

【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】平成 17 年 4 月 7 日 (2005.4.7)

【公表番号】特表 2004-536556 (P2004-536556A)

【公表日】平成 16 年 12 月 9 日 (2004.12.9)

【年通号数】公開・登録公報 2004-048

【出願番号】特願 2002-539535 (P2002-539535)

【国際特許分類第 7 版】

C 1 2 N 15/09

A 0 1 K 67/027

C 1 2 N 5/10

// C 1 2 Q 1/68

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 0 1 K 67/027

C 1 2 N 5/00 B

C 1 2 N 5/00 C

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成 15 年 5 月 6 日 (2003.5.6)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

真核生物細胞中の目的の内因性遺伝子または染色体遺伝子座を遺伝的に改変するための方法であって、以下：

- a) 目的の DNA 配列を含む、大きなクローン化ゲノムフラグメントを得る、工程；
 - b) (a) の該大きなクローン化ゲノムフラグメントを遺伝的に改変して、該真核生物細胞において使用するための大きな標的ベクター (L T V E C) を產生するために、細菌相同性組換えを使用する、工程；
 - c) (b) の該 L T V E C を該真核生物細胞に導入して、該細胞中の該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座を改変する、工程；および
 - d) (c) の該真核生物細胞における対立遺伝子の改変 (M O A) を検出して、該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座が、遺伝的に改変された真核生物細胞を同定するために、定量的アッセイを使用する、工程、
- を包含する、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、DNA 配列を含む、前記大きなクローン化遺伝子フラグメントが、目的の前記内因性遺伝子または染色体遺伝子座に対して相同性である、方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、前記内因性遺伝子または染色体遺伝子座に対する遺伝的改変が、コード配列、遺伝子セグメント、または調節エレメントの欠失；コード配列、遺伝子セグメント、または調節エレメントの変更；新しいコード配列、遺伝子セグメント、または調節エレメントの挿入；条件付き対立遺伝子の作製；あるいは 1 つの種由来のコード配列または遺伝子セグメントの、同一種または異なる種由来の相同性コード配

列または定向進化配列との置換を含む、方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、コード配列、遺伝子セグメント、または調節エレメントの前記変更が、置換、付加、または融合を含む、方法。

【請求項 5】

前記融合が、エピトープタグまたは二官能性タンパク質を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記定量的アッセイが、定量的 P C R、F I S H、競合的ゲノムハイブリダイゼーション、等温 D N A 増幅、固定化したプローブもしくは I n v a d e r P r o b e s (登録商標) に対する定量的ハイブリダイゼーション、または M M P アッセイ (登録商標) を含む、方法。

【請求項 7】

前記定量的 P C R が、T a q M a n (登録商標)、M o l e c u l a r B e a c o n、または E c l i p s e^{T M} プローブ技術を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記真核生物細胞が、哺乳動物の胚幹細胞である、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記胚幹細胞が、マウス、ラット、または他のげっ歯類の胚幹細胞である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記内因性遺伝子または染色体遺伝子座が、哺乳動物の遺伝子または染色体遺伝子座である、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記内因性遺伝子または染色体遺伝子座が、ヒトの遺伝子または染色体遺伝子座である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記内因性遺伝子または染色体遺伝子座が、マウス、ラット、または他のげっ歯類の遺伝子または染色体遺伝子座である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 L T V E C が、20 k b より大きな D N A フラグメントに適応し得る、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記 L T V E C が、100 k b より大きな D N A フラグメントに適応し得る、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

マウス胚幹細胞中の目的の内因性遺伝子または染色体遺伝子座を遺伝的に改変する方法であって、以下：

a) 目的の D N A 配列を含む、20 k b より大きなクローン化ゲノムフラグメントを得る工程であって、ここで、該大きなクローン化 D N A フラグメントが、該内因性遺伝子または染色体遺伝子座に対して相同性である、工程；

b) (a) の該大きなクローン化ゲノムフラグメントを遺伝的に改変して、該マウス胚幹細胞において使用するための大きな標的ベクターを産生するために、細菌相同性組換えを使用する工程であって、ここで、該遺伝的改変が、コード配列、遺伝子セグメント、または調節エレメントの欠失である、工程；

c) (b) の該大きな標的ベクターを該マウス胚幹細胞に導入して、該細胞中の該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座を改変する、工程；ならびに

d) (c) の該マウス胚幹細胞における対立遺伝子の改変 (M O A) を検出して、該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座が、遺伝的に改変されたマウス胚幹細胞を同定するために、定量的アッセイを使用する工程であって、該定量的アッセイが、定量的 P C R である

、工程、
を包含する、方法。

【請求項 16】

(c) の前記大きな標的ベクターの約 $1 \sim 5 \mu\text{g}$ が、約 1×10^7 細胞に導入される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法によって產生された、遺伝的に改変された内因性遺伝子または染色体遺伝子座。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 14、または 16 のいずれか 1 項に記載の方法によって產生された、遺伝的に改変された真核生物細胞。

【請求項 19】

胚幹細胞である、請求項 18 に記載の遺伝的に改変された細胞

【請求項 20】

請求項 15 に記載された方法によって產生された、遺伝的に改変されたマウス胚幹細胞。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法によって產生された、遺伝的に改変された内因性遺伝子または染色体遺伝子座を含む、非ヒト生物。

【請求項 22】

請求項 15 に記載の方法によって產生された、遺伝的に改変された内因性遺伝子または染色体遺伝子座を含む、マウス。

【請求項 23】

請求項 18 または 19 に記載の遺伝的に改変された真核生物細胞から產生された、非ヒト生物。

【請求項 24】

請求項 20 に記載の遺伝的に改変されたマウス胚幹細胞から產生された、マウス。

【請求項 25】

遺伝的に改変された、目的の内因性遺伝子または染色体遺伝子座を含む、非ヒト生物であって、該非ヒト生物は、以下の工程：

- a) 目的の DNA 配列を含む、大きなクローン化ゲノムフラグメントを得る、工程；
 - b) (a) の該大きなクローン化ゲノムフラグメントを遺伝的に改変して、胚幹細胞において使用するための大きな標的ベクター (L T V E C) を產生するために、細菌相同性組換えを使用する、工程；
 - c) (b) の該 L T V E C を該胚幹細胞に導入して、該細胞中の該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座を改変する、工程；
 - d) (c) の該胚幹細胞における対立遺伝子の改変 (M O A) を検出して、該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座が、遺伝的に改変された胚幹細胞を同定するために、定量的アッセイを使用する、工程；
 - e) (d) の該胚幹細胞を胚盤胞に導入する、工程；ならびに
 - f) (e) の該胚盤胞を、妊娠のために代理母に導入する、工程、
- を包含する、方法によって產生される、
非ヒト生物。

【請求項 26】

遺伝的に改変された、目的の内因性遺伝子または染色体遺伝子座を含む、マウスであって、該マウスは、以下の工程：

- a) 目的の DNA 配列を含む、20 kb より大きなクローン化ゲノムフラグメントを得る工程であって、ここで、該大きなクローン化 DNA フラグメントが、該内因性遺伝子または染色体遺伝子座に対して相同性である、工程；
- b) (a) の該大きなクローン化ゲノムフラグメントを遺伝的に改変して、該マウス胚幹細胞において使用するための大きな標的ベクターを產生するために、細菌相同性組換えを

使用する工程であって、ここで、該遺伝的改変が、コード配列、遺伝子セグメント、または調節エレメントの欠失である、工程；

c) (b) の該大きな標的ベクターを該マウス胚幹細胞に導入して、該細胞中の該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座を改変する、工程；

d) (c) の該マウス胚幹細胞における対立遺伝子の改変 (M O A) を検出して、該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座が、遺伝的に改変されたマウス胚幹細胞を同定するために、定量的アッセイを使用する工程であって、該定量的アッセイが、定量的 P C R である、工程；

e) (d) の該マウス胚幹細胞を胚盤胞に導入する、工程；ならびに

f) (e) の該胚盤胞を、妊娠のために代理母に導入する、工程、
を包含する、方法によって産生される、
マウス。

【請求項 27】

遺伝的に改変された、内因性遺伝子または染色体遺伝子座を含む、非ヒト生物であって、該非ヒト生物は、以下の工程：

a) 目的の D N A 配列を含む、大きなクローン化ゲノムフラグメントを得る、工程；

b) (a) の該大きなクローン化ゲノムフラグメントを遺伝的に改変して、真核生物細胞において使用するための大きな標的ベクター (L T V E C) を産生するために、細菌相同性組換えを使用する、工程；

c) (b) の該 L T V E C を該真核生物細胞に導入して、該細胞中の該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座を改変する、工程；

d) (c) の該真核生物細胞における対立遺伝子の改変 (M O A) を検出して、該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座が、遺伝的に改変された真核生物細胞を同定するために、定量的アッセイを使用する、工程；

e) (d) の該真核生物細胞から核を取り除く、工程；

f) (e) の該核を卵母細胞に導入する、工程；ならびに

g) (f) の該卵母細胞を、妊娠のために代理母に導入する、工程
を包含する、方法によって産生される、
非ヒト生物。

【請求項 28】

遺伝的に改変された、内因性遺伝子または染色体遺伝子座を含む、非ヒト生物であって、該非ヒト生物は、以下の工程：

a) 目的の D N A 配列を含む、大きなクローン化ゲノムフラグメントを得る、工程；

b) (a) の該大きなクローン化ゲノムフラグメントを遺伝的に改変して、真核生物細胞において使用するための大きな標的ベクター (L T V E C) を産生するために、細菌相同性組換えを使用する、工程；

c) (b) の該 L T V E C を該真核生物細胞に導入して、該細胞中の該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座を改変する、工程；

d) (c) の該真核生物細胞における対立遺伝子の改変 (M O A) を検出して、該内因性遺伝子または該染色体遺伝子座が、遺伝的に改変された真核生物細胞を同定するために、定量的アッセイを使用する、工程；

e) (d) の該真核生物細胞を別の真核生物細胞と融合する、工程；ならびに

f) (e) の融合した該真核生物細胞を妊娠のために代理母に導入する、工程、
を包含する、方法によって産生される、
非ヒト生物。

【請求項 29】

前記非ヒト生物が、マウス、ラット、または他のゲッ歯類である、請求項 25、27 または 28 のいずれか 1 項に記載の非ヒト生物。

【請求項 30】

請求項 2 ~ 16 のいずれか 1 項にさらに規定されるような方法によって産生される、請求

項 25 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の非ヒト生物。

【請求項 31】

非ヒト生物の産生のための、請求項 18 または 19 に記載の遺伝的に改変された細胞の使用。

【請求項 32】

マウスの産生のための、請求項 20 に記載の遺伝的に改変されたマウス胚幹細胞の使用。