

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】令和1年8月8日(2019.8.8)

【公表番号】特表2018-523999(P2018-523999A)  
 【公表日】平成30年8月30日(2018.8.30)  
 【年通号数】公開・登録公報2018-033  
 【出願番号】特願2017-568252(P2017-568252)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 A 0 1 K 67/027 (2006.01)  
 A 6 1 L 27/38 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/08 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/10 Z N A  
 A 0 1 K 67/027  
 A 6 1 L 27/38 1 2 0  
 C 1 2 N 15/08  
 C 1 2 N 15/09 1 0 0

【手続補正書】  
 【提出日】令和1年6月28日(2019.6.28)  
 【手続補正1】  
 【補正対象書類名】特許請求の範囲  
 【補正対象項目名】全文  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【特許請求の範囲】  
 【請求項1】

非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞が、機能的なNKX2-5タンパク質、HAND1タンパク質、TBX5タンパク質またはそれらの組み合わせを欠くよう、そのゲノムが、NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせの両方の対立遺伝子に変異を有する、非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

【請求項2】

変異が、NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせの欠失である、請求項1記載の非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

【請求項3】

非ヒト動物細胞または胚盤胞が、ブタ、ウシ、ウマまたはヤギである、請求項1または2記載の非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

【請求項4】

ヒトNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現し、非ヒト動物NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現を欠く、キメラ非ヒト動物、桑実胚または胚盤胞。

【請求項5】

前記非ヒト動物が、ヒト化心臓細胞および/または組織を生成する、請求項4記載のキメラ非ヒト動物。

【請求項6】

外因性ブタNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現し、内因性ブタNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現を欠く、キメラブタ(ブタ・ブタキメ

ラ)。

【請求項 7】

非ヒト動物が、ブタ、ウシ、ウマまたはヤギである、請求項4または5記載のキメラ非ヒト動物。

【請求項 8】

ヒトNKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせを発現するキメラ非ヒト動物を作製するための方法であって、以下の工程を含む、方法：

(a)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト動物細胞を作製する工程であって、非ヒトNKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせの遺伝子の両方のコピーが、機能的なNKX2-5タンパク質、HAND1タンパク質、TBX5タンパク質またはそれらの組み合わせの生成を妨げる変異を有する、工程；

(b)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(a)の非ヒト細胞由来の核を除核非ヒト卵母細胞に融合し、該卵母細胞を活性化させて、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト桑実胚または胚盤胞を形成するよう分裂させることを含む体細胞核移植によって、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト桑実胚、胚盤胞を作製する工程；

(c)非ヒトNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(b)の桑実胚または胚盤胞にヒト幹細胞を導入する工程；および

(d)偽妊娠代理非ヒト動物に(c)由来の桑実胚または胚盤胞を移植して、ヒトNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現するキメラ非ヒト動物を作製する工程。

【請求項 9】

外因性NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせを発現するキメラブタを作製するための方法であって、以下の工程を含む、方法：

(a)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルであるブタ細胞を作製する工程であって、内因性ブタNKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせの遺伝子の両方のコピーが、機能的な内因性ブタNKX2-5タンパク質、HAND1タンパク質、TBX5タンパク質またはそれらの組み合わせの生成を妨げる変異を有する、工程；

(b)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(a)のブタ細胞由来の核を除核ブタ卵母細胞に融合し、該卵母細胞を活性化させて、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルであるブタ桑実胚または胚盤胞を形成するよう分裂させる工程を含む体細胞核移植によって、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルであるブタ桑実胚または胚盤胞を作製する工程；

(c)ブタNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(b)の桑実胚または胚盤胞にブタ幹細胞を導入する工程；および

(d)偽妊娠代理ブタに(c)由来の桑実胚または胚盤胞を移植して、外因性ブタNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現するキメラブタを作製する工程。

【請求項 10】

非ヒト動物においてヒトまたはヒト化心臓細胞を生成する方法であって、以下の工程を含む、方法：

(a)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト細胞を作製する工程であって、非ヒトNKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせの両方の対立遺伝子が、機能的な非ヒトNKX2-5タンパク質、HAND1タンパク質、TBX5タンパク質またはそれらの組み合わせの生成を妨げる変異を有する、工程；

(b)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(a)の非ヒト細胞由来の核を除核非ヒト動物卵母細胞に融合し、該卵母細胞を活性化させて、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト動物胚盤胞を形成するよう分裂させることを含む体細胞核移植によって、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト桑実胚または胚盤胞を作製する工程；

(c)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(b)の非ヒト動物胚盤胞または桑実胚にヒト幹細胞を導入する工程；および

(d) 偽妊娠代理非ヒト動物に(c)由来の胚盤胞または桑実胚を移植して、ヒトまたはヒト化心臓細胞を発現する非ヒト動物を作製する工程。

【請求項 1 1】

非ヒト動物が、ブタ、ウシ、ウマまたはヤギである、請求項8または10記載の方法。

【請求項 1 2】

ヒト幹細胞が、組織特異的幹細胞、多能性幹細胞、分化多能性成体幹細胞、人工多能性幹細胞または臍帯血幹細胞(UCBSC)である、請求項8、9または10記載の方法。

【請求項 1 3】

前記人工多能性細胞が、線維芽細胞から形成される、請求項8、9または10記載の方法。

【請求項 1 4】

請求項8～13のいずれか一項記載の方法によって作製される非ヒト動物。

【請求項 1 5】

以下の工程を含む方法によって作られる、ヒト心臓、心臓組織、および/または心臓細胞：

(a)NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト動物細胞を作製する工程であって、非ヒトNKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせの両方の対立遺伝子が、機能的なNKX2-5タンパク質、HAND1タンパク質、TBX5タンパク質またはそれらの組み合わせの生成を妨げる変異および/または欠失を有する、工程；

(b)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト胚盤胞を作成するための遺伝子編集を用いて、NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせがヌルである(a)の非ヒト動物細胞由来の核を除核非ヒト卵母細胞に融合し、該卵母細胞を活性化させて、NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト胚盤胞を形成するよう分裂させることを含む体細胞核移植によって、NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト胚盤胞または桑実胚を作製する工程；

(c)NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせがヌルである(b)の非ヒト胚盤胞にヒトドナー幹細胞を導入する工程；および

(d)偽妊娠代理非ヒト動物に(c)由来の胚盤胞を移植して、ヒト心臓、心臓組織、および/または心臓細胞を生成する非ヒト動物を作製する工程。

【請求項 1 6】

非ヒト動物がブタである、請求項15に記載の心臓、心臓組織、および/または心臓細胞

。

【請求項 1 7】

胚盤胞補完によって得られる外来器官であって、胚盤胞が、NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、およびTBX5遺伝子またはそれらの組み合わせがヌル欠損である細胞を含む、外来器官

。

【請求項 1 8】

ゲノムが、NKX2-5遺伝子およびHAND1遺伝子の両方の対立遺伝子に変異を有する、請求項1～3のいずれか一項記載の非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

【請求項 1 9】

ゲノムが、NKX2-5遺伝子およびTBX5遺伝子の両方の対立遺伝子に変異を有する、請求項1～3のいずれか一項記載の非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

【請求項 2 0】

ゲノムが、HAND1遺伝子およびTBX5遺伝子の両方の対立遺伝子に変異を有する、請求項1～3のいずれか一項記載の非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

【請求項 2 1】

ゲノムが、NKX2-5遺伝子の両方の対立遺伝子に変異を有する、請求項1～3のいずれか一項記載の非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

【請求項 2 2】

ゲノムが、HAND1遺伝子の両方の対立遺伝子に変異を有する、請求項1～3のいずれか一項記載の非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

【請求項23】

ゲノムが、TBX5遺伝子の両方の対立遺伝子に変異を有する、請求項1～3のいずれか一項記載の非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

【請求項24】

非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞が、機能的なNKX2-5タンパク質、HAND1タンパク質、およびTBX5タンパク質を欠くよう、そのゲノムが、NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、およびTBX5遺伝子の両方の対立遺伝子に変異を有する、非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

各レシピエントの免疫複合体に特化したヒトまたはヒト化組織および器官を作製することが有用であろう。本明細書に開示されているように、宿主として大型動物を使用し、標的器官の成長および/または分化を担う遺伝子をノックアウトまたは失活させるようそのゲノムを編集し、胚盤胞または受精卵段階のその動物にドナー幹細胞を接種してその器官の成長および発生に関する失われた遺伝情報を補完することによって、それが実現する。その結果は、補完された組織（ヒト/ヒト化器官）がドナーの遺伝子型および表現型に適合しているキメラ動物である。そのような器官は一世代で作製され得、幹細胞は、患者自身の身体から採取または生成され得る。本明細書に開示されているように、細胞内で複数の遺伝子を同時に編集することによって、それが実現する（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、WO 2015/168125を参照のこと）。複数の遺伝子は、脊椎動物細胞または胚において標的化されたヌクレアーゼおよび相同組み換え修復（HDR（homology directed repair））テンプレートを用いて編集のために標的化され得る。

[本発明1001]

非ヒト動物細胞または胚盤胞が、機能的なNKX2-5タンパク質、HAND1タンパク質、TBX5タンパク質またはそれらの組み合わせを欠くよう、そのゲノムが、NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせの両方の対立遺伝子に変異を有する、非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

[本発明1002]

変異が、NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせの欠失である、本発明1001の非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

[本発明1003]

非ヒト動物細胞または胚盤胞が、ブタ、ウシ、ウマまたはヤギである、本発明1001または1002の非ヒト動物細胞、桑実胚または胚盤胞。

[本発明1004]

ヒトNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現し、非ヒト動物NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現を欠く、キメラ非ヒト動物、桑実胚または胚盤胞。

[本発明1005]

前記非ヒト動物が、ヒト化心臓細胞および/または組織を生成する、本発明1004のキメラ非ヒト動物。

[本発明1006]

外因性ブタNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現し、内因性ブタNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現を欠く、キメラブタ（ブタ・ブタキメラ）。

[本発明1007]

非ヒト動物が、ブタ、ウシ、ウマまたはヤギである、本発明1004または1005のキメラ非ヒト動物。

[本発明1008]

ヒトNKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせを発現するキメラ非ヒト動物を作製するための方法であって、以下の工程を含む、方法：

(a)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト動物細胞を作製する工程であって、非ヒトNKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせの遺伝子の両方のコピーが、機能的なNKX2-5タンパク質、HAND1タンパク質、TBX5タンパク質またはそれらの組み合わせの生成を妨げる変異を有する、工程；

(b)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(a)の非ヒト細胞由来の核を除核非ヒト卵母細胞に融合し、該卵母細胞を活性化させて、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト桑実胚または胚盤胞を形成するよう分裂させることを含む体細胞核移植によって、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト桑実胚、胚盤胞を作製する工程；

(c)非ヒトNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(b)の桑実胚または胚盤胞にヒト幹細胞を導入する工程；および

(d)偽妊娠代理非ヒト動物に(c)由来の桑実胚または胚盤胞を移植して、ヒトNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現するキメラ非ヒト動物を作製する工程。

[本発明1009]

外因性NKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせを発現するキメラブタを作製するための方法であって、以下の工程を含む、方法：

(a)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルであるブタ細胞を作製する工程であって、内因性ブタMYF5遺伝子、MYOD遺伝子、MRF4遺伝子またはそれらの組み合わせの遺伝子の両方のコピーが、機能的な内因性ブタMYF5タンパク質、MYODタンパク質、MRF4タンパク質またはそれらの組み合わせの生成を妨げる変異を有する、工程；

(b)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(a)のブタ細胞由来の核を除核ブタ卵母細胞に融合し、該卵母細胞を活性化させて、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルであるブタ桑実胚または胚盤胞を形成するよう分裂させる工程を含む体細胞核移植によって、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルであるブタ桑実胚または胚盤胞を作製する工程；

(c)ブタNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(b)の桑実胚または胚盤胞にブタ幹細胞を導入する工程；および

(d)偽妊娠代理ブタに(c)由来の桑実胚または胚盤胞を移植して、外因性ブタNKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせを発現するキメラブタを作製する工程。

[本発明1010]

非ヒト動物においてヒトまたはヒト化心臓細胞を生成する方法であって、以下の工程を含む、方法：

(a)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト細胞を作製する工程であって、非ヒトNKX2-5遺伝子、HAND1遺伝子、TBX5遺伝子またはそれらの組み合わせの両方の対立遺伝子が、機能的な非ヒトNKX2-5タンパク質、HAND1タンパク質、TBX5タンパク質またはそれらの組み合わせの生成を妨げる変異を有する、工程；

(b)MYF5、MYOD、MRF4またはそれらの組み合わせがヌルである(a)の非ヒト細胞由来の核を除核非ヒト動物卵母細胞に融合し、該卵母細胞を活性化させて、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト動物胚盤胞を形成するよう分裂させることを含む体細胞核移植によって、NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである非ヒト桑実胚または胚盤胞を作製する工程；

(c)NKX2-5、HAND1、TBX5またはそれらの組み合わせがヌルである(b)の非ヒト動物胚盤胞または桑実胚にヒト幹細胞を導入する工程；および

(d)偽妊娠代理非ヒト動物に(c)由来の胚盤胞または桑実胚を移植して、ヒトまたはヒト

化心臓細胞を発現する非ヒト動物を作製する工程。

[本発明1011]

非ヒト動物が、ブタ、ウシ、ウマまたはヤギである、本発明1008または1010の方法。

[本発明1012]

ヒト幹細胞が、組織特異的幹細胞、多能性幹細胞、分化多能性成体幹細胞、人工多能性幹細胞または臍帯血幹細胞（UCBSC）である、本発明1008、1009または1010の方法。

[本発明1013]

前記人工多能性細胞が、線維芽細胞から形成される、本発明1008、1009または1010の方法。

[本発明1014]

本発明1008～1013のいずれかの方法によって作製される非ヒト動物。