

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 2 年 6 月 18 日 (2020.6.18)

【公表番号】特表 2019-518454 (P2019-518454A)

【公表日】令和 1 年 7 月 4 日 (2019.7.4)

【年通号数】公開・登録公報 2019-026

【出願番号】特願 2018-560977 (P2018-560977)

【国際特許分類】

A 0 1 K	67/027	(2006.01)
C 1 2 N	15/06	(2006.01)
C 1 2 N	15/13	(2006.01)
C 1 2 N	15/62	(2006.01)
C 1 2 N	15/877	(2010.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	16/00	(2006.01)
C 0 7 K	16/46	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	5/20	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)

【F I】

A 0 1 K	67/027	Z N A
C 1 2 N	15/06	1 0 0
C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/62	
C 1 2 N	15/877	Z
C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 0 7 K	16/00	
C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/20	
C 1 2 P	21/08	

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 5 月 7 日 (2020.5.7)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質を産生するための方法であって、

(a) 目的の外来抗原に対する寛容が抑制された遺伝子組換え非ヒト動物を作製することであって、

(i) 非ヒト動物 1 細胞期胚にまたは 1 細胞期胚ではない非ヒト動物多能性細胞に、

(I) C a s 9 タンパク質または前記 C a s 9 タンパク質をコードする核酸と、

(I I) 第 1 のガイド R N A または前記第 1 のガイド R N A をコードする D N A であって、前記第 1 のガイド R N A は標的ゲノム遺伝子座内の第 1 のガイド R N A 認識配列にハイブリダイズし、

前記標的ゲノム遺伝子座は、前記目的の外来抗原と相同であるまたは前記目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含む、前記第 1 のガイド RNA または前記第 1 のガイド RNA をコードする DNA と、

(I I I) 第 2 のガイド RNA または前記第 2 のガイド RNA をコードする DNA であって、前記第 2 のガイド RNA は前記標的ゲノム遺伝子座内の第 2 のガイド RNA 認識配列にハイブリダイズする、前記第 2 のガイド RNA または前記第 2 のガイド RNA をコードする DNA と、

を導入することと、

(i i) 前記標的ゲノム遺伝子座で、改変非ヒト動物 1 細胞期胚、または二対立遺伝子改変を有する改変非ヒト動物多能性細胞を識別することであって、前記自己抗原の発現は排除される、前記識別することと、

(i i i) 前記改変非ヒト動物 1 細胞期胚または前記改変非ヒト動物多能性細胞から遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することであって、

前記標的ゲノム遺伝子座は、前記自己抗原の発現が排除されるように、前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物内における対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア内で改変される、前記作製することと、

を含む、前記作製することと、

(b) 工程 (a) で作製した前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を前記目的の外来抗原で免疫化することと、

(c) 前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を、前記目的の外来抗原に対する免疫応答を開始するのに十分な条件下に維持することと、

を含み、

前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物は、前記目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質を産生する、

前記方法。

【請求項 2】

前記 Cas 9 タンパク質が、二本鎖切断誘導活性を有し、前記 Cas 9 タンパク質および前記ガイド RNA が前記標的ゲノム遺伝子座内の異なる部位における対の二本鎖切断を生成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(I) 工程 (a) (i) における前記細胞または胚が、非ヒト動物 1 細胞期胚であり、工程 (a) (i i i) における遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することは、前記改変非ヒト動物 1 細胞期胚を代理母に移植して、前記自己抗原の発現が排除されるように、前記標的ゲノム遺伝子座が対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア内で改変された前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することを含むか、または

(I I) 工程 (a) (i) における前記細胞または胚が、前記非ヒト動物多能性細胞であり、前記非ヒト動物多能性細胞は前記非ヒト動物胚性幹細胞であり、工程 (a) (i i i) における遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することは、前記改変非ヒト動物多能性細胞を宿主胚へと導入し、前記宿主胚を代理母に妊娠させて、前記自己抗原の発現が排除されるように、前記標的ゲノム遺伝子座が対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア内で改変された前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することを含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 (a) (i) における前記細胞または胚が非ヒト動物多能性細胞であり、前記非ヒト動物多能性細胞が非ヒト動物胚性幹細胞である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫化した遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物から単離した B 細胞からハイブリドーマを作製することを更に含む、請求項 1 から請求項 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記免疫化した遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物から、前記目的の外来抗原に対する前

記抗原結合タンパク質のうちの1つにおける免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードする第1の核酸配列、及び/または、前記目的の外来抗原に対する前記抗原結合タンパク質のうちの1つにおける免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする第2の核酸配列を得ることを更に含み、

必要に応じて、前記第1の核酸配列及び/または前記第2の核酸配列は、前記遺伝子組換えF0世代非ヒト動物のリンパ球から、または、前記リンパ球から作製したハイブリドーマから得られ、

必要に応じて、前記遺伝子組換えF0世代非ヒト動物はヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、前記第1の核酸配列はヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードし、前記第2の核酸配列はヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする、

請求項1から請求項5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

(I) 前記遺伝子組換えF0世代非ヒト動物が産生した前記目的の外来抗原に対する前記抗原結合タンパク質は、前記標的ゲノム遺伝子座において野生型である対照非ヒト動物を前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記対照非ヒト動物が産生した抗原結合タンパク質と比較して、より高い力価を有する、および/または

(II) 前記標的ゲノム遺伝子座において野生型である対照非ヒト動物を前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記対照非ヒト動物が産生した抗原結合タンパク質と比較して、前記目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質のより多様なレパートリーは、前記遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記遺伝子組換えF0世代非ヒト動物により産生される、および/または

(III) 前記遺伝子組換えF0世代非ヒト動物が産生した前記目的の外来抗原に対する前記抗原結合タンパク質は、前記標的ゲノム遺伝子座において野生型である対照非ヒト動物を前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記対照非ヒト動物が産生した抗原結合タンパク質と比較して、より多様性が大きい重鎖V遺伝子セグメント及び/または軽鎖V遺伝子セグメントを使用する、および/または

(IV) 前記遺伝子組換えF0世代非ヒト動物が産生した前記目的の外来抗原に対する前記抗原結合タンパク質の一部は、前記自己抗原と交差反応する、

請求項1から請求項6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記第1のガイドRNA認識配列は、前記標的ゲノム遺伝子座内における前記第2のガイドRNA認識配列の5'であり、

工程(a)(ii)は、保持アッセイを実施して、5'領域及び前記第1のガイドRNA認識配列の約1kb内における及び/または3'領域及び前記第2のガイドRNA認識配列の約1kb内におけるコピー数が、2であることを確認することを含む、

請求項1から請求項7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記目的の外来抗原は、前記自己抗原のオルソログである、および/または前記目的の外来抗原は、ヒトタンパク質の全てまたは一部を含む、請求項1から請求項8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、1つまたは複数のヌクレオチドの挿入、1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、または、1つまたは複数のヌクレオチドの置換を含む、請求項1から請求項9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

前記標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、1つまたは複数のヌクレオチドの欠失を含み、前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の全てまたは一部の二対立遺伝子欠失を含み、必要に応じて、前記欠失は、ランダムな挿入及び欠失(インデル)を伴わない正確な欠失であり、必要に応じて、前記標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、約0.1kb~約200kbの二対立遺伝子欠失を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 1 2】

(I) 前記第 1 のガイド RNA 認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンを含むか、または、前記開始コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内であり、前記第 2 のガイド RNA 認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の終止コドンを含むか、または、前記終止コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内であり、前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の全てまたは一部の二対立遺伝子欠失を含むか、または

(I I) 第 1 と第 2 のガイド RNA 認識配列は異なり、前記第 1 と第 2 のガイド RNA 認識配列のそれぞれは、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンを含むか、または、前記開始コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内であり、前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の全てまたは一部の二対立遺伝子欠失を含む、

請求項 1 から請求項 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記導入工程 (a) (i) は、前記非ヒト動物多能性細胞または前記非ヒト動物 1 細胞期胚に、

(I V) 第 3 のガイド RNA もしくは前記第 3 のガイド RNA をコードする DNA であって、前記第 3 のガイド RNA が、前記標的ゲノム遺伝子座内の第 3 のガイド RNA 認識配列にハイブリダイズする、第 3 のガイド RNA もしくは前記第 3 のガイド RNA をコードする DNA、及び / または、

(V) 第 4 のガイド RNA もしくは前記第 4 のガイド RNA をコードする DNA であって、前記第 4 のガイド RNA が、前記標的ゲノム遺伝子座内の第 4 のガイド RNA 認識配列にハイブリダイズする、第 4 のガイド RNA もしくは前記第 4 のガイド RNA をコードする DNA

を導入することを更に含む、請求項 1 から請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

(I) 工程 (a) (i) における前記細胞または胚が非ヒト動物の多能性幹細胞であり、工程 (a) (i) が前記 Cas 9 タンパク質をコードする DNA、前記第 1 のガイド RNA をコードする前記 DNA および前記第 2 のガイド RNA をコードする前記 DNA を導入することを含み、必要に応じて、前記 Cas 9 タンパク質をコードする前記 DNA、前記第 1 のガイド RNA をコードする前記 DNA および前記第 2 のガイド RNA をコードする前記 DNA はそれぞれエレクトロポレーションまたはヌクレオフェクションにより前記非ヒト動物の多能性幹細胞に導入されるか、または

(I I) 工程 (a) (i) における前記細胞または胚が非ヒト動物 1 細胞期胚であり、工程 (a) (i) が前記 Cas 9 タンパク質をコードする RNA、前記第 1 のガイド RNA および前記第 2 のガイド RNA を導入することを含み、必要に応じて、前記 Cas 9 タンパク質をコードする前記 RNA、前記第 1 のガイド RNA および前記第 2 のガイド RNA はそれぞれ前核注入または細胞質注入により前記非ヒト動物 1 細胞期胚に導入される、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

外来修復テンプレートは、工程 (a) (i) で導入されない、請求項 1 から請求項 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記導入工程 (a) (i) は、工程 (a) (i) の前記細胞または胚が前記非ヒト動物 1 細胞期胚であり、前記外来修復テンプレートの長さが約 5 k b 以下である場合、前記非ヒト動物多能性細胞または前記非ヒト動物 1 細胞期胚に、前記標的ゲノム遺伝子座における 5' 標的配列にハイブリダイズする 5' ホモロジーアーム、及び前記標的ゲノム遺伝子座における 3' 標的配列にハイブリダイズする 3' ホモロジーアームを含む外来修復テンプレートを導入することを更に含む、

必要に応じて、前記標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、1つまたは複数のヌクレオチドの欠失を含み、好ましくは、前記欠失核酸配列は、前記5'標的配列と前記3'標的配列の間の前記核酸配列からなる、

請求項1から請求項14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記外来修復テンプレートは、前記5'ホモロジーアームと前記3'ホモロジーアームに隣接する核酸インサートを更に含み、

必要に応じて、前記核酸インサートは、前記標的ゲノム遺伝子座に対して相同またはオルソログスであり、前記標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、1つまたは複数のヌクレオチドの欠失を含み、前記核酸インサートは前記欠失核酸配列を置換する、

請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記外来修復テンプレートは、約50ヌクレオチド長～約1kb長であり、必要に応じて、前記外来修復テンプレートは、約80ヌクレオチド長～約200ヌクレオチド長であり、必要に応じて、前記外来修復テンプレートは一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドである、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

工程(a)(i)の前記細胞または胚は前記非ヒト動物多能性細胞であり、

(a)前記外来修復テンプレートは、少なくとも10kb長の大きな標的化ベクター(LTVEC)である、または、

(b)前記外来修復テンプレートはLTVECであり、前記LTVECの前記5'ホモロジーアームと前記3'ホモロジーアームの総合計は少なくとも10kb長である、

請求項16または17に記載の方法。

【請求項20】

前記非ヒト動物はヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含む、請求項1から請求項19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記非ヒト動物はげっ歯類であり、必要に応じて、前記げっ歯類はラットまたはマウスである、請求項1から請求項20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記げっ歯類はマウスであり、必要に応じて、前記マウス系統はBALB/c系統を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記マウス系統は、BALB/c系統、C57BL/6系統及び129系統を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記マウス系統は、50% BALB/c、25% C57BL/6、及び25% 129であり、必要に応じて、前記マウスのMHCハプロタイプはMHC^{b/d}である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記マウスは、内在マウス免疫グロブリン遺伝子座に挿入されたヒト非再構成可変領域遺伝子セグメントをその生殖細胞系内に含み、前記ヒト非再構成可変領域遺伝子セグメントは重鎖遺伝子セグメントであり、前記マウス免疫グロブリン遺伝子座は重鎖遺伝子座であり、及び/または、前記ヒト非再構成可変領域遺伝子セグメントはカッパまたはラムダ軽鎖セグメントであり、前記マウス免疫グロブリン遺伝子座は軽鎖遺伝子座である、請求項22から請求項24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記マウスはマウス定常領域遺伝子と機能的に連結したヒト非再構成可変領域遺伝子セグメントをその生殖細胞系内に含み、前記マウスはヒト定常領域遺伝子を欠き、前記マウス定常領域遺伝子は内在マウス免疫グロブリン遺伝子座に存在し、

必要に応じて、前記マウスは

(I) ヒト免疫グロブリン重鎖 V、D 及び J 遺伝子セグメントの挿入を含むハイブリッド重鎖遺伝子座であって、

前記ヒト重鎖免疫グロブリン V、D 及び J 遺伝子セグメントは、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子と機能的に連結し、前記マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子は内在マウス免疫グロブリン遺伝子座に存在する、前記ハイブリッド重鎖遺伝子座と、

(I I) ヒト免疫グロブリン軽鎖 V 及び J 遺伝子セグメントの挿入を含むハイブリッド軽鎖遺伝子座であって、

前記ヒト V 及び J 遺伝子セグメントは、マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列と機能的に連結する、前記ハイブリッド軽鎖遺伝子座と、

を含み、

(I) は再構成されて、マウス定常領域と機能的に連結したヒト可変領域を含むハイブリッド重鎖配列を形成し、(I I) は再構成されて、マウス定常領域と機能的に連結したヒト可変領域を含むハイブリッド軽鎖配列を形成し、前記マウスは、ヒト可変領域及びヒト定常領域を含む抗体を形成することができない、

請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記マウスは、マウス軽鎖定常領域と機能的に連結した 1 つ以下または 2 つ以下の再構成ヒト軽鎖 V / J 配列を含むヒト化免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座をその生殖細胞系内に含み、前記マウスは、マウス重鎖定常領域遺伝子と機能的に連結した少なくとも 1 つの非再構成ヒト V セグメント、少なくとも 1 つの非再構成ヒト D セグメント、及び少なくとも 1 つの非再構成ヒト J セグメントを含むヒト化免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座を更に含み、

必要に応じて、前記マウスは、ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座及びヒト化軽鎖免疫グロブリン可変遺伝子座を含み、前記マウスは単一軽鎖を発現する、

請求項 2 2 から請求項 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記マウスは、

(a) 免疫グロブリン軽鎖のヒト V_L ドメインをコードする単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) であって、

前記単一再構成ヒト V_L / J_L 領域は、ヒト V_L 1 - 3 9 / J_L 5 遺伝子セグメントまたはヒト V_L 3 - 2 0 / J_L 1 遺伝子セグメントから選択される、前記単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) と、

(b) 内在重鎖可変 (V_H) 遺伝子セグメントの 1 つまたは複数のヒト V_H 遺伝子セグメントへの置換であって、

前記ヒト V_H 遺伝子セグメントは内在重鎖定常 (C_H) 領域遺伝子と機能的に連結し、前記ヒト V_H 遺伝子セグメントは、ヒト / マウスキメラ重鎖遺伝子を再構成及び形成することができる、前記置換と、

を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記マウスは抗体の集団を発現し、前記マウスの生殖細胞系は、再構成ヒト生殖細胞系カッパ軽鎖可変領域遺伝子である単一免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域遺伝子のみを含み、

前記マウスは、1 つのコピーのみを含有するという点で前記単一免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域遺伝子にヘテロ接合性であるか、または、2 つのコピーを含有するという点で前記単一免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域遺伝子にホモ接合性であるかのいずれかであり、前記マウスは、

(a) 前記集団のそれぞれの免疫グロブリンカッパ軽鎖は、前記再構成ヒト生殖細胞系カッパ軽鎖可変領域遺伝子またはその体細胞変異体によりコードされる軽鎖可変ドメインを含み、

(b) 前記集団は、その軽鎖可変ドメインが前記再構成ヒト生殖細胞系カッパ軽鎖可変領域遺伝子によりコードされる前記免疫グロブリンカッパ軽鎖を含む抗体、及び、その軽鎖可変ドメインが前記その体細胞変異体によりコードされる前記免疫グロブリンカッパ軽鎖を含む抗体を含み、

(c) 前記マウスは、前記免疫グロブリンカッパ軽鎖と成功裏にペアとなり前記集団の前記抗体を形成する体細胞変異高親和性重鎖の多様な集団を産生する、

ために、

活性な親和性成熟を特徴とする、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記マウスは、その生殖細胞系内において、

(a)

(i) 単一ヒト生殖細胞系 V 配列であって、

前記単一ヒト生殖細胞系 V 配列は配列番号： 1 4 8 または配列番号： 1 4 9 内に存在する、前記単一ヒト生殖細胞系 V 配列と、

(i i) 単一ヒト生殖細胞系 J 配列であって、

前記再構成 V / J 配列は前記内在マウス 定常領域と機能的に連結する、前記単一ヒト生殖細胞系 J 配列と、

を含む再構成 V / J 配列の内在マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に、

(b) 複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントの内在マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座における挿入であって、

前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは内在マウス免疫グロブリン重鎖定常領域と機能的に連結し、前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは、再構成ヒト / マウスキメラ免疫グロブリン重鎖遺伝子を再構成及び形成することができる、前記挿入に、

ヘテロ接合性またはホモ接合性である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記マウスは免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含み、前記改変は内在 A D A M 6 機能を抑制または排除し、

前記マウスは、マウス A D A M 6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントをコードする異所性核酸配列を含み、前記 A D A M 6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントは、雄マウスにおいて機能しており、

前記マウス A D A M 6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントをコードする前記異所性核酸配列は、前記ヒト重鎖可変領域遺伝子座に存在する、請求項 2 5 から請求項 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記非ヒト動物は少なくとも部分的に B A L B / c 系統に由来するマウスであり、前記マウスはヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、

前記目的の外来抗原は、前記自己抗原に対してオルソロガスなヒトタンパク質の全てまたは一部であり、

(I) 前記第 1 のガイド R N A 認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンを含むか、または、前記開始コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内であり、前記第 2 のガイド R N A 認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の終止コドンを含むか、または、前記終止コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内であり、

前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の全てまたは一部の二対立遺伝子欠失を含み、それにより前記自己抗原の発現は排除されるか、または

(I I) 前記第 1 および第 2 のガイド R N A 認識配列は異なり、前記第 1 および第 2 のガイド R N A 認識配列のそれぞれが前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンを

含むか、または、前記開始コドンの約 10、20、30、40、50、100、200、300、400、500 または 1,000 ヌクレオチド以内であり、前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の前記開始コドンの二対立遺伝子破壊を含み、それにより前記自己抗原の発現は排除される、

請求項 1 から請求項 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記マウスは、

(a) マウス A D A M 6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントをコードする異所性核酸配列であって、

前記 A D A M 6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントは、雄マウスにおいて機能している、前記異所性核酸配列と、

(b) ヒト免疫グロブリン重鎖 V、D 及び J 遺伝子セグメントの挿入を含むハイブリッド重鎖遺伝子座であって、

前記ヒト重鎖免疫グロブリン V、D 及び J 遺伝子セグメントは、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子と機能的に連結し、前記マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子は内在マウス免疫グロブリン遺伝子座に存在する、前記ハイブリッド重鎖遺伝子座と、

(c) ヒト免疫グロブリン軽鎖 V 及び J 遺伝子セグメントの挿入を含むハイブリッド軽鎖遺伝子座であって、

前記ヒト V 及び J 遺伝子セグメントは、マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列と機能的に連結する、前記ハイブリッド軽鎖遺伝子座と、
を含み、

(b) は再構成されて、マウス定常領域と機能的に連結したヒト可変領域を含むハイブリッド重鎖配列を形成し、(c) は再構成されて、マウス定常領域と機能的に連結したヒト可変領域を含むハイブリッド軽鎖配列を形成し、前記マウスは、ヒト可変領域及びヒト定常領域を含む抗体を形成することができない、

請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記マウスは、その生殖細胞系内において、

(a) マウス A D A M 6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントをコードする異所性核酸配列であって、

前記 A D A M 6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントは、雄マウスにおいて機能している、前記異所性核酸配列に、

(b)

(i) 単一ヒト生殖細胞系 V 配列であって、

前記単一ヒト生殖細胞系 V 配列は配列番号：148 または配列番号：149 内に存在する、前記単一ヒト生殖細胞系 V 配列と、

(ii) 単一ヒト生殖細胞系 J 配列であって、

前記再構成 V / J 配列は前記内在マウス 定常領域と機能的に連結する、前記単一ヒト生殖細胞系 J 配列と、

を含む再構成 V / J 配列の内在マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に、

(c) 複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントの内在マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座における挿入であって、

前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは内在マウス免疫グロブリン重鎖定常領域と機能的に連結し、前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは、再構成ヒト / マウスキメラ免疫グロブリン重鎖遺伝子を再構成及び形成することができる、前記挿入に、

ヘテロ接合性またはホモ接合性である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 から請求項 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記非ヒト動物多能性

細胞はハイブリッド細胞であり、または、前記非ヒト動物 1 細胞期胚はハイブリッド 1 細胞期胚であり、前記方法は、

(a ') 前記標的ゲノム遺伝子座内の対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペアの前記配列を比較して、前記標的ゲノム遺伝子座内の標的領域を選択した後に、前記標的ゲノム遺伝子座の残部の全てまたは一部と比較して、対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア間のより高いパーセンテージの配列同一性を有する前記標的領域に基づいて前記接触工程 (a) を実施すること、を更に含み、前記標的領域は、

前記第 1 のガイド RNA 認識配列、及び、前記第 1 のガイド RNA 認識配列の 5 ' 側、3 ' 側または両側上にある少なくとも 10 b p、20 b p、30 b p、40 b p、50 b p、100 b p、200 b p、300 b p、400 b p、500 b p、600 b p、700 b p、800 b p、900 b p、1 k b、2 k b、3 k b、4 k b、5 k b、6 k b、7 k b、8 k b、9 k b または 10 k b の隣接配列、及び / または、

前記第 2 のガイド RNA 認識配列、及び、前記第 2 のガイド RNA 認識配列の 5 ' 側、3 ' 側または両側上にある少なくとも 10 b p、20 b p、30 b p、40 b p、50 b p、100 b p、200 b p、300 b p、400 b p、500 b p、600 b p、700 b p、800 b p、900 b p、1 k b、2 k b、3 k b、4 k b、5 k b、6 k b、7 k b、8 k b、9 k b または 10 k b の隣接配列、

を含み、

必要に応じて、前記標的領域は、前記標的ゲノム遺伝子座の残部と比較して、対応する第 1 と第 2 の前記ペア間のより高いパーセンテージの配列同一性を有し、

必要に応じて、前記標的領域は、対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア間の少なくとも 99 . 9 % の配列同一性を有し、前記標的ゲノム遺伝子座の残部は、対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア間の 99 . 8 % 以下の配列同一性を有する、
前記方法。

【請求項 36】

目的の外来抗原に対する寛容が抑制された遺伝子組換え非ヒト動物を作製するための方法であって、

(a) 非ヒト動物 1 細胞期胚にまたは 1 細胞期胚ではない非ヒト動物多能性細胞に、

(i) C a s 9 タンパク質または前記 C a s 9 タンパク質をコードする核酸と、

(i i) 第 1 のガイド RNA または前記第 1 のガイド RNA をコードする DNA であって、前記第 1 のガイド RNA は標的ゲノム遺伝子座内の第 1 のガイド RNA 認識配列にハイブリダイズし、

前記標的ゲノム遺伝子座は、前記目的の外来抗原と相同であるまたは前記目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含む、前記第 1 のガイド RNA または前記第 1 のガイド RNA をコードする DNA と、

(i i i) 第 2 のガイド RNA または前記第 2 のガイド RNA をコードする DNA であって、前記第 2 のガイド RNA は前記標的ゲノム遺伝子座内の第 2 のガイド RNA 認識配列にハイブリダイズする第 2 のガイド RNA または前記第 2 のガイド RNA をコードする DNA と、

を導入することと、

(b) 前記標的ゲノム遺伝子座で、改変非ヒト動物 1 細胞期胚、または二対立遺伝子改変を有する改変非ヒト動物多能性細胞を識別することであって、前記自己抗原の発現は排除される、前記識別することと、

(c) 前記改変非ヒト動物 1 細胞期胚または前記改変非ヒト動物多能性細胞から遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することであって、

前記標的ゲノム遺伝子座は、前記自己抗原の発現が排除されるように、前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物内における対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア内で改変される、前記作製することと、
を含む、前記方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0478

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0478】

合計、192のNeo+クローン、128のHyg+クローン、及び16のNeo+/Hyg+クローンをスクリーニングした。LTVECと、4つのsgRNAによりガイドされるCas9エンドヌクレアーゼと組み合わせることにより、一部ヘテロ接合性標的クローン、ヘミ接合性標的クローン、二対立遺伝子崩壊クローン、NHEJ欠失を有するヘテロ接合性標的クローン、二対立遺伝子NHEJ欠失を有するクローン、及びNHEJ欠失有するヘテロ接合性崩壊クローン、を生成した。しかしながら、ホモ接合性標的クローンは観察されなかった。このことは、相同染色体対内のそれぞれの染色体上における独立した標的化事象ではなく、局所的な遺伝子変換事象が、その他の実験で観察されたホモ接合性標的クローンに影響を及ぼすことを示唆している。相同染色体対内のそれぞれの染色体上における独立した標的化事象が、その他の実験で観察されたホモ接合性標的クローンに影響を及ぼす場合、相同染色体対内の2つの染色体のそれぞれのために特に調整された2つの標的化ベクターを使用すると、染色体のそれぞれのために調整された標的化ベクターが5'及び3'標的配列内の対立遺伝子配列変異に向かうために、5'及び3'ホモロジーアームの5'及び3'標的配列内の高いパーセンテージの対立遺伝子配列変異にもかかわらずホモ接合性標的クローンを生成することが予想された。しかしながら、2つのLTVECを使用しても、ホモ接合性標的クローンは一切生成されなかった。このことは、図27に示すようなホモ接合性標的改変の考えまたは局所的な遺伝子変換事象により生成された考えを更に裏付けるものである。本発明者らは、極性遺伝子変換よりも高い比率で標的欠失及び挿入の両側に局所的なヘテロ接合性の喪失を観察した。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質を産生するための方法であって、

(a) 目的の外来抗原に対する寛容が抑制された遺伝子組換え非ヒト動物を作製することであって、

(i) 非ヒト動物1細胞期胚にまたは1細胞期胚ではない非ヒト動物多能性細胞に、

(I) Cas9タンパク質と、

(II) 標的ゲノム遺伝子座内の第1のガイドRNA認識配列にハイブリダイズする第1のガイドRNAであって、

前記標的ゲノム遺伝子座は、前記目的の外来抗原と相同であるまたは前記目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含む、前記第1のガイドRNAと、

(III) 前記標的ゲノム遺伝子座内の第2のガイドRNA認識配列にハイブリダイズする第2のガイドRNAと、

を導入することであって、

前記標的ゲノム遺伝子座は、対応する第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変されて、改変非ヒト動物1細胞期胚、または二対立遺伝子改変を有する改変非ヒト動物多能性細胞を産生し、前記自己抗原の発現は排除される、前記導入することと、

(ii) 前記改変非ヒト動物1細胞期胚または前記改変非ヒト動物多能性細胞から遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を作製することであって、

前記標的ゲノム遺伝子座は、前記自己抗原の発現が排除されるように、前記遺伝子組換えF0世代非ヒト動物内における対応する第1の染色体と第2の染色体の前記ペア内で改変される、前記作製することと、

を含む、前記作製することと、

(b) 工程(a)で作製した前記遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を前記目的の外来抗

原で免疫化することと、

(c) 前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を、前記目的の外来抗原に対する免疫応答を開始するのに十分な条件下に維持することと、

を含み、

前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物は、前記目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質を産生する、

前記方法。

(項目 2)

工程 (a) (i) の前記細胞は前記非ヒト動物の多能性幹細胞であり、工程 (a) (i i) における前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物の前記作製は、

(I) 前記改変非ヒト動物多能性細胞を宿主胚に導入することと、

(I I) 前記宿主胚を代理母に移植して、前記自己抗原の発現が排除されるように、前記標的ゲノム遺伝子座が対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア内で改変された前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することと、

を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記多能性細胞は胚性幹 (E S) 細胞である、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

工程 (a) (i) の前記細胞は前記非ヒト動物 1 細胞期胚であり、工程 (a) (i i) における前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物の前記作製は、前記改変非ヒト動物 1 細胞期胚を代理母に移植して、前記自己抗原の発現が排除されるように、前記標的ゲノム遺伝子座が対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア内で改変された前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記免疫化した遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物から単離した B 細胞からハイブリドーマを作製することを更に含む、項目 1 から項目 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6)

前記免疫化した遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物から、前記目的の外来抗原に対する前記抗原結合タンパク質のうちの 1 つにおける免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードする第 1 の核酸配列、及び / または、前記目的の外来抗原に対する前記抗原結合タンパク質のうちの 1 つにおける免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする第 2 の核酸配列を得ることを更に含む、項目 1 から項目 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7)

前記第 1 の核酸配列及び / または前記第 2 の核酸配列は、前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物のリンパ球から、または、前記リンパ球から作製したハイブリドーマから得られる、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物はヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、前記第 1 の核酸配列はヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードし、前記第 2 の核酸配列はヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする、項目 6 または項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物が産生した前記目的の外来抗原に対する前記抗原結合タンパク質は、前記標的ゲノム遺伝子座において野生型である対照非ヒト動物を前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記対照非ヒト動物が産生した抗原結合タンパク質と比較して、より高い力価を有する、項目 1 から項目 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 0)

前記標的ゲノム遺伝子座において野生型である対照非ヒト動物を前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記対照非ヒト動物が産生した抗原結合タンパク質と比較して、前記目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質のより多様なレパートリーは、前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記遺伝子組換え F 0 世代非

ヒト動物により産生される、項目 1 から項目 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 1)

前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物が産生した前記目的の外来抗原に対する前記抗原結合タンパク質は、前記標的ゲノム遺伝子座において野生型である対照非ヒト動物を前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記対照非ヒト動物が産生した抗原結合タンパク質と比較して、より多様性が大きい重鎖 V 遺伝子セグメント及び / または軽鎖 V 遺伝子セグメントを使用する、項目 1 から項目 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 2)

前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物が産生した前記目的の外来抗原に対する前記抗原結合タンパク質の一部は、前記自己抗原と交差反応する、項目 1 から項目 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 3)

前記第 1 のガイド RNA 認識配列は、前記標的ゲノム遺伝子座内における前記第 2 のガイド RNA 認識配列の 5' であり、

工程 (a) (i) は、保持アッセイを実施して、5' 領域及び前記第 1 のガイド RNA 認識配列の約 1 k b 内における及び / または 3' 領域及び前記第 2 のガイド RNA 認識配列の約 1 k b 内におけるコピー数が、2 であることを確認することを更に含む、
項目 1 から項目 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 4)

前記目的の外来抗原は、前記自己抗原のオルソログである、項目 1 から項目 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 5)

前記目的の外来抗原は、ヒトタンパク質の全てまたは一部を含む、項目 1 から項目 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6)

前記標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、1 つまたは複数のヌクレオチドの挿入、1 つまたは複数のヌクレオチドの欠失、または、1 つまたは複数のヌクレオチドの置換を含む、項目 1 から項目 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 7)

前記標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、1 つまたは複数のヌクレオチドの欠失を含む、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記欠失は、ランダムな挿入及び欠失 (インデル) を伴わない正確な欠失である、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記第 1 のガイド RNA 認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンを含むか、または、前記開始コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内であり、前記第 2 のガイド RNA 認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の終止コドンを含むか、または、前記終止コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内である、項目 1 から項目 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 0)

前記第 1 と第 2 のガイド RNA 認識配列は異なり、前記第 1 と第 2 のガイド RNA 認識配列のそれぞれは、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンを含むか、または、前記開始コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内である、項目 1 から項目 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 1)

前記標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、約 0.1 k b ~ 約 2 0 0 k b の二対立遺伝子

欠失を含む、項目 1 から項目 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の全てまたは一部の二対立遺伝子欠失を含む、項目 1 から項目 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンの二対立遺伝子破壊を含む、項目 1 から項目 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 4)

前記導入工程 (a) (i) は、前記非ヒト動物多能性細胞または前記非ヒト動物 1 細胞期胚に、

(i v) 前記標的ゲノム遺伝子座内の第 3 のガイド RNA 認識配列にハイブリダイズする第 3 のガイド RNA、及び / または、

(v) 前記標的ゲノム遺伝子座内の第 4 のガイド RNA 認識配列にハイブリダイズする第 4 のガイド RNA、

を導入することを更に含む、項目 1 から項目 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 5)

工程 (a) (i) の前記細胞は前記非ヒト動物の多能性幹細胞であり、前記 Cas9 タンパク質、前記第 1 のガイド RNA 及び前記第 2 のガイド RNA はそれぞれ、DNA の形態で前記非ヒト動物の多能性幹細胞に導入される、項目 1 から項目 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 6)

工程 (a) (i) の前記細胞は前記非ヒト動物の多能性幹細胞であり、前記 Cas9 タンパク質、前記第 1 のガイド RNA 及び前記第 2 のガイド RNA はそれぞれ、エレクトロポレーションまたはヌクレオフェクションにより前記非ヒト動物の多能性幹細胞に導入される、項目 1 から項目 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 7)

工程 (a) (i) の前記細胞は前記非ヒト動物 1 細胞期胚であり、前記 Cas9 タンパク質、前記第 1 のガイド RNA 及び前記第 2 のガイド RNA はそれぞれ、RNA の形態で前記非ヒト動物 1 細胞期胚に導入される、項目 1 から項目 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 8)

工程 (a) (i) の前記細胞は前記非ヒト動物 1 細胞期胚であり、前記 Cas9 タンパク質、前記第 1 のガイド RNA 及び前記第 2 のガイド RNA は、前核注入または細胞質注入により前記非ヒト動物 1 細胞期胚に導入される、項目 1 から項目 2 4 及び項目 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 9)

外来修復テンプレートは、工程 (a) (i) で導入されない、項目 1 から項目 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 0)

前記導入工程 (a) (i) は、工程 (a) (i) の前記細胞が前記非ヒト動物 1 細胞期胚であり、前記外来修復テンプレートの長さが約 5 k b 以下である場合、前記非ヒト動物多能性細胞または前記非ヒト動物 1 細胞期胚に、前記標的ゲノム遺伝子座における 5 ' 標的配列にハイブリダイズする 5 ' ホモロジーアーム、及び前記標的ゲノム遺伝子座における 3 ' 標的配列にハイブリダイズする 3 ' ホモロジーアームを含む外来修復テンプレートを導入することを更に含む、項目 1 から項目 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 1)

前記外来修復テンプレートは、前記 5 ' ホモロジーアームと前記 3 ' ホモロジーアームに隣接する核酸インサートを更に含む、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記核酸インサートは、前記標的ゲノム遺伝子座に対して相同またはオルソログスであ

る、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記外来修復テンプレートは、約 5 0 ヌクレオチド長～約 1 k b 長である、項目 3 0 から項目 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記外来修復テンプレートは、約 8 0 ヌクレオチド長～約 2 0 0 ヌクレオチド長である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記外来修復テンプレートは一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドである、項目 3 0 から項目 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 6)

工程 (a) (i) の前記細胞は前記非ヒト動物多能性細胞であり、

(a) 前記外来修復テンプレートは、少なくとも 1 0 k b 長の大きな標的化ベクター (L T V E C) である、または、

(b) 前記外来修復テンプレートは L T V E C であり、前記 L T V E C の前記 5 ' ホモロジーアームと前記 3 ' ホモロジーアームの総合計は少なくとも 1 0 k b 長である、項目 3 0 から項目 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 7)

前記標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、1 つまたは複数のヌクレオチドの欠失を含み、

前記欠失核酸配列は、前記 5 ' 標的配列と前記 3 ' 標的配列の間の前記核酸配列からなる、

項目 3 0 から項目 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 8)

前記外来修復テンプレートは、前記 5 ' ホモロジーアームと前記 3 ' ホモロジーアームに隣接する核酸インサートを含み、

前記核酸インサートは、前記欠失核酸配列に対して相同またはオルソログスであり、

前記標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、1 つまたは複数のヌクレオチドの欠失を含み、

前記核酸インサートは前記欠失核酸配列を置換する、

項目 3 0 から項目 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 9)

前記非ヒト動物はヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含む、項目 1 から項目 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 0)

前記非ヒト動物はげっ歯類である、項目 1 から項目 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 1)

前記げっ歯類はマウスである、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記マウス系統は B A L B / c 系統を含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記マウス系統は、B A L B / c 系統、C 5 7 B L / 6 系統及び 1 2 9 系統を含む、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記マウス系統は、5 0 % B A L B / c 、 2 5 % C 5 7 B L / 6 、及び 2 5 % 1 2 9 である、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記マウスの M H C ハプロタイプは M H C ^b / ^d である、項目 4 1 から項目 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記マウスは、内在マウス免疫グロブリン遺伝子座に挿入されたヒト非再構成可変領域遺伝子セグメントをその生殖細胞系内に含む、項目 4 1 から項目 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 7)

前記ヒト非再構成可変領域遺伝子セグメントは重鎖遺伝子セグメントであり、前記マウス免疫グロブリン遺伝子座は重鎖遺伝子座であり、及び/または、前記ヒト非再構成可変領域遺伝子セグメントはカッパまたはラムダ軽鎖セグメントであり、前記マウス免疫グロブリン遺伝子座は軽鎖遺伝子座である、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記マウスはマウス定常領域遺伝子と機能的に連結したヒト非再構成可変領域遺伝子セグメントをその生殖細胞系内に含み、前記マウスはヒト定常領域遺伝子を欠き、前記マウス定常領域遺伝子は内在マウス免疫グロブリン遺伝子座に存在する、項目 4 6 または項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記マウスは、

(a) ヒト免疫グロブリン重鎖 V、D 及び J 遺伝子セグメントの挿入を含むハイブリッド重鎖遺伝子座であって、

前記ヒト重鎖免疫グロブリン V、D 及び J 遺伝子セグメントは、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子と機能的に連結し、前記マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子は内在マウス免疫グロブリン遺伝子座に存在する、前記ハイブリッド重鎖遺伝子座と、

(b) ヒト免疫グロブリン軽鎖 V 及び J 遺伝子セグメントの挿入を含むハイブリッド軽鎖遺伝子座であって、

前記ヒト V 及び J 遺伝子セグメントは、マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列と機能的に連結する、前記ハイブリッド軽鎖遺伝子座と、
を含み、

(a) は再構成されて、マウス定常領域と機能的に連結したヒト可変領域を含むハイブリッド重鎖配列を形成し、(b) は再構成されて、マウス定常領域と機能的に連結したヒト可変領域を含むハイブリッド軽鎖配列を形成し、前記マウスは、ヒト可変領域及びヒト定常領域を含む抗体を形成することができない、
項目 4 6 から項目 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 0)

前記マウスは、マウス軽鎖定常領域と機能的に連結した 1 つ以下または 2 つ以下の再構成ヒト軽鎖 V / J 配列を含むヒト化免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座をその生殖細胞系内に含み、前記マウスは、マウス重鎖定常領域遺伝子と機能的に連結した少なくとも 1 つの非再構成ヒト V セグメント、少なくとも 1 つの非再構成ヒト D セグメント、及び少なくとも 1 つの非再構成ヒト J セグメントを含むヒト化免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座を更に含む、項目 4 1 から項目 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 1)

前記マウスは、ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座及びヒト化軽鎖免疫グロブリン可変遺伝子座を含み、前記マウスは単一軽鎖を発現する、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記マウスは、

(a) 免疫グロブリン軽鎖のヒト V_L ドメインをコードする単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) であって、

前記単一再構成ヒト V_L / J_L 領域は、ヒト V_L 1 - 39 / J_L 5 遺伝子セグメントまたはヒト V_L 3 - 20 / J_L 1 遺伝子セグメントから選択される、前記単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) と、

(b) 内在重鎖可変 (V_H) 遺伝子セグメントの 1 つまたは複数のヒト V_H 遺伝子セグメントへの置換であって、

前記ヒト V_H 遺伝子セグメントは内在重鎖定常 (C_H) 領域遺伝子と機能的に連結し、

前記ヒト V_H 遺伝子セグメントは、ヒト/マウスキメラ重鎖遺伝子を再構成及び形成することができる、前記置換と、
を含む、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

前記マウスは抗体の集団を発現し、前記マウスの生殖細胞系は、再構成ヒト生殖細胞系カッパ軽鎖可変領域遺伝子である単一免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域遺伝子のみを含み、

前記マウスは、1つのコピーのみを含有するという点で前記単一免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域遺伝子にヘテロ接合性であるか、または、2つのコピーを含有するという点で前記単一免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域遺伝子にホモ接合性であるかのいずれかであり、前記マウスは、

(i) 前記集団のそれぞれの免疫グロブリンカッパ軽鎖は、前記再構成ヒト生殖細胞系カッパ軽鎖可変領域遺伝子またはその体細胞変異体によりコードされる軽鎖可変ドメインを含み、

(ii) 前記集団は、その軽鎖可変ドメインが前記再構成ヒト生殖細胞系カッパ軽鎖可変領域遺伝子によりコードされる前記免疫グロブリンカッパ軽鎖を含む抗体、及び、その軽鎖可変ドメインが前記その体細胞変異体によりコードされる前記免疫グロブリンカッパ軽鎖を含む抗体を含み、

(iii) 前記マウスは、前記免疫グロブリンカッパ軽鎖と成功裏にペアとなり前記集団の前記抗体を形成する体細胞変異高親和性重鎖の多様な集団を産生する、
ために、

活性な親和性成熟を特徴とする、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記マウスは、その生殖細胞系内において、

(a)

(i) 単一ヒト生殖細胞系 V 配列であって、

前記単一ヒト生殖細胞系 V 配列は配列番号：148または配列番号：149内に存在する、前記単一ヒト生殖細胞系 V 配列と、

(ii) 単一ヒト生殖細胞系 J 配列であって、

前記再構成 V/J 配列は前記内在マウス 定常領域と機能的に連結する、前記単一ヒト生殖細胞系 J 配列と、

を含む再構成 V/J 配列の内在マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に、

(b) 複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントの内在マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座における挿入であって、

前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは内在マウス免疫グロブリン重鎖定常領域と機能的に連結し、前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは、再構成ヒト/マウスキメラ免疫グロブリン重鎖遺伝子を再構成及び形成することができる、前記挿入に、

ヘテロ接合性またはホモ接合性である、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記マウスは免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含み、前記改変は内在 ADAM6 機能を抑制または排除し、

前記マウスは、マウス ADAM6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントをコードする異所性核酸配列を含み、前記 ADAM6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントは、雄マウスにおいて機能しており、

前記マウス ADAM6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントをコードする前記異所性核酸配列は、前記ヒト重鎖可変領域遺伝子座に存在する、
項目 4 6 から項目 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 6)

前記非ヒト動物は少なくとも部分的にB A L B / c系統に由来するマウスであり、前記マウスはヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、

前記目的の外来抗原は、前記自己抗原に対してオルソロガスなヒトタンパク質の全てまたは一部であり、

前記第1のガイドRNA認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンを含むか、または、前記開始コドンの約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500または1,000ヌクレオチド以内であり、前記第2のガイドRNA認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の終止コドンを含むか、または、前記終止コドンの約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500または1,000ヌクレオチド以内であり、

前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の全てまたは一部の二対立遺伝子欠失を含み、それにより前記自己抗原の発現は排除される、

項目1から項目55のいずれか1項に記載の方法。

(項目57)

前記非ヒト動物は少なくとも部分的にB A L B / c系統に由来するマウスであり、前記マウスはヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、

前記目的の外来抗原は、前記自己抗原に対してオルソロガスなヒトタンパク質の全てまたは一部であり、

前記第1のガイドRNA認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンを含み、前記第2のガイドRNA認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の終止コドンを含むか、または、前記開始コドンの約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500または1,000ヌクレオチド以内であり、

前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンの二対立遺伝子破壊を含み、それにより前記自己抗原の発現は排除される、

項目1から項目55のいずれか1項に記載の方法。

(項目58)

前記マウスは、

(a) マウスADAM6タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントをコードする異所性核酸配列であって、

前記ADAM6タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントは、雄マウスにおいて機能している、前記異所性核酸配列と、

(b) ヒト免疫グロブリン重鎖V、D及びJ遺伝子セグメントの挿入を含むハイブリッド重鎖遺伝子座であって、

前記ヒト重鎖免疫グロブリンV、D及びJ遺伝子セグメントは、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子と機能的に連結し、前記マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子は内在マウス免疫グロブリン遺伝子座に存在する、前記ハイブリッド重鎖遺伝子座と、

(c) ヒト免疫グロブリン軽鎖V及びJ遺伝子セグメントの挿入を含むハイブリッド軽鎖遺伝子座であって、

前記ヒトV及びJ遺伝子セグメントは、マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列と機能的に連結する、前記ハイブリッド軽鎖遺伝子座と、
を含み、

(b) は再構成されて、マウス定常領域と機能的に連結したヒト可変領域を含むハイブリッド重鎖配列を形成し、(c) は再構成されて、マウス定常領域と機能的に連結したヒト可変領域を含むハイブリッド軽鎖配列を形成し、前記マウスは、ヒト可変領域及びヒト定常領域を含む抗体を形成することができない、

項目56または項目57に記載の方法。

(項目59)

前記マウスは、その生殖細胞系内において、

(a) マウスADAM6タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントをコードする異所性核酸配列であって、

前記 A D A M 6 タンパク質、そのオルソログ、その相同体、またはそのフラグメントは、雄マウスにおいて機能している、前記異所性核酸配列に、

(b)

(i) 単一ヒト生殖細胞系 V 配列であって、

前記単一ヒト生殖細胞系 V 配列は配列番号： 1 4 8 または配列番号： 1 4 9 内に存在する、前記単一ヒト生殖細胞系 V 配列と、

(i i) 単一ヒト生殖細胞系 J 配列であって、

前記再構成 V / J 配列は前記内在マウス 定常領域と機能的に連結する、前記単一ヒト生殖細胞系 J 配列と、

を含む再構成 V / J 配列の内在マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に、

(c) 複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントの内在マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座における挿入であって、

前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは内在マウス免疫グロブリン重鎖定常領域と機能的に連結し、前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは、再構成ヒト / マウスキメラ免疫グロブリン重鎖遺伝子を再構成及び形成することができる、前記挿入に、

ヘテロ接合性またはホモ接合性である、項目 5 6 または項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 0)

項目 1 から項目 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記非ヒト動物多能性細胞はハイブリッド細胞であり、または、前記非ヒト哺乳動物 1 細胞期胚はハイブリッド 1 細胞期胚であり、前記方法は、

(a ') 前記標的ゲノム遺伝子座内の対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペアの前記配列を比較して、前記標的ゲノム遺伝子座内の標的領域を選択した後に、前記標的ゲノム遺伝子座の残部の全てまたは一部と比較して、対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア間のより高いパーセンテージの配列同一性を有する前記標的領域に基づいて前記接触工程 (a) を実施すること、を更に含み、前記標的領域は、

前記第 1 のガイド RNA 認識配列、及び、前記第 1 のガイド RNA 認識配列の 5 ' 側、3 ' 側または両側上にある少なくとも 1 0 b p、2 0 b p、3 0 b p、4 0 b p、5 0 b p、1 0 0 b p、2 0 0 b p、3 0 0 b p、4 0 0 b p、5 0 0 b p、6 0 0 b p、7 0 0 b p、8 0 0 b p、9 0 0 b p、1 k b、2 k b、3 k b、4 k b、5 k b、6 k b、7 k b、8 k b、9 k b または 1 0 k b の隣接配列、及び / または、

前記第 2 のガイド RNA 認識配列、及び、前記第 2 のガイド RNA 認識配列の 5 ' 側、3 ' 側または両側上にある少なくとも 1 0 b p、2 0 b p、3 0 b p、4 0 b p、5 0 b p、1 0 0 b p、2 0 0 b p、3 0 0 b p、4 0 0 b p、5 0 0 b p、6 0 0 b p、7 0 0 b p、8 0 0 b p、9 0 0 b p、1 k b、2 k b、3 k b、4 k b、5 k b、6 k b、7 k b、8 k b、9 k b または 1 0 k b の隣接配列、

を含む、前記方法。

(項目 6 1)

前記標的領域は、前記標的ゲノム遺伝子座の残部と比較して、対応する第 1 と第 2 の前記ペア間のより高いパーセンテージの配列同一性を有する、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記標的領域は、対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア間の少なくとも 9 9 . 9 % の配列同一性を有し、前記標的ゲノム遺伝子座の残部は、対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア間の 9 9 . 8 % 以下の配列同一性を有する、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 3)

目的の外来抗原に対する寛容が抑制された遺伝子組換え非ヒト動物を作製するための方法であって、

(a) 非ヒト動物 1 細胞期胚にまたは 1 細胞期胚ではない非ヒト動物多能性細胞に、

(i) C a s 9 タンパク質と、

(i i) 標的ゲノム遺伝子座内の第 1 のガイドRNA 認識配列にハイブリダイズする第 1 のガイドRNA であって、

前記標的ゲノム遺伝子座は、前記目的の外来抗原と相同であるまたは前記目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含む、前記第 1 のガイドRNA と、

(i i i) 前記標的ゲノム遺伝子座内の第 2 のガイドRNA 認識配列にハイブリダイズする第 2 のガイドRNA と、

を導入することであって、

前記標的ゲノム遺伝子座は、対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体のペア内で改変されて、改変非ヒト動物 1 細胞期胚、または二対立遺伝子改変を有する改変非ヒト動物多能性細胞を産生し、前記自己抗原の発現は排除される、前記導入することと、

(b) 前記改変非ヒト動物 1 細胞期胚または前記改変非ヒト動物多能性細胞から遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することであって、

前記標的ゲノム遺伝子座は、前記自己抗原の発現が排除されるように、前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物内における対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア内で改変される、前記作製することと、

を含む、前記方法。

(項目 6 4)

工程 (a) の前記細胞は前記非ヒト動物の多能性幹細胞であり、工程 (b) における前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物の前記作製は、

(I) 前記改変非ヒト動物多能性細胞を宿主胚に導入することと、

(I I) 前記宿主胚を代理母に移植して、前記自己抗原の発現が排除されるように、前記標的ゲノム遺伝子座が対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア内で改変された前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することと、

を含む、項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 5)

前記多能性細胞は胚性幹 (E S) 細胞である、項目 6 4 に記載の方法。

(項目 6 6)

工程 (a) の前記細胞は前記非ヒト動物 1 細胞期胚であり、工程 (b) における前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物の前記作製は、前記改変非ヒト動物 1 細胞期胚を代理母に移植して、前記自己抗原の発現が排除されるように、前記標的ゲノム遺伝子座が対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の前記ペア内で改変された前記遺伝子組換え F 0 世代非ヒト動物を作製することを含む、項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記目的の外来抗原は、前記自己抗原のオルソログである、項目 6 3 から項目 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 8)

前記第 1 のガイドRNA 認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンを含むか、または、前記開始コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内であり、前記第 2 のガイドRNA 認識配列は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の終止コドンを含むか、または、前記終止コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内である、項目 6 3 から項目 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 9)

前記第 1 と第 2 のガイドRNA 認識配列は異なり、前記第 1 と第 2 のガイドRNA 認識配列のそれぞれは、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンを含むか、または、前記開始コドンの約 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0 または 1, 0 0 0 ヌクレオチド以内である、項目 6 3 から項目 6 7 のいずれか 1

項に記載の方法。

(項目 7 0)

前記第 1 のガイド RNA 認識配列は、前記標的ゲノム遺伝子座内における前記第 2 のガイド RNA 認識配列の 5' であり、

工程 (a) (i) は、保持アッセイを実施して、5' 領域及び前記第 1 のガイド RNA 認識配列の約 1 k b 内における及び / または 3' 領域及び前記第 2 のガイド RNA 認識配列の約 1 k b 内におけるコピー数が、2 であることを確認することを更に含む、
項目 6 3 から項目 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 1)

前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の全てまたは一部の二対立遺伝子欠失を含む、項目 6 3 から項目 7 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 2)

前記改変は、前記自己抗原をコードする前記遺伝子の開始コドンの二対立遺伝子破壊を含む、項目 6 3 から項目 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 3)

前記非ヒト動物はマウスである、項目 6 3 から項目 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。