識するであろう。

【００５２】

概して、本明細書で使用される専門用語は、明白な別段の示唆が無い限り、当分野で理解される意味に従う。ある用語の明白な定義を以下に提供する本明細書全体を通じ、特定

の例におけるこれらの用語および他の用語の意味は、文脈から、当分野の当業者には明らかであろう。以下の用語および他の用語に関する追加的な定義は、本明細書全体を通じて説明される。本明細書内、およびその関連部分内に引用される参考文献は、参照により本明細書に援用される。

【００５３】

投与：本明細書において使用される場合、対象またはシステム（たとえば、細胞、臓器、組織、生物、または関連構成要素もしくはその構成要素のセット）に対する組成物の投与を含む。当業者であれば、投与経路は、たとえばその組成物が投与される対象またはシステム、組成物の性質、投与目的などに応じて変化し得ることを認識するであろう。たとえばある実施形態では、動物対象（ヒトまたは齧歯類）への投与は、気管支投与（気管支注入を含む）、口腔投与、皮間投与、動脈内投与、皮内投与、胃内投与、髄内投与、筋肉内投与、鼻内投与、腹腔内投与、髄腔内投与、静脈内投与、心室内投与、粘膜投与、鼻投与、経口投与、直腸投与、皮下投与、舌下投与、局所投与、気管投与（気管内注入を含む）、経皮投与、膣投与、および／または硝子体投与であってもよい。一部の実施形態では、投与は、間欠投与を含んでもよい。一部の実施形態では、投与は、少なくとも選択された期間にわたる、連続投与（たとえば、かん流）を含んでもよい。

【００５４】

改善：本明細書において使用される場合、状態の防止、減少、もしくは緩和、または対象の状態の改善を含む。改善は、疾患、障害、または症状（たとえば放射線傷害）の完全な回復または完全な防止を含むが、必須ではない。

【００５５】

およそ：１つ以上の対象の値に適用される場合、指定された参照値に類似した値を含む。ある実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別段定めがない限り、または文脈からそうでないことが明らかな場合（このような数字が可能な値の１００％を超える場合を除く）を除いて、指定された参照値のいずれかの方向に２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％またはそれ未満以内の範囲の値を指す。

【００５６】

生物学的に活性：本明細書で使用される場合、生物学的システム、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏ（たとえば生物中）で活性を有する任意の剤の特徴を指す。例えば、生物中に存在する場合、その生物内で生物学的効果を有する剤は、生物学的に活性であるとみなされる。特定の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドが生物学的に活性な場合、タンパク質またはポリペプチドの少なくとも一つの生物学的活性を共有するそのタンパク質またはポリペプチドの一部は、「生物学的に活性」な部分と一般的に呼ばれる。

【００５７】

同等：本明細書において使用される場合、お互いに同一ではなくてもよいが、それらの間の比較を許容できるほど十分に類似しており、従って観察された差異または類似性に基づいて合理的に結論を導き得る、二つ以上の剤、実体、状況、状態のセットなどを指す。当業者であれば、文脈内において、同等とみなされるために二つ以上のこのような薬剤、実体、状況、状況のセットなどに対して、ある所定の状況でどの程度の同一性が必要かを理解するであろう。

【００５８】

保存的：本明細書で使用される場合、保存的アミノ酸置換を記載する例を指し、類似の化学特性（例えば、電荷または疎水性）を伴う側鎖Ｒ基を有する別のアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を含む。一般的に、保存的アミノ酸置換は、対象のタンパク質の機能特性、例えば、リガンドに結合する受容体の能力などを実質的に変化させない。類似の化学特性を伴う側鎖を有するアミノ酸群の例には以下が挙げられる：たとえばグリシン（Ｇｌｙ、Ｇ）、アラニン（Ａｌａ、Ａ）、バリン（Ｖａｌ、Ｖ）、ロイシン（Ｌｅｕ、Ｌ）、およびイソロイシン（Ｉｌｅ、Ｉ）などの脂肪族側鎖；たとえばセリン（Ｓｅｒ、Ｓ）

およびスレオニン（Ｔｈｒ、Ｔ）などの脂肪族－ヒドロキシル側鎖；たとえばアスパラギン（Ａｓｎ、Ｎ）およびグルタミン（Ｇｌｎ、Ｑ）などのアミド含有側鎖；たとえばフェニルアラニン（Ｐｈｅ、Ｆ）、チロシン（Ｔｙｒ、Ｙ）、およびトリプトファン（Ｔｒｐ、Ｗ）などの芳香族側鎖；たとえばリシン（Ｌｙｓ、Ｋ）、アルギニン（Ａｒｇ、Ｒ）、およびヒスチジン（Ｈｉｓ、Ｈ）などの塩基性側鎖；たとえばアスパラギン酸（Ａｓｐ、Ｄ）およびグルタミン酸（Ｇｌｕ、Ｅ）などの酸性側鎖；ならびにたとえばシステイン（Ｃｙｓ、Ｃ）およびメチオニン（Ｍｅｔ、Ｍ）などの硫黄含有側鎖。保存的アミノ酸置換基には、例えば、バリン／ロイシン／イソロイシン（Ｖａｌ／Ｌｅｕ／Ｉｌｅ、Ｖ／Ｌ／Ｉ）、フェニルアラニン／チロシン（Ｐｈｅ／Ｔｙｒ、Ｆ／Ｙ）、リシン／アルギニン（Ｌｙｓ／Ａｒｇ、Ｋ／Ｒ）、アラニン／バリン（Ａｌａ／Ｖａｌ、Ａ／Ｖ）、グルタミン酸／アスパラギン酸（Ｇｌｕ／Ａｓｐ、Ｅ／Ｄ）、およびアスパラギン／グルタミン（Ａｓｎ／Ｇｌｎ、Ｎ／Ｑ）が含まれる。一部の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、例えばアラニンスキャニング変異誘導などで使用される、アラニンを含むタンパク質の任意の未変性残基の置換である可能性がある。一部の実施形態では、Ｇｏｎｎｅｔ，Ｇ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．，１９９２，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５６：１４４３－１４４５に開示されるＰＡＭ２５０対数尤度マトリクスにおいて正の値を有する保存的置換が行われる。一部の実施形態では、置換は、中等度に保存的な置換であり、この場合において当該置換は、ＰＡＭ２５０対数尤度マトリクスで負ではない値を有する。

【００５９】

対照：本明細書において使用される場合、結果が比較される基準である「対照」という当技術分野の意味を指す。一般的に、対照は、このような変数についての結論を出すために、変数を分離することによって実験の完全性を増加させるために使用される。一部の実施形態では、対照は、コンパレーターを提供するために、試験反応またはアッセイと同時に実施される反応またはアッセイである。「対照」とは、「対照動物」も含む。「対照動物」は本明細書に記述された改変、本明細書に記述されたものとは異なる改変を持つか、または未改変（すなわち、野生型動物）である場合がある。一つの実験では、「試験」（すなわち、試験される変数）が適用される。第二の実験では、「対照」であり、試験される変数は適用されない。一部の実施形態では、対照は歴史的対照（すなわち、以前に実施された試験またはアッセイの、または以前に知られた量または結果）である。一部の実施形態では、対照は印刷されたかまたはそれ以外の方法で保存された記録であるか、またはそれを含む。対照は、陽性対照または陰性対照である場合がある。

【００６０】

破損：本明細書において使用される場合、（例えば、遺伝子または遺伝子座位などの内因性相同配列を有する）ＤＮＡ分子との相同組み換え事象の結果を指す。一部の実施形態では、破損は、ＤＮＡ配列の挿入、欠失、置換、交換、ミスセンス変異、もしくはフレームシフト、またはこれらの任意の組み合わせを達成すること、または表す場合がある。挿入は、遺伝子全体または遺伝子の断片（例えば、エクソン）の挿入を含む場合があり、これは内因性配列以外の起源のもの（例えば、異種配列）であってもよい。一部の実施形態では、破損は遺伝子または遺伝子産物の（例えば、遺伝子によってコードされたタンパク質の）発現および／または活性を増加する場合がある。一部の実施形態では、破損は遺伝子または遺伝子産物の発現および／または活性を減少する場合がある。一部の実施形態では、破損は遺伝子またはコードされた遺伝子産物（例えば、コードされたポリペプチド）の配列を変える場合がある。一部の実施形態では、破損は遺伝子またはコードされた遺伝子産物（例えば、コードされたタンパク質）を切断または断片化する場合がある。一部の実施形態では、破損は遺伝子またはコードされた遺伝子産物（例えば、コードされたタンパク質）を伸長させる場合がある。一部のかかる実施形態では、破損は融合ポリペプチドの組立を遂行する場合がある。一部の実施形態では、破損は遺伝子または遺伝子産物のレベルに影響するが活性には影響しない場合がある。一部の実施形態では、破損は遺伝子または遺伝子産物の活性に影響するがレベルには影響しない場合がある。一部の実施形態では、破損は遺伝子または遺伝子産物のレベルに対して顕著な効果を持たない場合がある。

一部の実施形態では、破損は遺伝子または遺伝子産物の活性に対して顕著な効果を持たない場合がある。一部の実施形態では、破損は遺伝子または遺伝子産物のレベルまたは活性のいずれに対しても顕著な効果を持たない場合がある。

【００６１】

決定する、測定する、査定する、評価する、検査するおよび分析する：とは、本明細書において相互交換可能に使用され、任意の形態の測定結果を指し、要素が存在するかどうかの決定を含む。これらの用語は、定量的および／または定性的決定の両方を含む。アッセイは相対的または絶対的である場合がある。「の存在をアッセイする」ことは、存在する何かの量を決定するおよび／またはそれが存在するか不在かを決定することである可能性がある。

【００６２】

内因性座位または内因性遺伝子：本明細書において使用される場合、本明細書に記述される破損、欠失、置換、変化、または改変の導入前に、親または参照生物において存在する遺伝子座位を指す。一部の実施形態では、内因性遺伝子座位は自然界で存在する配列を有する。一部の実施形態では、内因性遺伝子座位は野生型遺伝子座位である。一部の実施形態では、参照生物は野生型生物である。一部の実施形態では、参照生物は遺伝子操作された生物である。一部の実施形態では、参照生物は実験室で繁殖された生物（野生型または遺伝子操作された）である。

【００６３】

内因性プロモーター：本明細書で使用される場合、例えば、野生型生物で、内因性遺伝子と自然に関連するプロモーターを指す。

操作された：本明細書において使用される場合、概して、ヒトの手により操作された態様を指す。例えば一部の実施形態では、自然界での順序では一緒に連結されていない２つ以上の配列がヒトの手により操作され、操作ポリヌクレオチド中で互いに直接連結された場合に、「操作された」とみなされ得る。一部の特定のかかる実施形態において、操作されたポリヌクレオチドは、自然界で第一のコード配列と作動的に関連するが、第二のコード配列とは作動的に関連せずに存在し、ヒトの手により連結されて第二のコード配列と作動的に関連した制御配列を含んでいてもよい。あるいは、またはさらに、一部の実施形態では、各々、自然界では互いに連結されていないポリペプチド要素またはドメインをコードする第一および第二の核酸配列が、１つの操作されたポリヌクレオチドにおいて互いに連結されていてもよい。同様に、一部の実施形態では、細胞または生物が操作され、それによりその遺伝情報が改変された（例えば、従前には存在していなかった新たな遺伝物質が導入されたり、または従前には存在していた遺伝物質が変更もしくは除去された）場合に、「操作された」とみなされ得る。一般的なことであり、当技術分野の当業者に理解されるとおり、操作されたポリヌクレオチドまたは細胞の子孫物も通常、実際の操作は過去の実体に対して行われていたのだとしても、「操作された」とみなされる。さらに、当技術分野の当業者により認識されるように、様々な技法が利用可能であり、それらを介して、本明細書に記載される「操作」を行うことができる。例えば、一部の実施形態では、「操作」には、分析または比較を行うようプログラムされた、または推奨された配列および／もしくは選択された配列を別手段により分析するようプログラムされた、コンピューターシステムの使用を介して（例えば核酸配列、ポリペプチド配列、細胞、組織および／または生物の）選択または設計を行うことを含んでもよい。あるいは、またはさらに、一部の実施形態では「操作」には、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ化学合成技術の使用、および／または組み換え核酸技術、例えば（例えばポリメラーゼ鎖反応などを介した）核酸増幅、ハイブリダイゼーション、突然変異誘導、形質転換、トランスフェクションなどの使用を含んでもよく、および／または様々な任意の制御交配法の使用を含んでもよい。当技術分野の当業者に認識されるように、様々な確立されているかかる技術（例えば組み換えＤＮＡ、オリゴヌクレオチド合成、および組織培養および形質転換（例えばエレクトロポレーション法、リポフェクション法など））が当技術分野に公知であり、様々な概説および詳説の参照文献中に記載されており、それらは本明細書全体を通じ引用および／または検討される。

たとえば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ２ｎｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９を参照のこと。

【００６４】

遺伝子：本明細書において使用される場合、産物（たとえば、ＲＮＡ産物および／またはポリペプチド産物）をコードする、染色体中のＤＮＡ配列を指す。一部の実施形態では、遺伝子は、コード配列（すなわち、特定の産物をコードする配列）を含む。一部の実施形態では、遺伝子は、非コード配列を含む。一部の特定の実施形態では、遺伝子は、コード配列（例えばエクソン配列）と非コード配列（例えばイントロン配列）の両方を含む。一部の実施形態では、遺伝子は、１つ以上の制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）を含んでもよく、および／または例えば遺伝子発現（例えば、細胞型特異的発現、誘導発現など）の１つ以上の態様を制御することができる、もしくは影響を与えることができるイントロン配列を含んでもよい。明白性を目的として、本発明者らは以下のことを記載する。本明細書において使用される場合、「遺伝子」という用語は、概して、ポリペプチドをコードする核酸の一部を指す；当該用語は、任意で、制御配列を包含する場合があり、これは当技術分野の当業者には、文脈から明白であろう。この定義は、「遺伝子」という用語が、非タンパク質をコードする発現単位に適用されることを除外する意図はなく、本明細書に使用される当該用語は、多くの場合においてはポリペプチドをコードする核酸を指すことを明白にすることを意図する。

【００６５】

異種：本明細書において使用される場合、異なる起源からの主体または実体を指す。例えば、特定の細胞もしくは生物に存在するポリペプチド、遺伝子、または遺伝子産物に関連して使用される場合、該用語は、関連ポリペプチド、遺伝子または遺伝子産物が、１）ヒトの手により操作されること、２）ヒトの手を介して細胞または生物（またはその前駆体）に導入されること、および／または３）当該関連細胞もしくは生物（例えば関連細胞型または生物型）中に自然状態では産生されない、または存在しないこと、を明らかにする。「異種」は、たとえば天然では関連していない、および一部の実施形態では非内因性の制御因子（たとえばプロモーター）の制御下にある、特定の天然の細胞または生物中に通常存在するが、突然変異または置換により改変されるポリペプチド、遺伝子、または遺伝子産物も含む。

【００６６】

宿主細胞：本明細書において使用される場合、その中に核酸またはタンパク質が導入された細胞を指す。当業者が本開示を読めば、このような用語が特定の主題細胞を指すだけでなく、このような細胞の子孫を指すためにも使用されることを理解するであろう。突然変異または環境の影響によって特定の改変は後続世代にも起こる可能性があるため、このような子孫は、実際は、親細胞と同一でない場合があるが、それでも「宿主細胞」という文言の範囲内に含まれる。一部の実施形態では、宿主細胞は原核細胞または真核細胞であるかそれを含む。一般的に、宿主細胞は、細胞が指定される種に関わらず、異種核酸またはタンパク質の受け入れおよび／または生産に適した任意の細胞である。細胞の例としては、原核生物および真核生物（単細胞または多細胞）の細胞、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、バチルス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｐｐ．）、ストレプトマイセス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｓｐｐ．）などの株）、マイコバクテリア細胞、真菌細胞、酵母細胞（例えば、出芽酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、分裂酵母（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）、ピキア・メタノリカ（Ｐｉｃｈｉａ ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）など）、植物細胞、昆虫細胞（例えば、ＳＦ－９、ＳＦ－２１、バキュロウイルス感染昆虫細胞、イラクサギンウワバ（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ）など）、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、または、例えば、ハイブリドーマもしくはクアドローマなどの細胞融合が挙げられる。一部の実施形態では、細胞はヒト

、サル、類人猿、ハムスター、ラット、またはマウス細胞である。一部の実施形態では、細胞は原核であり以下の細胞から選択される：ＣＨＯ（例えば、ＣＨＯ　Ｋ１、ＤＸＢ－１１　ＣＨＯ、Ｖｅｇｇｉｅ－ＣＨＯ）、ＣＯＳ（例えば、ＣＯＳ－７）、網膜細胞、Ｖｅｒｏ、ＣＶ１、腎臓（例えば、ＨＥＫ２９３、２９３　ＥＢＮＡ、ＭＳＲ　２９３、ＭＤＣＫ、ＨａＫ、ＢＨＫ）、ＨｅＬａ、ＨｅｐＧ２、ＷＩ３８、ＭＲＣ　５、Ｃｏｌｏ２０５、ＨＢ　８０６５、ＨＬ－６０、（例えば、ＢＨＫ２１）、Ｊｕｒｋａｔ、Ｄａｕｄｉ、Ａ４３１（表皮）、ＣＶ－１、Ｕ９３７、３Ｔ３、Ｌ細胞、Ｃ１２７細胞、ＳＰ２／０、ＮＳ－０、ＭＭＴ　０６０５６２、セルトリ細胞、ＢＲＬ　３Ａ細胞、ＨＴ１０８０細胞、骨髄腫細胞、腫瘍細胞、および前述細胞から派生する細胞株。一部の実施形態では、細胞は１つ以上のウイルス遺伝子、例えば、ウイルス遺伝子を発現する網膜細胞（例えば、ＰＥＲ．Ｃ６（登録商標）細胞）を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は単離細胞であるかそれを含む。一部の実施形態では、宿主細胞は組織の一部である。一部の実施形態では、宿主細胞は生物の一部である。

【００６７】

同一性：配列の比較と関連して本明細書において使用される場合、ヌクレオチドおよび／またはアミノ酸配列の同一性を測定するために使用され得る当技術分野において公知の多くの異なるアルゴリズムによって決定される同一性を指す。一部の実施形態では、本明細書に記述された同一性は、１０．０のギャップ開始ペナルティ、０．１のギャップ延長ペナルティを用い、Ｇｏｎｎｅｔ類似性マトリックス（ＭＡＣＶＥＣＴＯＲ（商標）１０．０．２、ＭａｃＶｅｃｔｏｒ　Ｉｎｃ．、２００８年）を使用したＣｌｕｓｔａｌ　Ｗ　ｖ．１．８３（ｓｌｏｗ）アラインメントを使用して決定される。

【００６８】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ（インビトロ）：本明細書で使用する場合、多細胞生物内ではなく、例えば試験管または反応容器などの人工的環境、細胞培養などにおいて発生する事象を指す。

【００６９】

ｉｎ　ｖｉｖｏ（インビボ）：本明細書で使用される場合、例えばヒトおよび／または非ヒト動物などの多細胞生物内で発生する事象を指す。細胞系のシステムの文脈において、当該用語を使用して、（例えばｉｎ　ｖｉｔｒｏシステムとの対照として）、生きた細胞内で発生する事象を指す場合もある。

【００７０】

単離された：本明細書において使用される場合、（１）（天然環境および／または実験環境のいずれかで）最初に生成された時にそれが関連していた成分の少なくとも一部から分離された物質および／もしくは実体、ならびに／または（２）ヒトの手によって設計、生産、調製、および／もしくは製造された物質ならびに／または実体を指す。単離された物質および／または実体は、それらが最初に関連していたその他の成分の約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約９９％超から分離される場合がある。一部の実施形態では、単離された薬剤は、約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約９９％を超えて純粋である。一部の実施形態では、物質は、その他の成分が実質的に含まれない場合、「純粋」である。一部の実施形態では、当業者であれば理解するように、例えば、一つ以上の担体または賦形剤（例えば、緩衝剤、溶媒、水など）などの特定のその他の成分と組み合わされた後でも、物質はまだ「単離された」または「純粋」とさえもみなされる場合があり、このような実施形態では、物質の単離または純度のパーセントはこのような担体または賦形剤を含めることなく計算される。一例を挙げると、一部の実施形態では、自然界に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの生体高分子は、ａ）導出の起源またはソースが、自然界の天然状態でそれに付随する成分の一部またはすべてと関連していない時、ｂ）それが、自然界でそれを生産する種と同じ種のその他のポリペプチドまたは核酸を実質的

に含まない時、またはｃ）自然界でそれを生産する種ではない細胞またはその他の発現系によって発現されるか、またはそうでなければそれからの成分と関連する時、「単離された」とみなされる。従って、例えば、一部の実施形態では、化学的に合成された、または自然界でそれを生産するものとは異なる細胞系で合成されたポリペプチドは、「単離された」ポリペプチドとみなされる。あるいはまたは追加的に、一部の実施形態では、一つ以上の精製技術を受けたポリペプチドは、それが、ａ）それが自然界で関連する、および／またはｂ）最初に生産された時にそれが関連していたその他の成分から分離されている限りは「単離された」ポリペプチドとみなされることができる。

【００７１】

座位：本明細書において使用される場合、遺伝子（または重要な配列）、ＤＮＡ配列、ポリペプチドをコードする配列、または生物ゲノムの染色体上の位置の特定の場所を指す。例えば、「Ｋｙｎｕ座位」は、Ｋｙｎｕ遺伝子、Ｋｙｎｕ　ＤＮＡ配列、Ｋｙｎｕをコードする配列、またはかかる配列が存在する位置について特定される生物のゲノムの染色体上のＫｙｎｕの位置の特定の場所を指す場合がある。「Ｋｙｎｕ座位」は、限定されないが、エンハンサー、プロモーター、５'および／もしくは３'のＵＴＲ、またはそれらの組み合わせなどをはじめとするＫｙｎｕ遺伝子の制御要素を含有してもよい。当技術分野の当業者には、一部の実施形態において、染色体が、数百、さらには数千の遺伝子を含有し得ること、および異なる種の間で比較した場合に、類似した遺伝子座位の物理的な共局在を示し得ることが明白である。かかる遺伝子座位は、シンテニー（ｓｙｎｔｅｎｙ）を共有したと記載され得る。

【００７２】

非ヒト動物：本明細書において使用される場合、ヒトではない任意の脊椎動物を指す。一部の実施形態では、非ヒト動物は、円口類、硬骨魚、軟骨魚（例えば、サメまたはエイ）、両生類、は虫類、哺乳類、および鳥である。一部の実施形態では、非ヒト動物は哺乳類である。一部の実施形態では、非ヒト哺乳類は、霊長類、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ウシ、または齧歯類である。一部の実施形態では、非ヒト動物はラットまたはマウスなどの齧歯類である。

【００７３】

核酸：本明細書において使用される場合、オリゴヌクレオチド鎖であるか、もしくはオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれることができる任意の化合物および／または物質を指す。一部の実施形態では、「核酸」とはオリゴヌクレオチド鎖であるか、またはホスホジエステル結合でオリゴヌクレオチド鎖組み込むことができる化合物および／または物質である。文脈から明らかであるように一部の実施形態では、「核酸」とは個別の核酸残基（例えば、ヌクレオチドおよび／またはヌクレオシド）を指し、一部の実施形態では、「核酸」とは個別の核酸残基を備えるオリゴヌクレオチド鎖を指す。一部の実施形態では、「核酸」はＲＮＡであるかまたはそれを含み、一部の実施形態では、「核酸」はＤＮＡであるかまたはそれを含む。一部の実施形態では、「核酸」は、一つ以上の天然核酸残基を含むかまたはそれらから成る。一部の実施形態では、「核酸」は、一つ以上の核酸類似体を含むかまたはそれらから成る。一部の実施形態では、核酸類似体は、ホスホジエステル骨格を利用しないという点で「核酸」とは異なる。例えば、一部の実施形態では、「核酸」は、当技術分野では知られており、骨格にホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を持つ、一つ以上の「ペプチド核酸」であるか、またはそれらを含み、それらは本発明の範囲内であるとみなされる。あるいはまたはさらに、一部の実施形態では、「核酸」は、ホスホジエステル結合ではなく、一つ以上のホスホロチオエートおよび／または５’－Ｎ－ホスホラミダイト結合を持つ。一部の実施形態では、「核酸」は一つ以上の天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、およびデオキシシチジン）であるか、または一つ以上の天然ヌクレオシドから成る。一部の実施形態では、「核酸」は、一つ以上のヌクレオシド類似体（例えば、２－アミノアデノシン、２－チオチミジン、イノシン、ピロロ－ピリミジン、３－メチルアデノシン、５－メチルシチジン、Ｃ－５　プロピニ

ルーシチジン、Ｃ－５　プロピニルーウリジン、２－アミノアデノシン、Ｃ５－ブロモウリジン、Ｃ５－フルオロウリジン、Ｃ５－ヨードウリジン、Ｃ５－プロピニルーウリジン、Ｃ５－プロピニルーシチジン、Ｃ５－メチルシチジン、２－アミノアデノシン、７－デアザアデノシン、７－デアザグアノシン、８－オキソアデノシン、８－オキソグアノシン、Ｏ（６）－メチルグアニン、２－チオシチジン、メチル化塩基、インターカレート塩基、およびそれらの組み合わせ）であるか、またはそれらから成る。一部の実施形態では、「核酸」は、天然核酸のものと比べて、一つ以上の改変された糖（例えば、２’－フルオロリボース、リボース、２’－デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース）を含む。一部の実施形態では、「核酸」は、ＲＮＡまたはタンパク質などの機能的遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を持つ。一部の実施形態では、「核酸」は、一つ以上のイントロンを含む。一部の実施形態では、「核酸」は、一つ以上のエクソンを含む。一部の実施形態では、「核酸」は、天然起源物からの単離、相補的鋳型に基づく重合による酵素合成（インビボまたはインビトロ）、組み換え細胞または系での複製、および化学合成の一つ以上によって調製される。一部の実施形態では、「核酸」は、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２０、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１５００、２０００、２５００、３０００、３５００、４０００、４５００、５０００またはそれを超える残基の長さである。一部の実施形態では、「核酸」は一本鎖であり、一部の実施形態では、「核酸」は二重鎖である。一部の実施形態では、「核酸」はポリペプチドをコードするか、またはポリペプチドをコードする配列の補体である少なくとも一つの要素を含むヌクレオチド配列を持つ。一部の実施形態では、「核酸」は酵素活性を持つ。

【００７４】

動作可能に連結された：本明細書において使用される場合、記載される構成要素が、それらが意図された様式で機能することができるような関係にある並置を指す。コード配列に「動作可能に連結した」対照配列は、対照配列に適合する条件下でコード配列の発現が達成されるように結合される。「動作可能に連結した」配列には、対象の遺伝子と連続する発現制御配列と、トランスで、または離れて作用して対象の遺伝子を制御する発現制御配列の両方を含む。「発現制御配列」という用語は、ポリヌクレオチド配列を含み、それらが結合されるコード配列の発現およびプロセッシングに作用するために必要である。「発現制御配列」には、適切な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的ＲＮＡプロセシングシグナル、細胞質ｍＲＮＡを安定化する配列、翻訳効率を強化する配列（すなわち、コザック配列）、タンパク質安定性を強化する配列、および望ましい場合、タンパク質分泌を強化する配列を含む。このような制御配列の性質は、宿主生物によって異なる。例えば、原核生物では、かかる制御配列としては、概して、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列が挙げられる一方、真核生物では、かかる制御配列としては、概して、プロモーターおよび転写終結配列が挙げられる。「制御配列」という用語は、その存在が発現およびプロセシングのために必須である要素を含むことを意図しており、その存在が有利である追加的要素、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列も含むことができる。

【００７５】

生理学的条件：本明細書において使用される場合、細胞および生物が生存し、および／または繁殖する条件に言及する当分野に理解される意味を指す。一部の実施形態では、当該用語には、生物または細胞系に対し自然界で発生し得る外的環境または内的環境の条件が含まれる。一部の実施形態では、生理学的条件は、ヒトまたは非ヒト動物の身体内にある条件であり、特に手術部位の、および／または手術部位内にある条件である。生理学的条件は、典型的には、たとえば２０～４０℃の範囲の温度、１気圧、ｐＨ６～８、１～２０ｍＭのグルコース濃度、大気中の酸素濃度、および地球上で遭う重力などを含む。一部

の実施形態では、実験室での条件は、生理学的条件に操作され、および／または維持される。一部の実施形態では、生理学的条件は、生物内で遭う条件である。

【００７６】

ポリペプチド：本明細書において使用される場合、アミノ酸の任意のポリマー鎖を指す。一部の実施形態では、ポリペプチドは、自然界に存在するアミノ酸配列を持つ。一部の実施形態では、ポリペプチドは、自然界に存在しないアミノ酸配列を持つ。一部の実施形態では、ポリペプチドは、お互いに別々に自然界に存在する部分を含むアミノ酸配列を持つ（すなわち、例えば、ヒトおよび非ヒト部分など、二つ以上の異なる生物からのもの）。一部の実施形態では、ポリペプチドは、それが人の手の作用を通して、設計および／または生産されるという点で、遺伝子操作されたアミノ酸配列を持つ。一部の実施形態では、ポリペプチドは、親ポリペプチドまたは参照ポリペプチドと比較し、１個以上のアミノ酸置換を含有するという点でバリアントであるアミノ酸配列を有する。

【００７７】

組み換え：本明細書で使用される場合、組み換え手段によって設計、操作、調製、発現、生成または単離されたポリペプチド（例えば、本明細書に記述されるＫｙｎｕポリペプチド）を指すことが意図されており、例えば、宿主細胞中にトランスフェクトされた組み換え発現ベクターを使用して発現されたポリペプチド、組み換えコンビナトリアルヒトポリペプチドライブラリから単離されたポリペプチド（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，Ｈ．Ｒ．，１９９７，ＴＩＢ Ｔｅｃｈ．１５：６２－７０；Ａｚｚａｚｙ，Ｈ．ａｎｄ Ｗ．Ｅ．Ｈｉｇｈｓｍｉｔｈ，２００２，Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．３５：４２５－４５；Ｇａｖｉｌｏｎｄｏ，Ｊ．Ｖ．ａｎｄ Ｊ．Ｗ．Ｌａｒｒｉｃｋ，２００２，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２９：１２８－４５；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ Ｈ．，ａｎｄ Ｐ．Ｃｈａｍｅｓ，２０００，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ２１：３７１－８）、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対しトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Ｔａｙｌｏｒ，Ｌ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０：６２８７－９５；Ｋｅｌｌｅｒｍａｎｎ，Ｓ－Ａ．ａｎｄ Ｌ．Ｌ．Ｇｒｅｅｎ，２００２，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１３：５９３－７；Ｌｉｔｔｌｅ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ２１：３６４－７０；Ｍｕｒｐｈｙ，Ａ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．，２０１４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１１（１４）：５１５３－８を参照）または選択された配列要素の相互スプライスを伴うその他の任意の手段によって調製、発現、生成または単離されたポリペプチドである。一部の実施形態では、このような選択された配列要素の一つ以上は自然界に存在する。一部の実施形態では、このような選択された配列要素の一つ以上はインシリコで設計される。一部の実施形態では、一つ以上のこのような選択配列要素は、例えば、天然または合成起源の既知の配列要素の変異誘導（例えば、インビボまたはインビトロ）から生じる。例えば、一部の実施形態では、組み換えポリペプチドは、対象のソース生物（例えば、ヒト、マウスなど）のゲノムに見られる配列から成る。一部の実施形態では、組み換えポリペプチドは、変異誘導（例えば、非ヒト動物での、インビトロまたはインビボ）から生じるアミノ酸配列を持ち、従って、組み換えポリペプチドのアミノ酸配列は、ポリペプチド配列から由来するが、インビボで非ヒト動物のゲノム内に自然には存在しない場合がある。

【００７８】

参照：本明細書で使用される場合、対象の剤、動物、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値が比較される、標準または対照の剤、動物、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値を指す。一部の実施形態では、参照の剤、動物、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値は、対象の剤、動物、コホート、個人、集団、サンプル、配列もしくは値の試験または決定と実質的に同時に試験および／または決定される。一部の実施形態では、参照の剤、動物、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値は、任意で有形媒体において具現化された歴史的参照である。一部の実施形態では、参照は対照を指す場合がある。「参照」は、「参照動物」も含む。「参照動物」は本明細書に記述さ

れた改変、本明細書に記述されたものとは異なる改変を持つか、または未改変（すなわち、野生型動物）である場合がある。典型的には、当業者には理解されるように、参照の剤、動物、コホート、個人、集団、サンプル、配列または値は、対象の剤、動物（例えば、哺乳類）、コホート、個人、集団、サンプル、配列もしくは値を決定または特徴付けるために利用される条件と同等の条件下で決定または特徴付けられる。

【００７９】

置換：本明細書において使用される場合、宿主の座位（たとえばゲノム）に存在する「置換された」核酸配列（例えば、遺伝子）がその座位から取り除かれ、異なる「置換」用核酸がその場所に配置されるプロセスを指す。一部の実施形態では、置換された核酸配列および置換用核酸配列は、例えば、それらがお互いに相同である、および／または対応する要素（例えば、タンパク質コード要素、調節要素など）を含むという点でお互いに同等である。一部の実施形態では、置換された核酸配列には、プロモーター、エンハンサー、スプライス供与部位、スプライスアクセプター部位、イントロン、エクソン、非翻訳領域（ＵＴＲ）のうち一つ以上を含み、一部の実施形態では、置換用核酸配列には、一つ以上のコード配列を含む。一部の実施形態では、置換用核酸配列は、置換された核酸配列のホモログまたはバリアント（たとえば変異体）である。一部の実施形態では、置換用核酸配列は、置換された配列のオルソログまたはホモログである。一部の実施形態では、置換用核酸配列はヒト核酸配列であるかまたはそれを含む。一部の実施形態では、置換用核酸配列がヒト核酸配列であるかまたはそれを含む場合を含め、置換された核酸配列は齧歯類配列（例えば、マウスまたはラット配列）であるかまたはそれを含む。一部の実施形態では、置換用核酸配列は、置換された配列のバリアントまたは変異体（すなわち、置換された配列と比較して、たとえば置換などの１個以上の配列の違いを含有する配列）である。そのように配置された核酸配列は、そのように配置された配列を得るために使用されるソース核酸配列の一部である一つ以上の調節配列を含む場合がある（例えば、プロモーター、エンハンサー、５'－または３'－非翻訳領域など）。例えば、様々な実施形態で、置換は、内因性配列と異種配列の代替であり、そのように配置された核酸配列（異種配列を含む）からの遺伝子産物の産生を生じさせるが、内因性配列の発現は生じさせない。置換は、内因性配列によってコードされるポリペプチドと類似の機能を有するポリペプチドをコードする核酸配列と、内因性ゲノム配列の置換である（例えば、内因性ゲノム配列はＫｙｎｕポリペプチドをコードし、ＤＮＡ断片は、１個以上のバリアントＫｙｎｕポリペプチドのすべてまたは一部をコードする）。様々な実施形態で、内因性遺伝子またはその断片は、対応する変異型遺伝子またはその断片で置換される。対応する変異型遺伝子またはその断片は、置換される内因性遺伝子またはその断片と、構造および／もしくは機能が実質的に類似するか、または同じである変異型遺伝子または断片である。

【００８０】

実質的に：本明細書において使用される場合、対象の特徴または特性のすべての、またはほぼすべての範囲または程度を示す定性的な状態を指す。生物学分野の当業者であれば、生物学的および化学的な現象はあったとしても、完了まで進む、および／または完全な状態まで進行する、または絶対的な結果を達成または避けることは稀であることを理解するであろう。従って「実質的に」という用語は本明細書では、多くの生物学的および化学的現象に固有の完全性の欠如の可能性をとらえるために使用される。

【００８１】

実質的な相同性：本明細書で使用される場合、アミノ酸配列間または核酸配列間の比較を指す。当業者であれば理解するように、二つの配列はそれらが対応する位置に相同な残基を含む場合、「実質的に相同」であると一般的にみなされる。相同残基は同一の残基である場合がある。あるいは、相同残基は、適切に類似した構造的特徴および／または機能的特徴を伴う非同一の残基である場合がある。例えば、当業者には周知のように、特定のアミノ酸は「疎水性」または「親水性」アミノ酸、および／または「極性」または「非極性」側鎖を持つものとして一般的に分類される。一つのアミノ酸の同じタイプの別のアミノ酸での置換は、「相同」置換とみなされる場合がよくある。典型的なアミノ酸分類を以

下に要約する：

【００８２】

アラニン	Ala	A	非極性	中性	1.8
アルギニン	Arg	R	極性	陽性	-4.5
アスパラギン	Asn	N	極性	中性	-3.5
アスパラギン酸	Asp	D	極性	陰性	-3.5
システイン	Cys	C	非極性	中性	2.5
グルタミン酸	Glu	E	極性	陰性	-3.5
グルタミン	Gln	Q	極性	中性	-3.5
グリシン	Gly	G	非極性	中性	-0.4
ヒスチジン	His	H	極性	陽性	-3.2
イソロイシン	Ile	I	非極性	中性	4.5
ロイシン	Leu	L	非極性	中性	3.8
リジン	Lys	K	極性	陽性	-3.9
メチオニン	Met	M	非極性	中性	1.9
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中性	2.8
プロリン	Pro	P	非極性	中性	-1.6
セリン	Ser	S	極性	中性	-0.8
スレオニン	Thr	T	極性	中性	-0.7
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性	-0.9
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	-1.3
バリン	Val	V	非極性	中性	4.2

曖昧なアミノ酸	3文字	1文字
アスパラギンまたはアスパラギン酸	Asx	B
グルタミンまたはグルタミン酸	Glx	Z
ロイシンまたはイソロイシン	Xle	J
不特定または未知のアミノ酸	Xaa	X

当技術分野で周知のように、アミノ酸または核酸配列は、ヌクレオチド配列に対するＢＬＡＳＴＮおよびＢＬＡＳＴＰ、ｇａｐｐｅｄ　ＢＬＡＳＴ、およびアミノ酸配列に対するＰＳＩ－ＢＬＡＳＴなどの市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む、様々なアルゴリズムの任意のものを使用して比較することができる。かかるプログラムの例は、Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５（３）：４０３－１０；Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：４６０－８０；Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，１９９７，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２５：３３８９－４０２；Ｂａｘｅｖａｎｉｓ，Ａ．Ｄ．ａｎｄ　Ｂ．Ｆ．Ｆ．Ｏｕｅｌｌｅｔｔｅ（ｅｄｓ．）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　ｔｈｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｗｉｌｅｙ，１９９８；ａｎｄ　Ｍｉｓｅｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｓ．）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１３２，Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，１９９８に解説されている。相同配列を特定することに加えて、上述のプログラムは相同性の程度の指標を一般的に提供する。一部の実施形態では、二つの配列は、残基の関連する区間に渡って、その対応残基の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５

％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上が相同の場合、実質的に相同であるとみなされる。一部の実施形態では、関連する区間は完全配列である。一部の実施形態では、関連する区間は少なくとも９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７またはそれ以上の残基である。一部の実施形態では、関連する区間は完全配列に沿った隣接残基を含む。一部の実施形態では、関連する区間は完全配列に沿った不連続な残基を含み、たとえばポリペプチドまたはその一部のフォールディングされた構造により引き合わされた非隣接残基を含む。一部の実施形態では、関連する区間は少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０またはそれ以上の残基である。

【００８３】

実質的な同一性：本明細書で使用される場合、アミノ酸配列間または核酸配列間の比較を指す。当業者であれば理解するように、二つの配列はそれらが対応する位置に同一な残基を含む場合、「実質的に同一」であると一般的にみなされる。当技術分野で周知のように、アミノ酸または核酸配列は、ヌクレオチド配列に対するＢＬＡＳＴＮおよびＢＬＡＳＴＰ、ｇａｐｐｅｄ　ＢＬＡＳＴ、およびアミノ酸配列に対するＰＳＩ－ＢＬＡＳＴなどの市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む、様々なアルゴリズムの任意のものを使用して比較することができる。かかるプログラムの例は、Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５（３）：４０３－１０；Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：４６０－８０；Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，１９９７，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２５：３３８９－４０２；Ｂａｘｅｖａｎｉｓ，Ａ．Ｄ．ａｎｄ　Ｂ．Ｆ．Ｆ．Ｏｕｅｌｌｅｔｔｅ（ｅｄｓ．）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　ｔｈｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｗｉｌｅｙ，１９９８；ａｎｄ　Ｍｉｓｅｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（ｅｄｓ．）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．１３２，Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，１９９８に解説されている。同一配列の特定に加え、上述のプログラムは多くの場合、同一性の程度の指標も提供する。一部の実施形態では、二つの配列は、残基の関連する区間に渡って、その対応残基の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上が同一の場合、実質的に同一であるとみなされる。一部の実施形態では、関連する区間は完全配列である。一部の実施形態では、関連する区間は少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０またはそれ以上の残基である。

【００８４】

標的化ベクターまたは標的化構築物：本明細書において使用される場合、標的化領域を備えるポリヌクレオチド分子を指す。標的化領域は、標的の細胞、組織または動物の配列と同一または実質的に同一の配列を備え、相同組み換えを介して標的化構築物（および／またはその中に含有される配列）を、その細胞、組織または動物のゲノム内の位置に統合する。部位特異的リコンビナーゼ認識部位（たとえばｌｏｘＰ部位またはＦｒｔ部位）を使用し、リコンビナーゼ介在カセット交換を介して細胞、組織または動物の一部へと標的化する標的化領域もまた含まれる。一部の実施形態では、本明細書に記載される標的化構築物は、特定の対象の核酸配列または遺伝子（たとえばレポーター遺伝子、同種遺伝子、異種遺伝子、または変異型遺伝子）、選択マーカー、対照配列および／または制御配列、ならびにリコンビナーゼまたは組み換え誘導性ポリペプチドをコードする他の核酸配列をさらに備える。一部の実施形態では、標的化構築物は、対象の遺伝子の全部または一部をさらに備えていてもよく、この場合において対象の遺伝子は、内因性配列によってコードされるタンパク質と類似の機能を有するポリペプチドの全部または一部をコードする。一部の実施形態では、標的化構築物は、対象の変異型遺伝子の全部または一部をさらに備えていてもよく、この場合において対象の変異型遺伝子は、内因性配列によってコードされ

るポリペプチドと類似の機能を有するバリアントポリペプチドの全部または一部をコードする。一部の実施形態では、標的化構築物は、レポーター遺伝子の全部または一部を備えていてもよく、この場合においてそのレポーター遺伝子は、当分野に公知の技術を使用して容易に特定される、および／または測定されるポリペプチドをコードする。

【００８５】

バリアント：本明細書で使用される場合、参照実体とかなりの構造的同一性を示すが、参照実体と比較して、一つ以上の化学的部分の存在において、または一つ以上の化学的部分のレベルにおいて、参照実体とは構造的に異なる実体を指す。一部の実施形態では、「バリアント」は、その参照実体とは機能的にも異なる。一般的に、特定の実体が、参照実体の「バリアント」と正しくみなされるかどうかは、参照実体とのその構造同一性の程度に基づく。当業者であれば理解するように、すべての生物学的または化学的参照実体は特定の特徴的構造要素を持つ。「バリアント」は、定義によると、一つ以上のこのような特徴的構造要素を共有する別個の化学的実体である。いくつかの例を挙げると、小分子は特徴的なコア構造要素（例えば、マクロサイクルコア）および／または一つ以上の特徴的懸垂部分を持つ場合があり、従って小分子のバリアントは、コア構造要素および特徴的懸垂部分を共有するが、その他の懸垂部分および／またはコア内に存在する結合のタイプ（単に対する二重、Ｅに対するＺなど）が異なるものであり、ポリペプチドは、直線または三次元空間でお互いに対して指定された位置を持つおよび／または特定の生物学的機能に寄与する複数のアミノ酸から成る特徴的配列要素を持つ場合があり、核酸は、直線または三次元空間でお互いに対して指定された位置を持つ複数のヌクレオチド残基から成る特徴的配列要素を持つ場合がある。例えば、「バリアントポリペプチド」は、アミノ酸配列の一つ以上の差異および／またはポリペプチド骨格に共有結合した化学的部分（例えば、炭化水素、脂質など）の一つ以上の差異の結果として、参照ポリペプチドとは異なる場合がある。一部の実施形態では、「バリアントポリペプチド」は、参照ポリペプチドと少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、または９９％の全体的配列同一性を示す。あるいはまたはさらに、一部の実施形態では、「バリアントポリペプチド」は、少なくとも一つの特徴的配列要素を参照ポリペプチドと共有しない。一部の実施形態では、参照ポリペプチドは一つ以上の生物活性を持つ。一部の実施形態では、「バリアントポリペプチド」は参照ポリペプチドの生物活性の一つ以上を共有する。一部の実施形態では、「バリアントポリペプチド」は参照ポリペプチドの生物活性の一つ以上を欠く。一部の実施形態では、「バリアントポリペプチド」は参照ポリペプチドと比べて一つ以上の生物活性のレベル減少を示す。一部の実施形態で、対象のポリペプチドは、特定位置での少数の配列変更以外は、親のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する場合、対象のポリペプチドは、親または参照ポリペプチドの「バリアント」であるとみなされる。典型的には、親と比べて、バリアント中の残基の２０％、１５％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、または２％未満が置換される。一部の実施形態では、「バリアント」は親と比べて、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、または１個の置換残基を有する。しばしば、「バリアント」は、非常に少数の（例えば、５、４、３、２、または１未満）の置換された機能残基（すなわち、特定の生物活性に参加する残基）を持つ。さらに、「バリアント」は一般的には５、４、３、２、または１以下の付加または欠失を持ち、親と比べて付加または欠失を持たないことがよくある。さらに、任意の付加または欠失は一般的には、約２５、約２０、約１９、約１８、約１７、約１６、約１５、約１４、約１３、約１０、約９、約８、約７、約６未満であり、通常は約５、約４、約３、または約２残基である。一部の実施形態では、親または参照ポリペプチドは自然界に存在するものである。当業者であれば理解するように、特に対象のポリペプチドが感染因子ペプチドである時、対象の特定ポリペプチドの複数のバリアントは、通常は自然界に見られる場合がある。

【００８６】

ベクター：本明細書において使用される場合、それが関連する別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。一部の実施形態では、ベクターは、染色体外複製および／また

は、真核および／または原核細胞などの宿主細胞中でそれらが連結する核酸の発現能力がある。動作可能に連結された遺伝子の発現を誘導することができるベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼称される。

【００８７】

野生型：本明細書で使用される場合、（変異型、病的、変更などとは対照をなす）「正常」な状態または状況で自然界に存在する構造および／または活性を有する実体を指す。当分野の当業者であれば、野生型の遺伝子およびポリペプチドはしばしば複数の異なる形態（例えば、アレル）で存在することを理解するであろう。

【００８８】

特定の実施形態の詳細な説明

キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）ポリペプチドをコードする遺伝物質中に破損または突然変異を有する非ヒト動物が提供される。特に、Ｋｙｎｕ遺伝子のコード配列のすべてまたは一部の欠失を有する非ヒト動物が提供され、その欠失により、当該非ヒト動物からＫｙｎｕポリペプチドの除去が生じる。また、Ｋｙｎｕ遺伝子のコード配列中に１つ以上の突然変異を有する非ヒト動物が提供され、その突然変異は、アミノ酸置換を含むコード遺伝子産物を生じさせ、そのアミノ酸置換は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）中に存在する共有エピトープの除去を生じさせる。本明細書において、Ｋｙｎｕ遺伝子中に１つ以上の点変異を有する非ヒト動物が記載され、その点変異は、コードＫｙｎｕポリペプチド中に保存的アミノ酸置換（たとえば、アスパラギン酸［Ａｓｐ、Ｄ］とグルタミン酸［Ｇｌｕ、Ｅ］の置換）を生じさせる。かかるアミノ酸置換は、本明細書に記載されるように、非ヒト動物により発現される内因性ＫｙｎｕポリペプチドとＨＩＶ－１　ｇｐ４１の膜近位外部領域（ＭＰＥＲ）に存在する共有エピトープの除去を生じさせる。ゆえに、提供される非ヒト動物は、ＨＩＶ感染および／もしくは伝染の治療ならびに／または改善に対する治療候補の開発および特定に特に有用であり、これらは、かかるエピトープを含有するＫｙｎｕポリペプチドを発現する野生型非ヒト動物を用いた場合には、自己寛容メカニズムのために得ることができないものである。特に、本明細書に記載される非ヒト動物は、１つ以上（たとえば１、２、３、４、５つなど）の点変異を、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子のコード配列に導入することを包含しており、その点変異は、野生型Ｋｙｎｕポリペプチドの機能は保持するが、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲ中にも存在するエピトープは欠いているＫｙｎｕポリペプチド（たとえばバリアントＫｙｎｕポリペプチド）を生じさせる。かかる非ヒト動物は、ＨＩＶ感染および／もしくは伝染の治療ならびに／または改善のための中和抗体の特定のための細胞源を提供する。さらに、かかる非ヒト動物は、ＨＩＶの感染、伝染、ならびに／またはそれに関連した疾患、障害、および症状の治療のための治療剤の開発のための有用な動物モデル系となる能力を提供する。

【００８９】

一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、本明細書に記載されるようにＫｙｎｕ遺伝子における破損または突然変異に関し、ヘテロ接合性である。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、本明細書に記載されるようにＫｙｎｕ遺伝子における破損または突然変異に関し、ホモ接合性である。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、レポーター遺伝子の全部または一部を備えており、この場合において前述のレポーター遺伝子は、Ｋｙｎｕプロモーターに動作可能に連結される。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕプロモーターは、内因性Ｋｙｎｕプロモーターを含む。

【００９０】

一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物により発現されるＫｙｎｕポリペプチドは、アミノ酸配列ＥＬＥＫＷＡ（配列番号３６）を含むＨ４ドメイン配列を備える。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物により発現されるＫｙｎｕポリペプチドは、野生型齧歯類Ｋｙｎｕポリペプチド中に存在し、そして残基９３にアミノ酸置換（たとえば、野生型齧歯類Ｋｙｎｕポリペプチド中に存在するアミノ酸以外のアミノ酸とのアミノ酸置換）をさらに含むＨ４ドメイン配列を備える。一部のある実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物により発現されるＫｙｎｕポリペプチドは、野生型

齧歯類Ｋｙｎｕポリペプチド中に存在し、Ｄ９３Ｅ置換をさらに含むＨ４ドメイン配列を備える。ゆえに、かかるＫｙｎｕポリペプチドは、一部の実施形態では、バリアントＫｙｎｕポリペプチドと特徴付けられ、または呼称される場合がある。

【００９１】

一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、欠失、破損、または別の手段で非機能的な内因性Ｋｙｎｕ遺伝子を備え、そして異種（たとえばヒト）由来の遺伝物質をさらに備える。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、変異型ヒトＫｙｎｕ遺伝子を備えており、この場合において当該変異型ヒトＫｙｎｕ遺伝子は、Ｄ９３Ｅ置換を含むヒトＫｙｎｕポリペプチドをコードする。一部のある実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は変異型ヒトＫｙｎｕ遺伝子を備えており、当該変異型ヒトＫｙｎｕ遺伝子は非ヒト動物のゲノム内に無作為に挿入され、それによりＤ９３Ｅ置換を含むヒトＫｙｎｕポリペプチドが発現される。

【００９２】

本発明の様々な態様が以下のセクションに詳細に記述される。セクションの使用は本発明を限定することを意図しない。各セクションは本発明の任意の態様に適用することができる。本明細書では、特に指定のない限り、「または」の使用は「および／または」を意味する。

【００９３】

自己免疫

Ｂ細胞受容体は、遺伝子セグメント（たとえばＶ、ＤおよびＪ）の規則正しい配置からの一連の組み換え事象を介して組み立てられる。この遺伝子セグメントの組立は曖昧であり、自己抗原を含む様々な抗原に対するアフィニティを有する受容体を生成することが知られる。自己分子に結合するＢ細胞受容体を生成してしまう能力があるかわりに、免疫系は数種の自己寛容メカニズムを備えており、それにより、かかる自己反応性Ｂ細胞受容体の発達と増大を回避し、自己と非自己を識別して、自己免疫を防止する（たとえば、Ｓｈｌｏｍｃｈｉｋ，Ｍ．Ｊ．，２００８，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　２８：１８－２８；Ｋｕｍａｒ，Ｋ．Ｒ．ａｎｄ　Ｃ．Ｍｏｈａｎ，２００８，４０（３）：２０８－２３を参照のこと）。かかる自己寛容メカニズムの機能が停止したり、別の理由により不適切に機能してしまった場合、自己免疫が生じ、関与する免疫細胞（たとえばＢ細胞またはＴ細胞）と抗原に応じて、様々な障害が現れる。たとえば甲状腺刺激ホルモン受容体に結合する自己反応性抗体の異常な増大により、甲状腺ホルモンの過剰産生が生じ、グレーブス病が発生する。また、たとえばＤＮＡ、クロマチン、およびリボ核タンパク質などの自己分子に結合する自己反応性抗体の生成および増大により、たとえば糸球体腎炎および血管炎などの重篤な炎症症状が生じ、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）と呼称される症状が発生する。自己寛容の破綻に対する防御のために、免疫系が用いるメカニズムとしては、たとえば骨髄および胸腺における自己反応性Ｂ細胞の削除および受容体編集、末梢器官における共刺激性分子の弱シグナル伝達の欠落を介した不活化（またはアネルギー）、およびリンパ組織からの自己分子の物理的分離が挙げられる。自己寛容メカニズムと自己免疫は、Ｍｕｒｐｈｙ，Ｋ．，２０１２，Ｊａｎｅｗａｙ’ｓ　Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ：８th ｅｄ．Ｃｈａｐｔｅｒｓ　８　ａｎｄ　１５：Ｇａｒｌａｎｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ｐｐ．２７５－３３３，６１１－６６８において詳細に検討され、この文献は参照により本明細書に援用される。

【００９４】

しかしながら自己寛容メカニズムは、負の結果も付随する。たとえば様々な分子の操作を介して、癌細胞は寛容メカニズムを誘導し、抗腫瘍免疫を阻害および／または下方制御することで、宿主の免疫システムをすり抜けることができる。またウイルス病原体は、抗体応答の抑制により、効率的に宿主に感染し、排除を回避することが判明している（たとえば、Ｙａｍａｄａ，Ｄ．Ｈ．ｅｔ　ａｌ．，２０１５，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　４２（２）：３７９－９０を参照のこと）。特に、いくつかの報告書において、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）が、広範な中和抗体の発達を抑制する自己寛容メカニズムを、疾患経過を良

好に変化させるには遅すぎる時期まで誘導することにより、免疫応答に対し抵抗性となることが示される（たとえば、Ｖｅｒｋｏｃｚｙ，Ｌ．ａｎｄ Ｍ．Ｄｉａｚ，２０１４，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．ＨＩＶ ＡＩＤＳ ９（３）：２２４－３４；Ｈａｙｎｅｓ，Ｂ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｔｒｅｎｄｓ Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．１７（２）：１０８－１６；Ｖｅｒｋｏｃｚｙ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３：３８３－９０；Ｈａｙｎｅｓ，Ｂ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．，２００５，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３０８：１９０６－８を参照のこと）。

【００９５】

ＨＩＶは、膜融合により細胞に入り込む統合型のエンベロープを持つレンチウイルス（レトロウイルスの亜群）である（Ｈａｒｒｉｓｏｎ，Ｓ．Ｃ．，２００５，Ａｄｖ．Ｖｉｒｕｓ．Ｒｅｓ．６４：２３１－６１）。ＨＩＶの構造、ゲノムおよびライフサイクルは詳細に研究されている。ＨＩＶのゲノムはウイルスのエンベロープに囲まれており、このエンベロープには、宿主細胞から取り込まれた脂質二重層とタンパク質が含まれ、ならびにＨＩＶのエンベロープタンパク質は、糖たんぱく質１２０と４１（ｇｐ１２０およびｇｐ４１）を含むキャップからなる。ＨＩＶは、重要な免疫細胞、特に注目すべきはＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞に感染し、免疫の機能不全と、部分的にはＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の減少による細胞介在性免疫の欠落を生じさせる。ＨＩＶ感染直後の初期Ｂ細胞応答は検出することができるが、血漿ＨＩＶ値の制御という点では効果がないままとなる（たとえば、Ｈａｙｎｅｓ，Ｂ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｔｒｅｎｄｓ Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．１７（２）：１０８－１６；Ｂａｒ，Ｋ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．，２０１０，ＡＩＤＳ Ｒｅｓ．Ｈｕｍａｎ Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ ２６：Ａ－１２；Ｔｏｍａｒａｓ，Ｇ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８２：１２４４９－６３を参照のこと）。ＨＩＶに対する免疫応答が無効であることが観察されているにもかかわらず、ｇｐ１２０とｇｐ４１に結合する６種の中和抗体（２Ｇ１２、ｂ１２、４４７－５２Ｄ、２Ｆ５、４Ｅ１０、Ｚ１３）が患者から特定されている（Ｇｏｒｎｙ，Ｍ．Ｋ．ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０（２）：６３５－４３；Ｍｕｓｔｅｒ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６７：６６４２－７；Ｂｕｃｈａｃｈｅｒ，Ａ．ｅｔ ａｌ．，１９９４，ＡＩＤＳ Ｒｅｓ．Ｈｕｍａｎ Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ １０：３５９－６９；Ｂｕｒｔｏｎ，Ｄ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６６：１０２４－７；Ｍｕｓｔｅｒ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６８：４０３１－４；Ｐｕｒｔｓｃｈｅｒ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，１９９４，ＡＩＤＳ Ｒｅｓ．Ｈｕｍ．Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ １０：１６５１－８；Ｒｏｂｅｎ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６８：４８２１－８；Ｐａｒｒｅｎ，Ｐ．Ｗ．ｅｔ ａｌ．，１９９５，ＡＩＤＳ ９：Ｆ１－Ｆ６；Ｔｒｋｏｌａ，Ａ．ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６９：６６０９－１７；Ｔｒｋｏｌａ，Ａ．ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７０：１１００－８；Ｓｔｉｅｇｌｅｒ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．，２００１，ＡＩＤＳ Ｒｅｓ．Ｈｕｍ．Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ １７：１７５７－６５；Ｚｗｉｃｋ，Ｍ．Ｂ．ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７５：１０８９２－９０５；Ｓｔｉｅｇｌｅｒ，Ｇ．ａｎｄ Ｈ．Ｋａｔｉｎｇｅｒ，２００３，Ｊ．Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．５１：７５７－９；Ｏｆｅｋ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．，２００４，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．１９：１０７２４－３７；Ｃａｒｄｏｓｏ，Ｒ．Ｍ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．，２００５，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ２２：１６３－７３）。これら特定された中和抗体の中で、モノクローナル抗体２Ｆ５と４Ｅ１０は、１型ＨＩＶ（ＨＩＶ－１）のｇｐ４１の膜近位外部領域（ＭＰＥＲ、ＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮＷＦＤＩＴＮＷＬＷＹＩＫ；配列番号４３）中のエピトープに結合し、さらに自己抗原にも結合することが報告されている（Ｈａｙｎｅｓ，Ｂ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．，２００５，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３０８：１９０６－８；Ｖｅｒｋｏｃｚｙ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．，２０１０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７（１）：１８１－６；Ｖｅｒｋｏｃｚｙ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８７：３７８５－９７）。実際のところ、ＭＰＥＲはＨＩＶ－１ワクチン設計の標的であり続けている（概要に関し、たとえばＭｏｎｔｅｒ

ｏ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．７２（１）：５４－８４を参照のこと）。

【００９６】

キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）は自己抗原として最近になり特定されたものであり、モノクローナル抗体２Ｆ５により結合される完全ＭＰＥＲエピトープを含むドメイン（Ｈ４ドメイン）を含有する（Ｙａｎｇ，Ｇ．ｅｔ　ａｌ．，２０１３，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２１０（２）：２４１－５６）。Ｋｙｎｕは、ピリドキサール－５’－リン酸塩（ピリドキサール－Ｐ）依存性の酵素であり、Ｌ－キヌレニンとＬ－３－ヒドロキシキヌレニンの開裂を触媒し、それぞれアントラニル酸と３－ヒドロキシアントラニル酸を生じさせ、キヌレニン経路を介したトリプトファンからのＮＡＤ補因子の生合成に関与する。選択的スプライシングにより、複数の転写バリアントが生じる（以下を参照）。いくつかの研究により、Ｋｙｎｕ活性と高血圧の関連性が報告されている（Ｋｗｏｋ，Ｊ．Ｂ．ｅｔ　ａｌ．，２００２，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７（３９）：３５７７９－８２；Ｍｉｚｕｔａｎｉ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，２００２，Ｈｙｐｅｒｔｅｎｓ．Ｒｅｓ．２５（１）：１３５－４０；Ｚｈａｎｇ，Ｙ．ｅｔ　ａｌ．，２０１１，Ｃｉｒｃ．Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｇｅｎｅｔ．４：６８７－９４）。ＨＩＶに対する既存の中和抗体と、自己抗原の間の共有エピトープの特定により、かかる抗体を産生するＢ細胞は、その自己反応性が原因で免疫レパートリーから削除されている可能性があり、ゆえに、ＨＩＶに対する効果的な抗体応答が患者において大幅に損なわれている、または存在していない可能性があるという洞察がもたらされた。

【００９７】

自己抗原に結合する抗体の産生は、解説されている（たとえば、米国特許第５，８８５，７９３号、米国特許第６，５２１，４０４号、米国特許第６，５４４，７３１号、米国特許第６，５５５，３１３号、米国特許第６，５８２，９１５号、米国特許第６，５９３，０８１号、米国特許第７，１１９，２４８号、米国特許第７，１９５，８６６号、米国特許第７，４５９，１５８号、米国特許第８，０１３，２０８号、米国特許第８，０２５，８７３号、米国特許第８，２９３，７０１号、米国特許第８，３８９，７９３号、米国特許第８，４６５，７４５号、および米国特許第８，５６３，００３号を参照のこと）。特に、非ヒト動物において、自己抗原またはそのホモログに結合するモノクローナル抗体を取得する方法は、そのヒトの対応する遺伝子と高い相同性を共有する、および／または高度に保存されている、非ヒト動物中の遺伝子のノックアウトを介して行われる（米国特許第７，１１９，２４８号を参照のこと）。高度に類似した、または「相同な」ヒト抗原を用いた非ヒト動物（たとえば齧歯類）の免疫化では、弱い抗体応答が生じてしまい、または抗体応答が存在せず、ゆえに、かかるヒト抗原に指向性の結合を伴う抗体の取得が疑わしいものとなる。本発明は、免疫寛容は、かかる外来性実体に対する中和抗体を発現するＢ細胞を枯渇させる、および／または削除するため、内因性ポリペプチドと、たとえばウイルスなどの外来性抗原の間にそのような共有エピトープが存在することで、非ヒト動物において、そのような外来性実体を中和する有効な免疫応答が開始されるかは疑わしいものとなるという洞察に基づいている。ゆえに、本発明は、外来性実体（たとえばウイルス）と共有される、非ヒト動物中のエピトープを認識する治療抗体の作製および開発のための改善されたｉｎ　ｖｉｖｏ系は、たとえば齧歯類（たとえばマウス）などの非ヒト動物中の内因性遺伝子産物中に存在するかかる共有エピトープを、かかる遺伝子産物の機能を損なうことなく除去することにより作製され得るという認識に基づいている。本開示は、特に、内因性遺伝子産物のホモログではない抗原中に存在するエピトープを、非ヒト動物の内因性遺伝子産物から除去する戦略の例を示す。

【００９８】

本明細書に記載されるように、本開示は、齧歯類の内因性ＫｙｎｕポリペプチドとＨＩＶに存在する共有エピトープを除去し、当該齧歯類中で抗ＨＩＶ抗体が作製され得るようにするための戦略を具体的に記載するものである。特に、本開示は、齧歯類Ｋｙｎｕポリペプチドをコードする遺伝物質を操作し、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１中に存在し、Ｋｙｎｕポ

リペプチド中にも存在するエピトープを除去する方法を具体的に記載するものである。１つの戦略において、齧歯類が遺伝子操作され、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲ中にも存在するエピトープを含有する内因性Ｋｙｎｕポリペプチドをコードする遺伝物質のすべてまたは一部が削除される。別の戦略において、齧歯類が遺伝子操作されて、内因性Ｋｙｎｕポリペプチドをコードする遺伝物質が改変され、それにより当該齧歯類により発現される、得られたＫｙｎｕポリペプチドは、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲ中に存在する共有エピトープを欠くＫｙｎｕポリペプチド（すなわちバリアントＫｙｎｕポリペプチド）となる。本明細書に記載される齧歯類により発現される、そのようなバリアントＫｙｎｕポリペプチドは、野生型Ｋｙｎｕポリペプチドと構造的、および機能的に同等である事が予期される。

【００９９】

任意の特定の学説に拘束されることは望まないが、本明細書に記載される戦略を利用して、たとえば齧歯類などの非ヒト動物の任意の他の内因性遺伝子産物中に存在するエピトープを除去することができ、または望まれる場合には、１つ以上の内因性遺伝子産物中に存在するエピトープの組み合わせを除外することができ、それらエピトープは、ＨＩＶ中（たとえば、ＨＩＶエンベロープタンパク質中）にも存在するものである。かかる内因性遺伝子産物の例は、Ｙａｎｇ，Ｇ．ｅｔ　ａｌ．（２０１３、上記）に記載されており、およびアポトーシス誘導因子１ミトコンドリア前駆体（ＡＩＦＭ１）、脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ３Ａ２）、ＡＴＰａｓｅファミリーＡＡＡドメイン含有タンパク質３Ａ（ＡＴＡＤ３Ａ）、ｅｒｌｉｎ－２（ＥＲＬＮ２）、エメリン（ＥＭＤ）、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）、６０ｋＤヒートショックタンパク質ミトコンドリア前駆体（ＨＳＰ６０）、チューブリン－１Ｂ鎖（Ｋ－ＡＬＰＨＡ－１）、キヌレニナーゼ（ＫＹＮＵ）、ドリチルジホスホオリゴ糖－タンパク質グリコシルトランスフェラーゼ４８　ｋＤ　サブユニット前駆体（ＯＳＴ４８）、プロヒビチン（ＰＨＢ）、６０Ｓ　リボソームタンパク質Ｌ４（ＲＰＬ４）、６０Ｓ　リボソームタンパク質Ｌ７（ＲＰＬ７）、スプライシング因子３Ｂサブユニット３（ＳＦ３Ｂ３）、ミトコンドリア　２－オキソグルタル酸／リンゴ酸担体タンパク質（ＳＬＣ２５Ａ１１）、不均一核リボ核タンパク質Ｑ（ＳＹＮＣＲＩＰ）、チューブリン－４Ａ鎖（ＴＵＢＢ４）、および伸長因子Ｔｕミトコンドリア前駆体（ＴＵＦＭ）が挙げられる。ゆえに本発明は特に、ＨＩＶの感染および伝染の治療ならびに／または改善のための抗体、および／または抗体系治療法の開発用の改善されたｉｎ　ｖｉｖｏシステムの生成を提供するものである。

【０１００】

自己抗原配列の例

ヒトおよび齧歯類（たとえばラットおよびマウス）のＫｙｎｕ配列の例を以下に解説する。ｍＲＮＡ配列については、カッコ内の太字はコード配列を示し、その太字で示されるなかで、連続したエクソンは、交互の下線文字により分けられる。

【０１０１】

ヒトＫＹＮＵ転写バリアントは当分野に公知である。たとえば１つのヒトＫＹＮＵ転写バリアント（バリアント２）は、バリアント３と比較して、５’非翻訳領域、３’非翻訳領域、およびコード領域が異なる。得られるアイソフォーム（アイソフォームｂ）は短く（３０７アミノ酸）、アイソフォームａと比較して明白に異なるＣ末端を有する。このバリアントのｍＲＮＡ配列とアミノ酸配列は、それぞれ、ＮＣＢＩ参照番号ＮＭ＿００１０３２９９８．１とＮＰ＿００１０２８１７０．１に見いだされ、参照により本明細書に援用される。別のヒトＫＹＮＵ転写バリアント（バリアント３）は、最も長い転写バリアントであり、アイソフォームａをコードする（バリアント１と同様、以下を参照）。このバリアントのｍＲＮＡ配列とアミノ酸配列は、それぞれ、ＮＣＢＩ参照番号ＮＭ＿００１１９９２４１．１とＮＰ＿００１１８６１７０．１に見いだされ、参照により本明細書に援用される。

【０１０２】

マウスＫｙｎｕ転写物も当分野に公知である。たとえば、１つのマウスＫｙｎｕ転写バリアント（バリアント２）は、バリアント１で使用されるスプライス部位を超えて伸長する３’末端エクソンを含有しており、バリアント１と比較して新規の３’コード領域と３’非翻訳領域が生じる。このバリアント（バリアント２）はアイソフォーム２をコードしており、短く（４２８アミノ酸）、アイソフォーム１と比較して明白に異なるＣ末端を有する。このバリアントのｍＲＮＡ配列とアミノ酸配列は、それぞれ、ＮＣＢＩ参照番号ＮＭ＿００１２８９５９３．１とＮＰ＿００１２７６５２２．１に見いだされ、参照により本明細書に援用される。別のマウスＫｙｎｕ転写バリアント（バリアント３）は、バリアント１と比較して別の３’末端エクソンを含有する。このバリアント（バリアント３）はアイソフォーム３をコードしており、短く（３２４アミノ酸）、アイソフォーム１と比較して明白に異なるＣ末端を有する。このバリアントのｍＲＮＡ配列とアミノ酸配列は、それぞれ、ＮＣＢＩ参照番号ＮＭ＿００１２８９５９４．１とＮＰ＿００１２７６５２３．１に見いだされ、参照により本明細書に援用される。

【０１０３】

ヒト（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ）ＫＹＮＵ転写バリアント１のｍＲＮＡ（配列番号１、ＮＣＢＩ参照配列　ＮＭ＿００３９３７．２）：

【０１０４】

GCAGTTCTTTGAATTTCTCACCCTAAGATCTGGCCTGTACATTTTCAAGGAATTCTTGAGAGGTTCTTGGAGAGATTCTGGG
AGCCAAACACTCCATTGGGATCCTAGCTGTTTTAGAGAACAACTTGTA(ATGGAGCCTTCATCTCTTGAGCTGCCGGCTGAC
ACAGTGCAGCGCATTGCGGCTGAACTCAAATGCCACCCAACGGATGAGAGGGTGGCTCTCCACCTAGATGAGGAAGATAAG
CTGAGGCACTTCAGGGAGTGCTTTTATATTCCCAAAATACAGGATCTGCCTCCAGTTGATTTATCATTAGTGAATAAAGAT
GAAAATGCCATCTATTTCTTGGGAAATTCTCTTGGCCTTCAACCAAAAATGGTTAAAACATATCTTGAAGAAGAACTAGAT
AAGTGGGCCAAAATAGCAGCCTATGGTCATGAAGTGGGGAAGCGTCCTTGGATTACAGGAGATGAGAGTATTGTAGGCCTT
ATGAAGGACATTGTAGGAGCCAATGAGAAAGAAATAGCCCTAATGAATGCTTTGACTGTAAATTTACATCTTCTAATGTTA
TCATTTTTTAAGCCTACGCCAAAACGATATAAAATTCTTCTAGAAGCCAAAGCCTTCCCTTCTGATCATTATGCTATTGAG
TCACAACTACAACTTCACGGACTTAACATTGAAGAAAGTATGCGGATGATAAAGCCAAGAGAGGGGGAAGAAACCTTAAGA
ATAGAGGATATCCTTGAAGTAATTGAGAAGGAAGGAGACTCAATTGCAGTGATCCTGTTCAGTGGGGTGCATTTTTACACT
GGACAGCACTTTAATATTCCTGCCATCACAAAAGCTGGACAAGCGAAGGGTTGTTATGTTGGCTTTGATCTAGCACATGCA
GTTGGAAATGTTGAACTCTACTTACATGACTGGGGAGTTGATTTTGCCTGCTGGTGTTCCTACAAGTATTTAAATGCAGGA
GCAGGAGGAATTGCTGGTGCCTTCATTCATGAAAAGCATGCCCATACGATTAAACCTGCATTAGTGGGATGGTTTGGCCAT
GAACTCAGCACCAGATTTAAGATGGATAACAAACTGCAGTTAATCCCTGGGGTCTGTGGATTCCGAATTTCAAATCCTCCC
ATTTTGTTGGTCTGTTCCTTGCATGCTAGTTTAGAGATCTTTAAGCAAGCGACAATGAAGGCATTGCGGAAAAAATCTGTT
TTGCTAACTGGCTATCTGGAATACCTGATCAAGCATAACTATGGCAAAGATAAAGCAGCAACCAAGAAACCAGTTGTGAAC
ATAATTACTCCGTCTCATGTAGAGGAGCGGGGGTGCCAGCTAACAATAACATTTTCTGTTCCAAACAAAGATGTTTTCCAA
GAACTAGAAAAAAGAGGAGTGGTTTGTGACAAGCGGAATCCAAATGGCATTCGAGTGGCTCCAGTTCCTCTCTATAATTCT
TTCCATGATGTTTATAAATTTACCAATCTGCTCACTTCTATACTTGACTCTGCAGAAACAAAAAATTAG)CAGTGTTTTCT
AGAACAACTTAAGCAAATTATACTGAAAGCTGCTGTGGTTATTTCAGTATTATTCGATTTTTAATTATTGAAAGTATGTCAC
CATTGACCACATGTAACTAACAATAAATAATATACCTTACAGAAAATCTGAAAAAAAAAAAAAAAAA

ヒト（Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓ）ＫＹＮＵのアイソフォームａ、転写バリアント１によりコードされる４６５アミノ酸（配列番号２、ＮＣＢＩ参照配列　ＮＰ＿００３９２８．１）：

MEPSSLELPADTVQRIAAELKCHPTDERVALHLDEEDKLRHFRECFYIPKIQDLPPVDLSLVNKDENAIYFLGNSLGLQP
KMVKTYLEEELDKWAKIAAYGHEVGKRPWITGDESIVGLMKDIVGANEKEIALMNALTVNLHLLMLSFFKPTPKRYKILL
EAKAFPSDHYAIESQLQLHGLNIEESMRMIKPREGEETLRIEDILEVIEKEGDSIAVILFSGVHFYTGQHFNIPAITKAG
QAKGCYVGFDLAHAVGNVELYLHDWGVDFACWCSYKYLNAGAGGIAGAFIHEKHAHTIKPALVGWFGHELSTRFKMDNKL
QLIPGVCGFRISNPPILLVCSLHASLEIFKQATMKALRKKSVLLTGYLEYLIKHNYGKDKAATKKPVVNIITPSHVEERG

CQLTITFSVPNKDVFQELEKRGVVCDKRNPNGIRVAPVPLYNSFHDVYKFTNLLTSILDSAETKN

マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）Ｋｙｎｕ転写バリアント１のｍＲＮＡ（配列番号３、ＮＣＢＩ参照配列　ＮＭ＿０２７５５２．２）：

【０１０５】

GAGCAGTTCTTTGGCTAGCTGGGGACAAAGAAAGATCCAGCATCCTCTGAGAAGGTACTGAAGACTACTGTCTGGATCTGAG
CAGATAACAGTTT(ATGATGGAGCCTTCGCCTCTTGAGCTTCCAGTTGATGCAGTGCGGCGCATCGCGGCTGAACTCAATT
GTGACCCAACAGATGAGAGGGTTGCTCTCCGCTTGGATGAGGAAGATAAACTGAGTCATTTTAGGAACTGTTTTTATATTC
CCAAAATGCGGGACCTGCCTTCAATTGATCTATCTTTAGTGAGTGAGGATGATGATGCCATCTATTTCCTGGGAAATTCCC
TTGGCCTTCAACCGAAAATGGTTAGGACATACCTGGAGGAAGAACTAGATAAGTGGGCCAAGATGGGAGCCTATGGCCATG
ATGTAGGCAAACGCCCTTGGATTGTAGGGGATGAGAGTATTGTAAGCCTTATGAAGGACATTGTAGGAGCCCATGAGAAAG
AAATAGCTCTAATGAATGCTTTGACTATTAATTTACATCTCCTGCTGTTATCATTCTTTAAGCCTACTCCAAAGCGGCACA
AAATTCTTCTAGAAGCCAAAGCCTTCCCTTCTGATCATTATGCTATTGAGTCACAGATTCAACTTCACGGACTTGATGTTG
AGAAAAGTATGCGGATGGTAAAGCCACGAGAGGGGGAAGAGACCTTAAGGATGGAGGACATACTGGAAGTAATCGAGGAGG
AAGGAGACTCGATCGCCGTGATCCTGTTCAGTGGGCTGCACTTTTATACTGGACAGCTGTTCAACATTCCTGCCATAACAA
AAGCTGGACATGCAAAGGGCTGTTTTGTTGGCTTTGACCTAGCACATGCAGTTGGAAATGTTGAACTCCGCTTACATGACT
GGGGTGTTGACTTTGCCTGCTGGTGTTCCTATAAGTATTTAAATTCAGGAGCTGGAGGTCTGGCTGGTGCCTTTGTCCACG
AGAAACATGCTCATACTGTCAAGCCTGCGTTAGTGGGATGGTTCGGCCATGACCTCAGTACAAGGTTTAACATGGATAACA
AACTACAATTAATCCCCGGGGCCAATGGATTCCGAATTTCAAACCCTCCCATTTTGTTGGTCTGCTCCTTGCACGCCAGTT
TAGAGGTCTTTCAGCAAGCAACTATGACTGCGCTGAGAAGAAAATCCATTCTGCTGACAGGTTATCTGGAATACATGCTCA
AACATTACCACAGCAAAGATAACACCGAAAACAAGGGGCCGATTGTGAATATCATCACCCCGTCCAGAGCAGAGGAGCGTG
GCTGCCAGTTAACACTCACCTTTTCCATTCCCAAGAAAAGCGTTTTTAAGGAACTAGAAAAAAGAGGAGTCGTTTGTGACA
AGCGAGAACCAGATGGCATCCGCGTGGCCCCTGTTCCTCTCTATAATTCTTTCCATGATGTTTATAAGTTCATCAGACTGC
TCACTTCCATACTCGACTCTTCAGAAAGAAGCTAG)CTATATTTTCTAGCACAACTCAAGTAAATCTCACTGAAAGGTGATG
GAGTTTTCACTTCTATTGAATTTTAGTCATTAAAAAAATCTCCAGAAATTGATTGCACAGAAATGATAACTATAAAAAAATT
TACATAAAACCTGGTGCATGCTTTAATATCTGTGTTTCTGGGGAACGTGGTGTCCTGTGAATTATGAAGTCACACTTTACAT
GACTACAGCCTACAGATGACTGTCTTGATCAGTTGTCACATTTCATGCTCACTGAAACATTTTCTCTTTAATTTGTGACTGA
ATTTCCAACGTTATAATGTATATGGACTTCTTGTATAAATATTAGAAGTATTACTTTAATTTTGCTATAGAGTTTTATTTTA
ATATTTGTAACTGAATCATCTGAAATATGTTTGATATGATCATGTTTTATCTAATTCCAGGAGGGGAACAGCCTTTTAAGCT
GTTACAAAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTTCCCCCCCC
CAGTGGTGTGTGTGTCTATGTGTTTGTGTTTCTGTGTGTCTGTGTAAAGGACATGTAAGTGCTTATGTATAAGGGATGAGGT
ACTTGACCCTATGTACTCTTGTGAGGCCAGAGGTCAACACTGGACATCTTCCTCAATCACTGTTTAAAATTTTATTTATTTA
TTTATTTTTATGTGTATGGGTATTTTGACTGCATTTATGTCTGTACCTCATGTGCATGCCATGATTACAGAAACTAGAAGAT
ACATCAGATCACCTGAGACTGGAGTTACAGAGCTGCTGTGTGGATACTAGGAATTGAACCCAGGTCGTTTGGAAGAATAGCC
AACGCTCTTATTCTTTGACACATCTCTCCAGCCTTTCCACTTCATATTTCAATACATGATTTCTCCCCAAACCTGGAACTTG
CTCCTTCAGCTCGTGTGGCTGGCCAGTGAGTCTTCAGCGTTTCTCTGTCTCTGCCCTACAATGAATGCGGGTTACAGCTGTA
CACTGTTGCACATAGATTTTTTACATGTCTACTGTGATCTGAACACAGTCCTTATATCAGTTCAGCAACCACTTCATCGACC
AAGCAATCCCCCAGTCATTGCTTTTTTGATGCCACTACTAGTATGCATTTACTGGCAAAGAATTCTAAGTTTGTATGTAGAA
AGAAAAAGTTATAATGATTTGATAAACTTGAATAAAACATACTTGGTCAGACAGAAACTTCTGATGTGATAAATGATAAGAT
ATGGAACTCTGGCAGTAGCTAACAACAAACACAGCACTCTTGTTTACTTAGGAATTCAATTCCGAGTGTTGCACACATATCT
ATGTTAACATAGCAAAGCTTTCCACTGCATTATTTCACCTTCATTAATGAAATGGCTATCAGGACCTGGAAACTCATCCGTA
ACACAGATTCCTACATGACTGTTTTTGAGTCCCACAGTGGTCAACAAAAGGACATGGTTTTCATTTTCAAGGAACAGAGTAC
CCTGGTGCCATTCTTCATTGCAAAAAATATAAAAATAAAATAAATAGTTAATTAT

マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）Ｋｙｎｕのアイソフォーム１、転写バリアント１によりコードされる４６５アミノ酸（配列番号４、ＮＣＢＩ参照配列　ＮＰ＿０８１８２

８．１）：

MMEPSPLELPVDAVRRIAAELNCDPTDERVALRLDEEDKLSHFRNCFYIPKMRDLPSIDLSLVSEDDDAIYFLGNSLGLQ
PKMVRTYLEEELDKWAKMGAYGHDVGKRPWIVGDESIVSLMKDIVGAHEKEIALMNALTINLHLLLLLSFFKPTPKRHKIL
LEAKAFPSDHYAIESQIQLHGLDVEKSMRMVKPREGEETLRMEDILEVIEEEGDSIAVILFSGLHFYTGQLFNIPAITKA
GHAKGCFVGFDLAHAVGNVELRLHDWGVDFACWCSYKYLNSGAGGLAGAFVHEKHAHTVKPALVGWFGHDLSTRFNMDNK
LQLIPGANGFRISNPPILLVCSLHASLEVFQQATMTALRRKSILLTGYLEYMLKHYHSKDNTENKGPIVNIITPSRAEER
GCQLTLTFSIPKKSVFKELEKRGVVCDKREPDGIRVAPVPLYNSFHDVYKFIRLLTSILDSSERS

ラット（Ｒａｔｔｕｓ　ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ）ＫｙｎｕｍＲＮＡ（配列番号５、ＮＣＢＩ参照配列　ＮＭ＿０５３９０２．２）：

【０１０６】

TGAAAAGGTACTGGAAACTGAGGACCCTATCTGGATCAAAGCAGTTTCTG(ATGGAGCCCTCGCCTCTTGAGCTACCAGTTG
ATGCAGTGCGGCGCATCGCGGCTGAACTCAATTGTGACCCAACCGATGAGAGGGTGGCTCTCCGCTTGGATGAGGAAGATA
AACTGAAGCGTTTTAAGGACTGTTTTTATATCCCCAAAATGCGGGACCTGCCTTCAATTGATCTATCTTTAGTGAATGAGG
ATGATAATGCCATCTATTTCCTGGGAAATTCCCTTGGTCTTCAACCGAAGATGGTTAAAACATACCTGGAGGAAGAGCTAG
ATAAGTGGGCCAAAATAGGAGCCTATGGCCATGAGGTAGGGAAACGTCCTTGGATTATAGGAGATGAGAGCATTGTAACCC
TTATGAAGGACATTGTAGGAGCCCATGAGAAAGAAATAGCTCTAATGAATGCTTTGACTGTTAATTTACATCTCCTGCTGT
TATCATTCTTTAAGCCTACACCAAAGCGGCACAAAATTCTTCTAGAAGCCAAAGCCTTCCCTTCTGATCATTATGCGATCG
AGTCACAGATTCAACTTCATGGACTTGATGTTGAGAAAAGTATGCGGATGATAAAGCCACGAGAGGGGGAAGAGACCTTAA
GAATGGAGGACATACTGGAAGTAATTGAGAAGGAAGGAGACTCAATTGCTGTGGTCCTGTTCAGTGGCCTGCACTTTTATA
CTGGACAGCTGTTCAACATTCCTGCCATTACACAAGCCGGACATGCAAAGGGCTGTTTTGTTGGCTTTGACCTAGCGCATG
CGGTTGGAAATGTTGAACTCCACTTACATGACTGGGATGTTGACTTTGCCTGCTGGTGCTCCTACAAGTATTTAAATTCAG
GAGCTGGAGGTCTGGCTGGTGCCTTCATCCATGAGAAACACGCTCACACGATCAAGCCAGCGTTAGTGGGATGGTTCGGCC
ATGAACTCAGTACAAGATTTAACATGGATAACAAACTACAATTAATCCCCGGGGTCAATGGATTCCGAATTTCCAACCCTC
CCATTCTGTTGGTCTGCTCCTTGCATGCCAGTTTAGAGATCTTTCAGCAAGCAACTATGACTGCGCTGAGGAGAAAATCCA
TTCTGCTGACAGGTTATCTGGAATACTTGCTCAAACATTACCATGGCGGAAATGACACAGAAAACAAGAGGCCAGTTGTGA
ACATAATCACCCCATCCAGAGCAGAGGAACGAGGCTGCCAGCTGACACTGACCTTTTCCATTTCCAAGAAAGGCGTTTTTA
AGGAACTAGAAAAAAGAGGAGTCGTCTGTGACAAGCGAGAACCAGAAGGCATCCGGGTGGCCCCGGTTCCTCTCTATAATT
CTTTCCATGATGTTTATAAGTTCATCAGACTGCTTACTGCCATACTCGACTCTACAGAAAGAAACTAG)CCATGCTTTCTA
AATAACTCAAGTAAATCTCACACACTGGGGGTTCCACTTCTACTGCATTTTAGTCATTCAAAAGTCTCCAGAAATTGATGGC
ATAGAAATGATGATGATTTTATAAACTTACATAAAACCTGGTACATGTTTTAATATCTGTGTCGCTGATGTGCTGTGGACTA
AGAAGTCACATTTTACATGACTCCAACCTACAGATGACTGTCTTGATCAGCTGTCACCTTCCATGGTCACTGAAAGGTTGTG
TGTTTAATTTGTGACTGAAATGACAACATTAAAATGTATCTGGACTTCTTGTATAAAAAAA

ラット（Ｒａｔｔｕｓ　ｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ）Ｋｙｎｕアミノ酸、４６４アミノ酸（配列番号６、ＮＣＢＩ参照配列　ＮＰ＿４４６３５４．１）：

MEPSPLELPVDAVRRIAAELNCDPTDERVALRLDEEDKLKRFKDCFYIPKMRDLPSIDLSLVNEDDNAIYFLGNSLGLQP
KMVKTYLEEELDKWAKIGAYGHEVGKRPWIIGDESIVTLMKDIVGAHEKEIALMNALTVNLHLLLLSFFKPTPKRHKILL
EAKAFPSDHYAIESQIQLHGLDVEKSMRMIKPREGEETLRMEDILEVIEKEGDSIAVVLFSGLHFYTGQLFNIPAITQAG
HAKGCFVGFDLAHAVGNVELHLHDWDVDFACWCSYKYLNSGAGGLAGAFIHEKHAHTIKPALVGWFGHELSTRFNMDNKL
QLIPGVNGFRISNPPILLVCSLHASLEIFQQATMTALRRKSILLTGYLEYLLKHYHGGNDTENKRPVVNIITPSRAEERG
CQLTLTFSISKKGVFKELEKRGVVCDKREPEGIRVAPVPLYNSFHDVYKFIRLLTAILDSTERN

変異型マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）Ｋｙｎｕ　ｍＲＮＡの例示（配列番号７）

【０１０７】

GAGCAGTTCTTTGGCTAGCTGGGGACAAAGAAAGATCCAGCATCCTCTGAGAAGGTACTGAAGACTACTGTCTGGATCTGAG
CAGATAACAGTTT(ATGATGGAGCCTTCGCCTCTTGAGCTTCCAGTTGATGCAGTGCGGCGCATCGCGGCTGAACTCAATT
GTGACCCAACAGATGAGAGGGTTGCTCTCCGCTTGGATGAGGAAGATAAACTGAGTCATTTTAGGAACTGTTTTTATATTC
CCAAAATGCGGGACCTGCCTTCAATTGATCTATCTTTAGTGAGTGAGGATGATGATGCCATCTATTTCCTGGGAAATTCCC
TTGGCCTTCAACCGAAAATGGTTAGGACATACCTGGAGGAAGAGCTTGAAAAATGGGCTAAGATGGGAGCCTATGGCCATG
ATGTAGGCAAACGCCCTTGGATTGTAGGGGATGAGAGTATTGTAAGCCTTATGAAGGACATTGTAGGAGCCCATGAGAAAG
AAATAGCTCTAATGAATGCTTTGACTATTAATTTACATCTCCTGCTGTTATCATTCTTTAAGCCTACTCCAAAGCGGCACA
AAATTCTTCTAGAAGCCAAAGCCTTCCCTTCTGATCATTATGCTATTGAGTCACAGATTCAACTTCACGGACTTGATGTTG
AGAAAAGTATGCGGATGGTAAAGCCACGAGAGGGGGAAGAGACCTTAAGGATGGAGGACATACTGGAAGTAATCGAGGAGG
AAGGAGACTCGATCGCCGTGATCCTGTTCAGTGGGCTGCACTTTTATACTGGACAGCTGTTCAACATTCCTGCCATAACAA
AAGCTGGACATGCAAAGGGCTGTTTTGTTGGCTTTGACCTAGCACATGCAGTTGGAAATGTTGAACTCCGCTTACATGACT
GGGGTGTTGACTTTGCCTGCTGGTGTTCCTATAAGTATTTAAATTCAGGAGCTGGAGGTCTGGCTGGTGCCTTTGTCCACG
AGAAACATGCTCATACTGTCAAGCCTGCGTTAGTGGGATGGTTCGGCCATGACCTCAGTACAAGGTTTAACATGGATAACA
AACTACAATTAATCCCCGGGGCCAATGGATTCCGAATTTCAAACCCTCCCATTTTGTTGGTCTGCTCCTTGCACGCCAGTT
TAGAGGTCTTTCAGCAAGCAACTATGACTGCGCTGAGAAGAAAATCCATTCTGCTGACAGGTTATCTGGAATACATGCTCA
AACATTACCACAGCAAAGATAACACCGAAAACAAGGGGCCGATTGTGAATATCATCACCCCGTCCAGAGCAGAGGAGCGTG
GCTGCCAGTTAACACTCACCTTTTCCATTCCCAAGAAAAGCGTTTTTAAGGAACTAGAAAAAAGAGGAGTCGTTTGTGACA
AGCGAGAACCAGATGGCATCCGCGTGGCCCCTGTTCCTCTCTATAATTCTTTCCATGATGTTTATAAGTTCATCAGACTGC
TCACTTCCATACTCGACTCTTCAGAAAGAAGCTAG)CTATATTTTCTAGCACAACTCAAGTAAATCTCACTGAAAGGTGATG
GAGTTTTCACTTCTATTGAATTTTAGTCATTAAAAAAATCTCCAGAAATTGATTGCACAGAAATGATAACTATAAAAAAATT
TACATAAAACCTGGTGCATGCTTTAATATCTGTGTTTCTGGGGAACGTGGTGTCCTGTGAATTATGAAGTCACACTTTACAT
GACTACAGCCTACAGATGACTGTCTTGATCAGTTGTCACATTTCATGCTCACTGAAACATTTTCTCTTTAATTTGTGACTGA
ATTTCCAACGTTATAATGTATATGGACTTCTTGTATAAATATTAGAAGTATTACTTTAATTTTGCTATAGAGTTTTATTTTA
ATATTTGTAACTGAATCATCTGAAATATGTTTGATATGATCATGTTTTATCTAATTCCAGGAGGGGAACAGCCTTTTAAGCT
GTTACAAAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTTCCCCCCCC
CAGTGGTGTGTGTGTCTATGTGTTTGTGTTTCTGTGTGTCTGTGTAAAGGACATGTAAGTGCTTATGTATAAGGGATGAGGT
ACTTGACCCTATGTACTCTTGTGAGGCCAGAGGTCAACACTGGACATCTTCCTCAATCACTGTTTAAAATTTTATTTATTTA
TTTATTTTTATGTGTATGGGTATTTTGACTGCATTTATGTCTGTACCTCATGTGCATGCCATGATTACAGAAACTAGAAGAT
ACATCAGATCACCTGAGACTGGAGTTACAGAGCTGCTGTGTGGATACTAGGAATTGAACCCAGGTCGTTTGGAAGAATAGCC
AACGCTCTTATTCTTTGACACATCTCTCCAGCCTTTCCACTTCATATTTCAATACATGATTTCTCCCCAAACCTGGAACTTG
CTCCTTCAGCTCGTGTGGCTGGCCAGTGAGTCTTCAGCGTTTCTCTGTCTCTGCCCTACAATGAATGCGGGTTACAGCTGTA
CACTGTTGCACATAGATTTTTTACATGTCTACTGTGATCTGAACACAGTCCTTATATCAGTTCAGCAACCACTTCATCGACC
AAGCAATCCCCCAGTCATTGCTTTTTTGATGCCACTACTAGTATGCATTTACTGGCAAAGAATTCTAAGTTTGTATGTAGAA
AGAAAAAGTTATAATGATTTGATAAACTTGAATAAAACATACTTGGTCAGACAGAAACTTCTGATGTGATAAATGATAAGAT
ATGGAACTCTGGCAGTAGCTAACAACAAACACAGCACTCTTGTTTACTTAGGAATTCAATTCCGAGTGTTGCACACATATCT
ATGTTAACATAGCAAAGCTTTCCACTGCATTATTTCACCTTCATTAATGAAATGGCTATCAGGACCTGGAAACTCATCCGTA
ACACAGATTCCTACATGACTGTTTTTGAGTCCCACAGTGGTCAACAAAAGGACATGGTTTTCATTTTCAAGGAACAGAGTAC
CCTGGTGCCATTCTTCATTGCAAAAAATATAAAAATAAAATAAATAGTTAATTAT

変異型マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）Ｋｙｎuポリペプチドの例示、変異型マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）ＫｙｎumＲＮＡによりコードされる４６５アミノ酸（配列番号８）：

MMEPSPLELPVDAVRRIAAELNCDPTDERVALRLDEEDKLSHFRNCFYIPKMRDLPSIDLSLVSEDDDAIYFLGNSLGLQ
PKMVRTYLEEELEKWAKMGAYGHDVGKRPWIVGDESIVSLMKDIVGAHEKEIALMNALTINLHLLLLSFFKPTPKRHKIL
LEAKAFPSDHYAIESQIQLHGLDVEKSMRMVKPREGEETLRMEDILEVIEEEGDSIAVILFSGLHFYTGQLFNIPAITKA

GHAKGCFVGFDLAHAVGNVELRLHDWGVDFACWCSYKYLNSGAGGLAGAFVHEKHAHTVKPALVGWFGHDLSTRFNMDNK
LQLIPGANGFRISNPPILLVCSLHASLEVFQQATMTALRRKSILLTGYLEYMLKHYHSKDNTENKGPIVNIITPSRAEER
GCQLTLTFSIPKKSVFKELEKRGVVCDKREPDGIRVAPVPLYNSFHDVYKFIRLLTSILDSSERS

自動削除ネオマイシン選択カセットを含有する、破損されたマウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）Ｋｙｎｕアレル部分の例示（マウス配列は大文字で示されており、標的化ベクターの配列は小文字で示される、配列番号９）：

TAATGGTGGACTCTGTAGAAGGCTGATATTCTGCAGAAAAAAAAATGATGATGGCTACATTATTTCAACGTTTTACTTCC
TTCTTAGATAACAGTTTATGggtaccgatttaaatgatccagtggtcctgcagaggagagattgggagaatcccggtgtg
acacagctgaacagactagccgcccaccctccctttgcttcttggagaaacagtgaggaagctaggacagacagaccaag
ccagcaactcagatctttgaacggggagtggagatttgcctggtttccggcaccagaagcggtgccggaaagctggctgg
agtgcgatcttcctgaggccgatactgtcgtcgtcccctcaaactggcagatgcacggttacgatgcgcccatctacacc
aacgtgacctatcccattacggtcaatccgccgtttgttcccacggagaatccgacgggttgttactcgctcacatttaa
tgttgatgaaagctggctacaggaaggccagacgcgaattatttttgatggcgttaactcggcgtttcatctgtggtgca
acgggcgctgggtcggttacggccaggacagtcgtttgccgtctgaatttgacctgagcgcatttttacgcgccggagaa
aaccgcctcgcggtgatggtgctgcgctggagtgacggcagttatctggaagatcaggatatgtggcggatgagcggcat
tttccgtgacgtctcgttgctgcataaaccgactacacaaatcagcgatttccatgttgccactcgctttaatgatgatt
tcagccgcgctgtactggaggctgaagttcagatgtgcggcgagttgcgtgactacctacgggtaacagtttctttatgg
cagggtgaaacgcaggtcgccagcggcaccgcgcctttcggcggtgaaattatcgatgagcgtggtggttatgccgatcg
cgtcacactacgtctgaacgtcgaaaacccgaaactgtggagcgccgaaatcccgaatctctatcgtgcggtggttgaac
tgcacaccgccgacggcacgctgattgaagcagaagcctgcgatgtcggtttccgcgaggtgcggattgaaaatggtctg
ctgctgctgaacggcaagccgttgctgattcgaggcgttaaccgtcacgagcatcatcctctgcatggtcaggtcatgga
tgagcagacgatggtgcaggatatcctgctgatgaagcagaacaactttaacgccgtgcgctgttcgcattatccgaacc
atccgctgtggtacacgctgtgcgaccgctacggcctgtatgtggtggatgaagccaatattgaaacccacggcatggtg
ccaatgaatcgtctgaccgatgatccgcgctggctaccggcgatgagcgaacgcgtaacgcgaatggtgcagcgcgatcg
taatcacccgagtgtgatcatctggtcgctggggaatgaatcaggccacggcgctaatcacgacgcgctgtatcgctgga
tcaaatctgtcgatccttcccgcccggtgcagtatgaaggcggcggagccgacaccacggccaccgatattatttgcccg
atgtacgcgcgcgtggatgaagaccagcccttcccggctgtgccgaaatggtccatcaaaaaatggctttcgctacctgg
agagacgcgcccgctgatcctttgcgaatacgcccacgcgatgggtaacagtcttggcggtttcgctaaatactggcagg
cgtttcgtcagtatccccgtttacagggcggcttcgtctgggactgggtggatcagtcgctgattaaatatgatgaaaac
ggcaacccgtggtcggcttacggcggtgattttggcgatacgccgaacgatcgccagttctgtatgaacggtctggtctt
tgccgaccgcacgccgcatccagcgctgacggaagcaaaacaccagcagcagttttccagttccgtttatccgggcaaa
ccatcgaagtgaccagcgaatacctgttccgtcatagcgataacgagctcctgcactggatggtggcgctggatggtaag
ccgctggcaagcggtgaagtgcctctggatgtcgctccacaaggtaaacagttgattgaactgcctgaactaccgcagcc
ggagagcgccgggcaactctggctcacagtacgcgtagtgcaaccgaacgcgaccgcatggtcagaagccgggcacatca
gcgcctggcagcagtggcgtctggcggaaaacctcagtgtgacgctccccgccgcgtcccacgccatcccgcatctgacc
accagcgaaatggatttttgcatcgagctgggtaataagcgttggcaatttaaccgccagtcaggctttctttcacagat
gtggattggcgataaaaaacaactgctgacgccgctgcgcgatcagttcacccgtgcaccgctggataacgacattggcg
taagtgaagcgacccgcattgaccctaacgcctgggtcgaacgctggaaggcggcgggccattaccaggccgaagcagcg
ttgttgcagtgcacggcagatacacttgctgatgcggtgctgattacgaccgctcacgcgtggcagcatcaggggaaaac
cttatttatcagccggaaaacctaccggattgatggtagtggtcaaatggcgattaccgttgatgttgaagtggcgagcg
atacaccgcatccggcgcggattggcctgaactgccagctggcgcaggtagcagagcgggtaaactggctcggattaggg
ccgcaagaaaactatcccgaccgccttactgccgcctgttttgaccgctgggatctgccattgtcagacatgtataccc
gtacgtcttcccgagcgaaaacggtctgcgctgcgggacgcgcgaattgaattatggcccacaccagtggcgcggcgact
tccagttcaacatcagccgctacagtcaacagcaactgatggaaaccagccatcgccatctgctgcacgcggaagaaggc
acatggctgaatatcgacggtttccatatggggattggtggcgacgactcctggagcccgtcagtatcggcggaattcca
gctgagcgccggtcgctaccattaccagttggtctggtgtcaaaaataataataaccgggcaggggggatctaagctcta
gataagtaatgatcataatcagccatatcacatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctg
aacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatag
catcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatc
atgtctggatcccccggctagagtttaaacactagaactagtggatcccccgggctcgataactataacggtcctaaggta

gcgactcgacataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatatgcatgccagtagcagcacccacgtccaccttctg
tctagtaatgtccaacacctccctcagtccaaacactgctctgcatccatgtggctcccatttatacctgaagcacttga
tggggcctcaatgttttactagagcccacccccctgcaactctgagaccctctggatttgtctgtcagtgcctcactggg
gcgttggataatttcttaaaaggtcaagttccctcagcagcattctctgagcagtctgaagatgtgtgcttttcacagtt
caaatccatgtggctgtttcacccacctgcctggccttgggttatctatcaggacctagcctagaagcaggtgtgtggca
cttaacacctaagctgagtgactaactgaacactcaagtggatgccatctttgtcacttcttgactgtgacacaagcaac
tcctgatgccaaagccctgcccacccctctcatgcccatatttggacatggtacaggtcctcactggccatggtctgtga
ggtcctggtcctctttgacttcataattcctaggggccactagtatctataagaggaagagggtgctggctcccaggcca
cagcccacaaaattccacctgctcacaggttggctggctcgacccaggtggtgtcccctgctctgagccagctcccggcc
aagccagcaccatgggaacccccaagaagaagaggaaggtgcgtaccgatttaaattccaatttactgaccgtacaccaa
aatttgcctgcattaccggtcgatgcaacgagtgatgaggttcgcaagaacctgatggacatgttcagggatcgccaggc
gttttctgagcatacctggaaaatgcttctgtccgtttgccggtcgtgggcggcatggtgcaagttgaataaccggaaat
ggtttcccgcagaacctgaagatgttcgcgattatcttctatatcttcaggcgcgcggtctggcagtaaaaactatccag
caacatttgggccagctaaacatgcttcatcgtcggtccgggctgccacgaccaagtgacagcaatgctgtttcactggt
tatgcggcggatccgaaaagaaaacgttgatgccggtgaacgtgcaaaacaggctctagcgttcgaacgcactgatttcg
accaggttcgttcactcatggaaaatagcgatcgctgccaggatatacgtaatctggcatttctggggattgcttataac
accctgttacgtatagccgaaattgccaggatcagggttaaagatatctcacgtactgacggtgggagaatgttaatcca
tattggcagaacgaaaacgctggttagcaccgcaggtgtagagaaggcacttagcctgggggtaactaaactggtcgagc
gatggatttccgtctctggtgtagctgatgatccgaataactacctgttttgccgggtcagaaaaaatggtgttgccgcg
ccatctgccaccagccagctatcaactcgcgccctggaagggatttttgaagcaactcatcgattgatttacggcgctaa
ggtaaatataaaatttttaagtgtataatgtgttaaactactgattctaattgtttgtgtattttaggatgactctggtc
agagatacctggcctggtctggacacagtgcccgtgtcggagccgcgcgagatatggcccgcgctggagtttcaataccg
gagatcatgcaagctggtggctggaccaatgtaaatattgtcatgaactatatccgtaacctggatagtgaaacaggggc
aatggtgcgcctgctggaagatggcgattgatctagataagtaatgatcataatcagccatatcacatctgtagaggttt
tacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaaacctgcc
ctagttgcggccaattccagctgagcgtgagctcaccattaccagttggtctggtgtcaaaaataataataaccgggcag
gggggatctaagctctagataagtaatgatcataatcagccatatcacatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacc
tcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttattgcagcttataatggt
tacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaact
catcaatgtatcttatcatgtctggatccccgggctagagtttaaacactagaactagtggatcccccgggatcatggcc
tccgcgccgggttttggcgcctcccgcgggcgcccccctcctcacggcgagcgctgccacgtcagacgaagggcgcagcg
agcgtcctgatccttccgcccggacgctcaggacagcggcccgctgctcataagactcggccttagaaccccagtatcag
cagaaggacattttaggacgggacttgggtgactctagggcactggttttctttccagagagcggaacaggcgaggaaaa
gtagtcccttctcggcgattctgcggagggatctccgtggggcggtgaacgccgatgattatataaggacgcgccgggtg
tggcacagctagttccgtcgcagccgggatttgggtcgcggttcttgtttgtggatcgctgtgatcgtcacttggtgagt
agcgggctgctgggctggccggggctttcgtggccgccgggccgctcggtgggacggaagcgtgtggagagaccgccaag
ggctgtagtctgggtccgcgagcaaggttgccctgaactgggggttgggggggagcgcagcaaaatggcggctgttcccga
gtcttgaatggaagacgcttgtgaggcgggctgtgaggtcgttgaaacaaggtgggggggcatggtgggcggcaagaaccc
aaggtcttgaggccttcgctaatgcgggaaagctcttattcgggtgagatgggctggggcaccatctggggaccctgacg
tgaagtttgtcactgactggagaactcggtttgtcgtctgttgcgggggcggcagttatggcggtgccgttgggcagtgc
acccgtacctttgggagcgcgcgccctcgtcgtgtcgtgacgtcacccgttctgttggcttataatgcagggtggggcca
cctgccggtaggtgtgcggtaggcttttctccgtcgcaggacgcagggttcgggcctagggtaggctctcctgaatcgac
aggcgccggacctctggtgaggggagggataagtgaggcgtcagtttctttggtcggttttatgtacctatcttcttaag
tagctgaagctccggttttgaactatgcgctcggggttggcgagtgtgttttgtgaagtttttaggcacctttgaaat
gtaatcatttgggtcaatatgtaattttcagtgttagactagtaaattgtccgctaaattctggccgtttttggcttttt
tgttagacgtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatgg
gatcggccattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggca
caacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttttgtcaagaccga
cctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcag
ctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatct

caccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgccc
attcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctgg
acgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatgcccgacggcgatgatctcgtc
gtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggct
gggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgacc
gcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctga
ggggatccgctgtaagtctgcagaaattgatgatctattaaacaataaagatgtccactaaaatggaagtttttcctgtc
atactttgttaagaagggtgagaacagagtacctacattttgaatggaaggattggagctacgggggtgggggtggggtg
ggattagataaatgcctgctctttactgaaggctctttactattgctttatgataatgtttcatagttggatatcataat
ttaaacaagcaaaaccaaattaagggccagctcattcctcccactcatgatctatagatctatagatctctcgtgggatc
attgtttttctcttgattcccactttgtggttctaagtactgtggtttccaaatgtgtcagtttcatagcctgaagaacg
agatcagcagcctctgttccacatacacttcattctcagtattgttttgccaagttctaattccatcagacctcgacctg
cagcccctagataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatGCTAGCGAGAGGTATCTGTGAAAGAAAGAAATGCTC
ATTAGACTTCCATTTTGTGTTCACTTATGTCCCTCAAAAGTATATTATCTTCATGGCTCTGATGTAACAA

自動削除ハイグロマイシン選択カセットを含有する、破損されたマウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）Ｋｙｎｕアレル部分の例示（マウス配列は大文字で示されており、標的化ベクターの配列は小文字で示される、配列番号１０）：

TAATGGTGGACTCTGTAGAAGGCTGATATTCTGCAGAAAAAAAAATGATGATGGCTACATTATTTCAACGTTTTACTTCC
TTCTTAGATAACAGTTTATGggtaccgatttaaatgatccagtggtcctgcagaggagagattgggagaatcccggtgtg
acacagctgaacagactagccgcccaccctccctttgcttcttggagaaacagtgaggaagctaggacagacagaccaag
ccagcaactcagatctttgaacggggagtggagatttgcctggtttccggcaccagaagcggtgccggaaagctggctgg
agtgcgatcttcctgaggccgatactgtcgtcgtcccctcaaactggcagatgcacggttacgatgcgcccatctacacc
aacgtgacctatcccattacggtcaatccgccgtttgttcccacggagaatccgacgggttgttactcgctcacatttaa
tgttgatgaaagctggctacaggaaggccagacgcgaattatttttgatggcgttaactcggcgtttcatctgtggtgca
acgggcgctgggtcggttacggccaggacagtcgtttgccgtctgaatttgacctgagcgcatttttacgcgccggagaa
aaccgcctcgcggtgatggtgctgcgctggagtgacggcagttatctggaagatcaggatatgtggcggatgagcggcat
tttccgtgacgtctcgttgctgcataaaccgactacacaaatcagcgatttccatgttgccactcgctttaatgatgatt
tcagccgcgctgtactggaggctgaagttcagatgtgcggcgagttgcgtgactacctacgggtaacagtttctttatgg
cagggtgaaacgcaggtcgccagcggcaccgcgcctttcggcggtgaaattatcgatgagcgtggtggttatgccgatcg
cgtcacactacgtctgaacgtcgaaaacccgaaactgtggagcgccgaaatcccgaatctctatcgtgcggtggttgaac
tgcacaccgccgacggcacgctgattgaagcagaagcctgcgatgtcggtttccgcgaggtgcggattgaaaatggtctg
ctgctgctgaacggcaagccgttgctgattcgaggcgttaaccgtcacgagcatcatcctctgcatggtcaggtcatgga
tgagcagacgatggtgcaggatatcctgctgatgaagcagaacaactttaacgccgtgcgctgttcgcattatccgaacc
atccgctgtggtacacgctgtgcgaccgctacggcctgtatgtggtggatgaagccaatattgaaacccacggcatggtg
ccaatgaatcgtctgaccgatgatccgcgctggctaccggcgatgagcgaacgcgtaacgcgaatggtgcagcgcgatcg
taatcacccgagtgtgatcatctggtcgctggggaatgaatcaggccacggcgctaatcacgacgcgctgtatcgctgga
tcaaatctgtcgatccttcccgcccggtgcagtatgaaggcggcggagccgacaccacggccaccgatattatttgcccg
atgtacgcgcgcgtggatgaagaccagcccttcccggctgtgccgaaatggtccatcaaaaaatggctttcgctacctgg
agagacgcgcccgctgatcctttgcgaatacgcccacgcgatgggtaacagtcttggcggtttcgctaaatactggcagg
cgtttcgtcagtatccccgtttacagggcggcttcgtctgggactgggtggatcagtcgctgattaaatatgatgaaaac
ggcaacccgtggtcggcttacggcggtgattttggcgatacgccgaacgatcgccagttctgtatgaacggtctggtctt
tgccgaccgcacgccgcatccagcgctgacggaagcaaaacaccagcagcagtttttccagttccgtttatccgggcaaa
ccatcgaagtgaccagcgaatacctgttccgtcatagcgataacgagctcctgcactggatggtggcgctggatggtaag
ccgctggcaagcggtgaagtgcctctggatgtcgctccacaaggtaaacagttgattgaactgcctgaactaccgcagcc
ggagagcgccgggcaactctggctcacagtacgcgtagtgcaaccgaacgcgaccgcatggtcagaagccgggcacatca
gcgcctggcagcagtggcgtctggcggaaaacctcagtgtgacgctccccgccgcgtcccacgccatcccgcatctgacc
accagcgaaatggattttgcatcgagctgggtaataagcgttggcaatttaaccgccagtcaggctttctttcacagat
gtggattggcgataaaaaacaactgctgacgccgctgcgcgatcagttcacccgtgcaccgctggataacgacattggcg
taagtgaagcgacccgcattgaccctaacgcctgggtcgaacgctggaaggcggcgggccattaccaggccgaagcagcg
ttgttgcagtgcacggcagatacacttgctgatgcggtgctgattacgaccgctcacgcgtggcagcatcaggggaaaac

cttatttatcagccggaaaacctaccggattgatggtagtggtcaaatggcgattaccgttgatgttgaagtggcgagcg
atacaccgcatccggcgcggattggcctgaactgccagctggcgcaggtagcagagcgggtaaactggctcggattaggg
ccgcaagaaaactatcccgaccgccttactgccgcctgttttgaccgctgggatctgccattgtcagacatgtataccccc
gtacgtcttcccgagcgaaaacggtctgcgctgcgggacgcgcgaattgaattatggcccacaccagtggcgcggcgact
tccagttcaacatcagccgctacagtcaacagcaactgatggaaaccagccatcgccatctgctgcacgcggaagaaggc
acatggctgaatatcgacggtttccatatggggattggtggcgacgactcctggagcccgtcagtatcggcggaattcca
gctgagcgccggtcgctaccattaccagttggtctggtgtcaaaaataataataaccgggcaggggggatctaagctcta
gataagtaatgatcataatcagccatatcacatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctg
aacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatag
catcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatc
atgtctggatcccccggctagagtttaaacactagaactagtggatcccccgggctcgataactataacggtcctaaggta
gcgactcgacataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatatgcatgccagtagcagcacccacgtccaccttctg
tctagtaatgtccaacacctccctcagtccaaacactgctctgcatccatgtggctcccatttatacctgaagcacttga
tggggcctcaatgttttactagagcccacccccctgcaactctgagaccctctggatttgtctgtcagtgcctcactggg
gcgttggataatttcttaaaaggtcaagttccctcagcagcattctctgagcagtctgaagatgtgtgcttttcacagtt
caaatccatgtggctgtttcacccacctgcctggccttgggttatctatcaggacctagcctagaagcaggtgtgtggca
cttaacacctaagctgagtgactaactgaacactcaagtggatgccatctttgtcacttcttgactgtgacacaagcaac
tcctgatgccaaagccctgcccacccctctcatgcccatatttggacatggtacaggtcctcactggccatggtctgtga
ggtcctggtcctctttgacttcataattcctaggggccactagtatctataagaggaagagggtgctggctcccaggcca
cagcccacaaaattccacctgctcacaggttggctggctcgacccaggtggtgtcccctgctctgagccagctcccggcc
aagccagcaccatgggaacccccaagaagaagaggaaggtgcgtaccgatttaaattccaatttactgaccgtacaccaa
aatttgcctgcattaccggtcgatgcaacgagtgatgaggttcgcaagaacctgatggacatgttcagggatcgccaggc
gttttctgagcatacctggaaaatgcttctgtccgtttgccggtcgtgggcggcatggtgcaagttgaataaccggaaat
ggtttcccgcagaacctgaagatgttcgcgattatcttctatatcttcaggcgcgcggtctggcagtaaaaactatccag
caacatttgggccagctaaacatgcttcatcgtcggtccgggctgccacgaccaagtgacagcaatgctgtttcactggt
tatgcggcggatccgaaaagaaaacgttgatgccggtgaacgtgcaaaacaggctctagcgttcgaacgcactgatttcg
accaggttcgttcactcatggaaaatagcgatcgctgccaggatatacgtaatctggcatttctggggattgcttataac
accctgttacgtatagccgaaattgccaggatcagggttaaagatatctcacgtactgacggtgggagaatgttaatcca
tattggcagaacgaaaacgctggttagcaccgcaggtgtagagaaggcacttagcctgggggtaactaaactggtcgagc
gatggatttccgtctctggtgtagctgatgatccgaataactacctgttttgccgggtcagaaaaaatggtgttgccgcg
ccatctgccaccagccagctatcaactcgcgccctggaagggatttttgaagcaactcatcgattgatttacggcgctaa
ggtaaatataaaattttaagtgtataatgtgttaaactactgattctaattgtttgtgtatttaggatgactctggtc
agagatacctggcctggtctggacacagtgcccgtgtcggagccgcgcgagatatggcccgcgctggagtttcaataccg
gagatcatgcaagctggtggctggaccaatgtaaatattgtcatgaactatatccgtaacctggatagtgaaacaggggc
aatggtgcgcctgctggaagatggcgattgatctagataagtaatgatcataatcagccatatcacatctgtagaggttt
tacttgctttaaaaaacctcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaaacctgcc
ctagttgcggccaattccagctgagcgtgagctcaccattaccagttggtctggtgtcaaaaataataataaccgggcag
gggggatctaagctctagataagtaatgatcataatcagccatatcacatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacc
tcccacacctcccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttattgcagcttataatggt
tacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaact
catcaatgtatcttatcatgtctggatcccccggctagagtttaaacactagaactagtggatcccccgggatcatggcc
tccgcgccgggttttggcgcctcccgcgggcgcccccctcctcacggcgagcgctgccacgtcagacgaagggcgcagcg
agcgtcctgatccttccgcccggacgctcaggacagcggcccgctgctcataagactcggccttagaaccccagtatcag
cagaaggacattttaggacgggacttgggtgactctagggcactggttttctttccagagagcggaacaggcgaggaaaa
gtagtcccttctcggcgattctgcggagggatctccgtggggcggtgaacgccgatgattatataaggacgcgccgggtg
tggcacagctagttccgtcgcagccgggatttgggtcgcggttcttgtttgtggatcgctgtgatcgtcacttggtgagt
agcgggctgctgggctggccggggctttcgtggccgccgggccgctcggtgggacggaagcgtgtggagagaccgccaag
ggctgtagtctgggtccgcgagcaaggttgccctgaactgggggttgggggggagcgcagcaaaatggcggctgttcccga
gtcttgaatggaagacgcttgtgaggcgggctgtgaggtcgttgaaacaaggtgggggcatggtgggcggcaagaaccc
aaggtcttgaggccttcgctaatgcgggaaagctcttattcgggtgagatgggctggggcaccatctggggaccctgacg

tgaagtttgtcactgactggagaactcggtttgtcgtctgttgcgggggcggcagttatggcggtgccgttgggcagtgc
acccgtacctttgggagcgcgcgccctcgtcgtgtcgtgacgtcacccgttctgttggcttataatgcagggtggggcca
cctgccggtaggtgtgcggtaggcttttctccgtcgcaggacgcagggttcgggcctagggtaggctctcctgaatcgac
aggcgccggacctctggtgaggggagggataagtgaggcgtcagtttctttggtcggttttatgtacctatcttcttaag
tagctgaagctccggttttgaactatgcgctcggggttggcgagtgtgttttgtgaagtttttaggcacctttgaaat
gtaatcatttgggtcaatatgtaattttcagtgttagactagtaaattgtccgctaaattctggccgtttttggctttt
tgttagacgtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatga
aaaagcctgaactcaccgcgacgtctgtcgagaagtttctgatcgaaaagttcgacagcgtgtccgacctgatgcagctc
tcggagggcgaagaatctcgtgctttcagcttcgatgtaggagggcgtggatatgtcctgcgggtaaatagctgcgccga
tggtttctacaaagatcgttatgtttatcggcactttgcatcggccgcgctcccgattccggaagtgcttgacattgggg
aattcagcgagagcctgacctattgcatctcccgccgtgcacagggtgtcacgttgcaagacctgcctgaaaccgaactg
cccgctgttctgcagccggtcgcggaggccatggatgcgatcgctgcggccgatcttagccagacgagcgggttcggccc
attcggaccgcaaggaatcggtcaatacactacatggcgtgatttcatatgcgcgattgctgatccccatgtgtatcact
ggcaaactgtgatggacgacaccgtcagtgcgtccgtcgcgcaggctctcgatgagctgatgctttgggccgaggactgc
cccgaagtccggcacctcgtgcacgcggatttcggctccaacaatgtcctgacggacaatggccgcataacagcggtcat
tgactggagcgaggcgatgttcggggattcccaatacgaggtcgccaacatcttcttctggaggccgtggttggcttgta
tggagcagcagacgcgctacttcgagcggaggcatccggagcttgcaggatcgccgcggctccgggcgtatatgctccgc
attggtcttgaccaactctatcagagcttggttgacggcaatttcgatgatgcagcttgggcgcagggtcgatgcgacgc
aatcgtccgatccggagccgggactgtcgggcgtacacaaatcgcccgcagaagcgcggccgtctggaccgatggctgtg
tagaagtactcgccgatagtggaaaccgacgccccagcactcgtccgagggcaaaggaataggggatccgctgtaagtc
tgcagaaattgatgatctattaaacaataaagatgtccactaaaatggaagttttcctgtcatactttgttaagaaggg
tgagaacagagtacctacattttgaatggaaggattggagctacgggggtgggggtggggtgggattagataaatgcctg
ctctttactgaaggctctttactattgctttatgataatgtttcatagttggatatcataatttaaacaagcaaaaccaa
attaagggccagctcattcctcccactcatgatctatagatctatagatctctcgtgggatcattgtttttctcttgatt
cccactttgtggttctaagtactgtggtttccaaatgtgtcagtttcatagcctgaagaacgagatcagcagcctctgtt
ccacatacacttcattctcagtattgttttgccaagttctaattccatcagacctcgacctgcagcccctagataacttc
gtataatgtatgctatacgaagttatgctagcGAGAGGTATCTGTGAAAGAAAGAAATGCTCATTAGACTTCCATTTTGT
GTTCACTTATGTCCCTCAAAAGTATATTATCTTCATGGCTCTGATGTAACAA

リコンビナーゼ介在性の選択カセット除去後の、破損されたマウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）Ｋｙｎｕアレル部分の例示（マウス配列は大文字で示されており、残りの標的化ベクターの配列は小文字で示される、配列番号１１）：

TAATGGTGGACTCTGTAGAAGGCTGATATTCTGCAGAAAAAAAAAATGATGATGGCTACATTATTTCAACGTTTTACTTCC
TTCTTAGATAACAGTTTATGggtaccgatttaaatgatccagtggtcctgcagaggagagattgggagaatcccggtgtg
acacagctgaacagactagccgcccaccctccctttgcttcttggagaaacagtgaggaagctaggacagacagaccaag
ccagcaactcagatctttgaacggggagtggagatttgcctggtttccggcaccagaagcggtgccggaaagctggctgg
agtgcgatcttcctgaggccgatactgtcgtcgtcccctcaaactggcagatgcacggttacgatgcgcccatctacacc
aacgtgacctatcccattacggtcaatccgccgtttgttcccacggagaatccgacgggttgttactcgctcacatttaa
tgttgatgaaagctggctacaggaaggccagacgcgaattatttttgatggcgttaactcggcgtttcatctgtggtgca
acgggcgctgggtcggttacggccaggacagtcgtttgccgtctgaatttgacctgagcgcatttttacgcgccggagaa
aaccgcctcgcggtgatggtgctgcgctggagtgacggcagttatctggaagatcaggatatgtggcggatgagcggcat
tttccgtgacgtctcgttgctgcataaaccgactacacaaatcagcgatttccatgttgccactcgctttaatgatgatt
tcagccgcgctgtactggaggctgaagttcagatgtgcggcgagttgcgtgactacctacgggtaacagtttctttatgg
cagggtgaaacgcaggtcgccagcggcaccgcgcctttcggcggtgaaattatcgatgagcgtggtggttatgccgatcg
cgtcacactacgtctgaacgtcgaaaacccgaaactgtggagcgccgaaatcccgaatctctatcgtgcggtggttgaac
tgcacaccgccgacggcacgctgattgaagcagaagcctgcgatgtcggtttccgcgaggtgcggattgaaaatggtctg
ctgctgctgaacggcaagccgttgctgattcgaggcgttaaccgtcacgagcatcatcctctgcatggtcaggtcatgga
tgagcagacgatggtgcaggatatcctgctgatgaagcagaacaactttaacgccgtgcgctgttcgcattatccgaacc
atccgctgtggtacacgctgtgcgaccgctacggcctgtatgtggtggatgaagccaatattgaaacccacggcatggtg
ccaatgaatcgtctgaccgatgatccgcgctggctaccggcgatgagcgaacgcgtaacgcgaatggtgcagcgcgatcg
taatcacccgagtgtgatcatctggtcgctggggaatgaatcaggccacggcgctaatcacgacgcgctgtatcgctgga

tcaaatctgtcgatccttcccgcccggtgcagtatgaaggcggcggagccgacaccacggccaccgatattatttgcccg
atgtacgcgcgcgtggatgaagaccagcccttcccggctgtgccgaaatggtccatcaaaaaatggctttcgctacctgg
agagacgcgcccgctgatcctttgcgaatacgcccacgcgatgggtaacagtcttggcggtttcgctaaatactggcagg
cgtttcgtcagtatccccgtttacagggcggcttcgtctgggactgggtggatcagtcgctgattaaatatgatgaaaac
ggcaacccgtggtcggcttacggcggtgattttggcgatacgccgaacgatcgccagttctgtatgaacggtctggtctt
tgccgaccgcacgccgcatccagcgctgacggaagcaaaacaccagcagcagtttttccagttccgtttatccgggcaaa
ccatcgaagtgaccagcgaatacctgttccgtcatagcgataacgagctcctgcactggatggtggcgctggatggtaag
ccgctggcaagcggtgaagtgcctctggatgtcgctccacaaggtaaacagttgattgaactgcctgaactaccgcagcc
ggagagcgccgggcaactctggctcacagtacgcgtagtgcaaccgaacgcgaccgcatggtcagaagccgggcacatca
gcgcctggcagcagtggcgtctggcggaaaacctcagtgtgacgctccccgccgcgtcccacgccatcccgcatctgacc
accagcgaaatggatttttgcatcgagctgggtaataagcgttggcaatttaaccgccagtcaggctttctttcacagat
gtggattggcgataaaaaacaactgctgacgccgctgcgcgatcagttcacccgtgcaccgctggataacgacattggcg
taagtgaagcgacccgcattgaccctaacgcctgggtcgaacgctggaaggcggcgggccattaccaggccgaagcagcg
ttgttgcagtgcacggcagatacacttgctgatgcggtgctgattacgaccgctcacgcgtggcagcatcaggggaaaac
cttatttatcagccggaaaacctaccggattgatggtagtggtcaaatggcgattaccgttgatgttgaagtggcgagcg
atacaccgcatccggcgcggattggcctgaactgccagctggcgcaggtagcagagcgggtaaactggctcggattaggg
ccgcaagaaaactatcccgaccgccttactgccgcctgttttgaccgctgggatctgccattgtcagacatgtataccccc
gtacgtcttcccgagcgaaaacggtctgcgctgcgggacgcgcgaattgaattatggcccacaccagtggcgcggcgact
tccagttcaacatcagccgctacagtcaacagcaactgatggaaaccagccatcgccatctgctgcacgcggaagaaggc
acatggctgaatatcgacggtttccatatggggattggtggcgacgactcctggagcccgtcagtatcggcggaattcca
gctgagcgccggtcgctaccattaccagttggtctggtgtcaaaaataataataaccgggcaggggggatctaagctcta
gataagtaatgatcataatcagccatatcacatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctg
aacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatag
catcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatc
atgtctggatcccccggctagagtttaaacactagaactagtggatccccgggctcgataactataacggtcctaaggta
gcgactcgacataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatgctagcGAGAGGTATCTGTGAAAGAAAGAAATGCTC
ATTAGACTTCCATTTTGTGTTCACTTATGTCCCTCAAAAGTATATTATCTTCATGGCTCTGATGTAACAA

自動削除ハイグロマイシン選択カセットを含有する、変異型マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）Ｋｙｎｕアレル部分の例示（マウス配列は通常の大文字で示されており、変異したヌクレオチドは下線付きの太文字で示される。標的化ベクターの配列は小文字で示される、配列番号１２）：

【０１０８】

AGAGCCTGAGGCTTCTGTGGGAGTAACTGCAAGTTATTTATTACCCTTCCTCTTGTAAATTATGTTAATAACGCTGGATTAA
CAATGACAACTGGGAGAATGTTAATTAATTTAACAAGCACTTTTTTTTTTGTATTTTCTTGTTTCAGTTGATCTATCTTTAG
TGAGTGAGGATGATGATGCCATCTATTTCCTGGGAAATTCCCTTGGCCTTCAACCGAAAATGGTTAGGACATACCTGGAGGA
AGAGCTTGAAAAATGGGCTAAGATGTAAGTACCAAGTTAAAAGGTGTAACTCCATCTGACAGAAGAATTCTGAAAATTACAA
AATGTGTCTGATTTGGACAAGTTACACCCTAGCATATTAGGAACAATGAAAACCTTATTTACAGTAATTACCAATACTAAAA
TATTTTGATGAAATAATCTTCAATCAGAATAAGTCCAAATGACAAATTCATGAAAGctcgagataacttcgtataatgtatg
ctatacgaagttatatgcatggcctccgcgccgggttttggcgcctcccgcgggcgcccccctcctcacggcgagcgctgcc
acgtcagacgaagggcgcagcgagcgtcctgatccttccgcccggacgctcaggacagcggcccgctgctcataagactcgg
ccttagaaccccagtatcagcagaaggacattttaggacgggacttgggtgactctagggcactggttttctttccagagag
cggaacaggcgaggaaaagtagtcccttctcggcgattctgcggagggatctccgtggggcggtgaacgccgatgattatat
aaggacgcgccgggtgtggcacagctagttccgtcgcagccgggatttgggtcgcggttcttgtttgtggatcgctgtgatc
gtcacttggtgagtagcgggctgctgggctggccggggctttcgtggccgccgggccgctcggtgggacggaagcgtgtgga
gagaccgccaagggctgtagtctgggtccgcgagcaaggttgccctgaactgggggttgggggagcgcagcaaaatggcgg
ctgttcccgagtcttgaatggaagacgcttgtgaggcgggctgtgaggtcgttgaaacaaggtgggggcatggtgggcggc
aagaacccaaggtcttgaggccttcgctaatgcgggaaagctcttattcgggtgagatgggctggggcaccatctggggacc
ctgacgtgaagtttgtcactgactggagaactcggtttgtcgtctgttgcgggggcggcagttatggcggtgccgttgggca
gtgcacccgtacctttgggagcgcgcgccctcgtcgtgtcgtgacgtcacccgttctgttggcttataatgcagggtggggc
cacctgccggtaggtgtgcggtaggcttttctccgtcgcaggacgcagggttcgggcctagggtaggctctcctgaatcgac
aggcgccggacctctggtgaggggagggataagtgaggcgtcagtttctttggtcggttttatgtacctatcttcttaagta
gctgaagctccggttttgaactatgcgctcggggttggcgagtgtgttttgtgaagtttttaggcacctttgaaatgtaa
tcatttgggtcaatatgtaattttcagtgttagactagtaaattgtccgctaaattctggccgtttttggcttttttgttag
acgtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatgaaaaagcct
gaactcaccgcgacgtctgtcgagaagtttctgatcgaaaagttcgacagcgtgtccgacctgatgcagctctcggagggcg
aagaatctcgtgctttcagcttcgatgtaggagggcgtggatatgtcctgcgggtaaatagctgcgccgatggtttctacaa
agatcgttatgtttatcggcactttgcatcggccgcgctcccgattccggaagtgcttgacattggggaattcagcgagagc
ctgacctattgcatctcccgccgtgcacagggtgtcacgttgcaagacctgcctgaaaccgaactgcccgctgttctgcagc
cggtcgcggaggccatggatgcgattgctgcggccgatcttagccagacgagcgggttcggcccattcggaccgcaaggaat
cggtcaatacactacatggcgtgatttcatatgcgcgattgctgatccccatgtgtatcactggcaaactgtgatggacgac
accgtcagtgcgtccgtcgcgcaggctctcgatgagctgatgctttgggccgaggactgccccgaagtccggcacctcgtgc
acgcggatttcggctccaacaatgtcctgacggacaatggccgcataacagcggtcattgactggagcgaggcgatgttcgg
ggattcccaatacgaggtcgccaacatcttcttctggaggccgtggttggcttgtatggagcagcagacgcgctacttcgag
cggaggcatccggagcttgcaggatcgccgcggctccgggcgtatatgctccgcattggtcttgaccaactctatcagagct
tggttgacggcaatttcgatgatgcagcttgggcgcagggtcgatgcgacgcaatcgtccgatccggagccgggactgtcgg
gcgtacacaaatcgcccgcagaagcgcggccgtctggaccgatggctgtgtagaagtactcgccgatagtggaaaccgacgc
cccagcactcgtccgagggcaaaggaataggggatccgctgtaagtctgcagaaattgatgatctattaaacaataaagat
gtccactaaaatggaagtttttcctgtcatactttgttaagaagggtgagaacagagtacctacattttgaatggaaggatt
ggagctacgggggtgggggtggggtgggattagataaatgcctgctctttactgaaggctctttactattgctttatgataa
tgtttcatagttggatatcataatttaaacaagcaaaaccaaattaagggccagctcattcctcccactcatgatctataga
tctatagatctctcgtgggatcattgtttttctcttgattcccactttgtggttctaagtactgtggtttccaaatgtgtca
gtttcatagcctgaagaacgagatcagcagcctctgttccacatacacttcattctcagtattgttttgccaagttctaatt

ccatcagacctcgacctgcagcccctagcccgggcgccagtagcagcacccacgtccaccttctgtctagtaatgtccaaca
cctccctcagtccaaacactgctctgcatccatgtggctcccatttatacctgaagcacttgatggggcctcaatgttttac
tagagcccacccccctgcaactctgagaccctctggatttgtctgtcagtgcctcactggggcgttggataatttcttaaaa
ggtcaagttccctcagcagcattctctgagcagtctgaagatgtgtgcttttcacagttcaaatccatgtggctgtttcacc
cacctgcctggccttgggttatctatcaggacctagcctagaagcaggtgtgtggcacttaacacctaagctgagtgactaa
ctgaacactcaagtggatgccatctttgtcacttcttgactgtgacacaagcaactcctgatgccaaagccctgcccacccc
tctcatgcccatatttggacatggtacaggtcctcactggccatggtctgtgaggtcctggtcctctttgacttcataattc
ctaggggccactagtatctataagaggaagagggtgctggctcccaggccacagcccacaaaattccacctgctcacaggtt
ggctggctcgacccaggtggtgtcccctgctctgagccagctcccggccaagccagcaccatgggtacccccaagaagaaga
ggaaggtgcgtaccgatttaaattccaatttactgaccgtacaccaaaatttgcctgcattaccggtcgatgcaacgagtga
tgaggttcgcaagaacctgatggacatgttcagggatcgccaggcgttttctgagcatacctggaaaatgcttctgtccgtt
tgccggtcgtgggcggcatggtgcaagttgaataaccggaaatggtttcccgcagaacctgaagatgttcgcgattatcttc
tatatcttcaggcgcgcggtctggcagtaaaaactatccagcaacatttgggccagctaaacatgcttcatcgtcggtccgg
gctgccacgaccaagtgacagcaatgctgtttcactggttatgcggcggatccgaaaagaaaacgttgatgccggtgaacgt
gcaaaacaggctctagcgttcgaacgcactgatttcgaccaggttcgttcactcatggaaaatagtgatcgctgccaggata
tacgtaatctggcatttctggggattgcttataacaccctgttacgtatagccgaaattgccaggatcagggttaaagatat
ctcacgtactgacggtgggagaatgttaatccatattggcagaacgaaaacgctggttagcaccgcaggtgtagagaaggca
cttagcctgggggtaactaaactggtcgagcgatggatttccgtctctggtgtagctgatgatccgaataactacctgtttt
gccgggtcagaaaaaatggtgttgccgcgccatctgccaccagccagctatcaactcgcgccctggaagggatttttgaagc
aactcatcgattgatttacggcgctaaggtaaatataaaatttttaagtgtataatgtgttaaactactgattctaattgtt
tgtgtatttaggatgactctggtcagagatacctggcctggtctggacacagtgcccgtgtcggagccgcgcgagatatgg
cccgcgctggagtttcaataccggagatcatgcaagctggtggctggaccaatgtaaatattgtcatgaactatatccgtaa
cctggatagtgaaacaggggcaatggtgcgcctgctggaagatggcgattgatctagataagtaatgatcataatcagccat
atcacatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattg
ttgttgttaaacctgccctagttgcggccaattccagctgagcgtgcctccgcaccattaccagttggtctggtgtcaaaaa
taataataaccgggcaggggggatctaagctctagataagtaatgatcataatcagccatatcacatctgtagaggttttac
ttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttattgc
agcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggt
ttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggaataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatgctagtaacta
taacggtcctaaggtagcgagctagcAGCCATTTAATGTCCAGCAAAGAAGTTAATTCATGATTTTGAGTGTTTAATGATGA
ATTCATGACCAAGTTAAGAATGCCATCAAAAATAGGAAATACAG

自動削除ネオマイシン選択カセットを含有する、変異型マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）Ｋｙｎｕアレル部分の例示（マウス配列は通常の大文字で示されており、変異したヌクレオチドは下線付きの太文字で示される。標的化ベクターの配列は小文字で示される、配列番号１３）：

【０１０９】

【化７】

AGAGCCTGAGGCTTCTGTGGGAGTAACTGCAAGTTATTTATTACCCTTCCTCTTGTAAATTATGTTAATAACGCTGGATTAA
CAATGACAACTGGGAGAATGTTAATTAATTTAACAAGCACTTTTTTTTTTTGTATTTTCTTGTTTCAGTTGATCTATCTTTAG
TGAGTGAGGATGATGATGCCATCTATTTCCTGGGAAATTCCCTTGGCCTTCAACCGAAAATGGTTAGGACATACCTGGAGGA
AGAGCTTGAAAAATGGGCTAAGATGTAAGTACCAAGTTAAAAGGTGTAACTCCATCTGACAGAAGAATTCTGAAAATTACAA
AATGTGTCTGATTTGGACAAGTTACACCCTAGCATATTAGGAACAATGAAAACCTTATTTACAGTAATTACCAATACTAAAA
TATTTTGATGAAATAATCTTCAATCAGAATAAGTCCAAATGACAAATTCATGAAAGctcgagataacttcgtataatgtatg
ctatacgaagttatatgcatggcctccgcgccgggttttggcgcctcccgcgggcgcccccctcctcacggcgagcgctgcc
acgtcagacgaagggcgcagcgagcgtcctgatccttccgcccggacgctcaggacagcggcccgctgctcataagactcgg
ccttagaaccccagtatcagcagaaggacattttaggacgggacttgggtgactctagggcactggttttctttccagagag
cggaacaggcgaggaaaagtagtcccttctcggcgattctgcggagggatctccgtggggcggtgaacgccgatgattatat
aaggacgcgccgggtgtggcacagctagttccgtcgcagccgggatttgggtcgcggttcttgtttgtggatcgctgtgatc
gtcacttggtgagtagcgggctgctgggctggccggggctttcgtggccgccgggccgctcggtgggacggaagcgtgtgga
gagaccgccaagggctgtagtctgggtccgcgagcaaggttgccctgaactgggggttgggggagcgcagcaaaatggcgg
ctgttcccgagtcttgaatggaagacgcttgtgaggcgggctgtgaggtcgttgaaacaaggtgggggcatggtgggcggc
aagaacccaaggtcttgaggccttcgctaatgcgggaaagctcttattcgggtgagatgggctggggcaccatctggggacc
ctgacgtgaagtttgtcactgactggagaactcggtttgtcgtctgttgcgggggcggcagttatggcggtgccgttgggca
gtgcacccgtacctttgggagcgcgcgccctcgtcgtgtcgtgacgtcacccgttctgttggcttataatgcagggtggggc
cacctgccggtaggtgtgcggtaggcttttctccgtcgcaggacgcagggttcgggcctagggtaggctctcctgaatcgac
aggcgccggacctctggtgaggggagggataagtgaggcgtcagtttctttggtcggttttatgtacctatcttcttaagta
gctgaagctccggttttgaactatgcgctcggggttggcgagtgtgttttgtgaagtttttaggcacctttgaaatgtaa
tcatttgggtcaatatgtaattttcagtgttagactagtaaattgtccgctaaattctggccgtttttggcttttttgttag
acgtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatgggatcggcc
attgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaa
tcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttttgtcaagaccgacctgtccggtgc
cctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgtt
gtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccg
agaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaa
acatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctc
gcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatgcccgacggcgatgatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgct
tgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcagga
catagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgcc
gctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgaggggatccgctgtaagtctgcagaaatt
gatgatctattaaacaataaagatgtccactaaaatggaagtttttcctgtcatactttgttaagaagggtgagaacagagt
acctacattttgaatggaaggattggagctacgggggtgggggtggggtgggattagataaatgcctgctctttactgaagg
ctctttactattgctttatgataatgtttcatagttggatatcataatttaaacaagcaaaaccaaattaagggccagctca
ttcctcccactcatgatctatagatctatagatctctcgtgggatcattgtttttctcttgattcccactttgtggttctaa
gtactgtggtttccaaatgtgtcagtttcatagcctgaagaacgagatcagcagcctctgttccacatacacttcattctca
gtattgttttgccaagttctaattccatcagacctcgacctgcagcccctagcccgggcgccagtagcagcacccacgtcca
ccttctgtctagtaatgtccaacacctccctcagtccaaacactgctctgcatccatgtggctcccatttatacctgaagca
cttgatggggcctcaatgttttactagagcccacccccctgcaactctgagaccctctggatttgtctgtcagtgcctcact

ggggcgttggataatttcttaaaaggtcaagttccctcagcagcattctctgagcagtctgaagatgtgtgcttttcacagt
tcaaatccatgtggctgtttcacccacctgcctggccttgggttatctatcaggacctagcctagaagcaggtgtgtggcac
ttaacacctaagctgagtgactaactgaacactcaagtggatgccatctttgtcacttcttgactgtgacacaagcaactcc
tgatgccaaagccctgcccacccctctcatgcccatatttggacatggtacaggtcctcactggccatggtctgtgaggtcc
tggtcctctttgacttcataattcctaggggccactagtatctataagaggaagagggtgctggctcccaggccacagccca
caaaattccacctgctcacaggttggctggctcgacccaggtggtgtcccctgctctgagccagctcccggccaagccagca
ccatgggtacccccaagaagaagaggaaggtgcgtaccgatttaaattccaatttactgaccgtacaccaaaatttgcctgc
attaccggtcgatgcaacgagtgatgaggttcgcaagaacctgatggacatgttcagggatcgccaggcgttttctgagcat
acctggaaaatgcttctgtccgtttgccggtcgtgggcggcatggtgcaagttgaataaccggaaatggtttcccgcagaac
ctgaagatgttcgcgattatcttctatatcttcaggcgcgcggtctggcagtaaaaactatccagcaacatttgggccagct
aaacatgcttcatcgtcggtccgggctgccacgaccaagtgacagcaatgctgtttcactggttatgcggcggatccgaaaa
gaaaacgttgatgccggtgaacgtgcaaaacaggctctagcgttcgaacgcactgatttcgaccaggttcgttcactcatgg
aaaatagtgatcgctgccaggatatacgtaatctggcatttctggggattgcttataacaccctgttacgtatagccgaaat
tgccaggatcagggttaaagatatctcacgtactgacggtgggagaatgttaatccatattggcagaacgaaaacgctggtt
agcaccgcaggtgtagagaaggcacttagcctgggggtaactaaactggtcgagcgatggatttccgtctctggtgtagctg
atgatccgaataactacctgttttgccgggtcagaaaaaatggtgttgccgcgccatctgccaccagccagctatcaactcg
cgccctggaagggatttttgaagcaactcatcgattgatttacggcgctaaggtaaatataaaatttttaagtgtataatgt
gttaaactactgattctaattgtttgtgtattttaggatgactctggtcagagatacctggcctggtctggacacagtgccc
gtgtcggagccgcgcgagatatggcccgcgctggagtttcaataccggagatcatgcaagctggtggctggaccaatgtaaa
tattgtcatgaactatatccgtaacctggatagtgaaacaggggcaatggtgcgcctgctggaagatggcgattgatctaga
taagtaatgatcataatcagccatatcacatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacc
tgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaaacctgccctagttgcggccaattccagctgagcgtgcctccgcaccat
taccagttggtctggtgtcaaaaataataataaccgggcaggggggatctaagctctagataagtaatgatcataatcagcc
atatcacatctgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaat
tgttgttgttaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcattt
ttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggaataacttcgtataatgtatgc
tatacgaagttatgctagtaactataacggtcctaaggtagcgagctagcAGCCATTTAATGTCCAGCAAAGAAGTTAATTC
ATGATTTTGAGTGTTTAATGATGAATTCATGACCAAGTTAAGAATGCCATCAAAAATAGGAAATACAG

選択カセットのリコンビナーゼ介在除去後の、変異型マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）Ｋｙｎｕアレル部分の例示（マウス配列は大文字で示されており、変異したヌクレオチドは下線付きの太文字で示される。選択カセットのリコンビナーゼ介在性除去後の標的化ベクター配列の残りの７７ｂｐは小文字で示される、配列番号１４）：

【０１１０】

AGAGCCTGAGGCTTCTGTGGGAGTAACTGCAAGTTATTTATTACCCTTCCTCTTGTAAATTATGTTAATAACGCTGGATTAA
CAATGACAACTGGGAGAATGTTAATTAATTTAACAAGCACTTTTTTTTTTTGTATTTTCTTGTTTCAGTTGATCTATCTTTAG
TGAGTGAGGATGATGATGCCATCTATTTCCTGGGAAATTCCCTTGGCCTTCAACCGAAAATGGTTAGGACATACCTGGAGGA
AGA**G**CT**T**GA**A**AA**A**TGGGC**T**AAGATGTAAGTACCAAGTTAAAAGGTGTAACTCCATCTGACAGAAGAATTCTGAAAATTACAA
AATGTGTCTGATTTGGACAAGTTACACCCTAGCATATTAGGAACAATGAAAACCTTATTTACAGTAATTACCAATACTAAAA
TATTTTGATGAAATAATCTTCAATCAGAATAAGTCCAAATGACAAATTCATGAAAGctcgagataacttcgtataatgtatg
ctatacgaagttatgctagtaactataacggtcctaaggtagcgagctagcAGCCATTTAATGTCCAGCAAAGAAGTTAATT
CATGATTTTGAGTGTTTAATGATGAATTCATGACCAAGTTAAGAATGCCATCAAAAATAGGAAATACAG

ＤＮＡ構築物および操作非ヒト動物の作製

本明細書に記載されるＫｙｎｕ遺伝子の破損または突然変異を有する非ヒト動物作製の

ためのＤＮＡ構築物または標的化ベクターを本明細書に提供する。
【０１１１】
ＤＮＡ配列を使用して、ノックアウト動物（たとえばＫｙｎｕのＫＯ）用の標的化ベクターを調製することができる。典型的には、レポーター遺伝子もしくは変異型Ｋｙｎｕ遺伝子の全部、または一部をコードするポリヌクレオチド分子（たとえば挿入核酸）は、ベクター、好ましくはＤＮＡベクターに挿入され、適切な宿主細胞中でそのポリヌクレオチド分子が複製される。
【０１１２】
ポリヌクレオチド分子（または挿入核酸）は、標的の座位または遺伝子に組み込まれることが望まれるＤＮＡのセグメントを備える。一部の実施形態では、挿入核酸は、対象のポリヌクレオチドを１つ以上備える。一部の実施形態では、挿入核酸は、１つ以上の発現カセットを備える。一部のある実施形態では、発現カセットは、対象のポリヌクレオチドを備えており、ポリヌクレオチドは選択マーカー、および／またはレポーター遺伝子を、一部のある実施形態では発現に影響を与える様々な制御構成要素（たとえばプロモーター、エンハンサーなど）とともにコードする。事実上、すべての対象のポリヌクレオチドが挿入核酸内に含有されることができ、それにより、標的のゲノムの座位で組み込まれることができる。本明細書において開示される方法は、標的とされるＫｙｎｕ遺伝子（または座位）に組み込まれる、少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個またはそれ以上の対象のポリヌクレオチドを提供する。
【０１１３】
一部の実施形態では、挿入核酸中に含有される対象ポリヌクレオチドは、レポーターをコードする。一部の実施形態では、挿入核酸中に含有される対象ポリヌクレオチドは、選択マーカー、および／またはリコンビナーゼをコードする。
【０１１４】
一部の実施形態では、対象ポリヌクレオチドは、部位特異的認識部位（たとえば、ｌｏｘＰ、Ｆｒｔなど）に隣接し、またはこれを備える。一部のある実施形態では、部位特異的認識部位は、レポーターをコードするＤＮＡセグメント、選択マーカーをコードするＤＮＡセグメント、リコンビナーゼをコードするＤＮＡセグメント、およびそれらの組み合わせに隣接する。挿入核酸内に含有されることができる選択マーカー、レポーター遺伝子、およびリコンビナーゼ遺伝子を含有する対象ポリヌクレオチドの例が本明細書に記載される。
【０１１５】
サイズに応じて、Ｋｙｎｕ遺伝子またはＫｙｎｕをコードする配列は、業者により入手可能なｃＤＮＡ源から直接クローニングされてもよく、またはＧｅｎＢａｎｋから入手可能な公開配列（上記を参照）に基づいてｉｎ　ｓｉｌｉｃｏで設計されてもよい。あるいは、細菌人工染色体（ＢＡＣ）ライブラリーが、対象遺伝子からＫｙｎｕ配列を提供することができる（例えば、齧歯類または異種のＫｙｎｕ遺伝子）。ＢＡＣライブラリーは、１００～１５０ｋｂの平均インサートサイズを含み、３００ｋｂの大きさのインサートを保有することができる（Ｓｈｉｚｕｙａ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．，１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：８７９４－７；Ｓｗｉａｔｅｋ，Ｐ．Ｊ．ａｎｄ　Ｔ．Ｇｒｉｄｌｅｙ，１９９３，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．７：２０７１－８４；Ｋｉｍ，Ｕ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　３４：２１３－８、参照により本明細書に援用される）。例えばヒトおよびマウスのゲノムＢＡＣライブラリーが構築されており、市販されている（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社、カールスバッド、カリフォルニア州）。ゲノムＢＡＣライブラリーは、齧歯類または異種のＫｙｎｕ配列ならびに転写制御領域の源として利用することもできる。
【０１１６】
あるいは、齧歯類または異種のＫｙｎｕ配列は、酵母人工染色体（ＹＡＣ）から単離、クローニング、および／または移転させてもよい。完全な齧歯類または異種のＫｙｎｕ遺伝子をクローニングし、１個または数個のＹＡＣ内に含有させてもよい。複数のＹＡＣが

使用され、重複相同性の領域を含有する場合、それらを酵母宿主株内で再結合させて、完全な座位を提示する１つの構築物を生成してもよい。哺乳類選択カセットを用いた改良によりＹＡＣのアームをさらに改変し、当技術分野に公知の方法および／または本明細書に記載される方法により、構築物を胚性幹細胞または胚に導入することを補助してもよい。

【０１１７】

本明細書に記載されるＫｙｎｕ配列を含有するＤＮＡ構築物または標的化ベクターは、一部の実施形態では、トランスジェニック非ヒト動物における発現用に非ヒトの制御配列（たとえば齧歯類のプロモーター）に動作可能に連結され、野生型または親の齧歯類Ｋｙｎｕポリペプチドを比較して１つ以上のアミノ酸置換を含有する齧歯類Ｋｙｎｕポリペプチドをコードする齧歯類Ｋｙｎｕゲノム配列を備える。一部の実施形態では、本明細書に記載されるＫｙｎｕ配列を含有するＤＮＡ構築物または標的化ベクターは、齧歯類のＫｙｎｕプロモーターに動作可能に連結され、野生型または親の齧歯類Ｋｙｎｕポリペプチドを比較して、Ｄ９３Ｅ置換を含有するバリアント齧歯類Ｋｙｎｕポリペプチドをコードする齧歯類Ｋｙｎｕゲノム配列を備える。本明細書に記載されるＤＮＡ構築物中に含有される齧歯類および／または異種の配列は、自然界に存在する齧歯類および／または異種の配列（たとえばゲノム）と同一または実質的に同一であってもよい。あるいは、かかる配列は人工であってもよく（たとえば合成）、またはヒトの手により操作されていてもよい。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ配列は、合成起源であり、自然界に存在する齧歯類または異種のＫｙｎｕ遺伝子中に存在する配列を含む。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ配列は、齧歯類または異種のＫｙｎｕ遺伝子と自然に関連する配列を備える。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ配列は、齧歯類または異種のＫｙｎｕ遺伝子と自然には関連していない配列を備える。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ配列は、非ヒト動物における発現に最適化された配列を備える。もし本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子の発現の最適化に追加的配列が有用である場合、かかる配列は、既存の配列をプローブとして使用してクローニングされることができる。変異型Ｋｙｎｕ遺伝子またはＫｙｎｕコード配列の発現を最大化するために必要な追加的配列は、ゲノム配列、または所望される結果に応じて他の源から取得することができる。

【０１１８】

ＤＮＡ構築物または標的化ベクターは、当技術分野に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、ＤＮＡ構築物は、大きなプラスミドの一部として調製することができる。そのような調製により、当技術分野で公知のように、効率的な方法で正しい構築物のクローニングと選択が可能となる。本明細書に記載される配列を含有するＤＮＡ断片は、プラスミド上の便利な制限酵素部位の間に位置づけることができ、それによって、所望される動物への組み込みのために、残りのプラスミド配列からそれらを簡便に単離することができる。

【０１１９】

プラスミド、ＤＮＡ構築物、および／または標的化ベクターの調製、ならびに宿主生物の形質転換に使用される様々な方法が当技術分野に公知である。原核細胞と真核細胞の両方に適した他の発現システム、ならびに一般的な組み換え法に関しては、以下を参照のこと：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄ．，ｅｄ．ｂｙ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ：１９８９．

上述のように、破損された、または変異型のＫｙｎｕ遺伝子を含有する、非ヒト用動物用の標的化ベクターの構築における使用のための非ヒト（たとえば齧歯類）Ｋｙｎｕの核酸配列およびアミノ酸配列の例が、上記に提示されている。その他の非ヒトＫｙｎｕ配列も、ＧｅｎＢａｎｋデータベース中に見出すことができる。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ標的化ベクターは、トランスジェニック非ヒト動物のゲノム内への挿入用のレポーター遺伝子、選択マーカー、リコンビナーゼ遺伝子（またはそれらの組み合わせ）、および非ヒトＫｙｎｕ配列（すなわち、標的領域の隣接配列）をコードするＤＮＡ配列を備える。１つの例では、第一のコードエクソンの開始コドンのすぐ下流（３’）に欠失開始点が設

定されてもよく、それにより、挿入核酸が、内因性制御配列（たとえばプロモーター）に動作可能に連結されることが可能となる。図２Ａ～２Ｃは、開始コドンを除く、コード配列（たとえばエクソン２～６）マウスＫｙｎｕ遺伝子の一部の標的化欠失を行い、β－ガラクトシダーゼをコードするｌａｃＺ遺伝子由来の配列を含有するカセット、およびＧ４１８抵抗性胚性幹（ＥＳ）細胞コロニーの選択用のネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（Ｎｅｏ）をコードする薬剤選択カセットとの置換を行うための標的化ベクターの例を図示する。標的化ベクターは、ＥＳ細胞特異的マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）または生殖細胞特異的プロモーター（たとえば、プロタミン１プロモーター；Ｐｒｏｔ－Ｃｒｅ－ＳＶ４０）により制御されるリコンビナーゼ（たとえば、Ｃｒｅ）をコードする配列も含有する。ネオマイシン選択カセットおよびＣｒｅリコンビナーゼコード配列は、ｌｏｘＰリコンビナーゼ認識部位に隣接され、これにより発生依存性の様式でネオマイシン選択カセットのＣｒｅ介在性除去が可能となる。すなわち、その生殖細胞が上述の破損されたＫｙｎｕ遺伝子を含有する齧歯類から派生した子孫は、発生の間に選択マーカーを脱落させる（たとえば、米国特許第８，６９７，８５１号、第８，５１８，３９２号、第８，３５４，３８９号、第８，９４６，５０５号、および第８，９４６，５０４号を参照のこと。それらすべては、参照により本明細書に援用される）。これにより、特に、分化細胞または生殖細胞のいずれかから、ネオマイシン選択カセットの自動削除が可能となる。ゆえに、表現型解析の前に、ネオマイシン選択カセットは、マウスＫｙｎｕプロモーターに動作可能に連結された（マウスＫｙｎｕ開始コドンに融合された）ｌａｃＺレポーター遺伝子のみを残しながら、除去される（図２Ｃ）。

【０１２０】

本明細書に記載されるように、Ｋｙｎｕ遺伝子の破損には、挿入核酸を用いた、Ｋｙｎｕ遺伝子またはその一部の置換、またはＫｙｎｕ遺伝子またはその一部への挿入／付加が含まれてもよい。一部の実施形態では、挿入核酸は、レポーター遺伝子を備える。一部のある実施形態では、レポーター遺伝子は、内因性Ｋｙｎｕプロモーターに動作可能に連結されて配置される。かかる改変により、内因性Ｋｙｎｕプロモーターにより誘導されるレポーター遺伝子の発現が可能となる。あるいは、レポーター遺伝子は、内因性Ｋｙｎｕプロモーターと動作可能に連結されて配置されない。

【０１２１】

様々なレポーター遺伝子（または検出可能部分）が、本明細書に記載される標的化ベクターにおいて使用されることができる。レポーター遺伝子の例としては、たとえば、β－ガラクトシダーゼ（ｌａｃＺ遺伝子によりコードされる）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、強化型緑色蛍光タンパク質（ｅＧＦＰ：ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＭｍＧＦＰ、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）、強化型青色蛍光タンパク質（ｅＢＦＰ：ｅｎｈａｎｃｅｄ ｂｌｕｅ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｐｒｏｔｅｉｎ）、ｍＰｌｕｍ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｔｄＴｏｍａｔｏ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊ－Ｒｅｄ、ＤｓＲｅｄ、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、ｍＣｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、強化型黄色蛍光タンパク質（ｅＹＦＰ：ｅｎｈａｎｃｅｄ ｙｅｌｌｏｗ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｐｒｏｔｅｉｎ）、Ｅｍｅｒａｌｄ、ＣｙＰｅｔ、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、Ｔ－Ｓａｐｐｈｉｒｅ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、またはこれらの組み合わせが挙げられる。本明細書に記載される方法は、β－ガラクトシダーゼをコードするｌａｃＺレポーター遺伝子を使用した標的化ベクターの構築を示すが、本開示を読んだ当業者であれば、本明細書に記載される非ヒト動物は、レポーター遺伝子が無くても作製されることができ、または当分野に公知の任意のレポーター遺伝子を用いて作製されることを理解するであろう。

【０１２２】

一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ標的化ベクターは、トランスジェニック非ヒト動物のゲノム内への挿入用の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子、選択マーカー、およびリコンビナーゼ遺伝子、ならびに非ヒトＫｙｎｕ配列（すなわち、標的領域の隣接配列）をコードするＤＮＡ配

列を備える。１つの例では、１つ以上の点変異が、Ｋｙｎｕ遺伝子のコード配列またはＫｙｎｕをコードする配列（たとえばエクソン）内に（たとえば部位指向性突然変異誘導により）導入されてもよく、それにより、変異型のＫｙｎｕ遺伝子またはＫｙｎｕをコードする配列により、所望されるＫｙｎｕポリペプチド（たとえばバリアントＫｙｎｕポリペプチド）がコードされる。かかる変異型Ｋｙｎｕ配列は、内因性制御配列（たとえばプロモーター）または所望される場合には構造性プロモーターに動作可能に連結されていてもよい。図４Ａおよび４Ｃは、変異型胚性幹（ＥＳ）細胞コロニー選択用のハイグロマイシン（Ｈｙｇ）をコードする薬剤選択マーカーを含有するカセットを用いて、マウスＫｙｎｕ遺伝子のエクソン（たとえばエクソン３）に１つ以上の点変異を行い、およびイントロン３の小規模な欠失を行うための標的化ベクターの例を図示する。実施例の項に記載されるように、マウスＫｙｎｕのエクソン３に導入された点変異のうちのいくつか、およびイントロン３の欠失は、変異型ＥＳ細胞コロニーのスクリーニングを容易にするために設計された。図４Ｃに示されるように、標的化ベクターは、ＥＳ細胞特異的ｍｉＲＮＡまたは生殖細胞特異的プロモーター（たとえば、プロタミン１プロモーター；Ｐｒｏｔ－Ｃｒｅ－ＳＶ４０）により制御されるリコンビナーゼ（たとえば、Ｃｒｅ）をコードする配列も含有する。ハイグロマイシン選択カセットおよびＣｒｅリコンビナーゼコード配列は、ｌｏｘＰリコンビナーゼ認識部位に隣接され、これにより発生依存性の様式でハイグロマイシン選択カセットのＣｒｅ介在性除去が可能となる。たとえば、その生殖細胞が上述の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を含有する齧歯類から派生した子孫は、発生の間に選択マーカーを脱落させる（たとえば、米国特許第８，６９７，８５１号、第８，５１８，３９２号、第８，３５４，３８９号、第８，９４６，５０５号、および第８，９４６，５０４号を参照のこと。それらすべては、参照により本明細書に援用される）。これにより、特に、分化細胞または生殖細胞のいずれかから、ハイグロマイシン選択カセットの自動削除が可能となる。ゆえに、表現型解析の前に、変異型Ｋｙｎｕエクソン３（およびイントロン３のｌｏｘＰ部位）が、マウスＫｙｎｕプロモーターに動作可能に連結された状態で、ハイグロマイシン選択カセットは除去される（図４Ｄ）。

【０１２３】

適切な場合、レポーターポリペプチド（および／または選択マーカー、および／またはリコンビナーゼ）の全部もしくは一部、またはＫｙｎｕポリペプチド（たとえばバリアントＫｙｎｕポリペプチド）をコードする遺伝物質またはポリヌクレオチド配列のコード領域は、非ヒト動物における発現に最適化されたコドンを含むように改変されてもよい（たとえば、米国特許第５，６７０，３５６号および第５，８７４，３０４号を参照）。コドン最適化配列は合成配列であり、非コドン最適化親ポリヌクレオチドによってコードされる同一ポリペプチド（または全長ポリペプチドと実質的に同じ活性を有する全長ポリペプチドの生物活性断片）をコードすることが好ましい。一部の実施形態では、レポーターポリペプチド（たとえば、ｌａｃＺ）の全部または一部をコードする遺伝物質のコード領域は、特定の細胞型（例えば、齧歯類細胞）に対して、コドン利用を最適化するように変更された配列を含んでもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載されるＫｙｎｕポリペプチド（たとえばバリアントＫｙｎｕポリペプチド）の全部または一部をコードする遺伝物質のコード領域は、特定の細胞型（例えば、齧歯類細胞）に対して、コドン利用を最適化するように変更された配列を含んでもよい。１つの例ではあるが、非ヒト動物（たとえば齧歯類）のゲノム内に挿入されるレポーター遺伝子または変異型Ｋｙｎｕ遺伝子のコドンは、その非ヒト動物の細胞における発現に対し最適化されていてもよい。このような配列はコドン最適化配列として記述される場合がある。

【０１２４】

本明細書に記載されるようにＫｙｎｕ遺伝子に破損または突然変異を備えた非ヒト動物を作製するための組成物および方法が提供され、それらは、Ｋｙｎｕプロモーターおよびｋｙｎｕ制御配列からレポーター遺伝子を発現する非ヒト動物、Ｋｙｎｕプロモーターおよびｋｙｎｕ制御配列からバリアントＫｙｎｕポリペプチドを発現する非ヒト動物を作製するための組成物及び方法を含む。一部の実施形態では、内因性プロモーターおよび内因

性制御配列からレポーター遺伝子またはバリアントＫｙｎｕポリペプチドを発現する非ヒト動物を作製するための組成物および方法も提供される。方法は、レポーター遺伝子（たとえば、ｌａｃＺ、図２Ａ～２Ｃを参照）のすべてまたは一部をコードする、本明細書に記載される標的化ベクターを、非ヒト動物のゲノム内に挿入し、それにより、Ｋｙｎｕ遺伝子のコード配列部分のすべてまたは一部が削除されることを含む。一部の実施形態では、方法は、標的化ベクターを非ヒト動物のゲノム内に挿入し、Ｋｙｎｕ遺伝子のエクソン２～６が削除されることを含む。

【０１２５】

Ｋｙｎｕプロモーター（たとえば内因性Ｋｙｎｕプロモーター）に動作可能に連結されたレポーター遺伝子の挿入は、比較的最小限のゲノム改変を利用し、非ヒト動物においてＫｙｎｕ特異的な様式でレポーターポリペプチドの発現をもたらす。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物または非ヒト細胞は、本明細書に記載される標的化ベクターを備えたＫｙｎｕ遺伝子を備える。一部のある実施形態では、標的化ベクターは図２Ａまたは２Ｃに示されるものである。

【０１２６】

様々な実施形態では、本明細書に記載される破損されたＫｙｎｕ遺伝子は、レポーター遺伝子の挿入から生じた挿入接合部１つ以上（たとえば第一および第二の接合部）を含む。

【０１２７】

様々な実施形態では、本明細書に記載される破損されたＫｙｎｕ遺伝子は、配列番号１５に対し、少なくとも５０％（たとえば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第一の挿入接合部、および配列番号１６に対し、少なくとも５０％（たとえば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第二の挿入接合部を含む。

【０１２８】

様々な実施形態では、本明細書に記載される破損されたＫｙｎｕ遺伝子は、配列番号１５に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第一の挿入接合部と、配列番号１６に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第二の挿入接合部を含む。

【０１２９】

様々な実施形態では、本明細書に記載される破損されたＫｙｎｕ遺伝子は、配列番号１５に対し、少なくとも５０％（たとえば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第一の挿入接合部、および配列番号１７に対し、少なくとも５０％（たとえば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第二の挿入接合部を含む。

【０１３０】

様々な実施形態では、本明細書に記載される破損されたＫｙｎｕ遺伝子は、配列番号１５に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第一の挿入接合部と、配列番号１７に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第二の挿入接合部を含む。

【０１３１】

様々な実施形態では、本明細書に記載される破損されたＫｙｎｕ遺伝子またはアレルは、配列番号９、配列番号１０、または配列番号１１に対し、少なくとも５０％（例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９

２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む。

【０１３２】

様々な実施形態では、本明細書に記載される破損されたＫｙｎｕ遺伝子またはアレルは、配列番号９、配列番号１０、または配列番号１１と実質的に同一であるか、または同一である配列を含む。

【０１３３】

方法は、バリアントＫｙｎｕポリペプチド（図４Ａ～４Ｄを参照）のすべてまたは一部をコードする、本明細書に記載される標的化ベクターを、非ヒト動物のゲノム内に挿入し、それにより、Ｋｙｎｕ遺伝子のコード配列の一部（たとえば、エクソン３）が変更されることを含む。一部の実施形態では、方法は、標的化ベクターを非ヒト動物のゲノム内に挿入し、Ｋｙｎｕ遺伝子のエクソン３を、バリアントＫｙｎｕポリペプチドをコードするよう突然変異させることを含む。

【０１３４】

Ｋｙｎｕプロモーター（たとえば内因性Ｋｙｎｕプロモーター）に動作可能に連結された変異型Ｋｙｎｕ遺伝子の挿入は、比較的最小限のゲノム改変を利用し、非ヒト動物においてバリアントＫｙｎｕポリペプチドの発現を生じさせ、このバリアントＫｙｎｕポリペプチドは、野生型非ヒト動物に存在するＫｙｎｕポリペプチドと機能的及び構造的に類似する。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物または非ヒト細胞は、本明細書に記載される標的化ベクターを備えたＫｙｎｕ遺伝子を備える。一部のある実施形態では、標的化ベクターは図４Ａ、４Ｃまたは４Ｄに示されるものである。

【０１３５】

様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、本明細書に記載される標的化ベクターの挿入から生じた挿入接合部を１つ以上（たとえば第一および第二の接合部）を含む。

【０１３６】

様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号２４に対し、少なくとも５０％（たとえば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第一の挿入接合部、および配列番号２５に対し、少なくとも５０％（たとえば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第二の挿入接合部を含む。

【０１３７】

様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号２４に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第一の挿入接合部と、配列番号２５に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第二の挿入接合部を含む。

【０１３８】

様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号２６に対し、少なくとも５０％（例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む挿入接合部を含む。

【０１３９】

様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号２６に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む挿入接合部を含む。

様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号４２に対し、少なくとも５０％（例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９

８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第三のエクソンを備える。
【０１４０】
様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号４２に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第三のエクソンを備える。
様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号２６に対し、少なくとも５０％（例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第三のイントロンを備える。
【０１４１】
様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号２６に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第三のイントロンを備える。
様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号４２に対し、少なくとも５０％（たとえば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第三のエクソンを備えており、および配列番号２６に対し、少なくとも５０％（たとえば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第三のイントロンを備える。
【０１４２】
様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号４２に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第三のエクソンを備えており、および配列番号２６に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第三のイントロンを備える。
【０１４３】
様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子またはアレルは、配列番号１２、配列番号１３、または配列番号１４に対し、少なくとも５０％（例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を備える。
【０１４４】
様々な実施形態では、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子またはアレルは配列番号１２、配列番号１３、または配列番号１４と実質的に同一であるか、または同一である配列を備える。
【０１４５】
様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物中の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号７に対し、少なくとも５０％（例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一であるｍＲＮＡをコードする。
【０１４６】
様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物中の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号７と実質的に同一であるか、または同一であるｍＲＮＡ配列をコードする。
様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物中の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号４２に対し、少なくとも５０％（例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含む第三のエクソンを備える。
【０１４７】
様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物中の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、配列番号４２に対し、実質的に同一であるか、または同一である配列を含む第三のエクソ

ンを備える。
【０１４８】
様々な実施形態において、本明細書に記載される非ヒト動物により産生される、または発現されるＫｙｎｕポリペプチドは、配列番号８に対し、少なくとも５０％（例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を備える。
【０１４９】
様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物により産生される、または発現されるＫｙｎｕポリペプチドは、配列番号８と実質的に同一であるか、または同一である配列を備える。
【０１５０】
様々な実施形態において、本明細書に記載される非ヒト動物により産生される、または発現されるＫｙｎｕポリペプチドは、配列番号４１または配列番号３６に対し、少なくとも５０％（例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）同一である配列を含むＨ４ドメインを備える。
【０１５１】
様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物により産生される、または発現されるＫｙｎｕポリペプチドは、配列番号４１または配列番号３６と実質的に同一であるか、または同一である配列を含むＨ４ドメインを備える。
【０１５２】
あるいは、他のＫｙｎｕ遺伝子またはＫｙｎｕをコードする配列が、本明細書に記載される方法において利用され、そのゲノムが、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を含有する非ヒト動物が生成されてもよい。たとえば、異種Ｋｙｎｕ遺伝子が非ヒト動物に導入されてもよく、その異種Ｋｙｎｕ遺伝子は、本明細書に記載されるバリアントＫｙｎｕポリペプチド（すなわち、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲとの共有エピトープを欠く）をコードする。別の例では、トランスジェニックＫｙｎｕ遺伝子が、非ヒト動物のゲノム内に無作為に挿入され、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子は、（たとえばＤＮＡまたはＲＮＡのオリゴヌクレオチドを用いた遺伝的改変または遺伝子ノックダウンを介して）機能しない状態となってもよい。別のＫｙｎｕ遺伝子またはＫｙｎｕをコードする配列の例は、ＨＩＶのエンベロープポリペプチドと共有される、またはＨＩＶのエンベロープポリペプチド中に存在するエピトープを１つ以上欠くポリペプチドをコードするＫｙｎｕ遺伝子またはＫｙｎｕをコードする配列（たとえば操作された）を含む。１つの例ではあるが、ＨＩＶのエンベロープと共有される、またはＨＩＶのエンベロープ中に存在するエピトープを含有していないＫｙｎｕポリペプチドをコードする、他種のＫｙｎｕ遺伝子が当分野に公知である。本開示を読んだ当業者であれば、かかるＫｙｎｕ遺伝子またはＫｙｎｕをコードする配列が、本明細書に記載される方法において利用され、非ヒト動物を作製し得ることを理解するであろう。
【０１５３】
本明細書に記載される標的化ベクターは、ＥＳ細胞内に導入され、Ｆｒｅｎｄｅｗｅｙ，Ｄ．，ｅｔ　ａｌ．，２０１０，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．４７６：２９５－３０７．において、本明細書に記載されるように、破損されたＫｙｎｕ遺伝子または変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を担持するＥＳクローンがスクリーニングされてもよい。様々な宿主胚が、本明細書に開示される方法および組成物において利用されることができる。たとえば、標的の遺伝子改変を有する多能性および／または分化全能性の細胞が、対応する生物から、前－桑実胚段階の胚（たとえば、８細胞期の胚）に導入されてもよい。たとえば、米国特許第７，５７６，２５９号、第７，６５９，４４２号、第７，２９４，７５４号、および米国特許出願公開２００８－００７８０００Ａ１を参照のこと。これらすべてはその全体で参照により本明細書に援用される。他の例では、ドナーＥＳ細胞は、２細胞期、４

細胞期、８細胞期、１６細胞期、３２細胞期、または６４細胞期の宿主胚に移植されてもよい。また宿主胚は、胚盤胞であってもよく、または前－胚盤胞の胚、前－桑実胚の段階の胚、桑実胚段階の胚、非小型化（ｕｎｃｏｍｐａｃｔｅｄ）桑実胚の段階の胚、または小型化（ｃｏｍｐａｃｔｅｄ）桑実胚段階の胚であってもよい。

【０１５４】

一部の実施形態では、ＶＥＬＯＣＩＭＯＵＳＥ（登録商標）方法（Ｐｏｕｅｙｍｉｒｏｕ，Ｗ．Ｔ．ｅｔ ａｌ．，２００７，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２５：９１－９９）を適用して、８細胞期の胚に陽性ＥＳ細胞を注入し、完全ＥＳ細胞由来Ｆ０世代のヘテロ接合性マウスを作製してもよく、このマウスが、ｌａｃＺ発現プロファイリングを行う、または交配させてホモ接合性とさせることができる。破損されたＫｙｎｕ遺伝子または変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を有する非ヒト動物を作製する方法の例を、実施例の項において提供する。

【０１５５】

ノックアウトおよびノックインを含む、トランスジェニック非ヒト動物を作製する方法が当分野に公知である（たとえば、Ｋｉｔａｍｕｒａ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｎａｔｕｒｅ ３５０：４２３－６；Ｋｏｍｏｒｉ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１１７１－５；Ｓｈｉｎｋａｉ，Ｙ．ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５９：８２２－５；Ｍａｎｓｏｕｒ，Ｓ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｎａｔｕｒｅ ３３６：３４８－５２；Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｊｏｙｎｅｒ，ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，２０００；Ｖａｌｅｎｚｕｅｌａ，Ｄ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１（６）：６５２－９；Ａｄａｍｓ，Ｎ．Ｃ．ａｎｄ Ｎ．Ｗ．Ｇａｌｅ，ｉｎ Ｍａｍｍａｌｉａｎ ａｎｄ Ａｖｉａｎ Ｔｒａｎｓｇｅｎｅｓｉｓ－Ｎｅｗ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ，ｅｄ．Ｌｏｉｓ，Ｓ．Ｐ．ａ．Ｃ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，Ｂｅｒｌｉｎ Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，２００６を参照）。たとえば、トランスジェニック齧歯類の作製は、内因性齧歯類遺伝子の遺伝子座位の破損と、その齧歯類ゲノム内へのレポーター遺伝子の導入を含んでもよく、一部の実施形態では、その内因性齧歯類遺伝子と同じ位置での導入であり、または内因性齧歯類遺伝子の遺伝子座位の改変と、その齧歯類ゲノム内への１つ以上の突然変異の導入を含んでもよく、一部の実施形態では、その内因性齧歯類遺伝子と同じ位置での導入であり、それにより、バリアントポリペプチドの発現が生じる。

【０１５６】

マウスＫｙｎｕ遺伝子のゲノム構造の（正確な縮尺ではない）概略図が、図１に提示される。レポーター遺伝子を使用して、マウスＫｙｎｕ遺伝子のコード配列の一部を削除するための標的化ベクターの例が、図２Ａに提示される。図示されるように、マウスＫｙｎｕ遺伝子のエクソン２～６（エクソン２のＡＴＧ開始コドンを除く）を含有するゲノムＤＮＡは、部位特異的リコンビナーゼ認識部位に隣接したレポーター遺伝子と自動削除薬剤選択カセットを用いて削除される。標的化ベクターは、未分化細胞においてリコンビナーゼが発現されるよう発生的に制御されたプロモーターに動作可能に連結されたリコンビナーゼコード配列を含む。相同組み換えが行われると、内因性マウスＫｙｎｕ遺伝子のエクソン２～６は、示される標的化ベクター中に含有される配列により削除され（または置換され）、図２Ｃに図示される構造を有するＫｙｎｕ遺伝子を有する遺伝子操作マウスが、発生の間にネオマイシンカセットのＣｒｅ介在性除去を介して生成され、マウスＫｙｎｕプロモーターに動作可能に連結された（マウスＫｙｎｕ開始コドンに融合された）ｌａｃＺレポーター遺伝子はそのまま残っている。

【０１５７】

マウスＫｙｎｕ遺伝子に突然変異を生成するための標的化ベクターの例を、図４Ａおよび４Ｃに提示する。図示されるように、変異型マウスＫｙｎｕ遺伝子（すなわち、点変異を含むエクソン３を有する変異型Ｋｙｎｕ遺伝子）が、標的化ベクターを用いて生成され、このベクターは、変異型Ｋｙｎｕエクソン３の下流にあり、Ｋｙｎｕイントロン３内に

位置する部位特異的リコンビナーゼ認識部位に隣接する自動削除薬剤選択カセットを含む（図４Ｃも参照）。標的化ベクターは、未分化細胞においてリコンビナーゼが発現されるよう発生的に制御されたプロモーターに動作可能に連結されたリコンビナーゼコード配列を含む。相同組み換えが行われると、内因性マウスＫｙｎｕ遺伝子のエクソン３（およびイントロン３）は、示される標的化ベクター中に含有される配列により置換され、図４Ｄに図示される構造を有する変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を有する遺伝子操作マウスが、発生の間に選択カセットのＣｒｅ介在性除去を介して生成され、マウスＫｙｎｕプロモーターに動作可能に連結されたエクソン３中に１つ以上の点変異と、イントロン３内に（固有ｌｏｘＰ部位をとともに）小さな削除を有する変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、そのまま残っている。得られた変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、Ｄ９３Ｅアミノ酸置換を含むＫｙｎｕポリペプチドをコードする（Ｄ９３Ｅ置換をコードするエクソン３部分に関しては図４Ｃを参照）。

【０１５８】

本明細書に記載される標的化ベクター中に含まれ得るプロモーターの例を以下に提示する。本明細書に記載される標的化ベクター中に使用され得る追加の適切なプロモーターとしては、米国特許第８，６９７，８５１号、第８，５１８，３９２号、および第８，３５４，３８９号に記載されるプロモーターが挙げられる。これらすべては参照により本明細書に援用される。

【０１５９】

プロタミン１（Ｐｒｍ１）プロモーター（配列番号３７）：

CCAGTAGCAGCACCCACGTCCACCTTCTGTCTAGTAATGTCCAACACCTCCCTCAGTCCAAACACTGCTCTGCATCCATG
TGGCTCCCATTTATACCTGAAGCACTTGATGGGGCCTCAATGTTTTACTAGAGCCCACCCCCCTGCAACTCTGAGACCCT
CTGGATTTGTCTGTCAGTGCCTCACTGGGGCGTTGGATAATTTCTTAAAAGGTCAAGTTCCCTCAGCAGCATTCTCTGAG
CAGTCTGAAGATGTGTGCTTTTCACAGTTCAAATCCATGTGGCTGTTTCACCCACCTGCCTGGCCTTGGGTTATCTATCA
GGACCTAGCCTAGAAGCAGGTGTGTGGCACTTAACACCTAAGCTGAGTGACTAACTGAACACTCAAGTGGATGCCATCTT
TGTCACTTCTTGACTGTGACACAAGCAACTCCTGATGCCAAAGCCCTGCCCACCCCTCTCATGCCCATATTTGGACATGG
TACAGGTCCTCACTGGCCATGGTCTGTGAGGTCCTGGTCCTCTTTGACTTCATAATTCCTAGGGGCCACTAGTATCTATA
AGAGGAAGAGGGTGCTGGCTCCCAGGCCACAGCCCACAAAATTCCACCTGCTCACAGGTTGGCTGGCTCGACCCAGGTGG
TGTCCCCTGCTCTGAGCCAGCTCCCGGCCAAGCCAGCACC

Ｂｌｉｍｐ１プロモーター１ｋｂ（配列番号３８）：

TGCCATCATCACAGGATGTCCTTCCTTCTCCAGAAGACAGACTGGGGCTGAAGGAAAAGCCGGCCAGGCTCAGAACGAGC
CCCACTAATTACTGCCTCCAACAGCTTTCCACTCACTGCCCCCAGCCCAACATCCCCTTTTTAACTGGGAAGCATTCCTA
CTCTCCATTGTACGCACACGCTCGGAAGCCTGGCTGTGGGTTTGGGCATGAGAGGCAGGGACAACAAAACCAGTATATAT
GATTATAACTTTTTCCTGTTTCCCTATTTCCAAATGGTCGAAAGGAGGAAGTTAGGTCTACCTAAGCTGAATGTATTCAG
TTAGCAGGAGAAATGAAATCCTATACGTTTAATACTAGAGGAGAACCGCCTTAGAATATTTATTTCATTGGCAATGACTC
CAGGACTACACAGCGAAATTGTATTGCATGTGCTGCCAAAATACTTTAGCTCTTTCCTTCGAAGTACGTCGGATCCTGTA
ATTGAGACACCGAGTTTAGGTGACTAGGGTTTTCTTTTGAGGAGGAGTCCCCCACCCCGCCCCGCTCTGCCGCGACAGGA
AGCTAGCGATCCGGAGGACTTAGAATACAATCGTAGTGTGGGTAAACATGGAGGGCAAGCGCCTGCAAAGGGAAGTAAGA
AGATTCCCAGTCCTTGTTGAAATCCATTTGCAAACAGAGGAAGCTGCCGCGGGTCGCAGTCGGTGGGGGGAAGCCCTGAA
CCCCACGCTGCACGGCTGGGCTGGCCAGGTGCGGCCACGCCCCCATCGCGGCGGCTGGTAGGAGTGAATCAGACCGTCAG
TATTGGTAAAGAAGTCTGCGGCAGGGCAGGGAGGGGGAAGAGTAGTCAGTCGCTCGCTCACTCGCTCGCTCGCACAGACA
CTGCTGCAGTGACACTCGGCCCTCCAGTGTCGCGGAGACGCAAGAGCAGCGCGCAGCACCTGTCCGCCCGGAGCGAGCCC
GGCCCGCGGCCGTAGAAAAGGAGGGACCGCCGAGGTGCGCGTCAGTACTGCTCAGCCCGGCAGGGACGCGGGAGGATGTG
GACTGGGTGGAC

Ｂｌｉｍｐ１プロモーター２ｋｂ（配列番号３９）：

GTGGTGCTGACTCAGCATCGGTTAATAAACCCTCTGCAGGAGGCTGGATTTCTTTTGTTTAATTATCACTTGGACCTTTC
TGAGAACTCTTAAGAATTGTTCATTCGGGTTTTTTTGTTTTGTTTTGGTTTGGTTTTTTTGGGTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTGGTTTTTGGAGACAGGGTTTCTCTGTATATAGCCCTGGCACAAGAGCAAGCTAACAGCCTGTTTCTTCTTGGTGC
TAGCGCCCCCTCTGGCAGAAAATGAAATAACAGGTGGACCTACAACCCCCCCCCCCCCCCCAGTGTATTCTACTCTTGT
CCCCGGTATAAATTTGATTGTTCCGAACTACATAAATTGTAGAAGGATTTTTTAGATGCACATATCATTTTCTGTGATAC
CTTCCACACACCCCTCCCCCCCAAAAAAATTTTTCTGGGAAAGTTTCTTGAAAGGAAAACAGAAGAACAAGCCTGTCTTT

ATGATTGAGTTGGGCTTTTGTTTTGCTGTGTTTCATTTCTTCCTGTAAACAAATACTCAAATGTCCACTTCATTGTATGA
CTAAGTTGGTATCATTAGGTTGGGTCTGGGTGTGTGAATGTGGGTGTGGATCTGGATGTGGGTGGGTGTGTATGCCCCGT
GTGTTTAGAATACTAGAAAAGATACCACATCGTAAACTTTTGGGAGAGATGATTTTTAAAAATGGGGGTGGGGGTGAGGG
GAACCTGCGATGAGGCAAGCAAGATAAGGGGAAGACTTGAGTTTCTGTGATCTAAAAAGTCGCTGTGATGGGATGCTGGC
TATAAATGGGCCCTTAGCAGCATTGTTTCTGTGAATTGGAGGATCCCTGCTGAAGGCAAAAGACCATTGAAGGAAGTACC
GCATCTGGTTTGTTTTGTAATGAGAAGCAGGAATGCAAGGTCCACGCTCTTAATAATAAACAAACAGGACATTGTATGCC
ATCATCACAGGATGTCCTTCCTTCTCCAGAAGACAGACTGGGGCTGAAGGAAAAGCCGGCCAGGCTCAGAACGAGCCCCA
CTAATTACTGCCTCCAACAGCTTTCCACTCACTGCCCCCAGCCCAACATCCCCTTTTTAACTGGGAAGCATTCCTACTCT
CCATTGTACGCACACGCTCGGAAGCCTGGCTGTGGGTTTGGGCATGAGAGGCAGGGACAACAAAACCAGTATATATGATT
ATAACTTTTTCCTGTTTCCCTATTTCCAAATGGTCGAAAGGAGGAAGTTAGGTCTACCTAAGCTGAATGTATTCAGTTAG
CAGGAGAAATGAAATCCTATACGTTTAATACTAGAGGAGAACCGCCTTAGAATATTTATTTCATTGGCAATGACTCCAGG
ACTACACAGCGAAATTGTATTGCATGTGCTGCCAAAATACTTTAGCTCTTTCCTTCGAAGTACGTCGGATCCTGTAATTG
AGACACCGAGTTTAGGTGACTAGGGTTTTCTTTTGAGGAGGAGTCCCCCACCCCGCCCCGCTCTGCCGCGACAGGAAGCT
AGCGATCCGGAGGACTTAGAATACAATCGTAGTGTGGGTAAACATGGAGGGCAAGCGCCTGCAAAGGGAAGTAAGAAGAT
TCCCAGTCCTTGTTGAAATCCATTTGCAAACAGAGGAAGCTGCCGCGGGTCGCAGTCGGTGGGGGGAAGCCCTGAACCCC
ACGCTGCACGGCTGGGCTGGCCAGGTGCGGCCACGCCCCCATCGCGGCGGCTGGTAGGAGTGAATCAGACCGTCAGTATT
GGTAAAGAAGTCTGCGGCAGGGCAGGGAGGGGGAAGAGTAGTCAGTCGCTCGCTCACTCGCTCGCTCGCACAGACACTGC
TGCAGTGACACTCGGCCCTCCAGTGTCGCGGAGACGCAAGAGCAGCGCGCAGCACCTGTCCGCCCGGAGCGAGCCCGGCC
CGCGGCCGTAGAAAAGGAGGGACCGCCGAGGTGCGCGTCAGTACTGCTCAGCCCGGCAGGGACGCGGGAGGATGTGGACT
GGGTGGAC

一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物のゲノムは、１つ以上のヒトイムノグロブリンの重鎖および／または軽鎖の遺伝子をさらに備える（たとえば、米国特許第８，５０２，０１８号、米国特許第８，６４２，８３５号、米国特許第８，６９７，９４０号、米国特許第８，７９１，３２３号、および米国特許出願公開２０１３－００９６２８７Ａ１を参照。本明細書に参照により援用される）。あるいは、破損されたまたは変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、たとえばＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ（登録商標）株（例えば米国特許第８，５０２，０１８号または米国特許第８，６４２，８３５号を参照。参照により本明細書に援用される）などの異なる改変株の胚性幹細胞に導入されてもよい。一部の実施形態では、破損されたまたは変異型のＫｙｎｕ遺伝子は、米国特許第８，６９７，９４０号および第８，６４２，８３５号に記載される改変株の胚性幹細胞に導入されてもよい。当該文献は参照により本明細書に援用される。

【０１６０】

創始トランスジェニック非ヒト動物は、そのゲノム中のレポーター遺伝子の存在（またはＫｙｎｕの非存在）に基づいて、および／または当該非ヒト動物の組織または細胞におけるレポーターの発現（またはＫｙｎｕ発現の欠落）に基づいて、またはそのゲノム中のＫｙｎｕコード配列（たとえばエクソン）中の１つ以上の点変異の存在および／もしくは非コードＫｙｎｕ配列（たとえばイントロン）の欠落に基づいて、ならびに／または当該非ヒト動物の組織もしくは細胞中のバリアントＫｙｎｕポリペプチドの発現（または野生型Ｋｙｎｕポリペプチドの発現の欠落）に基づいて、特定されることができる。次いで創始トランスジェニック非ヒト動物を使用して、レポーター遺伝子または変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を担持する追加の非ヒト動物と交配させ、それにより、各々が本明細書に記載される破損されたまたは変異型のＫｙｎｕ遺伝子のコピーを１つ以上担持する一連の非ヒト動物を生成することができる。

【０１６１】

トランスジェニック非ヒト動物はまた、導入遺伝子またはポリヌクレオチド分子（たとえば挿入核酸）の発現の制御または管理を可能とする選択システムを含有するよう作製されてもよい。システムの例としては、バクテリオファージＰ１のＣｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼシステム（例えば、Ｌａｋｓｏ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：６２３２－６２３６を参照のこと）および出芽酵母のＦＬＰ／Ｆｒｔリコンビナーゼシステム（Ｏ’Ｇｏｒｍａｎ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ，１

９９１，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１：１３５１－１３５５）が挙げられる。そのような動物は、例えば１種は選択されたポリペプチド（たとえばレポーターまたはバリアントＫｙｎｕポリペプチド）をコードする導入遺伝子を含有し、他方はリコンビナーゼ（例えばＣｒｅリコンビナーゼ）をコードする導入遺伝子を含有する、２種のトランスジェニック動物を交配することにより、「二重の」トランスジェニック動物を構築することにより提供され得る。

【０１６２】

本明細書に記載される非ヒト動物は、多くの場合、当該非ヒト動物の使用目的に応じて、上述のように調製され、または追加のヒト遺伝子もしくはヒト化遺伝子を含有させるための当技術分野に公知の方法を用いて作製されてもよい。かかる追加のヒト遺伝子またはヒト化遺伝子の遺伝物質は、本明細書に記載される遺伝子改変を有する細胞（例えば胚性幹細胞）のゲノムのさらなる改変を介して、または所望される場合には他の遺伝子改変系統を用いた当分野に公知の交配技術を介して、導入されてもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、トランスジェニックヒトイムノグロブリン重鎖と軽鎖の遺伝子をさらに備えるように製造される（たとえば、Ｍｕｒｐｈｙ，Ａ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．，２０１４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１１（１４）：５１５３－５１５８、米国特許第８，５０２，０１８号、第８，６４２，８３５号、第８，６９７，９４０号および第８，７９１，３２３号、米国特許出願公開２０１３－００９６２８７Ａ１を参照。それらすべては、その全体で参照により本明細書に援用される）。

【０１６３】

一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、本明細書に記述されるように、標的化ベクターを、改変された系統由来の細胞へと導入することにより作製されることができる。１つの例ではあるが、上述の標的化ベクターは、ＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ（登録商標）マウス細胞（たとえば胚性幹細胞）に導入される場合がある。ＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ（登録商標）マウスは、完全ヒト可変領域とマウス定常領域を有する抗体を発現する。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、ヒトイムノグロブリン遺伝子（可変領域遺伝子および／または定常領域遺伝子）をさらに備えるように作製される。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、本明細書に記述される破損されたまたは変異型Ｋｙｎｕ遺伝子、および異種（たとえばヒト）由来の遺伝物質を備え、この場合において、当該遺伝物質は、１つ以上のヒト重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を全部または一部コードする。

【０１６４】

たとえば本明細書に記載されるように、本明細書に記載される破損されたＫｙｎｕ遺伝子または変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えた非ヒト動物は、以下の文献に記載される１つ以上の改変を（たとえば交配または複数遺伝子標的化戦略を介して）さらに備えていてもよい：Ｍｕｒｐｈｙ，Ａ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．，２０１４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１１（１４）：５１５３－５１５８、米国特許第８，５０２，０１８号、第８，６４２，８３５号、第８，６９７，９４０号および第８，７９１，３２３号、米国特許出願公開２０１３－００９６２８７Ａ１。これらすべてはその全体で参照により本明細書に援用される。一部の実施形態では、本明細書に記載される破損されたまたは変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えた齧歯類は、ヒト化イムノグロブリン重鎖および／または軽鎖の可変領域座位を備えた齧歯類と交配される（たとえば、米国特許第８，５０２，０１８号または第８，６４２，８３５号を参照。それらは参照により本明細書に援用される）。

【０１６５】

マウス中のＫｙｎｕ遺伝子の破損または突然変異を利用した実施形態が本明細書において詳細に検討されているが、Ｋｙｎｕ遺伝子座位にかかる改変（または変更）を備えた他の非ヒト動物も提供される。一部の実施形態では、かかる非ヒト動物は、Ｋｙｎｕ遺伝子中に破損を備えており（たとえばＫｙｎｕコード配列の一部の欠失を伴うマウス）、その

破損は、内因性Ｋｙｎｕプロモーターに動作可能に連結されたレポーターの挿入が特徴であり、またはＫｙｎｕ遺伝子中の突然変異を備えており（たとえば１つ以上のＫｙｎｕエクソン中に１つ以上の突然変異を伴うマウス）、その突然変異は、内因性Ｋｙｎｕプロモーターに動作可能に連結された変異型Ｋｙｎｕエクソン（たとえば１つ以上の点変異を含有するエクソン３）の挿入が特徴である。かかる非ヒト動物としては、本明細書に開示されるＫｙｎｕ遺伝子のコード配列を破損するように、または突然変異させるように遺伝子改変されることができる任意の非ヒト動物が挙げられ、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ（例えば、雌牛、未去勢オスウシ、バッファロー）、シカ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えば、マーモセット、アカゲザル）などの哺乳類が挙げられる。例えば、好適な遺伝子改変可能ＥＳ細胞が直ちに利用可能でない非ヒト動物については、遺伝子改変を含む非ヒト動物を作るために他の方法が採用される。このような方法には、例えば、非ＥＳ細胞ゲノム（例えば、線維芽細胞または人工多能性細胞）を改変すること、および体細胞核移植（ＳＣＮＴ）を利用して好適な細胞、例えば除核卵母細胞、に遺伝子改変されたゲノムを導入すること、および改変された細胞（例えば、改変された卵母細胞）を胚の形成に好適な条件下で非ヒト動物に懐胎させることが挙げられる。

【０１６６】

簡潔に述べると、核移植の方法は、（１）卵母細胞を除核する工程；（２）除核された卵母細胞と組み合わされるドナー細胞またはドナー核を単離する工程；（３）その細胞または核を、除核卵母細胞に注入し、再構成細胞を形成させる工程；（４）再構成細胞を動物の子宮に移植し、胚を形成させる工程；および（５）胚を発生させる工程、を含む。かかる方法において、卵母細胞は通常、死亡した動物から採取されるが、生きた動物の卵管および／または卵巣のいずれかから単離してもよい。卵母細胞は、除核の前に当分野の当業者に公知の様々な培地中で成熟されてもよい。卵母細胞の除核は、当分野の当業者に公知の様々な方法で行うことができる。再構成細胞を形成させるために、除核卵母細胞にドナー細胞またはドナー核を挿入することは、典型的には、融合前の透明帯下にドナー細胞をマイクロインジェクションすることにより行われる。融合は、接触／融合面の全体にわたりＤＣ電気パルスを与えること（エレクトロフュージョン）により、たとえばポリエチレングリコールなどの融合促進化学物質に細胞を暴露することにより、またはたとえばセンダイウイルスなどの不活化ウイルスを用いることにより、誘導されてもよい。再構成細胞は、典型的には、核ドナーとレシピエント卵母細胞の融合の前、融合の間、および／または融合の後に、電気的および／または非電気的手段により活性化される。活性化の方法としては、電気パルス、化学誘導ショック、精子の侵入、卵母細胞中の二価カチオン値の上昇、および卵母細胞中の細胞タンパク質のリン酸化の減少（キナーゼ阻害物質によるものとして）が挙げられる。活性化された再構成細胞または胚は、典型的には、当分野の当業者に公知の培地中で培養され、その後、動物の子宮に移される。たとえば、米国特許第７，６１２，２５０号、米国特許出願公開２００４－０１７７３９０Ａ１および２００８－００９２２４９Ａ１、ならびに国際特許出願公開ＷＯ１９９９／００５２６６Ａ２およびＷＯ２００８／０１７２３４Ａｌを参照のこと。それら各々は、参照により本明細書に援用される。

【０１６７】

非ヒト動物ゲノム（例えば、ブタ、メスウシ、齧歯類、ニワトリなどのゲノム）の改変方法には、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｃｔｉｖａｔｏｒ－ｌｉｋｅ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｎｕｃｌｅａｓｅ、ＴＡＬＥＮ）、またはＣａｓタンパク質（すなわち、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム）を用いて、ゲノムを改変し、本明細書に記載される破損されたＫｙｎｕ遺伝子または変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を含ませる方法が挙げられる。

【０１６８】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は哺乳動物である。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、例えばトビネズミ上科またはネズミ上科の小さな哺乳

動物である。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、齧歯類である。一部の実施形態では、本明細書に記載される齧歯類はマウス、ラット、ハムスターから選択される。一部の実施形態では、本明細書に記載される齧歯類はネズミ上科から選択される。一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変動物は、ヨルマウス科（例えば、マウス様のハムスター）、キヌゲネズミ科（例えば、ハムスター、Ｎｅｗ Ｗｏｒｌｄラットおよびマウス、ハタネズミ）、ネズミ科（純種のマウスおよびラット、アレチネズミ、トゲマウス、タテガミネズミ）、アシナガマウス科（キノボリマウス、ロックマウス、オジロラット、マダガスカルラットおよびマウス）、トゲヤマネ科（例えば、トゲヤマネ）、およびメクラネズミ科（例えば、メクラネズミ、タケネズミ、および高原モグラネズミ）から選択された科からのものである。一部のある実施形態では、本明細書に記載される齧歯類は、純種のマウスまたはラット（ネズミ科）、アレチネズミ、トゲマウス、およびタテガミネズミから選択される。一部のある実施形態では、本明細書に記載されるマウスは、ネズミ科の１種である。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、齧歯類である。一部のある実施形態では、本明細書に記載される齧歯類はマウスおよびラットから選択される。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、マウスである。

【０１６９】

一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、Ｃ５７ＢＬ／Ａ、Ｃ５７ＢＬ／Ａｎ、Ｃ５７ＢＬ／ＧｒＦａ、Ｃ５７ＢＬ／ＫａＬｗＮ、Ｃ５７ＢＬ／６、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ、Ｃ５７ＢＬ／６ＢｙＪ、Ｃ５７ＢＬ／６ＮＪ、Ｃ５７ＢＬ／１０、Ｃ５７ＢＬ／１０ＳｃＳｎ、Ｃ５７ＢＬ／１０Ｃｒ、およびＣ５７ＢＬ／Ｏｌａから選択されるＣ５７ＢＬ系のマウスである齧歯類である。一部のある実施形態では、本明細書に記載されるマウスは、１２９Ｐ１、１２９Ｐ２、１２９Ｐ３、１２９Ｘ１、１２９Ｓ１（例えば、１２９Ｓ１／ＳＶ、１２９Ｓ１／ＳｖＩｍ）、１２９Ｓ２、１２９Ｓ４、１２９Ｓ５、１２９Ｓ９／ＳｖＥｖＨ、１２９／ＳｖＪａｅ、１２９Ｓ６（１２９／ＳｖＥｖＴａｃ）、１２９Ｓ７、１２９Ｓ８、１２９Ｔ１、１２９Ｔ２である系から成る群から選択される１２９系である（例えば、Ｆｅｓｔｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｇｅｎｏｍｅ １０：８３６；Ａｕｅｒｂａｃｈ，Ｗ．ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２９（５）：１０２４－１０２８，１０３０，１０３２を参照）。一部のある実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変マウスは、前述の１２９系と前述のＣ５７ＢＬ／６系との混合である。一部のある実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変マウスは、前述の１２９系の混合、または前述のＢＬ／６系の混合である。一部のある実施形態では、本明細書に記述された混合の１２９系は１２９Ｓ６（１２９／ＳｖＥｖＴａｃ）系である。一部の実施形態では、本明細書に記載されるマウスはＢＡＬＢ系（例えばＢＡＬＢ／ｃ系）である。一部の実施形態では、本明細書に記載されるマウスは、ＢＡＬＢ系統及び前述の別系統のミックスである。

【０１７０】

一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、ラットである。一部のある実施形態では、本明細書に記載されるラットは、Ｗｉｓｔａｒラット、ＬＥＡ系統、Ｓｐｒａｇｕｅ Ｄａｗｌｅｙ系統、Ｆｉｓｃｈｅｒ系統、Ｆ３４４、Ｆ６、及びＤａｒｋ Ａｇｏｕｔｉから選択される。一部のある実施形態では、本明細書に記述されたラット系は、ウィスター、ＬＥＡ、Ｓｐｒａｇｕｅ Ｄａｗｌｅｙ、フィッシャー、Ｆ３４４、Ｆ６、およびＤａｒｋ Ａｇｏｕｔｉから成る群から選択された二つ以上の系の混合である。

【０１７１】

ラット多能性細胞および／または分化全能性細胞は、たとえばＡＣＩラット系統、Ｄａｒｋ Ａｇｏｕｔｉ（ＤＡ）ラット系統、Ｗｉｓｔａｒラット系統、ＬＥＡラット系統、Ｓｐｒａｇｕｅ Ｄａｗｌｅｙ（ＳＤ）ラット系統、またはたとえばＦｉｓｈｅｒ Ｆ３４４もしくはＦｉｓｈｅｒ Ｆ６などのＦｉｓｃｈｅｒラット系統をはじめとする任意のラット系統由来であってもよい。ラット多能性細胞および／または分化全能性細胞は、上

記の２つ以上の系統の混合から誘導された系統から取得されたものであってもよい。たとえば、ラット多能性細胞および／または分化全能性細胞は、ＤＡ系統またはＡＣＩ系統由来のものであってもよい。ＡＣＩラット系統は、黒色のアグーチを有し、腹部と足は白色で、ＲＴ１^{ａｖ１}ハプロタイプであることが特徴である。当該系統は、Ｈａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓをはじめとする様々な供給源から入手可能である。ＡＣＩラット由来のラットＥＳ細胞株の例は、ＡＣＩ．Ｇ１ラットＥＳ細胞である。Ｄａｒｋ　Ａｇｏｕｔｉ（ＤＡ）ラット系統は、アグーチの毛色を有し、ＲＴ１^{ａｖ１}　ハプロタイプであることが特徴である。当該ラットは、Ｃｈａｒｌｅｓ　ＲｉｖｅｒおよびＨａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓをはじめとする様々な供給源から入手可能である。ＤＡラット由来のラットＥＳ細胞株の例は、ＤＡ．２ＢラットＥＳ細胞株と、ＤＡ．２ＣラットＥＳ細胞株である。一部の例では、ラットの多能性細胞および／または分化全能性細胞は、近交系ラット由来である。たとえば、米国特許出願公開２０１４－０２３５９３３　Ａ１を参照のこと。当該出願公開は本明細書に参照により援用される。

【０１７２】

Ｋｙｎｕ遺伝子中に破損を備えた非ヒト動物が提供される。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ遺伝子中の破損により、機能消失がもたらされる。特に、機能消失性の突然変異としては、Ｋｙｎｕ発現の低下または欠落を生じさせる突然変異、および／またはＫｙｎｕの活性／機能の低下または欠落を生じさせる突然変異が挙げられる。一部の実施形態では、機能消失性の突然変異は、野生型の非ヒト動物と比較し、１つ以上の表現型が生じる。Ｋｙｎｕの発現は、たとえば本明細書に記載される非ヒト動物の細胞または組織におけるＫｙｎｕ値の評価などにより直接測定されてもよい。

【０１７３】

典型的には、Ｋｙｎｕの発現値および／または活性は、Ｋｙｎｕの発現および／または活性が、同じ破損（たとえば欠失）を備えていない適切な対照細胞または非ヒト動物中のＫｙｎｕ値よりも統計的に低い（ｐ≦０．０５）場合に、低下している。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕの濃度および／または活性は、同じ破損（たとえば欠失）が無い対照細胞または非ヒト動物と比較して、少なくとも１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％またはそれ以上まで低下している。

【０１７４】

他の実施形態では、Ｋｙｎｕの発現値および／または活性を低下させる、Ｋｙｎｕ遺伝子中の破損を有する細胞または生物は、限定されないが、サザンブロット分析、ＤＮＡ配列解析、ＰＣＲ分析、または表現型分析をはじめとする方法を使用して選択される。その後、かかる細胞または非ヒト動物を、本明細書に記載される様々な方法および組成物において利用する。

【０１７５】

一部の実施形態では、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子は削除されていない（すなわち、本来のままである）。一部の実施形態では、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子は、変更され、破損され、削除され、または異種配列（たとえばレポーター遺伝子をコードする配列）と置換される。一部の実施形態では、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子のすべて、または実質的にすべてが、挿入核酸で置換される。一部のある実施形態では、置換は、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子のコード配列の一部と、レポーター遺伝子（たとえばｌａｃＺ）の置換を含み、それにより、そのレポーター遺伝子は、Ｋｙｎｕプロモーター（たとえば内因性Ｋｙｎｕプロモーター）と動作可能に連結される。一部の実施形態では、レポーター遺伝子の一部（たとえばその機能性断片）は、内因性非ヒトＫｙｎｕ遺伝子内に挿入される。一部の実施形態では、レポーター遺伝子は、ｌａｃＺ遺伝子である。一部の実施形態では、レポーター遺伝子は、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子の２コピーのうちの１つに挿入され、そのレポーター遺伝子に関してヘテロ接合性の非ヒト動物が生成される。一部の実施形態では、レポーター遺伝子に対してホモ接合性の非ヒト動物が提供される。

【０１７６】

Ｋｙｎｕ遺伝子中に突然変異を備えた非ヒト動物が提供される。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ遺伝子中の突然変異により、バリアントＫｙｎｕポリペプチド（たとえば、野生型Ｋｙｎｕポリペプチドと比較して１つ以上のアミノ酸置換を含むＫｙｎｕポリペプチド）の発現が生じる。バリアントＫｙｎｕの発現は、たとえば本明細書に記載される非ヒト動物の細胞または組織におけるバリアントＫｙｎｕ値の評価などにより直接測定されてもよい。

【０１７７】

他の実施形態では、Ｋｙｎｕ遺伝子中に突然変異を有する細胞または生物は、限定されないが、サザンブロット分析、ＤＮＡ配列解析、ＰＣＲ分析、または表現型分析をはじめとする方法を使用して選択される。その後、かかる細胞または非ヒト動物を、本明細書に記載される様々な方法および組成物において利用する。

【０１７８】

一部の実施形態では、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子は、変異型Ｋｙｎｕ配列（たとえば、変異型Ｋｙｎｕのすべてまたは一部をコードする配列）と変更され、または置換される。一部の実施形態では、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子のすべて、または実質的にすべてが、挿入核酸で置換される。一部のある実施形態では、置換は、内因性Ｋｙｎｕのエクソン３と、変異型Ｋｙｎｕのエクソン３の置換を含み、それにより、その変異型Ｋｙｎｕのエクソン３は、Ｋｙｎｕプロモーター（たとえば内因性Ｋｙｎｕプロモーター）および他の内因性Ｋｙｎｕエクソンと動作可能に連結される。一部の実施形態では、変異型Ｋｙｎｕのエクソン３は、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子内に挿入され、その変異型Ｋｙｎｕのエクソン３は１つ以上の点変異を含有する。一部のある実施形態では、５つの点変異を含有する。一部の実施形態では、変異型Ｋｙｎｕのエクソン３は、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子の２コピーのうちの１つに挿入され、その変異型Ｋｙｎｕのエクソン３に関してヘテロ接合性の非ヒト動物が生成される。一部の実施形態では、変異型Ｋｙｎｕエクソン３に対してホモ接合性の非ヒト動物が提供される。一部の実施形態では、変異型内因性Ｋｙｎｕ遺伝子を備えた非ヒト動物は、欠失（たとえば約６０ｂｐ）および／または部位特異的リコンビナーゼ認識部位（たとえばｌｏｘＰ）を含むＫｙｎｕイントロン３をさらに備える。

【０１７９】

変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を有する非ヒト動物を用いる方法

本明細書に記載される非ヒト動物は、ＨＩＶ感染および／または伝染に対して改善された動物モデルを提供する。特に、本明細書に記載される非ヒト動物は、たとえば進行性の免疫系の機能障害、二次性日和見感染症、細胞介在性免疫の消失、および癌などを特徴とするＨＩＶ関連の疾患、障害および症状を反映する、改善された動物モデルを提供する。

【０１８０】

たとえば本明細書に記載されるＫｙｎｕ遺伝子の破損は、本明細書に提供される非ヒト動物において様々な兆候（または表現型）を生じさせ得る。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ遺伝子の破損は、出生時、肉眼的には正常であるが、たとえば、約８週、９週、１０週、１１週、１２週、１３週、１４週、１５週、１６週、１７週、１８週、１９週、２０週、２１週、２２週、２３週、２４週、２５週、２６週、２７週、２８週、２９週、３０週、３１週、３２週、３３週、３４週、３５週、３６週、３７週、３８週、３９週、４０週、４１週、４２週、４３週、４４週、４５週、４６週、４７週、４８週、４９週、５０週、５１週、５２週、５３週、５４週、５５週、５６週、５７週、５８週、５９週、６０週後など、加齢に伴い１つ以上の兆候を発生させる非ヒト動物を生じさせる。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ遺伝子破損は、異常な機能の１つ以上の細胞型を有する非ヒト動物を生じさせる。一部の実施形態では、Ｋｙｎｕ遺伝子の破損は、高血圧および／または腎疾患と関連した１つ以上の兆候（または表現型）を示す非ヒト動物を生じさせる。かかる兆候（または表現型）としては、たとえば高血圧（すなわち血流に対する抵抗性の増大）、インスリン抵抗性、動脈コンプライアンスの低下、心室拡張、および高血圧性網膜症が挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、脳卒中治療のための候補治療法の特定および開発のための改善されたｉｎ　ｖｉｖｏシステムを提供する。ゆ

えに、少なくとも１つの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、高血圧および／または腎疾患に対する改善された動物モデルを提供するものであり、高血圧の疾患、障害もしくは症状の治療および／または予防のための治療剤の開発ならびに／または特定に使用することができる。

【０１８１】

本明細書に記載される非ヒト動物は、Ｋｙｎｕの発現を欠く、またはバリアントＫｙｎｕポリペプチドを発現する、改善されたｉｎ　ｖｉｖｏシステムおよび生体物質（例えば、細胞）の供給源を提供するものであり、それらは様々なアッセイに有用である。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物を使用して、Ｋｙｎｕの発現および／または活性の欠落に関連した１つ以上の兆候を治療、予防、および／または阻害する治療剤が開発される。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物を使用して、バリアントＫｙｎｕポリペプチドの発現に関連した１つ以上の兆候を治療、予防、および／または阻害する治療剤が開発される。バリアントＫｙｎｕポリペプチドの発現によって、本明細書に記載される非ヒト動物は、キヌレニン経路に対する機能的因果関係を決定するための様々なアッセイにおける使用に有用である。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、キヌレニン経路中の１つ以上の酵素（またはその産生物）に対して作用する分子のスクリーニング用の動物モデルを提供する。

【０１８２】

本明細書に記載される非ヒト動物には、他の表現型も存在し得る。たとえば一部の実施形態では、本明細書に記載されるＫｙｎｕ遺伝子の破損または突然変異は、ＨＩＶに対する免疫応答（たとえば抗体応答）を開始させる、本明細書に記載される非ヒト動物の能力を生じさせる。かかる免疫応答は、本明細書に記載される非ヒト動物中に、ＨＩＶ上に存在する１つ以上のエピトープに対する中和抗体が存在することにより特徴付けられる場合がある。ゆえに、少なくとも１つの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、ＨＩＶ感染および／または伝染に対する改善された動物モデルを提供するものであり、ＨＩＶに関連した疾患、障害もしくは症状の治療、予防および／または阻害のための治療剤の開発ならびに／または特定に使用することができる。

【０１８３】

本明細書に記載される非ヒト動物はまた、長期にわたるＨＩＶ感染から生じた免疫系の進行性の機能障害を治療、予防、および／または阻害する治療剤の特定のためのｉｎ　ｖｉｖｏシステムを提供する。一部の実施形態では、治療剤の効果は、そのゲノムが本明細書に記載されるＫｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物に前述の治療剤を投与することにより、ｉｎ　ｖｉｖｏで決定される。

【０１８４】

本明細書に記載される非ヒト動物は、機能不全状態の細胞介在性免疫のための改善された動物モデルも提供する。特に、本明細書に記載される非ヒト動物は、免疫細胞（たとえば、ヘルパーＴ細胞）の進行性の減少により特徴付けられる症状を反映する改善された動物モデルを提供する。さらに、本明細書に記載される非ヒト動物は、後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）に関連した症状を反映する改善された動物モデルを提供する。

【０１８５】

非ヒト動物に、たとえば静脈内注射または腹腔内注射などの任意の簡便な経路で、試験される治療剤を投与してもよい。かかる動物を免疫研究に含ませてもよく、それにより、治療剤を投与されなかった適切な対照非ヒト動物と比較した、非ヒト動物の免疫系に対する治療剤の効果（たとえばＴ細胞に対する効果）が決定される。動物組織（たとえばリンパ組織）の生検または解剖学的な評価を行ってもよく、および／または血液サンプルを採取してもよい。

【０１８６】

一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、ＨＩＶエンベロープに結合する抗体を作製するためのｉｎ　ｖｉｖｏシステムを提供する。一部の実施形態では、抗体によるＨＩＶの感染および／または伝染の防止は、そのゲノムが本明細書に記載される

Ｋｙｎｕ遺伝子を備える非ヒト動物に前述の抗体を投与することにより、ｉｎ　ｖｉｖｏで決定される。

【０１８７】

様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物を使用して、ＨＩＶ（たとえばＨＩＶのエンベロープ）に結合する、および一部の実施形態では、ＨＩＶの感染および／または伝染を防御する候補治療剤（たとえば抗体）が特定、スクリーニング、および／または開発される。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物を使用して、ＨＩＶに結合する、一部のある実施形態ではＨＩＶのエンベロープに結合する治療剤候補（たとえば抗体）の結合プロファイルが決定される。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物を使用して、ＨＩＶに結合する一つ以上の治療用抗体候補のエピトープが決定される。

【０１８８】

様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物を使用して、ＨＩＶを標的とする薬剤の薬物動態プロファイルが決定される。様々な実施形態で、本明細書に記載される１つ以上の非ヒト動物、および１つ以上の対照非ヒト動物または参照非ヒト動物が、それぞれ、ＨＩＶを標的とする１つ以上の候補治療剤に、様々な用量（たとえば、０．１ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇ、０．３ｍｇ／ｋｇ、０．４ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、４ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｍｇ、７．５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ、２５ｍｇ／ｋｇ、３０ｍｇ／ｋｇ、４０ｍｇ／ｋｇ、または５０ｍｇ／ｋｇまたはそれ以上）で曝露される。ＨＩＶを標的とする治療剤候補は、経口および非経口の投与経路を含む、任意の望ましい投与経路で投薬されてもよい。非経口経路には、例えば、静脈内、動脈内、門脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、髄腔内、くも膜下腔内、側脳室内、頭蓋内、胸腔内または注入のその他の経路を含む。非注射経路には、例えば、経口、鼻、経皮、肺、直腸、口腔、膣、眼を含む。投与は、連続注入、局所投与、インプラント（ゲル、膜など）からの持続放出、および／または静脈内注射による場合もある。非ヒト動物から血液が様々な時点（例えば、０時間、６時間、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、または最大３０日もしくはそれ以上の日数）で単離される。本明細書に記載される非ヒト動物から取得されたサンプルを使用して様々なアッセイが行われ、ＨＩＶを標的とする投与薬剤の、限定されないが総ＩｇＧ、抗薬剤応答、凝集などをはじめとする薬物動態プロファイルが決定されてもよい。

【０１８９】

様々な実施形態で、本明細書に記載される非ヒト動物を使用して、ＨＩＶの活性（たとえば感染、複製、拡散など）を遮断、調節、および／または阻害する治療効果、および免疫システム中の細胞の変化の結果としての遺伝子発現に対する効果を測定する。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、またはそれらから単離された細胞は、ＨＩＶを標的とする薬剤に暴露され、そのしばらくの後、たとえばＴ細胞との膜融合などのＨＩＶ依存性のプロセス（または相互作用）、ウイルス複製、またはウイルス単離株間の遺伝的変異性に対する効果が分析される。

【０１９０】

本明細書に記載される非ヒト動物からの細胞は、その場限りで単離して使用するか、または多世代にわたって培養物中で維持することができる。様々な実施形態で、本明細書に記載される非ヒト動物からの細胞は、（例えば、ウイルスの使用を介して、細胞融合を介して、などで）不死化され、培養（例えば、連続培養）で、無期限に維持される。

【０１９１】

様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物のＢ細胞は、ＨＩＶに結合する抗体の産生に使用される。たとえば、Ｂ細胞は、本明細書に記載される非ヒト動物から単離されてもよく、および直接使用されてもよく、またはハイブリドーマ作製のために不死化されてもよい。かかる非ヒト動物は、ＨＩＶまたはＨＩＶ関連抗原（たとえばＨＩＶエンベロープポリペプチド中に存在する配列を備えたペプチド）で免疫化され、その後、当

該非ヒト動物からＢ細胞が単離されてもよい。あるいは、本明細書に記載される非ヒト動物からＢ細胞が単離され、その後、免疫化レジメンが行われてもよい。Ｂ細胞および／またはハイブリドーマは、様々なＨＩＶ関連抗原に対する結合に関してスクリーニングされてもよく、ならびにアフィニティおよび／またはエピトープにより特徴解析されてもよい。抗体がかかる細胞からクローニングされ、および配列解析されてもよく、ならびに所望される場合には、抗体の様々な特性を決定するためのさらなるアッセイにおいて使用され得る治療剤候補（または治療用ライブラリー候補）を作製するために使用されてもよい。

【０１９２】

本明細書に記載される非ヒト動物は、薬剤またはワクチンの分析および検査のためのｉｎ　ｖｉｖｏシステムを提供する。様々な実施形態で、候補薬剤またはワクチンが本明細書に記載される一つ以上の非ヒト動物に送達され、その後、当該非ヒト動物をモニターして、薬剤またはワクチンに対する免疫応答、薬剤またはワクチンの安全性プロファイル、または疾患もしくは症状に対する効果、または疾患もしくは症状の１つ以上の兆候に対する効果のうちの一つ以上を決定してもよい。安全性プロファイルを決定するために使用される例示的方法には、毒性、最適な用量濃度、薬剤またはワクチンの有効性、および潜在的リスク因子の測定を含む。このような薬剤またはワクチンはこのような非ヒト動物で改善および／または開発される場合がある。一部の実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、ＨＩＶワクチンの分析、検査、および／または開発に使用される。

【０１９３】

ワクチンの有効性は、多くの方法で決定されることができる。簡潔に述べると、本明細書に記載される非ヒト動物は当分野に公知の方法を使用して免疫化され、その後、ワクチンでチャレンジされるか、またはすでに感染した非ヒト動物にワクチンが投与される。ワクチンの有効性を決定するために、ワクチンに対する非ヒト動物の応答が、その非ヒト動物（またはそれらから単離された細胞）のモニタリングを行うことにより、および／またはそれらに対して１つ以上のアッセイを行うことにより、測定されてもよい。ワクチンに対する非ヒト動物の応答は、その後、当分野に公知の、および／または本明細書に記載される１つ以上の手段を使用して、対照動物と比較される。

【０１９４】

ワクチンの有効性は、ウイルス中和アッセイによりさらに決定されてもよい。簡潔に述べると、本明細書に記載される非ヒト動物が免疫化され、免疫後の様々な日に血清が採取される。血清の連続希釈とウイルスを前インキュベートし、その間の時間に、そのウイルスに特異的な血清中の抗体が、ウイルスに結合する。ウイルス／血清の混合物は、その後、許容細胞に添加され、プラークアッセイまたはマイクロ中和アッセイにより感染性が決定される。血清中の抗体がウイルスを中和した場合、対照群と比較して、プラーク数が少ないか、または相対ルシフェラーゼ単位が低い。

【０１９５】

本明細書に記載される非ヒト動物は、薬剤の薬物動態特性および／または有効性を評価するためのｉｎ　ｖｉｖｏシステムを提供する。様々な実施形態では、薬剤は、本明細書に記載される一つ以上の非ヒト動物に送達または投与され、その後、当該非ヒト動物（またはそれらから単離された細胞）をモニターするか、または一つ以上のアッセイを実施して、当該非ヒト動物に対する薬剤の効果を決定してもよい。薬物動態特性としては、非ヒト動物がどのように薬剤を処理して様々な代謝物にするか（または、限定されないが有毒代謝物を含む一つ以上の薬剤代謝物の有無の検出）、薬剤半減期、投与後の薬剤の循環レベル（例えば、薬剤の血清濃度）、抗薬物反応（例えば、抗薬物抗体）、薬剤の吸収および分布、投与経路、薬剤の排泄および／またはクリアランスの経路が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、薬剤の薬物動態および薬力学特性は、本明細書に記載される非ヒト動物において、またはその使用を通してモニターされる。

【０１９６】

一部の実施形態では、アッセイを行うことには、薬剤が投与される非ヒト動物の表現型および／または遺伝子型への効果を決定することを含む。一部の実施形態では、アッセイ

の実施は、薬剤のロット間変動を決定することを含む。一部の実施形態では、アッセイの実施は、本明細書に記載される非ヒト動物に投与された薬剤の効果と、参照非ヒト動物に投与された薬剤の効果の間の差異を決定することを含む。様々な実施形態では、参照非ヒト動物は、本明細書に記載された改変を有するか、本明細書に記載される改変とは異なる改変を有するか、または改変を有しない（すなわち、野生型非ヒト動物）場合がある。

【０１９７】

薬剤の薬物動態特性を評価するために非ヒト動物で（またはそれらから単離された細胞でおよび／またはそれらを使用して）測定されうるパラメーターの例には、凝集、オートファジー、細胞分裂、細胞死、補体介在性溶血、ＤＮＡ完全性、薬物特異抗体力価、薬剤代謝、遺伝子発現アレイ、代謝活性、ミトコンドリア活性、酸化ストレス、食作用、タンパク質生合成、タンパク質分解、タンパク質分泌、ストレス反応、標的組織薬剤濃度、標的外組織薬剤濃度、転写活性などが挙げられるが、これらに限定されない。様々な実施形態で、本明細書に記載された非ヒト動物は、薬剤の薬学的有効量を決定するために使用される。

【０１９８】

キット

本発明はさらに、本明細書に記載される、少なくとも１つの非ヒト動物、非ヒト細胞、ＤＮＡ断片、および／または標的化ベクターで満たされた容器を１つ以上備えたパックまたはキットを提供する。キットは、任意の適用可能な方法（例えば調査方法）において使用されてもよい。医薬品および生物製品の製造、使用または販売を規制する政府機関により規定されたフォームの通知書を、任意でかかる容器に関連づけてもよく、その通知書は、（ａ）ヒト投与に関する製造、使用または販売に関する当局による承認、（ｂ）使用に関する説明書、またはその両方、または２つ以上の実体の間の物質および／または生物製品（例えば本明細書に記載される非ヒト動物または非ヒト細胞）の輸送を支配する契約書、を反映している。

【０１９９】

本発明の他の特徴は、例示のために与えられ、かつその限定を意図しない例示的な実施形態の以下の記述の過程で明らかになるであろう。

【実施例】

【０２００】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物をどのように作成し使用するかを当業者に説明するために提供されており、発明者がその発明として見なすものの範囲を限定することを意図していない。別途示されていない限り、温度は摂氏で示され、圧力は大気圧またはその近くである。

【０２０１】

実施例１　齧歯類キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子中に破損を生成する

本実施例は、齧歯類のキヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）座位に破損を生成するための標的化ベクターの構築を示すものである。特に本実施例は、マウスＫｙｎｕプロモーターと動作可能に連結されて配置された（すなわち、エクソン２のＡＴＧコドンとともにフレーム内にある）ｌａｃＺレポーター構築物を使用した、マウスＫｙｎｕ遺伝子のコード配列の５’部分の欠失を具体的に記載する（すなわち、エクソン２のＡＴＧコドンの３’から始まり、エクソン６の３’末端の前の５塩基対までであり、３９，３４３ｂｐの欠失が生じる）。内因性マウスＫｙｎｕ座位の破損を生成するためのＫｙｎｕ－ｌａｃＺ－ＳＤＣ標的化ベクターは、従前に記載されるように構築された（たとえば、米国特許第６，５８６，２５１号、Ｖａｌｅｎｚｕｅｌａ ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１（６）：６５２－６５９、およびＡｄａｍｓ，Ｎ．Ｃ．ａｎｄ Ｎ．Ｗ．Ｇａｌｅ，ｉｎ Ｍａｍｍａｌｉａｎ ａｎｄ Ａｖｉａｎ Ｔｒａｎｓｇｅｎｅｓｉｓ－Ｎｅｗ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ，ｅｄ．Ｌｏｉｓ，Ｓ．Ｐ．ａ．Ｃ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，Ｂｅｒｌｉｎ Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，２００６を参照）。標的化ベクター（またはＤＮＡ構築物）の例を、図２Ａ～２Ｃに明記する。

【０２０２】
簡潔に述べると、Ｋｙｎｕ－ｌａｃＺ－ＳＤＣ標的化ベクターは、従前に記載されるように（たとえば、米国特許第８，６９７，８５１号、第８，５１８，３９２号、および第８，３５４，３８９号を参照のこと。これらすべては参照により本明細書に援用される）、マウス細菌人工染色体（ＢＡＣ）クローンのＲＰ２３－３９１ｐ２４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）と、自動削除ネオマイシン選択カセット（ＬａｃＺ－ｐＡ－ＩＣｅｕＩ－ｌｏｘＰ－ｍＰｒｍ１－Ｃｒｅｉ－ＳＶ４０ｐＡ－ｈＵｂ１－ｅｍ７－Ｎｅｏ－ＰＧＫｐＡ－ｌｏｘＰ）を使用して作製された。Ｋｙｎｕ－ｌａｃＺ－ＳＤＣ標的化ベクターは、未分化細胞においてリコンビナーゼが発現されるよう発生的に制御されたマウスプロタミン１プロモーターに動作可能に連結されたＣｒｅリコンビナーゼコード配列を含有した。相同組み換えが行われると、内因性マウスＫｙｎｕ遺伝子のエクソン２のＡＴＧコドンの３’ヌクレオチドから、エクソン６の３’末端前の５個の塩基対までの欠失（３９，３４３ｂｐ）が、標的化ベクターに含有される配列（約８，４３０ｂｐ）に置換えされる。薬剤選択カセットは発生依存性の様式で除去される、すなわち、その生殖系細胞に上述の破壊されたＫｙｎｕ遺伝子を含むマウスから派生した子孫は、発生中に分化細胞から選択マーカーを脱落させる（米国特許第８，６９７，８５１号、第８，５１８，３９２号、および第８，３５４，３８９号を参照。これらすべては参照により本明細書に援用される）。

【０２０３】
Ｋｙｎｕ－ｌａｃＺ－ＳＤＣ標的化ベクターの構築は、ポリメラーゼ連鎖反応と配列解析により確認され、その後、マウス胚性幹（ＥＳ）細胞に導入され、Ｇ４１８を含有する選択培地中で培養された。エレクトロポレーションに使用されるマウスＥＳ細胞は、齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域（たとえば、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧなど）に動作可能に連結された複数のヒトV_H、D_H、およびJ_Hセグメント、齧歯類イムノグロブリンκ軽鎖定常領域に動作可能に連結された複数のヒトＶκおよびＪκセグメント、および１つ以上のマウスＡｄａｍ６遺伝子をコードする挿入配列（たとえば、米国特許第８，６４２，８３５号および第８，６９７，９４０号を参照。それら両方とも、参照により本明細書に援用される）を含有するゲノムを有していた。エレクトロポレーションの１０日後、薬剤抵抗性クローンを採取し、ＴＡＱＭＡＮ^{TM}によりスクリーニングを行い、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子の約３９．４ｋｂの固有の欠失を検出するプライマー／プローブのセットを使用し、従前に記載されるように（Ｖａｌｅｎｚｕｅｌａ ｅｔ ａｌ．，上記；Ｆｒｅｎｄｅｗｅｙ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．，２０１０，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．４７６：２９５－３０７）、正しい標的化に関し核型解析を行った（表１および図２Ｂ）。

【０２０４】
上流接合部を越えるヌクレオチド配列は、以下を含み、それらは内因性マウスＫｙｎｕイントロン１配列と、マウスＫｙｎｕＡＴＧコドン（大文字のＡＴＧコドンとともにカッコ内に含まれる）を示し、ｌａｃＺコード配列（斜体の大文字であり、下線のＫｐｎＩ部位が付随）と隣接する：

【０２０５】
(ttttacttcc ttcttagata acagttt ATG)*GGTACC GATTTAAATG ATCCAGTGGT CCTGCAGAGG AGAGATTGG*（配列番号１５）。

下流接合部を越えるヌクレオチド配列は、以下を含み、それらはマウスＫｙｎｕ遺伝子のエクソン６の最後の５塩基対と、イントロン６の３４ｂｐ（コード配列は大文字、非コード配列は小文字で、カッコ内に含まれる）に隣接したカセット配列（小文字であり、下線のＮｈｅＩ部分が付随）を示す：

【０２０６】
ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttat gctagc(GAGAG gtatctgtga aagaaagaaa tgctcattag actt)（配列番号１６）。

選択カセットのリコンビナーゼ介在性除去後（ＡＴＧコドンの３’、３，４７０ｂｐが

残留）の、上流接合部を越えるヌクレオチド配列は、以下を含み、それらは内因性マウスＫｙｎｕイントロン１配列と、マウスＫｙｎｕＡＴＧコドン（大文字のＡＴＧコドンとともにカッコ内に含まれる）を示し、ｌａｃＺコード配列（斜体の大文字であり、下線のＫｐｎＩ部位が付随）に隣接する：

【０２０７】

(ttttacttcc ttcttagata acagttt ATG)*GGTACC GATTTAAATG ATCCAGTGGT CCTGCAGAGG AGAGATTGG*（配列番号１５）。

選択カセットのリコンビナーゼ介在性除去後（ＡＴＧコドンの３’、３，４７０ｂｐが残留）の、下流接合部を越えるヌクレオチド配列は、以下を含み、それらはマウスＫｙｎｕ遺伝子のエクソン６の最後の５塩基対と、イントロン６の３４ｂｐ（コード配列は大文字、非コード配列は小文字で、カッコ内に含まれる）に隣接した、残ったｌａｃＺ配列（斜体の大文字であり、ＩＣｅｕ－Ｉ、ｌｏｘＰおよびＮｈｅＩの部位が小文字の下線で付随）を示す：

【０２０８】

CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC CCC cggctagagt ttaaacacta gaactagtgg atccccgggc taactataac ggtcctaagg tagcga ctcgac ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttat gctagc(GAGAG gtatctgtga aagaaagaaa tgctcatta)（配列番号１７）。

Ｋｙｎｕ－ｌａｃＺ－ＳＤＣ標的化ベクターを用いて、４回の分離を試みたが、上述のマウスＫｙｎｕ遺伝子の破損に関し、陽性のＥＳクローンは確認されなかった。別の実験では、上述のマウスＫｙｎｕ遺伝子の破損は、ハイブリッドＥＳ細胞株であるＦ１Ｈ４（５０％　１２９／Ｓ６／ＳｖＥｖ／Ｔａｃ、５０％　Ｃ５７ＢＬ／６ＮＴａｃ；Ａｕｅｒｂａｃｈ，Ｗ．ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２９（５）：１０２４－８，１０３０，１０３２）を使用して達成された。

【０２０９】

【表１】

名称	プライマー	配列（5’-3’）
	フォワード	TGCTACCCTACCAACCCATC（配列番号18）
4249mTU	プローブ	CCTACCCGAGCCTCGTGTTCTTTACG（配列番号19）
	リバース	GACAGCGTAAACACCCTGAGAG（配列番号20）
	フォワード	ATTCTGCACTTCTGATCACCTTTA（配列番号21）
4249mTD2	プローブ	TCAACAAGTACCCTGATTCACATTAAGGA（配列番号22）
	リバース	GAATGGCTACCTCACAGACATC（配列番号23）

まとめると、本実施例は、コード配列のすべてまたは一部の欠失による遺伝子産物の除去は、一部の遺伝子座位に対しては実施できない場合があることを示す。さらに本実施例は、一部の実施形態では、内因性ポリペプチドと外来性実体（たとえばウイルス）に存在する共有エピトープが発現されず、しかし別の手段で機能性ポリペプチドはコードされる、産生される、または発現されるような、別の遺伝子座位改変方法が必要とされ得ることを示すものである。

【０２１０】

実施例２　齧歯類キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）遺伝子中に突然変異を生成する

本実施例は、たとえば齧歯類（たとえばマウス）などの非ヒト哺乳類の内因性キヌレニナーゼ（Ｋｙｎｕ）座位中に１つ以上の点変異を生成させ、ＫｙｎｕポリペプチドとＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲに存在する共有エピトープを除去する方法の例を示す。ヒト

、マウス、ラット、および変異型のＫｙｎｕ（以下に記載される）のアミノ酸配列のアライメントが図３に明記されており、モノクローナル抗体２Ｆ５に結合される、ＨＩＶ－１ｇｐ４１とＫｙｎｕの共有エピトープはボックス内で示される。図４Ａ～４Ｄは、齧歯類Ｋｙｎｕポリペプチドをコードする遺伝物質中に点変異を生成するための標的化ベクターの例を示しており、このベクターは、ＶＥＬＯＣＩＧＥＮＥ（登録商標）技術を使用して構築された（米国特許第６，５８６，２５１号およびＶａｌｅｎｚｕｅｌａ ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１（６）：６５２－６５９を参照。これらすべては参照により本明細書に援用される）。

【０２１１】

簡潔に述べると、マウス細菌人工染色体（ＢＡＣ）クローンｂＭＱ－２８０Ｇ７（Ａｄａｍｓ，Ｄ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．，２００５，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ８６：７５３－７５８）を改変し、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子のエクソン３に点変異を導入し、それにより、Ｄ９３Ｅアミノ酸置換を有するＫｙｎｕポリペプチドが発現された（図２および４Ｂ）。追加で４つの同義的点変異をエクソン３に加え、イントロン３（すなわちＤ９３Ｅ置換の下流または３’）に約６０ｂｐの欠失が導入され、陽性クローンのスクリーニングを促進した（図４Ｂ）。点変異と、イントロン３の約６０ｂｐの欠失は、標的領域に隣接するマウス配列に対し同一の配列の小さな隣接アーム（すなわち、変異領域に対してそれぞれ５’と３’の、２５０ｂｐと１００ｂｐ）を使用した、新たなＤＮＡ合成により導入された（ＧｅｎｅＳｃｒｉｐｔ社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州、により合成）。合成断片（６０９ｂｐ）は、プラスミド骨格中に含有され、アンピシリン選択下で細菌中で増幅された。制限酵素を使用してハイグロマイシン抵抗性遺伝子を合成断片内にクローニングし、ｂＭＱ－２８０Ｇ７ ＢＡＣとの相同組み換え用のドナープラスミドを生成した（図４Ｃ）。次いで得られた改変ｂＭＱ－２８０Ｇ７ ＢＡＣクローンをＥＳ細胞内にエレクトロポレーションした。ＫｙｎｕＤ９３Ｅ－ＳＤＣ標的化ベクターは、未分化細胞においてリコンビナーゼが発現されるよう発生的に制御されたマウスプロタミン１プロモーターに動作可能に連結されたＣｒｅリコンビナーゼコード配列を含有した（図４Ｃ、また米国特許第８，６９７，８５１号、第８，５１８，３９２号、および第８，３５４，３８９号を参照。それらすべて参照により本明細書に援用される）。相同組み換えで、２０ｂｐの合成変異型Ｋｙｎｕエクソン３が、内因性マウスＫｙｎｕ座位のエクソン３の最後の２０ｂｐの代わりに挿入され、内因性マウスＫｙｎｕ座位のイントロン３の約６０ｂｐが、標的化ベクター（約８，４３０ｂｐ）に含有される配列により削除される。薬剤選択カセットは発生依存性の様式で除去される、すなわち、その生殖系細胞に上述の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を含むマウスから派生した子孫は、発生中に分化細胞から選択マーカーを脱落させる（図４Ｄ、また米国特許第８，６９７，８５１号、第８，５１８，３９２号、および第８，３５４，３８９号を参照。これらすべては参照により本明細書に援用される）。周辺のエクソン、イントロン及び非翻訳領域（ＵＴＲ）を含有する内因性ＤＮＡは、突然変異および選択カセットにより変更されなかった。標的化ベクターの配列解析により、変異型Ｋｙｎｕ遺伝子のすべてのエクソン、イントロン、スプライシングシグナル、およびオープンリーディングフレームが確認された。

【０２１２】

上述の改変ｂＭＱ－２８０Ｇ７ ＢＡＣクローンを使用して、マウス胚性幹（ＥＳ）細胞にエレクトロポレーションし、Ｄ９３Ｅアミノ酸置換を含有するＫｙｎｕポリペプチドをコードする変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えた改変ＥＳ細胞が作製された。エレクトロポレーションに使用されるマウスＥＳ細胞は、齧歯類イムノグロブリン重鎖定常領域（たとえば、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧなど）に動作可能に連結された複数のヒトV_H、D_H、およびJ_Hセグメント、齧歯類イムノグロブリンκ軽鎖定常領域に動作可能に連結された複数のヒトＶκおよびＪκセグメント、および１つ以上のマウスＡｄａｍ６遺伝子をコードする挿入配列（たとえば、米国特許第８，６４２，８３５号および第８，６９７，９４０号を参照。それら両方とも、参照により本明細書に援用される）を含有するゲノムを有していた。エレクトロポレーションの１０日後、薬剤抵抗性クローンを採取し、ＴＡＱＭＡＮ

TMによりスクリーニングを行い、内因性Ｋｙｎｕ遺伝子内へのエクソン３の点変異とイントロン３の欠失の適切な導入を検出するプライマー／プローブのセットを使用し、従前に記載されるように（Ｖａｌｅｎｚｕｅｌａ　ｅｔ　ａｌ．，ｓｕｐｒａ；Ｆｒｅｎｄｅｗｅｙ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，２０１０，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．４７６：２９５－３０７）、正しい標的化に関し核型解析を行った（表２および図４Ｃ）。

【０２１３】

４２４７ｍＴＤ（表２）を使用したクローンのスクリーニングにより、選択カセットの適切な統合が確認された。これは、変異型に生成された小さな欠失（すなわちイントロン３の６０ｂｐの欠失）内に配置されるため、野生型アレルのみが増幅されるよう設計されていた。４２４７ｍＴＵ２＿Ｄ９３Ｅ（表２）を用いたクローンのスクリーニングにより、変異型Ｋｙｎｕエクソン３の適切な統合が確認された。これは、変異型エクソン３のみ増幅し、操作された点変異の存在を検出するよう設計されていた。

【０２１４】

上流接合部を越えるヌクレオチド配列は、以下を含み、それらは、挿入点でカセット配列（小文字であり、下線のＸｈｏＩ部位と、太字のｌｏｘＰ部位を付随）と隣接する内因性マウスＫｙｎｕエクソン３配列（大文字で以下のカッコ内に含有され、太字と下線の点変異が付随）を示す。

【０２１５】

(TTCCTGGGAA ATTCCCTTGG CCTTCAACCG AAAATGGTTA GGACATACCT GGAGGAAGAG CTTGAAAAAT GGGCTAAGAT GTAAGTACCA AGTTAAAAGG TGTAACTCCA TCTGACAGAA GAATTCTGAA AATTACAAAA TGTGTCTGAT TTGGACAAGT TACACCCTAG CATATTAGGA ACAATGAAAA CCTTATTTAC AGTAATTACC AATACTAAAA TATTTTGATG AAATAATCTT CAATCAGAAT AAGTCCAAAT GACAAATTCAT GAAAG) ctcgag **ataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat** atgcatggcc tccgcgccgg gttttggcgc ctcccgcggg cgccccctc ctcacggcga gcgctgccac gtcagacgaa gggcgcagcg （配列番号２４）。

下流接合部を越えるヌクレオチド配列は、以下を含み、それらは、挿入点の下流のマウスＫｙｎｕイントロン３配列（以下のカッコ内に含まれる大文字）に隣接するカセット配列（小文字で示され、両方とも下線のＩ－ＣｅｕＩとＮｈｅＩ部位、および太字のｌｏｘＰ部位が付随）を示す：

【０２１６】

tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga **ataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat** gctag taactataacggtcctaaggtagcga gctagc (AGCCATTTAA TGTCCAGCAA AGAAGTTAAT TCATGATTTT GAGTGTTTAA TGATGAATTC ATGACCAAGT TAAGAATGCC ATCAAAAATA GGAAATACA) （配列番号２５）。

選択カセットのリコンビナーゼ介在性除去後の挿入点を越えるヌクレオチド配列（イントロン３に７７ｂｐ残留）は以下を含み、それらは残りのカセット配列（小文字で以下のカッコ内に含まれ、下線のＸｈｏＩ、Ｉ－ＣｅｕＩおよびＮｈｅＩ部位と、太字のｌｏｘＰ部位が付随）と並置されたマウスＫｙｎｕイントロン３配列（大文字）を示す：

【０２１７】

TTCCTGGGAA ATTCCCTTGG CCTTCAACCG AAAATGGTTA GGACATACCT GGAGGAAGAG CTTGAAAAAT GGGCTAAGAT GTAAGTACCA AGTTAAAAGG TGTAACTCCA TCTGACAGAA GAATTCTGAA AATTACAAAA TGTGTCTGAT TTGGACAAGT TACACCCTAG CATATTAGGA ACAATGAAAA CCTTATTTAC AGTAATTACC AATACTAAAA TATTTTGATG AAATAATCTT CAATCAGAAT AAGTCCAAAT GACAAATTCA TGAAAG (ctcgag ataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat gctag taactataacggtcctaaggtagcga gctagc) AGCCATTTAA TGTCCAGCAA AGAAGTTAATT CATGATTTTG AGTGTTTAAT GATGAATTCA TGACCAAGTT AAGAATGCCA TCAAAAATAG GAAATACA （配列番号２６）。

次いで陽性ＥＳ細胞クローンを使用して、ＶＥＬＯＣＩＭＯＵＳＥ（登録商標）法（たとえば、米国特許第７，２９４，７５４号、ＤｅＣｈｉａｒａ，Ｔ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，２０１０，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．４７６：２８５－９４；ＤｅＣｈｉａｒａ，Ｔ．Ｍ．，２００９，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．５３０：３１１－２４；Ｐｏｕｅｙｍｉｒｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００７，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２５：９１－９を参照のこと）を使用して雌マウスに移植した。その標的とされたＥＳ細胞は、非小型化８細胞期のＳｗｉｓｓ　Ｗｅｂｓｔｅｒ胚に注入され、変異型Ｋｙｎｕ遺伝子に関しヘテロ接合性で、健常で、完全にＥＳ細胞由来であり、Ｄ９３Ｅ置換を含有するＫｙｎｕポリペプチドを発現し、ヒト可変領域と齧歯類定常領域を有する抗体を発現するＦ０世代が作製された。ヘテロ接合性Ｆ０世代のオスと、Ｃ５７Ｂｌ６／ＮＴａｃのメスを交配させ、Ｆ１ヘテロ接合体を作製した。表現型解析のためにこのＦ１ヘテロ接合体を交雑させ、ホモ接合体マウスと野生型マウスのＦ２世代を作製した。

【０２１８】

まとめると、本実施例は、そのゲノムが変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えた齧歯類（たとえばマウス）の作製を示すものであり、その変異型Ｋｙｎｕ遺伝子は、エクソン３に１つ以上の点変異を備えており、その変異によりＤ９３Ｅ置換が生じる。本明細書に記載される、齧歯類に変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を生成する戦略は、発現されるＫｙｎｕポリペプチドとＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲの間の共有エピトープの除去を生じさせ、ＨＩＶ感染の治療的処置を目的として開発され得る抗体を発現する齧歯類の構築が可能となる。特に、本明細書に記載される齧歯類は、内因性ポリペプチド中に存在するＨＩＶエピトープに結合することを特徴とし、一部の実施形態では、免疫寛容メカニズムによって、自然発生的な抗体レパートリーから別手段により除外されてしまうヒト抗体系治療剤の作製のためのｉｎ　ｖｉｖｏシステムを提供するものである。

【０２１９】

【表２】

名称	プライマー	配列（5’-3’）
4247mTD	フォワード	ATGAAAGCGAGAGAGTAAAACAACATAT（配列番号 27）
	プローブ	TGTAATCTCCTTTTCTACATCTA（配列番号 28）
	リバース	GCTGGACATTAAATGGCTACATTG（配列番号 29）
4247mTU2_D93E	フォワード	CCTTGGCCTTCAACCGAAA（配列番号 30）
	プローブ	TGGTTAGGACATACCTGGAG（配列番号 31）
	リバース	TTGGTACTTACATCTTAGCCCATTTTT（配列番号 32）

実施例３　ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）に結合する抗体の作製

本実施例は、変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を備えた齧歯類において、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１の膜近位外部領域（ＭＰＥＲ）に由来するペプチドを使用して抗ＨＩＶ抗体が作製されたことを示すものである。特に、ＭＰＥＲペプチドは、既存の抗ＨＩＶ抗体の２Ｆ５と４Ｅ１

０のエピトープに由来するものであり、これを使用して、本明細書に記載される変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を含有するマウスを、従前に記載される（たとえば、Ｓ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，２０１１，ＰＬｏｓ　ＯＮＥ　６（１１）：ｅ２７８２４を参照）誘導法を使用して免疫化する。本実施例に記載される方法および免疫化の方法は当分野に公知であり、これを使用して、上述の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を含有する齧歯類を、ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲ中に存在し、内因性ポリペプチドと共有される任意のエピトープに由来するペプチドで、または望ましい場合にはエピトープの組み合わせで、免疫化することができる。

【０２２０】

ＨＩＶ－１　ｇｐ４１のＭＰＥＲに対するヒト抗体は、２Ｆ５エピトープ（ＱＱＥＫＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮ、配列番号３３）または２Ｆ５モノクローナル抗体と４Ｅ１０モノクローナル抗体の両方のエピトープ（ＮＥＱＥＬＬＥＬＤＫＷＡＳＬＷＮＷＦＮＩＴＮＷＬＷＹＩＫ、配列番号３４）を含有する合成ペプチドを使用して作製される。Ｃ末端疎水性膜アンカータグ（ＹＫＲＷＩＩＬＧＬＮＫＩＶＲＭＹＳ、配列番号３５）を用いてペプチドが合成され（ＣＰＣ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）、逆相ＨＰＬＣにより精製される。ＭＰＥＲペプチドの純度は、ＨＰＬＣにより９５％よりも高いと算定され、質量分光分析により確認される。

【０２２１】

実施例２に記載されるマウスのコホート（すなわち、上述の変異型Ｋｙｎｕ遺伝子を含有するＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ（登録商標）マウス）に、従前に解説される方法（Ｄｅｎｎｉｓｏｎ，Ｓ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．、上記）を使用してＭＰＥＲペプチドをチャレンジする。抗体免疫応答は、ＨＩＶ特異的免疫アッセイ（すなわち血清価）によりモニターされる。望ましい免疫応答が得られた場合、脾臓細胞（および／または他のリンパ組織）を採取し、マウスミエローマ細胞と融合させ、それらの活性を保持させ、不死化ハイブリドーマ細胞株を形成させる。ハイブリドーマ細胞株は（たとえばＥＬＩＳＡアッセイにより）スクリーニングされ、選択されて、ＨＩＶ特異的抗体を産生するハイブリドーマ細胞株が特定される。ハイブリドーマは、望まれる場合には相対結合アフィニティとアイソタイプに関してさらに特徴解析されてもよい。この技術と上記の免疫原を使用して、数種の抗ＨＩＶキメラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメインと齧歯類定常ドメインを保有する抗体）が取得される。

【０２２２】

完全ヒト抗体の作製を目的として、重鎖と軽鎖の可変領域をコードするＤＮＡが単離され、重鎖と軽鎖の望ましいアイソタイプ（定常領域）に連結されてもよい。かかる抗体タンパク質は、たとえばＣＨＯ細胞などの細胞中で産生され得る。その後、完全ヒト抗体は、相対結合アフィニティおよび／またはＨＩＶの中和活性に関して特徴解析される。

【０２２３】

抗原特異的キメラ抗体、または軽鎖と重鎖の可変ドメインをコードするＤＮＡが、抗原特異的リンパ球から直接単離されてもよい。最初にヒト可変領域とマウス定常領域を有する高アフィニティのキメラ抗体が単離され、アフィニティ、選択性、エピトープなどの望ましい特徴に関して特徴解析され、選択される。マウス定常領域は、所望されるヒト定常領域で置換され、完全ヒト抗体が作製される。選択される定常領域は具体的な用途に従い変化され得る一方で、高アフィニティ抗原結合と標的特異性の特徴は可変領域中に存在し得る。また抗ＨＩＶ抗体は、米国特許第７，５８２，２９８号に記載されるように、ミエローマ細胞との融合を行うことなく、抗原陽性Ｂ細胞（免疫化マウス由来）から直接単離されてもよい。当該文献は、その全体で参照により本明細書に明確に援用される。この方法を使用し、数種の完全ヒト抗ＨＩＶ抗体（すなわち、ヒト可変ドメインとヒト定常ドメインを保有する抗体）が作製される。

【０２２４】

均等

本発明の少なくとも一つの実施形態のこのような記述されたいくつかの側面を持つ、様々な修正、変更、および改善を当業者であれば容易に思いつくことが当業者には理解され

るはずである。このような修正、変更、および改善は本開示の一部であることが意図され、本発明の精神および範囲内であることが意図される。従って、前述の説明および図面は例示のみとしてのものであり、本発明は以下の請求項によって詳細に記述される。

【０２２５】

請求項で請求項を変更するための「第一の」、「第二の」、「第三の」などの順序の用語の使用は、それ自体は一つの請求項要素の別の要素に対する優位性、先行、もしくは順序、または方法の行為が実施される時間的順序を暗示せず、特定の名称を持つ一つの請求項要素を（順序の用語の使用以外は）同じ名称を持つ別の要素から区別して請求項要素を区別するための標識としてのみ使用される。

【０２２６】

本明細書および請求項で使用される場合、「ａ」および「ａｎ」という冠詞は、そうでないことが明確に示されない限り、複数参照を含むと理解されるべきである。群の一つ以上の要素の間に「または」を含む請求項または記述は、そうではないことが示されるかまたはそうでなければ文脈から明らかでない限り、一つ、二つ以上、または群のすべての要素が、所定の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する場合に満足される。本発明は、群の正確に一つの要素が所定の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する実施形態を含む。本発明は、二つ以上、または群の要素全体が所定の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する実施形態も含む。さらに、本発明は、別途指定されない限り、または矛盾または不一致が起こることが当業者には明らかでない限り、変形、組み合わせ、および記載された請求項の一つ以上からの一つ以上の限定、要素、句、記述用語などが、同じ基礎請求項に依存する別の請求項（または関連する任意のその他の請求項）に導入される並べ替えすべてを網羅することを理解すべきである。記載されたような要素が存在する場合（例えば、マーカッシュ群または類似の形式で）、要素の各サブグループも開示され、任意の要素を群から除去することができる。当然のことながら、一般的に、本発明、または本発明の態様が特定の要素、特徴などを含むとして言及される場合、本発明のある実施形態または本発明の態様は、このような要素、特徴などから成る、または実質的にそれらから成る。簡潔にするために、これらの実施形態はすべての場合において、多くの言葉では本明細書に特に記述されていない。これも当然のことながら、本発明の任意の実施形態または態様は、特定の除外が明細書に列挙されているかどうかにかかわらず、請求項から明示的に除外される可能性がある。

【０２２７】

当業者であれば、アッセイまたは本明細書に記述されたその他のプロセスで得られた値に起因する一般的な標準偏差または誤差を理解するであろう。本発明の背景を説明し、その実践に関して追加的詳細を提供するための本明細書の出版物、ウェブサイトおよびその他の参考資料は、参照により本明細書に援用される。

【図１】

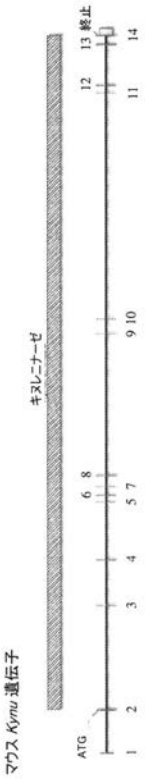


図 1

【図２Ａ】

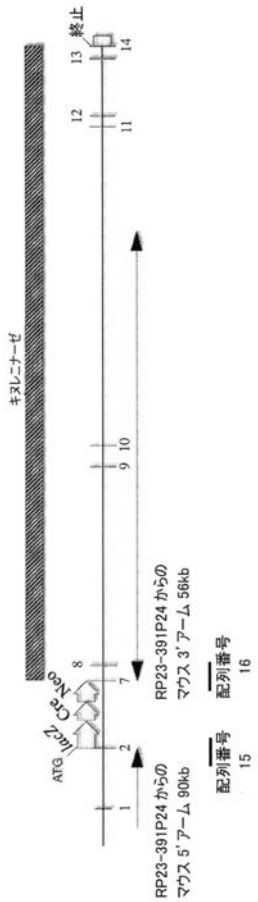


図 2A

【図２Ｂ】

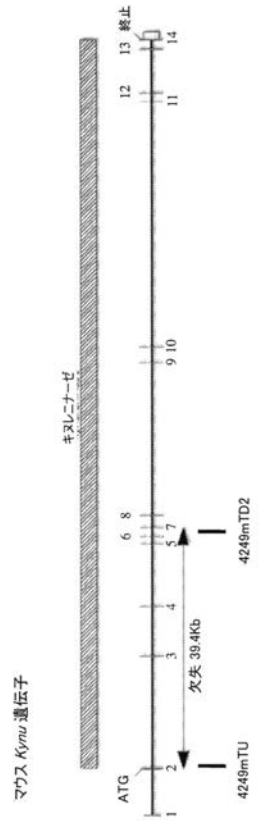


図 2B

【図２Ｃ】

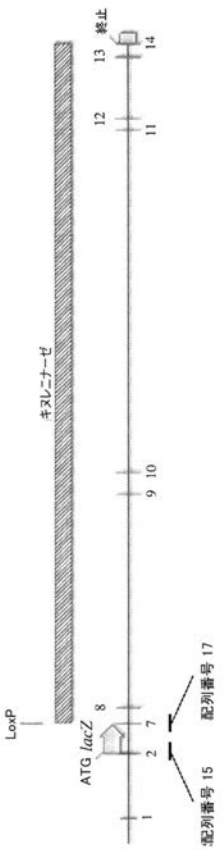


図 2C

【図３】

```
hKYNU      -MEPSSLELPADTVQRIAAELKCHPTDERVALHLDEEDKLRHFRECFYIPKIQDLPPVDL
mKynu      MMEPSPLELPVDAVRRIAAELNCDPTDERVALRLDEEDKLSHFRNCFYIPKMRDLPSIDL
rKynu      -MEPSPLELPVDAVRRIAAELNCDPTDERVALRLDEEDKLKRFKDCFYIPKMRDLPSIDL
mutKynu    MMEPSPLELPVDAVRRIAAELNCDPTDERVALRLDEEDKLSHFRNCFYIPKMRDLPSIDL
            ****.****.*:*:******:*.********:******* :*::******::***.:**

hKYNU      SLVNKDENAIYFLGNSLGLQPKMVKTYLEEELDKWAKIAAYGHEVGKRPWITGDESIVGL
mKynu      SLVSEDDDAIYFLGNSLGLQPKMVRTYLEEELDKWAKMGAYGHDVGKRPWIVGDESIVSL
rKynu      SLVNEDDNAIYFLGNSLGLQPKMVRTYLEEELDKWAKIGAYGHEVGKRPWIIGDESIVTL
mutKynu    SLVSEDDDAIYFLGNSLGLQPKMVRTYLEELEKWAKMGAYGHDVGKRPWIVGDESIVSL
           ***.:*::*****************:********:****:.****:******* ****** *

hKYNU      MKDIVGANEKEIAIMNALTVNLHLLMLSFFKPTPKRYKILLEAKAFPSDHYAIESQLQLH
mKynu      MKDIVGAHEKEIAIMNALTINLHLLLLSFFKPTPKRHKILLEAKAFPSDHYAIESQIQLH
rKynu      MKDIVGAHEKEIAIMNALTVNLHLLLLSFFKPTPKRHKILLEAKAFPSDHYAIESQIQLH
mutKynu    MKDIVGAHEKEIAIMNALTINLHLLLLSFFKPTPKRHKILLEAKAFPSDHYAIESQIQLH
           *******:***********:*****:**********:*******************:***

hKYNU      GLNIEESMRMIKPREGEETLRIEDILEVIEKEGDSIAVILFSGVHFYTGQHFNIPAITKA
mKynu      GLDVEKSMRMVKPREGEETLRMEDILEVIEEEGDSIAVILFSGLHFYTGQLFNIPAITKA
rKynu      GLDVEKSMRMIKPREGEETLRMEDILEVIEKEGDSIAVVLFSGLHFYTGQLFNIPAITQA
mutKynu    GLDVEKSMRMVKPREGEETLRMEDILEVIEEEGDSIAVILFSGLHFYTGQLFNIPAITKA
           **:::*:****:**********:********:********:****:****** *******:*

hKYNU      GQAKGCYVGFDLAHAVGNVELYLHDWGVDFACWCSYKYLNAGAGGIAGAFIHEKHAHTIK
mKynu      GHAKGCFVGFDLAHAVGNVELRLHDWGVDFACWCSYKYLNSGAGGLAGAFVHEKHAHTVK
rKynu      GHAKGCFVGFDLAHAVGNVELHLHDWDVDFACWCSYKYLNSGAGGLAGAFIHEKHAHTIK
mutKynu    GHAKGCFVGFDLAHAVGNVELRLHDWGVDFACWCSYKYLNSGAGGLAGAFVHEKHAHTVK
           *:****:*************** ****.*************:****:****:*******:*

hKYNU      PALVGWFGHELSTRFKMDNKLQLIPGVCGFRISNPPILLVCSLHASLEIFKQATMKALRK
mKynu      PALVGWFGHDLSTRFNMDNKLQLIPGANGFRISNPPILLVCSLHASLEVFQQATMTALRR
rKynu      PALVGWFGHELSTRFNMDNKLQLIPGVNGFRISNPPILLVCSLHASLEIFQQATMTALRR
mutKynu    PALVGWFGHDLSTRFNMDNKLQLIPGANGFRISNPPILLVCSLHASLEVFQQATMTALRR
           *********:*****:**********. ********************:*:****.***:

hKYNU      KSVLLTGYLEYLIKHNYGKDKAATKKPVVNIITPSHVEERGCQLTITFSVPNKDVPQELE
mKynu      KSILLTGYLEYMLKHYHSKDNTENKGPIVNIITPSRAEERGCQLTLTFSIPKKSVPKELE
rKynu      KSILLTGYLEYLLKHYHGGNDTENKRPVVNIITPSRAEERGCQLTLTFSISKKGVPKELE
mutKynu    KSILLTGYLEYMLKHYHSKDNTENKGPIVNIITPSRAEERGCQLTLTFSIPKKSVPKELE
           **:********::** :. :.: .* *:*******:.********:***:.:*.**:***

hKYNU      KRGVVCDKRNPNGIRVAPVPLYNSFHDVYKFTNLLTSILDSAETKN
mKynu      KRGVVCDKREPDGIRVAPVPLYNSFHDVYKFIRLLTSILDSSERS-
rKynu      KRGVVCDKREPEGIRVAPVPLYNSFHDVYKFIRLLTAILDSTERN-
mutKynu    KRGVVCDKREPDGIRVAPVPLYNSFHDVYKFIRLLTSILDSSERS-
           *********:*:****************** .***:****:* .
```

Figure 3

【図４Ａ】

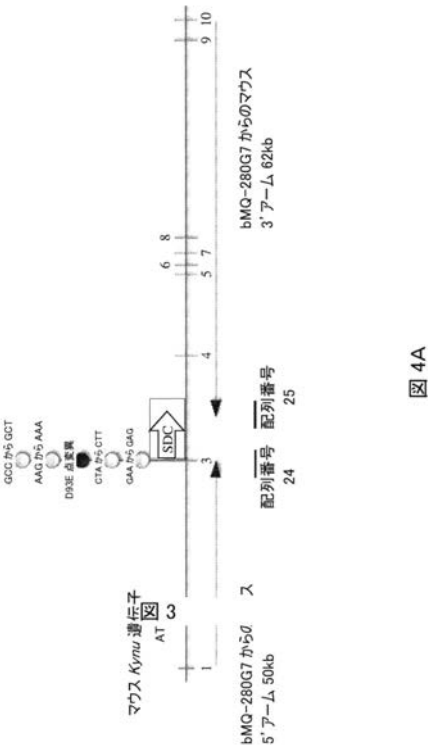


図 4A

【図４Ｂ】

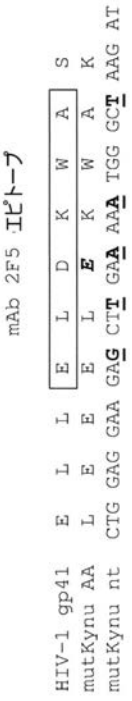


図 4B

【図４Ｃ】

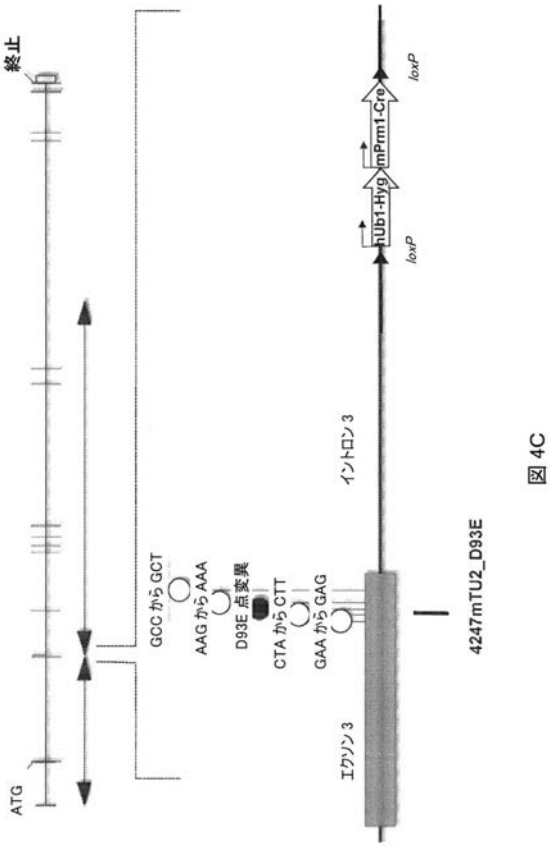


図 4C

【図４Ｄ】

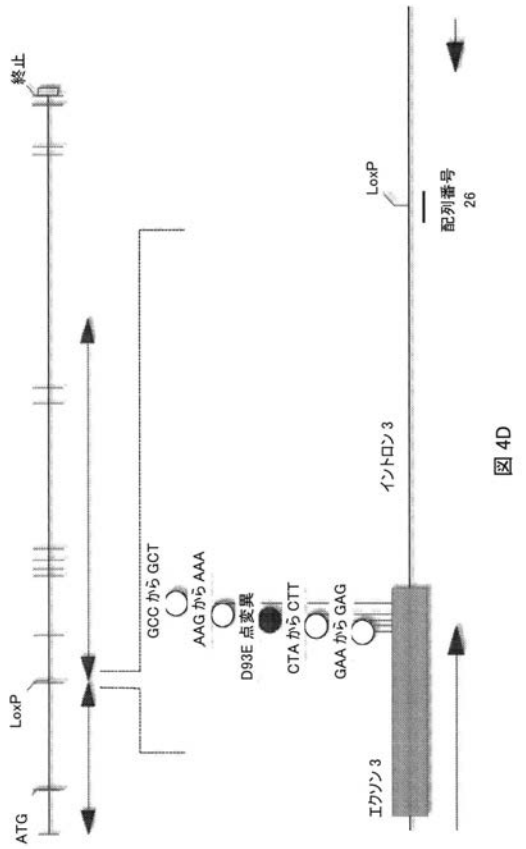


図 4D

【配列表】
2019509059000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/018166

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01K67/027 C07K16/10 C12N9/14
ADD.

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)
A01K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GUANG YANG ET AL: "Identification of autoantigens recognized by the 2F5 and 4E10 broadly neutralizing HIV-1 antibodies", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 210, no. 2, 28 January 2013 (2013-01-28), pages 241-256, XP055373224, US ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.20121977 cited in the application page 248 - page 252 ----- -/--	1-90

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* 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	Date of mailing of the international search report
17 May 2017	01/06/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Deleu, Laurent

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/018166

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/124156 A1 (REGENERON PHARMA [US]; UNIV DUKE [US]) 14 August 2014 (2014-08-14) figures 5,6	10-20, 22-24, 40-46, 51-59, 70-90
Y	WO 2011/020005 A1 (REGENERON PHARMA [US]; FRENDEWEY DAVID [US]; HESLIN DAVID JONATHAN [US]) 17 February 2011 (2011-02-17) Family member of US 8,697,851 cited in the description; claim 17; example 6	1-9,21, 25-39, 47-50, 60-69
A	A. J. MURPHY ET AL: "Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 111, no. 14, 25 March 2014 (2014-03-25), pages 5153-5158, XP055162338, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1324022111 page 5154	10-20, 22-24, 40-46, 51-59, 70-90
A	WO 02/066630 A1 (REGENERON PHARMA [US]; MURPHY ANDREW J [US]; YANCOPOULOS GEORGE D [US]) 29 August 2002 (2002-08-29) example 3	10-20, 22-24, 40-46, 51-59, 70-90
A	ANNA HRABOVSKA ET AL: "A Novel System for the Efficient Generation of Antibodies Following Immunization of Unique Knockout Mouse Strains", PLOS ONE, vol. 5, no. 9, 23 September 2010 (2010-09-23), page e12892, XP55131783, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0012892 page 3 - page 4	1-90

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/018166

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014124156 A1	14-08-2014	AU 2014214863 A1	24-09-2015
		CA 2899740 A1	14-08-2014
		EP 2953452 A1	16-12-2015
		HK 1218866 A1	17-03-2017
		KR 20150115775 A	14-10-2015
		RU 2015137173 A	13-03-2017
		SG 11201505713Y A	28-08-2015
		US 2014221625 A1	07-08-2014
		WO 2014124156 A1	14-08-2014
WO 2011020005 A1	17-02-2011	US 2011041196 A1	17-02-2011
		US 2011041197 A1	17-02-2011
		US 2013095565 A1	18-04-2013
		US 2013312128 A1	21-11-2013
		US 2013312129 A1	21-11-2013
		US 2014189900 A1	03-07-2014
		US 2014199761 A1	17-07-2014
		US 2015099296 A1	09-04-2015
		US 2015291978 A1	15-10-2015
		US 2016150767 A1	02-06-2016
		US 2016304903 A1	20-10-2016
		WO 2011020005 A1	17-02-2011
		WO 2011020014 A1	17-02-2011
WO 02066630 A1	29-08-2002	CA 2438390 A1	29-08-2002
		CY 1113964 T1	27-07-2016
		CY 1117254 T1	26-04-2017
		CZ 20032192 A3	17-03-2004
		DE 10010741 T1	21-08-2014
		DE 14163642 T1	09-10-2014
		DE 14172420 T1	04-12-2014
		DE 14172437 T1	27-11-2014
		DK 1360287 T3	08-10-2012
		DK 2264163 T3	26-10-2015
		DK 2787075 T3	27-02-2017
		EP 1360287 A1	12-11-2003
		EP 2264163 A2	22-12-2010
		EP 2767588 A1	20-08-2014
		EP 2786657 A2	08-10-2014
		EP 2787075 A1	08-10-2014
		EP 3085779 A1	26-10-2016
		EP 3085780 A1	26-10-2016
		ES 2391391 T3	23-11-2012
		ES 2556767 T3	20-01-2016
		ES 2608362 T3	10-04-2017
		HK 1057058 A1	18-01-2013
		HK 1146298 A1	29-04-2016
		HK 1198259 A1	20-03-2015
		HK 1198260 A1	20-03-2015
		HU 0303187 A2	29-12-2003
		JP 4412900 B2	10-02-2010
		JP 5345463 B2	20-11-2013
		JP 5692863 B2	01-04-2015
		JP 5805056 B2	04-11-2015
		JP 2004524841 A	19-08-2004
		JP 2009240331 A	22-10-2009
		JP 2012095670 A	24-05-2012
		JP 2013090631 A	16-05-2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/018166

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 2014176391 A	25-09-2014
		JP 2016189796 A	10-11-2016
		MX PA03007325 A	04-12-2003
		NZ 527629 A	24-03-2005
		PL 364281 A1	13-12-2004
		PT 1360287 E	06-12-2012
		PT 2264163 E	08-01-2016
		US 2002106629 A1	08-08-2002
		US 2004018626 A1	29-01-2004
		US 2007061900 A1	15-03-2007
		US 2011258710 A1	20-10-2011
		US 2011283376 A1	17-11-2011
		US 2013130388 A1	23-05-2013
		US 2013210137 A1	15-08-2013
		US 2014013457 A1	09-01-2014
		US 2014017229 A1	16-01-2014
		US 2014017238 A1	16-01-2014
		US 2014017781 A1	16-01-2014
		US 2014017782 A1	16-01-2014
		US 2014018522 A1	16-01-2014
		US 2014020124 A1	16-01-2014
		US 2014020125 A1	16-01-2014
		US 2014023637 A1	23-01-2014
		US 2014033336 A1	30-01-2014
		US 2014033337 A1	30-01-2014
		US 2014041068 A1	06-02-2014
		US 2014073010 A1	13-03-2014
		US 2016316731 A1	03-11-2016
		WO 02066630 A1	29-08-2002
		ZA 200306275 B	13-08-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C07K	***16/10***	***(2006.01)***	C07K	16/10		
C12N	***5/073***	***(2010.01)***	C12N	5/073		
C12N	*15/55*	*(2006.01)*	C12N	15/55		
C12N	*15/06*	*(2006.01)*	C12N	15/06	１００	
C07K	*7/06*	*(2006.01)*	C07K	7/06		
C07K	*7/08*	*(2006.01)*	C07K	7/08		
C07K	*14/16*	*(2006.01)*	C07K	14/16		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,RS,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(74)代理人 100152489
弁理士 中村 美樹
(72)発明者 キラツォス、クリストス
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード ７７７
(72)発明者 ムヒカ、アレクサンダー オー.
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード ７７７

Ｆターム(参考) 4B065 AA91X AB01 AC14 BA02 BA03 CA25 CA44
4H045 AA11 AA20 CA05 DA76 EA20 FA10 FA74 GA25