

【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 5 年 5 月 26 日 (2023.5.26)

【公開番号】特開 2023-11882 (P2023-11882A)

【公開日】令和 5 年 1 月 24 日 (2023.1.24)

【年通号数】公開公報 (特許) 2023-014

【出願番号】特願 2022-178043 (P2022-178043)

【国際特許分類】

A 01 K 67/027 (2006.01)

C 12 N 15/13 (2006.01)

C 12 N 5/10 (2006.01)

C 12 N 5/0781 (2010.01)

C 12 N 15/12 (2006.01)

【FI】

A 01 K 67/027 Z N A

C 12 N 15/13

C 12 N 5/10

C 12 N 5/0781

C 12 N 15/12

【手続補正書】

【提出日】令和 5 年 5 月 18 日 (2023.5.18)

【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】

胚性幹細胞であって、前記胚性幹細胞のゲノムが、

(a) マウス重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび少なくとも 1 つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの挿入と；

(b) 軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される 1 つ以下または 2 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列と；

(c) 雄マウスにおいて機能的なマウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列の挿入と

を含み、前記機能的なマウス A D M A 6 タンパク質は、前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、遺伝子改変された雄マウスの生殖系列ゲノムに組み込まれる場合に、前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質が発現され、妊性を向上または回復させることを特徴とする、胚性幹細胞。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントが、V<sub>H</sub>1 - 2、V<sub>H</sub>1 - 8、V<sub>H</sub>1 - 24、V<sub>H</sub>1 - 69、V<sub>H</sub>2 - 5、V<sub>H</sub>3 - 7、V<sub>H</sub>3 - 9、V<sub>H</sub>3 - 11、V<sub>H</sub>3 - 13、V<sub>H</sub>3 - 15、V<sub>H</sub>3 - 20、V<sub>H</sub>3 - 23、V<sub>H</sub>3 - 30、V<sub>H</sub>3 - 33、V<sub>H</sub>3 - 43、V<sub>H</sub>3 - 48、V<sub>H</sub>4 - 31、V<sub>H</sub>4 - 39、V<sub>H</sub>4 - 59、V<sub>H</sub>5 - 51 および V<sub>H</sub>6 - 1 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の胚性幹細胞。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3】

前記 1 つ以下または 2 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列が、内因性マウス軽鎖遺伝子座において内因性マウス軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される、請求項 1 または請求項 2 に記載の胚性幹細胞。

## 【請求項 4】

前記 1 つ以下または 2 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列が、

( a ) 再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列、

( b ) 再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列、または

( c ) 再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列および再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列

10

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の胚性幹細胞。

## 【請求項 5】

前記再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列が、再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 5 配列である、請求項 4 に記載の胚性幹細胞。

## 【請求項 6】

前記再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列が、再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 1 配列である、請求項 4 に記載の胚性幹細胞。

## 【請求項 7】

前記マウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、

( a ) 内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座と同じ染色体上に存在する；および / または

( b ) 異所性の位置に存在する、

20

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の胚性幹細胞。

## 【請求項 8】

前記マウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、前記少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび / または少なくとも 1 つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントと並置されるかまたは連続している、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の胚性幹細胞。

## 【請求項 9】

30

前記マウス A D A M 6 タンパク質が、マウス A D A M 6 a タンパク質またはマウス A D A M 6 b タンパク質である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の胚性幹細胞。

## 【請求項 10】

前記胚性幹細胞が、マウス 軽鎖可変領域をコードする遺伝子を再構成して形成することができる内因性マウス 軽鎖可変領域遺伝子座を欠く、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の胚性幹細胞。

## 【請求項 11】

前記胚性幹細胞が、マウス 軽鎖可変領域をコードする遺伝子を再構成して形成することができる内因性マウス 軽鎖可変領域遺伝子座を欠く、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の胚性幹細胞。

40

## 【請求項 12】

前記胚性幹細胞が、そのゲノムにおいて 1 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の胚性幹細胞。

## 【請求項 13】

遺伝子改変された E S 細胞を作製する方法であって、前記方法は、前記 E S 細胞がそのゲノムにおいて、

( a ) マウス重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび少なくとも 1 つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの挿入と；

50

(b) 軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される 1 つ以下または 2 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列と；

(c) 雄マウスにおいて機能的なマウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列の挿入と

を含むように前記 E S 細胞を遺伝子改変すること

を含み、前記機能的なマウス A D M A 6 タンパク質は、前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、遺伝子改変された雄マウスの生殖系列ゲノムに組み込まれる場合に、前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質が発現され、妊性を向上または回復させることを特徴とする、方法。

【請求項 1 4】

前記 1 つ以下または 2 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列が、内因性マウス軽鎖遺伝子座において内因性マウス軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 1 つ以下または 2 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列が、

(a) 再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列

(b) 再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列、または

(c) 再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列および再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列

を含む、請求項 1 3 または請求項 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列が、再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 5 配列である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列が、再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 1 配列である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記マウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、

(a) 内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座と同じ染色体上に存在する；および / または

(b) 異所性の位置に存在する、

請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記マウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、前記少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび / または少なくとも 1 つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントと並置されるかまたは連続している、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記マウス A D A M 6 タンパク質が、マウス A D A M 6 a タンパク質またはマウス A D A M 6 b タンパク質である、請求項 1 3 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

遺伝子改変されたマウスを作製する方法であって、前記方法は、前記マウスのゲノムの生殖系列において、

(a) マウス重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび少なくとも 1 つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの挿入であって、前記少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび / または少なくとも 1 つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントが、内因性 A D A M 6 タンパク質の機

10

20

30

40

50

能を破壊し、前記内因性 A D A M 6 機能の破壊が、雄マウスにおける妊性の低減を伴う、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび少なくとも 1 つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの挿入と；

(b) 軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される 1 つ以下または 2 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列と；

(c) 機能的なマウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列であって、前記ヌクレオチド配列は、前記マウスの生殖系列ゲノムに組み込まれ、前記遺伝子改変されたマウスが雄マウスであるときに、前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質が発現され、前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質は、前記雄マウスにおいて発現されると、妊性を向上または回復させる、機能的なマウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列と

10

を含むように前記マウスを遺伝子改変すること

を含む、方法。

【請求項 2 2】

前記 1 つ以下または 2 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列が、内因性マウス軽鎖遺伝子座において内因性マウス軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 1 つ以下または 2 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列が、

20

(a) 再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列

(b) 再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列、または

(c) 再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列および再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列

を含む、請求項 2 1 または請求項 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列が、再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 5 配列である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列が、再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 1 配列である、請求項 2 3 に記載の方法。

30

【請求項 2 6】

前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、

(a) 内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座と同じ染色体上に存在する；および / または

(b) 異所性の位置に存在する、

請求項 2 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、前記少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび / または少なくとも 1 つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントと並置されるかまたは連続している、請求項 2 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 8】

前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質が、マウス A D A M 6 a タンパク質またはマウス A D A M 6 b タンパク質である、請求項 2 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

マウスを作製する方法であって、前記方法は、

胚性幹細胞を宿主胚に導入することと、

前記宿主胚を代理母に懐胎させることと、

50

前記代理母に、全体または一部が前記胚性幹細胞に由来する子孫を出産させることとを含み、前記胚性幹細胞のゲノムが、

(a) マウス重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される、少なくとも1つの再構成されていないヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、少なくとも1つの再構成されていないヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントおよび少なくとも1つの再構成されていないヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントの挿入であって、前記少なくとも1つの再構成されていないヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、少なくとも1つの再構成されていないヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントおよび/または少なくとも1つの再構成されていないヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントが、内因性ADAM6タンパク質の機能を破壊する、少なくとも1つの再構成されていないヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、少なくとも1つの再構成されていないヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントおよび少なくとも1つの再構成されていないヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントの挿入と；

10

(b) 軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される1つ以下または2つ以下の再構成されたヒト軽鎖V/J配列と；

(c) 機能的なマウスADAM6タンパク質をコードするヌクレオチド配列であって、前記ヌクレオチド配列は、前記マウスの生殖系列ゲノムに組み込まれ、前記遺伝子改変されたマウスが雄マウスであるときに、前記機能的なマウスADAM6タンパク質が発現され、前記機能的なマウスADAM6タンパク質は、前記雄マウスにおいて発現されると、妊性を向上または回復させることを特徴とする、機能的なマウスADAM6タンパク質をコードするヌクレオチド配列と

を含む、方法。

20

#### 【請求項30】

二重特異性抗原結合性タンパク質を作製する方法であって、

(a) 第1のエピトープを含む目的の第1の抗原で免疫した第1の遺伝子操作マウスのB細胞のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列と同一の第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列によってコードされる第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む第1のヒト免疫グロブリン重鎖を、宿主細胞において発現させることであって、前記第1の遺伝子操作マウスが、

(i) 内因性マウス免疫グロブリン 軽鎖可変領域遺伝子座における、マウス 定常領域に作動可能に連結される、単一の再構成されたヒト軽鎖V/J配列の挿入であって、前記単一の再構成されたヒト軽鎖V/J配列が、単一の再構成されたヒトV<sub>1-39</sub>/J配列または単一の再構成されたヒトV<sub>3-20</sub>/J配列であり、前記マウスが、再構成してマウス免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインをコードする配列を形成することができる内因性マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座を欠く、単一の再構成されたヒト軽鎖V/J配列の挿入と；

30

(ii) 内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座における、マウス重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される、少なくとも1つの再構成されていないヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、少なくとも1つの再構成されていないヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントおよび少なくとも1つの再構成されていないヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントの挿入であって、前記挿入が、内因性ADAM6タンパク質の機能を破壊し、前記内因性ADAM6機能の破壊が、雄マウスにおける妊性の低減を伴う、少なくとも1つの再構成されていないヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、少なくとも1つの再構成されていないヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントおよび少なくとも1つの再構成されていないヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントの挿入と；

40

(iii) 機能的なマウスADAM6タンパク質をコードするヌクレオチド配列であって、前記ヌクレオチド配列は、前記マウスの生殖系列ゲノムに組み込まれ、前記遺伝子改変されたマウスが雄マウスであるときに、前記機能的なマウスADAM6タンパク質が発現され、前記機能的なマウスADAM6タンパク質は、前記雄マウスにおいて発現されると、妊性を向上または回復させる、機能的なマウスADAM6タンパク質をコードするヌクレオチド配列と；

(iv) B細胞集団であって、前記集団における各B細胞が、前記単一の再構成されたヒト軽鎖V/J配列に由来するヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと、複数のヒト免

50

疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントのうちの１つ以上に由来するヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインとを発現する、B細胞集団とを含む、第１のヒト免疫グロブリン重鎖を発現させることと、

(b) 第２のエピトープを含む目的の第２の抗原で免疫した第２の遺伝子操作マウスのB細胞のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列と同一の第２のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列によってコードされる第２のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む第２のヒト免疫グロブリン重鎖を、前記同じ宿主細胞において発現させることであって、前記第２の遺伝子操作マウスが、

(i) 内因性マウス免疫グロブリン 軽鎖可変領域遺伝子座における、マウス 定常領域に作動可能に連結される、単一の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列の挿入であって、前記単一の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列が、前記第１の遺伝子操作マウスの前記内因性マウス免疫グロブリン 軽鎖可変領域遺伝子座において挿入された前記単一の再構成されたヒト V / J 配列と同一であり、前記マウスが、再構成してマウス免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインをコードする配列を形成することができる内因性マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座を欠く、単一の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列の挿入と；

(i i) 内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座における、重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される、少なくとも１つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも１つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび少なくとも１つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの挿入であって、前記挿入が、内因性 A D A M 6 タンパク質の機能を破壊し、前記内因性 A D A M 6 機能の破壊が、雄マウスにおける妊性の低減を伴う、少なくとも１つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも１つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび少なくとも１つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの挿入と；

(i i i) B細胞集団であって、前記集団における各B細胞が、前記単一の再構成されたヒト軽鎖 V / J 配列に由来するヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを発現し、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に由来するヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを発現する、B細胞集団とを含む、第２のヒト免疫グロブリン重鎖を発現させることと、

(c) 前記第１の遺伝子操作マウスの前記内因性マウス免疫グロブリン 軽鎖可変領域遺伝子座において挿入された前記単一の再構成されたヒト V / J 配列と同一または実質的に同一の単一の再構成されたヒト V / J 配列に由来するヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含むヒト免疫グロブリン軽鎖を、前記同じ宿主細胞において発現させることと

を含み、

前記発現された、前記第１のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域によってコードされる前記第１の可変ドメインを含む第１のヒト免疫グロブリン重鎖が、前記発現された、前記第２のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域によってコードされる前記第２の可変ドメインを含む第２のヒト免疫グロブリン重鎖と対合し、前記第１および第２のヒト免疫グロブリン重鎖がそれぞれ、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含む前記ヒト免疫グロブリン軽鎖と対合して、それにより二重特異性抗原結合タンパク質を作製する、方法。

#### 【請求項 3 1】

前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、

(a) 内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座と同じ染色体上に存在する；および／または

(b) 異所性の位置に存在する、

請求項 3 0 に記載の方法。

#### 【請求項 3 2】

前記第１の遺伝子操作マウスにおける前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質をコード

10

20

30

40

50

するヌクレオチド配列が、前記少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよび / または少なくとも 1 つの再構成されていないヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントと並置されるかまたは連続している、請求項 30 または 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記機能的なマウス A D A M 6 タンパク質が、マウス A D A M 6 a タンパク質またはマウス A D A M 6 b タンパク質である、請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記第 1 の抗原および前記第 2 の抗原が、  
2 つの異なる抗原；または  
同じ抗原

10

であり、前記第 1 の抗原と前記第 2 の抗原が同じ抗原である場合、前記第 1 および前記第 2 のヒト免疫グロブリン重鎖は、前記同じ抗原の異なるエピトープに結合する、請求項 30 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記第 1 および第 2 の遺伝子操作マウスが同じマウスまたは別々のマウスである、請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

20

30

40

50