

【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 1 年 10 月 10 日 (2019.10.10)

【公表番号】特表 2018-527005 (P2018-527005A)

【公表日】平成 30 年 9 月 20 日 (2018.9.20)

【年通号数】公開・登録公報 2018-036

【出願番号】特願 2018-514376 (P2018-514376)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6888 (2018.01)

C 1 2 N 5/0789 (2010.01)

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

C 1 2 N 15/873 (2010.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6888 Z

C 1 2 N 5/0789 Z N A

C 1 2 N 5/0735

C 1 2 N 5/10

A 0 1 K 67/027

C 1 2 N 15/873 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 8 月 30 日 (2019.8.30)

【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】

非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における雌化活性に関する標的化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の第 1 集団及び第 2 集団を、前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記多能性を維持するのに好適な基本培地及び添加物を含む培地中で培養し、前記第 1 集団が、標的化合物の存在下で培養され、前記第 2 集団が、前記標的化合物の不存在下で培養されることと、

(b) D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち 1 つ以上の発現及び / または活性について、非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記第 1 及び第 2 集団の各々で前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞のうち 1 種以上をアッセイし、それによって雌化活性が、前記第 2 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性の減少によって同定されることと、

とを含む、前記方法。

【請求項 2】

(c) D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性に基づいて、F 0 世代において繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を生成するために、前記第 1 集団からドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を選択し、前記

F 0 世代における前記繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物の比率が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性に逆相関すること、をさらに含む、請求項 1 に記載の方法であって、必要に応じて、前記方法は

、
(d) 前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を宿主胚に導入すること、および必要に応じて、前記宿主胚を胚盤胞期まで培養することと、

(e) ステップ (d) の前記宿主胚をレシビエント雌非ヒト哺乳動物に導入して、前記宿主胚を懐胎させることと、

(f) 表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を含む F 0 X Y 非ヒト哺乳動物子孫を得て、性成熟に達すると、前記 F 0 の表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物が繁殖可能かつ妊孕可能になること

とを含む、前記方法。

【請求項 3】

前記標的化合物の不存在下で、ステップ (a) の前記培地が、前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記多能性を維持するのに十分であるが、繁殖可能な雌子孫を生じる前記細胞の能力を変化させない、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記雌化活性が、前記第 2 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の前記発現及び / または活性の減少によってステップ (b) で同定される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ (b) の前記アッセイによって、m R N A レベルで D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち 1 つ以上の発現が検出され、必要に応じて、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の m R N A 発現が、前記第 2 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の m R N A 発現より少なくとも 9 0 % 低い場合に、雌化活性が同定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記雌化活性が、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の発現及び / または活性の欠如によってステップ (b) で同定され、必要に応じて、前記雌化活性が、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の発現及び / または活性の欠如によってステップ (b) で同定される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

雌化培地における標的化合物の前記濃度の最適化方法であって、

(a) 非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の第 1 集団及び第 2 集団を、前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記多能性を維持するのに好適な基本培地及び添加物を含む培地中で培養し、

前記第 1 集団が、第 1 濃度の前記標的化合物の存在下で培養され、前記第 2 集団が、前記第 1 濃度とは異なる第 2 濃度の前記標的化合物の存在下で培養されることと、

(b) D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち 1 つ以上の発現及び / または活性について、非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記第 1 及び第 2 集団の各々で前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞のうち 1 種以上をアッセイすることと、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性が、前記第 2 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞で減少する場合に、前記第 1 濃度を選択すること、
とを含む、前記方法。

【請求項 8】

(c) D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性に基づいて、F 0 世代において繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を生成するために、前記第 1 集団からドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を選択し、前記 F 0 世代における前記繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物の前記比率が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性に逆相関すること、をさらに含む、請求項 7 に記載の方法であって、必要に応じて、前記方法は、

(d) 前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を宿主胚に導入すること、および必要に応じて、前記宿主胚を胚盤胞期まで培養することと、

(e) ステップ (d) の前記宿主胚をレシピエント雌非ヒト哺乳動物に導入して、前記宿主胚を懐胎させることと、

(f) 表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を含む F 0 X Y 非ヒト哺乳動物子孫を得て、性成熟に達すると、前記 F 0 の表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物が繁殖可能かつ妊孕可能になること

とを含む、前記方法。

【請求項 9】

前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記第 2 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の減少した発現及び / または活性を有する場合に、前記第 1 濃度がステップ (b) で選択される、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ (b) の前記アッセイによって、mRNA レベルで D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち 1 つ以上の発現が検出され、必要に応じて、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の mRNA 発現が、前記第 2 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の mRNA 発現より少なくとも 90 % 低い場合に、前記第 1 の濃度が選択される、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の発現及び / または活性を欠いている場合に、前記第 1 濃度がステップ (b) で選択され、必要に応じて、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の発現及び / または活性を欠いている場合に、前記第 1 濃度がステップ (b) で選択される、請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 1 集団が、アッセイステップ (b) の前に少なくとも 1 日間、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、10 日間、11 日間、12 日間、13 日間、2 週間、3 週間、または 4 週間の間、前記標的化合物の存在下で培養される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

(I) ステップ (c) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞、すなわち、前記対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記多能性を維持するのに十分であるが、繁殖可能な雌子孫を生じる前記細胞の能力を変化させない培地中で培養された前記細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の減少した発現及び / または活性を有し、必要に応じて、ステップ (c) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の減少した発現及び / または活性を有するか、または

(I I) ステップ (c) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記第 2 集団からの対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の減少した発現及び / または活性を有し、必要に応じて、ステップ (c) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の減少した発現及び / または活性を有する、請求項 2 ~ 6 および 8 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記第 1 集団及び前記第 2 集団が、同じ細胞株または同じクローンに由来するか、または同じ遺伝子型を有する、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の作製方法であって、

(a) 非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の集団を、前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記多能性を維持するのに好適な基本培地及び添加物を含む低オスモル濃度培地中で培養し、前記低オスモル濃度培地が、約 2 0 0 m O s m / k g ~ 約 3 2 9 m O s m / k g 未満のオスモル濃度を有することと、

(b) D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち 1 つ以上の発現及び / または活性について、非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記集団において前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞のうち 1 種以上をアッセイすることと、

(c) D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性に基づいて、F 0 世代において繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を生成するためにドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を選択し、前記 F 0 世代における前記繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物の前記比率が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性に逆相関することを含む、前記方法。

【請求項 1 6】

(d) 前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を宿主胚に導入すること、および必要に応じて、前記宿主胚を胚盤胞期まで培養することと、

(e) ステップ (d) の前記宿主胚をレシピエント雌非ヒト哺乳動物に導入して、前記宿主胚を懐胎させることと、

(f) 表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を含む F 0 X Y 非ヒト哺乳動物子孫を得て、性成熟に達すると、前記 F 0 の表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物が繁殖可能かつ妊孕可能になること

とをさらに含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、アッセイステップ (b) の前に少なくとも 1 日間、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、1 0 日間、1 1 日間、1 2 日間、1 3 日間、2 週間、3 週間、または 4 週間の間、前記低オスモル濃度培地中で培養される、請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

ステップ (c) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞、すなわち、前記対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記多能性を維持するのに十分であるが、繁殖可能な雌子孫を生じる前記細胞の能力を変化させない培地中で培養された前記細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の減少した発現及び / または活性を有し、必要に応じて、ステップ (c) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の減少した発現及び / または活性を有する、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

ステップ (b) の前記アッセイによって、m R N A レベルで D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち 1 つ以上の発現が検出され、必要に応じて、前記ドナー非ヒト哺乳動

物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の m R N A 発現が、前記対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の m R N A 発現より少なくとも 90 % 低い場合に、前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞がステップ (c) で選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ステップ (a) の前記培地が、約 200 m O s m / k g ~ 約 329 m O s m / k g 未満のオスモル濃度を有する低オスモル濃度培地である、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記低オスモル濃度培地が、以下の特性：

(I) 前記低オスモル濃度培地が、約 218 m O s m / k g ~ 約 322 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、

(I I) 前記低オスモル濃度培地が、218 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、

(I I I) 前記低オスモル濃度培地が、約 11 m S / c m ~ 約 13 m S / c m の伝導度を有すること、

(I V) 前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約 50 m M ~ 約 110 m M の濃度で含むこと、

(V) 前記基本培地が、塩化ナトリウムを約 50 m M ~ 約 110 m M の濃度で含むこと、

(V I) 前記基本培地が、炭酸塩を約 17 m M ~ 約 30 m M の濃度で含むこと、

(V I I) 前記基本培地が、重炭酸ナトリウムを約 13 m M ~ 約 25 m M の濃度で含むこと、

(V I I I) 前記基本培地が、約 85 m M ~ 約 130 m M のアルカリ金属ハロゲン化物塩及び炭酸塩の総濃度を有すること、

(I X) 前記基本培地が、塩化ナトリウムを 87 ± 5 m M の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、 261 ± 26 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、

(X) 前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約 50 m M ~ 約 110 m M の濃度で、及び炭酸塩を約 17 m M ~ 約 30 m M の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約 200 m O s m / k g ~ 約 329 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、

(X I) 前記低オスモル濃度培地が、218 m O s m / k g のオスモル濃度を有し、前記基本培地が、塩化ナトリウムを 50 m M ~ 110 m M の濃度で、及び重炭酸ナトリウムを 13 m M ~ 25 m M の濃度で含むこと、

(X I I) 前記基本培地が、炭酸塩を約 18 m M ~ 約 44 m M の濃度で含むこと、

(X I I I) 前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約 50 m M ~ 約 110 m M の濃度で含むこと、

(X I V) 前記炭酸塩が重炭酸ナトリウムであり、前記アルカリ金属及び前記ハロゲン化物の前記塩が塩化ナトリウムであり、前記低オスモル濃度培地が、約 216 m O s m / k g ~ 約 322 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、ならびに

(X V) 前記基本培地が、塩化ナトリウムを約 3 m g / m L の濃度で、及び重炭酸ナトリウムを約 2.2 m g / m L の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約 216 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること

のうち 1 つ以上を有する、請求項 15 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

ステップ (b) の前記アッセイによって、タンパク質レベルで D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の発現が検出される、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

ステップ (b) が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち 1 つ以上の発現及び / または活性について、前記第 1 集団における少なくとも 2 種の前記非ヒト哺乳動物 X Y

多能性細胞をアッセイすることを含み、ステップ(c)が、前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞として、他方のアッセイした細胞と比較して、 $Dd \times 3y$ 、 Uty 、及び $Eif2s3y$ のうち前記1つ以上の最も低い発現及び/または活性を有するステップ(b)の前記アッセイした細胞を選択することを含む、請求項2～6および8～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

ステップ(c)の前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、 $Dd \times 3y$ 、 Uty 、及び $Eif2s3y$ のうち前記1つ以上の発現及び/または活性を欠いており、必要に応じて、ステップ(c)の前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、 $Dd \times 3y$ 、 Uty 、及び $Eif2s3y$ の発現及び/または活性を欠いている、請求項2～6および8～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、胚性幹(ES)細胞であり、必要に応じて、前記ES細胞が、VGF1マウスES細胞である、請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記非ヒト哺乳動物が、げっ歯類であり、必要に応じて、前記げっ歯類がラットまたはマウスであり、必要に応じて、前記げっ歯類がC57BL/6系統を含むマウスであり、必要に応じて、前記Y染色体が、C57BL/6系統、129系統、またはBALB/c系統からのものであり、必要に応じて、前記げっ歯類が、C57BL/6系統及び129系統を含むマウスである、請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

前記非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、標的ゲノム遺伝子座に標的遺伝子改変を含み、必要に応じて、前記標的遺伝子改変が、挿入、欠失、ノックアウト、ノックイン、点変異、またはこれらの組合せを含む、請求項1～26のいずれか1項に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0123

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0123】

本発明は、以下を含むキットもまた提供する：(a)非ヒト哺乳動物XY多能性細胞において $Dd \times 3y$ 、 Uty 、及び $Eif2s3y$ のうち1つ以上の発現及び/または活性レベルを検出するための検出試薬、ならびに(b)検出試薬を使用して、非ヒト哺乳動物XY多能性細胞がF0世代において繁殖可能な表現型的に雌のXY非ヒト哺乳動物を生成する予測傾向と検出を相互に関連付けるための説明書。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

非ヒト哺乳動物XY多能性細胞における雌化活性に関する標的化合物のスクリーニング方法であって、

(a)非ヒト哺乳動物XY多能性細胞の第1集団及び第2集団を、前記非ヒト哺乳動物XY多能性細胞の前記多能性を維持するのに好適な基本培地及び添加物を含む培地中で培養し、前記第1集団が、標的化合物の存在下で培養され、前記第2集団が、前記標的化合物の不存在下で培養されることと、

(b) $Dd \times 3y$ 、 Uty 、及び $Eif2s3y$ のうち1つ以上の発現及び/または活性について、非ヒト哺乳動物XY多能性細胞の前記第1及び第2集団の各々で前記非ヒト哺乳動物XY多能性細胞のうち1種以上をアッセイし、それによって雌化活性が、前記第2集団からの前記1種以上の非ヒト哺乳動物XY多能性細胞と比較して、前記第1集団から

の前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性の減少によって同定されることと、

(c) D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性に基づいて、F 0 世代において繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を生成するために、前記第 1 集団からドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を選択し、前記 F 0 世代における前記繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物の比率が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性に逆関することと、

(d) 前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を宿主胚に導入することと、

(e) ステップ (d) の前記宿主胚をレシピエント雌非ヒト哺乳動物に導入して、前記宿主胚を懐胎させることと、

(f) 表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を含む F 0 X Y 非ヒト哺乳動物子孫を得て、性成熟に達すると、前記 F 0 の表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物が繁殖可能かつ妊孕可能になること

とを含む、前記方法。

(項目 2)

ステップ (b) の前記アッセイによって、mRNA レベルで D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の発現が検出される、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

ステップ (b) の前記アッセイによって、タンパク質レベルで D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の発現が検出される、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

前記雌化活性が、前記第 2 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の前記発現及び / または活性の減少によってステップ (b) で同定される、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5)

前記雌化活性が、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の発現及び / または活性の欠如によってステップ (b) で同定される、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6)

前記雌化活性が、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞における、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の発現及び / または活性の欠如によってステップ (b) で同定される、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7)

ステップ (c) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞、すなわち、前記対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記多能性を維持するのに十分であるが、繁殖可能な雌子孫を生じる前記細胞の能力を変化させない培地中で培養された前記細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の減少した発現及び / または活性を有する、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8)

ステップ (c) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記第 2 集団からの対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の減少した発現及び / または活性を有する、項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9)

ステップ (c) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記対照非ヒト哺乳動物

XY多能性細胞と比較して、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yの減少した発現及び/または活性を有する、項目7または8に記載の方法。

(項目10)

ステップ(b)が、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち1つ以上の発現及び/または活性について、前記第1集団における少なくとも2種の前記非ヒト哺乳動物XY多能性細胞をアッセイすることを含み、ステップ(c)が、前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞として、他方のアッセイした細胞と比較して、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の最も低い発現及び/または活性を有するステップ(b)の前記アッセイした細胞を選択することを含む、項目1～9のいずれか1項に記載の方法。

(項目11)

ステップ(c)の前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の発現及び/または活性を欠いている、項目1～10のいずれか1項に記載の方法。

(項目12)

ステップ(c)の前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yの発現及び/または活性を欠いている、項目1～11のいずれか1項に記載の方法。

(項目13)

前記第1集団が、アッセイステップ(b)の前に少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、2週間、3週間、または4週間の間、前記標的化合物の存在下で培養される、項目1～12のいずれか1項に記載の方法。

(項目14)

前記多能性細胞が、胚性幹(ES)細胞である、項目1～13のいずれか1項に記載の方法。

(項目15)

前記多能性細胞が、VGf1マウスES細胞である、項目14に記載の方法。

(項目16)

前記標的化合物の不存在下で、ステップ(a)の前記培地が、前記非ヒト哺乳動物XY多能性細胞の前記多能性を維持するのに十分であるが、繁殖可能な雌子孫を生じる前記細胞の能力を変化させない、項目1～15のいずれか1項に記載の方法。

(項目17)

前記標的化合物の不存在下で、ステップ(a)の前記培地が、約200mOsm/kg～約329mOsm/kg未満のオスモル濃度を有する低オスモル濃度培地である、項目1～15のいずれか1項に記載の方法。

(項目18)

前記低オスモル濃度培地が、以下の特性：

(I)前記低オスモル濃度培地が、約218mOsm/kg～約322mOsm/kgのオスモル濃度を有すること、

(II)前記低オスモル濃度培地が、218mOsm/kgのオスモル濃度を有すること、

(III)前記低オスモル濃度培地が、約11mS/cm～約13mS/cmの伝導度を有すること、

(IV)前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約50mM～約110mMの濃度で含むこと、

(V)前記基本培地が、塩化ナトリウムを約50mM～約110mMの濃度で含むこと、

(VI)前記基本培地が、炭酸塩を約17mM～約30mMの濃度で含むこと、

(VII)前記基本培地が、重炭酸ナトリウムを約13mM～約25mMの濃度で含むこと、

(V I I I) 前記基本培地が、約 8 5 m M ~ 約 1 3 0 m M のアルカリ金属ハロゲン化物塩及び炭酸塩の総濃度を有すること、

(I X) 前記基本培地が、塩化ナトリウムを $8 7 \pm 5$ m M の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、 $2 6 1 \pm 2 6$ m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、

(X) 前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約 5 0 m M ~ 約 1 1 0 m M の濃度で、及び炭酸塩を約 1 7 m M ~ 約 3 0 m M の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約 2 0 0 m O s m / k g ~ 約 3 2 9 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、ならびに

(X I) 前記低オスモル濃度培地が、 $2 1 8$ m O s m / k g のオスモル濃度を有し、前記基本培地が、塩化ナトリウムを 5 0 m M ~ 1 1 0 m M の濃度で、及び重炭酸ナトリウムを 1 3 m M ~ 2 5 m M の濃度で含むこと

のうち 1 つ以上を有する、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記基本培地が、炭酸塩を約 1 8 m M ~ 約 4 4 m M の濃度で含む、項目 1 7 または 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約 5 0 m M ~ 約 1 1 0 m M の濃度で含む、項目 1 7 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 1)

前記炭酸塩が重炭酸ナトリウムであり、前記アルカリ金属及び前記ハロゲン化物の前記塩が塩化ナトリウムであり、前記低オスモル濃度培地が、約 $2 1 6$ m O s m / k g ~ 約 $3 2 2$ m O s m / k g のオスモル濃度を有する、項目 1 7 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記基本培地が、塩化ナトリウムを約 3 m g / m L の濃度で、及び重炭酸ナトリウムを約 2 . 2 m g / m L の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約 $2 1 6$ m O s m / k g のオスモル濃度を有する、項目 1 7 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記非ヒト哺乳動物が、げっ歯類である、項目 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 4)

前記げっ歯類がラットまたはマウスである、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記げっ歯類が C 5 7 B L / 6 系統を含むマウスである、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記 Y 染色体が、C 5 7 B L / 6 系統、1 2 9 系統、または B A L B / c 系統からのものである、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記げっ歯類が、C 5 7 B L / 6 系統及び 1 2 9 系統を含むマウスである、項目 2 4 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 8)

前記宿主胚が前桑実期胚であり、ステップ (d) が、前記宿主胚を胚盤胞期まで培養することをさらに含む、項目 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 9)

前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記宿主胚への導入前に少なくとも 1 日間、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、1 0 日間、1 1 日間、1 2 日間、1 3 日間、2 週間、3 週間、または 4 週間の間、前記標的化合物の存在下で培養される、項目 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 0)

ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の作製方法であって、

(a) 非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の集団を、前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前

記多能性を維持するのに好適な基本培地及び添加物を含む低オスモル濃度培地中で培養し、前記低オスモル濃度培地が、約200mOsm/kg～約329mOsm/kg未満のオスモル濃度を有することと、

(b) Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち1つ以上の発現及び/または活性について、非ヒト哺乳動物XY多能性細胞の前記集団において前記非ヒト哺乳動物XY多能性細胞のうち1種以上をアッセイすることと、

(c) Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の前記発現及び/または活性に基づいて、F0世代において繁殖可能な表現型的に雌のXY非ヒト哺乳動物を生成するためにドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞を選択し、前記F0世代における前記繁殖可能な表現型的に雌のXY非ヒト哺乳動物の前記比率が、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の前記発現及び/または活性に逆相関することを含む、前記方法。

(項目31)

ステップ(b)の前記アッセイによって、前記mRNAレベルでDdx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の発現が検出される、項目30に記載の方法。

(項目32)

ステップ(b)の前記アッセイによって、前記タンパク質レベルでDdx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の発現が検出される、項目30に記載の方法。

(項目33)

前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、対照非ヒト哺乳動物XY多能性細胞、すなわち、前記対照非ヒト哺乳動物XY多能性細胞の前記多能性を維持するのに十分であるが、繁殖可能な雌子孫を生じる前記細胞の能力を変化させない培地中で培養された前記細胞と比較して、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の減少した発現及び/または活性に基づいて選択される、項目30～32のいずれか1項に記載の方法。

(項目34)

前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、前記対照非ヒト哺乳動物XY多能性細胞と比較して、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yの減少した発現及び/または活性を有する、項目33に記載の方法。

(項目35)

ステップ(b)が、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち1つ以上の発現及び/または活性について、非ヒト哺乳動物XY多能性細胞の前記集団における少なくとも2種の前記非ヒト哺乳動物XY多能性細胞をアッセイすることを含み、ステップ(c)が、前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞として、他方のアッセイした細胞と比較して、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の最も低い発現及び/または活性を有するステップ(b)の前記アッセイした細胞を選択することを含む、項目30～34のいずれか1項に記載の方法。

(項目36)

前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の発現及び/または活性を欠いている、項目30～35のいずれか1項に記載の方法。

(項目37)

前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yの発現及び/または活性を欠いている、項目30～36のいずれか1項に記載の方法。

(項目38)

前記非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、アッセイステップ(b)の前に少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、2週間、3週間、または4週間の間、前記低オスモル濃度培地中で培養される、項目30～37のいずれか1項に記載の方法。

(項目39)

前記多能性細胞が、胚性幹（E S）細胞である、項目30～38のいずれか1項に記載の方法。

（項目40）

前記多能性細胞が、V G F 1 マウス E S 細胞である、項目39に記載の方法。

（項目41）

前記低オスモル濃度培地が、以下の特性：

（I）前記低オスモル濃度培地が、約218 m O s m / k g ～約322 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、

（I I）前記低オスモル濃度培地が、218 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、

（I I I）前記低オスモル濃度培地が、約11 m S / c m ～約13 m S / c m の伝導度を有すること、

（I V）前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約50 m M ～約110 m M の濃度で含むこと、

（V）前記基本培地が、塩化ナトリウムを約50 m M ～約110 m M の濃度で含むこと、

（V I）前記基本培地が、炭酸塩を約17 m M ～約30 m M の濃度で含むこと、

（V I I）前記基本培地が、重炭酸ナトリウムを約13 m M ～約25 m M の濃度で含むこと、

（V I I I）前記基本培地が、約85 m M ～約130 m M のアルカリ金属ハロゲン化物塩及び炭酸塩の総濃度を有すること、

（I X）前記基本培地が、塩化ナトリウムを87 ± 5 m M の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、261 ± 26 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、

（X）前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約50 m M ～約110 m M の濃度で、及び炭酸塩を約17 m M ～約30 m M の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約200 m O s m / k g ～約329 m O s m / k g のオスモル濃度を有すること、ならびに

（X I）前記低オスモル濃度培地が、218 m O s m / k g のオスモル濃度を有し、前記基本培地が、塩化ナトリウムを50 m M ～110 m M の濃度で、及び重炭酸ナトリウムを13 m M ～25 m M の濃度で含むこと

のうち1つ以上を有する、項目30～40のいずれか1項に記載の方法。

（項目42）

前記基本培地が、炭酸塩を約18 m M ～約44 m M の濃度で含む、項目30～41のいずれか1項に記載の方法。

（項目43）

前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約50 m M ～約110 m M の濃度で含む、項目30～42のいずれか1項に記載の方法。

（項目44）

前記炭酸塩が重炭酸ナトリウムであり、前記アルカリ金属及び前記ハロゲン化物の前記塩が塩化ナトリウムであり、前記低オスモル濃度培地が、約216 m O s m / k g ～約322 m O s m / k g のオスモル濃度を有する、項目30～43のいずれか1項に記載の方法

。

（項目45）

前記基本培地が、塩化ナトリウムを約3 m g / m L の濃度で、及び重炭酸ナトリウムを約2.2 m g / m L の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約216 m O s m / k g のオスモル濃度を有する、項目30～44のいずれか1項に記載の方法。

（項目46）

前記非ヒト哺乳動物が、げっ歯類である、項目30～45のいずれか1項に記載の方法。

（項目47）

前記げっ歯類がラットまたはマウスである、項目46に記載の方法。

（項目48）

前記げっ歯類が C 5 7 B L / 6 系統を含むマウスである、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記 Y 染色体が、C 5 7 B L / 6 系統、1 2 9 系統、または B A L B / c 系統からのものである、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記げっ歯類が、C 5 7 B L / 6 系統及び 1 2 9 系統を含むマウスである、項目 4 7 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 1)

(d) 前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を宿主胚に導入することと、

(e) ステップ (d) の前記宿主胚をレシピエント雌非ヒト哺乳動物に導入して、前記宿主胚を懐胎させることと、

(f) 表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を含む F 0 X Y 非ヒト哺乳動物子孫を得て、性成熟に達すると、前記 F 0 の表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物が繁殖可能かつ妊孕可能になること

とをさらに含む、項目 3 0 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記宿主胚が前桑実期胚であり、ステップ (d) が、前記宿主胚を前記胚盤胞期まで培養することをさらに含む、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記宿主胚への導入前に少なくとも 1 日間、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、1 0 日間、1 1 日間、1 2 日間、1 3 日間、2 週間、3 週間、または 4 週間の間、前記低オスモル濃度培地中で培養される、項目 5 1 または 5 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

(a) 非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞において D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち 1 つ以上の発現及び / または活性レベルを検出するための検出試薬と、

(b) 前記検出試薬を使用して、F 0 世代において繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を生成するための前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の予測傾向と検出を相互に関連付けるための説明書

とを含む、キット。

(項目 5 5)

前記検出試薬が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の発現を検出するための、1 つ以上のプライマーセット及び / または 1 つ以上のプローブを含む、項目 5 4 に記載のキット。

(項目 5 6)

雌化培地における標的培地成分の前記濃度の最適化方法であって、

(a) 非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の第 1 集団及び第 2 集団を、前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記多能性を維持するのに好適な基本培地及び添加物を含む培地中で培養し、

前記第 1 集団が、第 1 濃度の前記標的培地成分の存在下で培養され、前記第 2 集団が、前記第 1 濃度とは異なる第 2 濃度の前記標的培地成分の存在下で培養されることと、

(b) D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち 1 つ以上の発現及び / または活性について、非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記第 1 及び第 2 集団の各々で前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞のうち 1 種以上をアッセイすることと、

(c) D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性が、前記第 2 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞で減少する場合に、前記第 1 濃度を選択することと、

(d) D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性に基づいて、F 0 世代において繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を

生成するために、前記第 1 集団からドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を選択し、前記 F 0 世代における前記繁殖可能な表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物の前記比率が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の前記発現及び / または活性に逆相関することと、

(e) 前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞を宿主胚に導入することと、

(f) ステップ (e) の前記宿主胚をレシピエント雌非ヒト哺乳動物に導入して、前記宿主胚を懐胎させることと、

(g) 表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物を含む F 0 X Y 非ヒト哺乳動物子孫を得て、性成熟に達すると、前記 F 0 の表現型的に雌の X Y 非ヒト哺乳動物が繁殖可能かつ妊孕可能になること

とを含む、前記方法。

(項目 5 7)

ステップ (b) の前記アッセイによって、前記 m R N A レベルで D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の発現が検出される、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

ステップ (b) の前記アッセイによって、前記タンパク質レベルで D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の発現が検出される、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記第 2 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の減少した発現及び / または活性を有する場合に、前記第 1 濃度がステップ (c) で選択される、項目 5 6 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 0)

前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の発現及び / または活性を欠いている場合に、前記第 1 濃度がステップ (c) で選択される、項目 5 6 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 1)

前記第 1 集団からの前記 1 種以上の非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の発現及び / または活性を欠いている場合に、前記第 1 濃度がステップ (c) で選択される、項目 5 6 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 2)

ステップ (d) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞、すなわち、前記対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記多能性を維持するのに十分であるが、繁殖可能な雌子孫を生じる前記細胞の能力を変化させない培地中で培養された前記細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の減少した発現及び / または活性を有する、項目 5 6 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 3)

ステップ (d) の前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記第 2 集団からの対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち前記 1 つ以上の減少した発現及び / または活性を有する、項目 5 6 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 4)

前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記対照非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞と比較して、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y の減少した発現及び / または活性を有する、項目 6 2 または 6 3 に記載の方法。

(項目 6 5)

ステップ (b) が、D d x 3 y、U t y、及び E i f 2 s 3 y のうち 1 つ以上の発現及び / または活性について、非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞の前記第 1 集団における少なくとも

も2種の前記非ヒト哺乳動物XY多能性細胞をアッセイすることを含み、ステップ(d)が、前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞として、他方のアッセイした細胞と比較して、 $Ddx3y$ 、 Uty 、及び $Eif2s3y$ のうち前記1つ以上の最も低い発現及び/または活性を有するステップ(b)の前記アッセイした細胞を選択することを含む、項目56～64のいずれか1項に記載の方法。

(項目66)

前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、 $Ddx3y$ 、 Uty 、及び $Eif2s3y$ のうち前記1つ以上の発現及び/または活性を欠いている、項目56～65のいずれか1項に記載の方法。

(項目67)

前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、 $Ddx3y$ 、 Uty 、及び $Eif2s3y$ の発現及び/または活性を欠いている、項目56～66のいずれか1項に記載の方法。

(項目68)

前記第1及び第2集団が、アッセイステップ(b)の前に少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、2週間、3週間、または4週間の間、前記標的培地成分の存在下で培養される、項目56～67のいずれか1項に記載の方法。

(項目69)

前記多能性細胞が、胚性幹(ES)細胞である、項目56～68のいずれか1項に記載の方法。

(項目70)

前記多能性細胞が、VGF1マウスES細胞である、項目69に記載の方法。

(項目71)

ステップ(a)の前記培地が、約 200mOsm/kg ～約 329mOsm/kg 未満のオスモル濃度を有する低オスモル濃度培地である、項目56～70のいずれか1項に記載の方法。

(項目72)

前記低オスモル濃度培地が、以下の特性：

(I) 前記低オスモル濃度培地が、約 218mOsm/kg ～約 322mOsm/kg のオスモル濃度を有すること、

(II) 前記低オスモル濃度培地が、 218mOsm/kg のオスモル濃度を有すること、

、

(III) 前記低オスモル濃度培地が、約 11mS/cm ～約 13mS/cm の伝導度を有すること、

(IV) 前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約 50mM ～約 110mM の濃度で含むこと、

(V) 前記基本培地が、塩化ナトリウムを約 50mM ～約 110mM の濃度で含むこと、

(VI) 前記基本培地が、炭酸塩を約 17mM ～約 30mM の濃度で含むこと、

(VII) 前記基本培地が、重炭酸ナトリウムを約 13mM ～約 25mM の濃度で含むこと、

(VIII) 前記基本培地が、約 85mM ～約 130mM のアルカリ金属ハロゲン化物塩及び炭酸塩の総濃度を有すること、

(IX) 前記基本培地が、塩化ナトリウムを $87 \pm 5\text{mM}$ の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、 $261 \pm 26\text{mOsm/kg}$ のオスモル濃度を有すること、

(X) 前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約 50mM ～約 110mM の濃度で、及び炭酸塩を約 17mM ～約 30mM の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約 200mOsm/kg ～約 329mOsm/kg のオスモル濃度を有すること、ならびに

(XI) 前記低オスモル濃度培地が、 218mOsm/kg のオスモル濃度を有し、前記基本培地が、塩化ナトリウムを 50mM ～ 110mM の濃度で、及び重炭酸ナトリウムを

1 3 m M ~ 2 5 m M の濃度で含むこと

のうち 1 つ以上を有する、項目 7 1 に記載の方法。

(項目 7 3)

前記基本培地が、炭酸塩を約 1 8 m M ~ 約 4 4 m M の濃度で含む、項目 7 1 または 7 2 に記載の方法。

(項目 7 4)

前記基本培地が、アルカリ金属及びハロゲン化物の塩を約 5 0 m M ~ 約 1 1 0 m M の濃度で含む、項目 7 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 5)

前記炭酸塩が重炭酸ナトリウムであり、前記アルカリ金属及び前記ハロゲン化物の前記塩が塩化ナトリウムであり、前記低オスモル濃度培地が、約 2 1 6 m O s m / k g ~ 約 3 2 2 m O s m / k g のオスモル濃度を有する、項目 7 1 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法

。

(項目 7 6)

前記基本培地が、塩化ナトリウムを約 3 m g / m L の濃度で、及び重炭酸ナトリウムを約 2 . 2 m g / m L の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約 2 1 6 m O s m / k g のオスモル濃度を有する、項目 7 1 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 7)

前記非ヒト哺乳動物が、げっ歯類である、項目 5 6 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 8)

前記げっ歯類がラットまたはマウスである、項目 7 7 に記載の方法。

(項目 7 9)

前記げっ歯類が C 5 7 B L / 6 系統を含むマウスである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

前記 Y 染色体が、C 5 7 B L / 6 系統、1 2 9 系統、または B A L B / c 系統からのものである、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 1)

前記げっ歯類が、C 5 7 B L / 6 系統及び 1 2 9 系統を含むマウスである、項目 7 8 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8 2)

前記宿主胚が前桑実期胚であり、ステップ (e) が、前記宿主胚を前記胚盤胞期まで培養することをさらに含む、項目 5 6 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8 3)

前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、前記宿主胚への導入前に少なくとも 1 日間、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、1 0 日間、1 1 日間、1 2 日間、1 3 日間、2 週間、3 週間、または 4 週間の間、前記標的培地成分の存在下で培養される、項目 5 6 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8 4)

前記多能性細胞が、標的ゲノム遺伝子座に標的遺伝子改変を含む、項目 1 ~ 5 3 及び 5 6 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8 5)

前記標的遺伝子改変が、挿入、欠失、ノックアウト、ノックイン、点変異、またはこれらの組合せを含む、項目 8 4 に記載の方法。

(項目 8 6)

(h) 子孫を生成するために前記繁殖可能な F 0 X Y 雌非ヒト哺乳動物を交配させること

。

(項目 8 7)

少なくとも 5 %、少なくとも 1 0 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも

40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または全ての前記XY子孫が、表現型的に雄かつ繁殖可能である、項目86に記載の方法。

(項目88)

前記XY子孫には表現型的に雌がない、項目86または87に記載の方法。

(項目89)

前記交配が、前記繁殖可能なF0 XY雌非ヒト哺乳動物をコホートF0 XY雄非ヒト哺乳動物と交雑させて、ここで前記繁殖可能なF0 XY雌非ヒト哺乳動物及び前記F0 XY雄非ヒト哺乳動物が各々、遺伝子改変についてヘテロ接合体であること、ならびに前記遺伝子改変についてホモ接合体であるF1子孫非ヒト哺乳動物を得ることを含む、項目86～88のいずれか1項に記載の方法。

(項目90)

少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%の前記F0 XY子孫が、性成熟に達すると繁殖可能になる表現型的に雌のXY非ヒト哺乳動物である、項目1～29、51～53、及び56～89のいずれか1項に記載の方法。

(項目91)

繁殖可能な表現型的に雌のXY動物である前記F0 XY子孫の前記パーセンテージが、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上のより高い発現及び/または活性を有する非ヒト哺乳動物XY多能性細胞に由来するF0 XY子孫と比較した場合に、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の減少した発現及び/または活性を有する非ヒト哺乳動物XY多能性細胞に由来するF0 XY子孫ではより高い、項目90に記載の方法。

(項目92)

前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞に由来する前記F0雌の全てが、XY遺伝子型を有する、項目1～29、51～53、及び56～91のいずれか1項に記載の方法。

(項目93)

前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞に由来する少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%の前記F0 XY雌が、繁殖可能である、項目1～29、51～53、及び56～92のいずれか1項に記載の方法。

(項目94)

繁殖可能な前記F0 XY雌の前記パーセンテージが、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上のより高い発現及び/または活性を有する非ヒト哺乳動物XY多能性細胞に由来するF0 XY子孫と比較した場合に、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の減少した発現及び/または活性を有する非ヒト哺乳動物XY多能性細胞に由来するF0 XY子孫ではより高い、項目93に記載の方法。

(項目95)

前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞に由来する少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%の前記F0 XY雌が、少なくとも2匹、3匹、4匹、5匹、6匹、7匹、8匹、9匹、または10匹の仔を有する同腹仔を産生することができる、項目1～29、51～53、及び56～94のいずれか1項に記載の方法。

(項目96)

F0 XY雌または繁殖可能なF0 XY雌により産生される前記平均産子数が、Ddx3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上のより高い発現及び/または活性を有する非ヒト哺乳動物XY多能性細胞に由来するF0 XY雌または繁殖可能なF0

X Y 雌と比較した場合に、D d x 3 y、U t y、及びE i f 2 s 3 yのうち前記1つ以上の減少した発現及び/または活性を有する非ヒト哺乳動物X Y多能性細胞に由来するF 0 X Y 雌または繁殖可能なF 0 X Y 雌ではより高い、項目9 5に記載の方法。

(項目9 7)

前記ドナー非ヒト哺乳動物X Y多能性細胞に由来する少なくとも5 %、少なくとも1 0 %、少なくとも2 0 %、少なくとも3 0 %、少なくとも4 0 %、少なくとも5 0 %、少なくとも6 0 %、少なくとも7 0 %、少なくとも8 0 %、少なくとも9 0 %、または少なくとも9 5 %の前記F 0 X Y 雌が、それらの生涯において少なくとも2 匹、3 匹、4 匹、5 匹、6 匹、7 匹、8 匹、9 匹、または1 0 匹の同腹仔を産生することができる、項目1 ~ 2 9、5 1 ~ 5 3、及び5 6 ~ 9 6のいずれか1 項に記載の方法。

(項目9 8)

F 0 X Y 雌または繁殖可能なF 0 X Y 雌により産生される一生涯における同腹仔の前記平均数が、D d x 3 y、U t y、及びE i f 2 s 3 yのうち前記1つ以上のより高い発現及び/または活性を有する非ヒト哺乳動物X Y多能性細胞に由来するF 0 X Y 雌または繁殖可能なF 0 X Y 雌と比較した場合に、D d x 3 y、U t y、及びE i f 2 s 3 yのうち前記1つ以上の減少した発現及び/または活性を有する非ヒト哺乳動物X Y多能性細胞に由来するF 0 X Y 雌または繁殖可能なF 0 X Y 雌ではより高い、項目9 7に記載の方法。

(項目9 9)

F 0 X Y 雌または繁殖可能なF 0 X Y 雌により産生される一生涯における子孫の前記平均数が、D d x 3 y、U t y、及びE i f 2 s 3 yのうち前記1つ以上のより高い発現及び/または活性を有する非ヒト哺乳動物X Y多能性細胞に由来するF 0 X Y 雌または繁殖可能なF 0 X Y 雌と比較した場合に、D d x 3 y、U t y、及びE i f 2 s 3 yのうち前記1つ以上の減少した発現及び/または活性を有する非ヒト哺乳動物X Y多能性細胞に由来するF 0 X Y 雌または繁殖可能なF 0 X Y 雌ではより高い、項目1 ~ 2 9、5 1 ~ 5 3、及び5 6 ~ 9 8のいずれか1 項に記載の方法。