

【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 12 Q	1/6888	(2018.01)
C 12 N	5/0789	(2010.01)
C 12 N	5/0735	(2010.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)
A 01 K	67/027	(2006.01)
C 12 N	15/873	(2010.01)

【F I】

C 12 Q	1/6888	Z
C 12 N	5/0789	Z N A
C 12 N	5/0735	
C 12 N	5/10	
A 01 K	67/027	
C 12 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の中で培養し、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ピエント雌非ヒト哺乳動物に導入して、前記宿主胚を懷胎させることと、

(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娠可能になること

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 90 % 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の中で培養し、

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娠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、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 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

(II) 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、前記第2集団からの対照非ヒト哺乳動物XY多能性細胞と比較して、Dd_x3y、Ut_y、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、Dd_x3y、Ut_y、及びEif2s₃y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8~12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

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1~13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞の作製方法であって、

(a) 非ヒト哺乳動物XY多能性細胞の集団を、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) Dd_x3y、Ut_y、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) Dd_x3y、Ut_y、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、Dd_x3y、Ut_y、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とを含む、前記方法。

【請求項16】

(d) 前記ドナー非ヒト哺乳動物XY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XY非ヒト哺乳動物を含むF0 XY非ヒト哺乳動物子孫を得て、性成熟に達すると、前記F0の表現型的に雌のXY非ヒト哺乳動物が繁殖可能かつ妊娠可能になること

とをさらに含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

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、請求項15または16に記載の方法。

【請求項18】

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、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に培養された前記細胞と比較して、Dd_x3y、Ut_y、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、Dd_x3y、Ut_y、及びEif2s₃yの減少した発現及び/または活性を有する、請求項15~17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

ステップ(b)の前記アッセイによって、mRNAレベルでDd_x3y、Ut_y、及びEif2s₃y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、前記对照非ヒト哺乳動物 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 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

ステップ (a) の前記培地が、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低オスモル濃度培地である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

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 2 1 8 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こと、

(II) 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すること、

(III) 前記低オスモル濃度培地が、約 1 1 m S / c m ~ 約 1 3 m S / c m 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 5 0 m M ~ 約 1 1 0 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 5 0 m M ~ 約 1 1 0 m M の濃度で含むこと、

(VI) 前記基本培地が、炭酸塩を約 1 7 m M ~ 約 3 0 m M 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 1 3 m M ~ 約 2 5 m M の濃度で含むこと、

(VIII) 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、

(IX) 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、

(XI) 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、

(XII) 前記基本培地が、炭酸塩を約 1 8 m M ~ 約 4 4 m M の濃度で含むこと、

(XIII) 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 の濃度で含むこと、

(XIV) 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こと、ならびに

(XV) 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约 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こと

のうち 1 つ以上を有する、請求項 1 5 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

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 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

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 X Y 多能性細胞として、他方のアッセイした細胞と比較して、D d × 3 y 、 U t y 、 及び E i f 2 s 3 y 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 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

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、D d × 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 X Y 多能性細胞が、D d × 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、請求項 2 ~ 6 および 8 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が、胚性幹(E S)細胞であり、必要に応じて、前記 E S 細胞が、 V G F 1 マウス E S 細胞である、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

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 C 5 7 B L / 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、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り、必要に応じて、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、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記非ヒト哺乳動物 X Y 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 ~ 2 6 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】0 1 2 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 3】

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 X Y 多能性細胞において D d × 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、ならびに(b) 検出試薬を使用して、非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞が 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 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に培養し、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、

(b) D d × 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、

(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娠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の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

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7または8に記載の方法。

(項目10)

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X Y多能性細胞として、他方のアッセイした細胞と比較して、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、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、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(E S)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、V G F 1マウスE S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、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、

(VII) 前記基本培地が、約 8.5 mM ~ 約 13.0 mM 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 8.7 ± 5 mM の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、26.1 ± 2.6 mM / 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 5.0 mM ~ 約 11.0 mM の濃度で、及び炭酸塩を約 1.7 mM ~ 約 3.0 mM の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約 20.0 mM / kg ~ 約 32.9 mM / 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、21.8 mM / 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 5.0 mM ~ 11.0 mM の濃度で、及び重炭酸ナトリウムを 1.3 mM ~ 2.5 mM の濃度で含むこと

のうち 1 つ以上を有する、項目 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記基本培地が、炭酸塩を約 1.8 mM ~ 約 4.4 mM の濃度で含む、項目 17 または 18 に記載の方法。

(項目 20)

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 mM ~ 約 11.0 mM の濃度で含む、項目 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 21)

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 21.6 mM / kg ~ 約 32.2 mM / kg のオスモル濃度を有する、項目 17 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 22)

前記基本培地が、塩化ナトリウムを約 3 mg / mL の濃度で、及び重炭酸ナトリウムを約 2.2 mg / mL の濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約 21.6 mM / kg のオスモル濃度を有する、項目 17 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 23)

前記非ヒト哺乳動物が、げっ歯類である、項目 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 24)

前記げっ歯類がラットまたはマウスである、項目 23 に記載の方法。

(項目 25)

前記げっ歯類が C57BL / 6 系統を含むマウスである、項目 24 に記載の方法。

(項目 26)

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る、項目 25 に記載の方法。

(項目 27)

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、項目 24 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 28)

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 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 29)

前記非ヒト哺乳動物 XY 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、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 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 30)

ドナー非ヒト哺乳動物 XY 多能性細胞の作製方法であって、

(a) 非ヒト哺乳動物 XY 多能性細胞の集団を、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) Dd_x3y、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) Dd_x3y、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、Dd_x3y、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Dd_x3y、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Dd_x3y、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に培養された前記細胞と比較して、Dd_x3y、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、Dd_x3y、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、Dd_x3y、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、Dd_x3y、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、Dd_x3y、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、Dd_x3y、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 ± 5 mMの濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、 261 ± 26 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13mM～25mM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18mM～約44mM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50mM～約110mM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216mOsm/kg～約322mOsm/kg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3mg/mLの濃度で、及び重炭酸ナトリウムを約2.2mg/mLの濃度で含み、前記低オスモル濃度培地が、約216mOsm/kg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娠可能になること

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、 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、Dd×3y、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と、

(e) 前記ドナー非ヒト哺乳動物XY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XY非ヒト哺乳動物を含むF0 XY非ヒト哺乳動物子孫を得て、性成熟に達すると、前記F0の表現型的に雌のXY非ヒト哺乳動物が繁殖可能かつ妊娠可能になること

とを含む、前記方法。

(項目57)

ステップ(b)の前記アッセイによって、前記mRNAレベルでDd×3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の発現が検出される、項目56に記載の方法。

(項目58)

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Dd×3y、Uty、及びEif2s3yのうち前記1つ以上の発現が検出される、項目56に記載の方法。

(項目59)

前記第1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、Dd×3y、Uty、及びEif2s3y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56～58のいずれか1項に記載の方法。

(項目60)

前記第1集団からの前記1種以上の非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、Dd×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56～59のいずれか1項に記載の方法。

(項目61)

前記第1集団からの前記1種以上の非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、Dd×3y、Uty、及びEif2s3y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56～60のいずれか1項に記載の方法。

(項目62)

ステップ(d)の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に培養された前記細胞と比較して、Dd×3y、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、項目56～61のいずれか1項に記載の方法。

(項目63)

ステップ(d)の前記ドナー非ヒト哺乳動物XY多能性細胞が、前記第2集団からの対照非ヒト哺乳動物XY多能性細胞と比較して、Dd×3y、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、項目56～62のいずれか1項に記載の方法。

(項目64)

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、Dd×3y、Uty、及びEif2s3yの減少した発現及び／または活性を有する、項目62または63に記載の方法。

(項目65)

ステップ(b)が、Dd×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 (d) が、前記ドナー非ヒト哺乳動物 X Y 多能性細胞として、他方のアッセイした細胞と比較して、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 5 6 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 6)

前記ドナー非ヒト哺乳動物 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、項目 5 6 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 7)

前記ドナー非ヒト哺乳動物 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、項目 5 6 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 8)

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 5 6 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 9)

前記多能性細胞が、胚性幹 (E S) 細胞である、項目 5 6 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 0)

前記多能性細胞が、 V G F 1 マウス E S 細胞である、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 1)

ステップ (a) の前記培地が、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低オスモル濃度培地である、項目 5 6 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 2)

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 2 1 8 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こと、

(I 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すること、

(I I I) 前記低オスモル濃度培地が、約 1 1 m S / c m ~ 約 1 3 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 5 0 m M ~ 約 1 1 0 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 5 0 m M ~ 約 1 1 0 m M の濃度で含むこと、

(V I) 前記基本培地が、炭酸塩を約 1 7 m M ~ 約 3 0 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 1 3 m M ~ 約 2 5 m M 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 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

をさらに含む、項目 1 ~ 2 9 、5 1 ~ 5 3 、及び 5 6 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(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、
Dd x 3y、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、
Dd x 3y、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、Dd x 3y、Uty、及びEif
2s3y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、Dd x 3y、Uty、及びE
if2s3y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、Dd x
3y、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 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 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 10 匹の同腹仔を産生することができる、項目 1 ~ 29 、 51 ~ 53 、及び 56 ~ 96 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 ~ 29 、 51 ~ 53 、及び 56 ~ 98 のいずれか 1 項に記載の方法。