

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7324583号

(P7324583)

(45)発行日 令和5年8月10日(2023.8.10)

(24)登録日 令和5年8月2日(2023.8.2)

(51)国際特許分類

F I

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

A 0 1 K

67/027

Z N A

C 1 2 N 15/06 (2006.01)

C 1 2 N

15/06

1 0 0

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N

15/13

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N

15/62

C 1 2 N 15/877 (2010.01)

C 1 2 N

15/877

Z

請求項の数 32 (全205頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-560977(P2018-560977)

(86)(22)出願日 平成29年5月19日(2017.5.19)

(65)公表番号 特表2019-518454(P2019-518454 A)

(43)公表日 令和1年7月4日(2019.7.4)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/033648

(87)国際公開番号 WO2017/201476

(87)国際公開日 平成29年11月23日(2017.11.23)

審査請求日 令和2年5月8日(2020.5.8)

(31)優先権主張番号 62/339,472

(32)優先日 平成28年5月20日(2016.5.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/368,604

(32)優先日 平成28年7月29日(2016.7.29)

最終頁に続く

(73)特許権者 597160510

リジェネロン・ファーマシューティカル

ズ・インコーポレイテッド

REGENERON PHARMACE

UTICALS, INC.

アメリカ合衆国10591-6707ニ

ューヨーク州タリータウン、オールド・

ソー・ミル・リバー・ロード777番

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ボロニナ, ベラ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1059

1, タリータウン, オールド ソー ミ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 複数のガイドRNAを使用して免疫寛容を破綻させるための方法

(57)【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マウスを作製することで

あって、

(i) マウス1細胞期胚にまたはマウス胚性幹(ES)細胞に、

(I) Cas9タンパク質または前記Cas9タンパク質をコードする核酸と、

(II) 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、

(III) 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、

を導入することであって、前記マウス1細胞期胚が、BALB/c系統、C57BL/6系統、および129系統の組み合わせの遺伝的背景に由来するものであり、そして、前記マウスES細胞が、BALB/c系統、C57BL/6系統、および129系統のミ

ックスに由来するものであり、前記マウス1細胞期胚および前記マウスES細胞が、少なくとも25%、BALB/c系統に由来している、ことと、

(ii) 前記標的ゲノム遺伝子座に二対立遺伝子改変を有する、改変マウス1細胞期胚、または改変マウスES細胞を同定することであって、前記改変マウス1細胞期胚または前記改変マウスES細胞における前記自己抗原の発現が排除される、前記同定することと、

(iii) 追加の交配工程なしに、前記改変マウス1細胞期胚または前記改変マウスES細胞から遺伝子組換えマウスを作製することであって、

前記標的ゲノム遺伝子座は、前記遺伝子組換えマウスにおける前記自己抗原の発現が排除されるように、前記遺伝子組換えマウス内における対応する第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マウスを前記目的の外来抗原で免疫化することと、

(c) 前記遺伝子組換えマウスを、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、

前記遺伝子組換えマウスは、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Cas9タンパク質が、二本鎖切断誘導活性を有し、前記Cas9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、マウス1細胞期胚であり、工程(a)(iii)における遺伝子組換えマウスを作製することは、前記改変マウス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マウスを作製することを含むか、または

(II) 工程(a)(i)における前記細胞または胚が、前記マウスES細胞であり、工程(a)(iii)における遺伝子組換えマウスを作製することは、前記改変マウスES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マウス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】

前記免疫化した遺伝子組換えマウスから単離した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3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記免疫化した遺伝子組換えマウスから、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、

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、前記遺伝子組換えマウスのリンパ球から、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、前記遺伝子組換えマウス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

10

20

30

40

50

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 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

(I) 前記遺伝子組換えマウス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マウスを前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記対照マウス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マウスを前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記対照マウス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、前記遺伝子組換えマウス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マウスにより産生される、および／または

(III) 前記遺伝子組換えマウス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マウスを前記目的の外来抗原で免疫化した後の前記対照マウス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) 前記遺伝子組換えマウス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 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

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 1 kb 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 kb 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 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

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 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

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 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 0.1 kb ～ 約 200 kb の二対立遺伝子欠失を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

(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 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 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むか、または

(II) 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 1, 000 ヌクレオチド以内であり、前記改変は、前記自己抗原

10

20

30

40

50

をコードする前記遺伝子の開始コドンの二対立遺伝子欠失を含む、
請求項 1 から請求項 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記導入工程 (a) (i) は、前記マウス ES 細胞または前記マウス 1 細胞期胚に、
(IV) 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、

(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 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

(I) 工程 (a) (i) における前記細胞または胚がマウス ES 細胞であり、工程 (a)
(i) が前記 Cas9 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 Cas9 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 DN
A 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マウス ES
細胞に導入されるか、または

(II) 工程 (a) (i) における前記細胞または胚がマウス 1 細胞期胚であり、工程
(a) (i) が前記 Cas9 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 Cas9 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マウス 1 細胞期胚に導入される、請求項 1
から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

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 13
のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

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マウス 1 細
胞期胚であり、前記外来修復テンプレートの長さが 5 kb 以下である場合、前記マウス E
S 細胞または前記マウス 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 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

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、

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 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記外来修復テンプレートは、50 ヌクレオチド長～1 kb 長であり、必要に応じて、

10

20

30

40

50

前記外来修復テンプレートは、80ヌクレオチド長～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15または16に記載の方法。

【請求項18】

工程(a)(i)の前記細胞または胚は前記マウスES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15または16に記載の方法。

10

【請求項19】

前記マウスはヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む、請求項1から請求項18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記マウス1細胞期胚および前記マウスES細胞が、少なくとも50%、または、少なくとも75%、BALB/c系統に由来している、請求項1から19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

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20に記載の方法。

20

【請求項22】

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1から請求項21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

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、

30

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、

(II)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、

40

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、(II)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22に記載の方法。

【請求項24】

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

50

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1から請求項23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

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_κ1-39/J_κ5遺伝子セグメントまたはヒトV_κ3-20/J_κ1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24に記載の方法。

【請求項26】

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プ軽鎖可変領域遺伝子である単一免疫グロブリンカップ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プ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プ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プ軽鎖は、前記再構成ヒト生殖細胞系カップ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プ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プ軽鎖を含む抗体、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プ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プ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24に記載の方法。

【請求項27】

前記マウスは、その生殖細胞系内において、

(a) 再構成V_κ/J_κ配列の内在マウスκ免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入であって、以下：

(i) 単一ヒト生殖細胞系V_κ配列であって、

前記単一ヒト生殖細胞系V_κ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_κ配列と、

(ii) 単一ヒト生殖細胞系J_κ配列であって、

前記再構成V_κ/J_κ配列は前記内在マウスκ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_κ配列と、

10

20

30

40

50

を含む前記再構成 V_κ / J_κ 配列の内在マウス κ 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 24 に記載の方法。

【請求項 28】

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、請求項 22 から請求項 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

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グ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 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 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 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か、または

(II) 前記第 1 および第 2 のガイド RNA 認識配列は異なり、前記第 1 および第 2 のガイド RNA 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 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 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

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、

10

20

30

40

50

(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 29 に記載の方法。

【請求項 31】

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 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に、

(b) 再構成 V κ / J κ 配列の内在マウス κ 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入であって、以下：

(i) 単一ヒト生殖細胞系 V κ 配列であって、

前記単一ヒト生殖細胞系 V κ 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 κ 配列と、

(ii) 単一ヒト生殖細胞系 J κ 配列であって、

前記再構成 V κ / J κ 配列は前記内在マウス κ 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 κ 配列と、

を含む前記再構成 V κ / J κ 配列の内在マウス κ 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 29 に記載の方法。

【請求項 32】

請求項 1 から請求項 31 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記マウス ES 細胞はハイブリッド細胞であり、または、前記マウス 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 bp 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 bp 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。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

E F S W E B を利用しテキストファイルで提出した配列表の参照

2017年5月18日に作製されたファイル497023SEQLIST.txtに記載の配列表は38.3キロバイトであり、参照として本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

「非自己」タンパク質を用いた非ヒト動物（例えば、マウスまたはラットなどのげっ歯類）の免疫化は、モノクローナル抗体などの特定の抗原結合タンパク質を得るために一般的に使用されている方法である。しかしながら、この手法は、非ヒト動物の天然タンパク質と、非ヒト動物の免疫機構が免疫原を非自己（すなわち、外来）と認識可能となるように免疫化されたタンパク質の間における、配列の相違に依存している。自己抗原との高度な相同性を有する抗原に対する抗体の産生は、免疫寛容に起因して困難な課題となる場合がある。タンパク質の機能的に重要な領域は種を超えて保存される傾向があることから、自己抗原に対する免疫寛容が、これらの重要なエピトープに対する抗体の産生における問題を提起する場合が多い。

10

【0003】

様々なゲノム遺伝子座への標的化が進展してはいるが、依然として、従来の標的化戦略では効率的に標的化できない多くのゲノム遺伝子座、または、効率的に達成できない多くのゲノム改変が残っている。C R I S P R / C a s システムがゲノム編集のための新しいツールを提供してはいるが、依然として問題点は残っている。例えば、特に真核細胞及び真核生物において、大きな標的ゲノム欠失またはその他の大きな標的遺伝子改変を生成しようとする一部の状況において、依然として問題が発生することがある。

20

【0004】

加えて、それに続く交配工程を伴わずに標的遺伝子改変にホモ接合性な細胞または動物を効率的に作製することが困難な場合があり、一部の遺伝子座においては、その他と比較して、ホモ接合性標的改変を生成するために標的とすることがより困難となる場合がある。例えば、従来の標的化戦略により、大きな標的ゲノム欠失にヘテロ接合性なF0世代マウスを得られる場合があるが、それに続くこれらヘテロ接合性マウスの交配では、欠失にホモ接合性なF1世代マウスを作製することが必要となる。これら追加の交配工程には費用と時間がかかる。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

目的の外来抗原に対する寛容が抑制された非ヒト動物を作製するための方法及び組成物、ならびに、このような動物を使用して目的の外来抗原に結合する抗原結合タンパク質を産生するための方法及び組成物を提供する。一態様では、本発明は、(a) 1細胞期胚ではない非ヒト動物多能性細胞のゲノムを、(i) Cas9タンパク質、(ii) 第1の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（第1の標的ゲノム遺伝子座は、目的の外来抗原と相同であるまたは目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する第1の自己抗原の発現に影響を及ぼす）、及び(iii) 第1の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（第1の標的ゲノム遺伝子座は、第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変されて、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、第1の自己抗原の発現は抑制される）と接触させること、(b) 改変非ヒト動物多能性細胞を宿主胚に導入すること、及び(c) 宿主胚を代理母に移植して、第1の自己抗原の発現が抑制されるように、第1の標的ゲノム遺伝子座が第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変された遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を作製すること、を含む、目的の外来抗原に対する寛容が抑制された非ヒト動物を作製するための方法を提供する。任意選択的に、多能性細胞は胚性幹(ES)細胞である。任意選択的に、接触させることは、Cas9タンパク質、第1のガイドRNA及び第2のガイドRNAを、ヌクレオフェクションで非ヒト動物多能

40

50

性細胞に導入することを含む。任意選択的に、Cas9タンパク質は、Cas9タンパク質をコードするDNAの形態で非ヒト動物多能性細胞に導入され、第1のガイドRNAは、第1のガイドRNAをコードするDNAの形態で非ヒト動物多能性細胞に導入され、第2のガイドRNAは、第2のガイドRNAをコードするDNAの形態で非ヒト動物多能性細胞に導入される。

【0006】

一部のこのような方法では、接触工程(a)は、ゲノムを、(iv)第1の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)第1の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と接触させることを更に含む。一部のこのような方法では、接触工程(a)は、ゲノムを、(iv)第2の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(第2の標的ゲノム遺伝子座は、目的の外来抗原と相同であるまたは目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する第1の自己抗原または第2の自己抗原の発現に影響を及ぼす)、及び／または、(v)第2の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と接触させることを更に含む。

10

【0007】

一部のこのような方法では、接触工程(a)は、ゲノムを、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と接触させることを更に含む。任意選択的に、外来修復テンプレートは、5'ホモロジーアームと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。一部のこのような方法では、核酸インサートは、第1の標的ゲノム遺伝子座に対して相同またはオルソログである。一部のこのような方法では、外来修復テンプレートは、約50ヌクレオチド長〜約1kb長である。一部のこのような方法では、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る。一部のこのような方法では、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。一部のこのような方法では、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)であり、及び／または、外来修復テンプレートは、LTVECの5'ホモロジーアームと3'ホモロジーアームの総合計が少なくとも10kb長のLTVECである。

20

30

【0008】

一部のこのような方法は、(d)工程(c)で作製した遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を目的の外来抗原で免疫化すること、(e)遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を、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、及び(f)遺伝子組換えF0世代非ヒト動物から、ヒト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、ヒト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。

【0009】

一部のこのような方法では、目的の外来抗原で遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を免疫化した後に得られた目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質は、第1の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免疫化した後に得られた抗原結合タンパク質と比較して、より高い力価を有している。一部のこのような方法では、第1の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免疫化した後に得られた抗原結合タンパク質と比較して、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、目的の外来抗原で遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を免疫化した後に得られる。

40

【0010】

一部のこのような方法では、第1の自己抗原の発現は排除される。

【0011】

一部のこのような方法では、目的の外来抗原は第1の自己抗原のオルソログである。一部のこのような方法では、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か

50

、それらから本質的になるか、または、それらからなる。

【0012】

一部のこのような方法では、第1の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。一部のこのような方法では、第1の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。一部のこのような方法では、接触工程(a)は、ゲノムを、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と接触させることを含み、ゲノムが1細胞期胚内に存在する場合、外来修復テンプレートは5kb長以下であり、外来修復テンプレートは、5'ホモロジーアームと3'ホモロジーアームに隣接する核酸インサートを含み、核酸インサートは、欠失核酸配列に対して相同またはオルソログスであり、核酸インサートは欠失核酸配列を置換する。一部のこのような方法では、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。一部のこのような方法では、接触工程(a)は、ゲノムを、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と接触させることを含み、ゲノムが1細胞期胚内に存在する場合、外来修復テンプレートは5kb長以下であり、欠失核酸配列は、5'標的配列と3'標的配列の間の核酸配列からなる。

10

【0013】

一部のこのような方法では、第1の標的ゲノム遺伝子座は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、改変は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部のホモ接合性欠失を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、改変は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンのホモ接合性破壊を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。

20

【0014】

一部のこのような方法では、第1のガイドRNA認識配列は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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、第2のガイドRNA認識配列は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含むか、または、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る。任意選択的に、第1のガイドRNA認識配列は開始コドンを含み、第2のガイドRNA認識配列は終止コドンを含む。一部のこのような方法では、第1のガイドRNA認識配列は第1のCas9開裂部位を含み、第2のガイドRNA認識配列は第2のCas9開裂部位を含み、第1の標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、第1のCas9開裂部位と第2のCas9開裂部位の間の欠失を含む。任意選択的に、欠失は正確な欠失であり、欠失核酸配列は、第1のCas9開裂部位と第2のCas9開裂部位の間の核酸配列からなる。

30

【0015】

一部のこのような方法では、第1と第2のガイドRNA認識配列は異なり、第1と第2のガイドRNA認識配列のそれぞれは、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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る。任意選択的に、第1と第2のガイドRNA認識配列のそれぞれは開始コドンを含む。

40

【0016】

一部のこのような方法では、第1の核酸配列及び／または第2の核酸配列は、遺伝子組換え非ヒト動物のリンパ球から、または、リンパ球から作製したハイブリドーマから得られる。

【0017】

50

一部のこのような方法では、非ヒト動物はヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含む。一部のこのような方法では、非ヒト動物はげっ歯類である。一部のこのような方法では、げっ歯類はマウスである。任意選択的に、マウス系統はBALB/c系統を含む。任意選択的に、マウス系統は、BALB/c系統、C57BL/6系統及び129系統を含む。任意選択的に、マウス系統は、50% BALB/c、25% C57BL/6、及び25% 129である。任意選択的に、マウスのMHCハプロタイプはMHC^{b/d}である。

【0018】

一部のこのような方法では、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。任意選択的に、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、マウス免疫グロブリン遺伝子座は重鎖遺伝子座である。任意選択的に、ヒト非再構成可変領域遺伝子セグメントは軽鎖セグメントであり、マウス免疫グロブリン遺伝子座は軽鎖遺伝子座である。任意選択的に、軽鎖遺伝子セグメントはヒトカッパまたはラムダ軽鎖遺伝子セグメントである。一部のこのような方法では、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、マウスはヒト定常領域遺伝子を欠き、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。一部のこのような方法では、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（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、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）、及び(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（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）、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、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。一部のこのような方法では、マウスは免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含み、改変は内在ADAM6機能を抑制または排除し、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、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する。任意選択的に、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は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座に存在する。任意選択的に、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は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座以外の位置に存在する。

【0019】

一部のこのような方法では、マウスは、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む。任意選択的に、軽鎖定常領域遺伝子はマウス遺伝子である。一部のこのような方法では、マウスは、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。任意選択的に、重鎖定常領域遺伝子はマウス遺伝子である。一部のこのような方法では、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、マウスは単一軽鎖を発現する。一部のこのような方法では、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)（単一再構成ヒトV_L/J_L領域は、ヒトV_κ1-39/J遺伝子セグメントまたはヒトV_κ3-20/J遺伝子セグメントから選択される）、及び(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（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、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）を含む。一部のこのような方法では、マウスは抗体の集団を発現し、マウスの生殖細胞系は、再構成ヒト生殖細胞系カップ軽鎖可変領域遺伝子である単一免疫グロブリンカップ軽鎖可変領域遺伝子のみを含み、マウスは、1つのコピーのみを含有するという点で単一免疫グロブリンカップ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単一免疫グロブリンカップ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、マウスは、(i) 集団のそれぞれの免疫グロブリンカップ軽鎖は、再構成ヒト生殖細胞系カップ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) 集団は、その軽鎖可変ドメインが再構成ヒト生殖細胞系カップ軽鎖可変領域遺伝子によりコードされる免疫グロブリンカップ軽鎖を含む抗体、及び、その軽鎖可変ドメインがその体細胞変異体によりコードされる免疫グロブリンカップ軽鎖を含む抗体を含み、(iii) マウスは、免疫グロブリンカップ軽鎖と成功裏にペアとなり集団の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。任意選択的に、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_K 配列（単一ヒト生殖細胞系 V_K 配列は配列番号：148または配列番号：149内に存在する）、及び(ii) 単一ヒト生殖細胞系 J_K 配列、を含む再構成 V_K/J_K 配列の内在マウス K 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に（再構成 V_K/J_K 配列は内在マウス K 定常領域と機能的に連結する）、及び(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に（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、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）ヘテロ接合性またはホモ接合性である。一部のこのような方法では、マウスは免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含み、改変は内在 $ADAM6$ 機能を抑制または排除し、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、 $ADAM6$ 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する。任意選択的に、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は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座に存在する。任意選択的に、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は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座以外の位置に存在する。

【0020】

一部のこのような方法では、マウスは、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含むゲノムを有し、改変は内在 $ADAM6$ 機能を抑制または排除し、マウスは、非ヒト動物 $ADAM6$ タンパク質、またはそのオルソログもしくは相同体、もしくは対応する $ADAM6$ タンパク質の機能性フラグメントをコードする核酸配列を更に含む。任意選択的に、マウスのゲノムは、(a) $ADAM6$ 遺伝子の異所性配置、及び(b) 内在非ヒト動物重鎖遺伝子座内への、1つまたは複数のヒト V_H 遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒト D_H 遺伝子セグメント、及び1つまたは複数のヒト J_H 遺伝子セグメントの挿入を含むヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座、を含み、ヒト V_H 、 D_H 及び J_H 遺伝子セグメントが重鎖定常領域遺伝子と機能的に連結しているために、マウスは、(i) 生殖能力があり、(ii) 抗原で免疫化した場合に、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる重鎖定常ドメインと機能的に連結した1つまたは複数のヒト V_H 遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒト D_H 遺伝子セグメント、及び1つまたは複数のヒト J_H 遺伝子セグメントによりコードされる重鎖可変ドメインを含む抗体を産生すること（抗体は抗原に対する特異的結合を示す）を特徴とする。

【0021】

一部のこのような方法では、非ヒト動物は、少なくとも部分的に $BALB/c$ 系統に由来するマウスであり、マウスはヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、目的の外来抗原は

10

20

30

40

50

、第1の自己抗原に対してオルソログなヒトタンパク質の全てまたは一部であり、第1の標的ゲノム遺伝子座は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含み、第1のガイドRNA認識部位は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含み、第2のガイドRNA認識部位は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含み、改変は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部のホモ接合性欠失を含み、それにより第1の自己抗原の発現は排除される。任意選択的に、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(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する)、(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(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、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)、及び(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(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)、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、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。任意選択的に、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(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する)、(b) (i) 単一ヒト生殖細胞系V κ 配列(単一ヒト生殖細胞系V κ 配列は配列番号: 148または配列番号: 149内に存在する)、及び(ii) 単一ヒト生殖細胞系J κ 配列、を含む再構成V κ /J κ 配列の内在マウス κ 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に(再構成V κ /J κ 配列は内在マウス κ 定常領域と機能的に連結する)、及び(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に(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、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 κ 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)ヘテロ接合性またはホモ接合性である。

【0022】

一部のこのような方法では、非ヒト動物は、少なくとも部分的にBALB/c系統に由来するマウスであり、マウスはヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、目的の外来抗原は、第1の自己抗原に対してオルソログなヒトタンパク質の全てまたは一部であり、第1の標的ゲノム遺伝子座は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含み、第1のガイドRNA認識部位は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含み、第2のガイドRNA認識部位は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含み、改変は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンのホモ接合性破壊を含み、それにより第1の自己抗原の発現は排除される。任意選択的に、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(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する)、(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(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、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)、及び(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(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)、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、

10

20

30

40

50

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、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。任意選択的に、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(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する)、(b) (i) 単一ヒト生殖細胞系V κ 配列(単一ヒト生殖細胞系V κ 配列は配列番号: 148または配列番号: 149内に存在する)、及び(ii) 単一ヒト生殖細胞系J κ 配列、を含む再構成V κ /J κ 配列の内在マウス κ 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に(再構成V κ /J κ 配列は内在マウス κ 定常領域と機能的に連結する)、及び(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に(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、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) ヘテロ接合性またはホモ接合性である。

【0023】

一部の方法では、非ヒト動物多能性細胞はハイブリッド細胞であり、方法は、(a') 第1の標的ゲノム遺伝子座内の相同染色体対の対応する第1の染色体の配列と第2の染色体の配列を比較して、第1の標的ゲノム遺伝子座内の標的領域を選択した後に、第1の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、相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の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標的領域に基づいて接触工程(a)を実施することを更に含む。任意選択的に、標的領域は、第1の標的ゲノム遺伝子座の残部と比較して、相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間のより高いパーセンテージの配列同一性を有する。任意選択的に、標的領域は、対応する第1の染色体と第2の染色体の間の少なくとも99.9%の配列同一性を有し、第1の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の染色体の間の99.8%以下の配列同一性を有する。任意選択的に、標的領域は、相同染色体対の対応する第1及び第2の染色体において同一である。任意選択的に、標的領域は、第1の標的ゲノム遺伝子座内の連続対立遺伝子配列同一性の最長可能ストレッチ内に存在する。

【0024】

一部のこのような方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列、及び、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10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列、ならびに、第2のガイドRNA認識配列、及び、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10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程(a')は、第1の標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上のセグメントを比較して(それぞれのセグメントは、ゲノム内の他の箇所には存在しない異なるガイドRNA認識配列、及び、異なるガイドRNA認識配列の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2

k b、3 k b、4 k b、5 k b、6 k b、7 k b、8 k b、9 k b、10 k b、20 k b、30 k b、40 k b、50 k b、60 k b、70 k b、80 k b、90 k b、100 k b、110 k b、120 k b、130 k b、140 k bまたは150 k bの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる）、その他のセグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有する2つのセグメントを標的領域として選択すること、を含む。任意選択的に、1つまたは複数のセグメントは、第1の標的ゲノム遺伝子座内のそれぞれの異なるガイドRNA認識配列に相当するがゲノム内の他の箇所には存在しないセグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。

【0025】

一部のこのような方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間の領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程(a')は、第1の標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上のセグメントを比較して（それぞれのセグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない）、その他のセグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有するセグメントを標的領域として選択すること、を含む。任意選択的に、1つまたは複数のセグメントは、第1の標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当するセグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

【0026】

一部のこのような方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間の領域、及び、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間のゲノム領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10 bp、20 bp、30 bp、40 bp、50 bp、100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1,000 bp、1 kb、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、10 kb、20 kb、30 kb、40 kb、50 kb、60 kb、70 kb、80 kb、90 kb、100 kb、110 kb、120 kb、130 kb、140 kbまたは150 kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程(a')は、第1の標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上のセグメントを比較して（それぞれのセグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域、及び、異なるガイドRNA認識配列ペア間のゲノム領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10 bp、20 bp、30 bp、40 bp、50 bp、100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1,000 bp、1 kb、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、10 kb、20 kb、30 kb、40 kb、50 kb、60 kb、70 kb、80 kb、90 kb、100 kb、110 kb、120 kb、130 kb、140 kbまたは150 kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない）、その他のセグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有するセグメントを標的領域として選択すること、を含む。任意選択的に、1つまたは複数のセグメントは、第1の標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当するセグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

【0027】

一部のこのような方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間のゲノム領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10 bp、20 bp、30 bp、40 bp、50 bp、100 bp、200 bp、300 bp、

10

20

30

40

50

400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程(a')は、第1の標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上の非連続セグメントを比較して(それぞれの非連続セグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域、及び、異なるガイドRNA認識配列ペア間のゲノム領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない)、その他の非連続セグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有する非連続セグメントを標的領域として選択すること、を含む。任意選択的に、1つまたは複数の非連続セグメントは、第1の標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当する非連続セグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

10

20

【0028】

一部のこのような方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間のゲノム領域の両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程(a')は、第1の標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上の非連続セグメントを比較して(それぞれの非連続セグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域、及び、異なるガイドRNA認識配列ペア間のゲノム領域の両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない)、その他の非連続セグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有する非連続セグメントを標的領域として選択すること、を含む。任意選択的に、1つまたは複数の非連続セグメントは、第1の標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当する非連続セグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

30

40

【0029】

一部のこのような方法では、工程(a')の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列に隣接する領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程(a')の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列に隣接及び含有する領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程(a')の標的領域は、5'標的配列及び／または3'標的配列を含

50

むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程（a'）の標的ゲノム遺伝子座は、5'標的配列及び3'標的配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程（a'）の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列の間の領域、及び、5'標的配列と3'標的配列の間の領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程（a'）の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列の間の領域、及び、5'標的配列と3'標的配列の間の領域の両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程（a'）の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列の間の領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程（a'）の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列の間の領域の両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。

【0030】

別の態様では、本発明は、（a）非ヒト動物1細胞期胚のゲノムを、（i）Cas9タンパク質、（ii）第1の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（第1の標的ゲノム遺伝子座は、目的の外来抗原と相同であるまたは目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する第1の自己抗原の発現に影響を及ぼす）、及び（iii）第1の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と接触させること（第1の標的ゲノム遺伝子座は、第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変されて、二対立遺伝子改変を生成し、第1の自己抗原を発現する改変非ヒト動物1細胞期胚は減少する）、及び（b）改変非ヒト動物1細胞期胚を代理母に移植して、第1の自己抗原の発現が抑制されるように、第1の標的ゲノム遺伝子座が第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変された遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を作製すること、を含む、目的の外来抗原に対する寛容が抑制された非ヒト動物を作製するための方法を提供する。任意選択的に、接触させることは、Cas9タンパク質、第1のガイドRNA及び第2のガイドRNAを、ヌクレオフェクションで非ヒト動物1細胞期胚に導入することを含む。任意選択的に、Cas9タンパク質は、Cas9タンパク質をコードするDNAの形態で非ヒト動物1細胞期胚に導入され、第1のガ

10

20

30

40

50

イドRNAは、第1のガイドRNAをコードするDNAの形態で非ヒト動物1細胞期胚に導入され、第2のガイドRNAは、第2のガイドRNAをコードするDNAの形態で非ヒト動物1細胞期胚に導入される。

【0031】

一部のこのような方法では、接触工程(a)は、ゲノムを、(iv)第1の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)第1の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と接触させることを更に含む。一部のこのような方法では、接触工程(a)は、ゲノムを、(iv)第2の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(第2の標的ゲノム遺伝子座は、目的の外来抗原と相同であるまたは目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する第1の自己抗原または第2の自己抗原の発現に影響を及ぼす)、及び／または、(v)第2の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と接触させることを更に含む。

10

【0032】

一部のこのような方法では、接触工程(a)は、ゲノムを、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と接触させることを更に含み、外来修復テンプレートは、約50ヌクレオチド長〜約5kb長である。任意選択的に、外来修復テンプレートは、5'ホモロジーアームと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。一部のこのような方法では、核酸インサートは、第1の標的ゲノム遺伝子座に対して相同またはオルソログである。一部のこのような方法では、外来修復テンプレートは、約50ヌクレオチド長〜約1kb長である。一部のこのような方法では、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る。一部のこのような方法では、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。

20

【0033】

一部のこのような方法は、(c)工程(b)で作製した遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を目的の外来抗原で免疫化すること、(d)遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を、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、及び(e)遺伝子組換えF0世代非ヒト動物から、ヒト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、ヒト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。

30

【0034】

一部のこのような方法では、目的の外来抗原で遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を免疫化した後に得られた目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質は、第1の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免疫化した後に得られた抗原結合タンパク質と比較して、より高い力価を有している。一部のこのような方法では、第1の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免疫化した後に得られた抗原結合タンパク質と比較して、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、目的の外来抗原で遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を免疫化した後に得られる。

40

【0035】

一部のこのような方法では、第1の自己抗原の発現は排除される。

【0036】

一部のこのような方法では、目的の外来抗原は第1の自己抗原のオルソログである。一部のこのような方法では、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か、それらから本質的になるか、または、それらからなる。

【0037】

一部のこのような方法では、第1の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

50

数のヌクレオチドの置換を含む。一部のこのような方法では、第1の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。一部のこのような方法では、接触工程(a)は、ゲノムを、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と接触させることを含み、ゲノムが1細胞期胚内に存在する場合、外来修復テンプレートは5 kb長以下であり、外来修復テンプレートは、5'ホモロジーアームと3'ホモロジーアームに隣接する核酸インサートを含み、核酸インサートは、欠失核酸配列に対して相同またはオルソロガスであり、核酸インサートは欠失核酸配列を置換する。一部のこのような方法では、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。一部のこのような方法では、接触工程(a)は、ゲノムを、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と接触させることを含み、ゲノムが1細胞期胚内に存在する場合、外来修復テンプレートは5 kb長以下であり、欠失核酸配列は、5'標的配列と3'標的配列の間の核酸配列からなる。

【0038】

一部のこのような方法では、第1の標的ゲノム遺伝子座は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、改変は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部のホモ接合性欠失を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、改変は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンのホモ接合性破壊を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。

【0039】

一部のこのような方法では、第1のガイドRNA認識配列は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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、第2のガイドRNA認識配列は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含むか、または、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る。任意選択的に、第1のガイドRNA認識配列は開始コドンを含み、第2のガイドRNA認識配列は終止コドンを含む。一部のこのような方法では、第1のガイドRNA認識配列は第1のCas9開裂部位を含み、第2のガイドRNA認識配列は第2のCas9開裂部位を含み、第1の標的ゲノム遺伝子座は、改変されて、第1のCas9開裂部位と第2のCas9開裂部位の間の欠失を含む。任意選択的に、欠失は正確な欠失であり、欠失核酸配列は、第1のCas9開裂部位と第2のCas9開裂部位の間の核酸配列からなる。

【0040】

一部のこのような方法では、第1と第2のガイドRNA認識配列は異なり、第1と第2のガイドRNA認識配列のそれぞれは、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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る。任意選択的に、第1と第2のガイドRNA認識配列のそれぞれは開始コドンを含む。

【0041】

一部のこのような方法では、第1の核酸配列及び／または第2の核酸配列は、遺伝子組換え非ヒト動物のリンパ球から、または、リンパ球から作製したハイブリドーマから得られる。

【0042】

一部のこのような方法では、非ヒト動物はヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含む。一部のこのような方法では、非ヒト動物はげっ歯類である。一部のこのような方法では、げっ歯類はマウスである。任意選択的に、マウス系統はBALB/c系統を含む。任意選択的に、マウス系統は、BALB/c系統、C57BL/6系統及び129系統を含む。任意

10

20

30

40

50

選択的に、マウス系統は、50% BALB/c、25% C57BL/6、及び25% 129である。任意選択的に、マウスのMHCハプロタイプはMHC^{b/d}である。

【0043】

一部のこのような方法では、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。任意選択的に、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、マウス免疫グロブリン遺伝子座は重鎖遺伝子座である。任意選択的に、ヒト非再構成可変領域遺伝子セグメントは軽鎖セグメントであり、マウス免疫グロブリン遺伝子座は軽鎖遺伝子座である。任意選択的に、軽鎖遺伝子セグメントはヒトカッパまたはラムダ軽鎖遺伝子セグメントである。一部のこのような方法では、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、マウスはヒト定常領域遺伝子を欠き、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。一部のこのような方法では、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（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、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）、及び(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（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）、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、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。一部のこのような方法では、マウスは免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含み、改変は内在ADAM6機能を抑制または排除し、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、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する。任意選択的に、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は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座に存在する。任意選択的に、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は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座以外の位置に存在する。

【0044】

一部のこのような方法では、マウスは、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む。任意選択的に、軽鎖定常領域遺伝子はマウス遺伝子である。一部のこのような方法では、マウスは、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。任意選択的に、重鎖定常領域遺伝子はマウス遺伝子である。一部のこのような方法では、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、マウスは単一軽鎖を発現する。一部のこのような方法では、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)（単一再構成ヒトV_L/J_L領域は、ヒトV_κ1-39/J遺伝子セグメントまたはヒトV_κ3-20/J遺伝子セグメントから選択される）、及び(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（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、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）を含む。一部のこのような方法では、マウスは抗体の集団を発現し、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、マウスは、1つのコピーのみ

を含有するという点で単一免疫グロブリンカップ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単一免疫グロブリンカップ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、マウスは、(i) 集団のそれぞれの免疫グロブリンカップ軽鎖は、再構成ヒト生殖細胞系カップ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) 集団は、その軽鎖可変ドメインが再構成ヒト生殖細胞系カップ軽鎖可変領域遺伝子によりコードされる免疫グロブリンカップ軽鎖を含む抗体、及び、その軽鎖可変ドメインがその体細胞変異体によりコードされる免疫グロブリンカップ軽鎖を含む抗体を含み、(iii) マウスは、免疫グロブリンカップ軽鎖と成功裏にペアとなり集団の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。任意選択的に、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 κ 配列(単一ヒト生殖細胞系V κ 配列は配列番号: 148または配列番号: 149内に存在する)、及び(ii) 単一ヒト生殖細胞系J κ 配列、を含む再構成V κ /J κ 配列の内在マウス κ 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に(再構成V κ /J κ 配列は内在マウス κ 定常領域と機能的に連結する)、及び(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に(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、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)ヘテロ接合性またはホモ接合性である。一部のこのような方法では、マウスは免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含み、改変は内在ADAM6機能を抑制または排除し、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、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する。任意選択的に、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は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座に存在する。任意選択的に、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は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座以外の位置に存在する。

【0045】

一部のこのような方法では、マウスは、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含むゲノムを有し、改変は内在ADAM6機能を抑制または排除し、マウスは、非ヒト動物ADAM6タンパク質、またはそのオルソログもしくは相同体、もしくは対応するADAM6タンパク質の機能性フラグメントをコードする核酸配列を更に含む。任意選択的に、マウスのゲノムは、(a) ADAM6遺伝子の異所性配置、及び(b) 内在非ヒト動物重鎖遺伝子座内への、1つまたは複数のヒトV H 遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒトD H 遺伝子セグメント、及び1つまたは複数のヒトJ H 遺伝子セグメントの挿入を含むヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座、を含み、ヒトV H 、D H 及びJ H 遺伝子セグメントが重鎖定常領域遺伝子と機能的に連結しているために、マウスは、(i) 生殖能力があり、(ii) 抗原で免疫化した場合に、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる重鎖定常ドメインと機能的に連結した1つまたは複数のヒトV H 遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒトD H 遺伝子セグメント、及び1つまたは複数のヒトJ H 遺伝子セグメントによりコードされる重鎖可変ドメインを含む抗体を産生すること(抗体は抗原に対する特異的結合を示す)を特徴とする。

【0046】

一部のこのような方法では、非ヒト動物は、少なくとも部分的にBALB/c系統に由来するマウスであり、マウスはヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、目的の外来抗原は、第1の自己抗原に対してオルソログなヒトタンパク質の全てまたは一部であり、第1の標的ゲノム遺伝子座は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含み、第1のガイドRNA認識部位は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含み、第2のガイドRNA認識部位は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含

み、改変は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部のホモ接合性欠失を含み、それにより第1の自己抗原の発現は排除される。任意選択的に、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(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する)、(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(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、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)、及び(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(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)、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、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。任意選択的に、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(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する)、(b) (i) 単一ヒト生殖細胞系V κ 配列(単一ヒト生殖細胞系V κ 配列は配列番号: 148または配列番号: 149内に存在する)、及び(ii) 単一ヒト生殖細胞系J κ 配列、を含む再構成V κ /J κ 配列の内在マウス κ 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に(再構成V κ /J κ 配列は内在マウス κ 定常領域と機能的に連結する)、及び(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に(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、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 κ 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)ヘテロ接合性またはホモ接合性である。

【0047】

一部のこのような方法では、非ヒト動物は、少なくとも部分的にBALB/c系統に由来するマウスであり、マウスはヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、目的の外来抗原は、第1の自己抗原に対してオルソログなヒトタンパク質の全てまたは一部であり、第1の標的ゲノム遺伝子座は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含み、第1のガイドRNA認識部位は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含み、第2のガイドRNA認識部位は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含み、改変は、第1の自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンのホモ接合性破壊を含み、それにより第1の自己抗原の発現は排除される。任意選択的に、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(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する)、(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(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、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)、及び(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(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)、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、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。任意選択的に、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(AD

10

20

30

40

50

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する)、(b)(i) 単一ヒト生殖細胞系 V κ 配列 (単一ヒト生殖細胞系 V κ 配列は配列番号: 148 または配列番号: 149 内に存在する)、及び (ii) 単一ヒト生殖細胞系 J κ 配列、を含む再構成 V κ / J κ 配列の内在マウス κ 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に (再構成 V κ / J κ 配列は内在マウス κ 定常領域と機能的に連結する)、及び (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に (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、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 κ 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) ヘテロ接合性またはホモ接合性である。

10

【0048】

一部の方法では、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、方法は、(a') 第 1 の標的ゲノム遺伝子座内の相同染色体対の対応する第 1 の染色体の配列と第 2 の染色体の配列を比較して、第 1 の標的ゲノム遺伝子座内の標的領域を選択した後に、第 1 の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、相同染色体対の対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の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標的領域に基づいて接触工程 (a) を実施することを更に含む。任意選択的に、標的領域は、第 1 の標的ゲノム遺伝子座の残部と比較して、相同染色体対の対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の間のより高いパーセンテージの配列同一性を有する。任意選択的に、標的領域は、対応する第 1 の染色体と第 2 の染色体の間の少なくとも 99.9% の配列同一性を有し、第 1 の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 の染色体の間の 99.8% 以下の配列同一性を有する。任意選択的に、標的領域は、相同染色体対の対応する第 1 及び第 2 の染色体において同一である。任意選択的に、標的領域は、第 1 の標的ゲノム遺伝子座内の連続対立遺伝子配列同一性の最長可能ストレッチ内に存在する。

20

【0049】

一部のこのような方法では、標的領域は、第 1 のガイド RNA 認識配列、及び、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 bp、20 bp、30 bp、40 bp、50 bp、100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1,000 bp、1 kb、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、10 kb、20 kb、30 kb、40 kb、50 kb、60 kb、70 kb、80 kb、90 kb、100 kb、110 kb、120 kb、130 kb、140 kb または 150 kb の隣接配列、ならびに、第 2 のガイド RNA 認識配列、及び、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 bp、20 bp、30 bp、40 bp、50 bp、100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1,000 bp、1 kb、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、10 kb、20 kb、30 kb、40 kb、50 kb、60 kb、70 kb、80 kb、90 kb、100 kb、110 kb、120 kb、130 kb、140 kb または 150 kb の隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程 (a') は、第 1 の標的ゲノム遺伝子座の 2 つまたはそれ以上のセグメントを比較して (それぞれのセグメントは、ゲノム内の他の箇所には存在しない異なるガイド RNA 認識配列、及び、異なるガイド 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 bp、20 bp、30 bp、40 bp、50 bp、100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1,000 bp、1 kb、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、10 kb、20 kb、30 kb、40 kb、50 kb、60 kb、70 kb、80 kb、90 kb、100 kb、110 kb、120 kb、130 kb、140 kb または 150 kb の隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる)、その他のセグメントと比

30

40

50

較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有する2つのセグメントを標的領域として選択すること、を含む。任意選択的に、1つまたは複数のセグメントは、第1の標的ゲノム遺伝子座内のそれぞれの異なるガイドRNA認識配列に相当するがゲノム内の他の箇所には存在しないセグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。

【0050】

一部のこのような方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間の領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程(a')は、第1の標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上のセグメントを比較して(それぞれのセグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない)、その他のセグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有するセグメントを標的領域として選択すること、を含む。任意選択的に、1つまたは複数のセグメントは、第1の標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当するセグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

10

【0051】

一部のこのような方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間の領域、及び、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間のゲノム領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程(a')は、第1の標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上のセグメントを比較して(それぞれのセグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域、及び、異なるガイドRNA認識配列ペア間のゲノム領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない)、その他のセグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有するセグメントを標的領域として選択すること、を含む。任意選択的に、1つまたは複数のセグメントは、第1の標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当するセグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

20

30

40

【0052】

一部のこのような方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間のゲノム領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150

50

k bの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程（a'）は、第1の標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上の非連続セグメントを比較して（それぞれの非連続セグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域、及び、異なるガイドRNA認識配列ペア間のゲノム領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない）、その他の非連続セグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有する非連続セグメントを標的領域として選択すること、を含む。任意選択的に、1つまたは複数の非連続セグメントは、第1の標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当する非連続セグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

【0053】

一部のこのような方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間のゲノム領域の両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程（a'）は、第1の標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上の非連続セグメントを比較して（それぞれの非連続セグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域、及び、異なるガイドRNA認識配列ペア間のゲノム領域の両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない）、その他の非連続セグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有する非連続セグメントを標的領域として選択すること、を含む。任意選択的に、1つまたは複数の非連続セグメントは、第1の標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当する非連続セグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

【0054】

一部のこのような方法では、工程（a'）の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列に隣接する領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程（a'）の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列に隣接及び含有する領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程（a'）の標的領域は、5'標的配列及び／または3'標的配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。任意選択的に、工程（a'）の標的ゲノム遺伝子座は、5'標的配列及び3'標的配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程（a'）の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列の間の領域、及び、5'標的配列と3'標的配列の間の領

10

20

30

40

50

域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程(a')の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列の間の領域、及び、5'標的配列と3'標的配列の間の領域の両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程(a')の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列の間の領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一部のこのような方法では、工程(a')の標的領域は、5'標的配列と3'標的配列の間の領域の両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。

【0055】

別の態様では、(a)(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、(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(標的ゲノム遺伝子座は、目的の外来抗原と相同であるまたは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)、及び(III)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(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、自己抗原の発現は排除される)、を導入すること、及び(ii)改変非ヒト動物1細胞期胚または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(標的ゲノム遺伝子座は、自己抗原の発現が排除されるように、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の染色体のペア内で改変される)、を含む、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、(b)工程(a)で作製した遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を目的の外来抗原で免疫化すること、及び(c)遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を、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(遺伝子組換えF0世代非ヒト動物は、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)、を含む、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を提供する。

【0056】

一部の方法では、工程（a）（i）の細胞は非ヒト動物の多能性幹細胞であり、工程（a）（ii）における遺伝子組換えF0世代非ヒト動物の作製は、（I）改変非ヒト動物多能性細胞を宿主胚に導入すること、及び（II）宿主胚を代理母に移植して、自己抗原の発現が排除されるように、標的ゲノム遺伝子座が対応する第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変された遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を作製すること、を含む。任意選択的に、多能性細胞は胚性幹（ES）細胞である。一部の方法では、工程（a）（i）の細胞は非ヒト動物1細胞期胚であり、工程（a）（ii）における遺伝子組換えF0世代非ヒト動物の作製は、改変非ヒト動物1細胞期胚を代理母に移植して、自己抗原の発現が排除されるように、標的ゲノム遺伝子座が対応する第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変された遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を作製することを含む。

10

【0057】

一部のこのような方法は、免疫化した遺伝子組換えF0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。一部のこのような方法は、免疫化した遺伝子組換えF0世代非ヒト動物から、目的の外来抗原に対する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、目的の外来抗原に対する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。任意選択的に、第1の核酸配列及び／または第2の核酸配列は、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物のリンパ球（例えば、B細胞）から、または、リンパ球から作製したハイブリドーマから得られる。任意選択的に、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、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、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。

20

【0058】

一部のこのような方法では、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物が産生した目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質は、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目的の外来抗原で免疫化した後の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、より高い力価を有している。一部のこのような方法では、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目的の外来抗原で免疫化した後の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、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、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を目的の外来抗原で免疫化した後の遺伝子組換えF0世代非ヒト動物により産生される。一部のこのような方法では、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物が産生した目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質は、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目的の外来抗原で免疫化した後の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。一部のこのような方法では、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物が産生した目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質の一部は、自己抗原と交差反応する。

30

【0059】

一部のこのような方法では、第1のガイドRNA認識配列は、標的ゲノム遺伝子座内における第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更に含む。

40

【0060】

一部のこのような方法では、目的の外来抗原は自己抗原のオルソログである。一部のこのような方法では、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。

【0061】

一部のこのような方法では、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。任意選択的に、欠失は、ランダムな挿入及び欠失（インデル）

50

を伴わない正確な欠失である。

【0062】

一部のこのような方法では、第1のガイドRNA認識配列は、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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、第2のガイドRNA認識配列は、自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含むか、または、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る。一部のこのような方法では、第1と第2のガイドRNA認識配列は異なり、第1と第2のガイドRNA認識配列のそれぞれは、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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る。

10

【0063】

一部のこのような方法では、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。一部のこのような方法では、改変は、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部の二対立遺伝子欠失を含む。一部のこのような方法では、改変は、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンの二対立遺伝子破壊を含む。

【0064】

一部のこのような方法では、導入工程(a)(i)は、非ヒト動物多能性細胞または非ヒト動物1細胞期胚に、(iv)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)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。

20

【0065】

一部のこのような方法では、工程(a)(i)の細胞は非ヒト動物の多能性幹細胞であり、Cas9タンパク質、第1のガイドRNA及び第2のガイドRNAはそれぞれ、DNAの形態で非ヒト動物の多能性幹細胞に導入される。一部のこのような方法では、工程(a)(i)の細胞は非ヒト動物の多能性幹細胞であり、Cas9タンパク質、第1のガイドRNA及び第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非ヒト動物の多能性幹細胞に導入される。一部のこのような方法では、工程(a)(i)の細胞は非ヒト動物1細胞期胚であり、Cas9タンパク質、第1のガイドRNA及び第2のガイドRNAはそれぞれ、RNAの形態で非ヒト動物1細胞期胚に導入される。一部のこのような方法では、工程(a)(i)の細胞は非ヒト動物1細胞期胚であり、Cas9タンパク質、第1のガイドRNA及び第2のガイドRNAは、前核注入または細胞質注入により非ヒト動物1細胞期胚に導入される。

30

【0066】

一部のこのような方法では、外来修復テンプレートは工程(a)(i)で導入されない。一部のこのような方法では、導入工程(a)(i)は、工程(a)(i)の細胞が非ヒト動物1細胞期胚であり、外来修復テンプレートの長さが約5kb以下である場合、非ヒト動物多能性細胞または非ヒト動物1細胞期胚に、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。任意選択的に、外来修復テンプレートは、5'ホモロジーアームと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。任意選択的に、核酸インサートは、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。任意選択的に、外来修復テンプレートは、約50ヌクレオチド長～約1kb長である。任意選択的に、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る。任意選択的に、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。任意選択的に、工程(a)(i)の細胞は非ヒト動物多能性細胞であり、(a)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)であり、または、(b)

40

50

外来修復テンプレートはL T V E C (L T V E Cの5'ホモロジーアームと3'ホモロジーアームの総合計は少なくとも10kb長)である。任意選択的に、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、欠失核酸配列は、5'標的配列と3'標的配列の間の核酸配列からなる。任意選択的に、外来修復テンプレートは、5'ホモロジーアームと3'ホモロジーアームに隣接する核酸インサートを含み、核酸インサートは欠失核酸配列に対して相同またはオルソログスであり、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、核酸インサートは欠失核酸配列を置換する。

【0067】

一部のこのような方法では、非ヒト動物はヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含む。一部のこのような方法では、非ヒト動物はげっ歯類である。任意選択的に、げっ歯類はマウスである。任意選択的に、マウス系統はBALB/c系統を含む。任意選択的に、マウス系統は、BALB/c系統、C57BL/6系統及び129系統を含む。任意選択的に、マウス系統は、50% BALB/c、25% C57BL/6、及び25% 129である。任意選択的に、マウスのMHCハプロタイプはMHC^{b/d}である。

【0068】

一部のこのような方法では、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。任意選択的に、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、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、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、マウス免疫グロブリン遺伝子座は軽鎖遺伝子座である。任意選択的に、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、マウスはヒト定常領域遺伝子を欠き、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。任意選択的に、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(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、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)、及び(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(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)、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、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。

【0069】

一部のこのような方法では、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、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。任意選択的に、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、マウスは単一軽鎖を発現する。任意選択的に、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) (単一再構成ヒトV_L/J_L領域は、ヒトV_K1-39/J_K5遺伝子セグメントまたはヒトV_K3-20/J_K1遺伝子セグメントから選択される)、及び(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(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、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)を含む。任意選択的に、マウスは抗体の集団を発現し、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

10

20

30

40

50

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、マウスは、1つのコピーのみを含有するという点で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、マウスは、(i) 集団のそれぞれの免疫グロブリンカッパ軽鎖は、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) 集団は、その軽鎖可変ドメインが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その体細胞変異体によりコードされる免疫グロブリンカッパ軽鎖を含む抗体を含み、(iii) マウスは、免疫グロブリンカッパ軽鎖と成功裏にペアとなり集団の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。任意選択的に、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 κ 配列(単一ヒト生殖細胞系V κ 配列は配列番号: 148または配列番号: 149内に存在する)、及び(ii) 単一ヒト生殖細胞系J κ 配列、を含む再構成V κ /J κ 配列の内在マウス κ 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に(再構成V κ /J κ 配列は内在マウス κ 定常領域と機能的に連結する)、及び(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に(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、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 κ 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)ヘテロ接合性またはホモ接合性である。

【0070】

一部のこのような方法では、マウスは免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含み、改変は内在ADAM6機能を抑制または排除し、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、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、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は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座に存在する。

【0071】

一部のこのような方法では、非ヒト動物は、少なくとも部分的にBALB/c系統に由来するマウスであり、マウスはヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、目的の外来抗原は自己抗原に対してオルソログなヒトタンパク質の全てまたは一部であり、第1のガイドRNA認識配列は、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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、第2のガイドRNA認識配列は、自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含むか、または、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、改変は、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部の二対立遺伝子欠失を含み、それにより自己抗原の発現は排除される。一部のこのような方法では、非ヒト動物は、少なくとも部分的にBALB/c系統に由来するマウスであり、マウスはヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含み、目的の外来抗原は、自己抗原に対してオルソログなヒトタンパク質の全てまたは一部であり、第1のガイドRNA認識配列は、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含み、第2のガイドRNA認識配列は、自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含むか、または、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、改変は、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンの二対立遺伝子破壊を含み、それにより自己抗原の発現は排除される。任意選択的に、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(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

において機能する)、(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(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、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)、及び(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(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)、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、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。任意選択的に、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(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する)、(b)(i) 単一ヒト生殖細胞系V κ 配列(単一ヒト生殖細胞系V κ 配列は配列番号: 148または配列番号: 149内に存在する)、及び(ii) 単一ヒト生殖細胞系J κ 配列、を含む再構成V κ /J κ 配列の内在マウス κ 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に(再構成V κ /J κ 配列は内在マウス κ 定常領域と機能的に連結する)、及び(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に(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、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)ヘテロ接合性またはホモ接合性である。

【0072】

一部のこのような方法では、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、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、方法は、(a') 標的ゲノム遺伝子座内の対応する第1の染色体と第2の染色体のペアの配列を比較して、標的ゲノム遺伝子座内の標的領域を選択した後に、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標的領域に基づいて接触工程(a)を実施すること、を更に含み、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列、及び、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10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kbまたは10kbの隣接配列、及び/または、第2のガイドRNA認識配列、及び、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10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kbまたは10kbの隣接配列、を含む。任意選択的に、標的領域は、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。任意選択的に、標的領域は、対応する第1の染色体と第2の染色体のペア間の少なくとも99.9%の配列同一性を有し、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の染色体のペア間の99.8%以下の配列同一性を有する。

【0073】

別の態様では、(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) Cas9タンパク質、(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(標的ゲノム遺伝子座は、目的の外来抗原と相同であるまたは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)、及び(iii) 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(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、自己抗原の発現は排除される）、を導入すること、及び（b）改変非ヒト動物1細胞期胚または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（標的ゲノム遺伝子座は、自己抗原の発現が排除されるように、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の染色体のペア内で改変される）、を含む、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を提供する。

【0074】

このような方法は、例えば、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として上記で開示したバリエーションのいずれかを含んでもよい。例えば、一部のこのような方法では、工程（a）の細胞は非ヒト動物の多能性幹細胞であり、工程（b）における遺伝子組換えF0世代非ヒト動物の作製は、（I）改変非ヒト動物多能性細胞を宿主胚に導入すること、及び（II）宿主胚を代理母に移植して、自己抗原の発現が排除されるように、標的ゲノム遺伝子座が対応する第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変された遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を作製すること、を含む。任意選択的に、多能性細胞は胚性幹（ES）細胞である。一部のこのような方法では、工程（a）の細胞は非ヒト動物1細胞期胚であり、工程（b）における遺伝子組換えF0世代非ヒト動物の作製は、改変非ヒト動物1細胞期胚を代理母に移植して、自己抗原の発現が排除されるように、標的ゲノム遺伝子座が対応する第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変された遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を作製することを含む。一部のこのような方法では、目的の外来抗原は自己抗原のオルソログである。一部のこのような方法では、第1のガイドRNA認識配列は、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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、第2のガイドRNA認識配列は、自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含むか、または、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る。一部のこのような方法では、第1と第2のガイドRNA認識配列は異なり、第1と第2のガイドRNA認識配列のそれぞれは、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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る。一部のこのような方法では、第1のガイドRNA認識配列は、標的ゲノム遺伝子座内における第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'領域及び第1のガイドRNA認識配列の約1 kb内における及び／または3'領域及び第2のガイドRNA認識配列の約1 kb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。一部のこのような方法では、改変は、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部の二対立遺伝子欠失を含む。一部のこのような方法では、改変は、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンの二対立遺伝子破壊を含む。一部のこのような方法では、非ヒト動物はマウスである。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】VELOCIMMUNE（登録商標）マウス（VE-3；IgHとIgKの両方においてホモ接合性にヒト化された）における免疫寛容を破壊させるための従来の手法を示す図である。従来の手法では、目的の外来標的抗原に相同な自己抗原をコードする遺伝子のヘテロ接合性ノックアウト（ヌル）対立遺伝子は、F1H4胚性幹（ES）細胞内で作製される。標的化ベクターの設計からノックアウトにヘテロ接合性なF0マウスの作製までの期間は約5ヶ月間である。それから、VE-3マウスを、目的の外来標的抗原に相同な自己抗原をコードする内在遺伝子にヘテロ接合性ノックアウト変異を有するF0マウスに改良する。免疫化に好適な三重ホモ接合性マウス（目的の標的においてホモ接合性ヌル、及びIgHとIgKの両方においてホモ接合性にヒト化）を作製するためには、更に

2世代の交配が必要となる。標的化ベクターの設計から三重ホモ接合性マウスの作製までの全体のプロセスには約15～16ヶ月間を要する。

【図2】VELOCIMMUNE（登録商標）（V E I - 3）マウスまたはユニバーサル軽鎖（U L Cまたは共通軽鎖）マウスにおける免疫寛容を破綻させるための、加速したプロセスを示す図である。このプロセスでは、V E I - 3マウスまたはU L Cマウスに由来するE S細胞を標的として、目的の外来標的抗原に相同な自己抗原をコードする内在遺伝子のヘテロ接合性ヌル対立遺伝子を作製する。ホモ接合性ヌルV E I - 3またはU L C E S細胞クローンを得るには連続的な標的化工程が必要となる。

【図3】VELOCIMMUNE（登録商標）（V E I - 3）マウスまたはユニバーサル軽鎖（または共通軽鎖）（U L C）マウスにおける寛容を破綻させるための、更に加速したプロセスを示す図である。このプロセスでは、V E I - 3またはU L C E S細胞をC R I S P R / C a s 9及び対のガイドRNAで標的化して、目的の外来標的抗原に相同な自己抗原をコードする内在遺伝子のホモ接合性崩壊を単一工程で生成する。T A Q M A N（登録商標）スクリーニングは、例えば、対立遺伝子の喪失アッセイと保持アッセイの両方を含んでいてもよい。

【図4】大きな標的化ベクター（L T V E C）及び対の上流及び下流ガイドRNA（g U及びg D）を使用した、目的の外来標的抗原に相同な自己抗原をコードするマウス遺伝子の同時欠失及びネオマイシン選択マーカーへの置換の一般的な概略を示す図である。2つのガイドRNAによりガイドされるC a s 9開裂部位の位置については、マウス遺伝子配列下部の矢印で示している。T A Q M A N（登録商標）アッセイプローブは水平線で示しており、保持アッセイプローブ、及び、上流、中央及び下流の対立遺伝子の喪失（L O A）アッセイプローブを含む。図の下部は予想される標的対立遺伝子型を示している。

【図5】大きな標的化ベクター（L T V E C）及びそれぞれがマウスA T G開始コドンを経験する3つのオーバーラップしたガイドRNAを使用した、目的の外来標的抗原に相同な自己抗原をコードするマウス遺伝子の同時欠失ならびにl o x Pに挟まれたネオマイシン選択マーカー及びl a c Zへの置換の一般的な概略を示す図である。ガイドRNAは水平矢印で示しており、T A Q M A N（登録商標）アッセイプローブは円で囲んだ水平線で示している。図の下部は予想される標的対立遺伝子型を示している。

【図6】標的8（自己抗原8）にオルソロガスな自己抗原をコードする内在遺伝子にホモ接合性ヌルである野生型ユニバーサル軽鎖（U L C 1 - 3 9）マウス及びU L C 1 - 3 9マウスにおけるヒト標的抗原（標的8）の抗体力価データを示す図である。

【図7】ハイブリッドV G F 1（F 1 H 4）E S細胞（C 5 7 B L 6（X^{B 6}） / 1 2 9 S 6（Y^{1 2 9}））を作製するために実施した交配を示す図である。

【図8】L T V E Cならびに、1つまたは2つの5'領域、中央領域及び3'領域g R N Aのいずれかを使用した、マウス遺伝子またはマウス遺伝子の一部の同時欠失及び対応するヒト型への置換の概略を示す図である。L T V E Cは図の上部に示しており、マウス遺伝子座は図の下部に示している。8つのガイドRNAによりガイドされるC a s 9開裂部位の位置については、マウス遺伝子配列下部の垂直矢印で示している。

【図9】図9 Aは、L T V E C及び2つのガイドRNA（ガイドRNA A及びB）を使用した、マウス遺伝子の同時欠失及び対応するヒト型への置換の一般的な概略を示す図である。L T V E Cは図9 Aの上部に示しており、マウス遺伝子座は図9 Aの下部に示している。2つのガイドRNAによりガイドされるC a s 9開裂部位の位置については、マウス遺伝子配列下部の矢印で示している。図9 B～Eは、2つのガイドRNAを使用する際により高い頻度で生じる固有二対立遺伝子改変（対立遺伝子型）を示す図である。斜線陰影付き太線はマウス遺伝子を示しており、点線はマウス遺伝子内の欠失を示しており、太い黒線はヒト遺伝子の挿入を示している。図9 Bはホモ接合性崩壊対立遺伝子（大きなC R I S P R誘導欠失）を示している。図9 Cはホモ接合性標的対立遺伝子を示している。図9 Dはヘミ接合性標的対立遺伝子を示している。図9 Eは複合ヘテロ接合性対立遺伝子を示している。

【図10】図10 A及び10 Bは、選択したクローンの遺伝子型を確認するためのP C R

アッセイを示す図である。図10Aは、プライマーm-lr-f及びm-5'-rを使用して選択したES細胞クローンのロングレンジPCRアッセイの結果を示しており、それらプライマーは、ヒトインサートと5'ホモロジーアームに相同な配列外側の配列の間の連結を作ることにより、正確な標的化をもたらす。図10Bは、5'Del J、5'Ins J、Del A + F、及びDel A + E2のPCRアッセイの結果を示している。5'Del Jは、m-5'-fプライマー及びm-5-rプライマーを使用したPCR産物を示しており、それらプライマーは、gRNA A開裂部位を囲む野生型配列の保持または喪失を確認するためにこの配列を増幅させる。5'Ins Jは、m-5'-fプライマー及びh-5'-rプライマーを使用したPCR産物を示しており、それらプライマーは、ヒトインサートとマウスゲノムの間の連結を作る。アッセイは、標的クローンとランダム組み込みクローンの両方において陽性結果を示している。Del A + Fは、想定アンプリコンサイズ(359bp)、及び、クローンBOF10及びAW-A8内におけるデュアルgRNA A及びF開裂が関与した大きな欠失による実際のバンドを示している。Del A + E2はクローンBA-A7における同様の事象を示している。NTはテンプレートが無いことを示し、+/+は親VGF1ハイブリッドES細胞野生型対照を示し、H/+はヘテロ接合性ヒト化遺伝子型を示し、H/Δはヘミ接合性ヒト化遺伝子型を示し、H/Hはホモ接合性ヒト化遺伝子型を示し、Δ/Δはホモ接合性欠失遺伝子型を示している。

【図11】図11A~11Cは、Cas9及び2つのgRNAと組み合わせられてLrp5ヒト化LTVECが標的としたマウスES細胞クローンAW-D9(図11A)及びマウスES細胞クローンBA-D5(図11C)の蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)解析、及びLTVEC単独が標的としたマウスES細胞クローンBS-C4(図11B)の蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)解析を示す図である。矢印は、19番染色体のバンドB上のハイブリダイゼーションシグナルの位置を示している。赤色シグナルは、マウスプローブのみとのハイブリダイゼーションを示している(破線矢印、図11B)。黄混合色シグナルは、赤色マウスプローブと緑色ヒトプローブの両方とのハイブリダイゼーションを示している。赤色シグナル(破線矢印)を有する一方の19番染色体バンドB及び黄色シグナル(実線矢印)を有するもう一方の19番染色体バンドBにより、BS-C4クローンにおける正確な遺伝子座への標的化及びヘテロ接合性遺伝子型が確認された(図11B)。黄色シグナル(実線矢印、図11A及び図11C)を有する両方の19番染色体のBバンドにより、AW-D9クローン及びBS-C4クローンにおける正確な遺伝子座への標的化及びホモ接合性遺伝子型が確認された。

【図12】VGF1ハイブリッドES細胞内のヘテロ接合性の喪失(LOH)を解析することにより2つのガイドRNAが関与する遺伝子変換または有糸分裂組換え事象を確認するように設計されたアッセイを有する19番染色体の概略を示す図である。TAQMAN(登録商標)qPCR染色体コピー数(CCN)プローブのおおよその位置は矢印で示している。構造多型(SV)多型PCRプローブのおおよその位置は、Lrp5遺伝子座からのそれらの距離(Mb)を示すシェブロン(上側に記載)で示している。一塩基多型(SNV)TAQMAN(登録商標)対立遺伝子識別プローブのおおよその位置は、Lrp5遺伝子座からのそれらの距離(Mb)を示す矢じり(下側に記載)で示している。F、E2、D、B2及びA用のgRNA認識配列の位置は、Lrp5遺伝子表記上側の斜め矢印で示している。

【図13】図13A及び13Bは、Cas9及び2つのgRNAと組み合わせられてHcヒト化LTVECが標的としたマウスES細胞クローンQ-E9(図13A)及びマウスES細胞クローンO-E3(図13B)の蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)解析を示す図である。矢印は、2番染色体のバンドB上のハイブリダイゼーションシグナルの位置を示している。赤色シグナルは、マウスプローブのみとのハイブリダイゼーションを示している(破線矢印、図13A)。黄混合色シグナルは、赤色マウスプローブと緑色ヒトプローブの両方とのハイブリダイゼーションを示している(実線矢印)。赤色シグナル(破線矢印)を有する一方の2番染色体バンドB及び黄色シグナル(実線矢

印)を有するもう一方の2番染色体バンドBにより、Q-E9クローンにおける正確な遺伝子座への標的化及びヘテロ接合性遺伝子型が確認された(図13A)。黄色シグナル(実線矢印、図13B)を有する両方の2番染色体のBバンドにより、O-E3クローンにおける正確な遺伝子座への標的化及びホモ接合性遺伝子型が確認された。

【図14】VGF1ハイブリッドES細胞内のヘテロ接合性の喪失(LOH)を解析することにより2つのガイドRNAが関与する遺伝子変換または有糸分裂組換え事象を確認するように設計されたアッセイを有するマウスC5遺伝子含有染色体の概略を示す図である。構造多型(SV)多型PCRプローブのおおよその位置は、C5遺伝子座からのそれらの距離(Mb)を示す水平矢印(上側に記載)で示している。E2及びA用のgRNA認識配列の位置は、C5遺伝子座表記上側の斜め矢印で示している。

10

【図15】図15A~15Eは、VGF1(F1H4)、129及びB6 DNAを対照として用いた、クローンBR-B4、BP-G7、BO-G11、BO-F10、BO-A8及びBC-H9の構造多型(SV)アッセイの結果を示す図である。Lrp5遺伝子座に対してテロメア側への以下の距離、13.7Mb(図15A)、20.0Mb(図15B)、36.9Mb(図15C)、48.3Mb(図15D)、及び56.7Mb(図15E)でアッセイを実施した。B6対立遺伝子及び129対立遺伝子のPCR産物の位置は矢印で示している。

【図16】図16A~16Cは、Lrp5のセントロメア側0.32Mbの対立遺伝子識別プロット(図16A)、Lrp5のテロメア側1.2Mbの対立遺伝子識別プロット(図16B)、及びLrp5のテロメア側57.2Mbの対立遺伝子識別プロット(図16C)を示す図である。それぞれの軸上の値は相対蛍光強度を示している。プロットはそれぞれの試料における4連試験について示しており、塗りつぶしドット(B6対立遺伝子)、空白ドット(129対立遺伝子)及び斜線付きドット(B6/129対立遺伝子の両方)で示されている。

20

【図17】図17A~17Cは、ヘテロ接合性の喪失により検出されるホモ接合性事象及び広範囲に及ぶ遺伝子変換を生じさせ得る、細胞周期のG2期に起こり得る有糸分裂組換え機構を示す概略である。図17Aは、129相同体上の標的ヒト化にヘテロ接合性なハイブリッド129/B6 ES細胞内における2つの染色分体を示す複製相同染色体を示している。両矢印は、相同染色体上の染色分体間の相同組換えによる相互交換を促進するデュアルgRNA誘導Cas9開裂により生成される潜在的な二本鎖切断を示しており、図17Bに示すハイブリッド染色分体をもたらす標的対立遺伝子のセントロメア側の交差として示されている。図17Cは有糸分裂と細胞分裂の後を示しており、娘細胞への4種類の染色体分離が可能である。ヘテロ接合性を維持した2つ、親型ヘテロ接合体(Hum/+、上部左側)及び均等交換によるヘテロ接合体(Hum/+、上部右側)については、LOHアッセイでは識別不可能である。その他の2つ、テロメア側B6対立遺伝子を喪失したヒト化ホモ接合体(Hum/Hum、例えば、クローンBO-A8、下部左側)及びテロメア側129対立遺伝子を喪失した野生型ホモ接合体(+/+、下部右側)は、ヘテロ接合性の喪失を示している。この後者のタイプは、ヒト化対立遺伝子の薬剤耐性カセットを保持していないために失われる。

30

【図18A】129S6/SvEvTacマウス系統に由来する1つの半数染色体組及びC57BL/6NTac(B6)マウス系統に由来する1つの半数染色体組を有するF1ハイブリッドマウスES細胞を用いたCRISPR/Cas9補助型ヒト化実験におけるヘテロ接合性の喪失(LOH)を含む観察結果を説明する、起こり得る機構を示す図である。ゲノム複製前またはゲノム複製後にヘテロ接合性改変が129染色体上で起こり、続いて、姉妹染色分体間の遺伝子変換が起こる、有糸分裂交差による相互染色分体交換を示している。

40

【図18B】129S6/SvEvTacマウス系統に由来する1つの半数染色体組及びC57BL/6NTac(B6)マウス系統に由来する1つの半数染色体組を有するF1ハイブリッドマウスES細胞を用いたCRISPR/Cas9補助型ヒト化実験におけるヘテロ接合性の喪失(LOH)を含む観察結果を説明する、起こり得る機構を示す図であ

50

る。単一の129染色分体がゲノム複製後に改変される、有糸分裂交差による相互染色分体交換を示している。

【図18C】129S6/SvEvTacマウス系統に由来する1つの半数染色体組及びC57BL/6NTac(B6)マウス系統に由来する1つの半数染色体組を有するF1ハイブリッドマウスES細胞を用いたCRISPR/Cas9補助型ヒト化実験におけるヘテロ接合性の喪失(LOH)を含む観察結果を説明する、起こり得る機構を示す図である。LTVEC標的化は起こっていないが、129染色体上またはB6染色体上のいずれかでCas9開裂が生じている(B6開裂を示している)、有糸分裂交差による相互染色分体交換を示している。

【図18D】129S6/SvEvTacマウス系統に由来する1つの半数染色体組及びC57BL/6NTac(B6)マウス系統に由来する1つの半数染色体組を有するF1ハイブリッドマウスES細胞を用いたCRISPR/Cas9補助型ヒト化実験におけるヘテロ接合性の喪失(LOH)を含む観察結果を説明する、起こり得る機構を示す図である。ゲノム複製前またはゲノム複製後にヘテロ接合性改変が129染色体上で起こり、続いて、姉妹染色分体間の遺伝子変換が起こる、切断誘導複製による染色分体複製を示している。

【図18E】129S6/SvEvTacマウス系統に由来する1つの半数染色体組及びC57BL/6NTac(B6)マウス系統に由来する1つの半数染色体組を有するF1ハイブリッドマウスES細胞を用いたCRISPR/Cas9補助型ヒト化実験におけるヘテロ接合性の喪失(LOH)を含む観察結果を説明する、起こり得る機構を示す図である。単一の129染色分体がゲノム複製後に改変される、切断誘導複製による染色分体複製を示している。

【図18F】129S6/SvEvTacマウス系統に由来する1つの半数染色体組及びC57BL/6NTac(B6)マウス系統に由来する1つの半数染色体組を有するF1ハイブリッドマウスES細胞を用いたCRISPR/Cas9補助型ヒト化実験におけるヘテロ接合性の喪失(LOH)を含む観察結果を説明する、起こり得る機構を示す図である。LTVEC標的化は起こっていないが、129染色体上またはB6染色体上のいずれかでCas9開裂が生じている(B6開裂を示している)、切断誘導複製による染色分体複製を示している。

【図19】VGF1ハイブリッドES細胞内においてLTVEC及び1つまたは複数のgRNAを使用した欠失及び対応するヒトLRP5遺伝子座への置換の標的となる、マウスLrp5遺伝子座の概略を示す図である。縦点線の内側の領域は標的領域(LTVECの5'標的配列及び3'標的配列の内側の領域)である。一塩基多型を同定するための参照配列を、Jackson Laboratory製のC57BL/6Jマウス系統のゲノム配列とした。Taconic Biosciences製の129S6/SvEv系統、Taconic Biosciences製のC57BL/6N系統、ならびに、129S6/SvEv系統及びC57BL/6N系統から作製したVGF1ハイブリッド細胞株(図下部の3行に記載)と、この参照配列を比較した。3行のそれぞれにおける縦線は、参照配列と比較した一塩基多型を示している。

【図20】VGF1ハイブリッドES細胞内においてLTVEC及び1つまたは複数のgRNAを使用した欠失及び対応するヒト型への置換の標的となる、マウスHc遺伝子座の概略を示す図である。縦点線の内側の領域は標的領域(LTVECの5'標的配列及び3'標的配列の内側の領域)である。一塩基多型を同定するための参照配列を、Jackson Laboratory製のC57BL/6Jマウス系統のゲノム配列とした。Taconic Biosciences製の129S6/SvEv系統、Taconic Biosciences製のC57BL/6N系統、ならびに、129S6/SvEv系統及びC57BL/6N系統から作製したVGF1ハイブリッド細胞株(図下部の3行に記載)と、この参照配列を比較した。3行のそれぞれにおける縦線は、参照配列と比較した一塩基多型を示している。

【図21】VGF1ハイブリッドES細胞内においてLTVEC及び1つまたは複数のg

10

20

30

40

50

RNAを使用した欠失及び対応するヒト型への置換の標的となる、マウス *Trpa1* 遺伝子座の概略を示す図である。縦点線の内側の領域は標的領域（LTVECの5' 標的配列及び3' 標的配列の内側の領域）である。一塩基多型を同定するための参照配列を、Jackson Laboratory製のC57BL/6Jマウス系統のゲノム配列とした。Taconic Biosciences製の129S6/SvEv系統、Taconic Biosciences製のC57BL/6N系統、ならびに、129S6/SvEv系統及びC57BL/6N系統から作製したVGF1ハイブリッド細胞株（図下部の3行に記載）と、この参照配列を比較した。3行のそれぞれにおける縦線は、参照配列と比較した一塩基多型を示している。

【図22】VGF1ハイブリッドES細胞内においてLTVEC及び1つまたは複数のgRNAを使用した欠失及び対応するヒト型への置換の標的となる、マウス *Adamts5* 遺伝子座の概略を示す図である。縦点線の内側の領域は標的領域（LTVECの5' 標的配列及び3' 標的配列の内側の領域）である。一塩基多型を同定するための参照配列を、Jackson Laboratory製のC57BL/6Jマウス系統のゲノム配列とした。Taconic Biosciences製の129S6/SvEv系統、Taconic Biosciences製のC57BL/6N系統、ならびに、129S6/SvEv系統及びC57BL/6N系統から作製したVGF1ハイブリッド細胞株（図下部の3行に記載）と、この参照配列を比較した。3行のそれぞれにおける縦線は、参照配列と比較した一塩基多型を示している。

【図23】VGF1ハイブリッドES細胞内においてLTVEC及び1つまたは複数のgRNAを使用した欠失及び対応するヒト型への置換の標的となる、マウス *Folh1* 遺伝子座の概略を示す図である。縦点線の内側の領域は標的領域（LTVECの5' 標的配列及び3' 標的配列の内側の領域）である。一塩基多型を同定するための参照配列を、Jackson Laboratory製のC57BL/6Jマウス系統のゲノム配列とした。Taconic Biosciences製の129S6/SvEv系統、Taconic Biosciences製のC57BL/6N系統、ならびに、129S6/SvEv系統及びC57BL/6N系統から作製したVGF1ハイブリッド細胞株（図下部の3行に記載）と、この参照配列を比較した。3行のそれぞれにおける縦線は、参照配列と比較した一塩基多型を示している。

【図24】VGF1ハイブリッドES細胞内においてLTVEC及び1つまたは複数のgRNAを使用した欠失及び対応するヒト型への置換の標的となる、マウス *Dpp4* 遺伝子座の概略を示す図である。縦点線の内側の領域は標的領域（LTVECの5' 標的配列及び3' 標的配列の内側の領域）である。一塩基多型を同定するための参照配列を、Jackson Laboratory製のC57BL/6Jマウス系統のゲノム配列とした。Taconic Biosciences製の129S6/SvEv系統、Taconic Biosciences製のC57BL/6N系統、ならびに、129S6/SvEv系統及びC57BL/6N系統から作製したVGF1ハイブリッド細胞株（図下部の3行に記載）と、この参照配列を比較した。3行のそれぞれにおける縦線は、参照配列と比較した一塩基多型を示している。

【図25】VGF1ハイブリッドES細胞内においてLTVEC及び1つまたは複数のgRNAを使用した欠失及び対応するヒト型への置換の標的となる、マウス *Ror1* 遺伝子座の概略を示す図である。縦点線の内側の領域は標的領域（LTVECの5' 標的配列及び3' 標的配列の内側の領域）である。一塩基多型を同定するための参照配列を、Jackson Laboratory製のC57BL/6Jマウス系統のゲノム配列とした。Taconic Biosciences製の129S6/SvEv系統、Taconic Biosciences製のC57BL/6N系統、ならびに、129S6/SvEv系統及びC57BL/6N系統から作製したVGF1ハイブリッド細胞株（図下部の3行に記載）と、この参照配列を比較した。3行のそれぞれにおける縦線は、参照配列と比較した一塩基多型を示している。

【図26】膜貫通タンパク質をコードする遺伝子を含むマウス遺伝子座の概略を示す図で

あり、マウス遺伝子座は、VGF1ハイブリッドES細胞内においてLTVEC及び1つまたは複数のgRNAを使用した欠失及び対応するヒト型への置換の標的となる。長方形は、標的ゲノム領域内の異なる遺伝子を示している。縦点線の内側の領域は標的領域（LTVECの5'標的配列及び3'標的配列の内側の領域）である。一塩基多型を同定するための参照配列を、Jackson Laboratory製のC57BL/6Jマウス系統のゲノム配列とした。Taconic Biosciences製の129S6/SvEv系統MP変異体、Taconic Biosciences製のC57BL/6N系統RGC変異体、ならびに、129S6/SvEv系統及びC57BL/6N系統から作製したVGF1ハイブリッド細胞株（図下部の3行に記載）と、この参照配列を比較した。MP変異体及びRGC変異体は、同一系統由来の異なるマウスである。3行のそれぞれにおける縦線は、参照配列と比較した一塩基多型を示している。

10

【図27】図27A～27Cは、局所的なヘテロ接合性の喪失により検出されるホモ接合性事象及び遺伝子変換を生じさせ得る、細胞周期のG2期の間に起こり得る有糸分裂組換え機構を示す概略である。図27Aは、129相同体上の標的ヒト化にヘテロ接合性なハイブリッド129/B6ES細胞内における2つの染色分体を示す複製相同染色体を示している。ゲノム複製前に129相同体上のヘテロ接合性改変が起こるまたはゲノム複製後に単一の129染色分体が改変され、続いて、染色分体間の遺伝子変換が起こる。両矢印は、デュアル鎖侵入及び合成誘導修復を促進するデュアルgRNA誘導Cas9開裂により生成される潜在的な二本鎖切断を示しており、図27Bに示すように、一方の改変染色分体における少しの部分を複製する遺伝子変換事象により生成されるハイブリッド染色分体をもたらすことについて、斜めの破線矢印で示されている。図27Cは有糸分裂及び細胞分裂の後を示しており、娘細胞への2種類の染色体分離、ヘテロ接合性の喪失を伴うことなくヘテロ接合性を維持している1つ（親型ヘテロ接合体（Hum/+、上部））、及び標的改変を囲む局所的なヘテロ接合性の喪失を伴っている1つ（Hum/Hum、下部、129対立遺伝子を保持）、が可能である。

20

【図28】自己抗原をコードする遺伝子の開始及び終止コドン領域を標的とする対のガイドRNAを単独でまたは大きな標的化ベクターと共に使用した、VIE-3及びULC1-39胚性幹（ES）細胞内における異なるサイズの異なる自己抗原標的のCRISPR/Cas9媒介欠失の効率を示す図である。

【図29】自己抗原をコードする遺伝子の開始及び終止コドン領域を標的とする対のガイドRNAを使用して、欠失させる異なるサイズの異なる自己抗原標的を標的とするCRISPR/Cas9でVIE-3及びULC1-39細胞期胚の標的化を行った後に、崩壊対立遺伝子を有するように作製された仔マウスのパーセンテージを示す図である。

30

【図30】図30A及び30Bは、標的9を発現するように遺伝子改変された親VIE-3T3細胞及びVIE-3T3細胞の標的9全長DNAによる免疫化後の、野生型VIE-3-Adam6マウス（図30B）、及び標的9（自己抗原9）にオルソロガスな自己抗原をコードする内在遺伝子にホモ接合性ヌルであるVIE-3-Adam6マウス（図30A）におけるヒト標的抗原（標的9）の抗体力価データを示す図である。

【図31】図31A及び31Bは、ヒト標的抗原（標的4）及び対応するオルソロガスマウス自己抗原（自己抗原4）の抗体力価データを示す図である。図31Aは、自己抗原4をコードする内在遺伝子にホモ接合性ヌルであるVIE-3-Adam6マウスにおけるヒト標的4及びマウス自己抗原4の抗体力価データを示している。図31Bは、自己抗原4をコードする内在遺伝子にホモ接合性ヌルであるULC1-39マウスにおける、ヒト標的4とマウス自己抗原4の組み合わせの抗体力価データを示している。

40

【図32】それぞれが50% BALB/cTac、25% C57BL/6NTac、及び25% 129S6/SvEvTacの遺伝的背景を有するVIE-3-Adam6マウス及びULC1-39マウスにおける免疫グロブリン重鎖遺伝子座（上部）及び免疫グロブリン軽鎖遺伝子座（下部）の概略を示す図である。VIE-3-Adam6マウスでは、内在マウス免疫グロブリン重鎖及び軽鎖可変領域は、再挿入マウスAdam6遺伝子（Adam6b及びAdam6a、台形で示す）に加えて、対応するヒトDNAへと置換されて

50

いる。ユニバーサル軽鎖（U L C 1-39）マウスでは、内在マウス免疫グロブリン重鎖可変領域は、再挿入マウスA d a m 6 遺伝子に加えて、対応するヒトDNAへと置換されており、免疫グロブリン軽鎖可変領域は、h V κ 3-15 プロモーターと機能的に連結した単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖ヌクレオチド配列（V κ 1-39 / J κ 5）を含む。ヒトセグメントは黒色で示しており、マウスセグメントは斜線で示している。

【発明を実施するための形態】

【0076】

定義

用語「タンパク質」、「ポリペプチド」及び「ペプチド」は本明細書において同じ意味で用いられ、任意の長さを有するポリマー形態のアミノ酸を含み、コード及び非コードアミノ酸、ならびに、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸を含む。この用語はまた、修飾されたポリマー、例えば、修飾ペプチド主鎖を有するポリペプチドなどを含む。

【0077】

タンパク質は「N末端」及び「C末端」を有すると言われている。用語「N末端」は、遊離アミン基（-NH₂）を有するアミノ酸を末端に持つ、タンパク質またはポリペプチドの開始端に関する。用語「C末端」は、遊離カルボキシル基（-COOH）を末端に持つ、アミノ酸鎖（タンパク質またはポリペプチド）の終末端に関する。

【0078】

用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、本明細書において同じ意味で用いられ、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはそのアナログもしくは修飾型を含む、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを含む。それらとしては、一本鎖、二本鎖及び多本鎖のDNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、ならびに、プリン塩基、ピリミジン塩基、またはその他の天然、化学修飾、生化学的修飾、非天然もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが挙げられる。

【0079】

核酸は、1つのモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸がホスホジエステル結合を介して隣接モノヌクレオチドペントース環の3'酸素に一方向に結合するような様式でモノヌクレオチドが反応してオリゴヌクレオチドを形成するために、「5'末端」及び「3'末端」を有すると言われている。オリゴヌクレオチドの末端は、その5'リン酸がモノヌクレオチドペントース環の3'酸素に結合していない場合、「5'末端」と呼ばれる。オリゴヌクレオチドの末端は、その3'酸素が別のモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸に結合していない場合、「3'末端」と呼ばれる。より大きなオリゴヌクレオチドの内部であっても、核酸配列は5'末端及び3'末端を有すると言われることもある。直鎖状または環状いずれかのDNA分子において、個々のエレメントは、「上流」エレメント、「下流」エレメントの5'、または3'エレメントと呼ばれる。

【0080】

用語「野生型」は、正常な（変異、異常、変化など対比して）状態または状況に見られる構造及び／または活性を有する構成要素を含む。野生型遺伝子及びポリペプチドは多くの場合、複数の異なる形態（例えば、対立遺伝子）で存在している。

【0081】

タンパク質及び核酸に関する用語「単離」は、通常は*in situ*で存在し得るその他の細菌成分、ウイルス成分または細胞成分を基準として比較的精製されたタンパク質及び核酸を含み、最高で、実質的に純粋なタンパク質製剤及びポリヌクレオチド製剤を含む。用語「単離」はまた、天然対応物がなく化学合成されているために、その他のタンパク質または核酸による汚染が実質的にないタンパク質及び核酸、または、天然に共に存在するその他の細胞成分（例えば、その他の細胞タンパク質、ポリヌクレオチドまたは細胞成分）の大部分から分離または精製されたタンパク質及び核酸を含む。

【0082】

「外来」分子または配列は、通常はその形態では細胞内に存在しない分子または配列を

10

20

30

40

50

含む。正常な存在は、細胞における特定の発生段階及び環境条件に関する存在を含む。外来分子または配列は、例えば、細胞内の対応する内在配列の変異型（例えば、内在配列のヒト化型など）を含んでいてもよく、または、細胞内の内在配列に対応してはいるが形態の異なる配列（すなわち、染色体内ではない）を含んでいてもよい。対照的に、内在分子または配列は、通常、特定の環境条件下における特定の発生段階の特定の細胞内にその形態で存在する分子または配列を含む。

【0083】

「コドン最適化」は、一般に、天然アミノ酸配列を維持しつつ、天然配列の少なくとも1つのコドンを、宿主細胞の遺伝子内でより頻繁にまたは最も頻繁に利用されているコドンに置換することにより、特に宿主細胞内における発現を高めるための核酸配列改変プロセスを含む。例えば、Cas9タンパク質をコードするポリヌクレオチドを修飾して、天然核酸配列と比較して、任意の原核細胞または真核細胞（細菌細胞、イースト菌、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、または任意のその他の宿主細胞を含む）においてより高頻度で使用されているコドンに置換してもよい。コドン利用表は、例えば、「Codon Usage Database」において容易に利用可能である。これらの表を様々な方法に適用してもよい。Nakamura et al. (2000) Nucleic Acids Research 28:292を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。特定宿主内で発現させるための特定配列におけるコドン最適化を実施するためのコンピュータアルゴリズムも利用可能である（例えば、Gene Forgeを参照のこと）。

【0084】

用語「遺伝子座」とは、遺伝子（または重要な配列）、DNA配列、ポリペプチドコード配列における特定の位置、または、生物ゲノムにおける染色体上の位置のことを意味する。例えば、「Lrp5遺伝子座」とは、Lrp5遺伝子、Lrp5 DNA配列、LRP5コード配列における特定の位置、または、このような配列が存在することが同定された生物ゲノムにおける染色体上のLrp5位置のことを意味し得る。「Lrp5遺伝子座」は、例えば、エンハンサー、プロモーター、5' UTR及び／または3' UTR、ならびにこれらの組み合わせを含む、Lrp5遺伝子の調節エレメントを含んでいてもよい。

【0085】

用語「遺伝子」とは、産物（例えば、RNA産物及び／またはポリペプチド産物）をコードし、非コードイントロンが介在したコード領域、及び、遺伝子が全長mRNA（5'及び3'非翻訳配列を含む）に相当するように5'末端上と3'末端上の両方のコード領域に隣接して位置する配列を含む、染色体内におけるDNA配列のことを意味する。用語「遺伝子」はまた、調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、及び転写因子結合部位）、ポリアデニル化シグナル、配列内リボソーム進入部位、サイレンサー、インスレーター配列、及びマトリックス付着領域を含む、その他の非コード配列を含む。これらの配列は、遺伝子のコード領域に近接（例えば、10 kb以内）していてもよく、または離れた部位にあってもよく、遺伝子の転写及び翻訳のレベルまたは比率に影響を及ぼす。

【0086】

用語「対立遺伝子」とは、遺伝子の変異体形態のことを意味する。一部の遺伝子は、染色体上における同一位置または遺伝子座に位置する、様々な異なる形態を有している。二倍体生物は、それぞれの遺伝子座に2つの対立遺伝子を有している。対立遺伝子のそれぞれのペアは、特定の遺伝子座の遺伝子型を表している。遺伝子型は、2つの同一対立遺伝子が特定の遺伝子座に存在する場合にホモ接合と記載され、2つの対立遺伝子が異なる場合にヘテロ接合と記載される。

【0087】

「プロモーター」は、通常は、特定のポリヌクレオチド配列の適切な転写開始部位においてRNAポリメラーゼIIにRNA合成を開始させることのできるTATAボックスを含む、DNAの調節領域である。プロモーターは、転写開始速度に影響を及ぼすその他の

10

20

30

40

50

領域を追加的に含んでいてもよい。本明細書で開示するプロモーター配列は、機能的に連結したポリヌクレオチドの転写を調節する。プロモーターは、本明細書で開示する細胞型（例えば、真核細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、げっ歯類細胞、多能性細胞、1細胞期胚、分化細胞、またはこれらの組み合わせ）の1つまたは複数において活性であってもよい。プロモーターは、例えば、構成的に活性なプロモーター、条件的プロモーター、誘導性プロモーター、時間的に制限されたプロモーター（例えば、発生的に調節されるプロモーター）、または空間的に制限されたプロモーター（例えば、細胞特異的または組織特異的プロモーター）であってもよい。プロモーターの例は、例えば、WO 2013/176772に見出すことができる（その全体は参照として本明細書に組み込まれる）。

【0088】

誘導性プロモーターの例としては、例えば、化学的に調節されるプロモーター及び物理的に調節されるプロモーターが挙げられる。化学的に調節されるプロモーターとしては、例えば、アルコール調節プロモーター（例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ（alcA）遺伝子プロモーター）、テトラサイクリン調節プロモーター（例えば、テトラサイクリン応答性プロモーター、テトラサイクリンオペレーター配列（tetO）、tet-Onプロモーターまたはtet-Offプロモーター）、ステロイド調節プロモーター（例えば、ラットグルココルチコイド受容体、エストロゲン受容体のプロモーター、またはエクジソン受容体のプロモーター）、または、金属調節プロモーター（例えば、金属タンパク質プロモーター）が挙げられる。物理的に調節されるプロモーターとしては、例えば、温度調節プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター）及び光調節プロモーター（例えば、光誘導性プロモーターまたは光抑制性プロモーター）が挙げられる。

【0089】

組織特異的プロモーターは、例えば、ニューロン特異的プロモーター、グリア特異的プロモーター、筋細胞特異的プロモーター、心臓細胞特異的プロモーター、腎臓細胞特異的プロモーター、骨細胞特異的プロモーター、内皮細胞特異的プロモーター、または、免疫細胞特異的プロモーター（例えば、B細胞プロモーターまたはT細胞プロモーター）であってもよい。

【0090】

発生的に調節されるプロモーターとしては、例えば、胚発生期中にのみ活性なプロモーター、または、成熟細胞においてのみ活性なプロモーターが挙げられる。

【0091】

「機能的な連結」または「機能的に連結」したとは、2種またはそれ以上の構成要素（例えば、プロモーター及び別の配列エレメント）が、両方の構成要素が正常に機能して、構成要素の少なくとも1種が、その他の構成要素の少なくとも1種が発揮した機能を媒介可能とすることを實現させるように、並列することを含む。例えば、プロモーターは、そのプロモーターが1つまたは複数の転写調節因子の有無に応じてコード配列の転写レベルを調節する場合、コード配列と機能的に連結してもよい。機能的な連結は、互いに連続しているような配列、または、トランスに作用する（例えば、調節配列はコード配列の転写を調節する距離で作用し得る）ような配列を含んでいてもよい。別の例では、免疫グロブリン可変領域（またはV(D)Jセグメント）の核酸配列は、免疫グロブリンの重鎖配列または軽鎖配列へと適切な配列間組換えがなされるように、免疫グロブリン定常領域の核酸配列と機能的に連結してもよい。

【0092】

核酸の「相補性」とは、核酸の一方の鎖のヌクレオチド配列が、その核酸塩基基の方向に起因して、相対する核酸鎖上の別の配列と水素結合を形成することを意味する。DNAの相補的塩基は通常、AとT、及びCとGである。RNAの相補的塩基は通常、CとG、及びUとAである。相補性は完全または実質的／十分であってもよい。2つの核酸間の完全な相補性とは、2つの核酸が、二重鎖内の全ての塩基がワトソンクリック対で相補的塩基に結合した二重鎖を形成可能であることを意味する。「実質的」または「十分」に相補的とは、一方の鎖の配列が、規定のハイブリダイゼーション条件（例えば、塩濃度及び温

10

20

30

40

50

度)において、相対する鎖の配列に対して完全 (completely) 及び／または完全 (perfectly) には相補的ではないが、2本の鎖上の塩基間に十分な結合が生じて安定したハイブリッド複合体を形成するということを意味する。配列、及びハイブリダイズした鎖の T_m (融解温度) を予測するための標準的な数学的計算を使用することにより、または、通常の方法を使用して T_m を実験的に求めることにより、このような条件を予測することは可能である。 T_m は、2本の核酸鎖間で形成されたハイブリダイゼーション複合体の集団が50%変性する (すなわち、二本鎖核酸分子の集団が半分解離して一本鎖になる) 温度を含む。 T_m 未満の温度でハイブリダイゼーション複合体が形成されることが好ましく、それに対し、 T_m 超の温度でハイブリダイゼーション複合体の鎖が融解または分離することが好ましい。核酸の構造特性にその他既知の T_m 計算値を考慮に入れるが、例えば、 $T_m = 81.5 + 0.41 (\%G + C)$ を使用することにより、1MのNaCl水溶液中の既知のG+C含有量を有する核酸の T_m を推定してもよい。

【0093】

「ハイブリダイゼーション条件」は、1本の核酸鎖が相補鎖相互作用及び水素結合により第2の核酸鎖に結合してハイブリダイゼーション複合体を生成する累積環境を含む。このような条件としては、核酸を含有する水溶液または有機溶液の化学成分及びその濃度 (例えば、塩、キレート化剤、ホルムアミド)、ならびにその混合液の温度が挙げられる。インキュベーション時間の長さまたは反応チャンバ寸法の長さなどのその他の因子は、環境に寄与し得る。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. sup. nd ed., pp. 1.90-1.91, 9.47-9.51, 11.47-11.57 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989) を参照されたい (その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

【0094】

ハイブリダイゼーションには、塩基間のミスマッチが発生し得るが、相補的な配列を含有する2種類の核酸が必要となる。2種類の核酸間のハイブリダイゼーションに適切な条件は、核酸の長さ及び相補性の度合い、当該技術分野において周知の変動要因によって決まる。2種類のヌクレオチド配列間の相補性の度合いが高いほど、これらの配列を有する核酸のハイブリッドにおける融解温度 (T_m) の数値は高くなる。相補性の短いストレッチ (例えば、35以下、30以下、25以下、22以下、20以下、または、18以下超のヌクレオチドの相補性) を有する核酸間のハイブリダイゼーションにおいては、ミスマッチの位置が重要になる (Sambrook et al., supra, 11.7-11.8を参照のこと)。通常、ハイブリダイズ可能な核酸の長さは少なくとも約10ヌクレオチドである。ハイブリダイズ可能な核酸の例示的な最小長としては、少なくとも約15ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約22ヌクレオチド、少なくとも約25ヌクレオチド、及び、少なくとも約30ヌクレオチドが挙げられる。更に、相補性領域の長さ及び相補性の度合いなどの因子に応じて、必要に応じ、温度及び洗浄液の塩濃度を調節してもよい。

【0095】

特異的にハイブリダイズ可能となるために、ポリヌクレオチドの配列が、その標的核酸の配列に対して100%相補的である必要はない。更に、ポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション事象に介在セグメントまたは隣接セグメントが含まれないように、1つまたは複数のセグメントにわたりハイブリダイズしてもよい (例えば、ループ構造またはヘアピン構造)。ポリヌクレオチド (例えば、gRNA) は、それらが標的とする標的核酸配列内の標的に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%の配列相補性を含んでいてもよい。例えば、20ヌクレオチド中18ヌクレオチドが標的に対して相補的であるために特異的にハイブリダイズするgRNAは、90%の相補性を示すだろう。この例において、残りの非相補的なヌクレオチドは密集していてもよく、または、相補的なヌクレオチド間に散在し

ていてもよく、互いに連続するまたは相補的なヌクレオチドに連続する必要はない。

【0096】

核酸内の核酸配列における個々のストレッチ間のパーセント相補性は、当該技術分野において周知のBLASTプログラム(basic local alignment search tool)及びPowerBLASTプログラム(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Zhang and Madden (1997) Genome Res. 7:649-656)を使用することにより、または、Smith and Watermanのアルゴリズム(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)を使用した初期設定を用いたGapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix (登録商標), Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)を使用することにより、慣例的に算出することができる。

10

【0097】

本明細書で提供する方法及び組成物は、様々な異なる構成要素を使用している。本明細書の全体にわたり、一部の構成要素が活性変異体及び活性フラグメントを有し得るということを理解されたい。このような構成要素としては、例えば、Cas9タンパク質、CRISPR RNA、tracrRNA及びガイドRNAが挙げられる。これら構成要素それぞれの生物学的活性については、本明細書中の他の箇所に記載している。

【0098】

2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列との関係における「配列同一性」または「同一性」とは、特定の比較窓にわたり最大一致性についてアラインするときに同一である、2つの配列内の残基について言及するものである。パーセンテージの配列同一性を使用してタンパク質について言及するとき、同一ではない残基位置が多くの場合、アミノ酸残基が類似した化学的性質(例えば、電荷または疎水性)を有するその他のアミノ酸残基で置換されることにより分子の機能的性質に変化がもたらされていない保存的アミノ酸置換により異なるということを理解されたい。配列が保存的置換により異なる場合、パーセント配列同一性を上方調節して置換の保存性を補正してもよい。このような保存的置換により異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有すると言われている。この補正を実施するための方法は当業者に周知である。通常、この方法は、保存的置換を完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとしてスコアリングすることによりパーセント配列同一性を高めることを含む。それゆえ、例えば、同一アミノ酸に1のスコアを与え、また非保存的置換にゼロのスコアを与える場合、保存的置換にはゼロ〜1のスコアが与えられる。例えば、プログラムPC/GENE(Intelligenetics, Mountain View, California)を実施することにより、保存的置換のスコアを算出する。

20

30

【0099】

「パーセンテージの配列同一性」は、比較窓にわたり最適にアラインした2つの配列を比較することにより算出された値を含み、比較窓内におけるポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列を最適にアライメントするための参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して、付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含んでいてもよい。両方の配列で同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が存在している位置の数を算出してマッチ位置の数を得て、マッチ位置の数を比較窓内における位置の合計数で割り、その結果に100を掛けてパーセンテージの配列同一性を得ることにより、パーセンテージを算出する。

40

【0100】

特に明記しない限り、配列同一性／類似性の値は、以下のパラメータ、50のGAP Weight及び3のLength Weight、ならびにnws gap dna. cmpスコアリングマトリックスを使用したヌクレオチド配列の%同一性及び%類似性；8のGAP Weight及び2のLength Weight、ならびにBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用したアミノ酸配列の%同一性及び%類似性；を用いたGA

50

P Version 10または任意のその同等プログラムを使用して得られた値を含む。
「同等プログラム」は、任意の問題の2つの配列について、GAP Version 10で作成した対応するアライメントと比較した場合に同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基マッチ及び同一のパーセント配列同一性を有するアライメントを作成する任意の配列比較プログラムを含む。

【0101】

本発明で使用する場合、用語「実質的な同一性」とは、対応する位置に同一残基を含有する配列を含む共有エピソードのことを意味する。例えば、2つの配列は、それらの対応する残基の少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上が関連ストレッチにわたり同一である場合、実質的に同一であるとみなすことができる。関連ストレッチは、例えば、完全な配列であってもよく、または、少なくとも5、10、15、またはそれ以上の残基であってもよい。

【0102】

用語「保存的アミノ酸置換」とは、サイズ、電荷または極性が類似した異なるアミノ酸を有する配列中に通常は存在するアミノ酸の置換のことを意味する。保存的置換の例としては、非極性（疎水性）残基、例えば、イソロイシン、バリンまたはロイシンなどを別の非極性残基に置換することを含む。同様に、保存的置換の例としては、ある極性（親水性）残基を、別の残基に置換すること、例えば、アルギニンとリシンとの間で、グルタミンとアスパラギンとの間で、または、グリシンとセリンとの間で置換することを含む。更に、1つの塩基性残基（例えば、リシン、アルギニンまたはヒスチジンなど）を別の塩基性残基に置換すること、または、1つの酸性残基（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸など）を別の酸性残基に置換することは、保存的置換の追加例である。非保存的置換の例としては、非極性（疎水性）アミノ酸残基、例えば、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニンまたはメチオニンなどを、極性（親水性）残基、例えば、システイン、グルタミン、グルタミン酸またはリシンなどに置換すること、及び／または、極性残基を非極性残基に置換することを含む。代表的なアミノ酸分類について以下にまとめている。

【表A】

アラニン	A l a	A	非極性	中性	1. 8
アルギニン	A r g	R	極性	陽性	- 4. 5
アスパラギン	A s n	N	極性	中性	- 3. 5
アスパラギン酸	A s p	D	極性	陰性	- 3. 5
システイン	C y s	C	非極性	中性	2. 5
グルタミン酸	G l u	E	極性	陰性	- 3. 5
グルタミン	G l n	Q	極性	中性	- 3. 5
グリシン	G l y	G	非極性	中性	- 0. 4
ヒスチジン	H i s	H	極性	陽性	- 3. 2
イソロイシン	I l e	I	非極性	中性	4. 5
ロイシン	L e u	L	非極性	中性	3. 8
リシン	L y s	K	極性	陽性	- 3. 9
メチオニン	M e t	M	非極性	中性	1. 9
フェニルアラニン	P h e	F	非極性	中性	2. 8
プロリン	P r o	P	非極性	中性	- 1. 6
セリン	S e r	S	極性	中性	- 0. 8
スレオニン	T h r	T	極性	中性	- 0. 7
トリプトファン	T r p	W	非極性	中性	- 0. 9
チロシン	T y r	Y	極性	中性	- 1. 3
バリン	V a l	V	非極性	中性	4. 2

10

20

30

40

50

【0103】

免疫グロブリン核酸配列に関する用語「生殖細胞系」は、後代に受け継がれる核酸配列を含む。

【0104】

用語「抗原結合タンパク質」は、抗原に結合する任意のタンパク質を含む。抗原結合タンパク質の例としては、抗体、抗体の抗原結合フラグメント、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、*scFv*、*bis-scFv*、ディアボディ、トリアボディ、テトラボディ、*V-NAR*、*VHH*、*VL*、*F(ab)*、*F(ab)₂*、*DVD*（二重可変ドメイン抗原結合タンパク質）、*SVD*（単一可変ドメイン抗原結合タンパク質）、*bispecific T-cell engager (BiTE)*、または、*Davisbody*（米国特許番号 8, 586, 713（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる））が挙げられる。

10

【0105】

用語「抗原」とは、完全な分子であるか分子内のドメインであるかにかかわらず、その物質に対する結合特異性を有する抗体の産生を誘導可能な物質のことを意味する。用語「抗原」はまた、野生型宿主生物においては自己認識により抗体産生が誘導されないが、適切な遺伝子操作を施して免疫寛容を破綻させた宿主動物ではこのような応答を誘導可能な、物質を含む。

【0106】

用語「エピトープ」とは、抗原結合タンパク質（例えば、抗体）が結合する、抗原上の部位のことを意味する。エピトープは、連続アミノ酸、または、1つまたは複数のタンパク質の三次フォールディングにより並んだ非連続アミノ酸から形成され得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープ（直鎖状エピトープとしても周知）は通常、変性溶媒に対する曝露を維持する一方で、三次フォールディングから形成されたエピトープ（構造的エピトープとしても周知）は通常、変性溶媒による処理により失われる。エピトープは通常、独特な立体配座で、少なくとも3つの、より一般的には、少なくとも5つの、または、8～10のアミノ酸を含む。エピトープの立体配座を同定するための方法としては、例えば、*X線結晶構造解析及び二次元核磁気共鳴が挙げられる。例えば、Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)*を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

20

30

【0107】

抗原またはエピトープと共に使用する場合の用語「自己」とは、通常は宿主種により合成される物質中に含まれているがゆえに、または通常は宿主種が曝露されているがゆえに、宿主種における野生型メンバーのB細胞受容体には認識されないまたは不十分にしか認識されないであろう抗原またはエピトープのことを意味する。このような物質は宿主免疫機構の寛容を誘導する。抗原またはエピトープと共に使用する場合の用語「外来」とは、自己抗原または自己エピトープではない抗原またはエピトープのことを意味する。外来抗原は、宿主種によって通常は産生されない任意の抗原である。

【0108】

用語「抗体」は、4本のポリペプチド鎖、ジスルフィド結合で互いに連結した2本の重（H）鎖及び2本の軽（L）鎖を含む、免疫グロブリン分子を含む。それぞれの重鎖は、重鎖可変ドメイン及び重鎖定常領域（*C_H*）を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、*C_{H1}*、*C_{H2}*及び*C_{H3}*を含む。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常領域（*C_L*）を含む。重鎖及び軽鎖可変ドメインは、フレームワーク領域（*FR*）と呼ばれるより保存された領域が挿入された相補性決定領域（*CDR*）と呼ばれる超可変領域へと、更に細分化することができる。それぞれの重鎖及び軽鎖可変ドメインは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順、*FR1*、*CDR1*、*FR2*、*CDR2*、*FR3*、*CDR3*、*FR4*（重鎖*CDR*を*HCDR1*、*HCDR2*及び*HCDR3*と略記してもよく、軽鎖*CDR*を*LCDR1*、*LCDR2*及び*LCDR3*と略記してもよい）で配置された、3つ

40

50

の C D R 及び 4 つの F R を含む。用語「高親和性」抗体とは、その標的エピトープに対して、約 10^{-9} M 以下（例えば、約 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、または、約 1×10^{-12} M）の K_D を有する抗体のことを意味する。一実施形態では、 K_D は、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E（商標）で測定され、別の実施形態では、 K_D は E L I S A で測定される。

【0109】

用語「重鎖」または「免疫グロブリン重鎖」は、任意の生物由来の、免疫グロブリン重鎖定常領域配列を含む、免疫グロブリン重鎖配列を含む。重鎖可変ドメインは、特に明記しない限り、3 つの重鎖 C D R 領域及び 4 つの F R 領域を含む。重鎖のフラグメントとしては、C D R、C D R と F R、及びこれらの組み合わせが挙げられる。通常、重鎖は、以下の可変ドメイン（N 末端から C 末端の順）、C_H1 ドメイン、ヒンジ、C_H2 ドメイン、及び C_H3 ドメインを有している。重鎖の機能性フラグメントは、エピトープを特異的に認識可能な（例えば、マイクロモル、ナノモルまたはピコモル範囲の K_D を有するエピトープを認識）、細胞から発現及び分泌可能な、少なくとも 1 つの C D R を含む、フラグメントを含む。重鎖可変ドメインは可変領域ヌクレオチド配列によりコードされており、通常、生殖細胞系内に存在する V_H、D_H 及び J_H セグメントのレパートリーに由来する V_H、D_H 及び J_H セグメントを含む。様々な生物における V、D 及び J 重鎖セグメントの配列、位置及び命名法については、I M G T データベース内で見つけることができ、world wide web (www) の URL 「imgt.org」においてインターネットを介してアクセス可能である。

【0110】

用語「軽鎖」は、任意の生物由来の免疫グロブリン軽鎖配列を含み、特に明記しない限り、ヒトカッパ (κ) 及びラムダ (λ) 軽鎖ならびに V_{pre B} に加え、代替軽鎖を含む。軽鎖可変ドメインは通常、特に明記しない限り、3 つの軽鎖 C D R 及び 4 つのフレームワーク (F R) 領域を含む。通常、全長軽鎖は、アミノ末端からカルボキシル末端にかけて F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 を含む可変ドメイン、及び軽鎖定常領域アミノ酸配列を含む。軽鎖可変ドメインは軽鎖可変領域ヌクレオチド配列によりコードされており、通常、生殖細胞系内に存在する軽鎖 V 及び J 遺伝子セグメントのレパートリーに由来する軽鎖 V_L 及び軽鎖 J_L 遺伝子セグメントを含む。様々な生物における軽鎖 V 及び J 遺伝子セグメントの配列、位置及び命名法については、I M G T データベース内で見つけることができ、world wide web (www) の URL 「imgt.org」においてインターネットを介してアクセス可能である。軽鎖としては、例えば、第 1 または第 2 のエピトープが存在する場合に、エピトープ結合タンパク質が選択的に結合する第 1 または第 2 のエピトープのいずれかと選択的には結合しないようなものが挙げられる。軽鎖としてはまた、エピトープが存在する場合に、エピトープ結合タンパク質が選択的に結合する 1 つまたは複数のエピトープと結合及び認識するか、または、エピトープ結合タンパク質が選択的に結合する 1 つまたは複数のエピトープとの重鎖の結合及び認識を補助するようなものが挙げられる。

【0111】

本発明で使用する場合、用語「相補性決定領域」または「C D R」は、通常は（すなわち、野生型動物）免疫グロブリン分子（例えば、抗体または T 細胞受容体）の軽鎖または重鎖の可変領域内の 2 つのフレームワーク領域間に存在する生物の免疫グロブリン遺伝子の核酸配列がコードするアミノ酸配列を含む。C D R は、例えば、生殖細胞系配列または再構成配列によってコードされていてもよく、また例えば、ナイーブまたは成熟した B 細胞または T 細胞によってコードされていてもよい。C D R は、体細胞変異（例えば、動物の生殖細胞系がコードする配列によって異なる）、ヒト化していてもよく、及び／または、アミノ酸置換、付加または欠失により改変されていてもよい。一部の状況（例えば、C D R 3）では、C D R は、連続（例えば、非再構成核酸配列内において）してはいないが、例えば、配列（例えば、V - D - J）がスプライシングまたは連結により組換えられて重鎖 C D R 3 が形成された結果として、B 細胞核酸配列内においては連続している、2 つ

またはそれ以上の配列（例えば、生殖細胞系配列）によってコードされていてもよい。

【0112】

用語「非再構成」は、V遺伝子セグメント及びJ遺伝子セグメント（重鎖においては、D遺伝子セグメントも）が別々に維持されているが、結合して、V（D）Jレパートリーの単一のV、（D）、Jを含む再構成V（D）J遺伝子を形成可能である、免疫グロブリン遺伝子座の状態を含む。

【0113】

用語「重鎖可変領域遺伝子座」は、野生型の重鎖可変（V_H）、重鎖多様性（D_H）、及び重鎖結合（J_H）領域DNA配列が見つかったり、染色体（例えば、マウス染色体）上の位置を含む。

【0114】

用語「カッパ軽鎖可変領域遺伝子座」は、野生型のκ可変（V_κ）及びκ結合（J_κ）領域DNA配列が見つかったり、染色体（例えば、マウス染色体）上の位置を含む。

【0115】

用語「ラムダ軽鎖可変領域遺伝子座」は、野生型のλ可変（V_λ）及びλ結合（J_λ）領域DNA配列が見つかったり、染色体（例えば、マウス染色体）上の位置を含む。

【0116】

「相同」配列（例えば、核酸配列）は、例えば、既知の参照配列に対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるような、既知の参照配列に対して同一であるかまたは実質的に類似しているかのいずれかである配列を含む。相同配列としては、例えば、オルソログス配列及びパラログス配列を挙げることができる。例えば、相同遺伝子は通常、共通祖先のDNA配列から、種分化イベント（オルソログス遺伝子）または遺伝子重複イベント（パラログス遺伝子）のいずれかによって伝わる。「オルソログス」遺伝子は、種分化により共通祖先の遺伝子から進化した異なる種の遺伝子を含む。オルソログスは通常、進化の過程において同一機能を維持している。「パラログス」遺伝子は、ゲノム内重複に関連する遺伝子を含む。パラログスは、進化の過程において新しい機能を発達させ得る。

【0117】

用語「インビトロ」は、人工環境、及び人工環境（例えば、試験管）内で生じるプロセスまたは反応を含む。用語「インビボ」は、天然環境（例えば、細胞、生物または生体）、及び天然環境内で生じるプロセスまたは反応を含む。用語「エクスビボ」は、個体の生体から取り出された細胞、及びこのような細胞内で生じるプロセスまたは反応を含む。

【0118】

用語「ハイブリッド」は、相同染色体対内における第1の染色体と第2の染色体の間の1つまたは複数の標的ゲノム遺伝子座に、1つまたは複数の配列変異を有する（例えば、対立遺伝子変異を有する）細胞または株を含む。例えば、ハイブリッド細胞は、遺伝的に異なる2個体の親間の交配（すなわち、1つまたは複数の遺伝子が異なる親間の交配）による後代に由来していてもよい。一例として、ハイブリッドは、2種類の異なる近交系（すなわち、遺伝的等質性を持たせた交配系）を交配させることにより作製してもよい。全てのヒトはハイブリッドであるとみなされる。

【0119】

1つまたは複数の列挙要素を「含む（comprising）」または「含む（including）」組成物または方法は、明示的に列挙していないその他の要素を含んでもよい。例えば、タンパク質を「含む（comprises）」または「含む（includes）」組成物は、タンパク質を、単独でまたはその他の成分と組み合わせてもよい。

【0120】

値の範囲に関する表記は、その範囲内のまたはその範囲を定義する全ての整数、及びそ

10

20

30

40

50

の範囲内の整数が定義する全ての下位範囲を含む。

【0121】

文脈から特に明らかなでない限り、用語「約」は、記載した値の測定値（例えば、SEM）における標準誤差内の値を包含する。

【0122】

単数形の冠詞「a」、「an」、及び「the」は、文脈上特に明確に定めない限り、複数の指示対象を含む。例えば、用語「a Cas9タンパク質」または「少なくとも1つのCas9タンパク質」は、これらの組み合わせを含む複数のCas9タンパク質を含み得る。

【0123】

統計上有意とは、 $p \leq 0.05$ のことを意味する。

【0124】

I. 概要

本明細書では、自己抗原とエピトープを共有するまたは自己抗原と相同である目的の外来標的抗原（例えば、目的のヒト標的抗原）上のエピトープに結合する抗原結合タンパク質（例えば、抗体）を作製するための組成物及び改善された方法を提供する。このような方法は、2つまたはそれ以上のガイドRNA（gRNA）を使用して単一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ことにより、げっ歯類など（例えば、マウスまたはラット）の非ヒト動物（任意選択的に、ヒト化免疫グロブリン重鎖及び／または軽鎖遺伝子座をそれらの生殖細胞系内に含む）における外来抗原に対する寛容を抑制することを含む。任意選択的に、標的ゲノム遺伝子座を含む細胞はハイブリッド細胞であり、方法は、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、標的領域が相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間のより高度な配列同一性を有するように、標的ゲノム遺伝子座内の標的領域を選択して標的遺伝子改変を実施することを更に含む。このような対の二本鎖切断は、自己抗原の発現に影響を及ぼして、自己抗原の発現を抑制または排除するか、または、外来抗原と共有する自己抗原由来のエピトープの発現を抑制または排除する。そのため、ヒト化免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子座を含みまた標的ゲノム遺伝子座内にこのような変異を有するこのような遺伝子組換え非ヒト動物を、外来抗原で免疫化してもよく、非ヒト動物を、非ヒト動物が外来抗原に対する免疫応答を生じるのに十分な条件下に維持してもよく、外来抗原に結合する抗原結合タンパク質を非ヒト動物または非ヒト動物由来の細胞から得ても良い。

【0125】

ヒト抗原に対する抗体を作製するために使用するマウス、例えば、ヒト化免疫グロブリン重鎖及び／または軽鎖遺伝子座をそれらの生殖細胞系内に含むマウスなどは通常、その他のマウス系統と比較して抗体の多様なレパートリーを産生する能力がBALB/c系統において高いことから、BALB/cを含む系統の組み合わせに由来する。しかしながら、マウスにおける標的遺伝子改変を生成するのに通常使用される胚性幹（ES）細胞（例えば、本明細書に記載するF1H4（VG F1）細胞）と比較して、このような系統の抗体産生マウスに由来するES細胞は通常、培養物内において標的となる能力が低く、及び／または、標的遺伝子改変を有し生殖細胞系を介して標的改変を遺伝させるF0世代マウスを作製する能力が低い。結果として、標的ノックアウトマウスを作製して寛容を克服するための従来の方法は、複数ラウンドの交配及び／または連続標的化を含み、目的の標的においてヌル対立遺伝子にホモ接合性のマウスを出産させて免疫化の準備を整えるための全体のプロセスには、約15～16ヶ月間を要する。

【0126】

本明細書に記載の方法は、この期間を約4～5ヶ月間に有利に短縮する（目的の標的においてヌル対立遺伝子にホモ接合性の仔マウスを約3ヶ月間で出産させることができる）。より短い期間に加えて、本明細書に記載の方法は、ホモ接合性改変の生成に必要なエレクトロポレーションのラウンド数を減少させ、培養に必要な継代回数を減少させて培養に必要な期間を短縮し、必要な細胞の数を減少させ、標的化ベクターを必要とせずその分ス

10

20

30

40

50

クリーニングが簡略化されることによりプロセスを合理化する。本明細書に記載の方法は有利に、自己抗原の発現が止まっていないマウスと比較して、重鎖及び軽鎖V遺伝子セグメントの使用が増加することにより、目的の外来抗原による免疫化後に抗体の多様性増加をもたらす。加えて、本明細書に記載の方法は、対応する自己抗原と交差反応する抗体（すなわち、自己抗原と目的の外来抗原の間にオーバーラップするエピトープに結合する抗体）を産生することにより、目的の外来抗原による免疫化後に、より多様性が大きいエピトープに対して産生された抗体をもたらす、その結果、目的の外来抗原に対するより大きなプールの抗体を産生することが可能となる。

【0127】

II. 標的ゲノム遺伝子座を改変して寛容を破綻させるための方法

「非自己」タンパク質を用いた、ヒト化免疫グロブリン重鎖及び／または軽鎖遺伝子座をそれらの生殖細胞系内に含む非ヒト動物（例えば、マウスまたはラットなどのげっ歯類）の免疫化は、モノクローナル抗体などの特定の抗原結合タンパク質を得るために一般的に使用されている方法である。この免疫化手法は、インビボで成熟した高親和性抗原結合タンパク質をもたらす可能性を有し費用効果と時間効果の両方において優れている場合があるために魅力的である。しかしながら、この手法は、非ヒト動物の天然タンパク質と、非ヒト動物の免疫機構が免疫原を非自己（すなわち、外来）と認識可能となるように免疫化されたタンパク質の間における、配列の相違に依存している。

【0128】

B細胞受容体は、一連の組換え事象により、順に並んだ遺伝子セグメント（例えば、V、D及びJ）からアセンブリされるが、遺伝子セグメントのこのアセンブリは不正確であり、自己抗原を含む様々な抗原に対する親和性を有する受容体を産生することが知られている。自己分子に結合するB細胞受容体を産生するこの能力にもかかわらず、免疫機構は、このような自己反応性B細胞受容体の発生及び増殖を防止し、自己を非自己と区別することにより自己免疫を回避するための、いくつかの自己寛容機構を備えている。例えば、Shlomchik（2008）Immunity 28：18-28、及びKumar and Mohan（2008）40（3）：208-23を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。それゆえ、非ヒト動物の自己抗原と高度な相同性（例えば、構造相同性または配列相同性）を有するヒト抗原に対するヒト化免疫グロブリン遺伝子座を有する非ヒト動物におけるヒト抗体の産生は、免疫寛容に起因して困難な課題となる場合がある。タンパク質の機能的に重要な領域は種を超えて保存される傾向があることから、自己抗原に対する免疫寛容が、これらの重要なエピトープに対する抗体の産生における問題を提起する場合が多い。極めて類似または「相同」な外来（例えば、ヒト）抗原を用いて非ヒト動物（例えば、マウスまたはラットなどのげっ歯類）を免疫化することにより、弱い抗体応答が生じるかまたは抗体応答が皆無となり、それにより、このようなヒト抗原に向かう結合性を有する抗原結合タンパク質（例えば、抗体）を得ることが不確実となる。一例として、内在タンパク質（自己抗原）と外来標的抗原が共有する配列同一性の総計は、免疫機構が標的抗原を外来と認識しないような、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性であってもよい。例えば、非ヒト動物における外来抗原と自己抗原の間の共有エピトープは、免疫寛容が、外来抗原に対する中和抗体を発現するB細胞を減少及び／または除去するため、非ヒト動物における外来抗原に対する効果的な免疫応答の備えを不確実なものとする場合がある。この寛容を克服して、非ヒト動物内において自己抗原またはその相同体（例えば、ヒト相同体）に結合するモノクローナル抗体を得るために、特定の遺伝子組換えまたはノックアウト非ヒト動物を作製して、有意な相同性を共有する非ヒト動物タンパク質をコードする遺伝子（または目的の共有エピトープ）、及び／または、免疫化に利用される抗原をコードするそのヒト対応遺伝子に高く保存された遺伝子（または目的の共有エピトープ）を除去してもよい。例えば、米国特許番号7,119,24

10

20

30

40

50

8を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。しかしながら、このような非ヒト動物の作製には費用と時間の両方がかかる場合がある。

【0129】

標的ノックアウトマウスを作製して寛容を克服するための従来の方法は、複数ラウンドの交配及び／または連続標的化を含む。ヒト抗原に対する抗体を作製するために使用するマウス、例えば、ヒト化免疫グロブリン重鎖及び／または軽鎖遺伝子座（例えば、I g H 遺伝子座とI g κ 遺伝子座の両方においてホモ接合性にヒト化されたV E L O C I M M U N E（登録商標）マウス）をそれらの生殖細胞系内に含むマウスなどは通常、その他のマウス系統と比較して抗体の多様なレパートリーを産生する能力がB A L B／c系統において高いことから、B A L B／cを含む系統の組み合わせに由来する。しかしながら、マウスにおける標的遺伝子改変を生成するのに通常使用される胚性幹（E S）細胞（例えば、50% 129 S v S 6 株及び50% C 5 7 B L／6 N 株からなる、本明細書に記載するF 1 H 4（V G F 1）細胞）と比較して、このような系統の抗体産生マウスに由来するE S細胞は通常、培養物内において標的となる能力が低く、及び／または、標的遺伝子改変を有し生殖細胞系を介して標的改変を遺伝させるF 0世代マウスを作製する能力が低い。それゆえ、V E L O C I M M U N E（登録商標）マウスなどの抗体産生マウスにおける免疫寛容を破綻させるための従来手法は、標的化を受けやすいE S細胞株（例えば、F 1 H 4）内の自己抗原をコードする遺伝子を最初に標的化してから、生殖細胞系を介して標的改変を遺伝させることを含む。このような手法では、大きな標的化ベクター（L T V E C）を設計し、F 1 H 4 E S細胞内にノックアウト（ヌル）対立遺伝子を作製して、目的の標的にヘテロ接合性ノックアウト変異を有するF 0マウスを作製する（通常の期間は5ヶ月間）。そのためV E L O C I M M U N E（登録商標）マウスを、目的の標的にヘテロ接合性ノックアウト変異を有するF 0マウスに改良する。免疫化に好適な三重ホモ接合性マウス（目的の標的においてホモ接合性ヌル、及びI g HとI g κの両方においてホモ接合性にヒト化）を作製するためには、更に2世代の交配が必要となる。全体のプロセスには約15～16ヶ月間を要し（例えば、図1を参照のこと）、以下で説明する連続標的化手法（例えば、図2を参照のこと）と比較してより効果的である。

【0130】

代替的に、大きな標的化ベクター（L T V E C）を設計及び構築してから、抗体産生マウス（例えば、V E L O C I M M U N E（登録商標）マウス、または機能性異所マウスA d a m 6 遺伝子を含むV E L O C I M M U N E（登録商標）マウス（「V E - 3マウス」））から誘導した胚性幹（E S）細胞にエレクトロポレーションして、標的抗原と相同であるまたは標的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内在遺伝子内にヘテロ接合性改変を生成してもよい。その後、第2ラウンドの標的化を実施してホモ接合性改変を生成する。上記の交配手法と比較して時間を必要としないが、このプロセスは依然として時間を要する場合があり、標的抗原による免疫化の準備が整ったF 0マウスの作製には約9～10ヶ月間かかる（例えば、図2を参照のこと）。加えて、このような方法は、複数ラウンドのエレクトロポレーション、及びより多くの継代を用いたより長い培養期間を必要とし、その全てにより、多能性が低下し、抗原結合タンパク質産生用F 0マウスの作製能が低下することになる。例えば、Buehr et al.（2008）Cell 135：1287-1298；Li et al.（2008）Cell 135（7）：1299-1310；及び、Liu et al.（1997）Dev. Dyn. 209：85-91を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

【0131】

本明細書に記載の方法は、この期間を約4～5ヶ月間に有利に短縮する（例えば、図3（目的の標的においてヌル対立遺伝子にホモ接合性の仔マウスを約3ヶ月間で出産させることができるが、その後、免疫化の前に4～5週間成長させる）を参照のこと）。より短い期間に加えて、本明細書に記載の方法は、ホモ接合性改変の生成に必要なエレクトロポ

レーションのラウンド数を減少させ、培養に必要な継代回数を減少させて培養に必要な期間を短縮し、必要な細胞の数を減少させる。スクリーニングは、例えば、対立遺伝子プロープの回収が不要となり、コピー数較正が不要となるために、より簡略化され合理化される。本明細書に記載の方法はまた、自己抗原の発現が止まっていないマウスと比較して、重鎖及び軽鎖V遺伝子セグメントの使用が増加することにより、目的の外来抗原による免疫化後に抗体の多様性増加をもたらす。加えて、本明細書に記載の方法は、対応する自己抗原と交差反応する抗体（すなわち、自己抗原と目的の外来抗原の間にオーバーラップするエピトープに結合する抗体）を産生することにより、目的の外来抗原による免疫化後に、より多様性が大きいエピトープに対して産生された抗体をもたらすことができ、その結果、目的の外来抗原に対するより大きなプールの抗体を産生することが可能となる。

10

【0132】

本明細書では、標的ゲノム遺伝子座を改変して寛容を破綻させるための様々な方法を提供する。本方法はエクスピボまたはインピボで実施可能であり、これらの方法は、目的の外来抗原と相同であるまたは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の発現に影響を及ぼす単一標的ゲノム遺伝子座内の異なる領域を標的とする2つまたはそれ以上のガイドRNA（例えば、2つのgRNA、3つのガイドRNA、または4つのガイドRNA）を利用して、Casタンパク質との2つまたはそれ以上の複合体を形成して、標的核酸を開裂させることができる。細胞が1細胞期胚である場合、2つまたはそれ以上のガイドRNAを単独でまたは外来修復テンプレートと組み合わせてのいずれかで使用してもよく、例えば、外来修復テンプレートは5kb長未満であってもよい。このような方法は、標的遺伝子座における二対立遺伝子の遺伝子改変の生成を促進させ、ゲノム崩壊またはその他の標的改変、例えば、ゲノム内核酸配列の同時欠失及び外来核酸配列への置換などを含んでいてもよい。1つのgRNAを用いた標的化（低頻度で二対立遺伝子改変を生成）と比較して、2つまたはそれ以上のgRNAを用いた標的化は、極めて高い比率で二対立遺伝子改変の生成（例えば、ホモ接合性に標的化された細胞、ホモ接合性に欠失した細胞、及びヘミ接合性に標的化された細胞を含む複合ヘテロ接合性に標的化された細胞）をもたらす。

20

【0133】

二本鎖切断（DSB）に対応する修復は、主に2つの保存されたDNA修復経路（非同末端結合（NHEJ）及び相同組換え（HR））を介して行われる。Kasperek & Humphrey (2011) Seminars in Cell & Dev. Biol. 22: 886-897を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。NHEJは、相同テンプレートを必要とせず、切断末端同士を直接ライゲーションすること、または切断末端を外来配列に直接ライゲーションすることによる、核酸内における二本鎖切断の修復を含む。NHEJによる非連続配列のライゲーションは多くの場合、二本鎖切断部位付近の欠失、挿入または転座をもたらし得る。

30

【0134】

外来修復テンプレートが関与する標的核酸の修復は、2つのポリヌクレオチド間における任意の遺伝情報交換プロセスを含んでいてもよい。例えば、NHEJはまた、切断末端を外来修復テンプレートの末端に直接ライゲーションすること（すなわち、NHEJに基づいた補足）による、外来修復テンプレートの標的導入をもたらし得る。このようなNHEJ介在性標的導入は、相同組換え修復（HDR）経路が容易に利用可能ではない場合（例えば、非分裂細胞、初代細胞、及び相同性に基づいたDNA修復が不十分に行われる細胞において）、外来修復テンプレートの挿入に好ましい場合がある。加えて、相同組換え修復とは対照的に、開裂部位前後における広い領域の配列同一性（Cas媒介開裂により生成されたオーバーハングを越える）に関する情報（ゲノム配列情報が限られたゲノムを有する生物への標的挿入を試みる場合に有用であり得る）は必要ではない。導入は、Casタンパク質によって生成された開裂ゲノム配列内のオーバーハングと適合性のあるオーバーハングに隣接する外来修復テンプレートを使用して、外来修復テンプレートと開裂ゲノム配列の間の平滑末端のライゲーションにより、または、付着末端（すなわち、5'末

40

50

たは3´オーバーハングを有する)のライゲーションにより、進行し得る。例えば、US 2011/020722、WO2014/033644、WO2014/089290、及びMaresca et al. (2013) Genome Res. 23 (3): 539-546を参照されたい(それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。平滑末端をライゲートする場合、フラグメントの結合に必要なマイクロホモロジー領域を生成するために標的及び/またはドナーの切断が必要となる場合があり、それにより、標的配列内に不必要な改変が生成され得る。

【0135】

修復はまた、相同組換え修復(HDR)または相同組換え(HR)により行われ得る。HDRまたはHRはヌクレオチド配列相同性を必要とし得る核酸修復形態を含み、「標的」分子(すなわち、二本鎖切断を受けた分子)を修復するためのテンプレートとしての「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝情報の移行をもたらす。いかなる特定の理論に制限されるものではないが、このような移行は、切断標的とドナーの間に形成されるヘテロ二本鎖DNAのミスマッチ修復、及び/または、ドナーを使用して標的の一部となる遺伝情報を再合成する合成依存的鎖アニーリング(synthesis-dependent strand annealing)、及び/または、関連プロセスを伴い得る。一部の例においては、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、または、ドナーポリヌクレオチドのコピーの一部は、標的DNA内に導入される。Wang et al. (2013) Cell 153: 910-918; Mandalos et al. (2012) PLOS ONE 7: e45768: 1-9; 及びWang et al. (2013) Nat Biotechnol. 31: 530-532を参照されたい(それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

【0136】

目的の外来標的抗原に対する寛容が抑制された非ヒト動物を作製するために、目的の外来抗原と相同であるまたは目的の外来抗原とエпитープを共有する自己抗原の発現に影響を及ぼす1つまたは複数の標的ゲノム遺伝子座を標的として、自己抗原の発現を抑制してもよい。自己抗原の発現を排除することが好ましい。自己抗原がもはや発現されなくなった場合(例えば、自己抗原がタンパク質である場合、タンパク質がもはや発現されなくなる、または、自己抗原がタンパク質上の特定のエпитープである場合、エпитープを含むタンパク質がもはや発現されなくなる)、自己抗原の発現は排除されたとみなされる。

【0137】

1つの例では、1細胞期胚ではない非ヒト動物多能性細胞(例えば、胚性幹(ES)細胞)のゲノムを、Casタンパク質、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、及び、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と接触させてもよい。別の例では、非ヒト動物1細胞期胚のゲノムを、Casタンパク質、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、及び、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と接触させてもよい。

【0138】

本明細書で提供する一部の方法では、標的となる細胞は、本明細書中の他の箇所で定義するハイブリッド細胞である。このような方法はまた、本明細書中の他の箇所で説明する標的ゲノム遺伝子座内の標的領域を選択することを含んでもよい。標的ゲノム遺伝子座または標的ゲノム遺伝子座の残部におけるその他のセグメントと比較して、標的領域が相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間の高いパーセンテージの配列同一性を有するように、標的領域を選択してもよい。一例として、標的領域の選択は、標的ゲノム遺伝子座内の相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の配列を比較して、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、相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間のより高いパーセンテージの配列同一性を有する標的領域

を選択すること、を含んでいてもよい。標的領域を選択するための方法については、本明細書中の他の箇所においてより詳細に記載されている。

【0139】

任意選択的に、ゲノムを、標的ゲノム遺伝子座内の（または、自己抗原の発現に影響を及ぼす、または目的の外来抗原と相同であるまたは目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する第2の自己抗原の発現に影響を及ぼす、第2の標的ゲノム遺伝子座内の）ガイドRNA認識配列にハイブリダイズする別のガイドRNAと更に接触させてもよく、例えば、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、または、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3のガイドRNA及び第4のガイドRNAなどである。接触は、Casタンパク質及びガイドRNAを、本明細書中の他の箇所において更に詳細に記載している任意の形態で、また任意の方法で、細胞に導入することを含んでいてもよい。ガイドRNAはCasタンパク質と複合体を形成し、Casタンパク質を標的ゲノム遺伝子座のガイドRNA認識配列に誘導し、Casタンパク質は、ガイドRNA認識配列内のCasタンパク質開裂部位において標的ゲノム遺伝子座を開裂させる。Casタンパク質で開裂させることで、二本鎖切断または一本鎖切断が生成され得る（例えば、Casタンパク質がニッカーゼである場合）。本方法に使用可能なCasタンパク質及びガイドRNAの例及びバリエーションについては、本明細書中の他の箇所に記載している。Casタンパク質で標的ゲノム遺伝子座を開裂させることで、標的ゲノム遺伝子座が第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変されて、自己抗原の発現を抑制する二対立遺伝子改変が生成され得る。

【0140】

目的の外来抗原は、抗原結合タンパク質が望まれる任意の外来抗原であってもよい。例えば、目的の外来抗原は、ウイルスタンパク質、細菌タンパク質、哺乳動物タンパク質、サルタンパク質、イヌタンパク質、ネコタンパク質、ウマタンパク質、ウシタンパク質、げっ歯類タンパク質（例えば、ラットまたはマウス）、またはヒトタンパク質の全てまたは一部を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなってもよい。例えば、目的の外来抗原は、1つまたは複数の変異または変化を有するヒトタンパク質を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなってもよい。目的の外来抗原、及び自己抗原は、相同であってもよい。例えば、目的の外来抗原、及び自己抗原は、オルソログまたはパラログであってもよい。代替的にまたは加えて、目的の外来抗原、及び自己抗原は、共有エピトープを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなってもよい。共有エピトープは相同タンパク質間に存在していてもよく、または、相同ではない異なるタンパク質間に存在していてもよい。エピトープの直鎖アミノ酸配列及び／または構造適合性（例えば、一次配列相同性がない状態であっても類似した抗原表面）の一方を共有していてもよい。例えば、共有エピトープは、実質的に同一なエピトープを含む。エピトープが2つの抗原間で共有されている場合、第1の抗原上のエピトープに対する抗体は通常、第2の抗原上のエピトープにも結合する。

【0141】

接触は、標的ゲノム遺伝子座と組換えを起こして標的遺伝子改変を生成する外来修復テンプレートの不在下または外来修復テンプレートの存在下で実施可能である。例えば、細胞は1細胞期胚であってもよく、外来修復テンプレートは5 kb長未満であってもよい。外来修復テンプレートの例については、本明細書中の他の箇所に記載されている。

【0142】

一部のこのような方法では、外来修復テンプレートによる標的核酸の修復は、相同組換え修復（HDR）により行われる。相同組換え修復は、Casタンパク質が標的ゲノム遺伝子座におけるDNAの両方の鎖を開裂させて二本鎖切断を生成するとき、Casタンパク質が標的ゲノム遺伝子座におけるDNAの1本の鎖を開裂させて一本鎖切断を生成するニッカーゼである場合、または、対のCasニッカーゼを使用して2つのオフセットニックにより形成された二本鎖切断を生成するとき、実施可能である。このような方法では、外来修復テンプレートは、標的ゲノム遺伝子座の5'標的配列及び3'標的配列に対応す

る5′ホモロジーアーム及び3′ホモロジーアームを含む。ガイドRNA認識配列または開裂部位は、5′標的配列に隣接していてもよく、3′標的配列に隣接していてもよく、5′標的配列と3′標的配列の両方に隣接していてもよく、または、5′標的配列にも3′標的配列にも隣接していなくてもよい。互いに隣接する配列は、互いに約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500または1、000ヌクレオチド以内の配列を含む。任意選択的に、外来修復テンプレートは、5′ホモロジーアームと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んでいてもよく、核酸インサートは、5′標的配列と3′標的配列の間に挿入される。核酸インサートが存在しない場合、外来修復テンプレートは、5′標的配列と3′標的配列の間のゲノム配列を除去するように機能し得る。

【0143】

代替的に、外来修復テンプレートによる標的核酸の修復は、非相同末端結合（NHEJ）介在性ライゲーションにより行われ得る。このような方法では、外来修復テンプレートの少なくとも1つの末端は、標的ゲノム遺伝子座におけるCas媒介開裂により生成された少なくとも1つのオーバーハングに対して相補的な短い一本鎖領域を含む。外来修復テンプレート内の相補的末端は、核酸インサートに隣接していてもよい。例えば、外来修復テンプレートのそれぞれの末端は、標的ゲノム遺伝子座におけるCas媒介開裂により生成されたオーバーハングに対して相補的な短い一本鎖領域を含んでいてもよく、外来修復テンプレート内のこれら相補領域は、核酸インサートに隣接していてもよい。オーバーハング（すなわち、付着末端）は、Cas媒介開裂により生成された二本鎖切断の平滑末端の切断により生成されてもよい。このような切断によりフラグメント結合に必要なマイクロホモロジー領域が生成され得るが、このことにより、標的核酸内に不必要または制御不能な改変が生成され得る。代替的に、対のCasニッカーゼを使用することで、このようなオーバーハングを生成してもよい。例えば、Casタンパク質がニッカーゼである場合、標的ゲノム遺伝子座を、DNAの相対する鎖を標的とする第1及び第2のガイドRNAと接触させてもよく、それにより、ダブルニッキングを介してゲノムが改変される。このことは、標的ゲノム遺伝子座を、標的ゲノム遺伝子座内の異なるガイドRNA認識配列にハイブリダイズする2つのガイドRNAと接触させることにより実施可能である。2つのガイドRNAはCasニッカーゼと2つの複合体を形成し、Casニッカーゼは、一方のガイドRNA認識配列内の標的ゲノム遺伝子座の第1の鎖にニックを生じさせ、もう一方のガイドRNA認識配列内の標的ゲノム遺伝子座の第2の鎖にニックを生じさせる。それから、外来修復テンプレートが標的ゲノム遺伝子座と組換えを起こして標的遺伝子改変を生成する。

【0144】

一部の方法では、核酸インサートは、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部に対して相同またはオルソロガスな配列を含む。このことは、例えば、自己抗原のノックアウトが胚の致死をもたらし得る場合に有用となり得る。核酸インサートは、本明細書に記載する任意の形態（例えば、標的化ベクター、LTVEC、ssODNなど）で外来修復テンプレート内にあってもよく、核酸インサートは、選択カセット（例えば、自己欠失選択カセット）を更に含んでいてもよく、または、選択カセットを欠いていてもよい。このような方法では、例えば、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を欠失させて対応する相同配列またはオルソロガス配列で置換してもよい。例えば、自己抗原をコードする遺伝子の全てを欠失させて対応する相同配列またはオルソロガス配列で置換してもよく、または、自己抗原の特定のモチーフまたは領域をコードする遺伝子の一部を欠失させて対応する相同配列またはオルソロガス配列で置換してもよい。任意選択的に、対応する相同配列またはオルソロガス配列は別の種由来であってもよい。例えば、自己抗原がマウス抗原である場合、対応する相同配列またはオルソロガス配列は、例えば、相同またはオルソロガスな、ラット、ハムスター、ネコ、イヌ、カメ、キツネザルまたはヒトの配列であってもよい。代替的にまたは加えて、相同配列またはオルソロガス配列は、置換された配列と比較して、1つまたは複数の点変異（例えば、1、2、3、4、5つまたはそれ以上

10

20

30

40

50

）を含んでいてもよい。このような点変異は、例えば、自己抗原内の1つまたは複数のエピトープの発現を排除するように機能してもよい。このようなエピトープは、目的の外来抗原と共有するエピトープであってもよい。任意選択的に、このような点変異は、コードポリペプチド内における保存的アミノ酸置換（例えば、アスパラギン酸〔Asp, D〕のグルタミン酸〔Glu, E〕への置換）をもたらし得る。このようなアミノ酸置換は、野生型自己抗原の機能を維持しているが目的の外来抗原上に存在し野生型自己抗原と共有するエピトープを欠いている自己抗原の発現をもたらし得る。同様に、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を欠失させて、目的の外来抗原と自己抗原の間で共有されたエピトープを欠く対応する相同配列またはオルソログ配列で置換することにより、野生型自己抗原の機能を維持しているが目的の外来抗原上に存在し野生型自己抗原と共有するエピトープを欠いている自己抗原の相同体またはオルソログの発現をもたらされ得る。その後、それらエピトープに対する抗原結合タンパク質を作製してもよい。

10

【0145】

それから、本明細書中の他の箇所に記載する方法を用い、改変非ヒト動物多能性細胞を使用して遺伝子組換え非ヒト動物を作製してもよい。例えば、改変非ヒト動物多能性細胞を宿主胚に導入してもよく、宿主胚を代理母に移植して、自己抗原の発現が抑制または排除されるように、標的ゲノム遺伝子座が第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変されて二対立遺伝子改変を有する遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を作製してもよい。1細胞期胚の例においては、遺伝子組換え胚を選択してから、代理母に移植して、自己抗原の発現が抑制または排除されるように、標的ゲノム遺伝子座が第1の染色体と第2の染色体のペア内で改変されて二対立遺伝子改変を有する遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を作製してもよい。それから、本明細書中の他の箇所に記載する方法を用い、F0世代非ヒト動物を使用して目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質を作製してもよい。

20

【0146】

A. 標的領域の選択

外来修復テンプレート（例えば、標的化ベクター）と標的ゲノム遺伝子座の間の相同組換えによる標的遺伝子改変は、特にげっ歯類胚性幹細胞以外の細胞型において極めて非効率的な場合がある。CRISPR/Cas9誘導開裂による1つまたは複数の二本鎖DNA切断の誘導は、外来修復テンプレート（例えば、標的化ベクター）と標的ゲノム遺伝子座の間の相同組換え（HR）によるホモ接合性の標的遺伝子組換えを促進し得る。CRISPR/Cas9はまた、非相同末端結合（NHEJ）修復機構による、ホモ接合性の挿入変異または欠失変異（すなわち、同一の二対立遺伝子改変）を促進し得る。極めて大規模なヒト化を伴う遺伝子改変のために、標的化ベクターを、単一標的ゲノム遺伝子座を標的とする2つのガイドRNAによりガイドされるCRISPR/Cas9ヌクレアーゼシステムと組み合わせることにより、1つのガイドRNAで達成する以上に標的化効率を更に向上させることができる。1つのガイドRNAを用いた標的化（低頻度で二対立遺伝子改変を生成する、または全く生成しない）と比較して、2つのガイドRNAを用いた標的化は、極めて高い比率でホモ接合性に標的化された細胞、ホモ接合性に欠失した細胞、及び複合ヘテロ接合性に標的化された細胞（ヘミ接合性に標的化された細胞を含む）の生成をもたらす。しかしながら、一部のゲノム遺伝子座において、ホモ接合性標的細胞またはホモ接合性欠失細胞を得ることは依然として困難な場合がある。

30

40

【0147】

ラボ環境で通常使用される近交系のマウス系統及びラット系統（事実上それらのゲノム遺伝子座の全てにおいてホモ接合性）とは異なり、ハイブリッド細胞（例えば、全てヒトの）内の標的ゲノム遺伝子座における2つの対立遺伝子の配列は通常、100%同一性とはならない。しかしながら、本明細書で提供する実施例において示すように、ホモ接合性ゲノム改変の頻度は、最初のCRISPR/Cas9誘導改変がHRにより生成されるかまたはNHEJにより生成されるかにかかわらず、標的ゲノム遺伝子座における2つの対立遺伝子間の配列類似性の程度に依存する。この所見は、CRISPR/Cas9誘導ホモ接合性遺伝子改変が相同性に依存する現象であることを示している。このことを裏付け

50

るものとして、本明細書の実施例において示すように、C R I S P R / C a s 9 誘導ホモ接合性改変は多くの場合、対立遺伝子配列におけるヘテロ接合性の喪失（L O H）、及び、同一染色体上の標的ゲノム遺伝子座に結合した構造多型（一塩基多型（S N V）または構造多型（S V））を伴う。L O Hは、片方の標的ゲノム遺伝子座上における変異体の局所的な遺伝子変換機構、または、標的ゲノム遺伝子座のテロメア側上における全ての変異体を含む広範囲の遺伝子変換（極性遺伝子変換）のいずれかを伴い得る。このような遺伝子変換事象は、相同性駆動有糸分裂組換え機構によるものであるに違いない。

【0148】

この知見は、C R I S P R / C a s 9 補助型ホモ接合性標的化実験を設計するためのガイドランスを提供する。2つの対立遺伝子が高度な配列同一性を共有する標的領域を選択することにより、成功の可能性が最大となる。2つの対立遺伝子間の高度な配列相違を有する標的領域におけるC R I S P R / C a s 9 補助型ホモ接合性標的化はほとんど成功しないようである。高密度のS N V及びS Vを有する遺伝子座であっても、標的ゲノム遺伝子座内の連続対立遺伝子配列同一性の最長可能ストレッチ内の配列、または、対立遺伝子配列同一性が最大化された標的ゲノム遺伝子座のストレッチ内の配列を認識するガイドRNAまたはヌクレアーゼ試薬の使用により、成功率は向上し得る。

【0149】

本明細書に記載の方法は、相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間の標的領域の全てまたは一部において配列同一性が最大化され得るように、標的領域を選択することを含んでいてもよい。ハイブリッド細胞において、相同染色体対の一方のコピー上の配列は通常、染色体対のもう一方のコピーと比較したとき若干の差異（例えば、一塩基多型）を有している。それゆえ、このような方法は、標的ゲノム遺伝子座内の相同染色体対（例えば、ヒト細胞は23の相同染色体対を有している）の対応する第1の染色体と第2の染色体の配列を比較してから、相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間の標的領域の全てまたは一部において配列同一性が最大化されるように、標的ゲノム遺伝子座内の標的領域を選択することを含んでいてもよい。利用可能な配列がない場合、このような方法は、配列を比較する前に、相同染色体対内のそれぞれの単一染色体上の標的ゲノム遺伝子座をシーケンシングすることを更に含んでいてもよい。

【0150】

標的領域は、例えば、本明細書で開示する方法における2つまたはそれ以上のガイドRNAのうちの1つまたは1つまたは複数の外来修復テンプレートが標的とする任意のセグメントまたは領域、または、本明細書で開示する方法における2つまたはそれ以上のガイドRNAのうちの1つまたは1つまたは複数の外来修復テンプレートが標的とするセグメントまたは領域に隣接する任意のセグメントまたは領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているか、または、それらから本質的になるか、または、それらからなっているか、または、それらから本質的になるか、または、それらからなっているか、及び／または、本明細書で開示する方法による欠失、置換または挿入の標的となるゲノムセグメントまたはゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているか、または、それらから本質的になるか、または、それらからなる（例えば、2つのガイドRNA認識配列または開裂部位間の領域の上流及び／または下流の配列、または、外来修復テンプレートの5'標的配列と3'標的配列の間の領域の上流及び／または下流の配列）。一例として、2つのガイドRNAを使用する場合、標的領域は、ガイドRNA認識配列またはCas開裂部位間の領域に隣接する5'（すなわち、上流）及び3'（すなわち、下流）の配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているか、または、隣接配列の長さの例については本明細書中の他の箇所に開示されている。

【0151】

一部の方法では、例えば、外来修復テンプレートを最初に設計してもよく、それから、外来修復テンプレートの5'標的配列と3'標的配列に隣接する領域内にガイドRNAを設計して、ガイドRNA認識配列内及び／または隣接する(5'側、3'側または両側)(例えば、2つまたはそれ以上のガイドRNAを使用する場合、最も離れた2つのガイドRNA認識配列間の領域に隣接する)領域の配列同一性を最大化させてもよい。代替的に、一部の方法では、例えば、2つまたはそれ以上のガイドRNAを最初に設計してもよく、それから、5'標的配列及び3'標的配列が2つまたはそれ以上のガイドRNA認識配列に隣接するように、5'標的配列及び3'標的配列内及び／または隣接する(5'側、3'側または両側)(例えば、5'標的配列と3'標的配列の間の領域に隣接する)領域における配列同一性が最大化されるように、外来修復テンプレートを設計してもよい。

10

【0152】

一例として、標的領域は、2つまたはそれ以上のガイドRNAのうちの1つのためのガイドRNA認識配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているてもよい。代替的にまたは加えて、標的領域は、ガイドRNA認識配列に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているてもよい。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。

20

【0153】

別の例では、標的領域は、2つまたはそれ以上のガイドRNA認識配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているてもよい。代替的にまたは加えて、標的領域は、ガイドRNA認識配列に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているてもよい。2つのガイドRNAを使用する方法では、例えば、標的領域は、2つのガイドRNA認識配列または開裂部位に隣接するゲノム領域、または、2つのガイドRNA認識配列または開裂部位に隣接及び含有するゲノム領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているてもよい。代替的にまたは加えて、標的領域は、2つのガイドRNA認識配列または開裂部位間の領域に隣接する5'配列及び／または3'配列、または、2つのガイドRNA認識配列または開裂部位間の領域及び2つのガイドRNA認識配列または開裂部位を含む領域に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているてもよい。2つのガイドRNA認識配列または開裂部位に隣接する上記のゲノム領域の代わりに、最も離れた開裂部位のガイドRNA認識配列に隣接するゲノム領域であろう場合を除いて、3つ以上のガイドRNAを使用する方法に類似の標的領域を選択してもよい。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配

30

40

50

列であってもよい。

【0154】

外来修復テンプレートを使用する方法では、例えば、標的領域は、5'標的配列と3'標的配列に隣接する領域、または、5'標的配列と3'標的配列に隣接及び含有する領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなってもよい。代替的にまたは加えて、標的領域は、5'標的配列と3'標的配列の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列、または、5'標的配列と3'標的配列の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなってもよい。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。

10

【0155】

対立遺伝子配列同一性は、標的領域の全てにおいてまたは標的領域の一部において最大化されてもよい。一例として、対立遺伝子配列同一性は、少なくとも1つのまたはそれぞれのガイドRNA認識配列に相当するゲノム領域において、または、少なくとも1つのまたはそれぞれのガイドRNA認識配列を含む領域において最大化されてもよい。例えば、対立遺伝子配列同一性は、少なくとも1つのまたはそれぞれのガイドRNA認識配列において最大化されてもよい。代替的に、対立遺伝子配列同一性は、少なくとも1つのまたはそれぞれのガイドRNA認識配列において、及び少なくとも1つのまたはそれぞれのガイドRNA認識配列に隣接する5'配列及び／または3'配列において最大化されてもよい。代替的に、対立遺伝子配列同一性は、少なくとも1つのまたはそれぞれのガイドRNA認識配列に隣接する5'配列及び／または3'配列において最大化されてもよい。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。

20

30

【0156】

代替的にまたは加えて、対立遺伝子配列同一性は、外来修復テンプレート用の5'標的配列及び／または3'標的配列に相当するゲノム領域において、または、5'標的配列と3'標的配列のうちの少なくとも1つまたはそれぞれを含む領域において最大化されてもよい。例えば、対立遺伝子配列同一性は、5'標的配列と3'標的配列のうちの少なくとも1つまたはそれぞれにおいて最大化されてもよい。代替的に、対立遺伝子配列同一性は、5'標的配列と3'標的配列のうちの少なくとも1つまたはそれぞれにおいて、及び5'標的配列と3'標的配列のうちの少なくとも1つまたはそれぞれに隣接する5'配列及び／または3'配列において最大化されてもよい。代替的に、対立遺伝子配列同一性は、5'標的配列と3'標的配列のうちの少なくとも1つまたはそれぞれに隣接する5'配列及び／または3'配列において最大化されてもよい。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、

40

50

700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。

【0157】

代替的にまたは加えて、対立遺伝子配列同一性は、欠失、置換または挿入の標的となる領域に隣接する配列において最大化されてもよい。例えば、2つのガイドRNAを使用する方法では、対立遺伝子配列同一性は、2つの開裂部位または2つのガイドRNA認識配列間の領域に隣接する5'配列及び／または3'配列において最大化されてもよい。3つまたはそれ以上のガイドRNAを使用する方法では、対立遺伝子配列同一性は、最も離れた2つの開裂部位または2つのガイドRNA認識配列間の領域に隣接する5'配列及び／または3'配列において最大化されてもよい。別の例における外来修復テンプレートを使用する方法では、対立遺伝子配列同一性は、外来修復テンプレート用の5'標的配列と3'標的配列の間の領域（すなわち、外来修復テンプレートによる欠失の標的となるゲノム領域）に隣接する5'配列及び／または3'配列において最大化されてもよい。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列であってもよい。

【0158】

相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間の標的領域の全てまたは一部において配列同一性が最大化されるように標的領域を選択することは、相同染色体対の第1の染色体と第2の染色体上の標的ゲノム遺伝子座を調べてから、標的ゲノム遺伝子座の残部と比較して最も高い対立遺伝子配列同一性を有する領域を選択することを必ずしも意味せず、その代わりにその他の因子を考慮に入れてもよい。例えば、標的領域が、1つまたは複数のガイドRNA認識配列及び／または1つまたは複数のガイドRNA認識配列に隣接する配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる場合、考慮に入れてもよいその他の因子としては、例えば、どの推定上のガイドRNA認識配列が領域内に位置しているか、推定上のガイドRNA認識配列が固有であるかどうか、推定上のガイドRNA認識配列がどの領域内に位置しているか、領域内における推定上のガイドRNA認識配列をどのように成功裏または正確に予測するか、領域内における推定上のガイドRNA認識配列をどのように成功裏または正確に外来修復テンプレート用の好適な5'標的配列及び3'標的配列に近接させるか、領域内における推定上のガイドRNA認識配列をどのように成功裏または正確にその他の推定上のガイドRNA認識配列に近接させるか、領域内における推定上のガイドRNA認識配列をどのように成功裏または正確に修復の標的となる変異に近接させるか、などが挙げられる。例えば、ガイドRNA認識配列は、ゲノム内の他の箇所には存在しない固有の標的部位であることが好ましい。例えば、US2014/0186843を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。同様に、ガイドRNAの特異性は、GC含有量及び標的化配列の長さに関係してそれらを変化させることにより最適化してもよく、ガイドRNAの

10

20

30

40

50

オフターゲット結合または相互作用を最小限に抑えるガイドRNA標的化配列を設計または評価するためのアルゴリズムが利用可能である。例えば、WO2016/094872を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。一部の方法では、異なる種由来のCas9タンパク質を検討または使用して（例えば、*S. pyogenes* Cas9及び*S. aureus* Cas9）、利用可能なPAM配列数の増加により潜在的なガイドRNA認識配列数を増加させてもよい。

【0159】

1つの例では、標的領域の全てまたは一部が相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間の高いパーセンテージの配列同一性を有するように標的領域を選択してもよい。例えば、標的領域の全てまたは一部が相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間の最低パーセンテージの配列同一性、少なくとも95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.55%、99.6%、99.65%、99.7%、99.75%、99.8%、99.85%、99.9%、99.95%または100%の配列同一性を有するように標的領域を選択してもよい。

【0160】

別の例では、標的領域の全てまたは一部が相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間の少ない数または低密度の一塩基多型を有するように標的領域を選択してもよい。例えば、標的領域の全てまたは一部が相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間の最大密度、配列のkbあたり5、4.9、4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1、3.2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1以下またはゼロなどの一塩基多型を有するように標的領域を選択してもよい。

【0161】

任意選択的に、標的領域は、相同染色体対の対応する第1及び第2の染色体において同一であってもよい。任意選択的に、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座内の連続配列同一性の最長可能ストレッチ内に存在していてもよい。

【0162】

代替的にまたは加えて、標的ゲノム遺伝子座内のその他の領域と比較して、標的領域の全てまたは一部が高いパーセンテージの配列同一性または相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間の少ない数もしくは低密度の一塩基多型を有するように標的ゲノム遺伝子座内の標的領域を選択してもよい。

【0163】

例えば、標的領域は、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、より高いパーセンテージの配列同一性またはより低密度の一塩基多型を有していてもよい。例えば、標的領域は、対応する第1の相同染色体と第2の相同染色体の間の少なくとも99.9%の配列同一性を有していてもよく、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の染色体の間の99.8%以下の配列同一性を有する。

【0164】

例えば、標的領域は、1つまたは複数のガイドRNA認識配列に相当する1つまたは複数の標的ゲノム領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他の潜在的なガイドRNA認識配列に相当するゲノム領域などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。1つの例では、標的領域は、1つまたは複数のガイドRNA認識配列のうちの少なくとも1つまたはそれらを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例え

ば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他の潜在的なガイドRNA認識配列などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。別の例では、標的領域は、1つまたは複数のガイドRNA認識配列のうちの少なくとも1つまたはそれぞれ、及び1つまたは複数のガイドRNA認識配列のうちの少なくとも1つまたはそれぞれに隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他の潜在的なガイドRNA認識配列及びそれらの5'隣接配列及び／または3'隣接配列などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。更に別の例では、標的領域は、1つまたは複数のガイドRNA認識配列のうちの少なくとも1つまたはそれぞれに隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他の潜在的なガイドRNA認識配列の5'隣接配列及び／または3'隣接配列などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。

【0165】

2つのガイドRNAを使用する方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列に相当する第1の標的ゲノム領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているもよく、及び／または、第2のガイドRNA認識配列に相当する第2の標的ゲノム領域内にあってもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他の潜在的なガイドRNA認識配列に相当するゲノム領域などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。例えば、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列及び／または第2のガイドRNA認識配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他の潜在的なガイドRNA認識配列などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。別の例では、標的領域は、高いパーセンテージの第1のガイドRNA認識配列及び第1のガイドRNA認識配列に隣接する5'配列及び／または3'配列及び／または第2のガイドRNA認識配列及び第2のガイドRNA認識配列に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他の潜在的なガイドRNA認識配列及びそれらの5'隣接配列及び／または3'隣接配列に相当するゲノム領域などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。更に別の例では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列に隣接する5'配列及び／または3'配列及び／または第2のガイドRNA認識配列に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他の潜在的なガイドRNA認識配列に隣接する5'配列及び／または3'配列などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。

10

20

30

40

50

。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。

【0166】

それゆえ、標的領域を選択するのに1つのガイドRNAを検討する方法では、例えば、標的領域の選択は、標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上のセグメントを比較して（それぞれのセグメントは、ゲノム内の他の箇所には存在しない異なるガイドRNA認識配列、及び、異なるガイドRNA認識配列の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる）、その他のセグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有するセグメントを標的領域として選択すること、を含む。2つまたはそれ以上のガイドRNAを使用する場合、方法は、その他のセグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有する2つまたはそれ以上のセグメントを標的領域として選択することを含んでいてもよい。任意選択的に、1つまたは複数のセグメントは、標的ゲノム遺伝子座内のそれぞれのガイドRNA認識配列に相当するがゲノム内の他の箇所には存在しないセグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなってもよい。

【0167】

代替的にまたは加えて、2つのガイドRNAを使用する方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間または第1の開裂部位と第2の開裂部位の間の領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなってもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他のペアの潜在的なガイドRNA認識配列または開裂部位の間の領域などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。3つまたはそれ以上のガイドRNAを使用する場合、関連領域は、最も離れた2つのガイドRNA認識配列または2つの開裂部位の間の領域であるだろう。

【0168】

それゆえ、2つのガイドRNAを使用する方法では、例えば、標的領域の選択は、標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上のセグメントを比較して（それぞれのセグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない）、その他のセグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有するセグメントを標的領域として選択すること、を含んでいてもよい。任意選択的に、1つまたは複数のセグメントは、標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当するセグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

【0169】

代替的にまたは加えて、2つのガイドRNAを使用する方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間または第1の開裂部位と第2の

10

20

30

40

50

開裂部位の間の領域、及び第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間または第1の開裂部位と第2の開裂部位の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているとしてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他のペアの潜在的なガイドRNA認識配列または開裂部位の間の領域、及び1つまたは複数のその他のペアの潜在的なガイドRNA認識配列または開裂部位の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有しているもよい。好ましくは、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間または第1の開裂部位と第2の開裂部位の間のゲノム領域、及び第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列または第1の開裂部位と第2の開裂部位の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているとしてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他のペアの潜在的なガイドRNA認識配列または開裂部位の間の領域、及び1つまたは複数のその他のペアの潜在的なガイドRNA認識配列または開裂部位の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び3'配列などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有しているもよい。3つまたはそれ以上のガイドRNAを使用する場合、関連領域は、最も離れた2つのガイドRNA認識配列または2つの開裂部位の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列であるだろう。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。

【0170】

それゆえ、2つのガイドRNAを使用する方法では、例えば、標的領域の選択は、標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上のセグメントを比較して（それぞれのセグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域、及び、異なるガイドRNA認識配列ペア間のゲノム領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない）、その他のセグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有するセグメントを標的領域として選択すること、を含んでいてもよい。任意選択的に、1つまたは複数のセグメントは、標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当するセグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

【0171】

代替的にまたは加えて、2つのガイドRNAを使用する方法では、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間または第1の開裂部位と第2の開裂部位の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらか

ら本質的になるか、または、それらからなっているとしてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他のペアの潜在的なガイドRNA認識配列または開裂部位の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。好ましくは、標的領域は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間または第1の開裂部位と第2の開裂部位の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているとしてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメント、例えば、標的ゲノム遺伝子座内の1つまたは複数のその他のペアの潜在的なガイドRNA認識配列または開裂部位の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び3'配列などと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。3つまたはそれ以上のガイドRNAを使用する場合、関連領域は、最も離れた2つのガイドRNA認識配列または2つの開裂部位の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列であるだろう。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。

【0172】

それゆえ、2つのガイドRNAを使用する方法では、例えば、標的領域の選択は、標的ゲノム遺伝子座の2つまたはそれ以上の非連続セグメントを比較して（それぞれの非連続セグメントは、異なるガイドRNA認識配列ペア間の領域、及び、異なるガイドRNA認識配列ペア間のゲノム領域の5'側、3'側または両側上にある少なくとも10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1,000bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kbまたは150kbの隣接配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない）、その他の非連続セグメントと比較して最も高いパーセンテージの配列同一性を有する非連続セグメントを標的領域として選択すること、を含んでいてもよい。任意選択的に、1つまたは複数の非連続セグメントは、標的ゲノム遺伝子座内にそれぞれの異なるガイドRNA認識配列ペアに相当する非連続セグメントを含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなり、ガイドRNA認識配列はゲノム内の他の箇所には存在しない。

【0173】

外来修復テンプレートを使用する方法では、標的領域は、5'標的配列と3'標的配列の間の領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているとしてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメントと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。代替的にまたは加えて、標的領域は、5'標的配列及び／または3'標的配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているとしてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメントと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。好ましくは、標的領域は、5'標的配列及び3'標的配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているとしてもよく、標的領域は、標的ゲノ

ム遺伝子座のその他のセグメントと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。例えば、標的領域は、5'標的配列と3'標的配列に隣接及び含有する領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっていないてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメントと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。

【0174】

同様に、外来修復テンプレートを使用する方法では、標的領域は、外来修復テンプレートの5'標的配列と3'標的配列の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列、または、外来修復テンプレートの5'標的配列及び3'標的配列間のゲノム領域及び外来修復テンプレートの5'標的配列及び3'標的配列を含むゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっていないてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメントと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。好ましくは、標的領域は、外来修復テンプレートの5'標的配列と3'標的配列の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び3'配列、または、外来修復テンプレートの5'標的配列及び3'標的配列間のゲノム領域及び外来修復テンプレートの5'標的配列及び3'標的配列を含むゲノム領域に隣接する5'配列及び3'配列内の5'配列及び3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっていないてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメントと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。代替的に、標的領域は、外来修復テンプレートの5'標的配列と3'標的配列の間の領域、及び5'標的配列と3'標的配列の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び／または3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっていないてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメントと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。好ましくは、標的領域は、外来修復テンプレートの5'標的配列と3'標的配列の間の領域、及び5'標的配列と3'標的配列の間のゲノム領域に隣接する5'配列及び3'配列を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっていないてもよく、標的領域は、標的ゲノム遺伝子座のその他のセグメントと比較して、高いパーセンテージの配列同一性または低密度の一塩基多型を有していてもよい。5'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。同様に、3'隣接配列は、例えば、少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1,000bpの隣接配列、または、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150kbの隣接配列であってもよい。

【0175】

本明細書で開示する方法により改変した標的領域は、細胞内のDNAにおける任意のセグメントまたは領域（連続または非連続）を含んでいてもよい。標的領域は、細胞由来であってもよく、細胞のゲノムに組み込まれたDNAの異種または外来セグメントであってもよく、または、これらの組み合わせであってもよい。このようなDNAの異種または外来セグメントとしては、導入遺伝子、発現カセット、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド、または、ゲノムDNAの異種または外来領域を挙げることができる。

【0176】

B. CRISPR/Casシステム

本明細書で開示する方法は、Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR関連 (Cas) システム、または細胞内のゲノムを改変するためのこのような

システムの構成要素を利用している。CRISPR/Casシステムは、Cas遺伝子の発現またはCas遺伝子の活性誘導に關与する転写産物及びその他の要素を含む。CRISPR/Casシステムは、I型、II型またはIII型のシステムであってもよい。代替的に、CRISPR/Casシステムは、例えば、V型システム（例えば、サブタイプV-AまたはサブタイプV-B）であってもよい。本明細書で開示する方法及び組成物は、核酸の部位特異的開裂にCRISPR複合体（Casタンパク質と複合体を形成したガイドRNA（gRNA）を含む）を利用したCRISPR/Casシステムを採用している。

【0177】

本明細書で開示する方法に使用するCRISPR/Casシステムは非天然である。「非天然」システムは、人間の手の関与を示す全て、例えば、構成要素の天然状態から変化または変異した、構成要素が実際に自然に結合する少なくとも1つのその他の構成要素を少なくとも実質的に含まない、または、構成要素が自然に結合しない少なくとも1つのその他の構成要素と關連する、1つまたは複数のシステム構成要素などを含む。例えば、一部のCRISPR/Casシステムは、共に自然に生じないgRNA及びCasタンパク質を含む非天然CRISPR複合体を採用している。その他のCRISPR/Casシステムは自然に生じないCasタンパク質を採用しており、またその他のCRISPR/Casシステムは自然に生じないgRNAを採用している。

【0178】

(1) Casタンパク質

Casタンパク質は通常、ガイドRNA（gRNA、以下でより詳細に説明する）と相互作用可能な、少なくとも1つのRNA認識または結合ドメインを含む。Casタンパク質はまた、ヌクレアーゼドメイン（例えば、DNaseまたはRNaseドメイン）、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質-タンパク質相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、及びその他のドメインを含んでもよい。ヌクレアーゼドメインは核酸開裂のための触媒活性を有し、触媒活性には核酸分子における共有結合の切断が含まれる。開裂により平滑末端または付着末端が生成されてもよく、一本鎖または二本鎖であってもよい。例えば、野生型Cas9タンパク質は通常、平滑な開裂産物を生成する。代替的に、野生型Cpf1タンパク質（例えば、FnCpf1）は、非標的鎖上のPAM配列から18番目の塩基対の後方及び標的鎖上の23番目の塩基の後方で生じる開裂により、5ヌクレオチド5'オーバーハングを有する開裂産物をもたらし得る。Casタンパク質は、標的核酸内の二本鎖切断（例えば、平滑末端を伴う二本鎖切断）を生成するための完全な開裂活性を有していてもよく、または、標的核酸内の一本鎖切断を生成するニッカーゼであってもよい。

【0179】

Casタンパク質の例としては、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e（CasD）、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9（Csn1またはCsx12）、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1（CasA）、Cse2（CasB）、Cse3（CasE）、Cse4（CasC）、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、CsF1、CsF2、CsF3、CsF4及びCu1966、ならびに、その相同体または修飾型が挙げられる。

【0180】

例示的なCasタンパク質は、Cas9タンパク質、またはII型CRISPR/Casシステムに由来するCas9タンパク質から誘導したタンパク質である。Cas9タンパク質はII型CRISPR/Casシステムに由来しており、通常は、保存構造を有する4つのモチーフを共有している。モチーフ1、2及び4はRuvC様モチーフであ

10

20

30

40

50

り、モチーフ3はHNHモチーフである。例示的なCas9タンパク質は、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus thermophilus*、*Streptococcus sp.*、*Staphylococcus aureus*、*Nocardia dassonvillei*、*Streptomyces pristinaespiralis*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptosporangium roseum*、*Streptosporangium roseum*、*Alicyclobacillus acidocaldarius*、*Bacillus pseudomycooides*、*Bacillus selenitireducens*、*Exiguobacterium sibiricum*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Lactobacillus salivarius*、*Microscilla marina*、*Burkholderiales bacterium*、*Polaromonas naphthalenivorans*、*Polaromonas sp.*、*Crocospaera watsonii*、*Cyanothece sp.*、*Microcystis aeruginosa*、*Synechococcus sp.*、*Acetohalobium arabaticum*、*Ammonifex degensii*、*Caldicelulosiruptor becscii*、*Candidatus Desulforudis*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Finergoldia magna*、*Natranaerobius thermophilus*、*Pelotomaculum thermopropionicum*、*Acidithiobacillus caldus*、*Acidithiobacillus ferrooxidans*、*Allochrochromatium vinosum*、*Marinobacter sp.*、*Nitrosococcus halophilus*、*Nitrosococcus watsoni*、*Pseudoalteromonas haloplanktis*、*Ktedonobacter racemifer*、*Methanohalobium evestigatum*、*Anabaena variabilis*、*Nodularia spumigena*、*Nostoc sp.*、*Arthrospira maxima*、*Arthrospira platensis*、*Arthrospira sp.*、*Lyngbya sp.*、*Microcoleus chthonoplastes*、*Oscillatoria sp.*、*Petrotoga mobilis*、*Thermosiphon africanus*、*Acaryochloris marina*、*Neisseria meningitidis*、または、*Campylobacter jejuni*由来である。Cas9ファミリーメンバーの追加の例については、WO2014/131833に記載されている（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。*S. pyogenes*由来のCas9（SpCas9）（SwissProt受入番号Q99ZW2で登録）は例示的なCas9タンパク質である。*S. aureus*由来のCas9（SaCas9）（UniProt受入番号J7RUA5で登録）は別の例示的なCas9タンパク質である。*Campylobacter jejuni*由来のCas9（CjCas9）（UniProt受入番号Q0P897で登録）は別の例示的なCas9タンパク質である。例えば、Kim et al. (2017) Nat. Comm. 8:14500を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。SaCas9はSpCas9よりも小さく、CjCas9はSaCas9とSpCas9の両方よりも小さい。

【0181】

Casタンパク質の別の例はCpf1（*Prevotella*及び*Francisella* 1由来のCRISPR）タンパク質である。Cpf1は、Cas9の対応するドメインに対して相同なRuvC様ヌクレアーゼドメインに加えて、Cas9の固有アルギニンリッチクラスターの同等物を含む大きなタンパク質（約1300アミノ酸）である。しかしながら、Cpf1は、Cas9タンパク質内に存在するHNHヌクレアーゼドメイン

10

20

30

40

50

を欠いており、HNHDメインを含む長いインサートを含むCas9とは対照的に、RuvC様ドメインはCpf1配列内において連続している。例えば、Zetsche et al. (2015) Cell 163 (3) : 759-771を参照されたい(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。例示的なCpf1タンパク質は、Francisella tularensis 1、Francisella tularensis subsp. novicida、Prevotella albensis、Lachnospiraceae bacterium MC2017_1、Butyrivibrio proteoclasticus、Peregrinibacterium bacterium GW2011_GWA2_33_10、Parcubacterium bacterium GW2011_GWC2_44_17、Smithe

lla sp. SCADC、Acidaminococcus sp. BV3L6、Lachnospiraceae bacterium MA2020、Candidatus Methanoplasma termitum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi 237、Leptospira inadai、Lachnospiraceae bacterium ND2006、Porphyromonas crevioricanis 3、Prevotella disiens、及びPorphyromonas macacae由来である。Francisella novicida U112由来のCpf1 (FnCpf1; Uniprot受入番号A0Q7Q2で登録)は例示的なCpf1タンパク質である。

【0182】

Casタンパク質は、野生型タンパク質(すなわち、自然に存在するタンパク質)、修飾Casタンパク質(すなわち、Casタンパク質変異体)、または野生型もしくは修飾Casタンパク質のフラグメントであってもよい。Casタンパク質はまた、野生型または修飾Casタンパク質の触媒活性に関与する活性変異体またはフラグメントであってもよい。触媒活性に関与する活性変異体またはフラグメントは、野生型もしくは修飾Casタンパク質またはその一部に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を含んでいてもよく、活性変異体は所望の開裂部位で切断する機能を維持しており、それゆえ、ニック誘導活性または二本鎖切断誘導活性を維持している。ニック誘導活性または二本鎖切断誘導活性のアッセイは周知であり、通常は、開裂部位を含有するDNA基質上におけるCasタンパク質の全体活性及びを特異性を測定する。

【0183】

修飾Casタンパク質の1つの例は、非特異的なDNA接触を抑制するように設計された改変を有するStreptococcus pyogenes Cas9のハイファイ変異体(N497A/R661A/Q695A/Q926A)である、修飾SpCas9-HF1タンパク質である。例えば、Kleinstiver et al. (2016) Nature 529 (7587) : 490-495を参照されたい(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。修飾Casタンパク質の別の例は、オフターゲット効果を抑制するように設計された修飾eSpCas9変異体(K848A/K1003A/R1060A)である。例えば、Slaymaker et al. (2016) Science 351 (6268) : 84-88を参照されたい(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。その他のSpCas9変異体としては、K855A及びK810A/K1003A/R1060Aが挙げられる。

【0184】

Casタンパク質を修飾して、核酸の結合親和性、核酸の結合特異性及び酵素活性のうちの1つまたは複数を上昇または低下させてもよい。またCasタンパク質を修飾して、タンパク質の任意のその他の活性または性質、例えば、安定性などを変化させてもよい。例えば、Casタンパク質の1つまたは複数のヌクレアーゼドメインを修飾、欠失または不活性化してもよく、または、Casタンパク質をトランケートして、タンパク質の機能に不可欠ではないドメインを除去、または、Casタンパク質の活性を最適化(例えば、

向上または抑制)してもよい。

【0185】

Casタンパク質は、少なくとも1つのヌクレアーゼドメイン、例えば、DNaseドメインなどを含んでいてもよい。例えば、野生型Cpf1タンパク質は通常、標的DNAの両方の鎖を開裂させるRuvC様ドメイン（おそらく二量体構造で）を含んでいる。Casタンパク質はまた、少なくとも2つのヌクレアーゼドメイン、例えば、DNaseドメインなどを含んでいてもよい。例えば、野生型Cas9タンパク質は通常、RuvC様ヌクレアーゼドメイン及びHNH様ヌクレアーゼドメインを含んでいる。RuvCドメイン及びHNHドメインはそれぞれ、二本鎖DNAの異なる鎖を切断して、DNA内に二本鎖切断を生成することができる。例えば、Jinek et al. (2012) Science 337: 816-821を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

【0186】

ヌクレアーゼドメインの一方または両方を、それらがもはや機能しなくなるようにまたはヌクレアーゼ活性が抑制されるように、欠失または変異させてもよい。ヌクレアーゼドメインのうちの一方が欠失または変異している場合、結果として生じるCasタンパク質（例えば、Cas9）はニッカーゼと呼ばれてもよく、二本鎖DNA内のガイドRNA認識配列に一本鎖切断を生成できるが、二本鎖切断は生成できない（すなわち、相補鎖または非相補鎖を開裂させることはできるが、両方は不可能である）。両方のヌクレアーゼドメインが欠失または変異している場合、結果として生じるCasタンパク質（例えば、Cas9）は、二本鎖DNAの両方の鎖（例えば、ヌクレアーゼヌルCasタンパク質）を開裂させるための低い機能を有することになる。Cas9をニッカーゼに変換する変異の一例は、S. pyogenes由来Cas9のRuvCドメイン内におけるD10A（Cas9の10位におけるアスパラギン酸からアラニンへの）変異である。同様に、S. pyogenes由来Cas9のHNHドメイン内におけるH939A（839位のアミノ酸におけるヒスチジンからアラニンへの）、またはH840A（840位のアミノ酸におけるヒスチジンからアラニンへの）またはN863A（N863位のアミノ酸におけるアスパラギンからアラニンへの）は、Cas9をニッカーゼに変換することができる。Cas9をニッカーゼに変換する変異のその他の例としては、S. thermophilus由来のCas9に対応する変異が挙げられる。例えば、Saprunauskas et al. (2011) Nucleic Acids Research 39: 9275-9282、及びWO2013/141680を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような変異は、部位特異的突然変異誘発、PCRによる変異誘発または全遺伝子合成などの方法を使用して生成することができる。ニッカーゼを生成するその他の変異の例は、例えば、WO2013/176772及びWO2013/142578に見出すことができる（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。ヌクレアーゼドメインの全てがCasタンパク質内で欠失または変異している（例えば、ヌクレアーゼドメインの両方がCas9タンパク質内で欠失または変異している）場合、結果として生じるCasタンパク質（例えば、Cas9）は、二本鎖DNAの両方の鎖（例えば、ヌクレアーゼヌルまたはヌクレアーゼ不活性Casタンパク質）を開裂させるための低い機能を有することになる。1つの特定の例は、D10A/H840A S. pyogenes Cas9二重変異、または、S. pyogenes Cas9に最適にアラインした場合の別種由来のCas9内の対応する二重変異である。別の特定の例は、D10A/N863A S. pyogenes Cas9二重変異、または、S. pyogenes Cas9に最適にアラインした場合の別種由来のCas9内の対応する二重変異である。

【0187】

Staphylococcus aureus Cas9タンパク質の触媒ドメイン内における不活性化変異の例もまた知られている。例えば、Staphylococcus aureus Cas9酵素（SaCas9）は、ヌクレアーゼ不活性Casタンパク質

10

20

30

40

50

を作製するために、N580位の置換（例えば、N580A置換）及びD10位の置換（例えば、D10A置換）を含んでいてもよい。例えば、WO2016/106236を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

【0188】

Cpf1タンパク質の触媒ドメイン内における不活性化変異の例もまた知られている。Francisella novicida U112由来のCpf1タンパク質（FnCpf1）、Acidaminococcus sp. BV3L6由来のCpf1タンパク質（AsCpf1）、Lachnospiraceae bacterium ND2006由来のCpf1タンパク質（LbCpf1）及びMoraxella bovoculi 237由来のCpf1タンパク質（MbCpf1 Cpf1）に関しては、このような変異は、AsCpf1の908位、993位もしくは1263位またはCpf1オルソログ内の対応する位置における変異、または、LbCpf1の832位、925位、947位もしくは1180位またはCpf1オルソログ内の対応する位置における変異を含み得る。このような変異は、例えば、AsCpf1のD908A、E993A及びD1263Aの変異またはCpf1オルソログ内の対応する変異、または、LbCpf1のD832A、E925A、D947A及びD1180Aの変異またはCpf1オルソログ内の対応する変異のうちの1つまたは複数を含み得る。例えば、US2016/0208243を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

10

【0189】

Casタンパク質はまた、融合タンパク質として異種ポリペプチドと機能的に連結してもよい。例えば、Casタンパク質を、開裂ドメイン、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写抑制因子ドメインと融合させることができる。WO2014/089290を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。またCasタンパク質を異種ポリペプチドと融合させて、安定性の向上または低下をもたらしてもよい。融合ドメインまたは融合異種ポリペプチドは、Casタンパク質内のN末端、C末端または内部に位置していてもよい。

20

【0190】

Cas融合タンパク質の一例は、細胞内局在をもたらす異種ポリペプチドに融合したCasタンパク質である。このような異種ポリペプチドとしては、例えば、1つまたは複数の核局在化シグナル（NLS）、例えば、核を標的とするSV40 NLS、ミトコンドリアを標的とするミトコンドリア局在化シグナル、ER保留シグナルなどを挙げることができる。例えば、Lange et al. (2007) J. Biol. Chem. 282:5101-5105を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。その他の好適なNLSとしてはαインポーチンNLSが挙げられる。このような細胞内局在化シグナルは、Casタンパク質内のN末端、C末端または任意の場所に位置していてもよい。NLSは塩基性アミノ酸のストレッチを含んでいてもよく、1つの部分からなる配列または2つの部分からなる配列であってもよい。任意選択的に、Casタンパク質は、N末端のNLS（例えば、αインポーチンNLS）及び／またはC末端のNLS（例えば、SV40 NLS）を含む2つまたはそれ以上のNLSを含む。

30

40

【0191】

Casタンパク質はまた細胞貫通ドメインと機能的に連結してもよい。例えば、細胞貫通ドメインは、HIV-1 TATタンパク質、ヒトB型肝炎ウイルス、MPG、Pep-1、VP22由来のTLM細胞貫通モチーフ、単純ヘルペスウイルス由来の細胞貫通ペプチド、またはポリアルギニンペプチド配列から誘導することができる。例えば、WO2014/089290を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。細胞貫通ドメインは、Casタンパク質内のN末端、C末端または任意の場所に位置していてもよい。

【0192】

Casタンパク質はまた、追跡または精製を容易とするための異種ポリペプチド、例え

50

ば、蛍光タンパク質、精製タグまたはエピトープタグなどと機能的に連結してもよい。蛍光タンパク質の例としては、緑色蛍光タンパク質（例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、eGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1）、黄色蛍光タンパク質（例えば、YFP、eYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1）、青色蛍光タンパク質（例えば、eBFP、eBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire）、青緑色蛍光タンパク質（例えば、eCFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan）、赤色蛍光タンパク質（mKate、mKate2、mPlum、DsRedモノマー、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred）、橙黄色蛍光タンパク質（mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato）、及び任意のその他の適切な蛍光タンパク質が挙げられる。タグの例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、キチン結合タンパク質（CBP）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン（TRX）、ポリ（NANP）、タンデム親和性精製（TAP）タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、ヘマグルチニン（HA）、nus、Softag 1、Softag 3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、ヒスチジン（His）、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（BCCP）、及びカルモジュリンが挙げられる。

【0193】

Cas9タンパク質をまた、外来修復テンプレートまたは標識核酸にテザリングしてもよい。このようなテザリング（すなわち、物理的連結）は共有結合相互作用または非共有結合相互作用を介して達成可能であり、テザリングは直接（例えば、タンパク質上のシステイン残基またはリシン残基の修飾またはインテイン修飾により達成可能な、直接融合または化学的コンジュゲートを介して）であってもよく、または、1つまたは複数の介在リンカーまたはアダプター分子（ストレプトアビジンまたはアプタマーなど）を介して達成可能である。例えば、Pierce et al. (2005) *Mini Rev. Med. Chem.* 5 (1): 41-55; Duckworth et al. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46 (46): 8819-8822; Schaeffer and Dixon (2009) *Australian J. Chem.* 62 (10): 1328-1332; Goodman et al. (2009) *Chem. Biochem.* 10 (9): 1551-1557; 及び、Khatwani et al. (2012) *Bioorg. Med. Chem.* 20 (14): 4532-4539を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。タンパク質-核酸コンジュゲートを合成するための非共有結合戦略としては、ビオチン-ストレプトアビジン法及びニッケル-ヒスチジン法が挙げられる。共有結合タンパク質-核酸コンジュゲートは、多種多様な化学反応を使用して、官能化核酸をタンパク質と適切に連結させることにより合成可能である。これらの化学反応の一部は、タンパク質表面上のアミノ酸残基（例えば、リシンアミンまたはシステインチオール）へのオリゴヌクレオチドの直接結合を伴い、その一方で、その他のより多くの複合体スキームは、タンパク質の翻訳後修飾、または、触媒性または反応性のタンパク質ドメインの関与を必要とする。タンパク質を核酸に共有結合させるための方法としては、例えば、オリゴヌクレオチドをタンパク質のリシン残基またはシステイン残基に化学架橋させること、発現タンパク質ライゲーション、化学酵素法、及びフォトアプタマーの使用を挙げることができる。外来修復テンプレートまたは標識核酸を、Cas9タンパク質内のC末端、N末端または内部領域にテザリングしてもよい。外来修復テンプレートまたは標識核酸をCas9タンパク質のC末端またはN末端にテザリングすることが好ましい。同様に、Ca

10

20

30

40

50

s 9 タンパク質を、外来修復テンプレートまたは標識核酸内の 5' 末端、3' 末端または内部領域にテザリングしてもよい。つまり、任意の方向及び極性で外来修復テンプレートまたは標識核酸をテザリングしてもよい。C a s 9 タンパク質を外来修復テンプレートまたは標識核酸の 5' 末端または 3' 末端にテザリングすることが好ましい。

【0194】

C a s タンパク質を任意の形態で提供してもよい。例えば、C a s タンパク質を、タンパク質の形態、例えば、g R N A と複合体を形成した C a s タンパク質などで提供してもよい。代替的に、C a s タンパク質を、C a s タンパク質をコードする核酸の形態、例えば、R N A（例えば、メッセンジャー R N A（m R N A））または D N A など提供してもよい。任意選択的に、C a s タンパク質をコードする核酸は、特定の細胞または生物内のタンパク質へと効率的に翻訳されるようにコドン最適化されていてもよい。例えば、C a s タンパク質をコードする核酸を修飾して、天然ポリヌクレオチド配列と比較して、細菌細胞、イースト菌、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、または任意のその他の目的の宿主細胞においてより高頻度で使用されているコドンに置換してもよい。C a s タンパク質をコードする核酸を細胞に導入する場合、C a s タンパク質は、細胞内で一時的に、条件的にまたは構成的に発現してもよい。

【0195】

C a s タンパク質をコードする核酸は、細胞のゲノムに安定的に組み込まれてもよく、細胞内で活性化しているプロモーターと機能的に連結してもよい。代替的に、C a s タンパク質をコードする核酸は、発現構築物内のプロモーターと機能的に連結してもよい。発現構築物は、目的の遺伝子またはその他の核酸配列（例えば、C a s 遺伝子）の発現を誘導可能な任意の核酸構築物、及び、このような目的の核酸配列を標的細胞へと移行させることができる任意の核酸構築物を含む。例えば、C a s タンパク質をコードする核酸は、核酸インサートを含む標的化ベクター内及び／または g R N A をコードする D N A を含むベクター内にあってもよい。代替的に、C a s タンパク質をコードする核酸は、核酸インサートを含む標的化ベクターから分離された及び／または g R N A をコードする D N A を含むベクターから分離された、ベクターまたはプラスミド内にあってもよい。発現構築物に使用可能なプロモーターとしては、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ウサギ細胞、多能性細胞、胚性幹（E S）細胞、または接合体のうちの 1 つまたは複数において活性化しているプロモーターが挙げられる。このようなプロモーターは、例えば、条件的プロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであってもよい。任意選択的に、プロモーターは、一方の方向への C a s タンパク質の発現ともう一方の方向へのガイド R N A の発現の両方の発現を誘導する二方向性プロモーターであってもよい。このような二方向性プロモーターは、（1）3 つの外部制御エレメント：遠位配列エレメント（D S E）、近位配列エレメント（P S E）及び T A T A ボックスを含む、完全で通常で一方向性の P o l I I I プロモーター、及び（2）D S E の 5' 末端に逆方向で融合した P S E 及び T A T A ボックスを含む、第 2 の基本的な P o l I I I プロモーターからなってもよい。例えば、H 1 プロモーターでは、D S E は P S E 及び T A T A ボックスに隣接しており、U 6 プロモーターに由来する P S E 及び T A T A ボックスを付加することにより逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを作製することにより、プロモーターは二方向性となり得る。例えば、U S 2 0 1 6 / 0 0 7 4 5 3 5 を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。二方向性プロモーターを使用して、C a s タンパク質をコードする遺伝子とガイド R N A をコードする遺伝子を同時に発現させることにより、輸送を促進するコンパクトな発現カセットの作製が可能となる。

【0196】

（2）ガイド R N A

「ガイド R N A」または「g R N A」は、C a s タンパク質（例えば、C a s 9 タンパク質）に結合してその C a s タンパク質を標的 D N A 内の特定の位置へと向かわせる R N

A分子である。ガイドRNAは、2つのセグメント、「DNA標的化セグメント」及び「タンパク質結合セグメント」を含んでいてもよい。「セグメント」は、分子の区画または領域、例えば、RNA内におけるヌクレオチドの連続ストレッチなどを含む。一部のgRNA、例えば、Cas9のgRNAなどは、2つの独立したRNA分子：「活性化RNA」（例えば、tracrRNA）及び「標的化RNA」（例えば、CRISPR RNA またはcrRNA）を含んでいてもよい。その他のgRNAは単一RNA分子（単一RNAポリヌクレオチド）であり、「単一分子gRNA」、「単一ガイドRNA」または「sgRNA」と呼ばれることもある。例えば、WO2013/176772、WO2014/065596、WO2014/089290、WO2014/093622、WO2014/099750、WO2013/142578、及びWO2014/131833を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。例えば、Cas9において、単一ガイドRNAは、tracrRNAに融合したcrRNA（例えば、リンカーを介して）を含んでいてもよい。例えば、Cpf1において、crRNAのみが標的配列への結合または開裂を達成する必要がある。用語「ガイドRNA」及び「gRNA」は、二重分子gRNA（すなわち、モジュールgRNA）と単一分子gRNAの両方を含む。

【0197】

例示的な2分子gRNAは、crRNA様（「CRISPR RNA」、または「標的化RNA」、または「crRNA」または「crRNAリピート」）分子及び対応するtracrRNA様（「トランス活性化CRISPR RNA」、または「活性化RNA」または「tracrRNA」）分子を含む。crRNAは、gRNAのDNA標的化セグメント（一本鎖）と、gRNAのタンパク質結合セグメントのdsRNA二重鎖における一方の半分を形成するヌクレオチドのストレッチの両方を含む。

【0198】

対応するtracrRNA（活性化RNA）は、gRNAのタンパク質結合セグメントのdsRNA二重鎖におけるもう一方の半分を形成するヌクレオチドのストレッチを含む。crRNAのヌクレオチドのストレッチは、tracrRNAのヌクレオチドのストレッチに対して相補的であり、tracrRNAのヌクレオチドのストレッチにハイブリダイズしてgRNAのタンパク質結合ドメインのdsRNA二重鎖を形成する。このように、それぞれのcrRNAは対応するtracrRNAを有すると言われることもある。

【0199】

crRNAとtracrRNAの両方を必要とするシステムでは、crRNAと対応するtracrRNAはハイブリダイズしてgRNAを形成する。crRNAのみを必要とするシステムでは、crRNAはgRNAであってもよい。crRNAは更に、ガイドRNA認識配列にハイブリダイズする一本鎖DNA標的化セグメントをもたらす。細胞内の修飾に使用する場合、任意のcrRNAまたはtracrRNA分子の正確な配列は、RNA分子を使用する種に特異的となるように設計してもよい。例えば、Mali et al. (2013) Science 339:823-826; Jinek et al. (2012) Science 337:816-821; Hwang et al. (2013) Nat. Biotechnol. 31:227-229; Jiang et al. (2013) Nat. Biotechnol. 31:233-239; 及び、Cong et al. (2013) Science 339:819-823を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

【0200】

任意のgRNAのDNA標的化セグメント（crRNA）は、標的DNA内の配列（すなわち、ガイドRNA認識配列）に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。gRNAのDNA標的化セグメントは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対合）を介して配列特異的な様式で標的DNAと相互作用する。このように、DNA標的化セグメントのヌクレオチド配列は様々であり得、gRNAと標的DNAが相互作用する標的DNA内の位置を決定する。本gRNAのDNA標的化セグメントを、標的DNA内の任意の所望の配

列にハイブリダイズさせるために改変してもよい。天然 *crRNA* は *CRISPR/Cas* システム及び生物によって異なるが、多くの場合、21～46ヌクレオチド長の2つのダイレクトリピート (DR) に隣接する21～72ヌクレオチド長の標的化セグメントを含有している (例えば、WO2014/131833を参照のこと (その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる))。 *S. pyogenes* の例においては、DRは36ヌクレオチド長であり、標的化セグメントは30ヌクレオチド長である。3'に位置するDRは、対応する *tracrRNA* に対して相補的であり、対応する *tracrRNA* にハイブリダイズして、更にはCasタンパク質に結合する。

【0201】

DNA標的化セグメントは、少なくとも約12ヌクレオチド、少なくとも約15ヌクレオチド、少なくとも約17ヌクレオチド、少なくとも約18ヌクレオチド、少なくとも約19ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約25ヌクレオチド、少なくとも約30ヌクレオチド、少なくとも約35ヌクレオチド、または、少なくとも約40ヌクレオチドの長さを有していてもよい。このようなDNA標的化セグメントは、約12ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約12ヌクレオチド～約80ヌクレオチド、約12ヌクレオチド～約50ヌクレオチド、約12ヌクレオチド～約40ヌクレオチド、約12ヌクレオチド～約30ヌクレオチド、約12ヌクレオチド～約25ヌクレオチド、または、約12ヌクレオチド～約20ヌクレオチドの長さを有していてもよい。例えば、DNA標的化セグメントは、約15ヌクレオチド～約25ヌクレオチド (例えば、約17ヌクレオチド～約20ヌクレオチド、または、約17ヌクレオチド、約18ヌクレオチド、約19ヌクレオチド、もしくは、約20ヌクレオチド) であってもよい。例えば、US2016/0024523を参照されたい (その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。 *S. pyogenes* 由来のCas9において、標準的なDNA標的化セグメントは16～20ヌクレオチド長または17～20ヌクレオチド長である。 *S. aureus* 由来のCas9において、標準的なDNA標的化セグメントは21～23ヌクレオチド長である。Cpf1において、標準的なDNA標的化セグメントは少なくとも16ヌクレオチド長または少なくとも18ヌクレオチド長である。

【0202】

tracrRNA は任意の形態 (例えば、全長 *tracrRNA* または活性な不完全 *tracrRNA*) であってもよく、また様々な長さであってもよい。 *tracrRNA* は一次転写産物またはプロセスされた形態を含んでいてもよい。例えば、 *tracrRNA* (単一ガイドRNAの一部としての、または2分子gRNAの一部である独立した分子としての) は、野生型 *tracrRNA* 配列 (例えば、約または約20、26、32、45、48、54、63、67、85超もしくはそれ以上のヌクレオチドの野生型 *tracrRNA* 配列) の全てまたは一部を含むかまたはそれらからなってもよい。 *S. pyogenes* 由来の野生型 *tracrRNA* 配列の例としては、171ヌクレオチド型、89ヌクレオチド型、75ヌクレオチド型及び65ヌクレオチド型が挙げられる。例えば、Deltcheva et al. (2011) Nature 471:602-607; WO2014/093661を参照されたい (それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。単一ガイドRNA (sgRNA) 内の *tracrRNA* の例としては、sgRNAの+48型、+54型、+67型及び+85型 (「+n」は、最大+nヌクレオチドの野生型 *tracrRNA* がsgRNA内に含まれることを示す) 内に見られる *tracrRNA* セグメントが挙げられる。US8,697,359を参照されたい (その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

【0203】

DNA標的化配列と標的DNA内のガイドRNA認識配列の間のパーセント相補性は、少なくとも60% (例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%) であってもよい。D

NA 標的化配列と標的 DNA 内のガイド RNA 認識配列の間のパーセント相補性は、約 20 連続ヌクレオチドにわたり少なくとも 60% であってもよい。一例として、DNA 標的化配列と標的 DNA 内のガイド RNA 認識配列の間のパーセント相補性は、標的 DNA の相補鎖内のガイド RNA 認識配列の 5' 末端において 14 連続ヌクレオチドにわたり 100% であり、またその残部にわたりたった 0% である。このような場合、DNA 標的化配列は 14 ヌクレオチド長であるとみなすことができる。別の例では、DNA 標的化配列と標的 DNA 内のガイド RNA 認識配列の間のパーセント相補性は、標的 DNA の相補鎖内のガイド RNA 認識配列の 5' 末端において 7 連続ヌクレオチドにわたり 100% であり、またその残部にわたりたった 0% である。このような場合、DNA 標的化配列は 7 ヌクレオチド長であるとみなすことができる。一部のガイド RNA では、DNA 標的化配列内の少なくとも 17 ヌクレオチドは標的 DNA に対して相補的である。例えば、DNA 標的化配列は 20 ヌクレオチド長であってもよく、標的 DNA (ガイド RNA 認識配列) との 1、2 または 3 のミスマッチを含んでいてもよい。ミスマッチはプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列に隣接していないことが好ましい (例えば、ミスマッチは DNA 標的化配列の 5' 末端内にあり、または、ミスマッチは PAM 配列から少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 または 19 塩基対離れている)。

【0204】

gRNA のタンパク質結合セグメントは、互いに対して相補的な 2 つのストレッチのヌクレオチドを含んでいてもよい。タンパク質結合セグメントの相補的なヌクレオチドはハイブリダイズして二本鎖 RNA 二重鎖 (dsRNA) を形成する。本 gRNA のタンパク質結合セグメントは Cas タンパク質と相互作用し、また gRNA は、DNA 標的化セグメントを介して結合 Cas タンパク質を標的 DNA 内の特定のヌクレオチド配列へと誘導する。

【0205】

単一ガイド RNA は DNA 標的化セグメント及びスキフォールド配列 (すなわち、ガイド RNA のタンパク質結合配列または Cas 結合配列) を有している。例示的なスキフォールド配列としては、GTTGGAACCAATTC AAAACAGCATAGCAA GTTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGG CACCGAGTCCGGTGC (配列番号: 150)、GTTTTAGAGCTAGAA ATAGCAAGTTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA AAAGTGGCACCGAGTCCGGTGC (配列番号: 151)、及び、GTTTA AGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAAAATAAGGC TAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCCGGTGC (配列番号: 152) が挙げられる。

【0206】

ガイド RNA は、追加の望ましい特徴 (例えば、改変または調節された安定性、細胞内標的化、蛍光標識による追跡、タンパク質またはタンパク質複合体用の結合部位、など) をもたらす修飾または配列を含んでいてもよい。このような修飾の例としては、例えば、5' キャップ (例えば、7-メチルグアニル酸キャップ (m7G)) ; 3' ポリアデニル化テール (すなわち、3' ポリ (A) テール) ; リボスイッチ配列 (例えば、タンパク質及び/またはタンパク質複合体による調節された安定性及び/または調節された接近性を可能とするための) ; 安定性制御配列; dsRNA 二重鎖 (すなわち、ヘアピン) を形成する配列; RNA を細胞内位置 (例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体など) へと向かわせる修飾または配列; 追跡 (例えば、蛍光分子への直接コンジュゲート、蛍光検出を容易にする部分へのコンジュゲート、蛍光検出を可能とする配列、など) をもたらす修飾または配列; タンパク質 (例えば、転写活性化因子、転写抑制因子、DNA メチル基転移酵素、DNA 脱メチル化酵素、ヒストンアセチル基転移酵素、ヒストン脱アセチル化酵素などを含む、DNA に作用するタンパク質) 用の結合部位をもたらす修飾または配列; 及びこれらの組み合わせが挙げられる。修飾のその他の例としては、遺伝子改変ステムループ二重

10

20

30

40

50

鎖構造、遺伝子改変バルジ領域、ステムループ二重鎖構造の遺伝子改変ヘアピン3'、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。例えば、US 2015/0376586を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。バルジは、crRNA様領域と最低限のtracrRNA様領域で構成された二重鎖内におけるヌクレオチドの不對領域であってもよい。バルジは、二重鎖の片側上に不對5'-XXXXY-3'（Xは任意のプリンであり、Yは反対側の鎖上のヌクレオチドとゆらぎ対を形成し得るヌクレオチドであってもよい）を、二重鎖のもう片側上に不對ヌクレオチド領域を含んでいてもよい。

【0207】

ガイドRNAは任意の形態で提供されてもよい。例えば、gRNAは、2つの分子（独立したcrRNA及びtracrRNA）または1つの分子（sgRNA）のいずれかとしてRNAの形態で提供されてもよく、また任意選択的に、Casタンパク質との複合体の形態で提供されてもよい。例えば、gRNAは、例えば、T7 RNAポリメラーゼを使用して、インビトロ転写により調製することができる（例えば、WO 2014/089290及びWO 2014/065596を参照のこと（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる））。ガイドRNAはまた化学合成により調製することができる。

【0208】

gRNAはまたgRNAをコードするDNAの形態で提供されてもよい。gRNAをコードするDNAは、単一RNA分子（sgRNA）または独立したRNA分子（例えば、独立したcrRNA及びtracrRNA）をコードしていてもよい。後者の場合、gRNAをコードするDNAは、1つのDNA分子として、またはcrRNA及びtracrRNAをそれぞれコードする独立したDNA分子として提供されてもよい。

【0209】

gRNAをDNAの形態で提供する場合、gRNAは、細胞内で一時的に、条件的にまたは構成的に発現してもよい。gRNAをコードするDNAは、細胞のゲノムに安定的に組み込まれてもよく、細胞内で活性化しているプロモーターと機能的に連結してもよい。代替的に、gRNAをコードするDNAは、発現構築物内のプロモーターと機能的に連結してもよい。例えば、gRNAをコードするDNAは、外来修復テンプレートを含むベクター内及び／またはCasタンパク質をコードする核酸を含むベクター内にあってもよい。代替的に、gRNAをコードするDNAは、外来修復テンプレートを含むベクター及び／またはCasタンパク質をコードする核酸を含むベクターから独立したベクターまたはプラスミド内にあってもよい。このような発現構築物に使用可能なプロモーターとしては、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ウサギ細胞、多能性細胞、胚性幹（ES）細胞、または接合体のうちの1つまたは複数において活性化しているプロモーターが挙げられる。このようなプロモーターは、例えば、条件的プロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであってもよい。このようなプロモーターはまた、例えば、二方向性プロモーターであってもよい。好適なプロモーターの特定の例としては、RNAポリメラーゼIIプロモーター、例えば、ヒトU6プロモーター、ラットU6ポリメラーゼIIプロモーター、またはマウスU6ポリメラーゼIIプロモーターなどが挙げられる。

【0210】

（3）ガイドRNA認識配列

用語「ガイドRNA認識配列」は、結合のための十分な条件が存在している場合、gRNAのDNA標的化セグメントが結合する標的DNA内に存在する核酸配列を含む。例えば、ガイドRNA認識配列は、ガイドRNAが相補性を有するように設計された配列を含み、そこでは、ガイドRNA認識配列とDNA標的化配列のハイブリダイゼーションがCRISPR複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションを起こしてCRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性が存在する場合、完全な相補性は必ずしも必要で

はない。ガイドRNA認識配列はまた、以下でより詳細に説明するCasタンパク質のための開裂部位を含む。ガイドRNA認識配列は、例えば、細胞の核もしくは細胞質内または細胞の細胞小器官（ミトコンドリアまたは葉緑体など）内に位置し得る任意のポリヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0211】

標的DNA内のガイドRNA認識配列は、Casタンパク質またはgRNAに標的とされ（すなわち、それらが結合、それらとハイブリダイズ、またはそれらに対して相補的である）てもよい。好適なDNA/RNA結合条件としては、通常は細胞内に存在する生理学的条件が挙げられる。その他の好適なDNA/RNA結合条件（例えば、無細胞系内の条件）は当技術分野において周知である（例えば、Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001)を参照のこと（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる））。Casタンパク質またはgRNAに対して相補的でありそれらにハイブリダイズする標的DNAの鎖を「相補鎖」と呼んでもよく、また「相補鎖」に対して相補的な（それゆえ、Casタンパク質またはgRNAに対して相補的ではない）標的DNAの鎖を「非相補鎖」または「テンプレート鎖」と呼んでもよい。

【0212】

Casタンパク質は、gRNAのDNA標的化セグメントが結合する標的DNA内に存在する核酸配列の内部または外部の部位で核酸を開裂させることができる。「開裂部位」は、Casタンパク質が一本鎖切断または二本鎖切断を生成する核酸の位置を含む。例えば、CRISPR複合体の形成（ガイドRNA認識配列にハイブリダイズしてCasタンパク質と複合体を形成したgRNAを含む）は、gRNAのDNA標的化セグメントが結合する標的DNA内に存在する核酸配列の内部または近傍（例えば、その核酸配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50またはそれ以上の塩基対内の）の一方の鎖または両方の鎖の開裂をもたらし得る。開裂部位が、gRNAのDNA標的化セグメントが結合する核酸配列の外部にある場合、開裂部位はなおも「ガイドRNA認識配列」の内部にあるとみなされる。開裂部位は、核酸の一方の鎖上にのみまたは両方の鎖上にあってもよい。開裂部位は、核酸の両方の鎖上の同一位置（平滑末端を生成）にあってもよく、または、それぞれの鎖上の異なる部位（付着末端（すなわち、オーバーハング）を生成）にあってもよい。例えば、そのそれぞれが異なる鎖上の異なる開裂部位において一本鎖切断を生成することにより二本鎖切断を生成する2つのCasタンパク質を使用することで、付着末端を生成することができる。例えば、オーバーハング配列が生成されるように、第1のニッカーゼは二本鎖DNA（dsDNA）の第1の鎖上の一本鎖切断を生成可能であり、第2のニッカーゼはdsDNAの第2の鎖上の一本鎖切断を生成可能である。一部の例においては、第1の鎖上におけるニッカーゼのガイドRNA認識配列は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100、250、500または1,000塩基対だけ、第2の鎖上におけるニッカーゼのガイドRNA認識配列から離れている。

【0213】

Casタンパク質による標的DNAの部位特異的な結合及び開裂は、(i) gRNAと標的DNAの間の塩基対相補性と(ii) プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と呼ばれる標的DNA内における短いモチーフの両方によって決まる位置で生じ得る。PAMはガイドRNA認識配列に隣接していてもよい。任意選択的に、PAMはガイドRNA認識配列の3'末端に隣接していてもよい。代替的に、PAMはガイドRNA認識配列の5'末端に隣接していてもよい。例えば、Casタンパク質の開裂部位は、PAM配列の約1～約10または約2～約5塩基対（例えば、3塩基対）上流または下流であってもよい。一部の例（例えば、S. pyogenes由来のCas9または密接に関連したCas9を使用する場合）においては、非相補鎖のPAM配列は5'-N₁GG-3'（N₁は、任意のDNAヌクレオチドであり、標的DNAの非相補鎖のガイドRNA認識配列の3

′にじかに接している)であってもよい。このように、相補鎖のPAM配列は5′-CCN₂-3′(N₂は、任意のDNAヌクレオチドであり、標的DNAの相補鎖のガイドRNA認識配列の5′にじかに接している)であるだろう。一部のこのような例においては、N₁及びN₂は相補的であってもよく、N₁-N₂塩基対は任意の塩基対(例えば、N₁=CでありN₂=G; N₁=GでありN₂=C; N₁=AでありN₂=T; またはN₁=TでありN₂=A)であってもよい。S. aureus由来のCas9の例においては、PAMは、NNGRRT(配列番号: 146)またはNNGRR(配列番号: 147)であってもよい(NはA、G、CまたはTであってもよく、RはGまたはAであってもよい)。C. jejuni由来のCas9の例においては、PAMは、例えば、NNNNACA CまたはNNNNRYACであってもよい(NはA、G、CまたはTであってもよく、RはGまたはAであってもよい)。一部の例(例えば、FnCpf1)においては、PAM配列は、5′末端の上流にあってもよく、配列5′-TTN-3′を有していてもよい。

【0214】

ガイドRNA認識配列の例としては、gRNAのDNA標的化セグメントに対して相補的なDNA配列、またはPAM配列に付加されるこのようなDNA配列が挙げられる。例えば、標的モチーフは、Cas9タンパク質が認識する先行するNGGモチーフ、例えば、GN₁₉NGG(配列番号: 1)またはN₂₀NGG(配列番号: 2)などにじかに接している20ヌクレオチドDNA配列であってもよい(例えば、WO2014/165825を参照のこと(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる))。5′末端のグアニンは、細胞内のRNAポリメラーゼによる転写を促進し得る。ガイドRNA認識配列のその他の例としては、T7ポリメラーゼによる効率的なインビトロ転写を促進する5′末端の2つのグアニンヌクレオチド(例えば、GGN₂₀NGG; 配列番号: 3)を挙げることができる。例えば、WO2014/065596を参照されたい(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。その他のガイドRNA認識配列は、5′GまたはGG及び3′GGまたはNGGを含む配列番号: 1~3の4~22ヌクレオチド長を有していてもよい。更にその他のガイドRNA認識配列は、配列番号: 1~3の14~20ヌクレオチド長を有していてもよい。

【0215】

ガイドRNA認識配列は、細胞に内在するまたは細胞に外来の任意の核酸配列であってもよい。ガイドRNA認識配列は、遺伝子産物(例えば、タンパク質)をコードする配列または非コード配列(例えば、調節配列)であってもよく、または、その両方を含んでいてもよい。

【0216】

C. 外来修復テンプレート

本明細書で開示する方法及び組成物は、Casタンパク質で標的ゲノム遺伝子座を開裂させてから標的ゲノム遺伝子座を改変するために外来修復テンプレートを利用することができる。例えば、細胞は1細胞期胚であってもよく、外来修復テンプレートは5kb長より短くてもよい。1細胞期胚以外の細胞型では、外来修復テンプレート(例えば、標的化ベクター)はより長くてもよい。例えば、1細胞期胚以外の細胞型では、外来修復テンプレートは、本明細書中の他の箇所で説明する大きな標的化ベクター(LTVEC)(例えば、少なくとも10kbの長さを有する標的化ベクター、または少なくとも10kbの総合計を有する5′ホモロジーアーム及び3′ホモロジーアームを有する標的化ベクター)であってもよい。Casタンパク質と組み合わせて外来修復テンプレートを使用すると、相同組換え修復の促進により、標的ゲノム遺伝子座のより正確な改変がもたらされ得る。

【0217】

このような方法では、Casタンパク質は標的ゲノム遺伝子座を開裂させて一本鎖切断(ニック)または二本鎖切断を生成し、外来修復テンプレートは、非相同末端結合(NHEJ)介在性ライゲーションまたは相同組換え修復事象を介して標的核酸を組換える。任意選択的に、外来修復テンプレートによる修復を行うと、標的とした対立遺伝子がCasタンパク質によって再標的化され得ないようにガイドRNA認識配列またはCas開裂部

10

20

30

40

50

位が除去または破壊される。

【0218】

外来修復テンプレートはデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）を含んでいてもよく、それらは一本鎖または二本鎖であってもよく、それらは直鎖状態または環状状態であってもよい。例えば、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（ssODN）であってもよい。例えば、Yoshimi et al. (2016) Nat. Commun. 7:10431を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。例示的な外来修復テンプレートは、約50ヌクレオチド～約5 kb長であり、約50ヌクレオチド～約3 kb長であり、または、約50～約1,000ヌクレオチド長である。その他の例示的な外来修復テンプレートは約40～約200ヌクレオチド長である。例えば、外来修復テンプレートは、約50～約60、約60～約70、約70～約80、約80～約90、約90～約100、約100～約110、約110～約120、約120～約130、約130～約140、約140～約150、約150～約160、約160～約170、約170～約180、約180～約190、または、約190～約200ヌクレオチド長であってもよい。代替的に、外来修復テンプレートは、約50～約100、約100～約200、約200～約300、約300～約400、約400～約500、約500～約600、約600～約700、約700～約800、約800～約900、または、約900～約1,000ヌクレオチド長であってもよい。代替的に、外来修復テンプレートは、約1 kb～約1.5 kb、約1.5 kb～約2 kb、約2 kb～約2.5 kb、約2.5 kb～約3 kb、約3 kb～約3.5 kb、約3.5 kb～約4 kb、約4 kb～約4.5 kb、または、約4.5 kb～約5 kb長であってもよい。代替的に、外来修復テンプレートは、例えば、5 kb、4.5 kb、4 kb、3.5 kb、3 kb、2.5 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、900ヌクレオチド、800ヌクレオチド、700ヌクレオチド、600ヌクレオチド、500ヌクレオチド、400ヌクレオチド、300ヌクレオチド、200ヌクレオチド、100ヌクレオチド、または、50ヌクレオチド以下の長さであってもよい。1細胞期胚以外の細胞型では、外来修復テンプレート（例えば、標的化ベクター）はより長くてもよい。例えば、1細胞期胚以外の細胞型では、外来修復テンプレートは、本明細書中の他の箇所

【0219】

1つの例において、外来修復テンプレートは約80ヌクレオチド～約200ヌクレオチド長のssODNである。別の例では、外来修復テンプレートは約80ヌクレオチド～約3 kb長のssODNである。このようなssODNは、例えば、それぞれが約40ヌクレオチド～約60ヌクレオチド長であるホモロジーマームを有していてもよい。このようなssODNはまた、例えば、それぞれが約30ヌクレオチド～100ヌクレオチド長であるホモロジーマームを有していてもよい。ホモロジーマームは対称（例えば、それぞれ40ヌクレオチド長またはそれぞれ60ヌクレオチド長）であってもよく、または、非対称（例えば、36ヌクレオチド長の1本のホモロジーマーム、及び91ヌクレオチド長の1本のホモロジーマーム）であってもよい。

【0220】

外来修復テンプレートは、追加の望ましい特徴（例えば、改変または調節された安定性、蛍光標識による追跡または検出、タンパク質またはタンパク質複合体用の結合部位、など）をもたらす修飾または配列を含んでいてもよい。外来修復テンプレートは、1つまたは複数の蛍光標識、精製タグ、エピトープタグ、またはこれらの組み合わせを含んでいてもよい。例えば、外来修復テンプレートは、1つまたは複数の蛍光標識（例えば、蛍光タンパク質またはその他の蛍光体もしくは染料）、例えば、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの蛍光標識を含んでいてもよい。例示的な蛍光標識としては、蛍光体、例えば、フルオレセイン（例えば、6-カルボキシフルオレセイン（6-FAM））、Texas Red、HEX、Cy3、Cy5、Cy5.5、Pacific Blue、5-（及び6-）-カルボキシテトラメチル

ローダミン (TAMRA)、及び Cy7 などが挙げられる。オリゴヌクレオチドを標識するための幅広い蛍光染料が市販されている (例えば、Integrated DNA Technologies から)。例えば、このような蛍光標識 (例えば、内部蛍光標識) を使用して、外来修復テンプレートの末端に適合する突出末端を有する開裂標的核酸に直接組み込んだ外来修復テンプレートを検出してもよい。標識またはタグは、外来修復テンプレート内の 5' 末端、3' 末端、または内部であってもよい。例えば、外来修復テンプレートは、Integrated DNA Technologies 製の IR700 蛍光体 (5' IRDYE (登録商標) 700) と 5' 末端でコンジュゲートしていてもよい。

【0221】

外来修復テンプレートはまた、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれるための DNA のセグメントを含む核酸インサートを含んでいてもよい。標的ゲノム遺伝子座に核酸インサートを導入することにより、目的の核酸配列の標的ゲノム遺伝子座への付加、標的ゲノム遺伝子座における目的の核酸配列の欠失、または、標的ゲノム遺伝子座における目的の核酸配列の置換 (すなわち、欠失及び挿入) がもたらされ得る。一部の外来修復テンプレートは、標的ゲノム遺伝子座における対応する欠失を何ら伴わずに、標的ゲノム遺伝子座に核酸インサートを挿入するように設計される。その他の外来修復テンプレートは、核酸インサートの対応する挿入を何ら伴わずに、標的ゲノム遺伝子座における目的の核酸配列を欠失させるように設計される。更にその他の外来修復テンプレートは、標的ゲノム遺伝子座における目的の核酸配列を欠失させて核酸インサートで置換するように設計される。

【0222】

核酸インサート、または欠失及び／または置換される標的ゲノム遺伝子座における対応する核酸は、様々な長さであってもよい。例示的な核酸インサート、または欠失及び／または置換される標的ゲノム遺伝子座における対応する核酸は、約 1 ヌクレオチド～約 5 kb 長であり、または、約 1 ヌクレオチド～約 1,000 ヌクレオチド長である。例えば、核酸インサート、または欠失及び／または置換される標的ゲノム遺伝子座における対応する核酸は、約 1～約 10、約 10～約 20、約 20～約 30、約 30～約 40、約 40～約 50、約 50～約 60、約 60～約 70、約 70～約 80、約 80～約 90、約 90～約 100、約 100～約 110、約 110～約 120、約 120～約 130、約 130～約 140、約 140～約 150、約 150～約 160、約 160～約 170、約 170～約 180、約 180～約 190、または、約 190～約 200 ヌクレオチド長であってもよい。同様に、核酸インサート、または欠失及び／または置換される標的ゲノム遺伝子座における対応する核酸は、約 1～約 100、約 100～約 200、約 200～約 300、約 300～約 400、約 400～約 500、約 500～約 600、約 600～約 700、約 700～約 800、約 800～約 900、または、約 900～約 1,000 ヌクレオチド長であってもよい。同様に、核酸インサート、または欠失及び／または置換される標的ゲノム遺伝子座における対応する核酸は、約 1 kb～約 1.5 kb、約 1.5 kb～約 2 kb、約 2 kb～約 2.5 kb、約 2.5 kb～約 3 kb、約 3 kb～約 3.5 kb、約 3.5 kb～約 4 kb、約 4 kb～約 4.5 kb、または、約 4.5 kb～約 5 kb 長であってもよい。標的ゲノム遺伝子座から欠失される核酸はまた、約 1 kb～約 5 kb、約 5 kb～約 10 kb、約 10 kb～約 20 kb、約 20 kb～約 30 kb、約 30 kb～約 40 kb、約 40 kb～約 50 kb、約 50 kb～約 60 kb、約 60 kb～約 70 kb、約 70 kb～約 80 kb、約 80 kb～約 90 kb、約 90 kb～約 100 kb、約 100 kb～約 200 kb、約 200 kb～約 300 kb、約 300 kb～約 400 kb、約 400 kb～約 500 kb、約 500 kb～約 600 kb、約 600 kb～約 700 kb、約 700 kb～約 800 kb、約 800 kb～約 900 kb、約 900 kb～約 1 Mb であってもよく、またはそれより長くてもよい。代替的に、標的ゲノム遺伝子座から欠失される核酸は、約 1 Mb～約 1.5 Mb、約 1.5 Mb～約 2 Mb、約 2 Mb～約 2.5 Mb、約 2.5 Mb～約 3 Mb、約 3 Mb～約 4 Mb、約 4 Mb～約 5 Mb、約 5 Mb～約 10 Mb、約 10 Mb～約 20 Mb、約 20 Mb～約 30 Mb、約 30 Mb～約 40 Mb、約 40 Mb～約 50 Mb、約 50 Mb～約 60 Mb、約 60 Mb～約 70 Mb、

10

20

30

40

50

約70Mb～約80Mb、約80Mb～約90Mb、または、約90Mb～約100Mbであってもよい。

【0223】

核酸インサートは、ゲノムDNAまたは任意のその他のタイプのDNAを含んでいてもよい。例えば、核酸インサートは、原核生物、真核生物、酵母菌、トリ（例えば、ニワトリ）、非ヒト哺乳動物、げっ歯類、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えば、マーモセット、アカゲザル）、家畜哺乳動物、農業用哺乳動物、カメ、または任意のその他の目的の生物由来であってもよい。

【0224】

核酸インサートは、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部に対して相同またはオルソログな配列（例えば、自己抗原の特定のモチーフまたは領域をコードする遺伝子の一部）を含んでいてもよい。相同配列は異なる種由来または同一種由来であってもよい。例えば、核酸インサートは、標的ゲノム遺伝子座において置換の標的となった配列と比較して、1つまたは複数の点変異（例えば、1、2、3、4、5つまたはそれ以上）を含む配列を含んでいてもよい。任意選択的に、このような点変異は、コードポリペプチド内における保存的アミノ酸置換（例えば、アスパラギン酸 [Asp, D] のグルタミン酸 [Glu, E] への置換）をもたらし得る。

【0225】

核酸インサート、または欠失及び／または置換される標的ゲノム遺伝子座における対応する核酸は、コード領域、例えば、エキソンなど；非コード領域、例えば、イントロン、非翻訳領域または調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー、または転写抑制因子結合エレメント）など；またはこれらの任意の組み合わせであってもよい。

【0226】

核酸インサートはまた、条件的対立遺伝子を含んでいてもよい。条件的対立遺伝子は、US2011/0104799に記載されているような多機能性対立遺伝子であってもよい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。例えば、条件的対立遺伝子は、（a）標的遺伝子の転写に対してセンス方向の作動配列、（b）センス方向またはアンチセンス方向の薬剤選択カセット（DSC）、（c）アンチセンス方向の目的のヌクレオチド配列（NSI）、及び（d）逆方向の逆位による条件的モジュール（conditional by inversion module）（COIN、エキソン分割イントロン及び逆位遺伝子トラップ様モジュールを利用）を含んでいてもよい。例えば、US2011/0104799を参照されたい。条件的対立遺伝子は、第1のリコンビナーゼに曝露すると組換わり、（i）作動配列及びDSCを欠き（ii）センス方向のNSI及びアンチセンス方向のCOINを含む条件的対立遺伝子を形成する、再組換え可能なユニットを更に含んでいてもよい。例えば、US2011/0104799を参照されたい。

【0227】

核酸インサートはまた、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを含んでいてもよい。代替的に、核酸インサートは、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを欠いていてもよい。選択マーカーは選択カセットに含まれていてもよい。任意選択的に、選択カセットは自己欠失カセットであってもよい。例えば、US8,697,851及びUS2013/0312129を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。一例として、自己欠失カセットは、マウスPrm1プロモーターと機能的に連結したCrei遺伝子（イントロンにより分離された、Creiリコンビナーゼをコードする2つのエキソンを含む）、及びヒトユビキチンプロモーターと機能的に連結したネオマイシン耐性遺伝子を含んでいてもよい。Prm1プロモーターを使用することにより、特にF0動物の雄胚細胞内において自己欠失カセットが欠失され得る。例示的な選択マーカーとしては、ネオマイシンリン酸基転移酵素（neo^r）、ヒグロマイシンBリン酸基転移酵素（hyg^r）、ピューロマイシン-N-アセチル基

10

20

30

40

50

転移酵素 (p u r o^r)、ブラストサイジンS脱アミノ酵素 (b s r^r)、キサンチン／グアニンホスホリボシル基転移酵素 (g p t)、もしくは単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (H S V⁻k)、またはこれらの組み合わせが挙げられる。選択マーカーをコードするポリヌクレオチドは、標的とする細胞内で活性化しているプロモーターと機能的に連結してもよい。プロモーターの例については、本明細書中の他の箇所に記載している。

【0228】

核酸インサートはまた、レポーター遺伝子を含んでいてもよい。例示的なレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、強化緑色蛍光タンパク質 (e G F P)、青緑色蛍光タンパク質 (C F P)、黄色蛍光タンパク質 (Y F P)、強化黄色蛍光タンパク質 (e Y F P)、青色蛍光タンパク質 (B F P)、強化青色蛍光タンパク質 (e B F P)、D s R e d、Z s G r e e n、M m G F P、m P l u m、m C h e r r y、t d T o m a t o、m S t r a w b e r r y、J⁻R e d、m O r a n g e、m K O、m C i t r i n e、V e n u s、Y P e t、E m e r a l d、C y P e t、C e r u l e a n、T⁻S a p p h i r e、及びアルカリホスファターゼをコードするようなものが挙げられる。このようなレポーター遺伝子は、標的とする細胞内で活性化しているプロモーターと機能的に連結してもよい。プロモーターの例については、本明細書中の他の箇所に記載している。

【0229】

核酸インサートはまた、1つまたは複数の発現カセットまたは欠失カセットを含んでいてもよい。任意のカセットは、発現に影響を及ぼす様々な調節構成要素と共に、目的のヌクレオチド配列、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド、及びレポーター遺伝子のうちの1つまたは複数を含んでいてもよい。含まれ得る選択マーカー及びレポーター遺伝子の例については、本明細書中の他の箇所において詳細に記載されている。

【0230】

核酸インサートは、部位特異的組換え標的配列に隣接する核酸を含んでいてもよい。代替的に、核酸インサートは1つまたは複数の部位特異的組換え標的配列を含んでいてもよい。完全な核酸インサートはこのような部位特異的組換え標的配列に隣接し得るが、核酸インサート内における任意の領域または個々の目的ポリヌクレオチドもまた、このような部位に隣接し得る。核酸インサートまたは核酸インサート内の任意の目的ポリヌクレオチドに隣接し得る部位特異的組換え標的配列としては、例えば、l o x P、l o x 5 1 1、l o x 2 2 7 2、l o x 6 6、l o x 7 1、l o x M 2、l o x 5 1 7 1、F R T、F R T 1 1、F R T 7 1、a t t p、a t t、F R T、r o x、またはこれらの組み合わせを挙げることができる。1つの例では、部位特異的組換え部位は、核酸インサート内に含まれる選択マーカーをコードするポリヌクレオチド及び／またはレポーター遺伝子に隣接する。標的遺伝子座に核酸インサートを導入した後に、部位特異的組換え部位間の配列を除去してもよい。任意選択的に、それぞれが部位特異的組換え部位を含む核酸インサートを有する2つの外来修復テンプレートを使用してもよい。外来修復テンプレートは、目的の核酸に隣接する5'領域及び3'領域を標的としてもよい。標的ゲノム遺伝子座に2つの核酸インサートを導入した後に、2つの挿入済み部位特異的組換え部位間の目的の核酸を除去してもよい。

【0231】

核酸インサートはまた、I型、II型、III型及びIV型のエンドヌクレアーゼを含む制限エンドヌクレアーゼ（すなわち、制限酵素）用の1つまたは複数の制限部位を含んでいてもよい。I型及びIII型の制限エンドヌクレアーゼは特定の認識部位を認識するが、通常は、開裂部位（認識部位）から数百塩基対離れ得るヌクレアーゼ結合部位の様々な位置で開裂させる。II型システムでは、制限活性は任意のメチル化酵素活性に依存せず、開裂は通常、結合部位内の特定部位または結合部位近傍の特定部位で生じる。ほとんどのII型酵素はパリンドローム配列を切断するが、IIa型酵素は非パリンドローム認識部位を認識して認識部位の外側を開裂させ、IIb型酵素は認識部位の外側の両方の部位において配列を2回切断し、またIIs型酵素は非対称認識部位を認識して認識部位が

ら約1～20ヌクレオチドの所定の距離離れた片側を開裂させる。IV型制限酵素はメチル化DNAを標的とする。制限酵素については、例えば、REBASE database (ウェブページ rebase.neb.com; Roberts et al., (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420; Roberts et al., (2003) Nucleic Acids Res. 31:1805-1812; 及び Belfort et al. (2002) in Mobile DNA II, pp. 761-783, Eds. Craigie et al., (ASM Press, Washington, DC)) において更に記載及び分類されている。

【0232】

(1) 非相同末端結合介在性挿入用の修復テンプレート

一部の外来修復テンプレートは、標的ゲノム遺伝子座におけるCasタンパク質媒介開裂により生成された1つまたは複数のオーバーハングに対して相補的な5'末端及び／または3'末端に短い一本鎖領域を有する。これらのオーバーハングは5'ホモロジーアーム及び3'ホモロジーアームと呼ばれることもある。例えば、一部の外来修復テンプレートは、標的ゲノム遺伝子座の5'標的配列及び／または3'標的配列におけるCasタンパク質媒介開裂により生成された1つまたは複数のオーバーハングに対して相補的な5'末端及び／または3'末端に短い一本鎖領域を有する。一部のこのような外来修復テンプレートは、5'末端にのみまたは3'末端にのみ相補領域を有する。例えば、一部のこのような外来修復テンプレートは、標的ゲノム遺伝子座の5'標的配列に生成されたオーバーハングに対して相補的な5'末端にのみ、または、標的ゲノム遺伝子座の3'標的配列に生成されたオーバーハングに対して相補的な3'末端にのみ、相補領域を有する。その他のこのような外来修復テンプレートは、5'末端と3'末端の両方に相補領域を有する。例えば、その他のこのような外来修復テンプレートは、5'末端と3'末端の両方に相補領域（例えば、それぞれ標的ゲノム遺伝子座におけるCas媒介開裂により生成された第1及び第2のオーバーハングに対して相補的な）を有する。例えば、外来修復テンプレートが二本鎖である場合、一本鎖相補領域は、修復テンプレートのトップ鎖の5'末端及び修復テンプレートのボトム鎖の5'末端から延びて、それぞれの末端上に5'オーバーハングを生成し得る。代替的に、一本鎖相補領域は、修復テンプレートのトップ鎖の3'末端及びテンプレートのボトム鎖の3'末端から延びて、3'オーバーハングを生成し得る。

【0233】

相補領域は、外来修復テンプレートと標的核酸の間のライゲーションを促進するのに十分な任意の長さの相補領域であってもよい。例示的な相補領域は、約1～約5ヌクレオチド長、約1～約25ヌクレオチド長、または、約5～約150ヌクレオチド長である。例えば、相補領域は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチド長であってもよい。代替的に、相補領域は、約5～約10、約10～約20、約20～約30、約30～約40、約40～約50、約50～約60、約60～約70、約70～約80、約80～約90、約90～約100、約100～約110、約110～約120、約120～約130、約130～約140、約140～約150ヌクレオチド長であってもよく、またはそれより長くてもよい。

【0234】

このような相補領域は、2つのニッカーゼ対により生成されたオーバーハングに対して相補的であってもよい。DNAの相対する鎖を開裂させて第1の二本鎖切断を生成する第1及び第2のニッカーゼ、ならびに、DNAの相対する鎖を開裂させて第2の二本鎖切断を生成する第3及び第4のニッカーゼを使用することにより、付着末端を有する2つの二本鎖切断を生成することができる。例えば、Casタンパク質を使用して、第1、第2、第3及び第4のガイドRNAに対応する第1、第2、第3及び第4のガイドRNA認識配列にニックを生じさせてもよい。第1及び第2のガイドRNA認識配列は、DNAの第1及び第2の鎖上の第1及び第2のニッカーゼにより生成されたニックが二本鎖切断を生成

するように、第1の開裂部位を生成するために配置されてもよい（すなわち、第1の開裂部位は、第1及び第2のガイドRNA認識配列内のニックを含む）。同様に、第3及び第4のガイドRNA認識配列は、DNAの第1及び第2の鎖上の第3及び第4のニックアーゼにより生成されたニックが二本鎖切断を生成するように、第2の開裂部位を生成するために配置されてもよい（すなわち、第2の開裂部位は、第3及び第4のガイドRNA認識配列内のニックを含む）。好ましくは、第1及び第2のガイドRNA認識配列及び／または第3及び第4のガイドRNA認識配列内のニックは、オーバーハングを生成するオフセットニックであってもよい。オフセット窓は、例えば、少なくとも約5bp、10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、またはそれ以上であってもよい。Ran et al. (2013) Cell 154:1380-1389; Mali et al. (2013) Nat. Biotech. 31:833-838; 及び、Shen et al. (2014) Nat. Methods 11:399-404を参照のこと（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような例においては、第1及び第2のガイドRNA認識配列内のニックならびに第3及び第4のガイドRNA認識配列内のニックにより生成されたオーバーハングに対して相補的な一本鎖相補領域を有するように、二本鎖外来修復テンプレートを設計してもよい。その後、非相同末端結合介在性ライゲーションにより、このような外来修復テンプレートを挿入してもよい。

【0235】

（2）相同組換え修復による挿入用の修復テンプレート

一部の外来修復テンプレートはホモロジーマームを含む。外来修復テンプレートが核酸インサートも含む場合、ホモロジーマームは核酸インサートに隣接していてもよい。参照し易くするために、本明細書においては、ホモロジーマームを5'及び3'（すなわち、上流及び下流）のホモロジーマームと呼ぶ。この用語は、外来修復テンプレート内の核酸インサートに対するホモロジーマームの相対位置に関連している。5'ホモロジーマーム及び3'ホモロジーマームは、標的ゲノム遺伝子座内の領域（本明細書においては、それぞれ「5'標的配列」及び「3'標的配列」と呼ぶ）に対応している。

【0236】

ホモロジーマームと標的配列は、2つの領域が互いに十分な度合いの配列同一性を共有して相同組換え反応の基質として働く場合、互いに「対応する」または「対応している」。用語「相同性」は、対応する配列と同一であるかまたは配列同一性を共有しているかのいずれかであるDNA配列を含む。任意の標的配列と外来修復テンプレート内に見られる対応するホモロジーマームの配列同一性は、相同組換えを生じさせる任意の度合いの配列同一性であってもよい。例えば、外来修復テンプレートのホモロジーマーム（またはそのフラグメント）と標的配列（またはそのフラグメント）が共有する配列同一性の総計は、配列が相同組換えを受けるような、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性であってもよい。更に、ホモロジーマームと対応する標的配列の間の相同性の対応する領域は、相同組換えを促進するのに十分な任意の長さの対応する領域であってもよい。例示的なホモロジーマームは、約25ヌクレオチド～約2.5kb長、約25ヌクレオチド～約1.5kb長、または、約25～約500ヌクレオチド長である。例えば、任意のホモロジーマーム（またはホモロジーマームのそれぞれ）及び／または対応する標的配列は、ホモロジーマームが十分な相同性を有して、標的核酸内の対応する標的配列との相同組換えを受けるような、約25～約30、約30～約40、約40～約50、約50～約60、約60～約70、約70～約80、約80～約90、約90～約100、約100～約150、約150～約200、約200～約250、約250～約300、約300～約350、約350～約400、約400～約450、または、約450～約500ヌクレオチド長の相同性の対応する領域を含んでいてもよい。代替的に、任意のホモロジーマーム（またはそれぞれのホモロジーマーム）及び／ま

たは対応する標的配列は、約0.5 kb～約1 kb、約1 kb～約1.5 kb、約1.5 kb～約2 kb、または、約2 kb～約2.5 kb長の相同性の対応する領域を含んでいてもよい。例えば、ホモロジーアームはそれぞれ、約750ヌクレオチド長であってもよい。ホモロジーアームは、対称（それぞれがおおよそ同一のサイズ長）であってもよく、または、非対称（一方がもう一方よりも長い）であってもよい。

【0237】

ホモロジーアームは細胞由来の遺伝子座（例えば、標的遺伝子座）に対応していてもよい。代替的に、例えば、ホモロジーアームは、例えば、導入遺伝子、発現カセット、またはDNAの異種もしくは外来領域を含む、細胞のゲノムに組み込まれたDNAの異種または外来セグメントの領域に対応していてもよい。代替的に、標的化ベクターのホモロジーアームは、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、ヒト人工染色体の領域、または適切な宿主細胞内に含まれる任意のその他の遺伝子改変領域に対応していてもよい。また更に、標的化ベクターのホモロジーアームは、BACライブラリ、コスミドライブラリまたはP1ファージライブラリの領域に対応するまたは由来していてもよく、または、合成DNAに由来していてもよい。

【0238】

外来修復テンプレートと組み合わせてCRISPR/Casシステムを使用する場合、5'標的配列及び3'標的配列は、Cas開裂部位における一本鎖切断（ニック）または二本鎖切断が生成され次第、標的配列とホモロジーアームの間の相同組換え事象の発生が促進されるように、Cas開裂部位に十分近接して（例えば、ガイドRNA認識配列に十分近接して）位置していることが好ましい。用語「Cas開裂部位」は、Cas酵素（例えば、ガイドRNAと複合体を形成したCas9タンパク質）によりニックまたは二本鎖切断が生成されるDNA配列を含む。外来修復テンプレートの5'ホモロジーアーム及び3'ホモロジーアームに対応する標的遺伝子座内の標的配列は、Cas開裂部位における一本鎖切断または二本鎖切断が生成され次第、5'及び3'標的配列とホモロジーアームの間の相同組換え事象の発生が促進されるような距離である場合、Cas開裂部位に「十分近接して位置」している。それゆえ、外来修復テンプレートの5'及び／または3'ホモロジーアームに対応する標的配列は、例えば、任意のCas開裂部位の少なくとも1ヌクレオチド以内、または、任意のCas開裂部位の少なくとも10ヌクレオチド～約1,000ヌクレオチド以内であってもよい。一例として、Cas開裂部位は、標的配列の少なくとも一方または両方にじかに隣接していてもよい。

【0239】

代替的に、任意の開裂部位は、5'標的配列、3'標的配列、または両方の標的配列からの様々な距離であってもよい。例えば、2つのガイドRNAを使用する場合、第1及び／または第2のガイドRNA認識配列または第1及び／または第2の開裂部位は、5'標的配列と3'標的配列の間に位置していてもよく、または5'標的配列及び／または3'標的配列に隣接していてもよく、または、例えば、5'標的配列及び／または3'標的配列の1 kb、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、10 kb、20 kb、30 kb、40 kb、50 kb、60 kb、70 kb、80 kb、90 kb、100 kb、110 kb、120 kb、130 kb、140 kb、150 kb、160 kb、170 kb、180 kb、190 kb、200 kb、250 kb、300 kb、350 kb、400 kb、450 kbまたは500 kb以内などで、5'標的配列及び／または3'標的配列に近接していてもよい。代替的に、第1及び／または第2のガイドRNA認識配列または第1及び／または第2の開裂部位は、5'標的配列及び／または3'標的配列から、少なくとも50 bp、少なくとも100 bp、少なくとも200 bp、少なくとも300 bp、少なくとも400 bp、少なくとも500 bp、少なくとも600 bp、少なくとも700 bp、少なくとも800 bp、少なくとも900 bp、少なくとも1 kb、少なくとも2 kb、少なくとも3 kb、少なくとも4 kb、少なくとも5 kb、少なくとも6 kb、少なくとも7 kb、少なくとも8 kb、少なくとも9 kb、少なくとも10 kb、少なくとも20 kb、少なくとも30 kb、少なくとも40 kb、少な

くとも50kb、少なくとも60kb、少なくとも70kb、少なくとも80kb、少なくとも90kb、少なくとも100kb、少なくとも110kb、少なくとも120kb、少なくとも130kb、少なくとも140kb、少なくとも150kb、少なくとも160kb、少なくとも170kb、少なくとも180kb、少なくとも190kb、少なくとも200kb、少なくとも250kb、少なくとも300kb、少なくとも350kb、少なくとも400kb、少なくとも450kb、または、少なくとも500kbに位置していてもよい。例えば、第1及び／または第2のガイドRNA認識配列または第1及び／または第2の開裂部位は、5'標的配列及び／または3'標的配列から、約50bp～約100bp、約200bp～約300bp、約300bp～約400bp、約400bp～約500bp、約500bp～約600bp、約600bp～約700bp、約700bp～約800bp、約800bp～約900bp、約900bp～約1kb、約1kb～約2kb、約2kb～約3kb、約3kb～約4kb、約4kb～約5kb、約5kb～約10kb、約10kb～約20kb、約20kb～約30kb、約30kb～約40kb、約40kb～約50kb、約50kb～約100kb、約100kb～約150kb、約150kb～約200kb、約200kb～約300kb、約300kb～約400kb、または、約400kb～約500kbに位置していてもよい。代替的に、第1及び／または第2のガイドRNA認識配列または第1及び／または第2の開裂部位は、5'標的配列及び／または3'標的配列から、50bp超、100bp超、200bp超、300bp超、400bp超、500bp超、600bp超、700bp超、800bp超、900bp超、1kb超、2kb超、3kb超、4kb超、5kb超、6kb超、7kb超、8kb超、9kb超、10kb超、20kb超、30kb超、40kb超、50kb超、60kb超、70kb超、80kb超、90kb超、または、100kb超に位置していてもよい。例えば、第1のガイドRNA認識配列または第1の開裂部位は、5'標的配列からまたは5'標的配列と3'標的配列の両方から、50bp超、100bp超、200bp超、300bp超、400bp超、500bp超、600bp超、700bp超、800bp超、900bp超、1kb超、2kb超、3kb超、4kb超、5kb超、6kb超、7kb超、8kb超、9kb超、10kb超、20kb超、30kb超、40kb超、50kb超、60kb超、70kb超、80kb超、90kb超、または、100kb超に位置していてもよい。同様に、第2のガイドRNA認識配列または第2の開裂部位は、3'標的配列からまたは5'標的配列と3'標的配列の両方から、50bp超、100bp超、200bp超、300bp超、400bp超、500bp超、600bp超、700bp超、800bp超、900bp超、1kb超、2kb超、3kb超、4kb超、5kb超、6kb超、7kb超、8kb超、9kb超、10kb超、20kb超、30kb超、40kb超、50kb超、60kb超、70kb超、80kb超、90kb超、または、100kb超に位置していてもよい。

【0240】

外来修復テンプレートのホモロジーアームに対応する標的配列の空間関係及びCas開裂部位は様々であり得る。例えば、標的配列はCas開裂部位の5'側に位置していてもよく、標的配列はCas開裂部位の3'側に位置していてもよく、または、標的配列はCas開裂部位に隣接していてもよい。

【0241】

1細胞期胚以外の細胞において、外来修復テンプレートは、細胞内の相同組換えを実施することを目的としたその他の手法で通常使用する核酸配列よりも大きな核酸配列に対応及び由来するホモロジーアームを含む標的化ベクターを含む「大きな標的化ベクター」すなわち「LTVEC」であってもよい。LTVECとしてはまた、細胞内の相同組換えを実施することを目的としたその他の手法で通常使用する核酸配列よりも大きな核酸配列を有する核酸インサートを含む標的化ベクターが挙げられる。例えば、LTVECは、従来のプラスミド系標的化ベクターではそのサイズ制限により対応不可能であった大きな遺伝子座の改変を可能とする。例えば、標的遺伝子座は、従来を使用することでは標的化が不可能であった、または、不正確にしか標的化できなかった、もしくは、ヌクレアー

10

20

30

40

50

【 0 2 4 2 】

10

20

30

40

50

0 kb～約190 kb、または、約190 kb～約200 kbであってもよい。5′ホモロジーマームと3′ホモロジーマームの総合計はまた、例えば、約200 kb～約250 kb、約250 kb～約300 kb、約300 kb～約350 kb、または、約350 kb～約400 kbであってもよい。代替的に、それぞれのホモロジーマームは、少なくとも5 kb、少なくとも10 kb、少なくとも15 kb、少なくとも20 kb、少なくとも30 kb、少なくとも40 kb、少なくとも50 kb、少なくとも60 kb、少なくとも70 kb、少なくとも80 kb、少なくとも90 kb、少なくとも100 kb、少なくとも110 kb、少なくとも120 kb、少なくとも130 kb、少なくとも140 kb、少なくとも150 kb、少なくとも160 kb、少なくとも170 kb、少なくとも180 kb、少なくとも190 kb、または、少なくとも200 kbであってもよい。同様に、5′ホモロジーマームと3′ホモロジーマームの総合計は、少なくとも10 kb、少なくとも15 kb、少なくとも20 kb、少なくとも30 kb、少なくとも40 kb、少なくとも50 kb、少なくとも60 kb、少なくとも70 kb、少なくとも80 kb、少なくとも90 kb、少なくとも100 kb、少なくとも110 kb、少なくとも120 kb、少なくとも130 kb、少なくとも140 kb、少なくとも150 kb、少なくとも160 kb、少なくとも170 kb、少なくとも180 kb、少なくとも190 kb、または、少なくとも200 kbであってもよい。それぞれのホモロジーマームはまた、少なくとも250 kb、少なくとも300 kb、少なくとも350 kb、または、少なくとも400 kbであってもよい。

【0245】

LTVECは、細胞内の相同組換えを実施することを目的としたその他の手法で通常使用する核酸配列よりも大きな核酸配列を有する核酸インサートを含んでいてもよい。例えば、LTVECは、約5 kb～約10 kb、約10 kb～約20 kb、約20 kb～約40 kb、約40 kb～約60 kb、約60 kb～約80 kb、約80 kb～約100 kb、約100 kb～約150 kb、約150 kb～約200 kb、約200 kb～約250 kb、約250 kb～約300 kb、約300 kb～約350 kb、約350 kb～約400 kbの範囲の核酸インサート、またはそれより長い核酸インサートを含んでいてもよい。LTVECはまた、例えば、約1 kb～約5 kb、約400 kb～約450 kb、約450 kb～約500 kbの範囲の核酸インサート、またはそれより長い核酸インサートを含んでいてもよい。代替的に、核酸インサートは、少なくとも1 kb、少なくとも5 kb、少なくとも10 kb、少なくとも20 kb、少なくとも30 kb、少なくとも40 kb、少なくとも60 kb、少なくとも80 kb、少なくとも100 kb、少なくとも150 kb、少なくとも200 kb、少なくとも250 kb、少なくとも300 kb、少なくとも350 kb、少なくとも400 kb、少なくとも450 kb、または、少なくとも500 kbであってもよい。

【0246】

D. 細胞のゲノムの接触及び核酸またはタンパク質の細胞内への導入

細胞のゲノムを接触させることは、細胞が1細胞期胚である場合、1つまたは複数のCasタンパク質またはCasタンパク質をコードする核酸、1つまたは複数のガイドRNAまたはガイドRNAをコードする核酸（すなわち、1つまたは複数のCRISPR RNA及び1つまたは複数のtracrRNA）、及び、1つまたは複数の外来修復テンプレートを細胞に導入することを含んでいてもよく、例えば、外来修復テンプレートは5 kb長未満であってもよい。細胞のゲノムを接触させること（例えば、細胞を接触させること）は、上記構成要素のうちの1つのみ、構成要素のうちの1つまたは複数、または、構成要素の全てを細胞に導入することを含んでいてもよい。「導入すること」は、配列が細胞の内部に侵入するような方法で核酸またはタンパク質を細胞に提示することを含む。導入することは任意の方法により実施可能であり、構成要素のうちの1つまたは複数（例えば、構成要素のうちの2つまたは構成要素の全て）を任意の組み合わせで同時または連続的に細胞に導入してもよい。例えば、Casタンパク質及びガイドRNAの導入に先立って外来修復テンプレートを導入してもよく、または、Casタンパク質及びガイドRNA

の導入後に外来修復テンプレートを導入してもよい（例えば、C a s タンパク質及びガイドRNA導入の約1、2、3、4、8、12、24、36、48または72時間前または後に外来修復テンプレートを投与してもよい）。例えば、US2015/0240263及びUS2015/0110762を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

【0247】

C a s タンパク質を、タンパク質の形態、例えば、gRNAと複合体を形成したC a s タンパク質などで、または、C a s タンパク質をコードする核酸の形態、例えば、RNA（例えば、メッセンジャーRNA（mRNA））またはDNAで細胞に導入してもよい。DNAの形態で導入する場合、ガイドRNAをコードするDNAは、細胞内で活性化して

10

【0248】

ガイドRNAを、RNAの形態またはガイドRNAをコードするDNAの形態で細胞に導入してもよい。DNAの形態で導入する場合、ガイドRNAをコードするDNAは、細胞内で活性化しているプロモーターと機能的に連結してもよい。このようなDNAは1つまたは複数の発現構築物内にあってもよい。例えば、このような発現構築物は単一核酸分子の構成要素であってもよい。代替的に、このような発現構築物は、2つまたはそれ以上の核酸分子を含む任意の組み合わせに分離していてもよい（すなわち、1つまたは複数のCRISPR RNAをコードするDNA及び1つまたは複数のtracrRNAをコードするDNAは、独立した核酸分子の構成要素であってもよい）。

20

【0249】

一部の方法では、ヌクレアーゼ試薬（例えば、C a s タンパク質及びガイドRNA）をコードするDNA及び／または外来修復テンプレートをコードするDNAを、DNAミニサークルを介して細胞に導入してもよい。例えば、WO2014/182700を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。DNAミニサークルは、複製起点も抗生物質選択マーカースも有さない非ウイルス遺伝子導入法に使用可能なスーパーコイルDNA分子である。それゆえ、DNAミニサークルは通常、プラスミドベクターよりもサイズが小さい。これらのDNAは細菌DNAを含有せず、それゆえ、細菌DNAに見られる非メチル化CpGモチーフを欠いている。

30

【0250】

本明細書で提供する方法は、核酸またはタンパク質が少なくとも1つの細胞の内部に浸入することを除いては、核酸またはタンパク質を細胞に導入するための特定の方法に依存しない。核酸及びタンパク質を様々な細胞型に導入するための方法は当技術分野において周知であり、例えば、安定トランスフェクション法、一過性トランスフェクション法、及びウイルス媒介法が挙げられる。

【0251】

トランスフェクションプロトコルに加え、核酸またはタンパク質を細胞に導入するためのプロトコルは様々であってもよい。限定されないトランスフェクション法としては、リポソーム；ナノ粒子；リン酸カルシウム（Graham et al. (1973) *Virology* 52 (2) : 456-67, Bacchetti et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (4) : 1590-4, 及びKriegler, M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company. pp. 96-97)；デンドリマー；または、DEAE-デキストランもしくはポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーを使用する化学ベースのトランスフェクション法が挙げられる。非化学的方法としては、エレクトロポレーション、ソノポレーション及び光学トランスフェクションが挙げられる。粒子ベースのトランスフェクションとしては、遺伝子銃の使用、またはマグネットを利用したトランスフェクション（Bertram (2006) *Current Pharmaceutical Biot*

40

50

technology 7, 277-28) が挙げられる。ウイルス法もまたトランスフェクションに使用可能である。

【0252】

核酸またはタンパク質の細胞への導入はまた、エレクトロポレーション、細胞質内注入、ウイルス感染、アデノウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、トランスフェクション、脂質媒介トランスフェクション、またはヌクレオフェクションを介していてもよい。核酸またはタンパク質の細胞への導入はまた、アデノ随伴ウイルスを介していてもよい。ヌクレオフェクションは、核酸基質を細胞質にだけではなく核膜を通過させて核にも送達することを可能とする優れたエレクトロポレーション技術である。加えて、本明細書で開示する方法におけるヌクレオフェクションの使用は通常、通常のエレクトロポレーションと比較してはるかに少ない細胞しか必要としない（例えば、通常のエレクトロポレーションによる7百万と比較してわずか約2百万）。1つの例では、ヌクレオフェクションは、LONZA（登録商標）NUCLEOFECTOR（商標）システムを使用して実施される。

10

【0253】

核酸またはタンパク質の細胞（例えば、1細胞期胚）への導入はまた、マイクロインジェクションにより実施可能である。1細胞期胚では、マイクロインジェクションは、母性及び／または父性前核へと、または細胞質へと実施されてもよい。マイクロインジェクションを1つの前核のみへと実施する場合、そのより大きなサイズにより父性前核が好ましい。mRNAのマイクロインジェクションは細胞質へと実施することが好ましく（例えば、mRNAを直接翻訳機構に送達するために）、その一方で、Casタンパク質またはCasタンパク質をコードするもしくはRNAをコードする核酸のマイクロインジェクションは、核／前核へと実施することが好ましい。代替的に、マイクロインジェクションは核／前核と細胞質の両方へと注入することにより実施可能であり、最初に核／前核へと針を挿入して第1の量を注入してもよく、また1細胞期胚から針を抜きながら第2の量を細胞質へと注入してもよい。Casタンパク質を細胞質へと注入する場合、Casタンパク質は、核／前核への送達を確実なものとするための核局在化シグナルを含むことが好ましい。マイクロインジェクションを実施するための方法はよく知られている。例えば、Nagy et al. (Nagy A, Gertszenstein M, Vintersten K, Behringer R., 2003, Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Meyer et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:15022-15026及びMeyer et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:9354-9359を参照されたい。1細胞期胚への導入はまた、エレクトロポレーションにより実施可能である。

20

30

【0254】

核酸またはタンパク質を細胞に導入するためのその他の方法としては、例えば、ベクター送達、粒子媒介送達、エクソソーム媒介送達、脂質ナノ粒子媒介送達、細胞貫通ペプチド媒介送達、または埋め込み型デバイス媒介送達を挙げることができる。

40

【0255】

核酸またはタンパク質の細胞への導入は、一定期間にわたり1回または複数回実施可能である。例えば、導入は、一定期間にわたり少なくとも2回、一定期間にわたり少なくとも3回、一定期間にわたり少なくとも4回、一定期間にわたり少なくとも5回、一定期間にわたり少なくとも6回、一定期間にわたり少なくとも7回、一定期間にわたり少なくとも8回、一定期間にわたり少なくとも9回、一定期間にわたり少なくとも10回、一定期間にわたり少なくとも11回、一定期間にわたり少なくとも12回、一定期間にわたり少なくとも13回、一定期間にわたり少なくとも14回、一定期間にわたり少なくとも15回、一定期間にわたり少なくとも16回、一定期間にわたり少なくとも17回、一定期間にわたり少なくとも18回、一定期間にわたり少なくとも19回、または、一定期間にわ

50

たり少なくとも20回実施可能である。

【0256】

一部の例においては、本方法及び組成物に用いる細胞は、それらのゲノムに安定的に組み込まれたDNA構築物を有している。このような例においては、接触させることは、既にそのゲノムに安定的に組み込まれた構築物を有する細胞を提供することを含んでいてもよい。例えば、本明細書で開示する方法に用いる細胞は、そのゲノムに安定的に組み込まれた既存Casコード遺伝子を有していてもよい（すなわち、Casレディー細胞）。「安定的に組み込む（stably incorporated）」、「安定的に導入」または「安定的に組み込む（stably integrated）」は、ヌクレオチド配列が細胞のゲノムに統合されてその後代へとそのヌクレオチド配列を遺伝させることができるように、ポリヌクレオチドを細胞に導入することを含む。DNA構築物または標的化ゲノム導入システムの様々な構成要素を安定的に組み込むために、任意のプロトコルを使用してもよい。

10

【0257】

E. 標的ゲノム遺伝子座、及びガイドRNA認識配列の位置

標的ゲノム遺伝子座は、目的の外来標的抗原と相同であるまたは目的の外来標的抗原と目的のエピトープを共有する自己抗原の発現に影響を及ぼす任意のゲノム遺伝子座であってもよい。好ましくは、標的ゲノム遺伝子座は、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなる。一例として、標的ゲノム遺伝子座は、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含む領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているか、または、遺伝子の完全なコード領域を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているか、または、代替的に、標的ゲノム遺伝子座は、自己抗原をコードする遺伝子の発現に影響を及ぼす別のゲノム遺伝子座を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなっているか、または、このようなゲノム遺伝子座の一例は、自己抗原をコードする遺伝子の発現に必要な転写調節因子をコードする遺伝子の全てまたは一部である。一部の方法では、複数の標的ゲノム遺伝子座を標的としてもよい。一例として、目的の外来抗原と相同であるまたは目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する複数の自己抗原をコードする複数の遺伝子が存在する場合、複数の遺伝子のそれぞれは、連続的にまたは同時にのいずれかで標的となり得る。

20

30

【0258】

第1及び第2のガイドRNA認識配列は標的ゲノム遺伝子座内の任意の場所にあってもよい。例えば、第1及び第2のガイドRNA認識配列は、目的の外来標的抗原と相同であるまたは目的の外来標的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に隣接していてもよい。1つの例では、第1のガイドRNA認識配列は、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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、第2のガイドRNA認識配列は、自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含むか、または、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る。例えば、第1のガイドRNA認識配列は開始コドンを含んでいてもよく、第2のガイドRNA認識は終止コドンを含んでいてもよい。第3及び第4のガイドRNAも使用する場合、第3及び第4のガイドRNA認識配列も標的ゲノム遺伝子座内の任意の場所にあってもよい。例えば、ガイドRNA認識配列のうちの2つ（例えば、第1及び第3（第1と第3のガイドRNA認識配列は異なり任意選択的にオーバーラップしている））は、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含んでいてもよく、または、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ってもよく、もう一方の2つのガイドRNA認識配列（例えば、第2及び第4（第2と第4のガイドRNA認識配列は異なり任意選択的にオーバーラップしている））は、自己抗原をコードする遺伝子の終止コドンを含んでいてもよく、または、終止コドンの約1

40

50

0、20、30、40、50、100、200、300、400、500または1,000ヌクレオチド以内であってもよい。開始コドンと終止コドンの両方を標的とすることにより、自己抗原をコードする遺伝子のコード配列の欠失をもたらすことができ、それにより、自己抗原の発現が排除される。

【0259】

別の例では、第1と第2のガイドRNA認識配列は異なり、それぞれは、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含むか、または、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る。例えば、第1と第2のガイドRNA認識配列は、オーバーラップしていてもよく、それぞれが開始コドンを含んでいてもよい。第3及び／または第4のガイドRNAも使用する場合、第3及び第4のガイドRNA認識配列は標的ゲノム遺伝子座内の任意の場所にあってもよい。例えば、第3と第4のガイドRNA認識配列は互いに異なってもよく、また第1及び第2のガイドRNA認識配列とは異なってもよく、第3と第4のガイドRNA認識配列のそれぞれはまた、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンを含んでいてもよく、または、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ってもよい。開始コドンを標的とすることにより、開始コドンを破壊することができ、それにより、自己抗原をコードする遺伝子の発現が排除される。

【0260】

第3及び第4のガイドRNA（または別のガイドRNA）を使用する場合、目的の外来抗原と相同であるまたは目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する第1の自己抗原の発現に影響を及ぼすまたはその他の自己抗原（例えば、第2の自己抗原）の発現に影響を及ぼす別の標的ゲノム遺伝子座も標的として、第1の自己抗原及び／またはその他の自己抗原の発現を抑制してもよい。一例として、一部の方法では、目的の外来抗原と相同であるまたは目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する第1の自己抗原をコードする遺伝子を標的としてもよく、また、目的の外来抗原と相同であるまたは目的の外来抗原と目的のエピトープを共有する第2の自己抗原をコードする第2の遺伝子を標的としてもよい。

【0261】

F．組換え機構、及び、非相同末端結合、遺伝子変換または相同組換えの普及率を変化させるための方法

組換えは2つのポリヌクレオチド間における任意の遺伝情報交換プロセスを含み、任意の機構により生じ得る。二本鎖切断（DSB）に対応する組換えは、主に2つの保存されたDNA修復経路（非相同末端結合（NHEJ）及び相同組換え（HR））を介して行われる。Kasperek & Humphrey (2011) Seminars in Cell & Dev. Biol. 22: 886–897を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。同様に、外来修復テンプレートが関与する標的核酸の修復は、2つのポリヌクレオチド間における任意の遺伝情報交換プロセスを含んでいてもよい。

【0262】

NHEJは、相同テンプレートを必要とせずに、切断末端同士を直接ライゲーションすること、または切断末端を外来配列に直接ライゲーションすることによる、核酸内における二本鎖切断の修復を含む。NHEJによる非連続配列のライゲーションは多くの場合、二本鎖切断部位付近の欠失、挿入または転座をもたらす。例えば、NHEJはまた、切断末端を外来修復テンプレートの末端に直接ライゲーションすること（すなわち、NHEJに基づいた補足）による、外来修復テンプレートの標的導入をもたらす。このようなNHEJ介在性標的導入は、相同組換え修復（HDR）経路が容易に利用可能ではない場合（例えば、非分裂細胞、初代細胞、及び相同性に基づいたDNA修復が不十分に行われる細胞において）、外来修復テンプレートの挿入に好ましい場合がある。加えて、相同組換え修復とは対照的に、開裂部位前後における広い領域の配列同一性（Cas媒介開裂により生成されたオーバーハングを越える）に関する情報（ゲノム配列情報が限られた

ゲノムを有する生物への標的挿入を試みる場合に有用であり得る)は必要ではない。導入は、Casタンパク質によって生成された開裂ゲノム配列内のオーバーハングと適合性のあるオーバーハングに隣接する外来修復テンプレートを使用して、外来修復テンプレートと開裂ゲノム配列の間の平滑末端のライゲーションにより、または、付着末端(すなわち、5'または3'オーバーハングを有する)のライゲーションにより、進行し得る。例えば、US 2011/020722、WO 2014/033644、WO 2014/089290、及びMaresca et al. (2013) Genome Res. 23(3):539-546を参照されたい(それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。平滑末端をライゲートする場合、フラグメントの結合に必要なマイクロホモロジー領域を生成するために標的及び/またはドナーの切断が必要となる場合があり、それにより、標的配列内に不必要な改変が生成され得る。

【0263】

組換えはまた、相同組換え修復(HDR)または相同組換え(HR)により行われ得る。HDRまたはHRはヌクレオチド配列相同性を必要とし得る核酸修復形態を含み、「標的」分子(すなわち、二本鎖切断を受けた分子)を修復するためのテンプレートとしての「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝情報の移行をもたらす。いかなる特定の理論に制限されるものではないが、このような移行は、切断標的とドナーの間に形成されるヘテロ二本鎖DNAのミスマッチ修復、及び/または、ドナーを使用して標的の一部となる遺伝情報を再合成する合成依存的鎖アニリング(synthesis-dependent strand annealing)、及び/または、関連プロセスを伴い得る。一部の例においては、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、または、ドナーポリヌクレオチドのコピーの一部は、標的DNA内に導入される。Wang et al. (2013) Cell 153:910-918; Mandalos et al. (2012) PLOS ONE 7:e45768:1-9; 及びWang et al. (2013) Nat Biotechnol. 31:530-532を参照されたい(それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

【0264】

組換えは、相同染色体対の第1の染色体と第2の染色体の間であってもよい。このような方法は、例えば、ヘテロ接合性の喪失(LOH)、遺伝子変換、または任意の周知の組換え機構により生じる交差事象を含み得る。理論に束縛されるものではないが、LOHは、例えば、有糸分裂組換え(遺伝子変換を伴うまたは伴わずに)を介して、または、染色体の喪失及び重複を介して生じ得る。例えば、Lefebvre et al. (2001) Nat. Genet. 27:257-258を参照されたい(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。この場合の遺伝子変換は、ドナー配列から極めて相同なアクセプターへの遺伝物質の一方方向性の転写(すなわち、1つの分子からその相同体への遺伝情報の非相互交換)を含み得る。遺伝子変換は、任意の周知の組換え機構による対立遺伝子を複製するための任意の方法を含む。例えば、遺伝子変換は、インタクト配列から二本鎖切断を含む相同領域への遺伝情報の非相互転写を伴い得、また、姉妹染色分体間、相同染色体間、または、同一染色分体上または異なる染色体上のいずれかにおける相同配列間で生じ得る。例えば、Chen et al. (2007) Nat. Rev. Genet. 8:762-775を参照されたい(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。特定の例では、遺伝子変換は、相同染色体から遺伝情報を複製した結果としての相同組換えから直接もたらされる。このことは、相同配列同士が異なる場合、局所的なヘテロ接合性の喪失(LOH)をもたらし得る。

【0265】

一例として、LOHは、有糸分裂交差による、または切断誘導複製による染色分体複製による、相互染色分体交換を介して生じ得る。いずれの例においても、ゲノム複製前に一方の染色体が標的となるヘテロ接合性改変は生じ得る。代替的に、単一染色分体はゲノム複製後に標的となり、続いて、染色分体間の遺伝子変換が生じ得る。

【0266】

本明細書で開示する方法のいずれかにおいて、細胞は、改変されてNHEJ活性が上昇または低下した細胞であってもよい。同様に、細胞は、改変されて遺伝子変換またはHDR活性が上昇した細胞であってもよい。このような改変は、NHEJ、遺伝子変換及び／またはHDRの調節に関与する遺伝子の発現または活性における改変を含んでいてもよい。例えば、NHEJの活性を低下させること及び／またはHDRの活性を上昇させることにより、2つのヌクレアーゼ試薬（例えば、Casタンパク質及び2つのガイドRNA）に対応するヌクレアーゼ認識配列（例えば、ガイドRNA認識配列）間のゲノム領域における二対立遺伝子崩壊が促進され得る。いかなる特定の理論に制限されるものではないが、二対立遺伝子ゲノム崩壊が生じ得る1つの機構は、第1の対立遺伝子内におけるNHEJ介在性修復またはHDR介在性修復、及びHDR機構を介した同一の第2の対立遺伝子の生成（例えば、遺伝子変換など）によるものである（実施例1を参照のこと）。それゆえ、HDR介在性経路を促進する（例えば、NHEJ活性を低下させることにより、またはHDR活性を上昇させることにより）ことにより、ゲノム領域の二対立遺伝子崩壊も促進され得る。同様に、いかなる特定の理論に制限されるものではないが、単一遺伝子座を標的とする対のヌクレアーゼ試薬（例えば、Casタンパク質及び対のガイドRNA）を使用したヘテロ接合性細胞のホモ接合性細胞への変換は、NHEJ活性が低下してHDR活性（例えば、遺伝子変換活性）が相対的に上昇する場合、促進され得る。

10

【0267】

NHEJ活性を上昇または低下させるためにまたはHDR活性を上昇または低下させるために、阻害剤を使用してもよい。このような阻害剤は、例えば、小分子または阻害核酸、例えば、遺伝子転写産物に特異的な低分子干渉核酸（例えば、低分子干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、及び低分子ヘアピンRNA（shRNA））またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどであってもよい。例えば、リン酸化、ユビキチン化及びスモ化を介した翻訳後修飾により、NHEJもしくはHDRに関与する酵素またはそれらの上流の調節に関与する酵素に、阻害剤を向かわせてもよい。

20

【0268】

哺乳動物細胞において、NHEJは優勢なDSB修復機構であり、細胞周期全体にわたり有効である。脊椎動物において、「標準的な（canonical）」または「標準的な（classical）」NHEJ経路（C-NHEJ）は、DNA-PK、Ku70-80、Artemis、リガーゼIV（Lig4）、XRCC4、CLF、及びPolμを含む、DSBを修復するためのいくつかのコア因子を必要とする。Kasperek & Humphrey (2011) Seminars in Cell & Dev. Biol. 22: 886-897を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。NHEJの間、DNA末端は、非常に豊富な末端保護Kuタンパク質（その他のNHEJ構成要素を収容するドッキングステーションとして機能する）による結合を受ける。

30

【0269】

それゆえ、本明細書で開示する方法の一部では、細胞は改変されて、C-NHEJに関与する因子の発現または活性を抑制もしくは排除または上昇させることになる。例えば、一部の方法では、細胞は改変されて、DNA-PK、Ku70-80、Artemis、リガーゼIV（Lig4）、XRCC4、CLF及び／またはPolμの発現または活性を抑制または排除することになる。特定の方法では、細胞は改変されて、DNA-PKの発現または活性を抑制または排除することになる、または、DNA-PKの発現または活性を上昇させることになる（例えば、DNA-PKcsの発現または活性；例示的なUniprot配列はP97313と呼ばれる）。DNA-PKcs阻害剤の例としては、例えば、NU7026及びNU7441が挙げられる。例えば、米国特許番号6,974,867（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）を参照されたい。特定の方法では、細胞は改変されて、リガーゼIVの発現または活性を抑制ま

40

50

たは排除することになる、または、リガーゼⅠⅤの発現または活性を上昇させることになる。リガーゼⅠⅤ阻害剤の一例はSCR7である。

【0270】

特定のDNA修復阻害剤の効果を相乗的に高めるため、または、細胞周期停止及び／またはアポトーシスのような意図しない副作用を防止するためのいずれかで、ATM（例えば、KU55933）、CHK1／CHK2（例えば、KLD1162またはCHIR-124）、及びATR（例えば、VE821）のような細胞周期チェックポイントタンパク質を標的とする阻害剤も使用してもよい（Ciccia et al. (2010) Mol Cell 40:179を参照のこと（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる））。

10

【0271】

C-NHEJの阻害は、「代替的な」NHEJ（A-NHEJ）経路が介在する異常な結合の度合いを上昇させ得、またHR修復も亢進させ得る。A-NHEJ経路はマイクロホモロジー媒介結合への偏向を示し、C-NHEJよりも遅い動態に従う。MRN複合体（MRE11、RAD50、NBS1）、CtIP、XRCC1、PARP、Lig1及びLig3を含むいくつかの因子の関与が提唱されている。Kasperek & Humphrey (2011) Seminars in Cell & Dev. Biol. 22:886-897、及びClaybon et al. (2010) Nucleic Acids Res. 38(21):7538-7545を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

20

【0272】

それゆえ、本明細書で開示する方法の一部では、細胞は改変されて、A-NHEJに関与する因子の発現または活性を抑制もしくは排除または上昇させることになる。例えば、一部の方法では、細胞は改変されて、MRE11、RAD50、NBS1、CtIP、XRCC1、PARP（例えば、PARP1）、Lig1及び／またはLig3の発現または活性を抑制または排除することになる。その他の方法では、細胞は改変されて、MRE11、RAD50、NBS1、CtIP、XRCC1、PARP（例えば、PARP1）、Lig1及び／またはLig3の発現または活性を上昇させることになる。特定の方法では、細胞は改変されて、PARP1の発現または活性を抑制または排除することになる、または、PARP1の発現または活性を上昇させることになる（例示的なUnipro配列はP11103と呼ばれる）。PARP阻害剤（例えば、NU1025、イニパリブ、オラパリブ）の例としては、ニコチンアミド；イソキノリノン及びジヒドロイソキノリノン；ベンゾイミダゾール及びインドール；フタラジン-1（2H）-オン及びキナゾリノン；イソインドリノンならびにその類似体及び誘導体；フェナントリジン及びフェナントリジノン；ベンゾピロンならびにその類似体及び誘導体；不飽和ヒドロキシム酸誘導体ならびにその類似体及び誘導体；縮合ピリダジンならびにその類似体及び誘導体を含むピリダジン；及び／または、その他の化合物、例えば、カフェイン、テオフィリン及びチミジン、ならびにその類似体及び誘導体などが挙げられる。例えば、米国特許番号8,071,579（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

30

40

【0273】

C-NHEJはまた、C-NHEJを阻害することによってもHR修復の亢進につながり得るように、HRとの競合関係を示す。NHEJを阻害することが、相同組換えによるランダム導入の抑制及び場合により標的導入の増加を介して標的遺伝子組換えの増加につながり得るため、NHEJとHRの間のこのような競合を利用することができる。

【0274】

一本鎖アニーリング、遺伝子変換、交差、及び切断誘導複製を含む、いくつかの様式の相同組換え修復が存在している。一本鎖アニーリングとは、切断されたDSBの両側の相同一本鎖配列同士がアニールすることにより染色体再構成が生じる、HR修復のマイナー様式である。一本鎖アニーリングは、2つの配列相同性領域を分ける距離に応じて様々な

50

サイズの欠失を生成する。遺伝子変換は1つの分子からその相同体への遺伝情報の非相互交換を含み、相同染色体から遺伝情報を複製した結果としてのHRから直接もたらされる。このことは、相同配列同士が異なる場合、局所的なLOHをもたらし得る。通常、遺伝子変換の長さは数百塩基対に限定される。しかしながら、RAD51C欠損を含む一部の遺伝的背景において、長トラクト遺伝子変換が報告されている。Nagara *et al.* (2006) *Mol. Cell. Biol.* 26:8075–8086を参照されたい(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。交差は、例えば、相同染色体間で生じ得、G1期に生じる場合には相互転座をもたらし可能性があり、または、G2期に生じる場合には切断部位から末端テロメアにわたる非相互転座及びLOHをもたらし可能性がある。切断誘導複製とは、鎖侵入後にDNA複製が染色体の末端まで続くHRの変異体である。それゆえ、HRがLOHを促進し得る多くの機構が存在する。

10

【0275】

それゆえ、本明細書で開示する方法の一部では、細胞は改変されて、HRに関与する因子の発現または活性を抑制もしくは排除または上昇させることになる。例えば、一部の方法では、細胞は改変されて、RAD51、RAD52、RAD54、RAD55、RAD51C、BRCA1及び／またはBRCA2の発現または活性を上昇させることになる。その他の方法では、細胞は改変されて、RAD51、RAD52、RAD54、RAD55、RAD51C、BRCA1及び／またはBRCA2の発現または活性を抑制または排除することになる。

20

【0276】

一部の方法では、NHEJ及び／またはHRの調節に関与する更にその他のタンパク質の発現または活性が変化され得る。例えば、一部の方法では、細胞は改変されて、Chk2の発現または活性を抑制または排除することになる、Clspnの発現または活性を抑制または排除することになる、Setd2の発現または活性を抑制または排除することになる、Kat2aの発現または活性を上昇させることになる、及び／または、Rad51の発現または活性を上昇させることになる。その他の方法では、細胞は改変されて、Chk2の発現または活性を上昇させることになる、Clspnの発現または活性を上昇させることになる、Setd2の発現または活性を上昇させることになる、Kat2aの発現または活性を抑制または排除することになる、及び／または、Rad51の発現または活性を抑制または排除することになる。

30

【0277】

Chk2 (Chk2及びRad53としても周知; *S. pombe* 相同体はCds1) は、チェックポイントによる細胞周期停止、DNA修復の活性化、及びDNA二本鎖切断の存在に応答したアポトーシスに必要なセリン／スレオニンタンパク質キナーゼである。Blaikley *et al.* (2014) *Nucleic Acids Research* 42:5644–5656を参照されたい(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。Clspn (Claspinとしても周知; *S. pombe* 相同体はMrc1) は、DNA損傷に応答したチェックポイントによる細胞周期停止に必要なタンパク質である。*S. pombe* におけるChk2またはClspnの相同体の欠失は、野生型と比較して著しく高いレベルの切断誘導遺伝子変換を示す過剰組換え表現型をもたらしと報告されている。具体的には、遺伝子変換のレベルが著しく上昇したと報告されている一方で、非相同末端結合(NHEJ)、姉妹染色分体変換(SCC)及びヘテロ接合性の喪失(LOH)のレベルが低下したと報告されている。Blaikley *et al.* (2014) *Nucleic Acids Research* 42:5644–5656を参照されたい。

40

【0278】

Kat2a (Gcn5及びGcn5l2としても周知) は転写活性化を促進する遍在性のヒストンアセチル基転移酵素であり、二本鎖切断修復に関与していることが報告されている。Kat2a依存性ヒストンH3リシン36(H3K36)のアセチル化により、ク

50

ロマチンアクセシビリティが高まり、切断が増加し、また相同組換えが促進される一方で、非相同末端結合は抑制される。Pai et al. (2014) Nat. Commun. 5:4091を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。Setd2 (Kiaa1732、Kmt3a及びSet2としても周知）は、脱メチル化リシン36 (H3K36me2) を基質として使用して、ヒストンH3のリシン36を特異的にトリメチル化 (H3K36me3) するヒストンメチル基転移酵素である。Setd2依存性H3K36のメチル化により、クロマチンアクセシビリティが低下し、切断が減少し、またNHEJが促進される。Pai et al. (2014) Nat. Commun. 5:4091を参照されたい。

【0279】

Rad 51 (RecA、Rad51A、及びDNA修復タンパク質Rad51相同体1としても周知) とは、Rad52及びその他のタンパク質と共に機能して相同組換え中に鎖交換を達成し、ミスマッチ修復により分解されて遺伝子変換トラクトを得るヘテロ二本鎖DNAを形成するタンパク質である。哺乳動物細胞において、Rad51及びRad52が過剰発現することにより、相同組換え及び遺伝子変換の頻度が増加することが報告されている。Yanez & Porter (1999) Gene Ther. 6:1282-1290、及びLambert & Lopez (2000) EMBO J. 19:3090-3099を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

【0280】

NHEJ、遺伝子変換及び／または相同組換え修復の調節に関与する遺伝子の発現または活性における改変は、空間的または時間的に特異的であってもよく、また誘導性または一時的及び可逆的であってもよい。例えば、様々な形態のカセットは、特定の発生段階においてまたは導入時に、特定の細胞型または組織型内における欠失を可能とするように構築され得る。このようなカセットは、カセットがリコンビナーゼ認識部位の両側に隣接しているリコンビナーゼシステムを採用していてもよく、所望の細胞型で発現する、所望の発生段階に発現する、または、導入時に発現もしくは活性化するリコンビナーゼを使用して除去することができる。このようなカセットは更に、US2011/0104799に記載（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）のとおり、ヌル対立遺伝子、条件的対立遺伝子、または条件的／ヌル対立遺伝子の組み合わせが生成されるように配置される様々なペアの異なるリコンビナーゼ認識部位を含むように構築され得る。リコンビナーゼ遺伝子の調節は様々な方法で制御可能であり、それら方法は例えば、細胞特異的なプロモーター、組織特異的なプロモーターまたは発生的に調節されるプロモーター（またはその他の調節エレメント）とリコンビナーゼ遺伝子を機能的に連結すること、あるいは、特定の細胞型、組織型または発生段階においてのみ活性化するmiRNA用の認識部位を含む3'-UTRとリコンビナーゼ遺伝子を機能的に連結することなどである。リコンビナーゼはまた、例えば、エフェクターまたは代謝産物（例えば、CreERT²（その活性はタモキシフェンにより正に制御される））の制御下にリコンビナーゼを置く融合タンパク質を用いることにより、または、誘導性プロモーター（例えば、その活性がドキシサイクリン及びTetRまたはTetR変異体により制御される誘導性プロモーター）の制御下にリコンビナーゼ遺伝子を置くことにより、調節することができる。様々な形態のカセット及びリコンビナーゼ遺伝子を調節するための方法の例については、例えば、US8,518,392、US8,354,389及びUS8,697,851に提供されている（それぞれの記載内容全体は参照として本明細書に組み込まれる）。

【0281】

本明細書で開示するその他の方法では、細胞は改変されて、細胞周期のある期、例えば、細胞周期のM期またはS期などにおいて細胞を阻止することにより、NHEJ活性を上昇または低下させることになる、または、遺伝子変換またはHDR活性を上昇させることになる。例えば、WO2016/036754を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このことは、細胞周期を阻止する組成物

10

20

30

40

50

を用いて実施することができる。このような組成物の例としては、ノコダゾール、ヒドロキシウレア；コルヒチン；デメコルチン（コルセミド）；ロバスタチン；ミモシン；チミジン；アフィジコリン；ラトランクリンA；及びラトランクリンBが挙げられる。このような改変は、NHEJ、遺伝子変換及び／またはHDRの調節に参与する遺伝子の発現または活性における改変を含んでいてもよい。

【0282】

G. 標的遺伝子改変のタイプ

本明細書に記載の方法を使用して、様々なタイプの標的遺伝子改変を導入することができる。このような標的遺伝子改変は、目的の外来標的抗原と相同であるまたは目的の外来標的抗原と目的のエピトープを共有する自己抗原の発現を抑制または排除する任意の改変を含んでいてもよい。このような改変が標的ゲノム遺伝子座を破壊することが好ましい。破壊の例としては、調節エレメント（例えば、プロモーターまたはエンハンサー）の改変、ミスセンス変異、ナンセンス変異、フレームシフト変異、切断変異、ヌル変異、または、少数のヌクレオチドの挿入もしくは欠失（例えば、フレームシフト変異を生じさせる）が挙げられる。破壊は、対立遺伝子の不活性化（すなわち、機能喪失）または喪失をもたらし得る。このような標的遺伝子改変は、例えば、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（*substitution*）（置換（*replacement*））を含み得る。このような挿入、欠失または置換は、例えば、点変異、目的の核酸配列またはその一部のノックアウト、目的の核酸配列またはその一部のノックイン、内在核酸配列の異種または外来核酸配列への置換、調節エレメント（例えば、プロモーターまたはエンハンサー）の改変、ミスセンス変異、ナンセンス変異、フレームシフト変異、切断変異、ヌル変異、またはこれらの組み合わせをもたらし得る。例えば、少なくとも1、2、3、4、5、7、8、9、10またはそれ以上のヌクレオチドを変化（例えば、欠失、挿入または置換）させて標的遺伝子改変を生成してもよい。欠失、挿入または置換は、本明細書中の他の箇所で開催する任意のサイズの欠失、挿入または置換であってもよい。例えば、Wang et al. (2013) Cell 153:910-918; Mandalos et al. (2012) PLOS One 7:e45768; 及び、Wang et al. (2013) Nat Biotechnol. 31:530-532を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような変異は、自己抗原の発現低下または発現（例えば、mRNA及び／またはタンパク質の発現）排除をもたらし得る（例えば、対立遺伝子の欠失）。

【0283】

標的遺伝子改変（例えば、挿入、欠失または置換）は、標的ゲノム遺伝子座の1つまたは複数の位置で生じ得る。例えば、標的遺伝子改変は、2つの外来修復テンプレートを使用する場合、標的ゲノム遺伝子座内の2つの位置における2つの独立した改変を含んでいてもよい。

【0284】

外来修復テンプレートを使用する方法では、例えば、欠失は5'標的配列と3'標的配列の間であってもよい。2つまたはそれ以上のガイドRNAを使用する方法では、欠失は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間、または、第1のCas開裂部位と第2のCas開裂部位の間であってもよい。このような欠失は任意の長さであってもよい。欠失核酸は、例えば、約1bp～約5bp、約5bp～約10bp、約10bp～約50bp、約50bp～約100bp、約100bp～約200bp、約200bp～約300bp、約300bp～約400bp、約400bp～約500bp、約500bp～約1kb、約1kb～約5kb、約5kb～約10kb、約10kb～約20kb、約20kb～約40kb、約40kb～約60kb、約60kb～約80kb、約80kb～約100kb、約100kb～約150kb、または約150kb～約200kb、約200kb～約300kb、約300kb～約400kb、約400kb～約500kb、約500kb～約1Mb、約1Mb～約1.5Mb、約1.5Mb～約2M

b、約2 Mb～約2.5 Mb、または、約2.5 Mb～約3 Mbであってもよい。

【0285】

代替的に、欠失核酸は、例えば、少なくとも1 bp、少なくとも5 bp、少なくとも10 bp、少なくとも50 bp、少なくとも100 bp、少なくとも200 bp、少なくとも300 bp、少なくとも400 bp、少なくとも500 bp、少なくとも1 kb、少なくとも5 kb、少なくとも10 kb、少なくとも20 kb、少なくとも30 kb、少なくとも40 kb、少なくとも50 kb、少なくとも60 kb、少なくとも70 kb、少なくとも80 kb、少なくとも90 kb、少なくとも100 kb、少なくとも110 kb、少なくとも120 kb、少なくとも130 kb、少なくとも140 kb、少なくとも150 kb、少なくとも160 kb、少なくとも170 kb、少なくとも180 kb、少なくとも190 kb、少なくとも200 kb、少なくとも250 kb、少なくとも300 kb、少なくとも350 kb、少なくとも400 kb、少なくとも450 kb、もしくは、少なくとも500 kbであってもよく、またはそれより長くてもよい。一部の例においては、欠失核酸は、少なくとも550 kb、少なくとも600 kb、少なくとも650 kb、少なくとも700 kb、少なくとも750 kb、少なくとも800 kb、少なくとも850 kb、少なくとも900 kb、少なくとも950 kb、少なくとも1 Mb、少なくとも1.5 Mb、少なくとも2 Mb、少なくとも2.5 Mb、少なくとも3 Mb、少なくとも4 Mb、少なくとも5 Mb、少なくとも10 Mb、少なくとも20 Mb、少なくとも30 Mb、少なくとも40 Mb、少なくとも50 Mb、少なくとも60 Mb、少なくとも70 Mb、少なくとも80 Mb、少なくとも90 Mb、または、少なくとも100 Mb（例えば、染色体の大部分）であってもよい。

【0286】

特定の例では、欠失サイズは、約0.1 kb～約1 Mb、約0.1 kb～約900 kb、約0.1 kb～約400 kb、約0.1 kb～約200 kb、約0.1 kb～約100 kb、または、最大約1 Mb、最大約900 kb、最大約400 kb、最大約200 kb、もしくは、最大約100 kbであってもよい。特定の例では、欠失サイズは、約0.1～200、0.1～190、0.1～180、0.1～170、0.1～160、0.1～150、0.1～140、0.1～130、0.1～120、0.1～110、0.1～100、0.1～90、0.1～80、0.1～70、0.1～60、0.1～50、0.1～40、0.1～30、0.1～200、0.1～10、0.1～9、0.1～8、0.1～7、0.1～6、0.1～5、0.1～4、0.1～3、0.1～2、または、0.1～1 kbであってもよい。標的細胞クローン、例えば、標的胚性幹細胞クローン内における二対立遺伝子欠失（崩壊）効率（すなわち、二対立遺伝子欠失でスクリーニングしたクローンのパーセンテージ）は、約1～100%、1～90%、1～80%、1～70%、1～60%、1～50%、1～40%、1～30%、もしくは、1～27%であってもよく、または、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、もしくは、25%であってもよい。例えば、一実施形態では、欠失サイズは約50 kb以下であり、二対立遺伝子欠失効率は約1～30%または1～27%であるか、または、欠失サイズは約50 kbまたはそれより大きく（例えば、約50 kb～約200 kb）、二対立遺伝子欠失効率は約1～5%または1～3%である。1細胞期胚を標的とする実験において、1細胞期胚にCRISPR/Casを注入した後に産まれた生仔における二対立遺伝子欠失（崩壊）効率（すなわち、二対立遺伝子欠失を有する生仔のパーセンテージ）は、約1～100%、1～90%もしくは1～85%であってもよく、または、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%もしくは85%であってもよい。例えば、一実施形態では、欠失サイズは約50 kb以下であり、二対立遺伝子欠失効率は約1～85%または20～85%であるか、または、欠失サイズは約50 kbまたはそれより大きく（例えば、約50 kb～約100 kb）、二対立遺伝子欠失効率は約1～20

10

20

30

40

50

%または1～15%である。

【0287】

外来修復テンプレートを使用する方法では、例えば、挿入は5'標的配列と3'標的配列の間であってもよい。このような挿入は任意の長さであってもよい。例えば、挿入核酸は、例えば、約1bp～約5bp、約5bp～約10bp、約10bp～約50bp、約50bp～約100bp、約100bp～約200bp、約200bp～約300bp、約300bp～約400bp、約400bp～約500bp、約500bp～約1kb、約1kb～約5kb、約5kb～約10kb、約10kb～約20kb、約20kb～約40kb、約40kb～約60kb、約60kb～約80kb、約80kb～約100kb、約100kb～約150kb、約150kb～約200kb、約200kb～約250kb、約250kb～約300kb、約300kb～約350kb、約350kb～約400kb、約400kb～約450kb、約450kb～約500kbであってもよく、またはそれより長くてもよい。代替的に、挿入は、少なくとも1bp、少なくとも5bp、少なくとも10bp、少なくとも50bp、少なくとも100bp、少なくとも200bp、少なくとも300bp、少なくとも400bp、少なくとも500bp、少なくとも1kb、少なくとも5kb、少なくとも10kb、少なくとも20kb、少なくとも30kb、少なくとも40kb、少なくとも60kb、少なくとも80kb、少なくとも100kb、少なくとも150kb、少なくとも200kb、少なくとも250kb、少なくとも300kb、少なくとも350kb、少なくとも400kb、少なくとも450kb、または、少なくとも500kbであってもよい。

【0288】

標的遺伝子改変は、正確な改変または不正確な改変であってもよい。例えば、外来修復テンプレートを使用する方法では、欠失は、改変標的ゲノム遺伝子座に別の挿入または欠失（インデル）が存在しないように、欠失核酸が5'ホモロジーアームと3'ホモロジーアームの間の核酸配列のみからなる、正確な欠失であってもよい。同様に、自己抗原をコードする遺伝子の完全なコード領域に隣接する対のgRNAを使用する場合、第1のCasタンパク質開裂部位と第2のCasタンパク質開裂部位の間の欠失は、改変標的ゲノム遺伝子座に別の挿入または欠失（インデル）が存在しないように、欠失核酸が第1のCasタンパク質開裂部位と第2のCasタンパク質開裂部位の間の核酸配列のみからなる、正確な欠失であってもよい。外来修復テンプレートと目的の領域に隣接する対のgRNAの両方を使用する方法では、欠失は、上記の正確な欠失のいずれかであってもよい。代替的に、第1のCasタンパク質開裂部位と第2のCasタンパク質開裂部位の間の欠失は、非相同末端結合（NHEJ）による不正確な修復と一致し、改変ゲノム遺伝子座に別の欠失及び／または挿入をもたらす、第1及び第2のCasタンパク質開裂部位を越えてわたる不正確な欠失であってもよい。例えば、欠失は、第1及び第2のCasタンパク質開裂部位を越えて、約1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、200、300、400もしくは500bpまたはそれ以上にわたっていてもよい。同様に、改変ゲノム遺伝子座は、約1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、200、300、400もしくは500bpまたはそれ以上の挿入など、NHEJによる不正確な修復と一致する別の挿入を含んでいてもよい。CRISPR/Cas9と共に外来修復テンプレート（例えば、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ssODN））を使用することにより、NHEJではなく相同組換え修復を促進することによる正確な改変の可能性が高まり得る。

【0289】

標的改変は、標的ゲノム遺伝子座における配列（例えば、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部、例えば、自己抗原の特定の領域またはモチーフをコードする遺伝子の一部など）を、対応する相同配列またはオルソログス配列で置換することを含んでいてもよい。自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部を欠失させて、目的の外来抗原と自己抗原の間で共有されたエピトープを欠く対応する相同配列またはオルソログス配列で置換することにより、野生型自己抗原の機能を維持しているが目的の外来抗原上に存在し野

生型自己抗原と共有するエピトープを欠いている自己抗原の相同体またはオルソログの発現がもたらされ得る。代替的にまたは加えて、標的改変は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部）に1つまたは複数の点変異（例えば、1、2、3、4、5つまたはそれ以上）を含んでいてもよい。このような点変異は、例えば、目的の外来抗原と共有する自己抗原内の1つまたは複数のエピトープの発現を排除するように機能してもよい。任意選択的に、このような点変異は、コードポリペプチド内における保存的アミノ酸置換（例えば、アスパラギン酸 [Asp, D] のグルタミン酸 [Glu, E] への置換）をもたらし得る。このようなアミノ酸置換は、野生型自己抗原の機能を維持しているが目的の外来抗原上に存在し野生型自己抗原と共有するエピトープを欠いている自己抗原の発現をもたらし得る。

10

【0290】

本明細書に記載の方法は、二対立遺伝子改変、特にホモ接合性改変の頻度を促進及び増加させる。特に、標的ゲノム遺伝子座内の第1及び第2のガイドRNA認識配列を標的とする第1及び第2のガイドRNAと細胞を接触させることにより、一方のガイドRNA単独と細胞を接触させることと比較して、二対立遺伝子改変の生成効率を向上させることができる。二対立遺伝子改変の生成効率はまた、標的ゲノム遺伝子座内のガイドRNA認識配列を標的とする第1、第2及び第3のガイドRNA、または、標的ゲノム遺伝子座内のガイドRNA認識配列を標的とする第1、第2、第3及び第4のガイドRNAと細胞を接触させることにより向上させることができる。加えてまたは代替的に、二対立遺伝子改変、特にホモ接合性改変の生成効率は、標的ゲノム遺伝子座の全てまたは一部における相同染色体対の対応する第1の染色体と第2の染色体の間で配列同一性が最大化されるように、標的ゲノム遺伝子座を選択することにより向上させることができる。このような標的ゲノム遺伝子座を選択するための方法については、本明細書中の他の箇所に更に詳細に記載されている。

20

【0291】

標的遺伝子改変は二対立遺伝子改変であることが好ましい。二対立遺伝子改変は、対応する相同染色体（例えば、二倍体細胞内の）上の同一遺伝子座に同一改変が生成される事象、または、対応する相同染色体上の同一遺伝子座に異なる改変が生成される事象を含む。相同染色体（すなわち、相同染色体対）は、同一遺伝子座に同一遺伝子を有する場合により異なる対立遺伝子を有する染色体（例えば、減数分裂中に対となる染色体）を含む。用語「対立遺伝子」は、遺伝子配列の1つまたは複数の代替形態のうちのいずれかを含む。二倍体細胞または二倍体生物では、任意の配列における2つの対立遺伝子は通常、一對の相同染色体上の対応する遺伝子座を占めている。

30

【0292】

二対立遺伝子改変は標的遺伝子改変のホモ接合性をもたらし得る。ホモ接合性は、標的ゲノム遺伝子座の両方の対立遺伝子（すなわち、両方の相同染色体上の対応する対立遺伝子）が標的遺伝子改変を有する状態を含む。例えば、二対立遺伝子改変は、自己抗原をコードする遺伝子の全てまたは一部のホモ接合性欠失を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなってもよく、または、二対立遺伝子改変は、開始コドンがもはや機能しなくなるように、自己抗原をコードする遺伝子の開始コドンのホモ接合性破壊を含むか、それらから本質的になるか、または、それらからなってもよい。

40

【0293】

代替的に、二対立遺伝子改変は標的改変の複合ヘテロ接合性（例えば、ヘミ接合性）をもたらし得る。複合ヘテロ接合性は、標的遺伝子座の両方の対立遺伝子（すなわち、両方の相同染色体上の対立遺伝子）が改変されているが、それらは別々の方法で改変されている（例えば、一方の対立遺伝子における標的改変、またもう一方の対立遺伝子の不活性化または破壊）状態を含む。例えば、標的改変を伴わない対立遺伝子において、Casタンパク質により生成された二本鎖切断は、核酸配列の挿入または欠失を含む変異対立遺伝子が生成されることにより上記ゲノム遺伝子座の破壊がもたらされる非相同末端結合（NH E J）介在性DNA修復によって修復されていてもよい。例えば、二対立遺伝子改変は、

50

標的改変を伴う一方の対立遺伝子及び発現できないもう一方の対立遺伝子を細胞が有する場合、複合ヘテロ接合性をもたらし得る。複合ヘテロ接合性はヘミ接合性を含む。ヘミ接合性は、標的遺伝子座の1つの対立遺伝子のみ（すなわち、2つの相同染色体のうちの1つの染色体上の対立遺伝子）が存在している状態を含む。例えば、二対立遺伝子改変は、一方の対立遺伝子内で標的改変が生じてもう一方の対立遺伝子の対応する喪失または欠失が生じる場合、標的改変のヘミ接合性をもたらし得る。

【0294】

特定の例では、二対立遺伝子改変は、第1の相同染色体と第2の相同染色体のペア内における第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間またはCas開裂部位間のホモ接合性欠失を含んでいてもよい。代替的に、二対立遺伝子改変は、第1の相同染色体と第2の相同染色体のペア内における第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間またはCas開裂部位間の二対立遺伝子欠失を含んでいてもよい（すなわち、両方の染色体に欠失があるが、それぞれにおいて必ずしも同一欠失ではない）。欠失を同時に生じさせてもよく、または、第1の相同染色体内で最初に欠失を生じさせてから、例えば、遺伝子変換による相同組換えを介して第2の相同染色体内の1つまたは複数の二本鎖切断を修復するためのドナー配列として第1の相同染色体を使用する細胞を用いてホモ接合性を達成してもよい。

【0295】

別の特定の例では、二対立遺伝子改変は、第1の相同染色体と第2の相同染色体のペア内における標的遺伝子の開始コドン領域のホモ接合性破壊を含んでいてもよい。代替的に、第1の相同染色体と第2の相同染色体のペア内における標的遺伝子の開始コドン領域の二対立遺伝子破壊である（すなわち、両方の染色体に破壊があるが、それぞれにおいて必ずしも同一改変ではない）。改変を同時に生じさせてもよく、または、第1の相同染色体内で最初に改変を生じさせてから、例えば、遺伝子変換による相同組換えを介して第2の相同染色体内の1つまたは複数の二本鎖切断を修復するためのドナー配列として第1の相同染色体を使用する細胞を用いてホモ接合性を達成してもよい。

【0296】

ドナー配列（例えば、外来修復テンプレート）を使用する場合、二対立遺伝子改変は、第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間またはCas開裂部位間の欠失に加えて、第1の相同染色体と第2の相同染色体のペア内における5'標的配列と3'標的配列の間に核酸インサートの挿入を含んでいてもよく、それによって、ホモ接合性改変ゲノムがもたらされ得る。代替的に、二対立遺伝子改変は、5'標的配列と3'標的配列の間の欠失に加えて、第1の相同染色体と第2の相同染色体のペア内における5'標的配列と3'標的配列の間に核酸インサートの挿入を含んでいてもよく、それによって、ホモ接合性改変ゲノムがもたらされ得る。両方の染色体内で欠失と挿入を同時に生じさせてもよく、または、第1の相同染色体内で最初に欠失と挿入を生じさせてから、例えば、遺伝子変換による相同組換えを介して第2の相同染色体内の二本鎖切断（複数可）を修復するためのドナー配列として第1の相同染色体を使用する細胞を用いてホモ接合性を達成してもよい。例えば、いかなる特定の理論に制限されるものではないが、核酸インサートの挿入は第1の相同染色体内で生じてもよく（Casタンパク質による開裂を伴ってまたは伴わずに）、その後、第2の相同染色体上のCasタンパク質による開裂が促進する遺伝子変換事象により、第2の相同染色体が改変されてもよい。

【0297】

代替的に、外来修復テンプレートが核酸インサートを含まない5'及び3'ホモロジーアームを含む場合、二対立遺伝子改変は、第1の相同染色体と第2の相同染色体のペア内における5'標的配列と3'標的配列の間の欠失を含んでいてもよく、それによって、ホモ接合性改変ゲノムがもたらされ得る。両方の染色体内で欠失を同時に生じさせてもよく、または、第1の相同染色体内で最初に欠失を生じさせてから、例えば、遺伝子変換による相同組換えを介して第2の相同染色体内の二本鎖切断（複数可）を修復するためのドナー配列として第1の相同染色体を使用する細胞を用いてホモ接合性を達成してもよい。例

例えば、いかなる特定の理論に制限されるものではないが、欠失は第1の相同染色体内で生じてよく（Casタンパク質による開裂を伴ってまたは伴わずに）、その後、第2の相同染色体上のCasタンパク質による開裂が促進する遺伝子変換事象により、第2の相同染色体が改変されてもよい。

【0298】

第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間の欠失または5'標的配列と3'標的配列の間の欠失は、改変ゲノム標的遺伝子座に別の欠失または挿入が存在しないように、欠失核酸が第1のヌクレアーゼ開裂部位と第2のヌクレアーゼ開裂部位の間の核酸配列のみからなるまたは5'標的配列と3'標的配列の間の核酸配列のみからなる、正確な欠失であってもよい。第1のガイドRNA認識配列と第2のガイドRNA認識配列の間の欠失はまた、非相同末端結合（NHEJ）による不正確な修復と一致し、改変ゲノム遺伝子座に別の欠失及び／または挿入をもたらす、第1及び第2のヌクレアーゼ開裂部位を越えてわたる不正確な欠失であってもよい。例えば、欠失は、第1及び第2のCasタンパク質開裂部位を越えて、約1bp、約2bp、約3bp、約4bp、約5bp、約10bp、約20bp、約30bp、約40bp、約50bp、約100bp、約200bp、約300bp、約400bp、約500bpまたはそれ以上にわたっていてもよい。同様に、改変ゲノム遺伝子座は、NHEJによる不正確な修復と一致する別の挿入、例えば、約1bp、約2bp、約3bp、約4bp、約5bp、約10bp、約20bp、約30bp、約40bp、約50bp、約100bp、約200bp、約300bp、約400bp、約500bpまたはそれ以上の挿入を含んでいてもよい。

【0299】

外来修復テンプレートを使用して生成する標的挿入は、任意のサイズの標的挿入であってもよい。外来修復テンプレート内における核酸インサートの例及び核酸インサートのサイズの例については、本明細書中の他の箇所に記載されている。

【0300】

ホモ接合性標的遺伝子改変は、これらの改変（以下でより詳細に説明する）を用いた遺伝子組換え動物を作製するためのプロセスがより効率的かつより時間を要しないものとなり得るために、有利である。その欠如の影響を試験するために遺伝子を除去または破壊するような多くの状況において、標的遺伝子改変の単なるヘテロ接合性（すなわち、一方の対立遺伝子においては改変があり、もう一方の対立遺伝子では変化なし）は十分ではない。従来の標的化戦略では、大きな標的ゲノム欠失にヘテロ接合性なF0世代動物を得ることが可能となり得るが、欠失にホモ接合性なF1世代動物を作製するためには、それに続くそれらヘテロ接合性動物の交配が必要となる。これら追加の交配工程には費用と時間がかかる。標的遺伝子改変にホモ接合性なF0世代遺伝子組換え動物の作製が可能となることにより、必要な交配工程がより少なくなることによる大幅な効率獲得及び時間節約がもたらされる。

【0301】

H. 標的遺伝子改変を有する細胞の同定

本明細書で開示する方法は、改変標的核酸（例えば、改変ゲノム）を有する細胞を同定することを更に含んでいてもよい。様々な方法を使用して、標的遺伝子改変、例えば、欠失または挿入などを有する細胞を同定してもよい。このような方法は、標的ゲノム遺伝子座に標的遺伝子改変を有する1つの細胞を同定することを含んでいてもよい。スクリーニングを行って、改変ゲノム遺伝子座を有するこのような細胞を同定してもよい。

【0302】

スクリーニング工程は、親染色体の対立遺伝子の改変（MOA）を評価するための定量的アッセイ（例えば、対立遺伝子の喪失（LOA）及び／または対立遺伝子の獲得（GOA）アッセイ）を含んでいてもよい。例えば、定量的PCR、例えば、リアルタイムPCR（qPCR）などにより定量的アッセイを実施してもよい。リアルタイムPCRは、標的ゲノム遺伝子座を認識する第1のプライマーセット及び非標的参照遺伝子座を認識する第2のプライマーセットを利用していてもよい。プライマーセットは、増幅配列を認識す

る蛍光プローブを含んでいてもよい。

【0303】

ホモ接合性崩壊ES細胞クローンを同定するために、従来の方法と比較して効率及び精度がより優れたTAQMAN（登録商標）プローブqPCR戦略を使用してもよい。「中央」LOAアッセイ（例えば、図4のmTMプローブを参照のこと）を含みGOAアッセイがないことにより、1枚のqPCRプレートでホモ接合性崩壊対立遺伝子を同定してもよい。ES細胞クローンをスクリーニングするために使用する全てのアッセイがLOAアッセイであるため、任意の非マウスDNA標準物質を使用することなく、試験する全ての領域におけるコピー数を正確に算出することが可能となる。

【0304】

スクリーニング工程はまた保持アッセイを含んでいてもよく、その保持アッセイは、標的ゲノム遺伝子座への核酸インサートの正確な標的挿入と標的ゲノム遺伝子座の外側のゲノム位置への核酸インサートのランダム遺伝子組換え挿入を識別するために使用するアッセイである。正確な欠失と欠失の標的となる領域を越えてわたる欠失を識別するために保持アッセイをまた使用してもよい。標的改変をスクリーニングするための通常のアッセイ、例えば、ロングレンジPCRまたはサザンロットなどは、挿入標的化ベクターを標的遺伝子座に結合させる。しかしながら、LTVECは、その大きなホモロジーマムサイズにより、このような通常のアッセイによるスクリーニングを可能としない。LTVEC標的化をスクリーニングするために、対立遺伝子の喪失（LOA）及び対立遺伝子の獲得（GOA）アッセイを含む対立遺伝子の改変（MOA）アッセイを使用してもよい（例えば、US2014/0178879及びFriendewey et al. (2010) *Methods Enzymol.* 476:295-307を参照のこと（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる））。対立遺伝子の喪失（LOA）アッセイは通常のスクリーニング理論を逆転させたものであり、変異が誘導された天然遺伝子座のコピー数を定量するものである。正確に標的化された細胞クローンにおいて、LOAアッセイは2つの天然対立遺伝子（XまたはY染色体上ではない遺伝子の）の一方を検出し、もう一方の対立遺伝子は標的改変により破壊される。対立遺伝子の獲得（GOA）アッセイとして同一原理を逆に適用して、挿入標的化ベクターのコピー数を定量してもよい。例えば、GOAアッセイとLOAアッセイを併用することにより、天然標的遺伝子の1つのコピーを喪失し薬剤耐性遺伝子の1つのコピーまたはその他の挿入マーカーを獲得した、正確に標的化されたヘテロ接合性クローンが明らかとなる。

【0305】

一例として、対立遺伝子を定量する方法として定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）を使用してもよいが、標的遺伝子のゼロ、1及び2つのコピー間、または、核酸インサートのゼロ、1及び2つのコピー間の差異を確実に識別可能な任意の方法を使用して、MOAアッセイを開発してもよい。例えば、TAQMAN（登録商標）を使用して、特に、参照遺伝子と比較することにより、ゲノムDNA試料内におけるDNAテンプレートのコピー数を定量してもよい（例えば、US6,596,541を参照のこと（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる））。参照遺伝子は、標的遺伝子（複数可）または標的遺伝子座（複数の遺伝子座）として同一ゲノムDNA内で定量される。それゆえ、2つのTAQMAN（登録商標）増幅（それぞれはその対応するプローブを有する）を実施する。一方のTAQMAN（登録商標）プローブは参照遺伝子の「Ct」（閾値サイクル）を決定する一方で、もう一方のプローブは、正常な標的化（すなわち、LOAアッセイ）により置換される標的遺伝子（複数可）または標的遺伝子座（複数の遺伝子座）の領域のCtを決定する。Ctとは、TAQMAN（登録商標）プローブのそれぞれにおける開始DNAの量を反映する量のことであり、それはすなわち、配列がより豊富でないほど、閾値サイクルに達するのにより多くのPCRサイクルが必要になるということである。TAQMAN（登録商標）反応のテンプレート配列のコピー数を半分にまで減少させると、約1Ct単位増加することになる。標的遺伝子（複数可）または標的遺伝子座（複数の遺伝子座）の一方の対立遺伝子が相同組換えで置換された細胞における

10

20

30

40

50

T A Q M A N（登録商標）反応は、非標的細胞由来のDNAと比較した場合、参照遺伝子におけるCtの増加を伴わずに、標的T A Q M A N（登録商標）反応において1Ctの増加をもたらす。GOAアッセイでは、別のT A Q M A N（登録商標）プローブを使用して、正常な標的化により標的遺伝子（複数可）または標的遺伝子座（複数の遺伝子座）を置換する核酸インサートのCtを決定してもよい。

【0306】

対のgRNAが標的ゲノム遺伝子座に大きなCas媒介欠失を生成し得るために、LTVECによる正確な標的化を確認するための補完標準LOA及びGOAアッセイが有用となり得る（すなわち、1細胞期胚以外の細胞において）。例えば、LOA及びGOAアッセイ単独では、特に、GOAアッセイがLTVECインサート内の選択カセットに対するプローブを用いる場合、正確に標的化された細胞クローンと、標的ゲノム遺伝子座の大きなCas誘導欠失がゲノム内の他の箇所におけるLTVECのランダム導入と同時に起こるクローンを識別することは不可能である。標的細胞内における選択圧が選択カセットに基づいているために、ゲノム内の他の箇所におけるLTVECのランダム遺伝子組換え導入は通常、LTVECの選択カセット及び隣接領域を含むが、LTVECのより遠位の領域は除外される。例えば、LTVECの一部がゲノムにランダムに組み込まれ、3'ホモロジーマーに隣接した選択カセットを有する約5kb長またはそれ以上の長さの核酸インサートをそのLTVECが含む場合、通常は、5'ホモロジーマーではなく3'ホモロジーマーが選択カセットに遺伝子組換え的に組み込まれる。代替的に、選択カセットが5'ホモロジーマーに隣接する場合、通常は、3'ホモロジーマーではなく5'ホモロジーマーが選択カセットに遺伝子組換え的に組み込まれる。一例として、LOA及びGOAアッセイを使用してLTVECの標的導入を評価し、GOAアッセイが選択カセットに対するプローブを利用している場合、LTVECのランダム遺伝子組換え導入と組み合わせた標的ゲノム遺伝子座におけるヘテロ接合性欠失は、標的ゲノム遺伝子座におけるLTVECのヘテロ接合性標的導入と同一のリードアウトをもたらす。LTVECによる正確な標的化を確認するために、保持アッセイを単独で使用してもよく、または、LOAアッセイ及び／またはGOAアッセイと組み合わせて使用してもよい。

【0307】

保持アッセイは、5'標的配列（LTVECの5'ホモロジーマーに対応する）内及び／または3'標的配列（LTVECの3'ホモロジーマーに対応する）内におけるDNAテンプレートのコピー数を定量する。特に、選択カセットに隣接するホモロジーマーに対応する標的配列内におけるDNAテンプレートのコピー数を定量することが有用である。二倍体細胞では、2超のコピー数は通常、標的ゲノム遺伝子座においてではなく、標的ゲノム遺伝子座の外側においてLTVECがランダムに遺伝子組換え導入されていることを示し、望ましくない。正確に標的化されたクローンは2のコピー数を保有する。加えて、このような保持アッセイにおける2未満のコピー数は通常、欠失の標的となる領域を越えてわたる大きなCas媒介欠失を示し、これもまた望ましくない。

【0308】

二倍体細胞内の標的ゲノム遺伝子座における核酸インサートの標的挿入を識別するための例示的な保持アッセイでは、第1の標的配列にハイブリダイズする第1のホモロジーマーと第2の標的配列にハイブリダイズする第2のホモロジーマーに隣接する核酸インサートを含む大きな標的化ベクター（LTVEC）と接触したゲノムを有する細胞からDNAを最初に得るが、その核酸インサートは第1のホモロジーマーに隣接する選択カセットを含む。任意選択的に、選択カセットは薬剤耐性遺伝子を含んでいてもよい。その後、第1の標的配列内に結合するプローブ、核酸インサート内に結合するプローブ、及び、既知のコピー数を有する参照遺伝子内に結合するプローブにDNAを曝露するが、それぞれのプローブは結合時に検出可能なシグナルを発生させる。その後、プローブのそれぞれの結合に由来するシグナルが検出される。参照遺伝子プローブに由来するシグナルを第1の標的配列プローブに由来するシグナルと比較して第1の標的配列のコピー数を定量し、参照遺伝子プローブに由来するシグナルを核酸インサートプローブに由来するシグナルと

比較して核酸インサートのコピー数を定量する。1または2の核酸インサートコピー数及び2の第1の標的配列コピー数は通常、標的ゲノム遺伝子座における核酸インサートの標的挿入を示し、また1またはそれ以上の核酸インサートコピー数及び3またはそれ以上の第1の標的配列コピー数は通常、標的ゲノム遺伝子座以外のゲノム遺伝子座における核酸インサートのランダム挿入を示す。

【0309】

第1の標的配列プローブの結合由来のシグナルを使用して第1の標的配列の閾値サイクル(Ct)値を決定してもよく、参照遺伝子プローブの結合由来のシグナルを使用して参照遺伝子の閾値サイクル(Ct)値を決定してもよく、また第1の標的配列Ct値と参照遺伝子Ct値を比較することにより第1の標的配列のコピー数を定量してもよい。同様に、核酸インサートプローブの結合由来のシグナルを使用して核酸インサートの閾値サイクル(Ct)値を決定してもよく、また第1の標的配列Ct値と参照遺伝子Ct値を比較することにより核酸インサートのコピー数を定量してもよい。

10

【0310】

L T V E C内の核酸インサートは、例えば、少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450または500 kbであってもよい。第1の標的配列及び選択カセット内においてプローブが結合する配列間の距離は、例えば、100ヌクレオチド、200ヌクレオチド、300ヌクレオチド、400ヌクレオチド、500ヌクレオチド、600ヌクレオチド、700ヌクレオチド、800ヌクレオチド、900ヌクレオチド、1 kb、1.5 kb、2 kb、2.5 kb、3 kb、3.5 kb、4 kb、4.5 kbまたは5 kb以下であってもよい。

20

【0311】

このような方法は、第2の標的配列のコピー数を定量するための別の保持アッセイを更に含んでもよい。例えば、このような方法は、第2の標的配列に結合するプローブに細胞のDNAを曝露すること、第2の標的配列プローブの結合由来のシグナルを検出すること、及び、参照遺伝子プローブに由来するシグナルを第2の標的配列プローブ由来のシグナルと比較して第2の標的配列のコピー数を定量すること、を更に含んでもよい。

【0312】

同様に、このような方法は、核酸インサート内における1つまたは複数の別の配列のコピー数を定量するための別のG O Aアッセイを更に含んでもよい。例えば、このような方法は、核酸インサートに結合する1つまたは複数の別のプローブに細胞のDNAを曝露すること、1つまたは複数の別のプローブの結合由来のシグナルを検出すること、及び、参照遺伝子プローブに由来するシグナルを1つまたは複数の別の核酸インサートプローブ由来のシグナルと比較して核酸インサート内における1つまたは複数の別の配列のコピー数を定量すること、を更に含んでもよい。

30

【0313】

同様に、標的ゲノム遺伝子座から内在配列を欠失させるようにL T V E Cを設計する場合または対のgRNAを使用する場合(例えば、単一ゲノム標的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して内在配列を欠失させるために)、このような方法は、標的ゲノム遺伝子座における内在配列のコピー数を定量するためのL O Aアッセイを更に含んでもよい。例えば、このような方法は、標的ゲノム遺伝子座における内在配列に結合するプローブに細胞のDNAを曝露すること、内在配列プローブの結合由来のシグナルを検出すること、及び、参照遺伝子プローブに由来するシグナルを内在配列プローブ由来のシグナルと比較して内在配列のコピー数を定量すること、を更に含んでもよい。

40

【0314】

対のgRNAは使用するが外来修復テンプレートは必ずしも使用しない実験に、保持アッセイをまた使用してもよい。対のgRNAが標的ゲノム遺伝子座に大きなCas媒介欠失を生成し得るために、NHEJ修復後のインデルに起因する、欠失の標的となる領域を

50

越えてわたる欠失ではなく、対の gRNA による正確な標的欠失を確認するための補完標準 LOA アッセイが有用となり得る。

【0315】

保持アッセイは、第1のガイドRNA認識配列を含む及び／または第1のガイドRNA認識配列の上流の領域（すなわち、5'ガイドRNA認識配列）内、及び／または、第2のガイドRNA認識配列を含む及び／または第2のガイドRNA認識配列の下流及び第2のガイドRNA認識配列に隣接する領域（すなわち、3'ガイドRNA認識配列）内における、DNAテンプレートのコピー数を定量する。二倍体細胞では、1未満のコピー数は、欠失の標的となる領域を越えてわたる大きなNHEJ介在性欠失を示し、望ましくない。正確に標的化されたクローンは2のコピー数を保有する。コピー数を定量するためのプローブは、例えば、ガイドRNA認識配列の約100ヌクレオチド、200ヌクレオチド、300ヌクレオチド、400ヌクレオチド、500ヌクレオチド、600ヌクレオチド、700ヌクレオチド、800ヌクレオチド、900ヌクレオチド、1 kb、1.5 kb、2 kb、2.5 kb、3 kb、3.5 kb、4 kb、4.5 kb または 5 kb 以内であってもよい。

【0316】

好適な定量的アッセイのその他の例としては、蛍光による *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)、比較ゲノムハイブリダイゼーション、等温DNA増幅、固定化プローブ（複数可）への定量的ハイブリダイゼーション、INVADER（登録商標）プローブ、TAQMAN（登録商標）Molecular Beacon プローブ、または、ECLIPSE（商標）プローブ技術が挙げられる（例えば、US 2005/0144655を参照のこと（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる））。標的改変をスクリーニングするための通常のアッセイ、例えば、ロングレンジPCR、サザンブロットまたはサンガーシーケンシングなども使用可能である。このようなアッセイは通常、挿入標的化ベクターと標的ゲノム遺伝子座の間の結合のエビデンスを得るために使用される。例えば、ロングレンジPCRアッセイにおいて、一方のプライマーは挿入DNA内の配列を認識する一方で、もう一方は標的化ベクターのホモロジーアームの末端を越える標的ゲノム遺伝子座配列を認識することができる。

【0317】

スクリーニング、特に改変した1細胞期胚に、次世代シーケンシング (NGS) もまた使用可能である。次世代シーケンシングは、「NGS」、「超並列シーケンシング」または「ハイスループットシーケンシング」と呼ばれることもある。このようなNGSは、スクリーニングツールに加え、標的遺伝子改変の正確な内容を明確にするための、またモザイク現象を検出するためのMOAアッセイ及び保持アッセイとして使用可能である。モザイク現象とは、単一の受精卵（すなわち、接合体）から発生した1つの個体内に異なる遺伝子型を有する2つまたはそれ以上の細胞集団が存在することを意味する。本明細書で開示する方法において、選択マーカーを使用して標的クローンをスクリーニングすることは必須ではない。例えば、本明細書に記載するMOA及びNGSアッセイは、選択カセットを使用することなく信頼可能である。

【0318】

目的の外来抗原と相同であるまたは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の発現を抑制または排除するために、標的細胞をまたスクリーニングしてもよい。例えば、自己抗原がタンパク質である場合、例えば、ウェスタンブロット解析またはタンパク質免疫染色を含むタンパク質発現をアッセイするための任意の周知の技術を用いて、発現を評価してもよい。

【0319】

III. 遺伝子組換え非ヒト動物の作製方法

本明細書で開示する様々な方法を使用して遺伝子組換え非ヒト動物を作製してもよい。本明細書に記載の方法を含む遺伝子組換え生物を作製するための任意の簡便な方法またはプロトコルは、このような遺伝子組換え非ヒト動物を作製するのに適している。胚性幹（

ES)細胞などの多能性細胞を遺伝子組換えすることから始めるこのような方法は通常、(1)本明細書に記載の方法を使用して、1細胞期胚ではない多能性細胞のゲノムを改変すること、(2)遺伝子組換え多能性細胞を同定または選択すること、(3)遺伝子組換え多能性細胞を宿主胚へと導入すること、及び(4)遺伝子組換え多能性細胞を含む宿主胚を代理母に移植して妊娠させること、を含む。そのため、代理母は、標的遺伝子改変を含み生殖細胞系を介して標的遺伝子改変を遺伝させることが可能なF0世代非ヒト動物を産むことができる。本明細書に記載の対立遺伝子の改変(MOA)アッセイにより、遺伝子組換えゲノム遺伝子座を持つ動物を同定してもよい。任意の期、例えば、胚盤胞期または前桑実胚期(すなわち、4細胞期または8細胞期)などに、ドナー細胞を宿主胚に導入してもよい。生殖細胞系を介して遺伝子改変を遺伝させることが可能な後代を生成する。多能性細胞は、例えば、本明細書中の他の箇所に記載のES細胞(例えば、げっ歯類ES細胞、マウスES細胞、またはラットES細胞)であってもよい。例えば、米国特許番号7,294,754を参照されたい(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

10

【0320】

代替的に、1細胞期胚を遺伝子組換えすることから始めるこのような方法は通常、(1)本明細書に記載の方法を使用して、1細胞期胚のゲノムを改変すること、(2)遺伝子組換え胚を同定または選択すること、及び(3)遺伝子組換え胚を代理母に移植して妊娠させること、を含む。そのため、代理母は、標的遺伝子改変を含み生殖細胞系を介して標的遺伝子改変を遺伝させることが可能なF0世代非ヒト動物を産むことができる。本明細書に記載の対立遺伝子の改変(MOA)アッセイにより、遺伝子組換えゲノム遺伝子座を持つ動物を同定してもよい。

20

【0321】

核移植技術も使用して非ヒト哺乳動物を作製してもよい。要約すると、核移植をするための方法は、以下の工程、(1)卵母細胞を摘出するまたは摘出卵母細胞を提供する工程、(2)摘出卵母細胞と混合するドナー細胞またはドナー核を単離または提供する工程、(3)細胞または核を摘出卵母細胞に挿入して再構成細胞を生成する工程、(4)再構成細胞を非ヒト動物の子宮に移植して胚を形成させる工程、及び(5)胚を成長させる工程、を含んでもよい。このような方法では、卵母細胞は通常、死亡した動物から取り出される(卵母細胞は生きている動物の卵管及び／または卵巣のいずれかからも単離可能ではあるが)。当業者に周知の様々な培地で卵母細胞を成熟させてから除核してもよい。当業者に周知の多数の方法で卵母細胞の除核を実施してもよい。ドナー細胞またはドナー核を摘出卵母細胞に挿入して再構成細胞を生成することは、ドナー細胞を透明帯の下にマイクロインジェクションしてから融合することにより行ってもよい。接触／融合面全体にDC電気パルスを加えること(電気融合)により、ポリエチレングリコールなどの融合促進化学物質に細胞を曝露させることにより、または、センダイウイルスなどの不活化ウイルスを介することにより、融合を誘導してもよい。核ドナーとレシピエント卵母細胞を融合する前、その間、及び／または、その後に、電気的方法及び／または非電気的方法により再構成細胞を活性化させてもよい。活性化方法としては、電気パルス、化学誘発性ショック、精子による貫入、卵母細胞内における二価カチオン濃度を上昇させること、及び卵母細胞内における細胞タンパク質のリン酸化を抑制すること(キナーゼ阻害剤により)、が挙げられる。活性化させた再構成細胞または胚を当業者に周知の培地で培養してから動物の子宮に移植してもよい。例えば、US2008/0092249、WO1999/005266、US2004/0177390、WO2008/017234、及びUS特許番号7,612,250を参照されたい(それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

30

40

【0322】

本明細書で提供する様々な方法により遺伝子組換え非ヒトF0動物の作製が可能となり、その遺伝子組換えF0動物の細胞は標的遺伝子改変を含む。F0動物を作製するために使用する方法に応じて、F0動物内における標的遺伝子改変を有する細胞の数は変化し得

50

るということを理解されたい。例えば、VELOCIMOUSE（登録商標）法を用いて、ドナーES細胞を対応する生物由来の前桑実胚期胚（例えば、8細胞期マウス胚）に導入することにより、F0動物におけるより高いパーセンテージの細胞集団に標的遺伝子改変を有する細胞を含ませることが可能となる。例えば、非ヒトF0動物の細胞寄与の少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、85%、86%、87%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%を占める細胞は、標的遺伝子改変を有する細胞集団を含むことができる。加えて、F0動物における胚細胞のうちの少なくとも1つまたは複数に標的遺伝子改変を有し得る。

【0323】

A. 非ヒト動物と細胞のタイプ

本明細書で提供する方法では、非ヒト動物ならびに非ヒト動物由来の細胞及び胚を使用する。このような非ヒト動物は、哺乳動物、例えば、げっ歯類（例えば、ラット、マウス及びハムスター）などであることが好ましい。その他の非ヒト哺乳動物としては、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、サル、類人猿、ネコ、イヌ、ウサギ、ウマ、雄ウシ、シカ、バイソン、家畜類（例えば、雌ウシ、去勢ウシなどのウシ種；例えば、ヒツジ、ヤギなどのヒツジ種；ならびに、ブタ及びイノシシなどのブタ種）が挙げられる。用語「非ヒト」はヒトを除外する。本明細書で提供する一部の方法では、非ヒト動物ならびに非ヒト動物由来の細胞及び胚はハイブリッドである。

【0324】

本明細書で提供する方法に用いる非ヒト動物細胞は、例えば、全能性細胞または多能性細胞（例えば、げっ歯類ES細胞、マウスES細胞またはラットES細胞などの胚性幹（ES）細胞）であってもよい。全能性細胞は任意の細胞型を生じ得る未分化細胞を含み、また多能性細胞は、2種以上の分化細胞型への分化能を有する未分化細胞を含む。このような多能性及び／または全能性細胞は、例えば、人工多能性幹（iPS）細胞などのES細胞またはES様細胞であってもよい。ES細胞は、胚に導入する際に分化胚の任意の組織をもたらすことが可能な、胚から誘導した全能性または多能性細胞を含む。ES細胞は胚盤胞の内細胞塊から誘導することができ、3種類の脊椎動物胚葉（内胚葉、外胚葉及び中胚葉）のいずれかの細胞へと分化させることができる。

【0325】

本明細書で提供する方法に用いる非ヒト動物細胞としてはまた、1細胞期胚（すなわち、受精卵母細胞または接合体）を挙げることができる。1細胞期胚は、2つの配偶子間の受精事象により形成された真核細胞である。このような1細胞期胚は、任意の遺伝的背景（例えば、BALB/c、C57BL/6、129、またはこれらの組み合わせ）に由来していてもよく、新鮮または凍結であってもよく、また自然交配または体外受精に由来していてもよい。

【0326】

本明細書で提供する方法に用いるマウス及びマウス細胞は、例えば、129系統、C57BL/6系統、BALB/c系統、Swiss Webster系統、129系統とC57BL/6系統のミックス、BALB/c系統とC57BL/6系統のミックス、129系統とBALB/c系統のミックス、及び、BALB/c系統とC57BL/6系統と129系統のミックス由来であってもよい。例えば、本明細書で提供する方法に用いるマウスまたはマウス細胞は、少なくとも部分的にBALB/c系統に由来していてもよい（例えば、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、BALB/c系統に由来している、または、約25%、約50%、約75%または約100%、BALB/c系統に由来している）。1つの例では、マウスまたはマウス細胞は、50% BALB/c、25% C57BL/6、及び25% 129を含む株を有していてもよい。代替的に、マウスまたはマウス細胞は、BALB/cを除く系統またはBALB/cを除く系統の組み合わせを含んでいてもよい。このようなマウスでは、目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質の十分なレパートリーを産生するのにBALB/c背景は必要とされ

10

20

30

40

50

ない。

【0327】

129系統の例としては、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1（例えば、129S1/SV、129S1/Sv1m）、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6（129/SvEvTac）、129S7、129S8、129T1及び129T2が挙げられる。例えば、Festing et al. (1999) Mammalian Genome 10 (8) : 836を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。C57BL系統の例としては、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/Kal_uW_N、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr及びC57BL/Olaが挙げられる。本明細書で提供する方法に用いるマウス及びマウス細胞はまた、上記129系統と上記C57BL/6系統のミックス（例えば、50% 129、50% C57BL/6）由来であってもよい。同様に、本明細書で提供する方法に用いるマウス及びマウス細胞は、上記129系統のミックスまたは上記BL/6系統のミックス（例えば、129S6（129/SvEvTac）系統）由来であってもよい。マウスES細胞の特定の例はVG F1マウスES細胞である。雌C57BL/6NTacマウスと雄129S6/SvEvTacマウスを掛け合わせるにより作製したハイブリッド胚からVG F1マウスES細胞（F1H4としても周知）を誘導した。例えば、Auerbach et al. (2000) Biotechniques 29, 1024-1028を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

【0328】

本明細書で提供する方法に用いるマウス及びマウス細胞はまた、MHCハプロタイプの任意の組み合わせを有していてもよい。MHC分子の機能は、外来ペプチドフラグメントに結合して、適切なT細胞に認識されるようにそれらを細胞表面上に提示することである。例えば、マウス及びマウス細胞は、MHC^bハプロタイプ（例えば、C57BL/6）、MHC^dハプロタイプ（例えば、BALB/c）を含んでいてもよく、または、MHC^bとMHC^dの両方（例えば、C57BL/6とBALB/cの組み合わせ）を含んでいてもよい。このようなMHCを組み合わせることにより、抗体価の上昇をもたらすことができる。

【0329】

本明細書で提供する方法に用いるラットまたはラット細胞は、例えば、ACIラット系統、Dark Agouti (DA) ラット系統、Wistarラット系統、LEAラット系統、Sprague Dawley (SD) ラット系統、または、Fisher F344もしくはFisher F6などのFischerラット系統を含む、任意のラット系統由来であってもよい。ラットまたはラット細胞はまた、上で列挙した2種またはそれ以上の系統のミックスに由来する系統から得ることができる。例えば、ラットまたはラット細胞は、DA系統またはACI系統由来であってもよい。ACIラット系統は、黒色のアグーチ、白色の腹部及び脚部、ならびにRT1^{av1}ハプロタイプを有することを特徴とする。このような系統は、Harlan Laboratoriesを含む様々な供給業者から入手可能である。ACIラット由来のラットES細胞株の一例は、ACI.G1ラットES細胞である。Dark Agouti (DA) ラット系統は、アグーチ毛及びRT1^{av1}ハプロタイプを有することを特徴とする。このようなラットは、Charles River及びHarlan Laboratoriesを含む様々な供給業者から入手可能である。DAラット由来のラットES細胞株の例は、DA.2BラットES細胞株及びDA.2CラットES細胞株である。一部の例においては、ラットまたはラット細胞は近交系ラット系統由来である。例えば、US2014/0235933A1を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。その他の例においては、ラットまたはラット細胞はハイブリッドラット系統由来である。

【0330】

宿主胚に移植された細胞を「ドナー細胞」と呼ぶ場合もある。ドナー細胞は、宿主胚と同一株由来であってもよく、または、異なる株由来であってもよい。同様に、代理母は、ドナー細胞及び／または宿主胚と同一株由来であってもよく、または、代理母は、ドナー細胞及び／または宿主胚とは異なる株由来であってもよい。

【0331】

本明細書で開示する方法及び組成物に様々な宿主胚を用いてもよい。例えば、ドナー細胞（例えば、ドナーES細胞）を対応する生物由来の前桑実胚期胚（例えば、8細胞期胚）に導入してもよい。例えば、US7,576,259;US7,659,442;US7,294,754;及びUS2008/0078000を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。その他の方法では、2細胞期、4細胞期、8細胞期、16細胞期、32細胞期または64細胞期の宿主胚にドナー細胞を移植してもよい。宿主胚はまた胚盤胞であってもよく、あるいは、前胚盤胞胚、前桑実胚期胚、桑実胚期胚、未融合桑実胚期胚、または、融合桑実胚期胚であってもよい。マウス胚を用いる場合、宿主胚の期は、Theiler (1989) "The House Mouse: Atlas of Mouse Development," Springer-Verlag, New York (その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる) に記載されているTheiler Stagesを参照すると、Theiler Stage 1 (TS1)、TS2、TS3、TS4、TS5及びTS6であってもよい。例えば、Theiler Stageは、TS1、TS2、TS3及びTS4から選択することができる。一部の方法では、宿主胚は透明帯を含み、ドナー細胞は、透明帯の穴を通して宿主胚に導入されたES細胞である。その他の方法では、宿主胚は帯のない胚である。更にその他の方法では、桑実胚期の宿主胚は凝集している。

【0332】

B. 抗原結合タンパク質を産生するための非ヒト動物

本明細書で提供する方法に使用する非ヒト動物は、抗原結合タンパク質を産生可能な任意の非ヒト動物、例えば、哺乳動物、げっ歯類、ラットまたはマウスなどであってもよい。例えば、抗体産生を最適化するように遺伝子組換えされた非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）を使用してもよい。このような非ヒト動物は、ヒト用医薬品として使用可能な抗体の大規模産生を促進するように遺伝子改変された非ヒト動物であってもよく、ヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含む非ヒト動物を含む。例えば、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）は、以下の改変、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）重鎖可変領域遺伝子座の全てまたは一部がヒト重鎖可変遺伝子座に置換されている、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）カッパ軽鎖可変領域遺伝子座の全てまたは一部がヒトカッパ軽鎖可変領域遺伝子座に置換されている、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）ラムダ軽鎖可変領域遺伝子座の全てまたは一部がヒトラムダ軽鎖可変領域遺伝子座に置換されている、及び、重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子座の全てがそのヒト相同体またはオルソログに置換されている、のうちの1つまたは複数をその生殖細胞系内に含んでもよい。非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）はまた、以下の改変、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）が非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）定常ドメインに融合したヒト可変ドメインを含むB細胞または抗体を産生するように、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）定常領域核酸配列と機能的に連結した完全ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子座、あるいは、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）が非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）定常領域に融合したヒト可変ドメインを含むB細胞または抗体を産生するように、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）定常領域核酸配列と機能的に連結したヒト重鎖及び／または軽鎖可変領域、のうちの1つまたは複数をそれらの生殖細胞系内に含んでもよい。一例として、VELOCIMMUNE（登録商標）マウスを使用してもよい。例えば、US6,596,541、US8,791,

10

20

30

40

50

323、US8,895,802、US8,895,801、US7,105,348、
US2002/0106629、US2007/0061900、US2011/025
8710、US2011/0283376、US2013/0210137、US201
4/0017781、US2014/0020124、US2014/0020125、
US2014/0017782、US2014/0018522、US2014/003
3337、US2014/0033336、US2014/0041068、US201
4/0073010、US2014/0023637、US2014/0017238、
US2014/0013457、US2014/0017229、US2002/018
3275、US8,502,018、US2012/0322108、US2013/0
254911、US2014/0213773、US2015/0201589、US2
015/0210776、US2014/0017228、US8,642,835、U
S8,697,940、及びMurphy et al. (2014) Proc. Natl
. Acad. Sci. U. S. A. 111 (14) : 5153-5158を参照されたい
(それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)
。VELOCIIMMUNE (登録商標) マウスは、対応するヒト免疫グロブリン可変領域
を内在遺伝子座に有するマウス免疫グロブリン重鎖 (IgH) とマウス免疫グロブリン軽
鎖 (例えば、κ軽鎖、Igκ) をコードする生殖細胞系可変領域の正確で大規模な置換を
含んでいる。この正確な置換により、重鎖及び軽鎖にヒト可変領域とマウス定常領域を持
たせたハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスがもたらされる。マウスV_H
-D_H-J_HセグメントとマウスV_κ-J_κセグメントを正確に置換することにより、ハイ
ブリッド免疫グロブリン遺伝子座において隣接するマウス配列がインタクトかつ機能的
に維持される。そのマウスの液性免疫機構は、野生型マウスの液性免疫機構と同様に機能
する。抗原誘発後のマウスにおいて、あらゆる重要な点でもB細胞の発生は妨げられず、
多様性に富んだヒト可変領域が生成される。

【0333】

上記の非ヒト動物 (例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類) (例えば、VELO
CIIMMUNE (登録商標) マウス) はまた、非ヒト動物 (例えば、ラットまたはマウス
などのげっ歯類) ADAM6 遺伝子、またはその相同体、オルソログもしくは機能性フラ
グメントをコードする機能性異所核酸配列をそれらの生殖細胞系内に含んでいてもよい。
例えば、このような非ヒト動物 (例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類) は、機能
性内在ADAM6 遺伝子を欠いて、非ヒト動物 (例えば、ラットまたはマウスなどのげっ
歯類) ADAM6 機能の喪失を補うための機能性異所核酸配列を含んでいてもよい。例え
ば、機能性異所配列は、1つまたは複数のAdam6 遺伝子、例えば、マウスAdam6
a 遺伝子、マウスAdam6 b 遺伝子、または、Adam6 a 遺伝子とAdam6 b 遺伝
子の両方を含んでいてもよい。異所性核酸配列は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座または他の
位置に存在していてもよい。例えば、US2012/0322108 ; US2013/0
254911 ; US2014/0213773 ; US2015/0201589 ; US2
015/0210776 ; US2014/0017228 ; 及び、US2013/019
8879を参照されたい (それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本
明細書に組み込まれる)。

【0334】

使用可能なその他の非ヒト動物 (例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類) として
は、ヒト軽鎖可変ドメインの限定的なレパートリー、または、ヒト軽鎖可変領域遺伝子セ
グメントの限定的なレパートリー由来の単一ヒト軽鎖可変ドメインを発現するように遺伝
子組換えされた非ヒト動物 (例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類) が挙げられる
。このような非ヒト動物は「ユニバーサル軽鎖」または「共通軽鎖」を産生し、二重特異
性抗体の作製に有用であり得る。例えば、US2011/0195454 ; US2012
/0021409 ; US2012/0192300 ; US2015/0059009 ; U
S2013/0045492 ; US2013/0198880 ; US2013/0185
821 ; US2013/0302836 ; US2013/0247234 ; US2014

10

20

30

40

50

／0329711；及び、US2013／0198879を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。例えば、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）は、再構成されて、単一軽鎖を発現する（または2つの軽鎖の一方または両方を発現する）再構成ヒト軽鎖可変領域遺伝子（または2つの再構成軽鎖可変領域遺伝子）を形成する、単一の非再構成ヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント（または2つのヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント）を含むように遺伝子組換えされてもよい。再構成ヒト軽鎖可変ドメインは、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）により選択された複数の親和性成熟ヒト重鎖とペアとなることが可能であり、重鎖可変領域は異なるエピトープに特異的に結合する。

【0335】

軽鎖選択肢の限定的なレパートリーを得るために、天然非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）軽鎖可変ドメインを生成または再構成するその機能が非機能性または実質的に非機能性となるように、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）を遺伝子改変してもよい。このことは、例えば、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）の軽鎖可変領域遺伝子セグメントを欠失させることにより達成可能である。その後、外来ヒト可変領域遺伝子セグメントが再構成されて内在非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）軽鎖定常領域遺伝子と組換えを起こし再構成リバースキメラ軽鎖遺伝子（ヒト可変、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）定常）を生成するような方法で、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）軽鎖定常領域と機能的に連結した、選択した外来で好適なヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントにより、内在非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）遺伝子座を改変してもよい。

【0336】

上記の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）（例えば、「ユニバーサル軽鎖」または「共通軽鎖」）はまた、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）ADAM6遺伝子、またはその相同体、オルソログもしくは機能性フラグメントをコードする機能性異所核酸配列をそれらの生殖細胞系内に含んでもよい。同様に、本明細書に記載するその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）のいずれかはまた、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）ADAM6遺伝子、またはその相同体、オルソログもしくは機能性フラグメントをコードする機能性異所核酸配列をそれらの生殖細胞系内に含んでもよい。例えば、このような非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）は、機能性内在ADAM6遺伝子を欠いて、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）ADAM6機能の喪失を補うための機能性異所核酸配列を含んでもよい。異所性核酸配列は、ヒト重鎖可変領域遺伝子座または他の位置に存在していてもよい。例えば、US2012／0322108；US2013／0254911；US2014／0213773；US2015／0201589；US2015／0210776；US2014／0017228；及び、US2013／0198879を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

【0337】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、重鎖定常領域核酸配列と機能的に連結した非再構成軽鎖Vセグメント及び非再構成Jセグメントをその生殖細胞系内に含む非ヒト動物が挙げられる。例えば、US2012／0096572、US2014／0130194、及びUS2014／0130193を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような非ヒト動物の1つの例は、内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖遺伝子座における全ての機能性内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖可変（V_H）遺伝子セグメント、全ての機能性内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖多様性（D_H）遺伝子セグメント、及び、全ての機能性内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖結合（J_H）遺伝子セグメントの、複数の非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変（V_K）遺伝子セグメント及び複数

10

20

30

40

50

の非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖結合 (J_K) 遺伝子セグメントを含み内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖定常 (C_H) 領域と機能的に連結したヌクレオチド配列への置換を含む改変内在免疫グロブリン重鎖遺伝子座、をその生殖細胞系ゲノムが含む非ヒト動物であり、複数の非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖 V 遺伝子セグメント及び複数の非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖 J 遺伝子セグメントは、B細胞の発生中にB細胞内において再構成に関与し、改変内在重鎖遺伝子座において内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖 C_H 領域と機能的に連結した再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖 V_K / J_K 遺伝子配列を形成する。このような非ヒト動物の別の例は、内在非ヒト動物重鎖遺伝子座において内在非ヒト動物重鎖定常領域と機能的に連結した第1の非再構成ヒトカッパ軽鎖可変 (V_K) 遺伝子セグメント及び非再構成ヒトカッパ軽鎖結合 (J_K) 遺伝子セグメントをその生殖細胞系内に含む非ヒト動物であり、第1の非再構成ヒト V_K 遺伝子セグメント及び非再構成ヒト J_K 遺伝子セグメントは、全ての機能性内在非ヒト動物重鎖可変 (V_H) 遺伝子セグメント、全ての機能性内在非ヒト動物多様性 (D_H) 遺伝子セグメント、及び、全ての機能性内在非ヒト動物重鎖結合 (J_H) 遺伝子セグメントを置換し、第1の非再構成ヒト V_K 遺伝子セグメント及び非再構成ヒト J_K 遺伝子セグメントは再構成に関与し、非ヒト動物における内在非ヒト動物重鎖定常領域と機能的に連結した再構成 V_K / J_K 配列を形成し、非ヒト動物は更に、非ヒト動物軽鎖定常遺伝子と機能的に連結した第2のヒト軽鎖可変 (V_L) 遺伝子セグメント及びヒト軽鎖結合 (J_L) 遺伝子セグメントをその生殖細胞系内に含む。このような非ヒト動物の更に別の例は、(a) 改変されて、内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖遺伝子座における全ての機能性内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖可変 (V_H) 遺伝子セグメント、全ての機能性内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖多様性 (D_H) 遺伝子セグメント、及び、全ての機能性内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖結合 (J_H) 遺伝子セグメントの、第1の複数の非再構成ヒト軽鎖可変 (V_K) 遺伝子セグメント及び第1の複数の非再構成ヒト軽鎖結合 (J_K) 遺伝子セグメントへの置換を含む内在免疫グロブリン重鎖遺伝子座 (第1の複数の非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖 V_K 及び J_K 遺伝子セグメントは、内在免疫グロブリン重鎖遺伝子座において内在重鎖定常 (C_H) 領域核酸配列と機能的に連結し、B細胞の発生中にB細胞内において再構成に関与し、内在非ヒト動物 C_H 領域核酸配列と機能的に連結した第1の再構成ヒト軽鎖 V_K / J_K 遺伝子配列を生成する)、及び (b) 内在非ヒト動物軽鎖遺伝子座において内在非ヒト動物軽鎖定常 (C_K) 領域核酸配列と機能的に連結した第2の複数の非再構成ヒト軽鎖可変 (V_K) 遺伝子セグメント及び第2の複数の非再構成ヒト軽鎖結合 (J_K) 遺伝子セグメントを含む改変免疫グロブリン軽鎖遺伝子座 (第2の複数の非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖 V_K 及び J_K 遺伝子セグメントは、内在鎖遺伝子座において全ての機能性内在非ヒト動物軽鎖可変 (V_K) 遺伝子セグメント及び全ての機能性内在非ヒト動物軽鎖結合 (J_K) 遺伝子セグメントを置換し、B細胞の発生中にB細胞内において再構成に関与し、内在非ヒト動物 C_K 領域核酸配列と機能的に連結した第2の再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖 V_K / J_K 領域遺伝子配列を形成する)、をそのゲノムが含む非ヒト動物である。

【0338】

使用可能なその他の非ヒト動物 (例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類) としては、内在非ヒト動物免疫グロブリン定常領域遺伝子配列と機能的に連結した再構成ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域ヌクレオチド配列を含む免疫グロブリン重鎖遺伝子座をその生殖細胞系ゲノム内に含む非ヒト動物が挙げられる。例えば、US 2015/0020224、US 2014/0245468、US 2016/0100561、US 9,204,624、及び US 14/961,642 を参照されたい (それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。このような非ヒト動物の1つの例は、内在重鎖定常領域遺伝子配列と機能的に連結した再構成ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域ヌクレオチド配列を内在免疫グロブリン重鎖遺伝子座におけるその生殖細胞系ゲノム内に含む非ヒト動物であり、再構成重鎖可変領域ヌクレオチド配列は $V_H 3-23 / X_1 X_2 / J_H$ の配列をコードし、式中、 X_1 は任意のアミノ酸であり、 X_2 は任意のアミノ酸である。このような非ヒト動物の別の例は、内在非ヒト免疫グロブリン定常領域遺伝子配

10

20

30

40

50

列と機能的に連結した再構成ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域ヌクレオチド配列を含む遺伝子組換え内在免疫グロブリン重鎖遺伝子座をその生殖細胞系ゲノム内に含む非ヒト動物であり、非ヒト動物は、B細胞集団の点において野生型非ヒト動物と実質的に類似した液性免疫機構を示す。このような非ヒト動物の更に別の例は、スパーサーを介して重鎖Jセグメント（J_H）配列と機能的に連結した重鎖Vセグメント（V_H）配列を含む再構成ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域ヌクレオチド配列を含む遺伝子組換え内在免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む非ヒト動物であり、スパーサーは少なくとも2つのアミノ酸残基を含んでコードし、再構成ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域ヌクレオチド配列は内在非ヒト動物免疫グロブリン定常領域遺伝子配列と機能的に連結する。1つの例において、V_HセグメントはV_H3-23である。

【0339】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列と機能的に連結した単一のヒト非再構成V_H遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒト非再構成D_H遺伝子セグメント、及び、1つまたは複数のヒト非再構成J_H遺伝子セグメントの存在を特徴とする、制限された免疫グロブリン重鎖遺伝子座、をその生殖細胞系ゲノムが含む非ヒト動物が挙げられ、非ヒト動物は、制限された免疫グロブリン重鎖遺伝子座に由来する再構成ヒト重鎖可変領域遺伝子配列を含むB細胞を更に含む。例えば、US2013/0323791及びUS2013/0096287を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。一部のこのような非ヒト動物において、単一の非再構成ヒトV_H遺伝子セグメントはV_H1-69である。一部のこのような非ヒト動物において、単一の非再構成ヒトV_H遺伝子セグメントはV_H1-2である。使用可能なその他の非ヒト動物としては、その内在免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、単一のヒトV_H遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒトD_H遺伝子セグメント、及び、1つまたは複数のヒトJ_H遺伝子セグメントを含み、機能性内在免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座を含まないという点で制限された非ヒト動物が挙げられ、非ヒト動物は、1つまたは複数のヒトJ_L遺伝子セグメントと機能的に連結した1つまたは複数のヒト免疫グロブリンV_L遺伝子セグメントを更に含み、単一のヒトV_H遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒトD_H遺伝子セグメント、及び、1つまたは複数のJ_H遺伝子セグメントは、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子と機能的に連結し、単一のヒトV_H遺伝子セグメントはV_H1-69またはその多型変異体である。

【0340】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、非再構成ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域ヌクレオチド配列を含む遺伝子組換え免疫グロブリン重鎖遺伝子座をその生殖細胞系ゲノム内に含む非ヒト動物が挙げられ、非再構成重鎖可変領域ヌクレオチド配列は、少なくとも1つのヒスチジンコドンの付加、または、少なくとも1つの非ヒスチジンコドンのヒスチジンコドンへの置換を含み、ヒスチジンコドンは、対応するヒト生殖細胞系重鎖可変領域遺伝子セグメントによってはコードされず、付加または置換ヒスチジンコドンは相補性決定領域3（CDR3）コード配列内に存在する。例えば、US2013/0247235、US9,301,510、及びUS14/046,501を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

【0341】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、内在IgG定常領域遺伝子のC_H1ドメインをコードするヌクレオチド配列の少なくとも一部の欠失を含む生殖細胞系遺伝子改変を含む非ヒト動物が挙げられ、非ヒト動物は機能性C_H1ドメインを含むIgM定常領域遺伝子を発現し、非ヒト動物は、C_H1ドメインの全てまたは一部を欠き関連軽鎖を欠くIgG抗体をその血清内において発現する。例えば、US2011/0145937、US2014/0289876、US2015/0197553、US2015/0197554、US2015/0197555、U

10

20

30

40

50

S 2 0 1 5 / 0 1 9 6 0 1 5、U S 2 0 1 5 / 0 1 9 7 5 5 6、U S 2 0 1 5 / 0 1 9 7 5 5 7、及び U S 8, 7 5 4, 2 8 7 を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような非ヒト動物の一例は、生殖細胞系改変を含む非ヒト動物であり、その改変は、（a）内在 I g G 定常領域遺伝子の C_H1 ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失、及び（b）1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの含有を含み、1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは（a）の内在 I g G 定常領域と機能的に連結し、非ヒト動物はインタクト I g M 定常領域遺伝子を含み、非ヒト動物は、ヒト可変ドメインを含み、C_H1 ドメインの全てまたは一部を欠き、関連軽鎖を欠く I g G 重鎖抗体を発現し、上記 I g G 重鎖抗体をその血清内に分泌する。例えば、U S 2 0 1 1 / 0 1 4 5 9 3 7 を参照されたい。この
10
ような非ヒト動物の別の例は、生殖細胞系改変を含む非ヒト動物であり、その改変は、（a）内在 I g G 定常領域遺伝子の C_H1 ドメイン及びヒンジ領域をコードする核酸配列の欠失、及び（b）1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの含有を含み、1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは（a）の内在 I g G 定常領域と機能的に連結し、非ヒト動物はインタクト I g M 定常領域遺伝子を含む。例えば、U S 2 0 1 5 / 0 1 9 7 5 5 3 を参照されたい。このような非ヒト動物の更に別の例は、生殖細胞系改変を含む非ヒト動物であり、その改変は、（a）内在 I g G 定常領域遺伝子の C_H1 ドメインをコードする核酸配列の欠失、（b）内在 I g G 2 a 定常領域遺伝子の欠失、（c）内在 I g G 2 b 定常領域遺伝子の欠失、及び（d）1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの含有を含み、1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは
20
（a）の内在 I g G 定常領域と機能的に連結し、非ヒト動物はインタクト I g M 定常領域遺伝子を含む。例えば、U S 2 0 1 5 / 0 1 9 7 5 5 4 を参照されたい。このような非ヒト動物の更に別の例は、生殖細胞系改変を含む非ヒト動物であり、その改変は、（a）内在 I g G 定常領域遺伝子の C_H1 ドメイン及びヒンジ領域をコードする核酸配列の欠失、（b）内在 I g G 2 a 定常領域遺伝子の欠失、（c）内在 I g G 2 b 定常領域遺伝子の欠失、及び（d）1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの含有を含み、1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは（a）の内在 I g G 定常領域と機能的に連結し、非ヒト動物はインタクト I g M 定常領域遺伝子を含む。例えば、U S 2 0 1 5 / 0 1 9 7 5 5 5 を参照されたい。このような非ヒト動物の更に別の例は、生殖細胞系改変を含む非ヒト動物であり、その改変は、（a）内在 I g G 1 定常領域遺伝子の C_H1 ドメインをコードする核酸配列の欠失、（b）内在 I g D 定常領域遺伝子の欠失、（c）内在 I g G 3 定常領域遺伝子の欠失、（d）内在 I g G 2 a 定常領域遺伝子の欠失、（e）
30
内在 I g G 2 b 定常領域遺伝子の欠失、（f）内在 I g E 定常領域遺伝子の欠失、（g）内在 I g A 定常領域遺伝子の欠失、及び（h）1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの含有を含み、1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは（a）の内在 I g G 1 定常領域と機能的に連結し、非ヒト動物はインタクト I g M 定常領域遺伝子を含む。例えば、U S 2 0 1 5 / 0 1 9 6 0 1 5 を参照されたい。このような非ヒト動物の更に別の例は、生殖細胞系改変を含む非ヒト動物であり、その改変は、（a）内在 I g G 1 定常領域遺伝子の C_H1 ドメイン及びヒンジ領域をコードする核酸配列の欠失、（b）内在 I g D 定常領域遺伝子の欠失、（c）内在 I g G 3 定常領域遺伝子の欠失、（d）内在 I g G 2
40
a 定常領域遺伝子の欠失、（e）内在 I g G 2 b 定常領域遺伝子の欠失、（f）内在 I g E 定常領域遺伝子の欠失、（g）内在 I g A 定常領域遺伝子の欠失、及び（h）1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの含有を含み、1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは（a）の内在 I g G 1 定常領域と機能的に連結し、非ヒト動物はインタクト I g M 定常領域遺伝子を含む。例えば、U S 2 0 1 5 / 0 1 9 7 5 5 6 を参照されたい。このような非ヒト動物の更に別の例は、生殖細胞系改変を含む非ヒト動物であり、その改変は、（a）内在 I g G 1 定常領域遺伝子の C_H1 ドメイン及びヒンジ領域をコードする核酸配列の欠失、（b）内在 I g D 定常領域遺伝子の欠失、（c）内在 I g G 3 定常領域遺伝子の欠失、（d）内在 I g G 2
50
a 定常領域遺伝子の欠失、（e）内在 I g G 2 b 定常領域遺伝子の欠失、（f）内在 I g

E 定常領域遺伝子の欠失、(g) 内在 I g A 定常領域遺伝子の欠失、及び (h) 1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの含有を含み、1 つまたは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは (a) の内在 I g G 1 定常領域と機能的に連結し、非ヒト動物はインタクト I g M 定常領域遺伝子を含む。例えば、U S 2 0 1 5 / 0 1 9 7 5 5 7 を参照されたい。

【 0 3 4 2 】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、非ヒト動物 κ 軽鎖定常領域配列と連続した λ 軽鎖可変領域配列 ($V\lambda$) 及び少なくとも 1 つの J 配列 (J) を含む非ヒト動物が挙げられる。例えば、U S 2 0 1 2 / 0 0 7 3 0 0 4、U S 2 0 1 4 / 0 1 3 7 2 7 5、U S 2 0 1 5 / 0 2 4 6 9 7 6、U S 2 0 1 5 / 0 2 4 6 9 7 7、U S 2 0 1 5 / 0 3 5 1 3 7 1、U S 9, 0 3 5, 1 2 8、U S 9, 0 6 6, 5 0 2、U S 9, 1 6 3, 0 9 2、及び U S 9, 1 5 0, 6 6 2 を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

このような非ヒト動物の 1 つの例は、(a) 内在非ヒト動物軽鎖遺伝子座における少なくとも 1 2 ~ 少なくとも 4 0 の非再構成ヒト λ 軽鎖可変領域遺伝子セグメント及び少なくとも 1 つのヒト J λ 遺伝子セグメント、(b) 少なくとも 1 2 ~ 少なくとも 4 0 のヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントと少なくとも 1 つのヒト J λ 配列の間に位置するヒト $V\kappa$ - J κ 遺伝子間配列を含む非ヒト動物であり、非ヒト動物は、ヒト $V\lambda$ ドメイン及び非ヒト動物 C κ ドメインを含む軽鎖を含む抗体を発現する。このような非ヒト動物の更に別の例は、(a) 複数の連続非再構成機能性ヒト λ 軽鎖 $V(hV\lambda)$ 遺伝子セグメント及び複数の

連続非再構成機能性ヒト λ 軽鎖 J ($hJ\lambda$) 遺伝子セグメントを含む非再構成軽鎖可変領域（複数の $hV\lambda$ 遺伝子セグメント及び複数の $hJ\lambda$ 遺伝子セグメントは、非再構成軽鎖可変領域内における唯一の機能性可変領域遺伝子セグメントである）、及び (b) 非ヒト動物 κ 軽鎖定常領域遺伝子（複数の連続非再構成ヒト λ 軽鎖 $V(hV\lambda)$ 遺伝子セグメント及び複数の連続非再構成ヒト λ 軽鎖 J ($hJ\lambda$) 遺伝子セグメントは、非再構成軽鎖可変領域が再構成されて再構成ヒト λ 軽鎖可変領域を生成可能なように、また再構成ヒト λ 軽鎖可変領域によりコードされる可変領域及び非ヒト動物 κ 軽鎖定常領域遺伝子によりコードされる定常領域を含む軽鎖を含む抗体を非ヒト動物が発現するように、非ヒト動物 κ 軽鎖定常領域遺伝子と機能的に連結する）、をその生殖細胞系内の内在 κ 軽鎖遺伝子座に含む非ヒト動物である。このような非ヒト動物の更に別の例は、(a) (i) 少なくとも 1 2 の連続非再構成機能性ヒト λ 軽鎖可変領域 ($hV\lambda$) 遺伝子セグメント及び複数の

連続非再構成機能性ヒト λ 軽鎖 J ($hJ\lambda$) 遺伝子セグメントを含む非再構成軽鎖可変領域（少なくとも 1 2 の機能性 $hV\lambda$ 遺伝子セグメント及び複数の機能性 $hJ\lambda$ 遺伝子セグメントは、非再構成軽鎖可変領域内における唯一の機能性可変領域遺伝子セグメントである）、及び (i i) 連続 $hV\lambda$ 遺伝子セグメントと複数の連続 $hJ\lambda$ 遺伝子セグメントの間に位置するヒト $V\kappa$ - J κ 遺伝子間配列、を含む非再構成軽鎖可変領域、及び (b) 非ヒト動物 κ 軽鎖定常領域遺伝子（少なくとも 1 2 の連続非再構成機能性ヒト λ 軽鎖 $V(hV\lambda)$ 遺伝子セグメント及び複数の連続非再構成機能性ヒト λ 軽鎖 J ($hJ\lambda$) 遺伝子セグメントは、非再構成軽鎖可変領域が再構成されて再構成ヒト λ 軽鎖可変領域を生成可能なように、また再構成ヒト λ 軽鎖可変領域によりコードされる可変領域及び非ヒト動物 κ 軽鎖定常領域遺伝子によりコードされる定常領域を含む軽鎖を含む抗体を非ヒト動物が発現するように、非ヒト動物 κ 軽鎖定常領域遺伝子と機能的に連結する）、をその生殖細胞系内の内在 κ 軽鎖遺伝子座に含む非ヒト動物である。このような非ヒト動物の更に別の例は、(a) 複数の連続非再構成機能性ヒト λ 軽鎖 $V(hV\lambda)$ 遺伝子セグメント及び複数の

連続非再構成機能性ヒト λ 軽鎖 J ($hJ\lambda$) 遺伝子セグメントを含む非再構成軽鎖可変領域（複数の $hV\lambda$ 遺伝子セグメント及び複数の $hJ\lambda$ 遺伝子セグメントは、非再構成軽鎖可変領域内における唯一の機能性可変領域遺伝子セグメントである）、及び (b) 非ヒト動物 κ 軽鎖定常領域遺伝子（複数の連続非再構成機能性 $hV\lambda$ 遺伝子セグメント及び複数の連続非再構成機能性 $hJ\lambda$ 遺伝子セグメントは、非再構成軽鎖可変領域が再構成されて再構成ヒト λ 軽鎖可変領域を生成可能なように、また再構成ヒト λ 軽鎖可変領域により

10

20

30

40

50

コードされる可変ドメイン及び非ヒト動物κ軽鎖定常領域遺伝子によりコードされる定常ドメインを含む軽鎖を含む抗体を非ヒト動物が発現するように、非ヒト動物κ軽鎖定常領域遺伝子と機能的に連結する)、をその生殖細胞系内に含む非ヒト動物である。このような非ヒト動物の更に別の例は、(a) (i) 少なくとも12の連続非再構成機能性ヒトλ軽鎖V(hVλ)遺伝子セグメント及び複数の連続非再構成機能性ヒトλ軽鎖J(hJλ)遺伝子セグメントを含む非再構成軽鎖可変領域(少なくとも12の機能性hVλ遺伝子セグメント及び複数の機能性hJλ遺伝子セグメントは、非再構成軽鎖可変領域内における唯一の機能性可変領域遺伝子セグメントである)、及び(ii)連続hVλ遺伝子セグメントと複数の連続hJλ遺伝子セグメントの間に位置するヒトVκ-Jκ遺伝子間配列、を含む非再構成軽鎖可変領域、及び(b)非ヒト動物κ軽鎖定常領域遺伝子(少なくとも12の連続非再構成機能性hVλ遺伝子セグメント及び複数の連続非再構成機能性hJλ遺伝子セグメントは、非再構成軽鎖可変領域が再構成されて再構成ヒトλ軽鎖可変領域を生成可能なように、また再構成ヒトλ軽鎖可変領域によりコードされる可変ドメイン及び非ヒト動物κ軽鎖定常領域遺伝子によりコードされる定常ドメインを含む軽鎖を含む抗体を非ヒト動物が発現するように、非ヒト動物κ軽鎖定常領域遺伝子と機能的に連結する)、をその生殖細胞系内に含む非ヒト動物である。このような非ヒト動物の更に別の例は、非ヒト動物κ定常ドメインと融合したヒトλ可変ドメイン配列を含む免疫グロブリン軽鎖を非ヒト動物が発現するように、非ヒト動物Cκ遺伝子と機能的に連結したヒトVλ及びJλ遺伝子セグメントを含む免疫グロブリン遺伝子座をそのゲノムが含む非ヒト動物である。例えば、US9, 226, 484を参照されたい。

10

20

【0343】

使用可能なその他の非ヒト動物(例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類)としては、その生殖細胞系内の内在非ヒト動物軽鎖遺伝子座にヒトλ軽鎖可変領域配列を含む非ヒト動物が挙げられ、ヒトラムダ可変領域配列は、非ヒト動物免疫グロブリン定常領域遺伝子配列を含む軽鎖内で発現される。例えば、US2013/0323790、US2013/0326647、US2015/0089680、US2015/0173331、US2015/0176002、US2015/0173332、US2012/0070861、US2015/0320023、US2016/0060359、US2016/0057979、US9, 029, 628、US9, 006, 511、US9, 012, 717、US9, 206, 261、US9, 206, 262、US9, 206, 263、及びUS9, 226, 484を参照されたい(それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。このような非ヒト動物の一例は、非ヒト動物定常領域と融合したヒトラムダ可変配列を含む免疫グロブリン軽鎖を発現する非ヒト動物であり、非ヒト動物は約1:1のκ使用率:λ使用率を示す。例えば、US9, 029, 628を参照されたい。このような非ヒト動物の更に別の例は、内在Vκ及びJκ遺伝子セグメントのヒトVλ及びJλ遺伝子セグメントへの置換を含む内在非再構成κ軽鎖免疫グロブリン遺伝子座をそのゲノムが含む非ヒト動物であり、非ヒト動物κ定常領域と融合したヒトλ可変配列を含む免疫グロブリン軽鎖を非ヒト動物が発現するように、ヒトVλ及びJλ遺伝子セグメントは非ヒト動物Cκ遺伝子と機能的に連結する。例えば、US9, 006, 511を参照されたい。このような非ヒト動物の更に別の例は、(i) 第1の内在Vλ-Jλ-Cλ遺伝子クラスターの欠失、及び(ii) 第2の内在Vλ-Jλ-Cλ遺伝子クラスター内の内在Vλ及びJλ遺伝子セグメントのフラグメントの、ヒトVλ及びJλ遺伝子セグメントへの置換、を含む内在λ軽鎖免疫グロブリン遺伝子座をそのゲノムが含む非ヒト動物であり、ヒトVλ及びJλ遺伝子セグメントは少なくとも1つのヒトVλ遺伝子セグメント及び少なくとも1つのヒトJλ遺伝子セグメントを含み、ヒトVλ及びJλ遺伝子セグメントは非ヒト動物Cλ遺伝子と機能的に連結する。例えば、US9, 012, 717を参照されたい。

30

40

【0344】

使用可能なその他の非ヒト動物(例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類)としては、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含むゲノムを有する非ヒト動物が挙げられ、改

50

変は内在ADAM6機能を抑制または排除し、非ヒト動物は、非ヒト動物ADAM6タンパク質、またはそのオルソログもしくは相同体、もしくは対応するADAM6タンパク質の機能性フラグメントをコードする核酸配列を更に含む。例えば、US2012/0322108、US2013/0254911、US2014/0213773、US2015/0201589、US2015/0210776、US2014/0017228、US8,642,835、及びUS8,697,940を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような非ヒト動物の一例は、（a）ADAM6遺伝子の異所性配置、及び（b）内在非ヒト動物重鎖遺伝子座内への、1つまたは複数のヒトV_H遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒトD_H遺伝子セグメント、及び1つまたは複数のヒトJ_H遺伝子セグメントの挿入を含むヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座、をそのゲノムが含む非ヒト動物であり、ヒトV_H、D_H及びJ_H遺伝子セグメントが重鎖定常領域遺伝子と機能的に連結しているために、非ヒト動物は、（i）生殖能力があり、（ii）抗原で免疫化した場合に、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる重鎖定常ドメインと機能的に連結した1つまたは複数のヒトV_H遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒトD_H遺伝子セグメント、及び1つまたは複数のヒトJ_H遺伝子セグメントによりコードされる重鎖可変ドメインを含む抗体を産生すること（抗体は抗原に対する特異的結合を示す）を特徴とする。例えば、US8,642,835を参照されたい。

【0345】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、（a）非ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域の上流への1つまたは複数のヒトV_L及びJ_L遺伝子セグメントの挿入、（b）非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の上流への1つまたは複数のヒトV_H遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒトD_H遺伝子セグメント、及び、1つまたは複数のヒトJ_H遺伝子セグメントの挿入、及び（c）ADAM6タンパク質またはその機能性フラグメントをコードするヌクレオチド配列（ADAM6タンパク質は異所性ADAM6核酸配列から発現される）、を含む非ヒト動物が挙げられる。例えば、US2013/0160153及びUS2014/0017228を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような非ヒト動物の一例は、（a）非ヒト動物免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子の上流への1つまたは複数のヒトV_L遺伝子セグメント及び1つまたは複数のヒトJ_L遺伝子セグメントの挿入、（b）非ヒト動物免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子の上流への1つまたは複数のヒトV_H遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒトD_H遺伝子セグメント、及び、1つまたは複数のヒトJ_H遺伝子セグメントの挿入、及び（c）非ヒト動物ADAM6タンパク質をコードする異所性ヌクレオチド配列（非ヒト動物ADAM6タンパク質は異所性ヌクレオチド配列から発現される）、をそのゲノムが含む非ヒト動物である。例えば、US2013/0160153を参照されたい。

【0346】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、少なくとも1つの非ヒスチジンコドンのヒスチジンコドンへの置換または少なくとも1つのヒスチジンコドンの挿入をCDR3コード配列内に含む非再構成免疫グロブリン可変遺伝子配列を含む免疫グロブリン遺伝子座、をその生殖細胞系内に含む非ヒト動物が挙げられ、非ヒト動物は抗体の多様なレパートリーをインビボで更に含み、抗体の多様なレパートリーのそれぞれは、目的の抗原に特異的であり、非再構成免疫グロブリン可変遺伝子配列内の少なくとも1つのヒスチジンコドン置換または挿入によりコードされる少なくとも1つのヒスチジンアミノ酸を可変ドメインのCDR3内に含む。例えば、US2013/0247236及びUS2014/0082760を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。1つの例では、第1の免疫グロブリン可変領域遺伝子座は、非再構成V_H、D_H及びJ_H遺伝子セグメントを含む非再構成免疫グロブリン重鎖可変領域配列の機能性部分を含み、非再構成V_H、D_H及びJ_H遺伝子セグメントのうちの1つまたは複数は、対応する野生型生殖細胞系遺伝子

10

20

30

40

50

セグメントによってはコードされない挿入または置換ヒスチジンコドンを含む。別の例では、非再構成 V_H 、 D_H 及び J_H 遺伝子セグメントは、非再構成ヒト V_H 遺伝子セグメント、非再構成ヒト D_H 遺伝子セグメント、及び非再構成ヒト J_H 遺伝子セグメントである。別の実施形態では、少なくとも1つのヒスチジンコドンの挿入または少なくとも1つの非ヒスチジンコドンのヒスチジンコドンへの置換を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域配列を含む第2の免疫グロブリン可変領域遺伝子座をその生殖細胞系内に含み、挿入または置換ヒスチジンコドンは、対応する野生型生殖細胞系免疫グロブリン可変領域配列によってはコードされず、非ヒト動物は、非ヒト動物の生殖細胞系内におけるヒスチジン置換または挿入に由来するヒスチジンを免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを発現する。例えば、US 2013/0247236を参照されたい。

10

【0347】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、（a）非ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域の上流への1つまたは複数のヒト V_L 遺伝子セグメント及び1つまたは複数のヒト J_L 遺伝子セグメントの挿入、（b）非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の上流への1つまたは複数のヒト V_L 遺伝子セグメント及び1つまたは複数のヒト J_L 遺伝子セグメントの挿入、及び（c）ADAM6タンパク質またはその機能性フラグメントをコードするヌクレオチド配列（ADAM6タンパク質は異所性ADAM6核酸配列から発現される）、を含む非ヒト動物が挙げられる。例えば、US 2013/0212719を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような非ヒト動物の一例は、（a）非ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子の上流への1つまたは複数のヒト V_L 遺伝子セグメント及び1つまたは複数のヒト J_L 遺伝子セグメントの挿入（1つまたは複数のヒト V_L 遺伝子セグメント及び1つまたは複数のヒト J_L 遺伝子セグメントは、非ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子と機能的に連結する）、（b）非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子の上流への1つまたは複数のヒト V_L 遺伝子セグメント及び1つまたは複数のヒト J_L 遺伝子セグメントの挿入（1つまたは複数のヒト V_L 遺伝子セグメント及び1つまたは複数のヒト J_L 遺伝子セグメントは、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子と機能的に連結する）、及び（c）非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）ADAM6タンパク質をコードする挿入核酸配列（非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）ADAM6タンパク質は、2つの免疫グロブリン重鎖と対になった2つの免疫グロブリン軽鎖をそれぞれが含む抗体を非ヒト動物のB細胞が発現するように、挿入核酸配列から発現され、それぞれの軽鎖はヒト軽鎖可変ドメイン及び非ヒト軽鎖定常ドメインを含み、それぞれの重鎖はヒト軽鎖可変ドメイン及び非ヒト重鎖定常ドメインを含む）、をそのゲノムが含む非ヒト動物である。例えば、US 2013/0212719を参照されたい。

20

30

【0348】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、（a）単一のヒト V_H 遺伝子セグメント、1つまたは複数の D_H 遺伝子セグメント、及び1つまたは複数の J_H 遺伝子セグメントを含むヒトゲノム配列、及び（b）雄非ヒト動物において機能するADAM6タンパク質をコードする配列（ADAM6をコードする配列は、野生型非ヒト動物のADAM6遺伝子座とは異なる位置に配置される）、をその生殖細胞系内に有する非ヒト動物が挙げられる。例えば、US 2013/0333057を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような非ヒト動物の一例は、（a）単一のヒト V_H 遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒト D_H 遺伝子セグメント、及び1つまたは複数のヒト J_H 遺伝子セグメントを含む非再構成ヒトゲノム配列（単一のヒト V_H 遺伝子セグメントは、 V_H1-2 、 V_H1-69 、 V_H2-26 、 V_H2-70 、またはその多型変異体である）、及び（b）雄非ヒト動物において機能するADAM6タンパク質をコードする配列（ADAM6タンパク質をコードする配列は、野生型非ヒト動物のADAM6遺伝子座とは異なる位置に配置される）、をその生殖細胞系内に有する非ヒト動物である。例えば、US 2013/0333057を参照されたい。

40

50

【0349】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、（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）（単一再構成ヒトV_L/J_L領域は、ヒトV_κ1-39/J遺伝子セグメントまたはヒトV_κ3-20/J遺伝子セグメント（例えば、V_κ1-39/J_κ5遺伝子セグメントまたはヒトV_κ3-20/J_κ1遺伝子セグメント）から選択される）、及び（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（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、ヒトV_H遺伝子セグメントは、ヒト/非ヒト動物キメラ重鎖遺伝子を再構成及び形成することができる）、を含む非ヒト動物が挙げられる。このような非ヒト動物を「ユニバーサル軽鎖」（ULC）または「共通軽鎖」非ヒト動物と呼ぶ場合もある。例えば、US2011/0195454、US2012/0021409、US2012/0192300、US2015/0059009、US2013/0045492、US2013/0198880、US2013/0185821、US2013/0302836、US2015/0313193、及びUS15/056,713を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。同様に、使用可能な別の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、抗体の集団を発現する非ヒト動物が挙げられ、非ヒト動物の生殖細胞系は、再構成ヒト生殖細胞系カップ軽鎖可変領域遺伝子である単一免疫グロブリンカップ軽鎖可変領域遺伝子のみを含み、非ヒト動物は、1つのコピーのみを含有するという点で単一免疫グロブリンカップ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単一免疫グロブリンカップ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、非ヒト動物は、（i）集団のそれぞれの免疫グロブリンカップ軽鎖は、再構成ヒト生殖細胞系カップ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）集団は、その軽鎖可変ドメインが再構成ヒト生殖細胞系カップ軽鎖可変領域遺伝子によりコードされる免疫グロブリンカップ軽鎖を含む抗体、及び、その軽鎖可変ドメインがその体細胞変異体によりコードされる免疫グロブリンカップ軽鎖を含む抗体を含み、（iii）非ヒト動物は、免疫グロブリンカップ軽鎖と成功裏にペアとなり集団の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。このような非ヒト動物の一例は、その生殖細胞系内において、（a）単一ヒト生殖細胞系V_κ配列（単一ヒト生殖細胞系V_κ配列は配列番号：148または配列番号：149内に存在する）、及び単一ヒト生殖細胞系J_κ配列（再構成V_κ/J_κ配列は内在非ヒト動物κ定常領域と機能的に連結する）、を含む再構成V_κ/J_κ配列の内在非ヒト動物κ免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入に、及び（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非ヒト動物免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座における挿入に（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非ヒト動物免疫グロブリン重鎖定常領域と機能的に連結し、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/非ヒト動物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）ヘテロ接合性またはホモ接合性な非ヒト動物である。配列番号：148は遺伝子改変ヒトV_κ1-39J_κ5遺伝子座の配列であり、配列番号：149は遺伝子改変ヒトV_κ3-20J_κ1遺伝子座の配列である。例えば、US2011/0195454を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

【0350】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、（i）免疫グロブリンハイブリッド鎖をコードするハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座（ハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座は、そのそれぞれが少なくとも機能性C_H1ドメインをコードする1つまたは複数の重鎖定常領域遺伝子を含む免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列と機能的に連結した非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメント（V_L及びJ_L）を含み、V_L及びJ_L遺伝子セグメントは再構成されて、免疫グロ

10

20

30

40

50

ブリン重鎖定常領域核酸配列と機能的に連結した再構成ヒトV_L/J_L遺伝子配列を含むハイブリッド配列を形成することができる)、(i i) ヒトユニバーサル軽鎖をコードし、免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列と機能的に連結したヒトユニバーサル再構成軽鎖可変領域ヌクレオチド配列を含む軽鎖遺伝子座、をその生殖細胞系ゲノム内に含む、ヒトV_L/C_H x U_LCドメインの生成に有用な非ヒト動物が挙げられ、非ヒト動物は、ハイブリッド遺伝子座に由来するヒト免疫グロブリンハイブリッド鎖及び軽鎖遺伝子座に由来する関連ヒトユニバーサル軽鎖を含む抗原結合タンパク質を産生することができ、ヒト免疫グロブリンハイブリッド鎖は、機能性C_H1ドメインを含む重鎖定常I g D、I g G、I g EまたはI g A領域に融合したヒト免疫グロブリン軽鎖可変(h V_L/C_H x U_LC)ドメインを含み、ヒトユニバーサル軽鎖は軽鎖定常ドメインに融合したヒト免疫グロブリン軽鎖を含む。例えば、P C T / U S 2 0 1 6 / 0 2 3 2 8 9を参照されたい(その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。このような非ヒト動物の一例は、(i) 全ての機能性内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖可変V_H遺伝子セグメント、全ての機能性内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖多様性D_H遺伝子セグメント、及び、全ての機能性内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖結合J_H遺伝子セグメントの、そのそれぞれが少なくとも機能性C_H1ドメインをコードする1つまたは複数の重鎖定常領域遺伝子を含む内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖定常領域核酸と機能的に連結した複数の非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変V_K遺伝子セグメント及び複数の非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖結合J_K遺伝子セグメントへの置換、を含む改変内在免疫グロブリン重鎖遺伝子座(複数の非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖V_K遺伝子セグメント及び複数の非再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖J_K遺伝子セグメントは、B細胞の発生中にB細胞内において再構成に関与し、内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖遺伝子座において内在非ヒト動物免疫グロブリン重鎖定常領域核酸配列と機能的に連結した第1の再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域V_K/J_Kヌクレオチド配列を形成する)、及び(i i) 再構成V_K1-39/J_K5またはV_K3-20/J_K1遺伝子配列に由来する単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列を含む改変内在軽鎖遺伝子座(単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列は、内在非ヒト動物免疫グロブリン軽鎖定常領域k遺伝子配列と機能的に連結する)、をその生殖細胞系ゲノム内に含む、ヒトV_L/C_H x U_LCドメインの生成に有用な非ヒト動物であり、非ヒト動物は、改変内在免疫グロブリン重鎖遺伝子座に由来するヒト免疫グロブリンハイブリッド鎖及び改変内在軽鎖遺伝子座に由来する関連ヒトユニバーサル軽鎖を含む抗原結合タンパク質を産生することができ、ヒト免疫グロブリンハイブリッド鎖は、機能性C_H1ドメインを含む重鎖定常I g D、I g G、I g EまたはI g A領域に融合したヒト免疫グロブリン軽鎖可変(h V_L/C_H x U_LC)ドメインを含み、ヒトユニバーサル軽鎖は軽鎖定常ドメインに融合したヒト免疫グロブリン軽鎖を含む。

【0351】

使用可能なその他の非ヒト動物(例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類)としては、免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列と機能的に連結した再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域ヌクレオチド配列を含む軽鎖免疫グロブリン遺伝子座をその生殖細胞系ゲノム内(例えば、内在非ヒト軽鎖遺伝子座に)に含む非ヒト動物が挙げられ、免疫グロブリン軽鎖定常領域核酸配列と機能的に連結した再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域ヌクレオチド配列はユニバーサル軽鎖をコードし、非ヒト動物は、免疫グロブリンハイブリッド鎖及びユニバーサル軽鎖を含む抗原結合タンパク質を発現する細胞、例えば、リンパ球、例えば、B細胞を産生可能であるまたは実際に産生する。例えば、U S 2 0 1 3 / 0 2 4 7 2 3 4、U S 2 0 1 4 / 0 3 2 9 7 1 1、U S 2 0 1 4 / 0 0 1 3 4 5 6、U S 2 0 1 5 / 0 1 1 9 5 5 6、U S 2 0 1 5 / 0 2 5 0 1 5 1、U S 9, 3 3 4, 3 3 4、及びU S 9, 3 3 2, 7 4 2を参照されたい(それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。一部のこのような非ヒト動物は、再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域ヌクレオチド配列にホモ接合性である。一部のこのような非ヒト動物は、再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域ヌクレオチド配列にヘテロ接合性であ

る。一部のこのような非ヒト動物において、軽鎖定常領域核酸配列はカップ配列である。一部のこのような非ヒト動物において、軽鎖定常領域核酸配列はラムダ配列である。一部のこのような非ヒト動物において、第2の免疫グロブリン遺伝子座は軽鎖カップ遺伝子座である。一部の実施形態では、第2の免疫グロブリン遺伝子座は軽鎖ラムダ遺伝子座である。このような非ヒト動物の一例は、ヒトV κ 及びJ κ セグメント配列を含む単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列を含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座をその生殖細胞系内に含む非ヒト動物であり、V κ セグメント配列はヒトV κ 1-39またはV κ 3-20遺伝子セグメントに由来し、単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列は、V κ セグメント配列の少なくとも1つの非ヒスチジンコドンの、105、106、107、108、109、111（IMGTのナンバリングに従う）及びこれらの組み合わせからなる群から選択される位置において発現されるヒスチジンコドンへの置換を含む。

10

【0352】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、（a）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 H セグメント、少なくとも1つの非再構成ヒトD H セグメント、及び少なくとも1つの非再構成ヒトJ H 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、（b）軽鎖定常領域遺伝子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、及び（c）機能性非ヒト動物ADAM6タンパク質、またはその機能性オルソログもしくは機能性相同体もしくは機能性フラグメントを発現する異所性核酸配列、をそのゲノムが含む非ヒト動物が挙げられる。例えば、US2013/0198879を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような非ヒト動物の一例は、（a）少なくとも1つの非再構成ヒトV H 遺伝子セグメント、少なくとも1つの非再構成ヒトD H 遺伝子セグメント、及び少なくとも1つの非再構成ヒトJ H 遺伝子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（ヒト化免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座は免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子と機能的に連結する）、（b）（i）単一の再構成ヒト軽鎖V/J配列（単一の再構成ヒト軽鎖V/J配列は再構成ヒトV κ 1-39/J κ 配列または再構成ヒトV κ 3-20/J κ 配列である）、または（ii）1つ以下のヒト軽鎖V遺伝子セグメント及び1つ以下のヒト軽鎖J遺伝子セグメント（1つ以下のヒト軽鎖V遺伝子セグメントはV κ 1-39またはV κ 3-20であり、ヒト化免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座は免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子と機能的に連結する）、を含むヒト化免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座、及び（c）雄非ヒト動物において機能する非ヒト動物ADAM6タンパク質、またはそのオルソログもしくは相同体もしくは機能性フラグメントを発現する異所性核酸配列、をその生殖細胞系内に含む非ヒト動物である。

20

30

【0353】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、（a）内在免疫グロブリン重鎖遺伝子座における少なくとも1つの内在免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子のC H 1ドメインをコードするヌクレオチド配列内の欠失または不活性化変異（少なくとも1つの内在免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子は、IgG、IgA、IgE、IgDまたはこれらの組み合わせである）、ならびに、（b）（i）少なくとも1つの非再構成免疫グロブリン軽鎖可変領域（V L ）遺伝子セグメント及び少なくとも1つの非再構成免疫グロブリン軽鎖結合（J L ）遺伝子セグメントを含む核酸配列（非再構成V L 及びJ L 遺伝子セグメントは、組換えを起こして、C H 1ドメインをコードするヌクレオチド配列内に欠失または不活性化変異を含む免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子と機能的に連結した再構成免疫グロブリン軽鎖可変領域（V L /J L ）ヌクレオチド配列を形成可能である）、及び／または、（ii）V L 及びJ L 遺伝子セグメント配列を含む単一再構成免疫グロブリン軽鎖可変領域V L /J L 遺伝子配列を含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座（単一再構成免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列は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）、の一方または両方、をその生殖細胞系内に含む非

40

50

ヒト動物が挙げられる。例えば、US 2015/0289489を参照されたい（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような非ヒト動物の一例は、（a）非ヒト動物重鎖遺伝子座における全てまたは事実上全ての内在免疫グロブリン重鎖V_H、D及びJ遺伝子セグメントの、（i）1つまたは複数の非再構成ヒト免疫グロブリン重鎖V_H遺伝子セグメント、1つまたは複数の非再構成ヒト免疫グロブリン重鎖D_H遺伝子セグメント、及び、1つまたは複数の非再構成ヒト免疫グロブリン重鎖J_H遺伝子セグメント（1つまたは複数のヒト非再構成免疫グロブリン重鎖V_H、D_H及びJ_H遺伝子セグメントは、非ヒト動物重鎖定常領域遺伝子配列と機能的に連結する）、または（ii）1つまたは複数の非再構成ヒト軽鎖V_L遺伝子セグメント及び1つまたは複数のヒト非再構成軽鎖J_L遺伝子セグメント（1つまたは複数の非再構成ヒト軽鎖V_L及びJ_L遺伝子セグメントは非ヒト動物重鎖定常領域遺伝子配列と機能的に連結し、非ヒト動物重鎖定常領域遺伝子配列は、全長IgM遺伝子、ならびに、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるIgG遺伝子内におけるC_H1ドメインをコードするヌクレオチド配列内の欠失または不活性化変異を含む）、のいずれかへの置換、及び（b）全てまたは事実上全ての内在免疫グロブリン軽鎖V及びJ遺伝子セグメントの、単一再構成ヒト可変V_K/J_K遺伝子配列への置換、を含む非ヒト動物であり、非ヒト動物は、関連軽鎖と結合したIgM重鎖を含むB細胞受容体を発現する。

【0354】

使用可能なその他の非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウスなどのげっ歯類）としては、免疫グロブリン軽鎖定常領域配列と機能的に連結した2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメント及び1つまたは複数のヒトJ_L遺伝子セグメントを含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座、をその生殖細胞系内に含む非ヒト動物が挙げられ、2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントのそれぞれは、対応するヒト生殖細胞系V_L遺伝子セグメントによってはコードされない少なくとも1つのヒスチジンコドンを含み、ヒトV_L遺伝子セグメント及びJ_L遺伝子セグメントは、抗体のヒト軽鎖可変ドメインを再構成及びコードすることができる。例えば、US 2014/0013456、US 2015/0119556、US 2015/0250151、US 2013/0247234、及びUS 9,332,742を参照されたい（それぞれの記載内容全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。このような非ヒト動物の一例は、そのそれぞれがヒトJ_L遺伝子セグメント（1つまたは複数のJ_Lセグメントから選択される）で再構成可能であり免疫グロブリン軽鎖のヒト可変ドメインをコード可能である、2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントを含む非ヒト動物であり、2つ以下のV_L遺伝子セグメントのそれぞれ及び／またはJ_L遺伝子セグメントは、少なくとも1つの非ヒスチジン残基のヒスチジン残基への置換を含む。例えば、US 2014/0013456を参照されたい。このような非ヒト動物の更に別の例は、免疫グロブリン軽鎖定常領域配列と機能的に連結した2つの非再構成ヒトV_K遺伝子セグメント及び1つまたは複数の非再構成ヒトJ_K遺伝子セグメント（複数可）を含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座、をその生殖細胞系内に含む非ヒト動物であり、2つの非再構成ヒトV_K遺伝子セグメントは、非ヒスチジンコドンのヒスチジンコドンへの1つまたは複数の置換をそれぞれが含むヒトV_K1-39及びV_K3-20遺伝子セグメントであり、ヒトV_K及びJ_K遺伝子セグメントは再構成可能であり、ヒトV_K及びJ_K遺伝子セグメントは、105、106、107、108、109、111（IMGTのナンバリングに従う）及びこれらの組み合わせからなる群から選択される位置に1つまたは複数のヒスチジンを含むヒト軽鎖可変ドメインをコードし、1つまたは複数のヒスチジンは1つまたは複数の置換に由来する。例えば、US 2015/0250151を参照されたい。

【0355】

IV. 抗原結合タンパク質の作製方法

本明細書で開示する方法により作製した遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を使用して、目的の外来標的抗原に対する抗原結合タンパク質を作製してもよい。抗原結合タンパク質（例えば、抗体）を作製するためのいくつかの技術について説明してきた。免疫化マウス

のB細胞から抗原結合タンパク質を直接単離してもよく（例えば、US 2007/0280945を参照のこと（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる））、及び／または、免疫化マウスのB細胞を使用してハイブリドーマを作製してもよい（例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495-497を参照のこと（その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる））。本明細書に記載の非ヒト動物由来の抗原結合タンパク質（重鎖及び／または軽鎖）をコードするDNAは、通常の手法を用いて容易に単離及びシークエンスすることができる。本明細書に記載の非ヒト動物に由来するハイブリドーマ及び／またはB細胞は、このようなDNAの好ましいソースとして機能する。単離後、DNAを発現ベクター内に入れてから、その発現ベクターを、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞へとトランスフェクションして、組換え宿主細胞内におけるモノクローナル抗体の合成を得てもよい。

10

【0356】

例えば、本明細書で開示する方法により作製した遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を標的抗原に曝露して、目的の外来標的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してもよい。その後、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物から、ヒト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／またはヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする第2の核酸配列を得てもよい。代替的に、その後、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物から抗原結合タンパク質を単離してもよい。一例として、目的の外来抗原に特異的に結合する抗体を発現する、クローニング的に選択したリンパ球を同定してもよい。

20

【0357】

1つの例では、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を目的の外来標的抗原で免疫化し、非ヒト動物に免疫応答を備えさせて、免疫化動物からリンパ球（例えば、B細胞）を採取し、そのリンパ球を骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマ細胞を作製し、そのハイブリドーマ細胞から標的抗原に特異的に結合するV_Hドメインをコードする核酸配列及び／または標的抗原に特異的に結合するV_Lドメインをコードする核酸配列を得て、免疫グロブリン重鎖及び／または免疫グロブリン軽鎖を作製するために、免疫グロブリン定常領域またはその配列の機能性フラグメントをコードする核酸配列とインフレーム（すなわち、機能的に連結）で核酸配列をクローニングして、抗原結合タンパク質を発現可能な細胞（例えば、CHO細胞）内で重鎖及び軽鎖を発現させること、により抗原結合タンパク質を作製してもよい。

30

【0358】

別の例では、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を目的の外来標的抗原で免疫化し、非ヒト動物に免疫応答を備えさせて、免疫化動物からリンパ球（例えば、B細胞）を採取し、そのリンパ球から標的抗原に特異的に結合するV_Hドメインをコードする核酸配列及び／または標的抗原に特異的に結合するV_Lドメインをコードする核酸配列を得て、免疫グロブリン重鎖及び／または免疫グロブリン軽鎖を作製するために、免疫グロブリン定常領域またはその配列の機能性フラグメントをコードする核酸配列とインフレーム（すなわち、機能的に連結）で核酸配列をクローニングして、抗原結合タンパク質を発現可能な細胞（例えば、CHO細胞）内で重鎖及び軽鎖を発現させること、により抗原結合タンパク質を作製してもよい。

40

【0359】

目的の外来抗原による免疫化は、目的の外来抗原を発現する、タンパク質、DNA、DNAとタンパク質の組み合わせ、または細胞を用いて実施することができる。得られたリンパ球は、例えば、免疫化動物の脾臓、リンパ節または骨髄を含む任意のソースに由来していてもよい。

【0360】

一部のこのような方法では、V_Hドメイン及び／またはV_Lドメインはヒトであり（例えば、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物がIgHとIgκの両方においてホモ接合性にヒト化されている場合）、V_Hドメイン及び／またはV_Lドメインは、ヒト定常領域をコー

50

ドする核酸配列とインフレーションでクローニングされ、また作製された抗原結合タンパク質は完全ヒト抗体である。

【0361】

本明細書に記載の遺伝子組換えF0世代非ヒト動物（すなわち、第1の標的ゲノム遺伝子座において遺伝子組換えされている）内で産生された、目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質の産生量は通常、対照非ヒト動物（すなわち、第1の標的ゲノム遺伝子座において野生型）と比較して、増加する。すなわち、本明細書に記載の遺伝子組換えF0世代非ヒト動物（すなわち、第1の標的ゲノム遺伝子座において遺伝子組換えされている）内で産生された、目的の外来抗原に対する抗原結合タンパク質は通常、第1の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免疫化した後に得られた抗原結合タンパク質と比較して、より高い力価を有している。例えば、力価は、少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍または10倍高くてもよい。用語「抗体力価」は、血清内に存在する特定抗体の濃度の測定値を含む。例えば、抗体力価は、特定のエピトープを認識する抗体を生物がどの程度産生したかの測定値であってもよく、陽性結果がなお認められる最大希釈の逆数として表される。同様に、第1の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免疫化した後に得られた抗原結合タンパク質と比較して、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通常、目的の外来抗原で遺伝子組換えF0世代非ヒト動物を免疫化した後に得られる。対照非ヒト動物とは、第1の標的ゲノム遺伝子座において野生型である非ヒト動物のことを意味する。遺伝子組換えF0世代非ヒト動物と対照動物の間の唯一の実質的な差異は、第1の標的ゲノム遺伝子座の状態であることが好ましい。例えば、対照動物は、その他の実質的な遺伝子改変を有さないこと、非ヒト動物の同一種であること、非ヒト動物の同一系統であること、同一遺伝的背景（第1の標的ゲノム遺伝子座以外の）を有していること、及び、遺伝子組換えF0世代非ヒト動物と同齢であることが好ましい。

【0362】

上記または以下に引用する全ての特許出願、ウェブサイト、その他の刊行物、受入番号などの全ては、あたかもそれぞれの個々の事項が明示的かつ個別に参照として組み込まれることが示されるように、あらゆる目的において同程度に参照として組み込まれる。別の期間における異なるバージョンの配列が受入番号と関連付いている場合、本出願の有効出願日における受入番号と関連付いているバージョンのことを意味する。適用可能な場合の受入番号に言及する有効出願日とは、実際の出願日または優先権出願の出願日のうちの早い方のことを意味する。同様に、異なるバージョンの刊行物、ウェブサイトなどが別の期間に公示されている場合、別途記載のない限り、本出願の有効出願日の直近に公示されたバージョンのことを意味する。別途特に記載のない限り、本発明の任意の特徴、工程、要素、実施形態または態様を、任意のその他のものと組み合わせて使用してもよい。明確性及び理解を目的とした例示及び例として本発明をある程度詳細に説明してきたが、添付の特許請求の範囲の範囲内における一定の変更及び修正を実施可能であることは明らかである。

【0363】

配列の簡単な説明

添付の配列表に記載したヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、ヌクレオチド塩基用の標準的な文字略語及びアミノ酸用の3文字コードを使用して示している。ヌクレオチド配列は、配列の5'末端から始まり3'末端へと前方に（すなわち、それぞれの行において左から右へと）進む標準的な慣習に従っている。それぞれのヌクレオチド配列の一方の鎖のみを示しているが、相補鎖は示した鎖のいずれかを参照することにより含まれるということを理解されたい。アミノ酸配列は、配列のアミノ末端から始まりカルボキシ末端へと前方に（すなわち、それぞれの行において左から右へと）進む標準的な慣習に従っている。

【0364】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1. 配列の説明。

配列 番号	タイ プ	説明
1	D N A	ガイド R N A 認識配列 v. 1
2	D N A	ガイド R N A 認識配列 v. 2
3	D N A	ガイド R N A 認識配列 v. 3

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

配列番号	タイプ	説明
4	DN A	C 5 (H c) g R N A A D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 1 0 0 b p)
5	DN A	C 5 (H c) g R N A B D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 5 0 0 b p)
6	DN A	C 5 (H c) g R N A C D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 3 8 2 0 0 b p 及び 3 7 5 0 0 b p)
7	DN A	C 5 (H c) g R N A D D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 4 3 5 0 0 b p 及び 3 2 2 0 0 b p)
8	DN A	C 5 (H c) g R N A E D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 5 0 0 b p)
9	DN A	C 5 (H c) g R N A E 2 D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 1 0 0 b p)
1 0	DN A	L r p 5 g R N A A D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 5 0 b p)
1 1	DN A	L r p 5 g R N A B D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 5 0 0 b p)
1 2	DN A	L r p 5 g R N A B 2 D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 1 0 0 0 b p)
1 3	DN A	L r p 5 g R N A C D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 2 9 9 0 0 b p 及び 3 8 4 3 0 b p)
1 4	DN A	L r p 5 g R N A D D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 2 9 9 5 0 b p 及び 3 8 3 8 0 b p)
1 5	DN A	L r p 5 g R N A E 2 D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 1 0 0 0 b p)
1 6	DN A	L r p 5 g R N A E D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 5 0 0 b p)
1 7	DN A	L r p 5 g R N A F D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 5 0 b p)
1 8	DN A	R o r 1 g R N A A D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 2 0 0 b p)
1 9	DN A	R o r 1 g R N A B D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 1 0 0 0 b p)
2 0	DN A	R o r 1 g R N A D D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 5 4 3 0 0 b p 及び 5 5 5 0 0 b p)
2 1	DN A	R o r 1 g R N A C D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 5 4 5 0 0 b p 及び 5 5 3 0 0 b p)
2 2	DN A	R o r 1 g R N A E D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 1 0 0 0 b p)
2 3	DN A	R o r 1 g R N A F D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 2 0 0 b p)
2 4	DN A	T r p a 1 g R N A A D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 1 0 0 b p)
2 5	DN A	T r p a 1 g R N A A 2 D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 5 0 0 b p)
2 6	DN A	T r p a 1 g R N A B D N A 標的化セグメント (標的遺伝子座末端から 1 0 0 0 b p)

10

20

30

40

【表 1 - 3】

配列 番号	タイ プ	説明
27	DN A	T r p a l g R N A C D N A 標的化セグメント (標的 遺伝子座末端から 25600bp 及び 19740bp)
28	DN A	T r p a l g R N A D D N A 標的化セグメント (標的 遺伝子座末端から 26970bp 及び 18370bp)
29	DN A	T r p a l g R N A E 2 D N A 標的化セグメント (標 的遺伝子座末端から 1000bp)
30	DN A	T r p a l g R N A E D N A 標的化セグメント (標的 遺伝子座末端から 500bp)
31	DN A	T r p a l g R N A F D N A 標的化セグメント (標的 遺伝子座末端から 100bp)
32	DN A	190045 フォワードプライマー
33	DN A	190061 フォワードプライマー
34	DN A	190068 フォワードプライマー
35	DN A	190030 フォワードプライマー
36	DN A	190033 フォワードプライマー (図 6 の S V 48 . 3 用フォワードプライマーと同一)
37	DN A	190013 フォワードプライマー
38	DN A	190045 リバースプライマー
39	DN A	190061 リバースプライマー
40	DN A	190068 リバースプライマー
41	DN A	190030 リバースプライマー
42	DN A	190033 リバースプライマー (図 6 の S V 48 . 3 用リバースプライマーと同一)
43	DN A	190013 リバースプライマー
44	DN A	図 6 の C 2 プローブ (B 6) - S N V 0 . 3 2
45	DN A	図 6 の T 3 プローブ (B 6) - S N V 1 . 2
46	DN A	図 6 の T 6 プローブ (B 6) - S N V 1 1 . 1
47	DN A	図 6 の T 7 プローブ (B 6) - S N V 1 3 . 2
48	DN A	図 6 の T 8 プローブ (B 6) - S N V 1 7 . 5
49	DN A	図 6 の T 9 プローブ (B 6) - S N V 2 5 . 8

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

配列 番号	タイ プ	説明
5 0	DN A	図 6 の T 1 0 プローブ (B 6) - S N V 3 3 . 0
5 1	DN A	図 6 の T 1 1 プローブ (B 6) - S N V 3 8 . 3
5 2	DN A	図 6 の T 1 3 プローブ (B 6) - S N V 4 9 . 6
5 3	DN A	図 6 の T 1 4 プローブ (B 6) - S N V 5 7 . 2
5 4	DN A	図 6 の C 2 プローブ (1 2 9) - S N V 0 . 3 2
5 5	DN A	図 6 の T 3 プローブ (1 2 9) - S N V 1 . 2
5 6	DN A	図 6 の T 6 プローブ (1 2 9) - S N V 1 1 . 1
5 7	DN A	図 6 の T 7 プローブ (1 2 9) - S N V 1 3 . 2
5 8	DN A	図 6 の T 8 プローブ (1 2 9) - S N V 1 7 . 5
5 9	DN A	図 6 の T 9 プローブ (1 2 9) - S N V 2 5 . 8
6 0	DN A	図 6 の T 1 0 プローブ (1 2 9) - S N V 3 3 . 0
6 1	DN A	図 6 の T 1 1 プローブ (1 2 9) - S N V 3 8 . 3
6 2	DN A	図 6 の T 1 3 プローブ (1 2 9) - S N V 4 9 . 6
6 3	DN A	図 6 の T 1 4 プローブ (1 2 9) - S N V 5 7 . 2
6 4	DN A	図 6 の C 2 フォワードプライマー - S N V 0 . 3 2
6 5	DN A	図 6 の T 3 フォワードプライマー - S N V 1 . 2
6 6	DN A	図 6 の T 6 フォワードプライマー - S N V 1 1 . 1
6 7	DN A	図 6 の T 7 フォワードプライマー - S N V 1 3 . 2
6 8	DN A	図 6 の T 8 フォワードプライマー - S N V 1 7 . 5
6 9	DN A	図 6 の T 9 フォワードプライマー - S N V 2 5 . 8
7 0	DN A	図 6 の T 1 0 フォワードプライマー - S N V 3 3 . 0
7 1	DN A	図 6 の T 1 1 フォワードプライマー - S N V 3 8 . 3
7 2	DN A	図 6 の T 1 3 フォワードプライマー - S N V 4 9 . 6

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

配列 番号	タイ プ	説明
7 3	DN A	図 6 の T 1 4 フォワードプライマー - S N V 5 7 . 2
7 4	DN A	図 6 の C 2 リバースプライマー - S N V 0 . 3 2
7 5	DN A	図 6 の T 3 リバースプライマー - S N V 1 . 2
7 6	DN A	図 6 の T 6 リバースプライマー - S N V 1 1 . 1
7 7	DN A	図 6 の T 7 リバースプライマー - S N V 1 3 . 2
7 8	DN A	図 6 の T 8 リバースプライマー - S N V 1 7 . 5
7 9	DN A	図 6 の T 9 リバースプライマー - S N V 2 5 . 8
8 0	DN A	図 6 の T 1 0 リバースプライマー - S N V 3 3 . 0
8 1	DN A	図 6 の T 1 1 リバースプライマー - S N V 3 8 . 3
8 2	DN A	図 6 の T 1 3 リバースプライマー - S N V 4 9 . 6
8 3	DN A	図 6 の T 1 4 リバースプライマー - S N V 5 7 . 2
8 4	DN A	図 6 の S V 1 3 . 7 用フォワードプライマー
8 5	DN A	図 6 の S V 1 3 . 7 用リバースプライマー
8 6	DN A	図 6 の S V 2 0 . 0 用フォワードプライマー
8 7	DN A	図 6 の S V 2 0 . 0 用リバースプライマー
8 8	DN A	図 6 の S V 3 6 . 9 用フォワードプライマー
8 9	DN A	図 6 の S V 3 6 . 9 用リバースプライマー
9 0	DN A	図 6 の S V 5 6 . 7 用フォワードプライマー
9 1	DN A	図 6 の S V 5 6 . 7 用リバースプライマー
9 2	DN A	L r p 5 遺伝子座用 m - l r - f プライマー
9 3	DN A	L r p 5 遺伝子座用 m - 5 ' - f プライマー
9 4	DN A	L r p 5 遺伝子座用 m - A プライマー
9 5	DN A	L r p 5 遺伝子座用 h - l r - r プライマー

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

配列 番号	タイ プ	説明
9 6	DN A	L r p 5 遺伝子座用 m - 5 ' - r プライマー
9 7	DN A	L r p 5 遺伝子座用 h - 5 ' - r プライマー
9 8	DN A	L r p 5 遺伝子座用 m - F プライマー
9 9	DN A	L r p 5 遺伝子座用 m - E 2 プライマー
1 0 0	DN A	7 0 6 4 r e t U フォワードプライマー
1 0 1	DN A	7 0 6 4 r e t U リバースプライマー
1 0 2	DN A	7 0 6 4 r e t U T A Q M A N (登録商標) プローブ
1 0 3	DN A	7 0 6 4 r e t D フォワードプライマー
1 0 4	DN A	7 0 6 4 r e t D リバースプライマー
1 0 5	DN A	7 0 6 4 r e t D T A Q M A N (登録商標) プローブ
1 0 6	DN A	7 1 4 0 r e t U フォワードプライマー
1 0 7	DN A	7 1 4 0 r e t U リバースプライマー
1 0 8	DN A	7 1 4 0 r e t U T A Q M A N (登録商標) プローブ
1 0 9	DN A	7 1 4 0 r e t D フォワードプライマー
1 1 0	DN A	7 1 4 0 r e t D リバースプライマー
1 1 1	DN A	7 1 4 0 r e t D T A Q M A N (登録商標) プローブ
1 1 2	DN A	F o l h 1 g R N A A DNA 標的化セグメント
1 1 3	DN A	F o l h 1 g R N A A 2 DNA 標的化セグメント
1 1 4	DN A	F o l h 1 g R N A B DNA 標的化セグメント
1 1 5	DN A	F o l h 1 g R N A C DNA 標的化セグメント
1 1 6	DN A	F o l h 1 g R N A D DNA 標的化セグメント
1 1 7	DN A	F o l h 1 g R N A E DNA 標的化セグメント
1 1 8	DN A	F o l h 1 g R N A E 2 DNA 標的化セグメント

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

配列 番号	タイ プ	説明
1 1 9	DN A	F o l h 1 g R N A F DNA標的化セグメント
1 2 0	DN A	A d a m t s 5 g R N A A DNA標的化セグメント
1 2 1	DN A	A d a m t s 5 g R N A A 2 DNA標的化セグメント
1 2 2	DN A	A d a m t s 5 g R N A B DNA標的化セグメント
1 2 3	DN A	A d a m t s 5 g R N A C DNA標的化セグメント
1 2 4	DN A	A d a m t s 5 g R N A D DNA標的化セグメント
1 2 5	DN A	A d a m t s 5 g R N A E 2 DNA標的化セグメント
1 2 6	DN A	A d a m t s 5 g R N A E DNA標的化セグメント
1 2 7	DN A	A d a m t s 5 g R N A F DNA標的化セグメント
1 2 8	DN A	D p p 4 g R N A A DNA標的化セグメント
1 2 9	DN A	D p p 4 g R N A B DNA標的化セグメント
1 3 0	DN A	D p p 4 g R N A B 2 DNA標的化セグメント
1 3 1	DN A	D p p 4 g R N A C DNA標的化セグメント
1 3 2	DN A	D p p 4 g R N A D DNA標的化セグメント
1 3 3	DN A	D p p 4 g R N A E 2 DNA標的化セグメント
1 3 4	DN A	D p p 4 g R N A E DNA標的化セグメント
1 3 5	DN A	D p p 4 g R N A F DNA標的化セグメント
1 3 6	DN A	図 8 の S V 6. 1 用フォワードプライマー
1 3 7	DN A	図 8 の S V 6. 1 用リバーズプライマー
1 3 8	DN A	図 8 の S V 6. 3 用フォワードプライマー
1 3 9	DN A	図 8 の S V 6. 3 用リバーズプライマー
1 4 0	DN A	図 8 の S V 7. 8 用フォワードプライマー
1 4 1	DN A	図 8 の S V 7. 8 用リバーズプライマー

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

配列 番号	タイ プ	説明
1 4 2	DN A	図 8 の S V 1 6 用フォワードプライマー
1 4 3	DN A	図 8 の S V 1 6 用リバースプライマー
1 4 4	DN A	図 8 の S V 2 5 . 5 用フォワードプライマー
1 4 5	DN A	図 8 の S V 2 5 . 5 用リバースプライマー
1 4 6	DN A	S . a u r e u s C a s 9 P A M 配列
1 4 7	DN A	S . a u r e u s C a s 9 P A M 配列
1 4 8	DN A	遺伝子改変ヒト V κ 1 - 3 9 J κ 5 遺伝子座
1 4 9	DN A	遺伝子改変ヒト V κ 3 - 2 0 J κ 1 遺伝子座
1 5 0	DN A	ガイド RNA スキャフォールド v 1
1 5 1	DN A	ガイド RNA スキャフォールド v 2
1 5 2	DN A	ガイド RNA スキャフォールド v 3

【実施例】

【 0 3 6 5 】

実施例 1 . 開始コドンと終止コドンを標的とする対のガイド RNA を使用した、抗体産生の KO 胚性幹 (E S) 細胞、 1 細胞期胚及びマウスの作製。

VELOCIGENE (登録商標) 及び VELOCIMOUSE (登録商標) 技術は、完全ヒト抗体の産生を可能とする VELOCIMMUNE (登録商標) マウスの作製を可能としている。VELOCIMMUNE (登録商標) マウスは、完全ヒト化可変領域がマウス定常領域と連結した免疫グロブリンカップ鎖 (I g κ) 及び重鎖 (I g H) を発現する。タンパク質の機能的に重要な領域は種を超えて保存される傾向があることから、自己抗原に対する免疫寛容が、これらの重要なエпитープに対する抗体の産生における問題を提起する場合が多い。常法に従い、VELOCIMMUNE (登録商標) マウスを、目的の自己抗原標的にヘテロ接合性ノックアウト変異を有する F 0 マウスに改良して、免疫寛容を克服した。免疫化に好適な三重ホモ接合性マウス (目的の標的においてホモ接合性ヌル、及び I g H と I g κ の両方においてホモ接合性にヒト化) を作製するためには、更に 2 世代の交配及び 1 5 ~ 1 6 ヶ月間の合計期間が必要となっていた。このプロセスを加速させるために、目的の標的にヌル対立遺伝子を作製するための標的となり得る VELOCIMMUNE (登録商標) 胚性幹 (E S) 細胞を誘導した。しかしながら、あいにく、ホモ接合性ヌル VELOCIMMUNE (登録商標) E S 細胞クローンを得るには連続的な標的化工程が必要となり、時間がかかる。より重要なことに、完全 E S 細胞由来 F 0 VELOCIMICE (登録商標) (すなわち、E S 細胞を 8 細胞期胚に注入することで得た完全 E S 細胞由来 F 0 世代マウス) を作製するための低い能力を免疫化プロジェクト用に KO した VELOCIMMUNE (登録商標) E S 細胞クローンが通常示す (例えば、表 2 を参照のこと) だけではなく、完全 E S 細胞由来 F 0 VELOCIMICE (登録商標) (すなわち、E S 細胞を 8 細胞期胚に注入することで得た完全 E S 細胞由来 F 0 世代マウス) を作製するための一層更に低い能力を連続的に標的化した VELOCIMMU

NE（登録商標）ES細胞クローンも示す。例えば、表3（標的遺伝子改変を生成するのに用いる標準的なES細胞株、及びVELOCIMICE（登録商標）（F1H4 ES細胞株）、及び2種類のユニバーサル軽鎖（ULC）ES細胞株、及びVELOCIMMUNE（登録商標）ES細胞株（VI-3Adam6）を使用して、VELOCIMOUSE（登録商標）作製効率を比較している）を参照されたい。

【0366】

【表2】

表2．免疫化プロジェクト用にKOしたES細胞株のVELOCIMOUSE（登録商標）作製効率

ESC株	遺伝子型決定したVELOCIMICE（登録商標）の合計	注入胚の合計	VELOCIMOUSE（登録商標）の作製収率
ULC1-39 F2	36	6788	0.50%
ULC1-39 A4	2	150	1.30%
VI3Adam-B3	163	2112	7.72%

【0367】

【表3】

表3．ES細胞株の総VELOCIMOUSE（登録商標）作製効率

	マイクロインジェクションした胚あたりの%VELOCIMICE（登録商標）	
ESC株	1回目のエレクトロポレーション	連続的なエレクトロポレーション
F1H4	18.5%	16.6%
ULC1-39 A4	2.0%	2.6%
ULC 1-39 F2	2.1%	0.9%
VI-3Adam6 B3	11.1%	5.2%

【0368】

目的の外来ヒト標的抗原に対する寛容の低いマウスを作製するために、本発明者らは、機能性異所マウスAdam6遺伝子を含むVELOCIMMUNE（登録商標）ES細胞（目的の標的においてヌル対立遺伝子にホモ接合性）を単一改変工程で迅速に作製するための方法を開発した。本発明者らは、機能性異所マウスAdam6遺伝子を含むVELOCIMMUNE（登録商標）ES細胞内の目的の標的における両方の対立遺伝子上の大きな欠失を一对のガイドRNAを使用して効率的に生成するための手順を最適化することにより、大きな標的化ベクター（LTVEC）を設計及び作製する必要性を除去した。この手法を使用して、目的の標的においてヌル対立遺伝子にホモ接合性であり免疫化の準備が整ったF0 VELOCIMICE（登録商標）を、15～16ヶ月間ではなく4～5ヶ月間で出産させることができる（目的の標的においてヌル対立遺伝子にホモ接合性の仔マウスを約3ヶ月間で出産させることができるが、その後、免疫化のために4～5週間成長させる）。この実験では、ホモ接合性欠失用にこれら目的の外来標的抗原にオルソロガな自己抗原を標的とするための対のガイドRNAを設計してクローニングした。自己抗原をコードする内在遺伝子の開始及び終止コドン領域を標的とするためのガイドRNAを設計した。一部の標的用に2対のgRNA（v1及びv2）を設計した。ガイドRNAの設計プロセスについては、以下の原料及び方法に記載している。機能性異所マウスAdam6遺伝子（VI-3 Adam6）マウス（再挿入マウスAdam6遺伝子に加えて、内

在マウス免疫グロブリン重鎖及び軽鎖可変領域を対応するヒトDNAへと置換した) またはユニバーサル軽鎖 (ULC 1-39) マウス (ヒトVκ 1-39/J遺伝子セグメントである単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を有するマウス) を含むVELOCI IMMUNE (登録商標) マウスに由来するES細胞内に、ガイドRNAをCas9と共にエレクトロポレーションまたはヌクレオフェクションした。図32を参照されたい。エレクトロポレーション及びヌクレオフェクションのプロトコルについては、以下の原料及び方法に記載している。一部の実験では、欠失させる自己抗原をコードする内在遺伝子を標的とする大きな標的化ベクター (LTVEC) と共に、Cas9及び対のガイドRNAをエレクトロポレーションした (例えば、図4を参照のこと)。LTVECの有無におけるCRISPR/Cas9 (CC9) の使用に同等の欠失効率が認められた (表4を参照のこと)。

【0369】

【表4-1】

表4. 二対立遺伝子欠失効率。

自己抗原	親ESC	EPタイプ	スクリーニングしたクローン	二対立遺伝子欠失を有するクローン	効率 (%)
自己抗原1 (細胞質)	ULC 1-39 F2	LTVEC + CC9 v1	384	19	4.9
		CC9 v1	384	20	5.2
		CC9 v2	176	14	7.9
	VI-3 Ad am6 B3	LTVEC + CC9 v1	384	9	2.3
		CC9 v1	384	15	3.9
		CC9 v2	352	19	5.4
自己抗原2 (膜貫通)	ULC 1-39 F2	LTVEC + CC9 v1	384	14	3.6
		CC9 v1	384	21	5.5
		CC9 v2	352	42	11.9
	VI-3 Ad am6 B3	LTVEC + CC9 v2	384	11	2.9
		CC9 v2	384	11	2.9
		CC9 v2	176	20	11.3
自己抗原3 (膜貫通)	ULC 1-39 F2	LTVEC + CC9	384	12	3.1
		CC9	384	11	2.9

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

自己抗原	親 E S C	E P タイプ	スクリーニングしたクローン	二対立遺伝子欠失を有するクローン	効率 (%)
通)	V I - 3 A d a m 6 B 3	L T V E C + C C 9	3 8 4	1 1	2 . 9
自己抗原 4 (膜貫通)	U L C 1 - 3 9 F 2	L T V E C + C C 9	1 7 6	1 1	6 . 3
		C C 9	1 7 6	3	1 . 7
	V I - 3 A d a m 6 B 3	C C 9	3 5 2	7 6	2 1 . 6
自己抗原 5 (膜貫通)	U L C 1 - 3 9 F 2	L T V E C + C C 9	1 9 2	8	4 . 2
		C C 9	3 8 4	8	2 . 1
	V I - 3 A d a m 6 B 3	C C 9	3 5 2	1 5	4 . 3
自己抗原 6 (膜貫通)	U L C 1 - 3 9 F 2	C C 9	1 7 6	1 0	5 . 6
自己抗原 7 (膜貫通)	U L C 1 - 3 9 F 2	L T V E C + C C 9	3 5 2	1 0	2 . 8
		C C 9	3 5 2	5	1 . 4
	V I - 3 A d a m 6 B 3	C C 9	3 5 2	7	2

【 0 3 7 0 】

実験の開始 (g R N A の設計) から終了 (自己抗原をコードする内在遺伝子のホモ接合性ヌル対立遺伝子を有する F 0 マウスの遺伝子型決定) までの時間表は約 3 ヶ月間であった。一例として、標的 1 (自己抗原 1) に対応する自己抗原にホモ接合性ヌルな F 0 マウスを作製するための時間表を表 5 に示す。

【 0 3 7 1 】

【表 5 - 1】

表 5 . V I - 3 A d a m 6 マウスにおける自己抗原 1 のホモ接合性ヌル対立遺伝子を提供するための時間表。

プロセス	日付
g R N A 及び T A Q M A N (登録商標) の設計	9 / 2 1 / 1 5
g R N A の調製	1 0 / 6 / 1 5
エレクトロポレーション	1 0 / 1 6 / 1 5
一次 E S 細胞スクリーニング	1 1 / 2 / 1 5
再確認スクリーニング	1 1 / 1 8 / 1 5
E S 細胞クローンのマイクロインジェクション	1 1 / 2 3 / 1 5

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

プロセス	日付
F 0 マウスの出生日	1 2 / 1 1 / 1 5
F 0 マウスの遺伝子型決定	1 2 / 2 1 / 1 5

【 0 3 7 2 】

それぞれの自己抗原の開始及び終止コドン領域を標的とする対のガイド RNA を単独でまたは欠失させる自己抗原を標的とする大きな標的化ベクター（L T V E C）と共に使用して、V I - 3 - A d a m 6 マウス及び U L C 1 - 3 9 マウス由来の胚性幹（E S）細胞内の様々な欠失用自己抗原を標的とするため、いくつかの実験を実施した。C a s 9 及びガイド RNA を DNA の形態で E S 細胞に導入した。表 6 及び図 2 8 に示すように、試験した全ての自己抗原において欠失（すなわち、崩壊）を達成したが、欠失サイズは 0 . 1 k b ~ 1 6 5 k b の範囲であり、欠失（すなわち、崩壊）のサイズと欠失（すなわち、崩壊）の生成効率の間には負の相関が認められた。二対立遺伝子崩壊ははるかに大きなサイズでも達成され得る。例えば、本発明者らは、約 4 0 0 k b の欠失サイズで二対立遺伝子崩壊を達成した。同様に、2 つの 5 ' g RNA 及び 2 つの 3 ' g RNA ならびに修復ベクターを使用して、マウス I g H 遺伝子座における約 9 0 0 k b ~ 1 M b の二対立遺伝子崩壊を約 1 . 2 % の効率で達成した（データは省略）。

【 0 3 7 3 】

【表 6 - 1】

表 6 . 欠失（崩壊）効率に対する欠失（崩壊）サイズの影響。

マウス標的	崩壊サイズ（k b）	スクリーニングしたクローン	N H E J 二対立遺伝子インデル	
			崩壊	崩壊効率（%）
自己抗原 4	0 . 1	5 2 8	7 6	1 4 . 3
自己抗原 1 0	0 . 1	3 5 2	4 8	1 3 . 6
自己抗原 1 1	1 . 3	3 5 2	4	1 . 1
自己抗原 1 2	1 . 6	1 7 6	2 9	1 6 . 5
自己抗原 5	2 . 2	7 3 6	7	0 . 9
自己抗原 1 3	2 . 6	3 5 2	5 2	1 4 . 8
自己抗原 1 4	2 . 8	3 5 2	1 8	5 . 1
自己抗原 1 5	4 . 3	3 5 2	3 9	1 1 . 1
自己抗原 1 6	4 . 5	3 5 2	3 0	8 . 5
自己抗原 1 7	4 . 6	3 5 2	3 6	1 0 . 2
自己抗原 1 8	6	1 7 6	2 4	1 3 . 6
自己抗原 2	1 5 . 1	5 2 8	6 2	1 1 . 7
自己抗原 9	1 8 . 4	4 4 0	1 1 9	2 7
自己抗原 1 9	2 4 . 5	1 7 6	2 5	1 4 . 2
自己抗原 7	2 5 . 3	7 0 4	1 2	1 . 7
自己抗原 2 0	2 5 . 7	3 5 2	4 5	1 2 . 8
自己抗原 2 1	2 6 . 2	3 5 2	3 0	8 . 5
自己抗原 6	2 8 . 9	1 7 6	1 0	5 . 7
自己抗原 3	3 9	2 8 0	1 1	3 . 9
自己抗原 1	4 5 . 7	5 2 8	3 3	6 . 3
自己抗原 2 2	5 8	1 7 6	2	1 . 1
自己抗原 2 3	8 4 . 4	3 5 2	9	2 . 6

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

マウス標的	崩壊サイズ (k b)	スクリーニン グしたクロー ン	N H E J 二対立遺伝子インデ ル	
			崩壊	崩壊効率 (%)
自己抗原 2 4	9 5 . 4	7 9 2	8	1
自己抗原 2 5	1 6 5	7 0 4	1 3	2 . 4

【 0 3 7 4 】

E S 細胞を使用した手順同様、目的の外来ヒト標的抗原に対する寛容の低いマウスを作製するために、本発明者らはまた、1細胞期胚（目的の標的においてヌル対立遺伝子にホモ接合性）を単一改変工程で迅速に作製するための方法を開発した。本発明者らは、1細胞期胚内の目的の標的における両方の対立遺伝子上の大きな欠失を一对のガイドRNAを使用して効率的に生成するための手順を最適化することにより、大きな標的化ベクター（L T V E C）を設計及び作製する必要性を除去した。加えて、1細胞期胚を使用することにより、E S 細胞株（例えば、U L C 1 - 3 9 E S 細胞株）の使用と比較して、標的マウスの作製効率を向上させることができる。この手法を使用して、目的の標的においてヌル対立遺伝子にホモ接合性であり免疫化の準備が整ったF 0 マウスを、1 5 ～ 1 6 ヶ月間ではなく4 ～ 5 ヶ月間で出産させることができる（目的の標的においてヌル対立遺伝子にホモ接合性のF 0 仔マウスを約3 ヶ月間で出産させることができる）。この実験では、ホモ接合性欠失用にこれら目的の外来標的抗原にオルソログな自己抗原を標的とするための対のガイドRNAを設計してクローニングした。自己抗原をコードする内在遺伝子の開始及び終止コドン領域を標的とするためのガイドRNAを設計した。ガイドRNAの設計プロセスについては、以下の原料及び方法に記載している。要約すると、過排卵雌を種雄と交配して胚を生成した。ほんの数匹の雄しか利用できない場合は、体外受精を使用した。雌の年齢範囲は3 ～ 1 6 週であり、ドナーあたりの卵母細胞は1 5 ～ 4 6 の範囲（中央＝3 2 個の卵母細胞）であり、ドナーあたりの接合体は5 ～ 3 2 の範囲（中央＝1 5 個の接合体）であった。機能性異所マウスA d a m 6 遺伝子（V I - 3 A d a m 6）マウス（再挿入マウスA d a m 6 遺伝子に加えて、内在マウス免疫グロブリン重鎖及び軽鎖可変領域を対応するヒトDNAへと置換した）またはユニバーサル軽鎖（U L C 1 - 3 9）マウス（ヒトV κ 1 - 3 9 / J κ 5 遺伝子セグメントである単一再構成ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を有するマウス）を含むV E L O C I M M U N E（登録商標）マウスに由来する1細胞期胚に、ガイドRNAをC a s 9 mRNAと共にマイクロインジェクション（細胞質注入）した。注入した胚の数は9 9 ～ 7 8 4 の範囲（中央＝3 3 4）であり、生存胚のパーセンテージは5 6 % ～ 7 3 % の範囲（中央＝6 3 %）であり、移植した胚の数は5 9 ～ 4 4 2 の範囲（中央＝2 2 6）であり、それぞれのプロジェクト用の仔の数は1 0 ～ 4 6 の範囲（中央＝3 2）であり、出生率は2 % ～ 5 9 % の範囲（中央＝1 3 %）であった。表7及び図29に示すように、試験した全ての自己抗原において標的欠失（すなわち、崩壊）を有する生仔を作製したが、欠失サイズは0 . 1 k b ～ 9 4 k b の範囲であり、欠失（すなわち、崩壊）のサイズと欠失（すなわち、崩壊）を有する仔マウスの作製効率の間には負の相関が認められた。

【 0 3 7 5 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 7. 胚への Cas 9 注入によるノックアウト。

自己抗原 番号	サイ ズ (k b)	齢 (週)	卵子 ドナ ー	卵子 ／ド ナー	接合 体／ ドナ ー	注入 数	E T 数	仔 数	出 生 %	エキソ ン 1 NHE J 効率	生 仔 の 崩 壊 効 率 (ヌル 仔の 数)
3	3 9	7	5	3 3	2 0	9 9	5 9	3 5	5 9 %	6 6 %	2 7 % (1 0 匹の 仔)
4	0 . 1	3 ~ 7	3 0	2 5	9 *	2 7 5	1 6 9	2 8	1 7 %	9 6 %	2 5 % (7 匹 の仔)
2 6	1 5	6 ~ 7	2 0	1 6	9 *	2 6 7	1 8 9	1 9	1 0 %	1 0 0 %	5 8 % (1 1 匹の 仔)
1 4	2 . 7	7 ~ 1 0	2 1	3 5	1 6	3 3 4	2 2 6	4 3	1 9 %	9 8 %	8 5 % (3 6 匹の 仔)
1 0	3 . 9	7 ~ 1 5	4 9	3 0	1 3	7 8 4	4 4 2	1 0	2 %	N / A	6 6 % (6 匹 の仔)
1 7	4 . 5	1 0	6	3 8	1 6	2 9 0	2 1 2	3 9	1 8 %	9 9 %	5 7 % (2 2 匹の 仔)
6	2 9	1 0 ~ 1 1	2 1	3 9	2 0	5 5 6	3 6 6	4 6	1 3 %	9 1 %	3 1 % (1 4 匹の 仔)
1	4 6	1 0 ~ 1 6	2 5	3 2	1 9	4 7 0	2 7 5	3 2	1 2 %	8 4 %	2 2 % (7 匹 の仔)
2 7	1 9 . 8	1 1 ~ 1 6	2 4	3 2	2 0	4 9 1	3 0 7	2 4	8 %	8 0 %	4 5 % (1 0 匹の 仔)
1 3	2 . 6	1 4 ~ 1 5	1 7	3 1	1 9	3 2 6	2 2 3	4 7	2 1 %	1 0 0 %	8 6 % (4 0 匹の 仔)
1 6	4 . 5	1 4 ~ 1 5	1 7	3 4	1 7	2 8 6	1 7 3	4 3	2 5 %	9 7 %	8 3 % (3 4 匹の 仔)

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

2 3	8 4	1 1 ~ 1 3	2 0	3 4	1 9	2 5 3	1 3 0	1 1	8 %	7 6 %	7 % (3 匹 の仔)
2 4	9 4	1 2 ~ 1 5	3 6	2 5	1 3	4 6 3	3 1 7	5 6	1 8 %	8 3 %	1 3 % (1 匹 の仔)
1 5	4 2	1 2 ~ 1 5	2 3	2 4	1 2	2 8 6	1 7 4	4 4	2 5 %	8 8 %	5 0 % (1 0 匹の 仔)

* I V F または三つ組（つがいによる自然交配の代わりに）

【 0 3 7 6 】

原料及び方法

ガイドRNA及びTAQMAN（登録商標）アッセイの設計：それぞれの遺伝子座におけるコンセンサスコード配列（CCDS）を基準とし、5'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNnnNNNGG3'（配列番号：2）のフォーマット（式中、Nは任意のヌクレオチド）で、23塩基対の長さを有するガイドRNA（gRNA）を設計した。最後の3つのヌクレオチド（NGG）はプロト Spacer 隣接モチーフ（PAM）であり、Cas9酵素による二本鎖平滑末端DNA開裂は5'側からNGGへと3ヌクレオチドのところ（上記の小文字残基間）で生じる。crispr.mit.edu、crispr.med.harvard.edu/sgrNAScorer/、及び、broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-designを含む様々なgRNA検索エンジンから得たスコアを基準としてgRNAを選択した。簡潔に説明すると、開始ATGの5'及び3'に接する100~150bpの配列及び終止コドンの5'及び3'に接する100~150bpをそれぞれ、両方のDNA鎖上のgRNA用にアッセイした。使用した全ての検索エンジンで高スコアを有するATG近傍の2つのgRNA（互いに25%以下だけオーバーラップする）及び終止コドン近傍の2つのgRNAについて、マウスゲノム内における固有性及びユニバーサル軽鎖（ULC、または共通軽鎖）内において一塩基多型（SNV）が無いこと、機能性異所マウスAdam6遺伝子（VI-3-Adam6）を含むVELOCIIMMUNE（登録商標）マウス、ならびにVGB6 VELOCIGENE（登録商標）マウス胚性幹細胞（ESC）株を更に照会した。上記検索仕様を使用して高スコアのガイドが見つからなかった場合には、2つの高品質なガイドが見つかるまでATGと終止コドンの周辺の別の配列を検索した。

【 0 3 7 7 】

プローブ配列がそれぞれのガイドにおけるcas9切断部位に常にオーバーラップするようなAPPLIED BIOSYSTEMS（登録商標）Custom TAQMAN（登録商標）MGBプローブを使用し、PRIMER EXPRESS（登録商標）を使用してTAQMAN（登録商標）アッセイを設計した。Biosearch Technologies Dual Labeled BHQ（登録商標）プローブ（biosearchtech.com/ProbeITy/design/inputsequence.aspx）を使用して、いくつかのTAQMAN（登録商標）アッセイも得た。Cas9がガイドにより結合された配列を切断する場合、これらのアッセイは対立遺伝子の喪失アッセイとして機能する。全てのアッセイをSNVでスクリーニングした。ガイドを以下のとおり、mGU及びmGU2（マウスゲノム上流用）ならびにmGD及びmGD2（マウスゲノム下流用）と命名した。TAQMAN（登録商標）アッセイを以下のとおり、mTGU及びmTGU2（それぞれmGU及びmGU2を包含するTAQMAN（登録商標）アッセイ用）ならびにmTGD及びmTGD2（それぞれmGD及びmGD2を包含

するTAQMAN（登録商標）アッセイ用）と命名した。ガイドmGU／mGU2及びmGD／mGD2からおおよそ等距離で、崩壊させる遺伝子座の中央に別のTAQMAN（登録商標）アッセイを設計し、mTM（マウスTAQMAN（登録商標）中央用）と命名した。この対立遺伝子の喪失アッセイは、ガイドに隣接する領域の欠失（崩壊）が生じるかどうかを明らかにする。

【0378】

mGU／mGU2（最も5'のどちらか）の200～800bp上流及びmGD／mGD2（最も3'のどちらか）の200～800bp下流に更なるTAQMAN（登録商標）アッセイを設計した。これらのアッセイをそれぞれ、retU（保持上流用）及びretD（保持下流用）と呼んだ。これらのアッセイは最大許容欠失サイズを定め、上記のSNVでスクリーニングした。

【0379】

ガイドRNAのクローニング：ガイドRNA二重鎖を設計して合成した。U6プロモーターはグアニンで始まるのが好ましいことから、配列が既にグアニンで始まっていない場合には、5'にグアニンを付加した。凍結乾燥gRNA二重鎖を100μMとなるように滅菌水に再懸濁させ、以下のライゲーション反応液、14.5μL PCR用水；2μL 10X T4 DNAリガーゼ緩衝液（NEB）、1μL pMB_s gRNA_BsmBIベクター（約60ng）、1μL gRNA二重鎖（100μM）、及び1.5μL T4 DNAリガーゼ（40U／μL；NEB）、を0.5mL微量遠心チューブ内にセットアップした。その後、ライゲーション反応液を室温で1時間インキュベートしてから、TOP10細胞を用いた形質転換反応にその反応液を使用した。その後、コロニーを選択してPCRで確認してからシーケンシングを行った。

【0380】

BTX（登録商標）エレクトロポレーションプロトコル：ガイド混合液を、以下、10μgのそれぞれのsgRNAプラスミド、及び5μgのCas9野生型プラスミドのとおり調製した。エレクトロポレーションの実施日、エレクトロポレーションプロセスの半時間～1時間前に細胞をES培地に供給した。その後、細胞をPBSで2回洗浄し、0.25%トリプシン-EDTAを加えてから、細胞を37℃で15分間インキュベートした。インキュベーション後にプレート（複数可）を軽くたたき、ES培地を加えてトリプシンを中和し、細胞を4回優しくピペティングして細胞集塊を剥がしてからゼラチンプレート（複数可）に移し、細胞を37℃で20分間インキュベートした。プレート（複数可）を揺らしてから培地で1回穏やかに洗浄し、その後、全ての細胞を15mLチューブに移してから1200rpmで5分間遠心した。全てのペレットを10mLのPBS内で混ぜ合わせてから、細胞をカウントし、必要に応じて希釈した。20μL容量の細胞懸濁液をCELLOMETER（登録商標）スライドに添加し、Nexcelom CELLOMETER AUTO T4（商標）Cell Viability Counterを使用してカウントした。その後、チューブを1200rpmで5分間遠心分離にかけた。それぞれのエレクトロポレーションに7.5x10⁶個の細胞を使用して、エレクトロポレーション緩衝液中にペレットを再懸濁させた。それぞれのチューブの容量が120μLとなるように、微量遠心チューブ内のガイド混合液へと細胞を加えた。チューブを2～3回攪拌し、大きな開口部先端を使用して96ウェルエレクトロポレーションキュベット（2mmギャップ）に移してから、キュベットを密閉した。BTX（登録商標）ECM（登録商標）630 Electroporatorを使用して、700V、400Ω、25μFで電気パルスを印加した。その後、キュベットを氷上で10分間インキュベートした。それから、エレクトロポレーションした細胞を深いウェルプレートに移した（キュベットを氷上に置いて0.8mL／ウェルで加えた）。それぞれのプレート内に25mLの培地を投入した2x15cmゼラチンプレートに細胞を播種した。1μg／mLのピューロマイシンで開始して一過性の選択を3日間行い、エレクトロポレーションから10日後まで培地を非選択培地に交換してから、その時点でコロニーを選択した。

【0381】

NUCLEOFECTOR (登録商標) エレクトロポレーションプロトコル: エレクトロポレーションの実施日、エレクトロポレーションプロセスの半時間~1時間前に細胞をES培地に供給した。その後、細胞を10mL PBSで2回洗浄し、2mLの0.25%トリプシン-EDTAを加えてから、細胞を37℃で15分間インキュベートした。インキュベーション後にプレート(複数可)を軽くたたき、8mLのES培地を加えてトリプシンを中和し、細胞を4回優しくピペッティングして細胞集塊を剥がしてからゼラチンプレート(複数可)に移し、細胞を37℃で20分間インキュベートした。プレート(複数可)を揺らしてから培地で1回穏やかに洗浄し、その後、全ての細胞を15mLチューブに移してから90 X gで3分間遠心した。ペレットを10mLのPBS中に再懸濁させてから、細胞をカウントし、必要に応じて希釈した。20μL容量の細胞懸濁液をCELLLOMETER (登録商標) スライドに添加し、Nexcelom Vision CBA Systemを使用してカウントした。合計2 x 10⁶個の細胞をアリコートし、EPPENDORF (登録商標) チューブを用いて90 X gで3分間遠心分離にかけた。その後、総容積が100μLとなるように5μgのCas9野生型プラスミド及び2.5μgのそれぞれのsgRNAプラスミドと混合したLONZA (登録商標) P4緩衝液中にペレットを再懸濁させた。それから、細胞を大きなLONZA (登録商標) キュベットに移した。LONZA (登録商標) 4D-NUCLEOFECTOR (商標) 及びプログラムCP-105を使用して電気パルスを印加した。400μL容量の新鮮なES培地を加えてから、細胞を新しいEPPENDORF (登録商標) チューブに移して混合した。その後、10mLのES培地を含む2 x 10cmゼラチンプレートに細胞を播種した。EPから2日後にピューロマイシン(1.5μg/mL)で開始して一過性の選択を2日間行った。選択後、エレクトロポレーションから10日後まで非選択培地を使用してから、その時点でコロニーを選択した。

【0382】

スクリーニング: ガイドmGU、mGU2、mGD及びmGD2を用いたCas9による切断について、TAQMAN (登録商標) アッセイmTGU、mTGU2、mTGD及びmTGD2を使用して評価した。コピー数が2(親、未改変対照DNA)から1へと減少した場合に、一方の対立遺伝子における切断(もう一方ではない)が確認された。アッセイがゼロのコピー数を生じた場合に、Cas9によるホモ接合性開裂が確認された。ATGと終止コドンの近傍のCas9切断が介在配列の除去を保証しないことから、mTMアッセイ数が2(親)からそれぞれ1またはゼロになった場合に、ヘテロ接合性崩壊及びホモ接合性崩壊と評価した。最後に、retUアッセイ及びretDアッセイを使用して欠失サイズの外側許容限度を設定した。保持アッセイでは、親と同様にコピー数2を有し、インタクト(保持された)を維持したままであった。

【0383】

アッセイmTGU、mTGU2、mTM、mTGD及びmTGD2またはこれらのいくつかの組み合わせを使用して、mGU、mGU2、mGD及びmGD2またはこれらのいくつかの組み合わせのエレクトロポレーション後に得られたESCクローンに対して、Cas9開裂及び/または崩壊で1回目のスクリーニングを行った。retU及びretDを使用して、全てのアッセイにおいてゼロのコピー数であるコロニーを更にスクリーニングし、retU及びretDにおいて2のコピー数のコロニーのみを更なるアッセイへと進めた。

【0384】

マウス胚性幹細胞の一次スクリーニング及び再確認スクリーニング: TAQMAN (登録商標) LOA(対立遺伝子の喪失)マルチプレックス(4プレックス)qPCRにより、改変mESCコロニーを標的遺伝子座のホモ接合性欠失でスクリーニングした。スクリーニングの初回パス(一次)で、2枚の96ウェルプレートの1~11列目に176の固有クローンのDNAを単離した。12列目には、同一mESC親株からあらかじめ単離した野生型ES細胞DNAを満たし、スクリーニングするそれぞれのDNAプレートが88の改変クローン及び8つの標準物質クローンを含有するようにコピー数の標準物質として

使用した。それぞれのクローンのDNAを4倍の384ウェルプレートに分注し、標的遺伝子の相対的な上流、中央及び下流領域内におけるコピー数を同時に定量するために使用するFAM、VIC、ABY及びQuasarのTAQMAN（登録商標）プローブを用いて、DNA濃度を校正するためのQuasar増幅Wnt-2bを用いて、単一の反応混合液内における標的遺伝子座の3つの領域にわたるホモ接合性LOAについてアッセイした。コピー数を定量した後、標的遺伝子座にわたる3つのアッセイ全てのゼロコピーを有する「最良」品質クローンのうちの最大8つを続く増殖拡大、再播種用を選択し、増殖レパートリーのコピー数アッセイ（再確認）を実施した。それぞれの増殖クローンを播種し、96ウェルプレートの1行（A～H）の最初の6列を占める6つの複製のDNAを単離してから、使用する別のアッセイ用の別の遺伝物質及びデータ複製を得た。一次スクリーニングに使用したアッセイを繰り返して一次遺伝子型を確認し、保持アッセイを使用して欠失の長さを測定した。保持アッセイは欠失の標的となる領域のすぐ上流及びすぐ下流に配置され、通常は、同等の2つの複製であった。別のアッセイを使用して、マウス免疫グロブリン重（IgH）及びカッパ（Igκ）遺伝子座における親ESC遺伝子型（IgHマウス及びIgκマウスのLOA、ならびにヒト化のGOA）を確認した。

【0385】

Cas9媒介対立遺伝子を同定するための次世代シーケンシング（NGS）：標準的な塩析法を使用して、Cas9改変F0マウスの小さい尾部生検からゲノムDNAを抽出した。それぞれの標的遺伝子座用に、以下の要件、（1）アンプリコンサイズは280～380bp長である、（2）gRNA開裂部位は、より大きな挿入／欠失（インデル）に対応するために少なくとも35bp離れたプライマーによるPCR産物内の中央に配置される、（3）62～65℃の融解温度（Tm）を有し、3'末端上に2bpのCGクランブを有するプライマーの長さは22～25bpである、及び（4）プライマーはBALB/c、C57BL/6または129系統の一塩基多型のゲノム配列に対して確認される、に従いPCR用プライマーを設計した。それから、ILLUMINA（登録商標）が提供する特定のユニバーサルアダプター配列を遺伝子座特異的配列に付加した。得られたアンプリコンをアガロースゲル上で可視化し、THERMO FISHER SCIENTIFIC（登録商標）SEQUALPREP（商標）Normalization Plate Kitを使用して精製／標準化した。Qubit（登録商標）で産物を定量して、それぞれの産物の1ngを、NEXTERA（登録商標）プライマー及びNEXTERA（登録商標）PCRマスターミックスを用いる別のPCRによるバーコード化のためのプレートとして使用した。サーモサイクラー内、72℃で3分間、95℃で30秒間、{95℃で10秒間、55℃で30秒間、72℃で30秒間}を12サイクル、72℃で5分間、及び10℃の静置で、PCRを実施した。得られたバーコード化PCR産物をAMPURE（登録商標）XPビーズで精製し、Nextera（登録商標）XTキット内のILLUMINA（登録商標）標準化ビーズを使用して標準化してからプールし、シーケンシング及び生データ収集のためにMISEQ（商標）にロードした。

【0386】

8細胞期マウス胚のマイクロインジェクション：滅菌35mm培養ディッシュ蓋に約2mLの標準ES細胞培地（-LIF）を加え、濾過済みミネラルオイルで覆った。マウスピペットを使用してディッシュの下半分にES細胞を播種した。ディッシュ上部に凍結保存8細胞期SW宿主胚を付着させた。インジェクション中における胚の損傷の最小化を補助するために、ホールディングピペットに対して軽く叩くことで新しいインジェクションピペットの先端を丸くした。形態及び輝度を基準としてES細胞を選択してから、インジェクションピペット内に採集した。割球間の空間が3時の位置となるように、ホールディングピペット上に胚を位置決めした。3時の位置で帯を慎重に穿刺してそのスポットに細胞を蓄積させることにより、胚の囲卵腔にES細胞を導入した。胚あたり合計7～9個のES細胞を導入した。濾過済みミネラルオイルで覆ったKSOM胚培養液のドロップを含有する35mmディッシュに注入胚を置いてから、37.0℃、7.5%CO₂で一晩胚を培養した。翌朝、偽妊娠雌に胚を外科的に移植した。

【0387】

実施例2．開始コドンの領域を標的とする複数のガイドRNAを使用した、抗体産生用のKO ES細胞及びマウスの作製。

目的の外来標的抗原に対する寛容の低いマウスを作製するための別の実験では、ホモ接合性欠失用にこれら目的の外来標的抗原にオルソロガスな自己抗原を標的とするための3つのガイドRNAを設計してクローニングした。自己抗原をコードする内在遺伝子の開始コドンを含むオーバーラップ領域を標的とするための3つのオーバーラップしたガイドRNAを設計した（図5を参照のこと）。ユニバーサル軽鎖（ULC 1-39）マウス（（i）単一ヒト生殖細胞系V κ 配列及び単一ヒト生殖細胞系J κ 配列を含む再構成V κ /J κ 配列の内在マウス κ 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入（再構成V κ /J κ 配列は内在マウス κ 定常領域と機能的に連結する）、及び（ii）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た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をそれらの生殖細胞系内に含むマウス）に由来するES細胞内に、ガイドRNAをCas9と共にエレクトロポレーションまたはヌクレオフェクションした。一部の実験では、欠失させる自己抗原をコードする内在遺伝子を標的とする大きな標的化ベクター（LTVEC）と共に、Cas9及び3つのガイドRNAをエレクトロポレーションした（例えば、図5を参照のこと）。CRISPR/Cas9（CC9）と組み合わせてLTVECを使用することにより、標的遺伝子座における二対立遺伝子変異を得る可能性が著しく高まる（表8を参照のこと）が、LTVEC及びCRISPR/Cas9による標的化には偽陽性を除外するためにはるかに多くのスクリーニングが必要となる。

【0388】

【表8】

表8．二対立遺伝子欠失効率。

自己抗原	親ESC	EPタイプ	スクリーニングしたコロニー	二対立遺伝子改変を有するクローン	効率 (%)
自己抗原8 (膜貫通)	ULC 1-39 F2	LTVEC + CC9	384	111	28.9
		CC9	192	28	14.6

【0389】

実施例3．マウスの免疫化及び免疫原に対する血清抗体応答の解析。

免疫化

機能性異所マウスAdam6遺伝子（VI-3）を含むVELOCIIMMUNE（登録商標）マウス、ユニバーサル軽鎖（ULC 1-39）マウス（（i）単一ヒト生殖細胞系V κ 配列及び単一ヒト生殖細胞系J κ 配列を含む再構成V κ /J κ 配列の内在マウス κ 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における挿入（再構成V κ /J κ 配列は内在マウス κ 定常領域と機能的に連結する）、及び（ii）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た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をそれらの生殖細胞系内に含むマウス）、KO（ノックアウト）/VI-3マウス（外来標的抗原にオルソロガスな自己抗原をノックアウトしたVI-3マウス）、及びKO/ULC 1-39マウス（外来標的抗原にオルソロガスな自己抗原をノックアウトしたULC 1-39マウス）を、様々な免疫原（例えば、タンパク質など）を使用して、多数の膜貫通標的で免疫化した。免疫化の開始前に、マウスから免疫前血清を採取した。標準的なアジュバントを使用して、合計3〜6回のブーストで、異なる時間間隔の異なる経路でマウスをブーストした。定期的にマウスの採血を行い、対応する抗原に対する抗血清力価を評価した。標的8の例では、足蹠経路により、マウスFcタグを有する標的8の組換え細胞外ドメインでマウスを免疫化し

た。力価は、2回目の採血（一次に続き、ULC 1-39の+6回のブースト）または3回目の採血（一次に続き、自己抗原-8-KO/ULC 1-39の+3回のブースト）由来であった。

【0390】

抗血清力価の測定

ELISAを使用して、対応する免疫原に対する血清中抗体力価を測定した。リン酸緩衝生理食塩水（PBS、IRVINE SCIENTIFIC（登録商標））中の対応する標的抗原を用いて、96ウェルマイクロタイタープレート（THERMO SCIENTIFIC（登録商標））を2 µg/mLで一晩コーティングした。0.05% Tween 20を含有するリン酸緩衝生理食塩水（PBS-T、SIGMA-ALDRICH（登録商標））でプレートを洗浄してから、PBS中の250 µL 0.5%ウシ血清アルブミン（BSA、SIGMA-ALDRICH（登録商標））を用いて、室温で1時間ブロッキングした。PBS-Tでプレートを洗浄した。免疫前血清及び免疫抗血清を0.5% BSA-PBS中で3倍に系列希釈し、室温で1時間プレートに加えた。プレートを洗浄してから、ヤギ抗マウスIgG-Fc-西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）をコンジュゲートした二次抗体（Jackson ImmunoResearch）をプレートに加え、室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄してから、TMB/H₂O₂を基質として使用して20分間インキュベートすることにより進展させた。酸で反応を停止させてから、分光光度計（VICTOR（登録商標）、PERKINELMER（登録商標））を用いて、450 nmでプレートを読んだ。GRAPHPAD PRISM（登録商標）ソフトウェアを使用して抗体力価を算出した。標的8の例では、使用した力価抗原は、Myc-Myc-Hisタグを有するヒト標的8の組換え細胞外ドメインであった。

【0391】

結果

異なる膜貫通標的で免疫化することにより、VI-3、ULC 1-39、KO/VI-3及びKO/ULC 1-39マウスにおける体液性免疫応答を調査した。KO/VI-3及びKO/ULC 1-39系統の免疫化した全ての標的において、高い抗体力価が誘導された。力価はまた、マウスのVI-3及びULC 1-39系統で高かった。しかしながら、一般的に、KO系統はより高い力価応答を有するようであった。誘導された免疫応答については、抗原結合吸光度がバックグラウンドと比較して2倍超高い、血清希釈の最高倍率の逆数と定義される抗体力価として、表9に示している。それゆえ、数値が高いほど、免疫原に対する体液性免疫応答はより高くなる。合計で、KO系統における16標的超が成功裏に免疫化されている。標的1及び標的9に対するBST及びハイブリドーマプラットホームにより、また標的4及び標的5に対するBSTにより、モノクローナル抗体が単離されており、これら抗体の更なるキャラクタリゼーションについては進行中である。ULC 1-39及び自己抗原-8-KO/ULC 1-39マウスにおける、1つの目的のヒト標的抗原（標的8；上記のマウス自己抗原8にオルソログス）に対する抗体産生のデータについては、表9及び図6に提供している。F0 KOマウスは、標的に対する中央抗体力価に示すとおり、野生型ULC 1-39マウスと比較して、タンパク質誘発に対する約5倍超高い応答を誘導した。表9はまた、抗原に特異的に結合する抗体の数を提供している（バックグラウンド吸光度と比較して2倍の吸光度）。同様の結果を、VI-3マウスと比較した自己抗原-9-KO/VI-3マウスについて示している。図30A及び図30Bを参照されたい。この実験では、皮内経路で、野生型標的9をコードするDNAのいずれかを用いて、野生型VI-3-Adam6マウス及び自己抗原-9-KO/VI-3-Adam6マウスを免疫化した。標的9を発現するように遺伝子改変された細胞または親VI-3 T3細胞を使用して、力価を測定した。VI-3-Adam6マウスの抗体力価が対照と同様に低いのにに対して、自己抗原-9-KO/VI-3-Adam6マウスにおける抗体力価は著しく上昇した。このことは、KO/VI-3系統とKO/ULC系統の両方が強力な免疫応答を誘導していることを示している。

【0392】

【表 9】

表 9. ULC 1-39 系統及び KO/ULC 1-39 系統における免疫応答の比較。

標的	標的に対する中央抗体力価		抗原に陽性なモノクローナル抗体	
	KO/ULC 1-39 (n=5)	ULC 1-3 9 (n=10)	KO/ULC 1-39 (n=2)	ULC 1-3 9 (n=2)
標的 8	986, 890	200, 387	76	61

【0393】

実施例 4. マウスの免疫化ならびに抗体多様性及び V 遺伝子セグメント使用の解析。

機能性異所マウス Adam6 遺伝子 (VI-3) を含む VELOCIMMUNE (登録商標) マウス及び自己抗原-3-KO (ノックアウト) / VI-3 マウスを標的 3 で免疫化した。免疫化の開始前に、マウスから免疫前血清を採取した。標準的なアジュバントを使用して、合計 3~6 回のブーストで、異なる時間間隔の異なる経路でマウスをブーストした。定期的にマウスの採血を行い、対応する抗原に対する抗血清力価を評価した。

【0394】

野生型 VI-3 マウス及び自己抗原-3-KO VI-3 マウスの脾臓から B 細胞を単離してから、抗体をシーケンスして V 遺伝子使用を定量した。単一抗原に陽性な B 細胞から VH ドメイン及び VL ドメインをコードする DNA を直接単離してシーケンスした。例えば、US7, 582, 298 を参照されたい (その全体はあらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。野生型 VI-3 マウスの V 遺伝子使用データを表 10 に示し、自己抗原-3-KO VI-3 マウスの V 遺伝子使用データを表 11 に示している。表 10 及び表 11 に示すとおり、野生型 VI-3 マウスと比較して、自己抗原-3-KO VI-3 マウスに、重鎖 V 遺伝子セグメントと軽鎖 V 遺伝子セグメントの両方の使用におけるより大きな多様性が認められた。例えば、野生型 VI-3 マウスにおける抗体では、4 つの重鎖 V 遺伝子セグメント及び 6 つの軽鎖 V 遺伝子セグメントのみが使用され、抗体の 79% が IgH V4-59 及び Igk V1-12 V 遺伝子セグメントを使用していた。それに対し、自己抗原-3-KO VI-3 マウスにおける抗体では、6 つの重鎖 V 遺伝子セグメント及び 10 の軽鎖 V 遺伝子セグメントが使用され、最も一般的な使用組み合わせ (IgH V3-23 と Igk V4-1) でも抗体の 42% を占めるに過ぎなかった。

【0395】

【表 10-1】

表 10. 野生型 VI-3 マウスにおける標的 3 に対する抗体の V 遺伝子使用。

W	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	V	合計
T	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	κ	
V	κ	κ	κ	κ	κ	κ	κ	κ	κ	κ	κ	κ	
I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	配	
3	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	4	列無	

10

20

30

40

50

【表 10-2】

マウス	5	9	12	16	17	33	39	11	15	20	1		
I g H V 1 — 1 8													0
I g H V 3 — 1 1								1				2	3
I g H V 3 — 2 3			29										29
I g H V 3 — 3 3													0
I g H V 3 — 7													0
I g H V 3 —										1			1

10

20

30

40

50

【表 10-3】

9													
I g H V 4 - 5 9	3	1	1 5 0			2							1 5 6
V H 配 列 無			1										1
合 計	3	1	1 8 0	0	0	2	0	1	0	1	0	2	1 9 0

10

【0396】

【表 11-1】

表 11. 自己抗原-3-KO V I-3 マウスにおける標的 3 に対する抗体の V 遺伝子使用。

KO V I 3 マウス	I g κ V 1 - 5	I g κ V 1 - 9	I g κ V 1 - 1 2	I g κ V 1 - 1 6	I g κ V 1 - 1 7	I g κ V 1 - 3 3	I g κ V 1 - 3 9	I g κ V 3 - 1 1	I g κ V 3 - 1 5	I g κ V 3 - 2 0	I g κ V 4 - 1	V κ 配 列 無	合 計
I g H V 1 - 1 8						2							2
I g H V 3 - 1 1	1		1										2
I g H V 3 - 2 3		3 3			2	1					5 6		9 2
I g H V 3 - 3 3			1				2						3
I g H V 3 - 7											1		1
I g H V 3 - 9													0
I g H V 4 -	4	1	3	3	1	8	6		1	4			3 1

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

5 9													
V H 配 列 無			1										1
合計	5	3 4	6	3	3	1 1	8	0	1	4	5 7	0	1 3 2

【0 3 9 7】

加えて、マウス自己抗原 3 に対する交差反応性を有する抗体（すなわち、ヒト標的 3 とマウス自己抗原 3 の両方に結合する抗体）を自己抗原 - 3 - K O V I - 3 マウスに産生させた（例えば、表 1 2 を参照されたい）。V I - 3 マウスと U L C 1 - 3 9 マウスの両方における自己抗原 4 及びヒト標的 4 に、同様の結果が認められた。図 3 1 A 及び図 3 1 B を参照されたい。この実験では、足蹠経路を使用して、H i s タグを付加したヒト標的 4 タンパク質及び／または H i s タグを付加したマウス自己抗原 4 タンパク質（H i s タグを付加した）で自己抗原 - 4 - K O / V I - 3 - A d a m 6 マウス及び自己抗原 - 4 - K O / U L C 1 - 3 9 マウスを免疫化した。H i s タグを付加したヒト標的 4、H i s タグを付加したマウス自己抗原 4、または H i s タグを付加した F e l d 1（対照）を被覆抗原として使用し、力価を測定した。

【0 3 9 8】

マウス自己抗原 3 と標的 3 の間に共有されている（またはマウス自己抗原 4 とヒト標的 4 の間に共有されている）エピトープに対する抗体を産生する能力は、抗体のプールを増殖させるために有利であり、野生型 V I - 3 マウスでは、マウス自己抗原 3 に対する交差反応性を有する抗体は産生されなかった。加えて、交差反応抗体の薬物動態特性は、野生型マウスにおける内在自己抗原とのそれらの交差反応ゆえに、インビボでより容易に試験することができる。したがって、このような交差反応抗体の標的抗原（例えば、ヒト標的抗原）を発現するように遺伝子組換えされたマウスを作製する必要はなくてもよい。

【0 3 9 9】

【表 1 2】

表 1 2. 自己抗原 - 3 - K O V I - 3 マウスが産生した自己抗原 3 に対する交差反応性を有する抗体。

V H	V κ	抗体の数
I g H V 3 - 2 3	I g κ V 1 - 1 7	2
I g H V 3 - 2 3	I g κ V 1 - 9	1
I g H V 3 - 2 3	I g κ V 4 - 1	5 5
I g H V 4 - 5 9	I g κ V 3 - 2 0	1

【0 4 0 0】

実施例 5. 1 つのガイド RNA または 2 つのガイド RNA を使用した C R I S P R / C a s 9 媒介標的化。

原料及び方法

E S 細胞培養、スクリーニング及びエレクトロポレーション

本明細書に記載の実験は、V G F 1、本発明者らの C 5 7 B L 6 N T a c / 1 2 9 S 6 S v E v F 1 ハイブリッド X Y E S 細胞株を用いて実施した（Poueymirou et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25:91-99; Valenzuela et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:652-659）。上記のとおり E S 細胞を培養した（Matise et al. (2000) in Joyner, A. L. ed. Gene Targeting: a practical approach, pp. 100-132, Oxford University P

ress, New York)。雌C57BL/6NTacマウスを雄129S6/SvEvTacマウスと交配してC57BL6(X^{B6})/129S6(Y^{129})マウスを作製することにより、VGF1細胞を作製した。図7を参照されたい。

【0401】

2mmギャップのキュベット内、最終容量0.12mlの7.5百万個の細胞を用いてエレクトロポレーション(EP)を実施した。BTX ECM 630エレクトロポレーションシステム(Harvard Apparatus, Holliston, MA)を使用したEPの電気条件は、700V、400オームの抵抗、及び25マイクロFの静電容量であった。EPあたりのLTVECの量は0.0015mgであり、Cas9発現プラスミドは0.005mgであり、sgRNA発現プラスミドは0.010mgであった。LTVECが発現するネオマイシン耐性を選択することなくクローンの選択を可能とするピューロマイシン耐性を付与した100ngのプラスミドを追加して、いくつかのEPを実施した。EP後、2枚の15cmゼラチンディッシュに細胞を播種して、培地を毎日交換した。100ug/mlのG-418硫酸塩または0.0015mg/mlのピューロマイシンのいずれかを含有する選択培地をEPから48時間後に開始し、EPから10日後まで継続した。PBS内でコロニーを選択してから、0.05%トリプシンを含有する96ウェルディッシュに加えて15分間解離させ、培地で中和し、スクリーニング用DNAの単離に使用した。

10

【0402】

対立遺伝子の改変法(Frendewey et al. (2010) Methods Enzymol. 476:295-307)を使用して、正確に標的化されたES細胞クローンの同定及びマウス対立遺伝子の遺伝子型決定を行った。

20

【0403】

ガイド配列の設計

Lrp5の欠失部またはその他の標的遺伝子の内側50bp、100bp、500bpまたは1kb位置を囲む約200bpのDNA(上流と下流の両方)をCRISPR design tool(crispr.mit.edu)に入力し、可能なgRNA配列を取得した。それから、潜在的なgRNA配列をフィルタリングして、それらgRNA配列がLTVEC内のヒト化インサートではなく内在DNAの切断のみを可能とすることを確保した。

30

【0404】

単一ガイドRNAのクローニング

sgRNAについては、シームレスなRNA発現のために二重鎖オリゴ(IDT)をBsmBI部位において77bpスキャフォールドに融合したpMB__sgRNA(U6プロモーター)にクローニングするか、または、GeneCopoeia製の承認済み発現プラスミド(LRP5ガイドA、B、B2、E2、E及びF)として購入するかのいずれかとした。インハウスで作製したプラスミドについては、PCR及びサンガーシーケンシングにより確認を行った。

【0405】

遺伝子型確認用DNAテンプレート

ES細胞、標的化ベクターならびにCas9を発現するプラスミド及びいくつかのガイドRNA(gRNA)のうちの1つを発現するプラスミドまたは異なるgRNAの組み合わせを発現する2つのプラスミドをエレクトロポレーションしたES細胞由来のクローン、からDNAを精製した。対立遺伝子の改変(すなわち、対立遺伝子の喪失または対立遺伝子の獲得)定量的PCRアッセイにより、マウス標的遺伝子座の標的欠失及び標的化ベクターの挿入を有するまたはCas9/gRNA誘導欠失を有すると同定されたクローンを、通常のフォローアップPCRアッセイ用に選択した。

40

【0406】

オリゴヌクレオチドの設計

それぞれの組み合わせのgRNA用に2つのPCRアッセイを設計した。第1のPCR

50

は、異なる gRNA の組み合わせにおけるガイド RNA 認識配列間の崩壊を検出するための欠失アッセイであった。第 2 の PCR アッセイ (5' アッセイ) は 2 つの PCR アッセイを含んでいた。第 1 は、ヒト化対立遺伝子用の 5' ヒトアッセイであり、マウス-ヒト接合部にわたるように設計された。第 2 は、内在マウス対立遺伝子用の 5' マウスアッセイであり、5' 標的欠失接合部にわたるように設計された。

【0407】

PCR 反応及び TOPO クローニング

TaKaRa LA Taq DNA Polymerase (Cat. # RR002M) を使用して ES 細胞 DNA テンプレートを増幅した。それぞれの PCR アッセイ反応混合液を水陰性対照と共にランした。アッセイ混合液は、以下、0.005 mL の ES 細胞 DNA テンプレート、1X LA PCR Buffer II (Mg^{2+} plus)、0.01 mM の dNTP 混合液、0.0075 mM の Forward Oligo (それぞれ)、0.0075 mM の Reverse Oligo (それぞれ)、5000 ユニット/mL の LA Taq Polymerase、及び 0.025 mL の ddH₂O、を含

10

【0408】

PCR Thermocycle プログラムは、94℃で1分間；続いて、増幅 kb あたり、94℃で30秒間、60℃アニーリンググラジエントで30秒間、及び68℃で1分間を35サイクル；続いて、72℃で10分間重合、で構成されていた。

【0409】

Invitrogen 1kb plus DNA ラダー (Cat. # 10787-018) 及び／または Invitrogen 50bp DNA ラダー (Cat. # 10416-014) を含む 2% アガロースゲル上の電気泳動により、PCR 産物を分離した。シーケンシング用 Invitrogen's TOPO TA クローニングキット (Cat. # K4575-02) の取扱説明書に従い、残りの PCR 産物を pCR4-TOPO Vector にクローニングした。クローニング反応物を One Shot Top10 細胞へと化学的に形質転換し、0.06 mg/mL の X-gal 及び 0.025 mg/mL のカナマイシン寒天平板上に播種した。

20

【0410】

シーケンシング

0.025 mg/mL のカナマイシンを含有する LB に白色コロニーを接種し、振盪させながら 37℃で一晩インキュベートした。それぞれのコロニーは、アッセイ産物の集団由来の 1 つのアンプリコンを示していた。QIAGEN プラスミドミニプレップキット (Cat. # 12123) を使用して、それぞれの細菌培養物から DNA を抽出した。0.002 mL の TOPO クローン PCR、1x PCRx Enhancer Solution (10x stock) (Cat. # X11495-017)、0.0075 mM のオリゴ (M13F または M13R)、及び 0.015 mL の ddH₂O、を含むシーケンシング反応混合液を用いて、インサートの DNA 配列を同定した。

30

【0411】

シーケンシング解析

シーケンシング結果から不明配列及び pCR4-TOPO Vector 配列をトリミングし、PCR インサート配列を単離した。それから、シーケンスしたフラグメントを参照にアラインし、変異を解析した。

40

【0412】

崩壊クローンのシーケンシング

製造業者の取扱説明書 (Invitrogen cat. # K4575-02) に従い、崩壊陽性クローン由来の PCR 産物を pCR4-TOPO Vector にクローニングし、その後、One Shot Top10 細胞へと化学的に形質転換し、0.060 mg/mL の X-gal 及び 0.025 mg/mL のカナマイシン寒天平板上に播種した。QIAGEN プラスミドミニプレップキット (Cat. # 12123) を使用して、細

50

菌培養物からDNAを抽出した。その後、インサートシーケンシング結果を予測崩壊参照にアラインし、インデル変異を解析した。Cas9がPAMから3塩基対を開裂させてgRNAが認識する配列にすることが予測された。参照から予測開裂部内の配列を欠失させ、残りの配列を使用して結果にアラインした。

【0413】

一塩基多型 (SNV) 用TAQMAN (登録商標) 対立遺伝子識別アッセイ

TAQMAN (登録商標) 対立遺伝子識別反応液は、ゲノムDNA、それぞれの多型に特異的なプローブ／プライマー、及びTAQMAN (登録商標) 遺伝子発現PCRマスターミックス、を含有する0.008mlであった。プローブはLife Technologies (Thermo) から取り寄せ、プライマーはIDTから取り寄せた。対立遺伝子129用のプローブをVIC色素で標識し、対立遺伝子B6用のプローブをFAM色素で標識した。それぞれのTAQMAN (登録商標) 対立遺伝子アッセイを4倍の384ウェルプレートで実施し、Applied Biosystems ViiA 7プラットフォームでランした。SNV PCRサイクリングプログラムは、以下、95℃で10分間に続いて、95℃で15秒間、60℃で60秒間、及び60℃で30秒間を40サイクル、のとおりであった。ViiA 7 Software v1.1を使用して、ランの解析及び結果の評価を実施した。

【0414】

FISH解析

Cell Line Genetics (Madison, Wisconsin) または Van Andel Institute (Grand Rapids, Michigan) のいずれかにおいて、それらの標準的な方法による蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) を使用して、選択したES細胞クローンを解析した。本発明者らは、マウス及びヒトのBACを2色解析用プローブとして提供した。

【0415】

高いゲノム崩壊及び／または標的遺伝子座のヒト化

げっ歯類遺伝子の全てまたは一部の単一工程欠失及び任意選択的にそのヒト相同体の全てまたは一部への同時置換を正確に達成するために、本発明者らはエレクトロポレーションにより、以下の核酸分子、(1) LTVEC、(2) Cas9エンドヌクレアーゼをコードするプラスミドまたはmRNA、及び(3) 1つまたは複数のCRISPR単一ガイドRNA (gRNA) またはgRNA自体をコードする1つまたは複数のプラスミドを、げっ歯類ES細胞に導入した。それぞれの実験では、LTVECを直鎖化した。一部の実験では、LTVECは、げっ歯類遺伝子を欠失させてヒト遺伝子を挿入する相同組換え事象を誘導するように設計された、げっ歯類DNAのホモロジーアームに隣接する遺伝子産物(タンパク質またはRNA)をコードするヒト遺伝子の全てまたは一部を含んでいた。その他の実験では、別々の遺伝子座、例えば、Ch25h遺伝子座などを標的とするようにLTVECを設計した。いずれの例においても、LTVECはまた、抗生剤(例えば、G418)への耐性を付与する酵素(例えば、ネオマイシンリン酸基転移酵素)の発現を誘導する薬剤選択カセットを保持していた。

【0416】

LTVECを取り込んでそのゲノム内に組み込んだES細胞は、抗生剤を含有する増殖培地を入れた組織培養ディッシュ上で増殖してコロニーを形成することができた。本発明者らがLTVEC分子と比較して500~1,000倍超のCRISPR/Cas9コード及びgRNAコード核分子を導入したため、LTVEC含有薬剤耐性コロニーの大部分はまた、少なくとも一時的にCRISPR/Cas9構成要素を含有していた。本発明者らは、薬剤耐性コロニーを選択してから、対立遺伝子の改変法 (Valenzuela et al. (2003) Nat. Biotech. 21:652-660; Frendewey et al. (2010) Methods Enzymol. 476:295-307 (その全体は参照として本明細書に組み込まれる)) を用いてそれらをスクリーニングし、正確に標的化されたヒト化対立遺伝子を有するクローンを同定した。加えて、L

10

20

30

40

50

LTVECのホモロジーアーム内配列を認識するリアルタイムPCRアッセイ（保持アッセイと呼ばれる）を使用して、LTVECのマウスゲノムへの正確な標的化を確認した。これら保持アッセイのコピー数を定量することにより、正確に標的化されたESクローン（2のコピー数を保持）と、標的マウス遺伝子座の大きなCas9誘導欠失がゲノム内の他の箇所におけるLTVECのランダム導入と同時に起こるクローン（その場合、保持アッセイは3（またはそれ以上）のコピー数を有する）の識別を補助するための更なる明確性がもたらされた。対のgRNAが標的マウス遺伝子座に大きなCas9媒介欠失を生成する機能は、更なる明確性をもたらして正確な標的化を確認するために上記の標準的なLOA及びGOAアッセイが保持アッセイにより補完され得ることを意味した。それゆえ、保持アッセイは設計されて、LOA及びGOAアッセイと共に使用された。

10

【0417】

それぞれの実験では、1つまたは2つのgRNAのいずれかを使用した。単一で使われるgRNAは、標的遺伝子座（すなわち、標的マウス遺伝子欠失）の5'末端近傍、標的遺伝子座の中央近傍、または標的遺伝子座の3'末端近傍において、Cas9開裂を誘導した。2つのgRNAを使用した場合、一方のgRNAは標的遺伝子座の5'末端近傍のCas9開裂を誘導し、もう一方のgRNAは標的遺伝子座の中央または標的遺伝子座の3'末端近傍のCas9開裂を誘導した。

【0418】

Lrp5遺伝子座

1つのセットの実験では、LTVECは、外部ドメインをコードするマウスLrp5（低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質5）遺伝子の一部の68kbの欠失を生成して、ヒトLRP5遺伝子に由来する相同配列の91kbのフラグメントへと同時に置換するように設計された（図8を参照のこと）。LTVECは、欠失させることを目的としたマウスLrp5遺伝子の68kb配列に隣接するマウスLrp5遺伝子座の一部に由来する7kb及び33kbのゲノムDNAを含有するホモロジーアームに隣接する91kbフラグメントのヒトLRP5遺伝子を含んでいた。個々の実験では、Lrp5ヒト化LTVECを、欠失の標的となるマウスLrp5遺伝子の領域内の二本鎖切断を生成するように設計された、Cas9をコードするプラスミド及び8つのgRNA（A、B、B2、C、D、E2、E、F）のうちの1つをコードする第2のプラスミドと組み合わせた。ヒトLRP5遺伝子の挿入部位内の任意の配列の認識を回避するようにgRNAを設計した。その他の実験では、本発明者らは、LTVEC及びCas9コードプラスミドを、欠失の標的となるマウスLrp5遺伝子の領域内の異なる部位を標的とする2つの異なるgRNAをコードするプラスミドと組み合わせた。

20

30

【0419】

欠失内の配列用ならびに薬剤選択カセット及びヒト遺伝子インサート内の配列用の対立遺伝子の改変アッセイ（Valenzuela et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:652-659; Friendewey et al. (2010) Methods Enzymol. 476:295-307）により、薬剤耐性ES細胞クローンを標的ヒト化でスクリーニングした。クローンが2つの内在マウス遺伝子配列のうちの1つを喪失しヒトインサートの1つのコピーを獲得し、また保持配列の2つのコピー（LTVECのホモロジーアーム内に配置された）を保持していた場合、クローンを正確に標的化されたものとスコアリングした。このスクリーニングのための2つの保持アッセイは、以下のプライマー及びプローブ、7064retUフォワードプライマー CCTCTGAGCTTTTCCTTTGCAG（配列番号：100）、7064retUリバースプライマー CCTAGACAACACAGACACTGTATCA（配列番号：101）、7064retUTAQMAN（登録商標）プローブ TTCTGCCCTTGAA AAGGAGAGGC（配列番号：102）、7064retDフォワードプライマー CTCTGAGGCCACCTGAA（配列番号：103）、7064retDリバースプライマー CCTTGACAAGTTCTGCTTCTAC（配列番号：104）、7064retDTAQMAN（登録商標）プローブ TGCCCAAGCCTCTGCAG

40

50

CTTT（配列番号：105）を使用したTAQMAN（登録商標）アッセイであった。
【0420】

Lrp5遺伝子のCRISPR/Cas9補助型ヒト化の結果については、表13にまとめている。LTVEC単独をES細胞に導入した際、スクリーニング済み薬剤耐性クローンの1.9%は、正確に標的化されたヘテロ接合性ヒト化対立遺伝子を保持していた（表13のヘテロ標的化列（非標的対立遺伝子が全く変異されていないクローンまたはNHEJにより生じた小さな欠失などの小さなCRISPR誘導変異を有するクローンを含む）を参照のこと）。それに対し、LTVECを、8つの試験gRNA（A、B、B2、C、D、E2、E及びF、表1を参照のこと）のうちの7つ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、正確に標的化された単一对立遺伝子ヘテロ接合性変異が2.1～7.8%の範囲の効率で生成された。B2及びDによるCas9誘導開裂では、単一对立遺伝子標的化に加えて、二対立遺伝子ホモ接合性ヒト化が1.0～2.1%の頻度で検出された。本発明者らは、小さく単純な欠失対立遺伝子であっても、LTVEC単独による二対立遺伝子標的化を全く観察していない。VELOCI-MOUS（登録商標）法（Poueymirou et al. (2007) Nat. Biotech. 25:91-99（その全体は本明細書に参照として組み込まれる））を用いて、ホモ接合性Lrp5ヒト化ES細胞を、表現型試験及び薬剤効果試験の準備が整った完全ES細胞由来マウスに直接変換することができる。

【0421】

想定開裂部位またはその近傍におけるgRNA/Cas9誘導NHEJ変異を検出するために考案したMOAアッセイは、試験した全てのgRNAの変異活性を示した（データは省略）。アッセイした全てのクローン内で検出された単一对立遺伝子gRNA誘導変異または二対立遺伝子gRNA誘導変異のいずれかの比率は、遺伝子座及び位置によって変化した。gRNA変異活性とLTVEC標的化の間に強い相関は認められなかったが、最低標的化効率は多くの場合、最低変異頻度を有するgRNAと関連していた。

【0422】

欠失の標的となるLrp5遺伝子の領域における異なる末端を認識する2つのgRNAを組み合わせると、試験した5つの組み合わせのうちの3つにおけるホモ接合性標的化事象の頻度を主に上昇させることによって、総ヒト化標的化効率が上昇した（表13）。gRNAの組み合わせが、gRNAによりプログラムされたCas9開裂部位間の大きな欠失を生成する潜在性を有することにより、本発明者らはまた、一方のLrp5対立遺伝子上に標的ヒト化を保持しもう一方の対立遺伝子上に大きなCRISPR誘導欠失を保持するヘミ接合性ES細胞クローンを観察した（gRNAの組み合わせA + F、表13）。加えて、gRNAの組み合わせの2つ（A + F及びA + E2）において、本発明者らは、固有の遺伝子型（両Lrp5対立遺伝子上に大きなCRISPR媒介欠失）を有するES細胞クローンを同定した。

【0423】

【表13-1】

表13. 個々のgRNA及び組み合わせたgRNAを使用したLrp5外部ドメインのCRISPR/Cas9補助型ヒト化のスクリーニング結果。

gRNA	標的欠失の5'／3'末端からgRNA部位の距離 (bp)	対立遺伝子型による標的化効率				
		ヘテロ標的化 (%効率)	ヘミ標的化 (%効率)	ホモ標的化 (%効率)	総標的化 (%効率)	ホモ欠失 (%効率)
A	50 (5')	7.8			7.8	

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

		対立遺伝子型による標的化効率				
g R N A	標的欠失の 5' / 3' 末端から g R N A 部位の距離 (b p)	ヘテロ標的化 (% 効率)	ヘミ標的化 (% 効率)	ホモ標的化 (% 効率)	総標的化 (% 効率)	ホモ欠失 (% 効率)
B	5 0 0 (5 ')	4 . 2			4 . 2	
B 2	1 0 0 0 (5 ')	6 . 2		1 . 0	7 . 2	
C	2 9 9 0 0 (5 ') / 3 8 4 3 0 (3 ')	4 . 1			4 . 1	
D	2 9 9 5 0 (5 ') / 3 8 3 8 0 (3 ')	5 . 2		2 . 1	7 . 3	
E 2	1 0 0 0 (3 ')	2 . 1			2 . 1	
E	5 0 0 (3 ')	0 . 0			0 . 0	
F	5 0 (3 ')	4 . 2			4 . 2	
A + F	A : 5 0 (5 ') F : 5 0 (3 ')	6 . 6	2 . 9	2 . 2	1 1 . 7	2 . 9
B + E	B : 5 0 0 (5 ') E : 5 0 0 (3 ')	2 . 5			2 . 5	
B 2 + E 2	B 2 : 1 0 0 0 (5 ') E 2 : 1 0 0 0 (3 ')	4 . 2		2 . 1	6 . 3	
A + E	A : 5 0 (5 ') E : 5 0 0 (3 ')	4 . 6		6 . 2	1 0 . 8	
A + E 2	A : 5 0 (5 ') E 2 : 1 0 0 0 (3 ')	2 . 0		4 . 0	6 . 0	4 . 0
無	N / A	1 . 9			1 . 9	

【 0 4 2 4】

表 1 3 に示すとおり、1 つの g R N A ではなく単一遺伝子座を標的とする 2 つの g R N A (図 9 A を参照のこと) を使用した場合に、二対立遺伝子標的化を有するクローンのパーセンテージにおける有意な上昇が認められ、g R N A の組み合わせの使用が二対立遺伝子改変を促進することを示した。図 9 A は、L T V E C 及び 2 つのガイド R N A (A 及び B) を使用した、マウス遺伝子の同時欠失及び対応するヒト型への置換の一般的な概略を示している。2 つの g R N A を使用する際にはるかに高い頻度で認められる固有の変異対立遺伝子型としては、ホモ接合性に崩壊した対立遺伝子 (図 9 B 、 Δ / Δ) 、ホモ接合性に標的化された対立遺伝子 (図 9 C 、 H u m / H u m) 、ヘミ接合性に標的化された対立

遺伝子（図9D、Hum/Δ）、及びその他の複合ヘテロ接合性に標的化された対立遺伝子（例えば、一方の対立遺伝子がLTVEC標的ヒト化を有し、もう一方の対立遺伝子が小さな欠失などのCRISPR誘導変異を有する）（図9E）、が挙げられる。

【0425】

MOAアッセイに基づく遺伝子型を支持及び確認するために、いくつかのPCRアッセイを実施した。プライマーについては表1中に見出すことができる。Lrp5 LTVECは、ヒトインサートと隣接マウスゲノム配列の間の物理的接合部をアッセイするためのPCRによる標的化を証明するには十分に短い（6.9 kb）5'ホモロジーアームを有していた。本発明者らは、ヘテロ接合性、ヘミ接合性またはホモ接合性とスコアリングされたクローン由来のDNAを有するが、親ES細胞株由来または二対立遺伝子の大きな欠失を有するとスコアリングされたクローン由来のDNAを有さない、想定された7.5 kbのPCR産物（図10A）を観察し、それにより、推測された二対立遺伝子の大きな欠失をスクリーニング及び支持するMOA（すなわち、LOA及びGOA）により作製された標的化細胞を確認した。5'-Dele-J PCRアッセイ（欠失接合部及び挿入接合部における配列を確認した（図10B））は、親ES細胞株由来及びほとんどのヘテロ接合性ヒト化クローン由来のDNAを有する330 bpの産物を生成した（データは省略）。ヘテロ接合性クローンAW-C3では、5'-Dele-Jアッセイは、想定されたよりも小さな産物（図10B）を生成し、gRNA A/Cas9開裂が非標的対立遺伝子上に小さな欠失変異（gRNA A開裂用のMOAアッセイによっても検出される）を誘導したことを示唆した（データは省略）。予想どおり、5'-Dele-Jアッセイは、ヘミ接合性、ホモ接合性及び二対立遺伝子欠失の対立遺伝子を有するクローンに対して陰性であった。5'-Ins-J PCR（ヒトDNAインサートの5'末端と隣接したマウス隣接配列の間の接合部における配列を確認した）（図10B）は、ヘテロ接合性、ヘミ接合性及びホモ接合性クローン（これらクローンは、少なくとも1つの標的されたヒト化対立遺伝子を有している）内の478 bpの産物を生成した。5'-Ins-J PCRアッセイは、二対立遺伝子の大きな欠失を有するクローンの産物を生成しなかった（図10B）。ヘミ接合性クローン及び二対立遺伝子欠失クローン内の大きな欠失を確認するために、本発明者らは、デュアルgRNA標的部位の外側の配列を認識するプライマーを用いたPCRを実施した。Del(A+F) PCR（A gRNA部位とF gRNA部位の間の欠失をアッセイする）は、クローンAW-A8及びBO-F10由来のDNAを有する約360 bpの単一産物（図10B）を生成し、Lrp5対立遺伝子の少なくとも1つが大きな欠失を有していることが確認された。同様に、Del(A+E2) PCR（A gRNA部位とE2 gRNA部位の間の大きな欠失をアッセイする）は、クローンBA-A7由来のDNAを有する約250 bpの単一産物を生成した。欠失PCRは、接合部、LOA及びGOAアッセイと共に、二対立遺伝子の大きな欠失遺伝子型を支持している。図10A及び図10Bに示すアッセイ結果は、表13にまとめた二対立遺伝子の遺伝子型を確認するための蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH、図11A～図11C）に加えて本発明者らが実施した類似アッセイの代表的な例である。

【0426】

蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）を使用して、Lrp5遺伝子のホモ接合性標的ヒト化を確認した。Lrp5ヒト化LTVECをCas9及び2つのgRNA（A+FまたはA+E2）と組み合わせた標的化実験による定量的PCRアッセイ及び通常のPCRアッセイによりホモ接合性標的とスコアリングされたES細胞クローンを、民間のFISH解析及び核型解析用細胞診断サービスに送付した。マウスLrp5遺伝子を有する細菌人工染色体（BAC）を赤色蛍光マーカーで標識して内在Lrp5遺伝子座を同定するためのプローブとして使用し、ヒトLRP5遺伝子を有するBACを緑色蛍光マーカーで標識してヒトインサートが標的とした染色分体を同定するためのプローブとして使用した。標識BACプローブを標的クローン由来の中期スプレッドにハイブリダイズして、蛍光顕微鏡で可視化した。DAPI（4',6-ジアミジノー2-フェニルインドール）を用いた染色によりスプレッド上の染色体を可視化して、ギムザ染色によ

りそれぞれのクローンの個々の核型を同定した。正常な40XY核型（図示せず）を有することが判明しているクローンAW-D9の標準的な結果を図11Aに示している。図11Aの合成写真は、赤色マウスBACプローブシグナルと緑色ヒトBACプローブシグナルの両方が、両コピーのマウス19番染色体上の細胞学的バンドB（Lrp5遺伝子における既知の位置）に共局在したことを示している。図11Cの合成写真は、別のクローン（BA-D5）における同様のホモ接合性標的化を示している。これらの結果は、ヒト化LTVEC内におけるヒトLRP5遺伝子の91kbフラグメントが、クローンAW-D9及びBA-D5内の両19番染色体相同体上における目的のマウスLrp5遺伝子座に正確に挿入されたことを裏付けるものである。それに対し、図11Bの合成写真は、赤色マウスBACプローブシグナルと緑色ヒトBACプローブシグナルの両方（実線矢印）が単一コピーのマウス19番染色体上の細胞学的バンドBに共局在した一方で、赤色マウスBACプローブシグナルのみがもう一方のコピーのマウス19番染色体上の細胞学的バンドBに局在したことを示している。これらの結果は、ヒト化LTVEC内におけるヒトLRP5遺伝子の91kbフラグメントが、一方のコピーの19番染色体上のみにおける目的のマウスLrp5遺伝子座に正確に挿入されたこと（ヘテロ接合性標的化）を裏付けるものである。これらの結果はまた、ヒトBACプローブがマウスLrp5遺伝子座にクロスハイブリダイズしないがヒトLRP5インサートのみを認識することを示している（省略するがその他の対照と共に）。

【0427】

明らかな非相同末端結合修復により両方の対立遺伝子に生成された特定のクローンにおける同一のCRISPR誘導インデル変異の存在は、F1H4ハイブリッド細胞（50% 129SvS6株及び50% C57BL/6N株からなる）における遺伝子変換事象の発生を示唆していた。2つのgRNAを使用する際の高い二対立遺伝子標的化の基礎をなす機構についての洞察を得るために、LTVEC及びA + FまたはA + E2 gRNAの組み合わせのいずれかをを用いた標的化に続いて、標的ホモ接合性ヒト化またはCRISPRが誘導したホモ接合性の大きな欠失のいずれかを有する7つのクローンをスクリーニングした。

【0428】

図12は、2つのガイドRNAが関与する遺伝子変換事象を確認するように設計されたアッセイの例を示している。具体的には、F1H4ハイブリッドES細胞（50% 129SvS6株及び50% C57BL/6N株からなる）内におけるヘテロ接合性の喪失（LOH）を解析することにより、遺伝子変換の可能性を確認した。129SvS6（129）とC57BL/6N（B6）の間の既知の多型におけるヘテロ接合性の喪失により遺伝子変換が示され得るため、これら2つの対立遺伝子型を識別するようにPCRアッセイを設計した。129対立遺伝子とB6対立遺伝子の間の差異を検出するように設計された通常のPCRを用いて、構造多型（SV）多型をアッセイした。以下で使用したSVアッセイの1つのみを図12に示しているが、それぞれにおいてコンセプトは同様である。B6マウス系統と129マウス系統の間の構造多型（SV）に基づいてプライマーを設計したが、それらプライマーについては表1に記載している。プライマー設計の条件は、約25bpのSVを同定して約300bpのPCR産物を生成させるような条件とし、任意の変化がゲル電気泳動により可視化され得るようにこれらの条件を選択した。

【0429】

クローンに対してPCRを行う前に、アッセイを検証して、B6系統、129系統由来及びF1H4 ES細胞株由来の野生型ES細胞DNAに対して最適化した。B6対立遺伝子または129対立遺伝子のいずれかに特異的な識別可能なPCRバンドを生成し、F1H4 DNAを使用してこれら同様の2つの識別可能なバンドを安定生成するプライマーセットを、クローン試験用を選択した。19番染色体（Lrp5遺伝子の位置）については、対立遺伝子の改変（MOA）アッセイ及び通常のPCRにより「ホモ接合性標的」または「ホモ接合性崩壊」のいずれかとして遺伝子型決定されたLrp5ヒト化クローンに使用するための6組のプライマーセット（ID 190045、190061、190

10

20

30

40

50

068、190030、190033、190013)を選択した。Lrp5遺伝子座から染色体のテロメア末端までの19番染色体に沿ってLrp5遺伝子座から約13.7～約56.2Mbの範囲で、SV PCRアッセイを間隔を空けて配置した。19番染色体上におけるLrp5遺伝子座からのSVアッセイのおおよその距離(Mb)は、以下、190045アッセイで13.7、190061アッセイで19.0、190068アッセイで35.0、190030アッセイで37.4、190033アッセイで48.3、及び190013アッセイで56.2、のとおりである。アッセイ190033(SV48.3として示す)のみを図12に示しているが、アッセイ190045、190061、190068、190030、190033及び190013用のプライマーについて表1に示している。

10

【0430】

これらクローン由来のDNAに加え、F1H4対照DNA、129対照DNA及びB6対照DNAに対してPCRを実施した。電気泳動によりPCR産物を6%ポリアクリルアミドゲル上で分離させてからGelRedで染色した。F1H4対照と一致する2つのバンドを生成したクローンにおいては、以前の最適化により、上部のバンドが129対立遺伝子に特異的であり下部のバンドがB6対立遺伝子に特異的であることが示された。1つのバンドのみを生成したクローンは、B6バンドのみまたは129バンドのみのいずれかを示した。クローンAW-A7、AW-F10、BA-D5、BA-F2、BC-H9及びBR-B4が6つ全てのアッセイでB6バンドのみを示した一方で、クローンBO-A8は6つ全てのアッセイで129バンドのみを示した。上で述べたように、これらクローンは、MOA及び／またはPCRによりホモ接合性標的またはホモ接合性崩壊のいずれかとして遺伝子型決定され、様々なgRNAの組み合わせ(A + F、A + E2、B2及びD)が関与していた。単一对立遺伝子バンドのみの存在は遺伝子変換事象が起こっていることを示唆した(変換がない場合、両方のバンドはなおもF1H4対照に存在するであろう)。

20

【0431】

加えて、TAQMAN(登録商標)対立遺伝子識別アッセイを用いて、129対立遺伝子とB6対立遺伝子の間の一塩基多型(SNV)をアッセイした。図12の19番染色体地図上におけるSNVアッセイのおおよその位置は、Lrp5遺伝子座からのそれらの距離(Mb)を示す矢じり(下側に記載)で示している。Lrp5遺伝子座からの距離(Mb)は、以下、Lrp5の0.32セントロメア側(C2)、Lrp5の1.2テロメア側(T3)、Lrp5の11.1テロメア側(T6)、Lrp5の13.2テロメア側(T7)、Lrp5の17.5テロメア側(T8)、Lrp5の25.8テロメア側(T9)、Lrp5の33.0テロメア側(T10)、Lrp5の38.3テロメア側(T11)、Lrp5の49.6テロメア側(T13)、及びLrp5の57.2テロメア側(T14)、のとおりである。129特異的プローブ及びB6特異的プローブならびにプライマーペアについては、表1に示している。

30

【0432】

表14は、SV対立遺伝子とSNV対立遺伝子の両方のLOHによる、Lrp5標的遺伝子座からテロメア方向へと19番染色体の長腕にわたる明らかな遺伝子変換事象を示した、ES細胞クローンの7つの例を示している。示したとおり、Lrp5ヒト化LTVECを1つまたは2つのgRNAと組み合わせた独立した標的化実験でES細胞クローンを誘導した。gRNA認識配列の位置は、図12のLrp5遺伝子表記の上側に示している(左向き太矢印)。遺伝子型決定アッセイは、7つのクローンのうちの6つがLrp5遺伝子のホモ接合性に標的化されたヒト化を有する一方で、1つがホモ接合性崩壊(gRNA部位間の大きな欠失)を有することを示した。7つのクローンのうちの6つでは、129対立遺伝子が喪失してB6対立遺伝子のみが残った。その他のクローンでは、B6対立遺伝子が喪失して129対立遺伝子のみが残った。Lrp5遺伝子座のセントロメア側をアッセイした対立遺伝子では、全てのクローンはヘテロ接合性を維持していた(すなわち、全てのクローンはC2 SNVアッセイでヘテロ接合性B6/129であった)。7つ

40

50

のクローンで認められた L O H は、L T V E C を 1 つの g R N A またはより頻繁に 2 つの g R N A と組み合わせた場合にホモ接合性の遺伝子組換え対立遺伝子が得られ、一方の対立遺伝子上における最初の標的遺伝子改変に続き、一方の染色体からその相同体へと標的遺伝子改変を複製する相同組換え遺伝子変換事象である、1 つの機構を示している。

【0433】

【表14】

表14. ヘテロ接合性の喪失アッセイの結果。

クローン	g R N A	L r p 5 対立遺伝子型	ヘテロ接合性の喪失アッセイ (S V 及び S N V)
A W - A 7	A + F	ホモ接合性標的化	B 6 対立遺伝子のみ検出された
A W - F 1 0	A + F	ホモ接合性崩壊	B 6 対立遺伝子のみ検出された
B O - A 8	A + F	ホモ接合性標的化	1 2 9 対立遺伝子のみ検出された
B A - D 5	A + E 2	ホモ接合性標的化	B 6 対立遺伝子のみ検出された
B A - F 2	A + E 2	ホモ接合性標的化	B 6 対立遺伝子のみ検出された
B C - H 9	B 2	ホモ接合性標的化	B 6 対立遺伝子のみ検出された
B R - B 4	D	ホモ接合性標的化	B 6 対立遺伝子のみ検出された

【0434】

C 5 (H c) 遺伝子座

別のセットの実験では、L T V E C は、補対成分 5 (C 5 または H c (溶血性補体)) のマウス遺伝子の 7 6 k b の欠失を生成して、相同ヒト C 5 遺伝子の 9 7 k b のフラグメントへと同時に置換するように設計された。標的遺伝子座は、C 5 (H c) 遺伝子の終止コドンに対応するエキソン 2 を含んでいた。L T V E C は、欠失させることを目的としたマウス C 5 (H c) 遺伝子の 7 6 k b 配列に隣接するマウス C 5 (H c) 遺伝子座の一部に由来する 3 5 k b 及び 3 1 k b のゲノム DNA を含有するホモロジアームに隣接する 9 7 k b フラグメントのヒト C 5 遺伝子を含んでいた。個々の実験では、C 5 (H c) ヒト化 L T V E C を、欠失の標的となるマウス C 5 (H c) 遺伝子の領域内の二本鎖切断を生成するように設計された、C a s 9 をコードするプラスミド及び 6 つの g R N A (A、B、C、D、E 及び E 2、表 1 を参照のこと) のうちの 1 つをコードする第 2 のプラスミドと組み合わせた。ヒト C 5 遺伝子の挿入部位内の任意の配列の認識を回避するように g R N A を設計した。その他の実験では、本発明者らは、L T V E C 及び C a s 9 コードプラスミドを、欠失の標的となるマウス C 5 (H c) 遺伝子の領域内の異なる部位を標的とする 2 つの異なる g R N A をコードするプラスミドと組み合わせた。一部の実験では、C 5 (H c) ヒト化 L T V E C の代わりに、C h 2 5 h 遺伝子座を標的とする対照 L T V E C を使用した。C h 2 5 h の全コード配列 (約 1 k b) を欠失させてピューロマイシン及びネオマイシン選択カセットを C h 2 5 h 遺伝子座に挿入するように設計された対照 L T V E C を、C 5 (H c) 遺伝子座における相同組換えの標的とはならない薬剤耐性クローンを選択するための手段として使用した。

【0435】

C 5 (H c) 遺伝子の C R I S P R / C a s 9 補助型ヒト化の結果については表 1 5 に示しており、L r p 5 遺伝子の C R I S P R / C a s 9 補助型ヒト化で得られた結果に類似している。L T V E C 単独による標的化効率は L r p 5 と比較して C 5 (H c) ヒト化でより高かった (6 . 1 %) が、C a s 9 及び g R N A を加えることにより、試験した 6 つの g R N A のうちの 4 つで標的化効率が向上した。L r p 5 と同様に、C 5 (H c) ヒ

ト化のために gRNA を組み合わせると（すなわち、2つの gRNA を使用する）、ヘミ接合性及びホモ接合性標的化事象の頻度を主に上昇させることによって、総標的化効率が更に上昇した。本発明者らはまた、両方の対立遺伝子上に大きな CRISPR 誘導欠失を有する ES 細胞クローンを発見した（1.8%～3.6%の頻度で観察された）。加えて、Ch25h 遺伝子座を標的とする LTV EC を 2つの C5（Hc）gRNA と組み合わせて使用した場合に、2つのガイド RNA 認識配列間で崩壊したホモ接合性対立遺伝子を有するクローンが 1.2%～6%の頻度で観察され、標的遺伝子座における崩壊事象が相同組換え事象とは独立して生じることを示した。Lrp5 と同様に、保持アッセイを使用して正確に標的化されたクローンを確認した。このスクリーニングのための 2つの保持アッセイは、以下のプライマー及びプローブ、7140retU フォワードプライマー CC CAGCATCTGACGACACC（配列番号：106）、7140retU リバースプライマー GACCACTGTGGGCATCTGTAG（配列番号：107）、7140retUTA QMAN（登録商標）プローブ CCGAGTCTGCTGTTACTGT TAGCATCA（配列番号：108）、7140retD フォワードプライマー CCC GACACCTTCTGAGCATG（配列番号：109）、7140retD リバースプライマー TGCAGGCTGAGTCAGGATTTG（配列番号：110）、7140retD TA QMAN（登録商標）プローブ TAGTCACGTTTTGTGACAC CCCAGA（配列番号：111）を使用した TA QMAN（登録商標）アッセイであった。

【0436】

【表15-1】

表15. 個々の gRNA 及び組み合わせた gRNA を使用した C5（Hc）遺伝子の CRISPR/Cas9 補助型ヒト化のスクリーニング結果。

			対立遺伝子型による標的化効率				
gRNA	標的欠失 の 5' / 3' 末端から gRNA 部位の距 離 (bp)	LTV EC	ヘテロ 標的化 (%効 率)	ヘミ標的 化 (%効 率)	ホモ標的 化 (%効 率)	総標的 化 (%効 率)	ホモ 欠失 (% 効率)
A	100 (5')	C5	16. 6			16. 6	
B	500 (5')	C5	14. 5			14. 5	
C	3820 0 (5') / 3750 0 (3')	C5	11. 4			11. 4	

10

20

30

40

50

【表 15-2】

対立遺伝子型による標的化効率							
gRNA	標的欠失 の5' / 3' 末端から gRNA 部位の距 離 (bp)	LTV EC	ヘテロ 標的化 (%効 率)	ヘミ標的 化 (%効 率)	ホモ標的 化 (%効 率)	総標的 化 (%効 率)	ホモ 欠失 (%効 率)
D	4350 0 (5') / 3220 0 (3')	C5	7.3			7.3	
E	500 (3')	C5	4.2			4.2	
E2	100 (3')	C5	6.2			6.2	
A + C	A : 10 0 (5') C : 37 500 (3')	C5	19.6	7.1	0.6	27.3	0.6
A + C	A : 10 0 (5') C : 37 500 (3')	Ch2 5h	N/A	N/A	N/A	N/A	6.0
A + E2	A : 10 0 (5') E2 : 1 00 (3')	C5	19.0	3.6	1.2	23.8	3.0
A + E2	A : 10 0 (5') E2 : 1 00 (3')	Ch2 5h	N/A	N/A	N/A	N/A	1.2
無	N/A	C5	6.1			6.1	

【0437】

蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を使用して、C5 (Hc) 遺伝子のホモ接合性標的のヒト化を確認した。C5 (Hc) ヒト化 LTV EC を Cas9 及び2つの gRNA と組み合わせた標的化実験による定量的 PCR アッセイ及び通常の PCR アッセイによりホモ接合性標的とスコアリングされた ES 細胞クローンを、民間の FISH 解析及び核型解析用細胞診断サービスに送付した。マウス C5 (Hc) 遺伝子を有する細菌人工染色体 (BAC) を赤色蛍光マーカーで標識して内在遺伝子座を同定するためのプローブとして使用し、ヒト C5 遺伝子を有する BAC を緑色蛍光マーカーで標識してヒトインサートが標的とした染色分体を同定するためのプローブとして使用した。標識 B A

Cプローブを標的クローン由来の中期スプレッドにハイブリダイズして、蛍光顕微鏡で可視化した。DAPI (4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール) を用いた染色によりスプレッド上の染色体を可視化して、ギムザ染色によりそれぞれのクローンの個々の核型を同定した。クローンO-Eの標準的な結果を図13Bに示している。図13Bの合成写真は、赤色マウスBACプローブシグナルと緑色ヒトBACプローブシグナルの両方が、両コピーのマウス2番染色体上のC5 (Hc) 遺伝子座 (C5 (Hc) 遺伝子における既知の位置) に共局在したことを示している。これらの結果は、ヒト化LTVEC内におけるヒトC5遺伝子の97 kbフラグメントが、クローンO-E3内の両2番染色体相同体上における目的のマウスC5 (Hc) 遺伝子座に正確に挿入されたことを裏付けるものである。それに対し、図13Aの合成写真は、赤色マウスBACプローブシグナルと緑色ヒトBACプローブシグナルの両方 (実線矢印) が単一コピーのマウス2番染色体上に共局在した一方で、赤色マウスBACプローブシグナルのみがもう一方のコピーのマウス2番染色体上のC5 (Hc) 遺伝子座に局在したことを示している。これらの結果は、ヒト化LTVEC内におけるヒトC5遺伝子の97 kbフラグメントが、クローンQ-E9内の一方のコピーの2番染色体上のみにおける目的のマウスC5 (Hc) 遺伝子座に正確に挿入されたこと (ヘテロ接合性標的化) を裏付けるものである。

【0438】

それから、クローンに対してアッセイを行い、2つのガイドRNAが関与する遺伝子変換事象を確認した。具体的には、F1H4ハイブリッドES細胞 (50% 129 SvS6株及び50% C57BL/6N株からなる) 内におけるヘテロ接合性の喪失 (LOH) を解析することにより、遺伝子変換の可能性を確認した。129SvS6 (129) とC57BL/6N (B6) の間の既知の多型におけるヘテロ接合性の喪失により遺伝子変換が示され得るため、これら2つの対立遺伝子型を識別するようにPCRアッセイを設計した。129対立遺伝子とB6対立遺伝子の間の差異を検出するように設計された通常のPCRを用いて、構造多型 (SV) 多型をアッセイした。B6マウス系統と129マウス系統の間の構造多型 (SV) に基づいてプライマーを設計したが、それらプライマーについては表1に記載している。プライマー設計の条件は、約25 bpのSVを同定して約300 bpのPCR産物を生成させるような条件とし、任意の変化がゲル電気泳動により可視化され得るようにこれらの条件を選択した。

【0439】

クローンに対してPCRを行う前に、アッセイを検証して、B6系統、129系統由来及びF1H4 ES細胞株由来の野生型ES細胞DNAに対して最適化した。B6対立遺伝子または129対立遺伝子のいずれかに特異的な識別可能なPCRバンドを生成し、F1H4 DNAを使用してこれら同様の2つの識別可能なバンドを安定生成するプライマーセットを、クローン試験用を選択した。標的化実験のクローンに使用するために、5つのプライマーセット (ID SV 6.1、SV 6.3、SV 7.8、SV 16及びSV 25.5) を選択した。C5遺伝子座から染色体のテロメア末端までの染色体に沿ってC5遺伝子座から約6.3~約25.5 Mbの範囲で、SV PCRアッセイのうちの4つを間隔を空けて配置した。最後のSV PCRアッセイは、C5遺伝子座へと約6.1 Mbセントロメア側であった。C5遺伝子座からのSVアッセイのおおよその距離 (Mb) は、以下、アッセイSV 6.1で6.1 (セントロメア側)、アッセイSV 6.3で6.3 (テロメア側)、アッセイSV 7.8で7.8 (テロメア側)、アッセイSV 16.0で16.0、及びアッセイSV 25.5で25.5 (図14を参照のこと)、のとおりである。

【0440】

C4遺伝子座のセントロメア側をアッセイした対立遺伝子では、21全てのクローンはヘテロ接合性を維持していた (すなわち、全てのクローンはヘテロ接合性B6/129であった)。試験した21のクローンのうちの2つは、LOHによるC5標的遺伝子座からテロメア方向への明らかな遺伝子変換事象を示した (表16を参照のこと)。遺伝子型決定アッセイでは、クローンのうちの一方がC5遺伝子のホモ接合性に標的化されたヒト化

を有し、もう一方のクローンがホモ接合性崩壊を有することを示した。2つのクローンで認められたLOHは、LTVECを1つのgRNAまたはより頻繁に2つのgRNAと組み合わせた場合にホモ接合性の遺伝子組換え対立遺伝子が得られ、一方の対立遺伝子上における最初の標的遺伝子改変に続き、一方の染色体からその相同体へと標的遺伝子改変を複製する相同組換え遺伝子変換事象である、1つの機構を示している。

【0441】

【表16】

表16. ヘテロ接合性の喪失アッセイの結果。

クローン	gRNA	C5対立遺伝子型	遺伝子変換アッセイ
R-E 2	A + E2	ホモ接合性標的化	129対立遺伝子のみ検出された
R-E 8	A + E2	ホモ接合性崩壊	129対立遺伝子のみ検出された

10

【0442】

Ror1遺伝子座

別のセットの実験では、LTVECは、マウスRor1（チロシンタンパク質キナーゼ膜貫通受容体ROR1）遺伝子の110kbの欠失を生成して、相同ヒトROR1遺伝子の134kbのフラグメントへと同時に置換するように設計された。LTVECは、欠失させることを目的としたマウスRor1遺伝子の110kb配列に隣接するマウスRor1遺伝子座の一部に由来する41.8kb及び96.4kbのゲノムDNAを含有するホモロジーアームに隣接する134kbフラグメントのヒトROR1遺伝子を含んでいた。個々の実験では、Ror1ヒト化LTVECを、欠失の標的となるマウスRor1遺伝子の領域内の二本鎖切断を生成するように設計された、Cas9をコードするプラスミド及び6つのgRNA（A、B、C、D、E及びF、表1を参照のこと）のうちの1つをコードする第2のプラスミドと組み合わせた。ヒトROR1遺伝子の挿入部位内の任意の配列の認識を回避するようにgRNAを設計した。その他の実験では、本発明者らは、LTVEC及びCas9コードプラスミドを、欠失の標的となるRor1遺伝子内の異なる部位を標的とする2つの異なるgRNAをコードするプラスミドと組み合わせた。

20

30

【0443】

Ror1遺伝子のCRISPR/Cas9補助型ヒト化の結果については表17に示しており、Lrp5遺伝子及びC5（Hc）遺伝子のCRISPR/Cas9補助型ヒト化で得られた結果に類似している。LTVEC単独による標的化効率は0.3%であったが、Cas9及びgRNAを加えることにより、試験した6つのgRNAのうちの2つで標的化効率がわずかに上昇した。A gRNAとF gRNAを組み合わせると、ヘテロ接合性標的化事象とヘミ接合性標的化事象の両方の頻度を上昇させることによって、総Ror1標的化効率が6.3%に上昇した。本発明者らはまた、両方の対立遺伝子上に大きなCRISPR誘導欠失を有するES細胞クローンを発見した（1.6%の頻度で観察された）。ホモ接合性標的クローンは観察されなかった。別の実験では、gRNA AとgRNA Dも組み合わせたが、ホモ接合性標的化は依然として観察されなかった。

40

【0444】

50

【表 17】

表 17. 個々の gRNA 及び組み合わせた gRNA を使用した Ror1 遺伝子の CRISPR/Cas9 補助型ヒト化のスクリーニング結果。

gRNA	標的欠失の 5' / 3' 末端から gRNA 部位の距離 (bp)	対立遺伝子型による標的化効率				
		ヘテロ標的化 (%効率)	ヘミ標的化 (%効率)	ホモ標的化 (%効率)	総標的化 (%効率)	ホモ欠失 (%効率)
A	200 (5')	0.7			0.7	
B	1000 (5')	0.0			0.0	
D	54300 (5') / 55500 (3')	0.7			0.7	
C	54500 (5') / 55300 (3')	0.0			0.0	
E	1000 (3')	0.0			0.0	
F	200 (3')	0.3			0.3	
A + F	A : 200 (5') F : 200 (3')	4.2	2.1		6.3	1.6
A + D	A : 200 (5') D : 55500 (3')	1.0			1.0	
無	N / A	0.3			0.3	

【0445】

Trpa1 遺伝子座

別のセットの実験では、LTVEC は、マウス Trpa1 (一過性受容体電位カチオンチャネル、サブファミリー A、メンバー 1) 遺伝子の 45.3 kb の欠失を生成して、相同ヒト TRPA1 遺伝子の 54.5 kb のフラグメントへと同時に置換するように設計された。LTVEC は、欠失させることを目的としたマウス Trpa1 遺伝子の 45.3 kb 配列に隣接するマウス Trpa1 遺伝子座の一部に由来する 41.0 kb 及び 58.0 kb のゲノム DNA を含有するホモロジーアームに隣接する 54.5 kb フラグメントのヒト TRPA1 遺伝子を含んでいた。個々の実験では、Trpa1 ヒト化 LTVEC を、欠失の標的となるマウス Trpa1 遺伝子の領域内の二本鎖切断を生成するように設計された、Cas9 をコードするプラスミド及び 8 つの gRNA (A、A2、B、C、D、E2、E 及び F、表 1 を参照のこと) のうちの 1 つをコードする第 2 のプラスミドと組み合わせた。ヒト TRPA1 遺伝子の挿入部位内の任意の配列の認識を回避するように gRNA を設計した。その他の実験では、本発明者らは、LTVEC 及び Cas9 コードプラスミドを、欠失の標的となる Trpa1 遺伝子内の異なる部位を標的とする 2 つの異なる gRNA をコードするプラスミドと組み合わせた。

【0446】

T r p a 1 遺伝子の C R I S P R / C a s 9 補助型ヒト化の結果については表 18 に示しており、L r p 5 遺伝子及び C 5 (H c) 遺伝子の C R I S P R / C a s 9 補助型ヒト化で得られた結果に類似している。L T V E C 単独による標的化効率は 0.3% であったが、C a s 9 及び g R N A を加えることにより、試験した 8 つの g R N A のうちの 6 つで標的化効率が上昇した。B g R N A と F g R N A を組み合わせると、ヘテロ接合性、ヘミ接合性及びホモ接合性の標的化事象の頻度を上昇させることによって、総 T r p a 1 標的化効率が 3.4% に上昇した。本発明者らはまた、両方の対立遺伝子上に大きな C R I S P R 誘導欠失を有する E S 細胞クローンを発見した (0.3% の頻度で観察された)。

【0447】

【表 18-1】

表 18. 個々の g R N A 及び組み合わせた g R N A を使用した T r p a 1 遺伝子の C R I S P R / C a s 9 補助型ヒト化のスクリーニング結果。

		対立遺伝子型による標的化効率				
g R N A	標的欠失の 5' / 3' 末端から g R N A 部位の距離 (b p)	ヘテロ標的化 (% 効率)	ヘミ標的化 (% 効率)	ホモ標的化 (% 効率)	総標的化 (% 効率)	ホモ欠失 (% 効率)
A	100 (5')	1.0			1.0	
A2	500 (5')	2.1			2.1	
B	1000 (5')	1.4			1.4	

【表 18-2】

		対立遺伝子型による標的化効率				
g R N A	標的欠失の 5' / 3' 末端から g R N A 部位の距離 (b p)	ヘテロ標的化 (% 効率)	ヘミ標的化 (% 効率)	ホモ標的化 (% 効率)	総標的化 (% 効率)	ホモ欠失 (% 効率)
C	25600 (5') / 19740 (3')	1.0			1.0	
D	26970 (5') / 18370 (3')	2.1			2.1	
E2	1000 (3')	0.0			0.0	
E	500 (3')	0.0			0.0	
F	100 (3')	0.7			0.7	
B + F	B : 1000 (5') F : 100 (3')	2.8	0.3	0.3	3.4	0.3
無	N / A	0.3			0.3	

【0448】

これらの例が示すように、大きく離れた部位においてデュアルガイドRNAを使用することによって、単一gRNAと比較してヘテロ接合性ヒト化の向上が改善された。加えて、デュアルガイドRNAを使用することによって、単一gRNAと比較して二対立遺伝子事象が促進された。1つのgRNAを用いた標的化とは対照的に、2つのgRNAを用いた標的化により、両方の対立遺伝子が標的ヒト化を有したホモ接合性標的細胞（Hum/Hum）、どちらの対立遺伝子もヒト化LTVECに標的とされなかったが両方共大きな欠失を有したホモ接合性欠失細胞（Δ/Δ）、及び、一方の対立遺伝子が標的ヒト化を有しもう一方が大きなデュアルgRNA/Cas9誘導欠失を有したヘミ接合性標的細胞（Hum/Δ）、が生成される。第1に、本発明者らは、両方の標的対立遺伝子に正確で同一な非常に大きなヒト化を有する正確に標的化されたクローン（例えば、標的遺伝子改変にホモ接合性な細胞）を発見した。Lrp5ヒト化を達成するために本発明者らが1つのgRNAを使用した際にホモ接合性に標的化されたクローンも観察されたが、それらクローンは、本発明者らが2つのgRNAを用いた際と比較してはるかに低い頻度で生じた（表13を参照のこと）。同様に、本発明者らは、C5（Hc）ヒト化またはTrpa1ヒト化を達成するために1つのgRNAを使用した際にホモ接合性標的化を観察しなかったが、本発明者らは、標的化ベクターと共に2つのgRNAを使用した際にホモ接合性標的化を観察した（表15及び表18を参照のこと）。同様に、本発明者らは、Lrp5標的化、C5（Hc）標的化、Ror1標的化及びTrpa1標的化の遺伝子改変にヘミ接合性である正確に標的化されたクローン（すなわち、それらクローンは、一方の対立遺伝子上に正確に標的化されたヒト化を有し、もう一方の対立遺伝子上に非常に大きな（時に遺伝子破壊）欠失を有する）を発見した。Lrp5ヒト化、C5（Hc）ヒト化、Ror1ヒト化またはTrpa1ヒト化を達成するために1つのgRNAを使用した際には、このような改変は全く生じなかった（それぞれ表13、表15、表17及び表18を参照のこと）。

【0449】

第2に、本発明者らは、両方の標的対立遺伝子上における両方のgRNAがガイドするCas9開裂事象により誘導された同一の非常に大きな欠失（>45kb）を有するクローン（すなわち、細胞は、標的遺伝子座において大きな（時に遺伝子破壊）欠失にホモ接合性であった）を発見した。これらのタイプの変異は、同一遺伝子に向かう標的化ベクターを必要としない。例えば、表15に示すとおり、本発明者らは、Cas9及び2つのgRNAを、gRNAが標的とする遺伝子とは無関係の異なる遺伝子に向かう標的化ベクターと組み合わせることにより、ホモ接合性CRISPR誘導欠失を有するES細胞を得た。それゆえ、2つのgRNAによりガイドされるCas9ヌクレアーゼは、標的化ベクターを加えることなく細胞内における大きな欠失を誘導することができる。このような例においては、薬剤耐性遺伝子を発現するベクターによりもたらされる一過性または安定な薬剤選択は、DNAを取り込んだES細胞の濃縮による希少なホモ接合性欠失クローンの単離促進を可能とする。

【0450】

実施例6．組み合わせたgRNAにより誘導された大きな欠失の解析。

組み合わせたgRNAにより誘導された大きな欠失の対立遺伝子構造

2つのgRNAがガイドするCas9開裂事象により誘導された大きな欠失を含むクローンについて、別の配列解析を実施した（表19を参照のこと）。本発明者らがgRNAをLrp5 LTVECまたはほぼ30Mb離れたCh25h遺伝子を標的とするLTVECのいずれかと組み合わせた際におおよそ同等の頻度でLrp5遺伝子座に大きな欠失を得たため、これらの大きな欠失は同一遺伝子座におけるLTVEC誘導相同組換え事象とは無関係であると思われる（データは省略）。大きな欠失の特性を決定するために、本発明者らは、6つのヒト化に由来する40のクローン（15のヘミ接合性及び二対立遺伝子の大きな欠失を有する25）について欠失スパニングPCR（deletion-spanning PCR）を実施し、個々のクローンのPCR産物をシーケンスした。シ

ークエンスにより、38 kb～109 kbの範囲の大きな欠失を確認した。ES細胞クローンのうちの3つ（Lrp5クローンAW-A8及びBP-D3ならびにAdams5クローンX-B11）は想定Cas9開裂部位間に完全に修復された正確な欠失（68.2 kb）を有していた一方で、1つのクローン（HcクローンP-B12）は単一塩基対挿入に加え38.1 kbの欠失を有していた。ES細胞クローンのうちの27は、非相同末端結合（NHEJ）による不正確な修復と一致する、Cas9開裂部位を越えてわたる欠失を有していた。残りの9つのES細胞クローンは明らかなNHEJ誘導欠失と挿入を組み合わせた変異（例えば、Lrp5クローンBP-F6及びHcクローンO-E4）を有しており、そのうちの5つは、本発明者らがそのソースゲノム遺伝子座にマッピング可能な200 bp超の挿入を有していた（データは省略）。Lrp5クローンBO-E9内における210 bpの挿入（19番染色体 +、3589138～3589347）は、gRNA F標的部位の外側セントロメア方向約2,600 bpに位置する同一配列に対して逆方向であった。この配列は、Lrp5 LTVECの長い3'ホモロジーアーム内に存在していた。Lrp5クローンBP-F6及びBP-G7は、本発明者らがLrp5 gRNA A及びFをCas9及びLrp5からテロメア方向に30 Mb離れたCh25h遺伝子を標的とするLTVECと組み合わせた実験に由来していた。クローンBP-F6は、Ch25h近傍の配列と同一な163 bpのフラグメントに結合したベクター骨格の一部と同一な103 bpのフラグメントで構成されまたLTVECの長腕内に存在することからCh25h LTVECの一端に由来すると思われる266 bpの挿入（19番染色体 +、34478136～34478298）を有しており、このフラグメントは、内在染色体配列に対して逆方向で欠失に挿入された。HcクローンO-E4は、gRNA A認識配列から約3.1 kb離れた欠失配列内に見つかった同一配列に対して逆である254 bpの挿入を有していた。HcクローンS-D5内における1,304 bpの挿入は、2つのフラグメント、想定gRNA E2誘導Cas9開裂部位から約1.4 kb離れた欠失配列内に見つかった同一配列と同一方向である1,238 bpの部分、及びgRNA E2切断部位の外側25 bpの同一配列の逆方向の複製である第2の66 bpの部分、で構成されていた。

【0451】

10

20

30

40

50

【表 19-1】

表 19. 組み合わせた gRNA により誘導された大きな欠失の対立遺伝子構造。

遺伝子	ES 細胞クローン	遺伝子型 ¹	gRNA	標的欠失内の位置 (bp)	欠失のサイズ (kb)	欠失した別の配列 (bp)	挿入 (bp)	PCR クローン
Lrp5	AW-A8	Δ/Δ	A + F	5' - 50 / 50 - 3'	68.2	-	-	40
	BO-E9	Δ/Δ				12	210	17
	BP-D3	Δ/Δ				-	-	11
	BP-F6	Δ/Δ				30	266	6
	BP-G7	Δ/Δ				77		9
	BA-A7	Δ/Δ	A + E2	5' - 50 / 1,000 - 3'	67.3	7		19
	BA-C7	Δ/Δ				84		32
Hc	N-A1	Δ/Δ	A +	5' - 100 / 38,20	38.1	14		12

10

20

30

40

50

【表 19-2】

1		C	0-3			
N-D 4	Δ/Δ				1 0	1 5
N-D 1 1	H u m Δ				2 0	1 0
N-E 1	H u m Δ				1 0	1
N-E 9	H u m Δ				1 0	1 3
O-C 5	H u m Δ				2 0	1 6
O-D 2	H u m Δ				3 1	2 1
O-E 4	H u m Δ				5	1 2
O-E 5	H u m Δ				1 9	2 5 4
O-E 6	H u m Δ				3 5	2
O-F 1 1	H u m Δ				6	1 7
O-F 1 2	H u m Δ				1 2	7
P-B 1 2	Δ/Δ				4 1	6
P-C 1 2	Δ/Δ				3 5	1
P-D 1	Δ/Δ					1
P-G 8	Δ/Δ					7
Q-F 5	H u m Δ	A + E 2	5 - 1 0 0 / 1 0 0 - 3	7 5 . 6	2 0	1 5
Q-F 1 0	Δ/Δ				3 3	1 0
R-A 5	Δ/Δ				5	2
R-A 7	Δ/Δ				3	3
R-A 9	H u m Δ				4 6	1 3
R-	H u m				1 8	1 4
					3 7	1 5
					2 6 1	8
					1 8 0	1 1

10

20

30

40

50

【表 19 - 3】

	C 8	／ Δ						
	R - D 1 2	H u m ／ Δ				1 8 2		1 0
	R - F 1 1	H u m ／ Δ				1 9		1 1
	S - A 1 1	Δ／ Δ				1 2 2		1 1
	S - D 5	Δ／ Δ				4 6		1
	S - D 5	Δ／ Δ				2 1 6	1 3 0 4	8
R o r l	Y - B 5	Δ／ Δ	A + F	5' - 2 0 0 ／ 2 0 0 - 3 '	1 0 9	1 8		6
	Y - C 7	Δ／ Δ				2 3		7
	Y - E 1	Δ／ Δ				1 2		3
T r p a 1	A D - C 7	Δ／ Δ	B + F	5' - 1, 0 0 0 / 1 0 0 - 3'	4 4. 6	3 0		8
D p p 4	S - F 1	Δ／ Δ		5' - 5 0 / 3 8, 1 0 0 - 3'	4 0. 7	1 8	8 7 7	2 0
	S - G 6	Δ／ Δ				3 5	3	1 7
A d a m t s 5	X - B 1 1	Δ／ Δ		5' - 1 0 0 0 / 1 0 0 - 3'	3 7. 4			1 1

¹ H u m / +、ヘテロ接合性遺伝子型をもたらす、2つの天然対立遺伝子のうちの一方の標的ヒト化；H u m / Δ、ヘミ接合性遺伝子型をもたらす、一方の対立遺伝子が標的ヒト化を有しもう一方が大きなC a s 9 - g R N A誘導欠失を有する二対立遺伝子改変；H u m / H u m、ホモ接合性遺伝子型をもたらす、両方の対立遺伝子が標的ヒト化を有する二対立遺伝子改変；Δ / Δ、両方の対立遺伝子が大きなC a s 9 - g R N A誘導欠失を有する二対立遺伝子改変。

【0 4 5 2】

ホモ接合性対立遺伝子における遺伝子変換のエビデンス

二対立遺伝子の大きな欠失を有する25のES細胞クローンのうちの24は、単一の固有配列のみを有しており（表19）、それらクローンがホモ接合性対立遺伝子であることを示した。H cクローンS - A 1 1において、本発明者らは、12のPCRクローンのうちの11内に同一配列を発見した。異なる配列を有する単一クローンは2つの異なる欠失対立遺伝子を示唆し得るが、本発明者らはまた、H cヘミ接合性クローンのうちの2つ、N - D 1 1及びO - F 1 2において同一結果を発見した。複数のクローン内の異なるホモ接合性欠失対立遺伝子は、それら対立遺伝子が、一方の染色体上の欠失が相同染色体上のC a s 9開裂の相同組換え修復用のテンプレートとして機能する遺伝子変換機構により生じ得たことを示唆した。本発明者らは、19番染色体上のL r p 5遺伝子座（以下で使用する5つのSVアッセイ及び10のSNVアッセイについては図12を参照のこと）及び2番染色体上のH c遺伝子座（図示せず）の周囲の変種間の構造多型（SV）及び一塩基多型（SNV）によるヘテロ接合性の喪失としての遺伝子変換（L e f e b v r e e t a l.（2001）Nat. Genet. 27: 257 - 258）をアッセイするために、129 S 6 S v E v T a c（129）とC 5 7 B L / 6 N T a c（B 6）のF 1ハイブ

リッド組成物のVGF1 ES細胞株 (Poueymirou et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25:91-99; Valenzuela et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:652-659) を利用した。任意のヘテロ接合性の喪失が全染色体喪失の結果ではないことを確認するために、本発明者らは、129系統とB6系統の間で同一な部位で染色体コピー数 (CCN) アッセイを実施した。Lrp5ヒト化または欠失対立遺伝子について、本発明者らは、Lrp5からテロメア方向に1.2 Mb離れた位置から19番染色体の長腕末端までの位置に配置された複数のSV及びSNVをアッセイした (図12)。Lrp5の位置がセントロメアに近いために、本発明者らは遺伝子のセントロメア側にSVを発見せずSNVを1つだけ発見した。Hcでは、本発明者らは2番染色体上の遺伝子の両側に複数のSV及びSNVをアッセイすることができた (図示せず)。Lrp5クローンのうちの6つの結果については、図15A～図15E及び図16A～図16Cに示している。

【0453】

図15A～図15Eは、5つのSVアッセイ (その位置範囲は、Lrp5から13.7 Mb離れた位置から長腕のテロメア末端近傍の56.7 Mb離れた位置まで) の結果を示している。5つのSVアッセイは、129、B6及びVGF1対照内に2種類の異なるサイズの産物 (129対立遺伝子 (大きい方) 及びB6対立遺伝子 (小さい方)) を生成した。19番染色体地図上におけるSVアッセイのおおよその位置については、図12に示している (アッセイSV 13.7、アッセイSV 20.0、アッセイSV 36.9、アッセイSV 48.3、及びアッセイSV 56.7を参照のこと)。アッセイの数字は、Lrp5に対してテロメア側のMbの数字を表している。これらアッセイ用のプライマーについては表1に示しており、それらの結果については図15A～図15Eに示している。クローンのうちの2つ、BC-H9 (Lrp5^{Hum/Hum}、gRNA B2) 及びBR-B4 (Lrp5^{Hum/Hum}、gRNA D) がB6 SV対立遺伝子の全てを保持するヘテロ接合性の喪失を示す一方で、3番目のクローン、BO-A8 (Lrp5^{Hum/Hum}、gRNA A + F) は129対立遺伝子の全てを保持していた。その他の3つのクローン、BO-F10 (Lrp5^{Hum/Hum}、gRNA A + F)、BO-G11 (Lrp5^{Hum/Hum}、gRNA A + F) 及びBP-G7 (Lrp5^{Δ/Δ}、gRNA A + F) は、ヘテロ接合性を維持していた。

【0454】

加えて、TAQMAN (登録商標) 対立遺伝子識別アッセイを用いて、129対立遺伝子とB6対立遺伝子の間の一塩基多型 (SNV) をアッセイした。図12の19番染色体地図上におけるSNVアッセイのおおよその位置は、アッセイの数字を下部に有する矢じりで示しており、Lrp5遺伝子座からのそれらの距離 (Mb) については以下に示す。Lrp5遺伝子座からの距離 (Mb) は、以下、Lrp5の0.32セントロメア側 (C2)、Lrp5の1.2テロメア側 (T3)、Lrp5の11.1テロメア側 (T6)、Lrp5の13.2テロメア側 (T7)、Lrp5の17.5テロメア側 (T8)、Lrp5の25.8テロメア側 (T9)、Lrp5の33.0テロメア側 (T10)、Lrp5の38.3テロメア側 (T11)、Lrp5の49.6テロメア側 (T13)、及びLrp5の57.2テロメア側 (T14)、のとおりである。129特異的プローブ及びB6特異的プローブならびにプライマーペアについては、表1に示している。SVアッセイによりテロメアのヘテロ接合性の喪失 (LOH) を示した3つのクローン (BC-H9、BO-A8及びBR-B4) の結果については、図16A～図16Cに示している。SNVアッセイ (図16A～図16C、データは省略) では、Lrp5のテロメア側に19番染色体の長腕にわたる遺伝子変換事象 (SNV 1.2及びSNV 57.2; それぞれ図16B及び図16Cを参照のこと) を確認したが、SNV 0.32アッセイ (図16Aを参照のこと) は、全てのクローンがセントロメア側にLrp5から320 kb離れた対立遺伝子におけるヘテロ接合性を維持していたことを示した。アッセイした24のLrp5^{Hum/Hum}またはLrp5^{Δ/Δ}クローンのうち、本発明者らは、Lrp5のテロメア側に19番染色体の全長腕にわたるヘテロ接合性の喪失のエビデンスを有していた6つ

を発見した。クローンのうちの5つ（4つのLrp5^{Hum/Hum}及び1つのLrp5^{Δ/Δ}）がヘテロ接合性からホモ接合性B6に変換された一方で、6番目のクローン（Lrp5^{Hum/Hum}）はホモ接合性129に変換された。CCNアッセイは、19番染色体の2つのコピーの保持を示した。21のHcホモ接合性クローンに対する同様のヘテロ接合性の喪失アッセイにより、2つ、R-E2（Hc^{Hum/Hum}、gRNA^{A+F}）及びR-E8（Hc^{Δ/Δ}、gRNA^{A+F}）が、セントロメア側に全ての対立遺伝子のヘテロ接合性を維持しつつ、Hc遺伝子のテロメア側に全てのSV及びSNVのホモ接合性129に対するヘテロ接合性の喪失を示すことが明らかとなった。CCNアッセイは、2番染色体の喪失がないことを示した。

【0455】

本発明者らの結果は、CRISPR/Cas9が100kb超の大きな単一工程ヒト化の相同組換え修復を改善可能であることを初めて示しており、それにより、大規模なゲノム改変の可能性が広がる。LTVECとgRNA/Cas9を組み合わせることによる最も注目し予想外な効果は、ホモ接合性標的ヒト化を促進させるそれらの機能であった。二対立遺伝子変異及びホモ接合性標的化事象がその他のCRISPR/Cas9実験で報告されているが、これらの遺伝子改変及び挿入のほとんどは、本発明者らのヒト化対立遺伝子と比較して数桁小さい。CRISPR/Cas9の使用前において、本発明者らは、LTVECによるホモ接合性標的化を発見していなかったし、別々の遺伝子を標的とする複数のLTVECを組み合わせた際の2つ以上の遺伝子の同時標的化も確認していなかった。この知見を考慮すると、gRNA/Cas9誘導ホモ接合性標的化は、両方の対立遺伝子を別々に標的とする2つのLTVECではなく、一方の対立遺伝子上における最初の標的化事象が1つまたは複数のCas9切断が促進するもう一方の対立遺伝子の相同変換のためのテンプレートとして機能し得るということを示唆した。デュアルgRNA/Cas9が誘導する大きな二対立遺伝子欠失もホモ接合性であるという意外な新事実（表19）は、遺伝子変換機構の更なる裏付けを提供した。

【0456】

ヘテロ接合性の喪失アッセイ（図12）は、標的遺伝子のテロメア側の染色体の大きなフラグメントを変換する複数の対立遺伝子の大規模な遺伝子変換がホモ接合性ヒト化及び大きな欠失の一部に影響を及ぼすことを示した。このタイプの広範囲指向性遺伝子変換は、細胞周期のG2期における相同染色体の複製染色分体間の有糸分裂組換えと一致する（Lefebvre et al. (2001) Nat. Genet. 27:257-258）（図17A～図17C）。ホモ接合性事象のごく少数を説明するに過ぎないが、この機構は、gRNA/Cas9開裂を使用して染色体の大きな部分にわたる複数の対立遺伝子をヘテロ接合性からホモ接合性へと大規模に変換させることを促進可能とするための手段を提供することができた。しかしながら、ホモ接合性事象のほとんどは、その機構が更なる研究に値する局所的な遺伝子変換の結果であるものと思われる。

【0457】

広範囲指向性遺伝子変換の更なるエビデンスは、F1H4ハイブリッドES細胞（50% 129SVS6株及び50% C57BL/6N株からなる）に、Lrp5 gRNA^A及びFをコードするプラスミド、Cas9をコードするプラスミド、及びLrp5からテロメア方向に30Mb離れたCh25h遺伝子を標的とするLTVECをエレクトロポレーションした後に得られた3つのクローンを解析することによりもたらされた。2つのgRNA（5'末端に500bp離れたgRNA、及び3'末端に2kb離れたgRNA）の間の想定欠失内におけるTAQMAN（登録商標）アッセイを使用した一次スクリーニング後に、3つのクローンは最初に野生型とスコアリングされたが、129対立遺伝子とB6対立遺伝子の間の一塩基多型（SNV）をアッセイする続くTAQMAN（登録商標）対立遺伝子識別アッセイでは驚くべきことに、ヘテロ接合性の喪失が明らかとなった。使用したSNVアッセイは、1つのセントロメアアッセイ（SNV 0.32）及び2つのテロメアアッセイ（SNV 1.2及びSNV 57.2）であった（図12を参照のこと）。表20に示すとおり、セントロメアSNVアッセイ（0.32Mb）により、3

つのクローン全てにおけるヘテロ接合性の維持が確認された。しかしながら、両方のテロメアSNVアッセイはBP-E7及びBP-H4が129対立遺伝子にホモ接合性であることを示し、両方のテロメアSNVアッセイはBP-E6がB6対立遺伝子にホモ接合性であることを示した。3つのクローン全ては19番染色体の2つのコピーの保持を示し、3つのクローン全てはLTVEC標的化にトランスジェニックであった（すなわち、Ch25h遺伝子座が標的となった）。これらの結果は、標的化CRISPR/Cas9開裂を使用した人工ホモ接合性（forced homozygosity）への可能性を開くものである。

【0458】

【表20】

表20. SNV対立遺伝子識別アッセイのスクリーニング結果。

クローン	SNV 0. 3 2	SNV 1. 2	SNV 5 7. 2
BP-E7	1 2 9 / B 6	1 2 9 / 1 2 9	1 2 9 / 1 2 9
BP-H4	1 2 9 / B 6	1 2 9 / 1 2 9	1 2 9 / 1 2 9
BP-E6	1 2 9 / B 6	B 6 / B 6	B 6 / B 6

【0459】

マウスF1H4ハイブリッドES細胞（50% 129SvS6株及び50% C57BL/6N株からなる）を用いたCRISPR/Cas9補助型LTVECヒト化実験（図18A～図18Fを参照のこと）で観察された結果について、いくつかの起こり得る機構で説明可能である。このような機構は、有糸分裂交差による（図18A～図18Cを参照のこと）、または切断誘導複製による染色分体複製による（図18D～図18Eを参照のこと）、相互染色分体交換を介して生じ得る。いずれの例においても、ゲノム複製前に129染色体またはB6染色体のいずれか一方がLTVECの標的となるヘテロ接合性改変は生じ得る（図18A及び図18Dを参照のこと）。代替的に、単一の129染色分体または単一のB6染色分体はゲノム複製後にLTVECの標的となり、続いて、染色分体間の遺伝子変換が生じ得る（図18B及び図18Eを参照のこと）。代替的に、標的ゲノム遺伝子座におけるLTVEC標的化はなくてもよいが、129染色体またはB6染色体のいずれかでCas9開裂が生じ得る（図18C及び図18Fを参照のこと）。BP-E7、BP-H4、及びBP-E6クローンで観察された結果について、この後者の可能性で説明可能である。潜在的な結果については、図18A～図18Fに示している。図18Fでは、Cas9が129染色分体を開裂させる場合、B6対立遺伝子を保持するヘテロ接合性の喪失（LOH）を観察することも可能である。上記の実験では、両方の対立遺伝子が標的となること（Hum/Hum）または両方の対立遺伝子が野生型対立遺伝子となること（+/+）をもたらすヘテロ接合性の喪失事象が観察された。

【0460】

実施例7. B6対立遺伝子と129対立遺伝子の間に最も少ない変異を有する遺伝子のホモ接合性標的化。

いくつかのその他の遺伝子座についてもホモ接合性標的化の試験を行った。別の実験では、LTVECは、マウスAdamts5（ディスインテグリン、及びトロンプスポンジンモチーフ5を有するメタロプロテアーゼ）遺伝子の38kbの欠失を生成して、ヒトADAMTS5遺伝子の43kbのフラグメントへと同時に置換するように設計された。LTVECは、欠失させることを目的としたマウスAdamts5遺伝子の38kb配列に隣接するマウスAdamts5遺伝子座の一部に由来する22kb及び46kbのゲノムDNAを含有するホモロジーマーに隣接する43kbフラグメントのヒトADAMTS5遺伝子を含んでいた。個々の実験では、本発明者らは、Adamts5ヒト化LTVECを、欠失の標的となるマウスAdamts5遺伝子の領域内の二本鎖切断を生成するよ

10

20

30

40

50

うに設計された、C a s 9 をコードするプラスミド及び第 2 のプラスミドまたは 8 つの s g R N A (g A 、 g A 2 、 g B 、 g C 、 g D 、 g E 、 g E 2 及び g F) のうちの 1 つまたは 2 つをコードするプラスミドと組み合わせた。ヒト A D A M T S 5 の挿入部位内の任意の配列の認識を回避するように s g R N A を設計した。

【 0 4 6 1 】

A d a m t s 5 遺伝子の C R I S P R / C a s 9 補助型ヒト化の結果については、表 2 1 に示している。L T V E C 単独を E S 細胞に導入した際、本発明者らは、9 6 のスクリーニング済み薬剤耐性クローンのどれも、正確に標的化された単一对立遺伝子ヘテロ接合性ヒト化対立遺伝子を保持していないことを発見した。それに対し、L T V E C を、8 つの試験 s g R N A のうちの 2 つ (B 及び F 、表 1 を参照のこと) によりガイドされる C a s 9 エンドヌクレアーゼと組み合わせることにより、正確に標的化された単一对立遺伝子ヘテロ接合性変異または二対立遺伝子複合ヘテロ接合性変異が 1 . 0 % の効率で生成された。ホモ接合性標的改変は観察されなかった。別の実験では、g R N A A 2 と g R N A E 2 も組み合わせたが、ホモ接合性標的化は依然として観察されなかった。

【 0 4 6 2 】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 2 1. A d a m t s 5 遺伝子の C R I S P R / C a s 9 補助型ヒト化のスクリーニング結果。

s g R N A 位置	欠失末端からの距離 (b p)	g R N A	C R I S P R 活性 (%)	スクリーニングしたクローン	ヘテロ接合体性標的化	複合ヘテロ接合体性	ホモ接合体性標的化
5'	1 0 0	g R N A A	8 5 . 7	9 6	0	0	0
5'	5 0 0	g R N A A 2	5 4 . 8	9 6	0	0	0
5'	1 0 0 0	g R N A B	6 6 . 7	9 6	1	0	0
中央	1 8 7 0 0 / 1 8 9 5 0	g R N A C	9 . 5	9 6	0	0	0
中央	1 8 8 0 0 / 1 8 8 5 0	g R N A D	4 . 8	9 6	0	0	0
3'	1 0 0 0	g R N A F	3 6 . 9	9 6	0	1	0
3'	5 0 0	g R N A E	5 4 . 8	9 6	0	0	0
3'	1 0 0	g R N A E 2	5 4 . 8	9 6	0	0	0
5' 及び 3'	5 0 0 / 1 0 0	A 2 + E 2	アッセイ無	9 6	0	0	0
N / A	N / A	無	N / A	9 6	0	0	0

【0 4 6 3】

別の実験では、L T V E C は、マウス D p p 4 (ジペプチジルペプチダーゼ 4) 遺伝子の 7 9 k b の欠失を生成して、相同ヒト D P P 4 遺伝子の 8 2 k b のフラグメントへと同時に置換するように設計された。L T V E C は、欠失させることを目的としたマウス D p p 4 遺伝子の 7 9 k b 配列に隣接するマウス D p p 4 遺伝子座の一部に由来する 4 6 k b のゲノム DNA をそれぞれ含有する 5' 及び 3' ホモロジーアームに隣接する 8 2 k b フラグメントのヒト D P P 4 遺伝子を含んでいた。個々の実験では、本発明者らは、D p p 4 ヒト化 L T V E C を、欠失の標的となるマウス D p p 4 遺伝子の領域内の二本鎖切断を生成するように設計された、C a s 9 をコードするプラスミド及び第 2 のプラスミドまたは 8 つの s g R N A (g A、g B、g B 2、g C、g D、g E、g E 2 及び g F) のうちの 1 つまたは 2 つをコードするプラスミドと組み合わせた。ヒト D P P 4 遺伝子の挿入部

位内の任意の配列の認識を回避するように s g R N A を設計した。

【 0 4 6 4 】

D p p 4 遺伝子の C R I S P R / C a s 9 補助型ヒト化の結果については、表 2 2 に示している。L T V E C 単独を E S 細胞に導入した際、本発明者らは、スクリーニング済み薬剤耐性クローンの 2 . 1 % が、正確に標的化された単一对立遺伝子ヘテロ接合性ヒト化対立遺伝子を保持していることを発見した。それに対し、L T V E C を、8 つの試験 s g R N A (A 、 B 、 B 2 、 C 、 D 、 E 、 E 2 及び F 、表 1 を参照のこと) のうちの任意の 1 つによりガイドされる C a s 9 エンドヌクレアーゼと組み合わせることにより、正確に標的化された単一对立遺伝子ヘテロ接合性変異が 2 . 1 ~ 7 . 3 % の範囲の効率で生成された。ホモ接合性標的改変は観察されなかった。別の実験では、g R N A A と g R N A F 、または g R N A A と g R N A D を組み合わせたが、ホモ接合性標的化は依然として観察されなかった。

【 0 4 6 5 】

【表 2 2 - 1】

表 2 2 . D p p 4 遺伝子の C R I S P R / C a s 9 補助型ヒト化のスクリーニング結果。

s g R N A 位置	欠失末端からのおよその距離 (b p)	g R N A	C R I S P R 活性 (%)	スクリーニングしたクローン	ヘテロ接合性標的化	複合ヘテロ接合性	ホモ接合性標的化
5 ′	5 0	g R N A A	アッセイ無	9 6	7	0	0
5 ′	4 0 0	g R N A B	アッセイ無	9 6	2	0	0
5 ′	9 0 0	g R N A B 2	アッセイ無	9 6	5	0	0
中央	3 8 8 0 0 / 4 0 2 0 0	g R N A C	アッセイ無	9 6	3	0	0
中央	4 0 8 0 0 / 3 8 1 0 0	g R N A D	アッセイ無	9 6	3	0	0
3 ′	9 0 0	g R N A E	アッセイ無	9 6	2	0	0

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2】

		2					
3	5 0 0	g R N A E	アッセイ無	9 6	6	0	0
3	2 0 0	g R N A F	アッセイ無	9 6	5	0	0
5 及び 3	5 0 / 3 8 1 0 0	A + D	アッセイ無	3 8 4	4	0	0
5 及び 3	5 0 / 2 0 0	A + F	アッセイ無	3 8 4	9	0	0
N / A	N / A	無	N / A	9 6	2	0	0

10

【0 4 6 6】

別の実験では、L T V E Cは、マウスF o l h 1（グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ2）遺伝子の5 5 k bの欠失を生成して、相同ヒトF O L H 1 遺伝子の6 1 k bのフラグメントへと同時に置換するように設計された。L T V E Cは、欠失させることを目的としたマウスF o l h 1 遺伝子の5 5 k b配列に隣接するマウスF o l h 1 遺伝子座の一部に由来する2 2 k b及び4 6 k bのゲノムDNAを含有するホモロジーマームに隣接する6 1 k bフラグメントのヒトF O L H 1 遺伝子を含んでいた。個々の実験では、本発明者らは、F o l h 1 ヒト化L T V E Cを、欠失の標的となるマウスF o l h 1 遺伝子の領域内の二本鎖切断を生成するように設計された、C a s 9をコードするプラスミド及び第2のプラスミドまたは8つのs g R N A（g A、g A 2、g B、g C、g D、g F、g E及びg E 2）のうちの1つまたは2つをコードするプラスミドと組み合わせた。ヒトF O L H 1 遺伝子の挿入部位内の任意の配列の認識を回避するようにs g R N Aを設計した。

20

【0 4 6 7】

F o l h 1 遺伝子のC R I S P R / C a s 9補助型ヒト化の結果については、表 2 3 に示している。L T V E C単独をE S細胞に導入した際、本発明者らは、9 6のスクリーニング済み薬剤耐性クローンのどれも、正確に標的化された単一对立遺伝子ヘテロ接合性ヒト化対立遺伝子を保持していないことを発見した。それに対し、L T V E Cを、6つの試験s g R N Aのうちの3つ（A、D及びE 2、表 1を参照のこと）によりガイドされるC a s 9エンドヌクレアーゼと組み合わせることにより、正確に標的化された単一对立遺伝子ヘテロ接合性変異が1. 0～3. 1%の範囲の効率で生成された。ホモ接合性標的改変は観察されなかった。別の実験では、g R N A Aとg R N A E 2、またはg R N A Aとg R N A Dを組み合わせたが、ホモ接合性標的化は依然として観察されなかった。

30

【0 4 6 8】

【表 2 3 - 1】

表 2 3. F o l h 1 遺伝子のC R I S P R / C a s 9補助型ヒト化のスクリーニング結果。

40

s g R N A 位 置	欠失末端 からのお およその 距離（b	g R N A	C R I S P R 活性 （%）	スク リー ニン グし	ヘテロ接 合性標的 化	複合ヘテ ロ接合性	ホモ接合 性標的化
------------------------	------------------------------	------------	-----------------------------	----------------------	-------------------	--------------	--------------

50

【表 2 3 - 2】

	p)			たク ロー ン			
5	1 0 0	g R N A A	4 5 . 2	9 6	2	0	0
5	5 0 0	g R N A A 2	6 1 . 9	9 6	0	0	0
5	1 0 0 0	g R N A B	N / A	N / A	N / A	N / A	N / A
中央	3 0 3 0 0 / 2 4 8 0 0	g R N A C	7 . 1	9 6	0	0	0
中央	3 1 2 9 0 / 2 3 8 1 0	g R N A D	3 9 . 2	9 6	1	0	0
3	1 0 0 0	g R N A F	N / A	N / A	N / A	N / A	N / A
3	5 0 0	g R N A E 2	アッセ イ無	9 6	1	0	0
3	1 0 0	g R N A E	1 . 2	9 6	0	0	0
5 及び 3	1 0 0 / 2 3 8 1 0	A + D	アッセ イ無	9 6	3	0	0
5 及び 3	1 0 0 / 5 0 0	A + E 2	アッセ イ無	9 6	0	0	0
N / A	N / A	無	N / A	9 6	0	0	0

【0 4 6 9】

異なる遺伝子座を標的とする際に観察されたホモ接合性標的クローンの要約については、表 2 4 に提供している。

【0 4 7 0】

【表 2 4 - 1】

表 2 4. 異なる遺伝子座におけるホモ接合性標的クローンの数。

遺伝子	A d a m t s 5	T r p a 1	F o l h 1	L r p 5	C 5	D p p 4	R o r 1
MA I D #	7 0 2 8	7 0 0 2	7 0 4 4	7 0 6 4	7 1 4 0	7 3 2 6	7 2 9 2

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

欠失／挿入 (k b)	3 8 / 4 3	4 5 / 5 5	5 5 / 6 1	6 8 / 9 1	7 6 / 9 7	7 9 / 8 2	1 1 0 / 1 3 4
g R N A の組み合 わせ	A 2 + E 2	B + F	A + D、 A + E 2	A + F、 B + E、 B 2 + E 2、 A + E、 A + E 2	A + C、 A + E 2	A + F、 A + D	A + D、 A + F
ホモ接合 性標的ク ローン	0	1	0	1 2	4	0	0
ホモロジ ーアーム を設計す るための ゲノム	1 2 9 B a c	1 2 9 B a c	B 6 B a c	1 2 9 B a c	1 2 9 B a c	B 6 B a c	B 6 B a c

10

20

【0 4 7 1】

これらの実験では、ホモ接合性標的化は、B 6 対立遺伝子と 1 2 9 対立遺伝子の間に最も少ない配列変異を有する遺伝子で最も多かった。このことは図 1 9 ～図 2 5 に示されている。それぞれの図における縦点線の内側の領域は、標的領域 (L T V E C の 5 ' 標的配列及び 3 ' 標的配列の内側の領域) を示している。例えば、L r p 5 (図 1 9 を参照のこと) では、L T V E C のホモロジアーームは、1 2 9 ゲノムに基づいて設計された。一塩基多型を同定するための参照配列を、J a c k s o n L a b o r a t o r y 製の C 5 7 B L / 6 J マウス系統のゲノム配列とした。T a c o n i c B i o s c i e n c e s 製の 1 2 9 S 6 / S v E v 系統、T a c o n i c B i o s c i e n c e s 製の C 5 7 B L / 6 N 系統、ならびに、1 2 9 S 6 / S v E v 系統及び C 5 7 B L / 6 N 系統から作製した V G F 1 ハイブリッド細胞株と、この参照配列を比較した。縦線は、参照配列と比較した一塩基多型を示している。図 2 0 ～図 2 5 はそれぞれ、H c、T r p a 1、A d a m t s 5、F o l h 1、D p p 4、R o r 1 及び C D 3 についての同様の解析を提供している。

30

【0 4 7 2】

表 2 4 及び図 1 9 ～図 2 5 に示すとおり、最も多い数のホモ接合性標的クローンは、L r p 5 遺伝子座 (1 2 のホモ接合性クローン) 及び H c / C 5 遺伝子座 (4 つのホモ接合性クローン) において生成された。特に、g R N A 認識配列もしくはその近傍または欠失及び置換させることを目的とした領域の前後において、これら標的ゲノム遺伝子座のそれぞれが有する一塩基多型は極めて少なかった (図 1 9 (L r p 5) 及び図 2 0 (C 5) を参照のこと)。

40

【0 4 7 3】

それに対し、ホモ接合性標的化は、特に、g R N A 認識配列もしくはその近傍または欠失及び置換させることを目的とした領域の前後において、B 6 対立遺伝子と 1 2 9 対立遺伝子の間に高密度の対立遺伝子配列変異を有する遺伝子で少ないまたは不在であった。例えば、A d a m t s 5 遺伝子座、F o l h 1 遺伝子座、D p p 4 遺伝子座または R o r 1 遺伝子座を標的とする際に、ホモ接合性クローンは生成されなかった (それぞれ図 2 2 ～図 2 5 を参照のこと)。しかしながら、欠失及び置換させることを目的とした領域の高密度の対立遺伝子配列変異 3 ' を有するが欠失及び置換させることを目的とした領域の低密

50

度の対立遺伝子配列変異 5' を有する *Trpa1* 遺伝子座を標的とする際に、ホモ接合性クローンは生成された（すなわち、5' *gRNA* 認識配列またはその近傍に）（図 21）。

【0474】

実施例 8．相同染色体対がホモ接合性標的化を増加させないそれぞれの染色体に対して設計された標的化ベクターの使用。

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により、または、相同染色体対内の一方の染色体上における標的化事象に続く相同染色体対間で同等の遺伝子変換またはヘテロ接合性の喪失により、ホモ接合性標的改変が生成されたかどうかを更に試験するために、*gRNA* 認識配列もしくはその近傍または欠失及び置換させることを目的とした領域の前後において相同染色体対間に大量の対立遺伝子配列変異を有する別のゲノム遺伝子座を標的とした。例えば、図 26 を参照されたい。このことは、ホモ接合性崩壊またはホモ接合性標的化に対する対立遺伝子変異の影響を本発明者らが確認することを可能とした。縦点線の内側の領域は標的領域（*LTVEC* の 5' 標的配列及び 3' 標的配列の内側の領域）である。一塩基多型を同定するための参照配列を、*Jackson Laboratory* 製の *C57BL/6J* マウス系統のゲノム配列とした。*Taconic Biosciences* 製の *129S6/SvEv* 系統 MP 変異体、*Taconic Biosciences* 製の *C57BL/6N* 系統 RGC 変異体、ならびに、*129S6/SvEv* 系統及び *C57BL/6N* 系統から作製した *VGF1* ハイブリッド細胞株（図下部の 3 行に記載）と、この参照配列を比較した。3 行のそれぞれにおける縦線は、参照配列と比較した一塩基多型を示している。

【0475】

この実験では、2 つの *LTVEC* を、マウス遺伝子座の 33 kb の欠失を生成して、ヒトセグメント間にマウス遺伝子座の介在セグメントを有するオルソログスヒト遺伝子の 3 つのセグメント（6.8 kb、0.1 kb 及び 1.7 kb）を含む 34.5 kb のフラグメントへと同時に置換するように設計した。実験は、*VGF1* (F1H4)、本発明者らの *C57BL6NTac/129S6SvEvF1* ハイブリッド XY ES 細胞株を用いて実施した（*Poueymiro et al.* (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:91-99; *Valenzuela et al.* (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:652-659）。上記のとおり *ES* 細胞を培養した（*Matisse et al.* (2000) in *Joyner, A. L. ed. Gene Targeting: a practical approach*, pp. 100-132, Oxford University Press, New York）。雌 *C57BL/6NTac* マウスを雄 *129S6/SvEvTac* マウスと交配して *C57BL6* (X^{B6}) / *129S6* (Y^{129}) マウスを作製することにより、*VGF1* 細胞を作製した。図 7 を参照されたい。

【0476】

一方の *LTVEC* は *VGF1* 細胞内の *129* 染色体に対して設計され *Neo* 選択カセット (MAID # 7170) を含むホモロジーマームを有し、もう一方の *LTVEC* は *C57BL6* 染色体に対して設計され *Hyg* 選択カセット (MAID # 7314) を含むホモロジーマームを有していた。2 つの *LTVEC* は別の場合同一であった。

【0477】

個々の実験では、本発明者らは、2 つのヒト化 *LTVEC* を、欠失の標的となるマウス遺伝子の領域内の二本鎖切断を生成するように設計された、*Cas9* をコードするプラスミド及び第 2 のプラスミドまたは 4 つの *sgRNA* (*mGU*、*mGU2*、*mGD*、*mGD2*) をコードするプラスミドと組み合わせた。ヒト遺伝子の挿入部位内の任意の配列の認識を回避するように *sgRNA* を設計した。

【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F0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F0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 10)

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 11)

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 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 12)

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

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

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23のいずれか1項に記載の方法。

（項目25）

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24のいずれか1項に記載の方法。

10

（項目26）

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25のいずれか1項に記載の方法。

（項目27）

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24のいずれか1項に記載の方法。

20

（項目28）

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24及び項目27のいずれか1項に記載の方法。

（項目29）

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28のいずれか1項に記載の方法。

（項目30）

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5kb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28のいずれか1項に記載の方法。

30

（項目31）

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挿入を更に含む、項目30に記載の方法。

（項目32）

前記核酸挿入は、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である、項目31に記載の方法。

40

（項目33）

前記外来修復テンプレートは、約50ヌクレオチド長～約1kb長である、項目30から項目32のいずれか1項に記載の方法。

（項目34）

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る、項目33に記載の方法。

（項目35）

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30から

50

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 10 kb 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 ' ホモロジーマームと前記 3 ' ホモロジーマームの総合計は少なくとも 10 kb 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 ' ホモロジーマームと前記 3 ' ホモロジーマームに隣接する核酸挿入を含み、

前記核酸挿入は、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、

前記核酸挿入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、50 % B A L B / c、25 % C 5 7 B L / 6、及び 25 % 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む、前記マウスはヒト定常領域遺伝子を欠き、前記マウ

10

20

30

40

50

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46または項目47に記載の方法。

(項目49)

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46から項目48のいずれか1項に記載の方法。

(項目50)

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、項目41から項目48のいずれか1項に記載の方法。

(項目51)

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50に記載の方法。

(項目52)

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_K1-39/J_K5遺伝子セグメントまたはヒトV_K3-20/J_K1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51に記載の方法。

(項目53)

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、

10

20

30

40

50

(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、

(i i) 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、

(i i i) 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 κ 配列であって、

前記単一ヒト生殖細胞系 V κ 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 κ 配列と、

(i i) 単一ヒト生殖細胞系 J κ 配列であって、

前記再構成 V κ / J κ 配列は前記内在マウス κ 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 κ 配列と、

を含む再構成 V κ / J κ 配列の内在マウス κ 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 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、
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グ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 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

10

20

30

40

50

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 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 7)

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グ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 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 8)

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、

項目 5 6 または項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

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 κ 配列であって、

前記単一ヒト生殖細胞系 V κ 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 κ 配列と、

(ii) 単一ヒト生殖細胞系 J κ 配列であって、

前記再構成 V κ / J κ 配列は前記内在マウス κ 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 κ 配列と、

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

10

20

30

40

50

(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56または項目57に記載の方法。

(項目60)

項目1から項目59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10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kbまたは10kb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10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kbまたは10kbの隣接配列、を含む、前記方法。

(項目61)

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60に記載の方法。

(項目62)

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、項目61に記載の方法。

(項目63)

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) 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

10

20

30

40

50

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、前記方法。

(項目64)

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F0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、

(II) 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F0世代非ヒト動物を作製することと、

を含む、項目63に記載の方法。

(項目65)

前記多能性細胞は胚性幹(ES)細胞である、項目64に記載の方法。

(項目66)

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F0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F0世代非ヒト動物を作製することを含む、項目63に記載の方法。

(項目67)

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63から項目66のいずれか1項に記載の方法。

(項目68)

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る、項目63から項目67のいずれか1項に記載の方法。

(項目69)

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る、項目63から項目67のいずれか1項に記載の方法。

(項目70)

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更に含む、

項目63から項目69のいずれか1項に記載の方法。

(項目71)

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63から項目70のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(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。

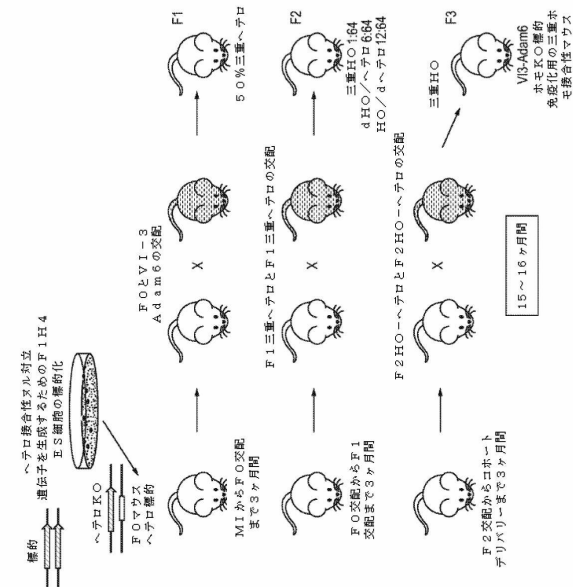
(項目 7 3)

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。

【図面】

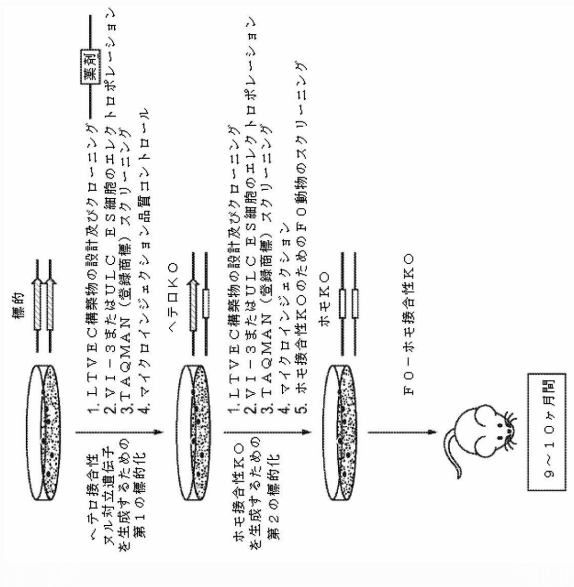
【図 1】

【図 1】



【図 2】

【図 2】



10

20

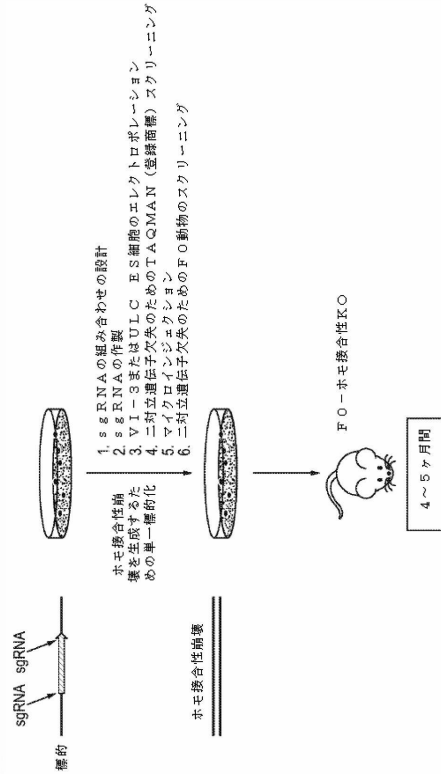
30

40

50

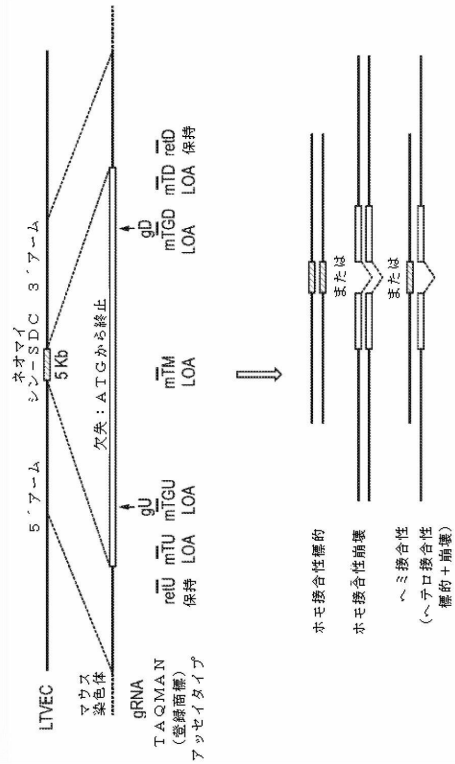
【図 3】

【図 3】



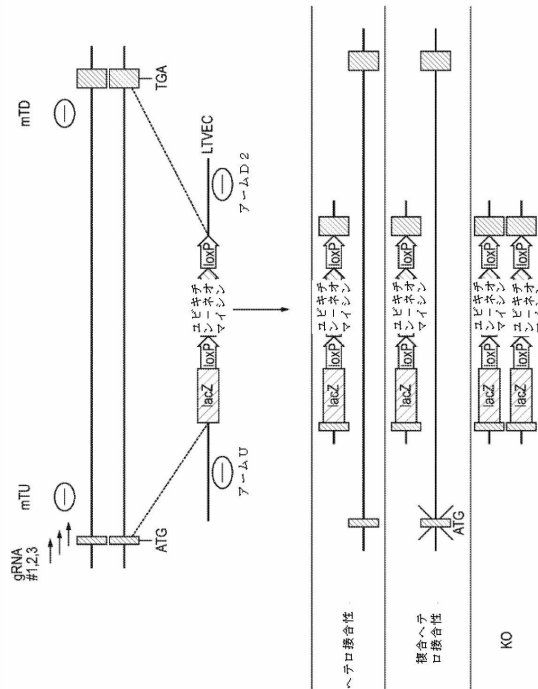
【図 4】

【図 4】



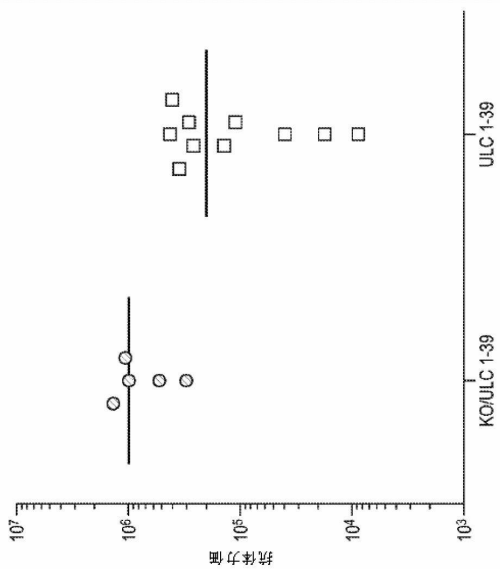
【図 5】

【図 5】



【図 6】

【図 6】



10

20

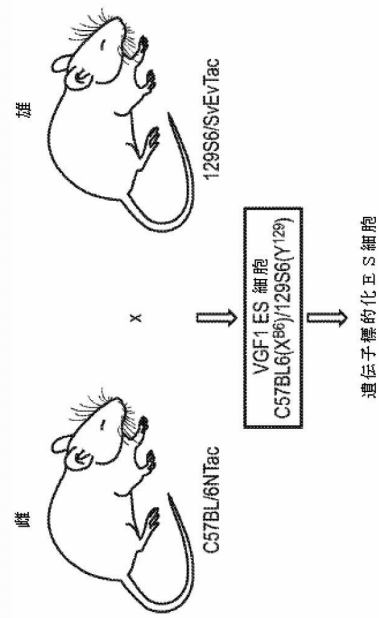
30

40

50

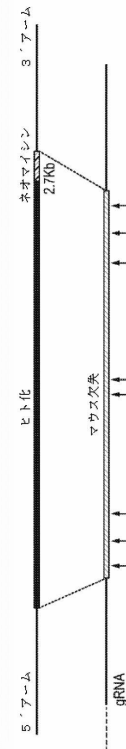
【図 7】

【図 7】



【図 8】

【図 8】

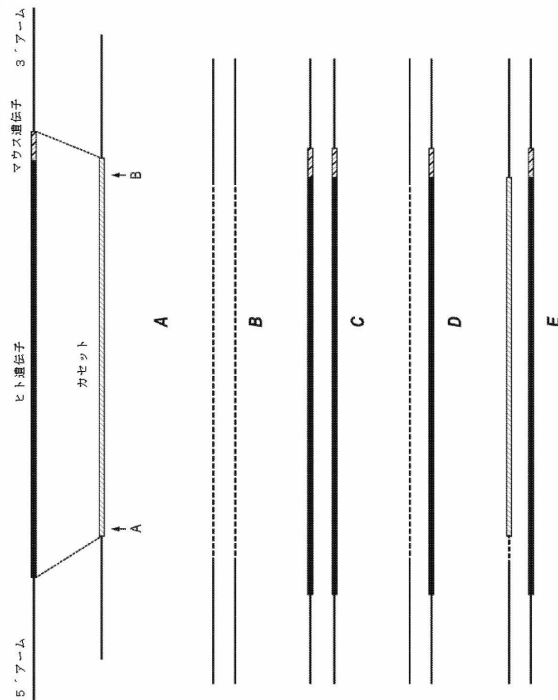


10

20

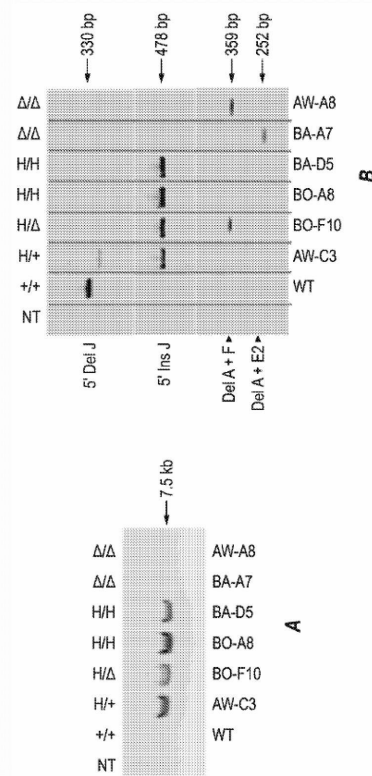
【図 9】

【図 9】



【図 10】

【図 10】



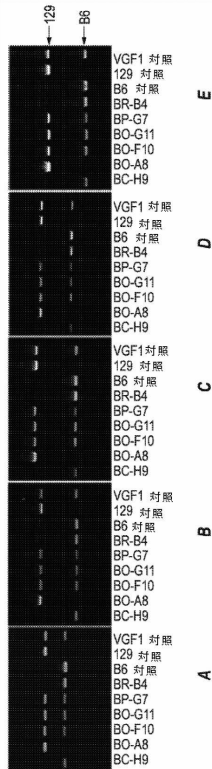
30

40

50

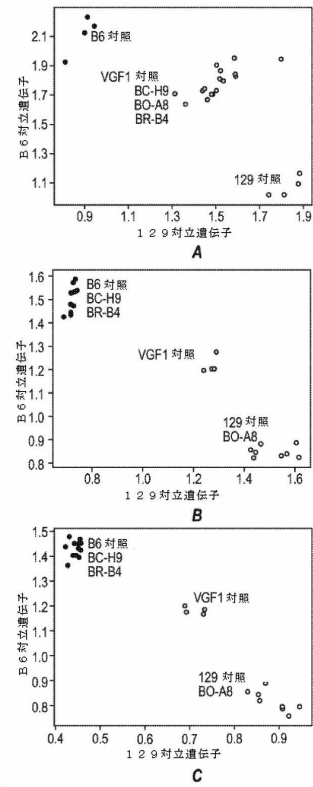
【図 15】

【図 15】



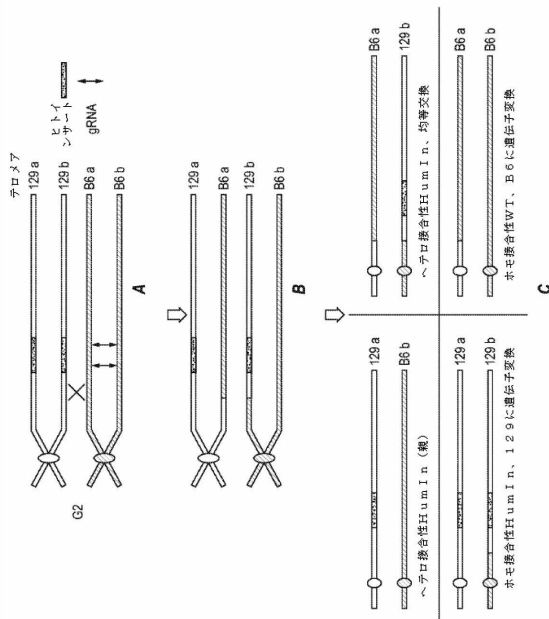
【図 16】

【図 16】



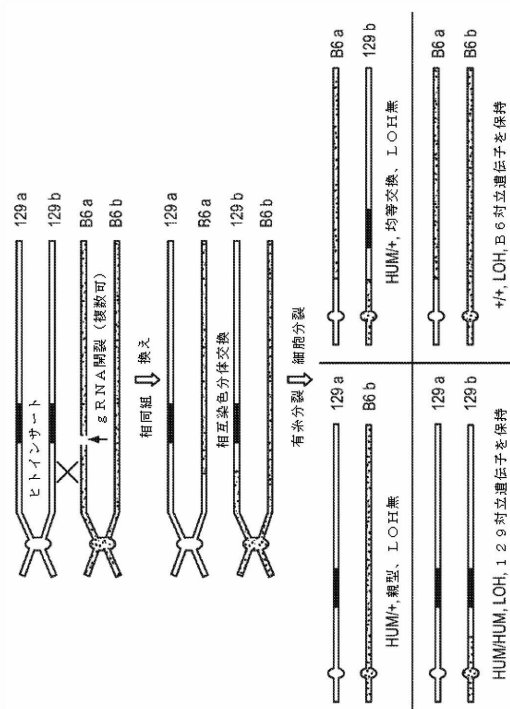
【図 17】

【図 17】



【図 18 A】

【図 18 A】



10

20

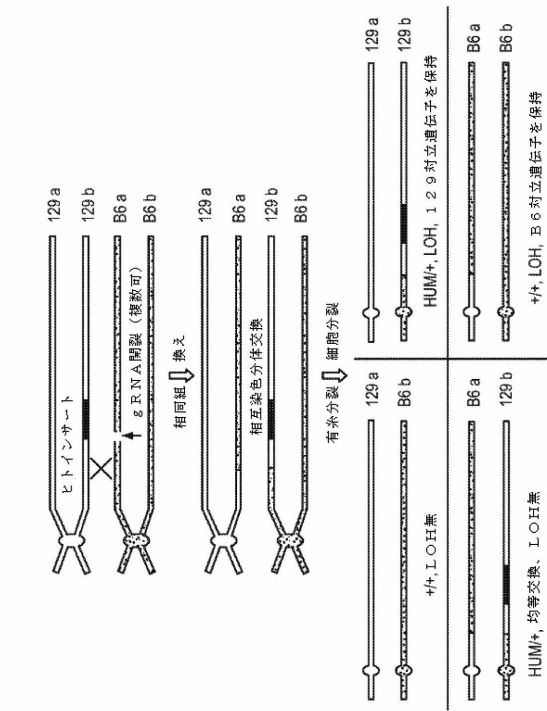
30

40

50

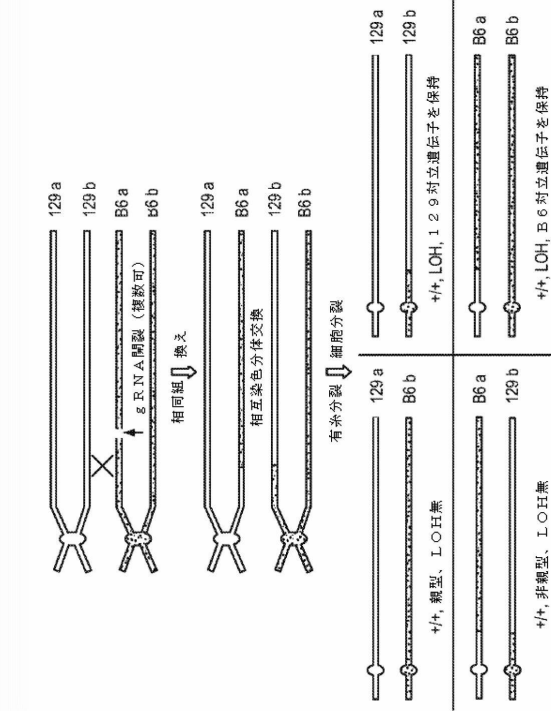
【図 18 B】

【図 18 B】



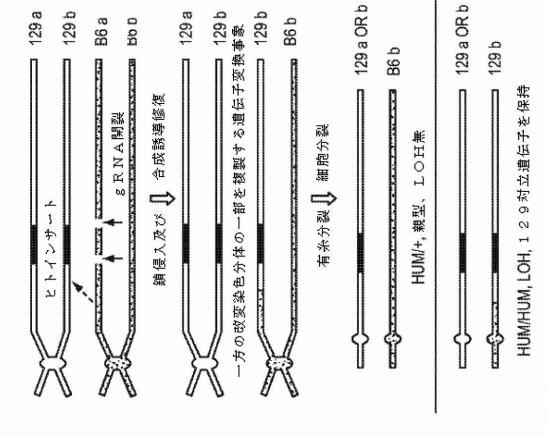
【図 18 C】

【図 18 C】



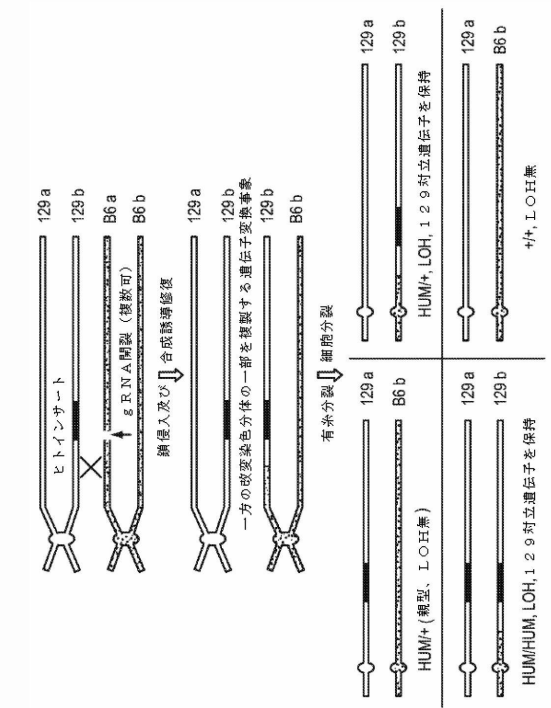
【図 18 D】

【図 18 D】



【図 18 E】

【図 18 E】



10

20

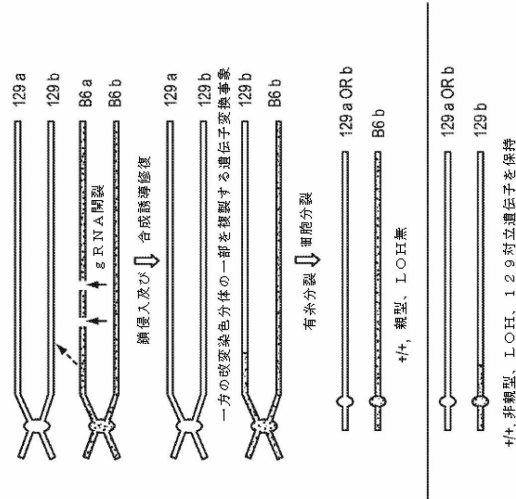
30

40

50

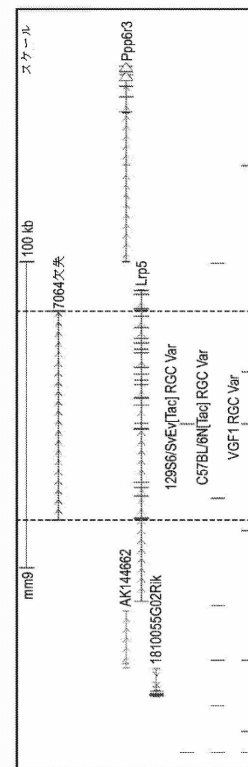
【図 18 F】

【図 18 F】



【図 19】

【图 19】

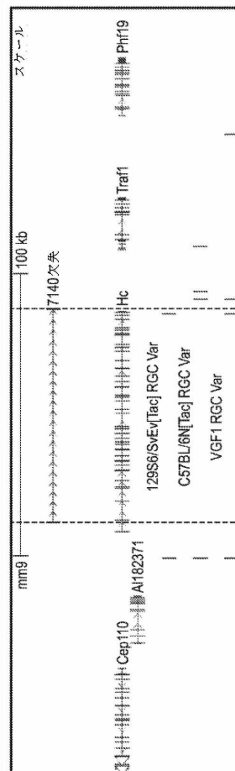


10

20

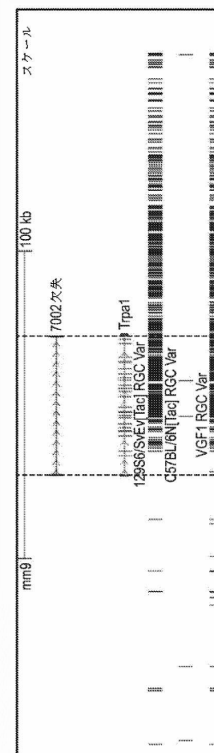
【図 20】

【図 20】



【図 2 1】

【图 2 1】



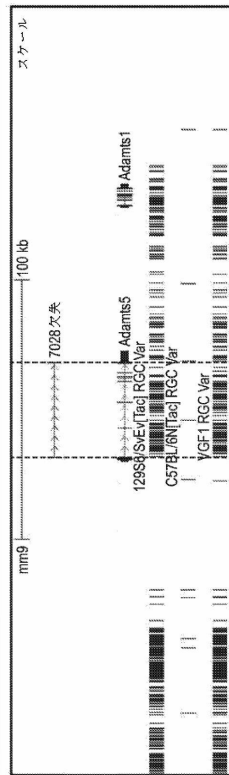
30

40

50

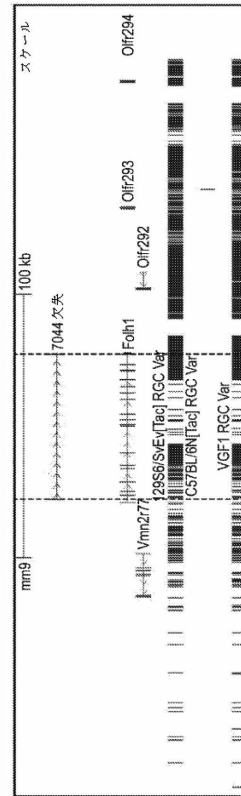
【図 2 2】

【図 2 2】



【図 2 3】

【図 2 3】

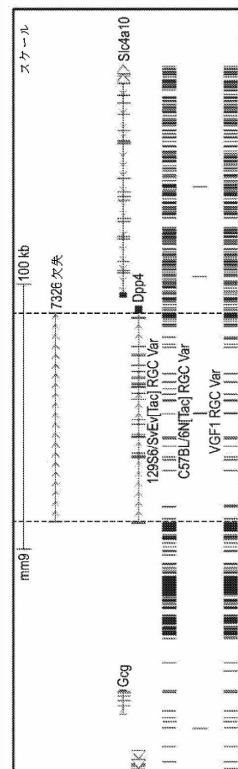


10

20

【図 2 4】

【図 2 4】



【図 2 5】

【図 2 5】



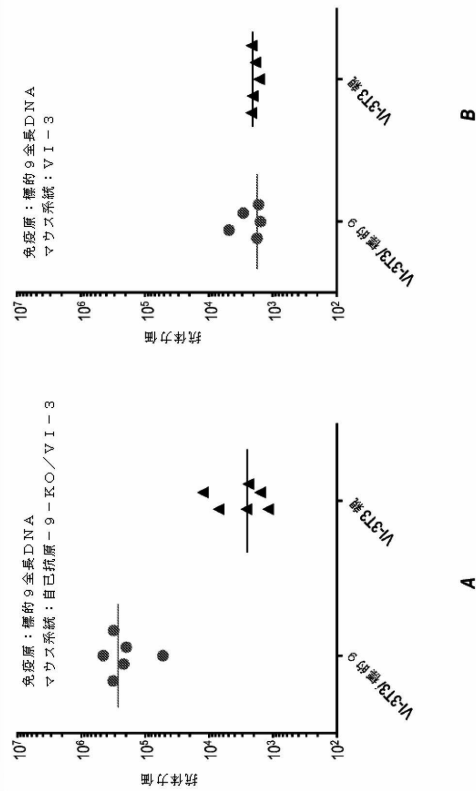
30

40

50

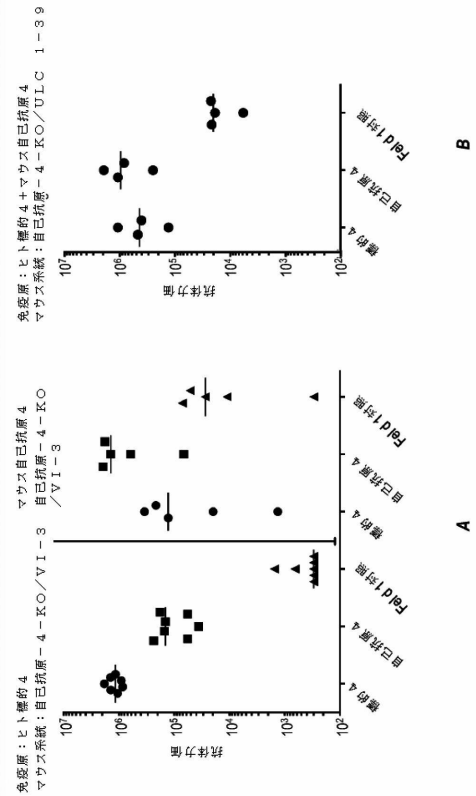
【図 3 0】

【図 3 0】



【図 3 1】

【図 3 1】

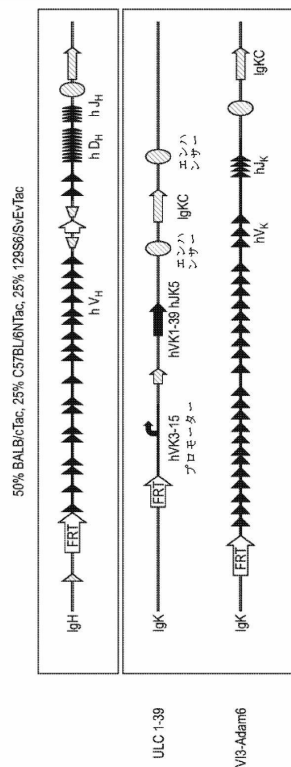


10

20

【図 3 2】

【図 3 2】



30

40

50

【配列表】
0007324583000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/20	(2006.01)	C 1 2 N	5/20	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

ル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 マクドナルド, リン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 プリセット, マリーヌ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ライ, カーマン ビーナス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン, ウェスト メイン ストリート 1 2 7 , ユニット 2 0 1

(72)発明者 バディテ, アショク

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 マーフィー, アンドリュー ジェイ.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ドロゲット, グスターボ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 フレンドウェイ, デイビッド

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ザンブロウィッツ, ブライアン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

審査官 山本 匡子

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 5 / 1 8 8 1 0 9 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 5 / 0 8 8 6 4 3 (WO, A 1)

特開平 0 8 - 0 5 6 6 9 2 (JP, A)

特開 2 0 0 6 - 1 8 7 2 1 5 (JP, A)

特表 2 0 1 6 - 5 2 2 6 7 9 (JP, A)

Skeletal Muscle, 2015年, 5:34, DOI 10.1186/s13395-015-0060-8

FEBS J.(2014)Vol.281, p.1717-1725 , doi:10.1111/febs.12735

Molecular Therapy(2015)4, e268, pp.1-10, doi:10.1038/mtna.2015.42

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

C 1 2 Q

C 1 2 N 1 / 0 0 - 5 / 2 8

A 0 1 K 6 7 / 0 2 7

MEDLINE / BIOSIS / CAPLUS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)