

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6446360号  
(P6446360)

(45) 発行日 平成30年12月26日(2018.12.26)

(24) 登録日 平成30年12月7日(2018.12.7)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z
C 1 2 N 15/873 (2010.01)	C 1 2 N 15/09 1 0 0
A O 1 K 67/027 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0
請求項の数 31 (全 33 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2015-525450 (P2015-525450)	(73) 特許権者	513214088
(86) (22) 出願日	平成25年7月19日(2013.7.19)		リコンビネティクス・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2015-523098 (P2015-523098A)		RECOMBINETICS, INC.
(43) 公表日	平成27年8月13日(2015.8.13)		アメリカ合衆国55114ミネソタ州セント・ポール、ユニバーシティ・アベニュー・ウエスト1246番、スウィート301
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/051222	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02014/022120		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成26年2月6日(2014.2.6)	(74) 代理人	100084146
審査請求日	平成28年7月15日(2016.7.15)		弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	61/677, 904	(74) 代理人	100122301
(32) 優先日	平成24年7月31日(2012.7.31)		弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	13/836, 860		
(32) 優先日	平成25年3月15日(2013.3.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 対立遺伝子置換によるFMDV抵抗性家畜の産生

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

口蹄疫ウイルスのプロテイナーゼによる切断に抵抗性のe I F 4 Gタンパク質を発現するe I F 4 G遺伝子のゲノムエディティングを含むインビトロでの偶蹄類の細胞。

【請求項2】

前記エディティングされたe I F 4 G遺伝子によって発現されるe I F 4 Gタンパク質をさらに含む、請求項1に記載の偶蹄類の細胞。

【請求項3】

口蹄疫ウイルスに抵抗性であるゲノムエディティングされた偶蹄類の作出方法であって、

a. 偶蹄類の細胞、初代細胞、又は偶蹄類の胚のゲノムにおける天然e I F 4 G遺伝子をインビトロでエディティングするステップ、及び前記偶蹄類の細胞または初代細胞をクローニングするか又は母動物に前記胚を移植するステップであって、前記e I F 4 G遺伝子が、口蹄疫ウイルスのプロテイナーゼによる切断に抵抗性のe I F 4 Gアイソフォームを発現するようにエディティングされる、ステップ、又は

b. 外来性e I F 4 G遺伝子の発現を偶蹄類の初代細胞又は偶蹄類の胚にインビトロで加えるステップ、及び前記初代細胞をクローニングするか又は母動物に前記胚を移植するステップであって、前記外来性e I F 4 G遺伝子が、口蹄疫ウイルスのプロテイナーゼによる切断への抵抗性によってタンパク質分解に抵抗するe I F 4 Gアイソフォームを発現する、ステップ、又は

c. (a) 及び (b) の両方を含む方法。

【請求項 4】

前記初代細胞又は前記胚に：

a. 前記天然 e I F 4 G 遺伝子のある部位を特異的に切断する部位特異的ヌクレアーゼと、

b. 前記 e I F 4 G 遺伝子の少なくとも一部分を含む核酸鋳型であって、前記鋳型が前記天然 e I F 4 G 遺伝子の代替の対立遺伝子を提供し、前記代替の対立遺伝子が、口蹄疫ウイルス酵素のプロテイナーゼによる切断に抵抗性の e I F 4 G アイソフォームをコードする、核酸鋳型と

を導入するステップを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記部位特異的ヌクレアーゼが、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) 及びクラスターを形成する規則的に間隔が置かれた短いパンドロームリピート (CRISPR) からなる群から選択される、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法により作製される偶蹄類。

【請求項 7】

e I F 4 G 遺伝子にゲノムエディティングを含むゲノムエディティングされた偶蹄類であって、前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子が、口蹄疫ウイルスのプロテイナーゼによる切断に抵抗性となるように改変された e I F 4 G タンパク質を発現する、偶蹄類。

【請求項 8】

前記エディティングが、前記 e I F 4 G 遺伝子の 1 つ以上の塩基の挿入、欠失、又は置換を含む、請求項 7 に記載の偶蹄類。

【請求項 9】

前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子が、口蹄疫ウイルス酵素のリーダープロテイナーゼ (L<sup>P</sup>R<sup>o</sup>) による切断に抵抗性となるように改変された e I F 4 G タンパク質を発現する、請求項 7 ~ 8 のいずれか一項に記載の偶蹄類。

【請求項 10】

前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子が、口蹄疫ウイルス酵素のウイルスコード 3C プロテアーゼ (3C<sup>P</sup>R<sup>o</sup>) による切断に抵抗性の e I F 4 G タンパク質を発現する、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の偶蹄類。

【請求項 11】

前記動物が第 1 の品種の動物であり、前記ゲノムエディティングが、動物の別の品種または種に見出される e I F 4 G 遺伝子の対立遺伝子の移入によるものである、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の偶蹄類。

【請求項 12】

前記動物が第 1 の種の動物であり、前記ゲノムエディティングが、第 2 の種における e I F 4 G 遺伝子の対立遺伝子の移入によるものである、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の偶蹄類。

【請求項 13】

前記動物が前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子に関してホモ接合体である、請求項 7 に記載の偶蹄類。

【請求項 14】

創始動物である、請求項 7 ~ 13 のいずれか一項に記載の偶蹄類。

【請求項 15】

前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子によって発現される e I F 4 G タンパク質をさらに含む、請求項 7 ~ 14 のいずれか一項に記載の偶蹄類。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

口蹄疫に抵抗性である、請求項 7 ~ 15 のいずれか一項に記載の偶蹄類。

## 【請求項 17】

前記エディティングされた e I F 4 G タンパク質が、L<sup>P</sup>R<sup>o</sup> 及び/又は C<sup>P</sup>R<sup>o</sup> の結合を防ぐようにエディティングされる、請求項 7 ~ 16 のいずれか一項に記載の偶蹄類。

## 【請求項 18】

口蹄疫の治療又は予防に使用するための、口蹄疫ウイルス酵素のプロテイナーゼによる切断に抵抗性の e I F 4 G タンパク質をコードする単離核酸を含む組成物。

## 【請求項 19】

単離核酸が、外来性 e I F 4 G 遺伝子を発現する核酸又は動物の野生型 e I F 4 G タンパク質と比べて改変された e I F 4 G タンパク質を発現する核酸である、請求項 18 に記載の組成物。

10

## 【請求項 20】

口蹄疫の治療又は予防に使用するための、請求項 18 又は 19 に記載の単離核酸を組み込んでいるベクターを含む組成物。

## 【請求項 21】

偶蹄類において口蹄疫を治療するための、又はそれを予防するための、請求項 18 ~ 20 のいずれか一項に記載の単離核酸又はベクターの使用。

## 【請求項 22】

前記エディティングが、前記 e I F 4 G 遺伝子の 1 つ以上の塩基の挿入、欠失、又は置換を含む、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 23】

前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子が、前記ゲノムエディティングされた偶蹄類の野生型 e I F 4 G タンパク質と比べて、口蹄疫ウイルス酵素のプロテイナーゼによる切断に抵抗性となるようにエディティングされた e I F 4 G タンパク質を発現する、請求項 3 ~ 5 及び 22 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子が、前記ゲノムエディティングされた偶蹄類の野生型 e I F 4 G タンパク質と比べて、口蹄疫ウイルス酵素のリーダープロテイナーゼ (L<sup>P</sup>R<sup>o</sup>) による切断に抵抗性となるようにエディティングされた e I F 4 G タンパク質を発現する、請求項 3 ~ 5 及び 22 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 25】

前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子が、前記ゲノムエディティングされた偶蹄類の野生型 e I F 4 G タンパク質と比べて、口蹄疫ウイルス酵素のウイルスコード 3 C プロテアーゼ (3 C<sup>P</sup>R<sup>o</sup>) による切断に抵抗性となるようにエディティングされた e I F 4 G タンパク質を発現する、請求項 3 ~ 5 及び 22 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記ゲノムエディティングされた偶蹄類が第 1 の品種の動物であり、前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子が、その動物の別の品種に見出される e I F 4 G 遺伝子の天然の対立遺伝子の移入によるものである、請求項 3 ~ 5 及び 22 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 27】

前記ゲノムエディティングされた偶蹄類が第 1 の種であり、前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子が、別の種における e I F 4 G 遺伝子の対立遺伝子の移入によるものである、請求項 3 ~ 5 及び 22 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記ゲノムエディティングされた偶蹄類が前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子に関してホモ接合体である、請求項 3 ~ 5 及び 22 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記ゲノムエディティングされた偶蹄類が前記エディティングされた e I F 4 G 遺伝子

50

によって発現される前記 e I F 4 G タンパク質をさらに含む、請求項 3 ~ 5 及び 22 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記ゲノムエディティングされた偶蹄類が口蹄疫に抵抗性である、請求項 3 ~ 5 及び 22 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記エディティングされた e I F 4 G タンパク質が、L<sup>p r o</sup> 及び / 又は C<sup>p r o</sup> の結合を防ぐようにエディティングされる、請求項 3 ~ 5 及び 22 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2013年3月15日に出願された米国特許出願第13/836,860号明細書及び2012年7月31日に出願された米国仮特許出願第61/677,904号明細書に対する優先権を主張するものであり、これらの仮特許出願は双方とも、本明細書における参照により本明細書によって援用される。

【0002】

本技術分野は、遺伝子修飾動物及び関連技術に関する。

【背景技術】

20

【0003】

口蹄疫ウイルス (FMDV) に感染した偶蹄類動物は、急性水疱性疾患により急速に無能力化する。ウシ及びブタのFMD感染は、発熱、有痛性の水疱形成、跛行及び食欲不振を引き起こす。感染病原体の名前が示唆するとおり、脚の二次感染が起こることが多く、慢性跛行及び治癒の遅れが引き起こされ、同様に乳腺炎も、乳牛によく見られる続発症であり得る。疾患の急性期は約1週間続き、免疫応答の高まりを受けて弱まるが、なかでも抗体応答は、血流からのウイルスの排除においてその効率が極めて高いことに伴い、特に重要であるように思われる。幼若動物では、心筋の感染が循環不全を引き起こすため死亡が起こり得る。この疾患は伝染性が極めて高いため、たった一頭の動物の感染で群れ全体の殺処分及び埋却が必要となる。従ってFMDVは、ある面では、家畜化された農業動物の病原体のうち世界で最も重要なものと考えられている。2001年の英国におけるFMDの大発生では総計約120~140億ドルの損失が生じており[1]、また十年以上前にカリフォルニア大学デービス校が行った推定によれば、カリフォルニア州に限られたFMDの大発生であっても、対策費用並びに動物の移動及び販売の制限によって失われる取引に60~140億ドルの負担が生じる。ミルク及び他の製品、並びに食肉の販売が中止されることになり、生産者及び関連産業の従事者の仕事は失われるか又は著しく縮小されるであろう。他の国々はそれに比例した経済的影響を受ける。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

40

FMDVに抵抗性を有する動物が、本明細書に記載される。動物は最小限のヌクレオチド変化のみを伴い作製され、この変化は正確な位置に設けられ、動物のゲノムに他の変化は生じない。

【0005】

本発明の実施形態は、e I F 4 G 遺伝子にゲノム修飾を含む遺伝子修飾動物である。修飾には、例えば、e I F 4 G 遺伝子の1つ以上の塩基の挿入、欠失、又は置換が含まれ得る。e I F 4 G 遺伝子は、その動物の野生型 e I F 4 G タンパク質と比べて改変された e I F 4 G タンパク質を発現し、口蹄疫ウイルス酵素のプロテイナーゼ、例えば口蹄疫ウイルス酵素のリーダープロテイナーゼ (L p r o) 及び口蹄疫ウイルス酵素のウイルスコード3Cプロテアーゼ (3 C p r o) の一方又は両方による切断に抵抗性となるように改変

50

され得る。動物は哺乳動物であってもよい。動物は、実験研究用動物（例えば、マウス、ラット、イヌ又は実験室で使用されるブタ種、例えばミニブタ）であってもよい。動物は、例えば、ブタ、魚、ウサギ、雌ウシ、ニワトリ、ヤギ、及びヒツジからなる群から選択される家畜動物であってもよい。ある場合には、動物は第1の品種の動物であり、ゲノム修飾は、その動物の別の品種に見出されるe I F 4 G遺伝子の天然の対立遺伝子である。別の場合には、動物は第1の種の動物であり、ゲノム修飾は、第2の種（ヒト又は非ヒト動物）の別の品種におけるe I F 4 G遺伝子の対立遺伝子である。対立遺伝子は、一般には遺伝子全体ではなく、FMDVプロテアーゼによる結合及びタンパク質分解を媒介するタンパク質部分をコードする遺伝子の一部分である。動物は、修飾されたe I F 4 G遺伝子に関してホモ接合体又はヘテロ接合体であり得る。動物は創始動物又は創始動物の子孫であってよく、即ち、動物の新しい品種又は系統が作出されてもよい。動物は、修飾されたe I F 4 G遺伝子により発現されるe I F 4 Gタンパク質を含んでいてもよい。動物は口蹄疫に抵抗性であり得る。修飾e I F 4 Gタンパク質は、L p r o及びC p r oの一方、又はその両方の結合を防ぐように修飾され得る。

#### 【0006】

本発明の実施形態は、遺伝子修飾生物の作出方法であり、これは、初代細胞又は胚の天然e I F 4 G遺伝子をインビトロで（又は胚の場合には子宮で）改変するステップと、初代細胞をクローニングするか又は母動物（サロゲート）に胚を移植するステップとを含み、ここでe I F 4 G遺伝子は、口蹄疫プロテアーゼによるタンパク質分解に抵抗するe I F 4 Gアイソフォームを発現するように改変されている。この方法は、天然e I F 4 G遺伝子のある部位を特異的に切断する部位特異的ヌクレアーゼと、e I F 4 G遺伝子の少なくとも一部分を含む核酸鋳型とを初代細胞又は胚にトランスフェクトするステップを含むことができ、ここで鋳型は天然e I F 4 G遺伝子の代替の対立遺伝子を提供し、前記代替の対立遺伝子が、口蹄疫ウイルス酵素のプロテイナーゼによる切断に抵抗性であるe I F 4 Gアイソフォームをコードする。部位特異的ヌクレアーゼの例は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）及びクラスターを形成する規則的に間隔が置かれた短いパ lind r o m i c R e p e a t : C R I S P R、又は時にC R I S P R / C a s 9と称されることもある）からなる群から選択されるヌクレアーゼベースの系である。

#### 【0007】

ある実施形態は、e I F 4 G遺伝子にゲノム修飾を含むインビトロ細胞である。e I F 4 G遺伝子は、その動物の野生型e I F 4 Gタンパク質と比べて口蹄疫ウイルス酵素のプロテイナーゼによる切断に抵抗性となるように改変されたe I F 4 Gタンパク質を発現し得る。細胞は、マウス、ラット、ウマ、ミニブタ、ブタ、魚、ウサギ、雌ウシ、ニワトリ、ヤギ、偶蹄類、有蹄類、及びヒツジからなる群から選択され得る。細胞は、修飾されたe I F 4 G遺伝子によって発現されるe I F 4 Gタンパク質をさらに含み得る。

#### 【0008】

本発明の実施形態は、口蹄疫ウイルス酵素のプロテイナーゼによる切断に抵抗性であるe I F 4 Gタンパク質などの、e I F 4 Gタンパク質のいずれかのアイソフォームをコードする単離核酸を含む。

#### 【0009】

本発明の実施形態は、E I F 4 Gタンパク質又はFMDVプロテアーゼが結合する前記タンパク質の一部分を発現する外来性遺伝子を含む細胞、生物、又は動物を含む。外来性遺伝子発現はFMDVウイルス結合に関して競合するため、天然タンパク質切断が減少する。或いは、プロテアーゼ抵抗性E I F 4 Gの外来性遺伝子発現は、細胞が感染しながら継続的な細胞機能を提供する。ある実施形態は遺伝子修飾生物の作出方法であり、これは、外来性e I F 4 G遺伝子の発現を初代細胞又は胚にインビトロで加えるステップと、初代細胞をクローニングするか又は母動物に胚を移植するステップとを含み、ここで外来性e I F 4 G遺伝子は、口蹄疫プロテアーゼによるタンパク質分解に抵抗するe I F 4

Gアイソフォームを発現する。ある実施形態は、e I F 4 G 遺伝子に対するゲノム修飾又は外来性 e I F 4 G 遺伝子を発現する核酸を含むインビトロ細胞である。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】インビボ全細胞内タンパク質の電気泳動プロファイルのラジオオートグラフィーである；下部にあるピコルナウイルス感染後の時間（時間単位）の関数として、細胞からの<sup>35</sup>S 標識全タンパク質をイメージングする；完全な細胞溶解（6.5時間後）は、宿主タンパク質の遮断及びピコルナウイルスタンパク質によるポリペプチド合成のほぼ全面的な乗っ取りの時間的経過を示している。5時間目の顕著なバンドは、L<sup>P</sup>r<sup>o</sup>によってポリタンパク質前駆体から切断されたウイルスタンパク質である（ゲルの上部の濃いバンド）。ゲルの下部近くの強いバンドは、非ポリアデニル化mRNAに由来する、従ってe I F 4 G に依存せず、且つウイルスプロテイナーゼ活性に感受性を有するヒストンである。

10

【図2】E I F 4 G I 遺伝子の一部を改変した実験結果を示す。ブタE I F 4 G I の一部の配列をパネルAに示す。野生型配列は、L<sup>P</sup>r<sup>o</sup>切断部位（矢印）に対してマイナス3位及び2位にアスパラギン及びロイシン残基を有する。この例では、鋳型が提供されることにより、修飾E I F 4 G I をL<sup>P</sup>r<sup>o</sup>切断に対して抵抗性にするためのアスパラギン酸及びフェニルアラニンによるマイナス3位及び2位残基の置換が誘導される。T A L E N の2つの対（上）は、野生型E I F 4 G I を切断して相同組換えを刺激するように設計された。パネルB）は、各T A L E N 対をトランスフェクトしたブタ線維芽細胞のサーベイヤー（C e l - I ）アッセイの結果を示す。パネルC）は、相同組換え効率を決定するためのR F L P アッセイを示す。この図は、左T A L E N C C G T C C T T T G C C A A C C T T（配列番号12）、右T A L E N A G C A A C C G T G G G C C C C C A（配列番号13）；左T A L E N T G G C C G A C C A G C C C T T（配列番号14）；右T A L E N C C C A A G G G T G G G C C（配列番号15）；E I F 4 G I 遺伝子部分 C A G A C T T C A C T C C G T C C T T T G C C A A C C T T G G C C G A C C A G C C C T T A G C A A C C G T G G G C C C C C A A G G G G T G G G C C（配列番号16）；及びH D R C A G A C T T C A C T C C G T C C T T T G C C G A C T T C G G C C G A C C A G C C C T T A G C A A C C G T G G G C C C C C A A G G G G T G G G C C（配列番号17）を含む。

20

30

【発明を実施するための形態】

【0011】

本開示は、F M D V に抵抗性の動物を作製する方法を説明する。動物は、その真核生物翻訳開始因子4 G タンパク質（e I F 4 G）がF M D V プロテアーゼL<sup>P</sup>r<sup>o</sup>及び3 C<sup>P</sup>r<sup>o</sup>（本明細書では、まとめてF M D V プロテアーゼと称される）の一方又は両方による切断に抵抗性となるように遺伝子修飾される。このプロテアーゼはF M D V によって作られるもので、e I F 4 G タンパク質を攻撃する。実施例には、F M D V プロテアーゼの一つによる攻撃に抵抗するように修飾された家畜初代細胞の生成が含まれる。動物はこれらの細胞から、本発明者らにより創始動物の作製に有効であることが明らかにされた技法を用いてクローニングされ得る。修飾は、天然遺伝子の対立遺伝子の修飾によってF M D V プロテアーゼ抵抗性e I F 4 G タンパク質を発現する修飾対立遺伝子が作製されるように部位特異的な方法で作製され得る。

40

【0012】

F M D V 抵抗性

F M D V は、ポリオウイルス、ライノウイルス（感冒）、及びA型肝炎を含む動物ウイルスのなかで最も小さいピコルナウイルス科（p i c o r n a v i r i d a e）のアフトウイルス属（A p h t h o v i r u s）に属する。複数のサブタイプを含む7種の血清型がある[2]。他のピコルナウイルスと同様に、F M D V ゲノムは、直接翻訳され得る（プラス鎖ゲノム）約8,500ヌクレオチドの一本鎖RNAであり、100KDaを上回る単一のポリタンパク質をコードする。F M D V RNAのN末端領域には、2つのアイ

50

ソフォーム L a b 及び L b (このうち L b が重要な産物である)を有する L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>と称されるパイン様プロテアーゼがコードされる[3]。L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>はいずれも非常に小さく、且つ非常に特異的である。L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>配列は初めに F M D V ポリタンパク質をその合成中に切断し、自らをポリタンパク質から遊離させる。次に遊離 L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>は、残りのポリタンパク質をさらに切断して、莫大な数の子孫ウイルスを産生する個々の機能性ポリペプチドにする。L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>は他にいくつかの標的部位を有し、そのなかで最も重要な標的部位は、真核生物翻訳開始因子 4 G ( e I F 4 G ) であるものと思われ[4、5]、これは L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>によって切断されると、哺乳類細胞の<sup>4</sup>m G キャップ m R N A の開始を促進することができない。2つのアイソフォーム e I F 4 G I 及び e I F 4 G I I がある e I F 4 G は、キャッピングされ且つポリアデニル化されたあらゆる m R N A の 5' 末端及び 3' 末端の構造に結合するいくつかの e I F 4 R N A 結合タンパク質を一つにまとめる足場タンパク質である。ある種のピコルナウイルス、例えばポリオウイルスでは、2 A<sup>p</sup>r<sup>o</sup>プロテアーゼが L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>と同等の活性を有する。

#### 【0013】

e I F 4 G の正味の効果は、その 5' 末端に結合した<sup>7</sup>m G キャップ結合 e I F 4 E と、3' 末端のポリ(A)結合タンパク質(P A B P)とを有する末端真核生物 m R N A を非共有結合的に架橋することである[6、7]。m R N A の末端へのこれらの付加により、翻訳機構が完全にプロセシングされた m R N A と細胞中にある他の無数の R N A 分子とを区別してタンパク質へのその翻訳を協調させることが可能となる。e I F 4 G タンパク質は、この決定的に重要な活性により、ウイルスタンパク質のみを産生するように細胞の翻訳機構を支配すべく進化してきたウイルスの侵入による切断の格好の標的となる[8~12]。切断されて2つ以上のペプチドになると、e I F 4 G は m R N A の 5' 及び 3' 末端を架橋することができなくなり、宿主タンパク質合成が数時間にわたり止まる(図1)。プロテアーゼは、インターフェロン及びその調節因子[13~16]、並びにウイルス、特に複製の過程において二本鎖 R N A 中間体(又は最終)産物を有するウイルスに対する免疫応答に関わる核内因子 B [17]などのタンパク質を標的化する副次的な活性を有する。切断された e I F 4 G ペプチドと F M D V 内部リボソーム開始部位との相互作用は、F M D V 遺伝子の発現に重要であるものと思われる[18~21]。

#### 【0014】

ピコルナウイルスゲノムはキャッピングされておらず、従ってそのコードされたポリタンパク質の翻訳開始に e I F 4 G の助けは不要である。むしろ、ポリタンパク質前駆体の翻訳開始は配列内リボソーム進入部位(I R E S)で起こる。結果として、宿主細胞タンパク質のほとんど全ての合成が遮断され、タンパク質合成機構はほぼウイルスタンパク質の産生のみを利用可能なものとなる。この特徴は、ウイルス感染動物における急速な症状の拡散及び発現の鍵である。第2のプロテアーゼ、3 C<sup>p</sup>r<sup>o</sup>があり、これもまた、e I F 4 G、P A B P 及び R N A ヘリカーゼ e I F 4 A を攻撃する[22]。しかしながら、3 C<sup>p</sup>r<sup>o</sup>の活性は遅延性であり、概して L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>と比べて宿主タンパク質合成の破壊において担う役割は少ない[11、23、24]。L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>及び 3 C<sup>p</sup>r<sup>o</sup>のこれらの2つの特徴は、ウイルスの弱体化及び拡散に不可欠である。培養 B H K - 2 1 細胞を使用したある研究では、L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>を欠く F M D V がやや低い速度で複製したことが示されたが[25]、L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>を欠く F M D V は、ウシ及びブタに注入したとき顕著に非病原性であり、同舎の動物に拡散不能であった[26、27]。L<sup>p</sup>r<sup>o</sup>欠損ウイルスは、全動物ではインターフェロン媒介性細胞防御に感受性を示したが、培養細胞ではそれを示さなかった[27、28]。

#### 【0015】

従ってピコルナウイルスの効果的な戦略は、ポリタンパク質を成熟タンパク質に切断するために必要なものと同じウイルスプロテアーゼを使用して、最大の弱点である e I F 4 G の架橋機能を攻撃することにより宿主タンパク質合成を不活性することである。これが行われることに伴い、ウイルスゲノムは、1) 必須宿主タンパク質の合成が損なわれる、及び 2) いくつかの宿主防御タンパク質がウイルスプロテアーゼの標的となるアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を有する、という理由で有意な細胞内免疫応答を誘導しない二本鎖の中間体を経て複製する。ウイルスは正常な細胞活性を壊滅させるため、細胞破壊性である；感染性ピリオンは、感染後4～6時間で現れる。

【0016】

本発明の実施形態は、FMDVによって作られるプロテアーゼに抵抗するeIF4Gタンパク質をコードするeIF4G遺伝子を有する動物である。一つのFMDV抵抗性の実施形態は、eIF4Gタンパク質にC<sup>pr</sup>°及び/又はL<sup>pr</sup>°抵抗性を付与する唯一つのみ又は数個のみのeIF4G遺伝子におけるヌクレオチド特異的な変化を作製することである。動物ゲノムに対するかかる精密な遺伝子変化は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、又はクラスターを形成する規則的に間隔が置かれた短いパリンドロームリピート(CRISPR)などの部位特異的ヌクレアーゼで作製される。TALENはZFNより汎用性の高いプラットフォームである[34、35]。CRISPRは新しい有効なツールである(Congら, Science express, Jan 3 2013 ¶. 1-7; Maliら, Science 15 February 2013: Vol. 339, pp. 823-826)。実施例2において、そのEIF4GがFMDVプロテアーゼ抵抗性遺伝子となるようにゲノム修飾されている初代細胞が記載される。このような細胞は、従来技術を使用したクローン動物の作製に用いられ得る。

10

【0017】

動物の一実施形態は、動物のゲノムに抵抗性遺伝子を有する。代替的实施形態は動物に外来性遺伝子を加え、動物が一部又は全ての細胞でこの外来性遺伝子を発現する。外来性遺伝子はFMDV活性に抵抗する。本発明の実施形態は、EIF4Gタンパク質又はFMDVプロテアーゼが結合する前記タンパク質の一部を発現する外来性遺伝子を含む細胞、生物、又は動物を含む。別の代替的实施形態は、eIF4G遺伝子を誘導性プロモーターの制御下に置く。例えば、使用時には、一群の動物がその飼料中に添加剤を与えられるなどして遺伝子が活性化され、抵抗性が作り出され得る。創始動物及び品種は、これらの特徴の1つ以上を伴い樹立され得る。

20

【0018】

翻訳機能は保持するがプロテアーゼ消化に抵抗性であるeIF4GI及びeIF4GII配列中の特定のアミノ酸の置換により、宿主タンパク質合成は、ピコルナウイルス感染細胞において分解されない宿主mRNAが多量に過剰であるため、引き続きウイルスタンパク質の合成を打ち負かすことができる[36]。さらに、eIF4G切断産物がないため、FMDV RNAのIRES媒介性翻訳が減弱し得る[20、21]。この手法はFMDV複製に対する抵抗性を提供し、プロテアーゼ感受性eIF4G遺伝子を含むゲノムにプロテアーゼ抵抗性eIF4G遺伝子を単純に加えるのとは比べて優れている[19、36]。この戦略には遺伝子導入は関わらない；むしろこれは、動物細胞における標準的な遺伝活性である遺伝子変換に相当する。

30

【0019】



【表 1】

表 1: ブタ、ウシ及びヒツジ eIF4G 配列及び FMDV 抵抗性アイソフォーム

バージョン	配列	
野生型	PSFANLGRPALS	配列番号 1
アイソフォーム 1	PSFA <u>D</u> EGRPALS	配列番号 2
アイソフォーム 2	PSFANLGP <u>P</u> ALS	配列番号 3
アイソフォーム 3	PSFANFGRPALS	配列番号 4
アイソフォーム 4	PSFANDGRPALS	配列番号 5
アイソフォーム 5	PSFANPGRPALS	配列番号 6
アイソフォーム 6	PSFANYGRPALS	配列番号 7
アイソフォーム 7	PSFANWGRPALS	配列番号 8
アイソフォーム 8	PSFADLGRPALS	配列番号 9
アイソフォーム 9	PSFPNLGRPALS	配列番号 10
アイソフォーム 10	PSFDNLGRPALS	配列番号 11

10

20

## 【 0 0 2 0 】

例として、表 1 に、 $L^P R^o$  が結合し、且つ  $L^P R^o$  によって切断されるブタ eIF4G 遺伝子の一部分（ウシ及びヒツジと 100% の同一性）に関するアミノ酸配列型 668 ~ 679 を示す。表 1 にはさらに、分解に対する抵抗性を生じさせ、且つ FMDV 抵抗性を生み出すことが予想される 1 つ又は 2 つのアミノ酸の改変を示し、これらの改変は下線を引いて強調している。代替的なアミノ酸配列は、eIF4G タンパク質のアイソフォームである；様々なアイソフォームをコードする遺伝子は、互いに対立遺伝子である。アミノ酸 668 ~ 679 は、NM\_001246253 から翻訳されるとおりの野生型（Wt）ブタ eIF4G I のものである。FMDV  $L^P R^o$  プロテアーゼに対する抵抗性を付与する代替的なアイソフォームが、から予想される（ウイルスポリペプチド部位について記載する Santosら 2009 を参照のこと；Biochemistry 48, 7948）。アイソフォーム 1 は、この部位におけるヒト eIF4G II とのアラインメントに基づく。ヒト eIF4G II はここでは切断されず、機能性である。アイソフォーム 2 及び 8 も同様にヒト eIF4G II とのアラインメントに基づく。従って残りのアイソフォームが、プロテアーゼを阻害し且つ正常な機能を維持するそれらの可能性に基づき選択される。当業者は、指示されるアイソフォームを作製するため核酸配列を容易に作り出すことができ、及び野生型遺伝子配列は容易に且つ公的に利用可能である。種々のアイソフォームをコードするため、コロニースクリーニングに役立つサイレント RFLP 突然変異と共に相同組換え（HR）鑄型を生成し得る。これらの鑄型は、eIF4G14.1 TALEN 結合部位にわたる 90mer オリゴヌクレオチドを有し得る（図 2）。各 HR 鑄型（典型的には約 0.025 ~ 約 0.8 n モル）が、eIF4G14.1 TALEN（典型的には約 0.1 ~ 約 10 マイクログラム）と共に初期継代線維芽細胞に導入され、個々のコロニーが、突然変異対立遺伝子の移入についてスクリーニングされ得る。所望の対立遺伝子を組み込むコロニーから細胞が取り出され、創始動物のクローニングに使用され得る。

30

40

## 【 0 0 2 1 】

表 2 は、様々な家畜種における様々な eIF4G 遺伝子の配列供給源を示す。当業者は、これらの及び他の家畜 eIF4G 遺伝子について容易に情報を入手し得る。

## 【 0 0 2 2 】

## 【表 2】

表 2 家畜における EIF4G オルソログ及びホモログ

	遺伝子	Ensembl ID	NCBI ID (mRNA)
ブタ	<i>EIF4GI</i>	ENSSSCG00000030255	
	<i>EIF4G3*</i>	ENSSSCG00000003512	
	新規未同定	ENSSSCG000000026340	
雌ウシ	<i>EIF4GI</i>	ENSBTAG00000012881	
	<i>EIF4G3*</i>	ENSBTAG000000040215	
ヒツジ	<i>EIF4GI</i>		XM_004003088.1

\*EIF4G3 遺伝子は Eif4GII タンパク質をコードすることに留意されたい。

10

## 【 0 0 2 3 】

従って、本発明の実施形態は、FMDV プロテイナーゼ、例えば L<sup>P</sup> r<sup>o</sup> 及びノ又は C<sup>P</sup> r<sup>o</sup> に抵抗性の EIF4G を含む。実施形態は、野生型の 1 つ以上の残基（アミノ酸又は核酸）に変化を有するアイソフォームを含み、またそれをコードする核酸配列も含む。1 つ以上の改変された残基は、FMDV プロテイナーゼが結合する位置にあっても、又はそれに対応する核酸配列にあってもよい。或いは、突然変異は、プロテイナーゼがタンパク質においてその切断を行う点にあってもよい。野生型と比べた変化の数は、典型的には、1 ~ 約 50 の変化を包含し得る；当業者は、例えば 1 ~ 5、1 ~ 10 など、1 ~ 50 におけるあらゆる範囲及び値が企図されることを直ちに理解するであろう。これらの変化は、EIF4G が正常な（即ち非 FMDV の）機能を果たすよう働き得るような変化である。EIF4G が改良された動物を含む動物は、口蹄疫に抵抗性となり得る。抵抗性の一つの形態は免疫であり、即ち動物は本質的にこの疾患に罹患しない。別の形態又は抵抗性は、動物が一度感染しても、より容易に回復することである。抵抗性の別の形態は、動物がそもそも（ウイルスが拡散することが困難である結果として）感染し難いことである。抵抗性の帰結としては、宿主におけるウイルス価が大幅に低下するという理由で、疾患が蔓延する可能性の低下を挙げることができる。

20

## 【 0 0 2 4 】

実施形態にはまた、遺伝子、タンパク質、タンパク質をコードする核酸、並びにかかる遺伝子及びタンパク質を含む細胞又は動物も含まれる。動物は家畜として、及び FMDV を調べるための研究動物として有用である。細胞は、家畜としての、又は研究動物としての動物の作製に有用であり、また FMDV 研究にも役立つ。FMDV タンパク質分解に抵抗する細胞は、FMDV ライフサイクルの他の側面に干渉する薬物及び治療の試験に有用である。一つの理由は、これらの動物及び細胞がより長く生き延びるため、これらの他の介入の効果をアッセイし得ることである。別の理由は、他の治療法による試験の結果において、それらの作用機序が FMDV タンパク質分解であるか否かを速やかに決定し得ることである。遺伝子及びタンパク質は、それ自体で、FMDV 検査及び効果のアッセイにさらに役に立つ。

30

40

## 【 0 0 2 5 】

## 遺伝子修飾動物

染色体修飾が単一対立遺伝子又は二対立遺伝子である動物が、マーカーを所定の位置に残し、それを動物から出して育てることを可能にする方法を用いるか、或いは動物にマーカーを置かない方法により作製され得る。例えば、本発明者らは、相同性依存型組換え（homologous dependent recombination: HDR）の方法を使用して、動物の染色体に対する変化、又はそこへの外来性遺伝子の挿入を作製している。部位特異的（site-specific）ヌクレアーゼ、例えば、TALEN、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、又は CRISPR、及びリコンビナーゼ融合タンパク質などのツール、並びに従来の方法が利用可能である。

50

## 【0026】

遺伝子修飾との関連における用語の天然対立遺伝子は、修飾されている生物種と同じ生物種で天然に見出される対立遺伝子を意味する。用語の新規対立遺伝子は、非天然対立遺伝子を意味する。ヤギに置かれたヒト対立遺伝子は、新規対立遺伝子である。従って天然対立遺伝子は、異種交配することのできる種の範囲内に既に存在する種類のものである。また新規対立遺伝子は、異種交配することのできる種の範囲内に存在しないものである。種間の対立遺伝子の移動とは、動物のある種から別の種への移動を意味し、種内の移動とは、同じ種の動物間での移動を意味する。

## 【0027】

従来の育種手法によるある品種から別の品種への対立遺伝子の移動には、品種間で多くの対立遺伝子を入れ替えることが関わる。減数分裂中の組換えでは、必ず品種間で遺伝子座が交換される。対照的に、部位特異的ヌクレアーゼ修飾された家畜及び他の動物は、細胞が有糸分裂のみの時点で細胞又は胚が修飾されるため、減数分裂期組換えイベントにより生じる遺伝子変化がない。結果として、T A L E N修飾動物は、有性生殖によって作出された動物と容易に区別することができる。

## 【0028】

本明細書における方法は、既存の動物のゲノムのエディティングを提供する。動物は一定の表現型を有し、例えば体細胞クローニングによる動物のクローニングが、当該の表現型を有効に維持する。クローニング中に細胞ゲノムに1つ又は複数の特定の変化を作製することにより、既知の表現型を改変することが可能になる。本明細書における方法は、或いは、未だ一定の形質を有する動物になるまでに発育していない胚のゲノムの改変を提供する。健全なジェネティクスを備える胚が、それでもなお、そのジェネティクスの遺伝的潜在能力の範囲内にある形質の全てを発現しないこともあり、即ち、動物は、その系統が育種される目的の形質を必ずしも発現するとは限らない。

## 【0029】

本発明者らは、以前、修飾細胞のポリゾン集団からクローニングするときの効果的なクローニング効率を実証した(Carlsonら, 2011)。しかしながら、加えてT A L E N媒介性ゲノム修飾、並びにリコンビナーゼ融合分子による修飾が、単一の世代での二対立遺伝子改変の達成をもたらす。例えば、S C N Tにより、且つ同系交配によりホモ接合性を生じさせることなしに、ロックアウト遺伝子に関してホモ接合体の動物を作製し得る。ブタ及びウシなどの家畜の妊娠期間及び繁殖年齢に至るまでの成熟は、研究及び生産の重大な障害である。例えば、クローニング及び繁殖によるヘテロ接合変異細胞(両性)からのホモ接合ロックアウトの生成は、ブタ及びウシについて、それぞれ16ヶ月及び30ヶ月を要する。

## 【0030】

本発明者らは、以前、非トランスジェニック線維芽細胞と共に播種し、トランスポゾン共選択法(Carlsonら, 2011, 米国特許出願公開第2011/0197290号明細書)を用いて薬剤選択に供したとき、トランスジェニック初代線維芽細胞を効果的に拡大し、コロニーとして単離し得ることを示した。さらに(米国特許出願公開第2012/0222143号明細書を参照)、6つのT A L E N対で処理し、且つ標的部位にわたるP C R産物のサーベイヤ( S U R V E Y O R )アッセイ又はダイレクトシーケンシングによりその遺伝子型を評価した細胞について、ピューロマイシン抵抗性コロニーが単離されたことが示された。概して、インデル陽性クローンの割合は、3日目の修飾レベルに基づき行った予想と同様であった。6つのT A L E N対のうち5つについて、二対立遺伝子ロックアウトクローンが同定され、インデル陽性細胞の最大35%に存在した。特に、T A L E N対の大部分に関する二対立遺伝子ロックアウトクローンの頻度は、各染色体の切断を独立したイベントとして扱った場合に予想される頻度を超える。

## 【0031】

T A L E N誘導相同組換えでは、連結された選択マーカーが不要となる。T A L E Nを使用すると、相同性依存型修復(H D R)によって特定の対立遺伝子を家畜ゲノムに正確

10

20

30

40

50

に移入させることができる。パイロットスタディでは、特定の11bp欠失（ベルジアン・ブルー対立遺伝子）（Grobetら，1997；Kambadurら，1997）をウシGDF8遺伝子座に導入した（米国特許出願公開第2012/0222143号明細書を参照）。単独でトランスフェクトしたとき、btGDF8.1 TALEN対は標的遺伝子座で染色体の最大16%を切断した。11bp欠失を有するスーパーコイル相同DNA修復鋳型をコトランスフェクトすると、所望のイベントに関する選択なしに3日目に最大5%の遺伝子変換頻度（HDR）となった。スクリーニングした単離コロニーの1.4%に遺伝子変換が同定された。

#### 【0032】

##### TALEN

TALENは、遺伝子操作ツールである。遺伝子の不活性化は、TALENの多くの用途のうちの一つである。用語TALENは、本明細書で使用されるとき、広義であり、別のTALENの助けなしに二本鎖DNAを切断することのできる単量体TALENを含む。用語TALENはまた、共同して同じ部位のDNAを切断する働きをするように操作されるTALENの対の一方又は両方のメンバーを指しても使用される。共同して働くTALENは、DNAの利き手を参照して、左TALEN（left-TALEN）及び右TALEN（right-TALEN）と称され得る。

#### 【0033】

Millerら（Millerら（2011）Nature Biotechnol 29：143）は、TALトランシェーション変異体をFokIヌクレアーゼの触媒ドメインに連結することによる部位特異的ヌクレアーゼ構成のためのTALENの作製を報告した。得られたTALENは、2つの主要な真核生物DNA修復経路である非相同末端結合（NHEJ）と相同性指向型修復とを介して不死化ヒト細胞に遺伝子修飾を誘導することが示された。TALENは、特異的結合用に操作することができる。MillerらのTALENの改良が、2012年8月24日に出願された米国特許出願公開第13/594,694号明細書に記載されている。特異的結合とは、この用語が生物学の技術分野で一般に使用されるとおり、非標的組織と比べて比較的高い親和性で標的に結合する分子を指し、概して、静電相互作用、ファンデルワールス相互作用、水素結合などの複数の非共有結合性の相互作用が関わる。具体的な結合相互作用が、抗体-抗原結合、酵素-基質結合、特に結合タンパク質-受容体相互作用を特徴付ける。

#### 【0034】

TALの暗号が報告されており（国際公開第2011/072246号パンフレット）、ここでは各DNA結合リピートが標的DNA配列における1つの塩基対の認識に関与する。残基は組み合わせさせてDNA配列を標的化し得る：（a）C/Gの認識にはHD；（b）A/Tの認識にはNI；（c）T/Aの認識にはNG；（d）C/G又はA/T又はT/A又はG/Cの認識にはNS；（e）G/C又はA/Tの30認識にはNN；（f）T/Aの認識にはIG；（g）C/Gの認識にはN；（h）C/G又はT/Aの認識にはHG；（i）T/Aの認識にはH；及び（j）G/Cの認識にはNK。端的には、TALENの結合標的部位が決定され、ヌクレアーゼとその標的部位を認識する一連のRVDとを含む融合分子が作られる。結合すると、ヌクレアーゼがDNAを切断し、細胞修復機構が切断末端に遺伝子修飾を作製するよう働くことができるようになる。用語TALENは、転写活性化因子様（TAL）エフェクター結合ドメインとヌクレアーゼドメインとを含むタンパク質を意味し、それ自体機能性である単量体TALEN並びに別の単量体TALENとの二量体化が必要なその他の単量体TALENが含まれる。二量体化は、両方の単量体TALENが同じであるときホモ二量体TALENをもたらすことができ、又は単量体TALENが異なるときヘテロ二量体TALENをもたらすことができる。

#### 【0035】

一部の実施形態では、単量体TALENが用いられ得る。TALENは、典型的にはスパーサーを含む二分の認識部位にわたる二量体として機能し、ここでは2つのTALエフェクタードメインが各々FokI制限酵素の触媒ドメインに融合し、得られた各TAL

10

20

30

40

50

NのDNA認識部位がスペーサー配列によって分けられ、及び各TALEN単量体が認識部位に結合することによりFokIが二量体化し、スペーサー内に二本鎖切断を作り出すことが可能になる。しかしながら単量体TALENもまた構築することができ、ここでは単一のTALEフェクターが、機能するのに二量体化する必要のないヌクレアーゼと融合する。一つのかかるヌクレアーゼは、例えば、2つの単量体が単一のポリペプチドとして発現するFokIの単鎖変異体である。他の天然に存在する又は操作された単量体ヌクレアーゼもまた、この役割を果たすことができる。単量体TALENに使用されるDNA認識ドメインは、天然に存在するTALEフェクターに由来してもよい。或いは、DNA認識ドメインは、特定のDNA標的を認識するように操作されてもよい。操作された単鎖TALENは、操作されたDNA認識ドメインを1つしか必要としないため、構築及び展開がより容易であり得る。二量体DNA配列特異的ヌクレアーゼは、2つの異なるDNA結合ドメイン（例えば、1つがTALEフェクター結合ドメイン、及び1つが別の種類の分子に由来する結合ドメイン）を使用して生成することができる。TALENは、スペーサーを含む二分の認識部位にわたる二量体として機能し得る。このヌクレアーゼ構成もまた、例えば1つのTALEN単量体と1つのジンクフィンガーヌクレアーゼ単量体とから生成された標的特異的ヌクレアーゼに用いることができる。そのような場合、TALEN及びジンクフィンガーヌクレアーゼ単量体のDNA認識部位は、適切な長さのスペーサーによって隔てられ得る。2つの単量体が結合することにより、FokIが二量体化し、スペーサー配列内に二本鎖切断を作り出すことが可能となり得る。ジンクフィンガー以外のDNA結合ドメイン、例えば、ホメオドメイン、mybリピート又はロイシンジッパーもまた、FokIと融合し、TALEN単量体と共に機能性ヌクレアーゼを作り出すパートナーとして働くことができる。

10

20

#### 【0036】

一部の実施形態では、TALEフェクターを使用して、他のタンパク質ドメイン（例えば、非ヌクレアーゼタンパク質ドメイン）に特定のヌクレオチド配列を標的化させることができる。例えば、TALEフェクターを、限定なしに、DNA20相互作用酵素（例えば、メチラーゼ、トポイソメラーゼ、インテグラーゼ、トランスボザーゼ、又はリガーゼ）、転写活性化因子若しくはリプレッサー、又はヒストンなどの他のタンパク質と相互作用するか若しくはそれを修飾するタンパク質のタンパク質ドメインに連結することができる。かかるTALEフェクター融合物の応用には、例えば、エピジェネティック調節エレメントの作成又は修飾、DNAにおける部位特異的な挿入、欠失、又は修復の作製、遺伝子発現の制御、及びクロマチン構造の修飾が含まれる。

30

#### 【0037】

標的配列のスペーサーを選択し、又は変化させて、TALENの特異性及び活性を調節することができる。スペーサー長さの柔軟性は、スペーサー長さを選択することにより特定の配列を高い特異性で標的化し得ることを示している。さらに、異なるスペーサー長さについて活性にばらつきがあることが観察されており、スペーサー長さを選択することにより所望のレベルのTALEN活性を達成し得ることが示される。

#### 【0038】

用語ヌクレアーゼには、エキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼが含まれる。用語エンドヌクレアーゼは、DNA又はRNA分子、好ましくはDNA分子内の核酸間における結合の加水分解（切断）の触媒能を有する任意の野生型又は変異型酵素を指す。エンドヌクレアーゼの非限定的な例としては、FokI、HhaI、HindIII、NotI、BbvCI、EcoRI、BglII、及びAlwIなどのII型制限エンドヌクレアーゼが挙げられる。エンドヌクレアーゼは、長さ約12～45塩基対（bp）、より好ましくは14～45bpのポリヌクレオチド認識部位を典型的に有するとき、レアカットエンドヌクレアーゼもまた含む。レアカットエンドヌクレアーゼは、規定の遺伝子座でDNA二本鎖切断（DSB）を誘導する。レアカットエンドヌクレアーゼは、例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼ、操作されたジンクフィンガードメインとFokIなどの制限酵素の触媒ドメインとの融合により得られるキメラジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN

40

50

）又は化学的エンドヌクレアーゼであってもよい。化学的エンドヌクレアーゼでは、化学的又はペプチド性切断因子（cleaver）が核酸のポリマーか、或いは特定の標的配列を認識する別のDNAにコンジュゲートし、それにより切断活性が特定の配列を標的化する。化学的エンドヌクレアーゼには、特定のDNA配列と結合することが知られる、オルトフェナントロリン、DNA切断分子、及び三本鎖形成オリゴヌクレオチド（TFO）のコンジュゲートのような合成ヌクレアーゼも包含される。かかる化学的エンドヌクレアーゼは、本発明に係る用語「エンドヌクレアーゼ」に含まれる。かかるエンドヌクレアーゼの例としては、I - See I、I - Chu L I - Cre I、I - Csm I、PI - See L PI - Tti L PI - Mtu I、I - Ceu I、I - See IL 1 - See III、HO、PI - Civ I、PI - Ctr L PI - Aa e I、PI - Bsu I、PI - Dha I、PI - Dra L PI - Mav L PI - Meh I、PI - Mfu L PI - Mfl I、PI - Mga L PI - Mgo I、PI - Min L PI - Mka L PI - Mle I、PI - Mma I、PI - 30 Msh L PI - Msm I、PI - Mth I、PI - Mtu I、PI - Mxe I、PI - Npu I、PI - Pfu L PI - Rma I、PI - Spb I、PI - Ssp L PI - Fae L PI - Mja I、PI - Pho L PI - Tag L PI - Thy I、PI - Tko I、PI - Tsp I、I - Mso Iが挙げられる。

#### 【0039】

TALLEN又は他のツールによって作製される遺伝子修飾は、例えば、挿入、欠失、外来性核酸断片の挿入、及び置換からなるリストから選択され得る。用語「挿入」は、染色体への文字通りの挿入又は修復用鋳型としての外来性配列の使用のいずれかを意味して広義に使用される。一般には、標的DNA部位が同定され、その部位に特異的に結合し得るTALLEN対が作成される。TALLENは細胞又は胚へと、例えばタンパク質、mRNAとして、又はTALLENをコードするベクターにより送達される。TALLENがDNAを切断して二本鎖切断が作製され、次にこれが修復されることで、多くの場合にインデルが作り出され、又は染色体に挿入されるか、或いは修飾配列による切断の修復用鋳型として働く同伴する外来性核酸に含まれる配列又は多型が組み込まれる。この鋳型駆動型の修復は、染色体を変化させるのに有用なプロセスであり、細胞染色体に有効な変化を提供する。

#### 【0040】

用語の外来性核酸は、その核酸が天然で細胞中にある核酸配列と同じであるか、それとも異なるかに関わらず、細胞又は胚に加えられる核酸を意味する。用語の核酸又は核酸断片又は核酸配列は広義であり、染色体、発現カセット、遺伝子、DNA、RNA、mRNA、又はそれらの一部分が含まれる。細胞又は胚は、例えば、家畜、偶蹄類、雌ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ウサギ、及び魚からなる群から選択され得る。用語の家畜は、食品又は生物学的材料用の商品として育てられる家畜化された動物を意味する。用語の偶蹄類は、各足に通常2本又は時に4本のこともある偶数の指を有する偶蹄目（Artiodactyla）の有蹄の哺乳動物を意味し、ウシ、シカ、ラクダ、カバ、ヒツジ、及びヤギが含まれる。

#### 【0041】

一部の実施形態は、遺伝子修飾された家畜及び／又は偶蹄類を作製する組成物又は方法を含み、これは、家畜及び／又は偶蹄類の細胞又は胚にTALLEN対を導入するステップであって、それにより細胞又は胚のDNAに対してTALLEN対が特異的に結合する部位に遺伝子修飾を作製するステップと、その細胞から家畜動物／偶蹄類を産生するステップとを含む。細胞又は胚に対しては、例えば接合子、胚盤胞、又は胚への直接注入が用いられ得る。或いは、タンパク質、RNA、mRNA、DNA、又はベクターを導入するための多くの公知の技法のいずれかをを用いてTALLEN及び／又は他の因子が細胞に導入されてもよい。遺伝子修飾動物は胚又は細胞から、公知の方法、例えば妊娠宿主への胚の移植、又は様々なクローニング法によって作製され得る。語句「細胞のDNAに対する、TA

LENが特異的に結合する部位での遺伝子修飾」などは、TALENがその標的部位に特異的に結合するとTALEN上のヌクレアーゼによって切断される部位に遺伝子修飾が作製されることを意味する。ヌクレアーゼはTALEN対が結合するところを正確に切断するのでなく、むしろ2つの結合部位の間にある規定の部位で切断する。

#### 【0042】

一部の実施形態は、動物のクローニングに使用される細胞の組成物又は処理を含む。細胞は、家畜及び/又は偶蹄類細胞、培養細胞、初代細胞、初代体細胞、接合子、生殖細胞、始原生殖細胞、又は幹細胞であってもよい。例えば、実施形態は、遺伝子修飾を生じさせる組成物又は方法であり、これは、培養物中の複数の初代細胞を、TALENタンパク質又は1つ若しくは複数のTALENをコードする核酸に曝露するステップを含む。TALENは、タンパク質として導入されるか、又は核酸断片として導入され、例えばベクター中のmRNA又はDNA配列によりコードされ得る。

10

#### 【0043】

細胞の遺伝子修飾には、レポーターの挿入も含まれ得る。レポーターは、例えば、蛍光(fluorescent)マーカー、例えば緑色蛍光タンパク質及び黄色蛍光タンパク質であってもよい。レポーターは、選択マーカー、例えば、ピューロマイシン、ガンシクロビル、アデノシンデアミナーゼ(ADA)、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(ネオマイシン(neo)、G418、APH)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ(phosphotransferase)、チミジンキナーゼ(TK)、又はキサントシンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ(xanthine-guanine phosphoribosyltransferase)(XGPRT)であってもよい。レポーター、選択マーカー、及び/又は1つ以上のTALEN用のベクターは、例えば本明細書に詳述されるとおりの、プラスミド、トランスポゾン、トランスポザーゼ、ウイルス、又は他のベクターであってもよい。

20

#### 【0044】

TALENは複数のDNA部位を指向し得る。これらの部位は、数千個又は何千個もの塩基対によって隔てられているものであり得る。DNAは細胞機構により再結合することができ、それにより、それらの部位の間にある領域全体の欠失が生じ得る。実施形態は、例えば、1~5メガベース又は染色体の50%~80%、又は約100~約1,000,000塩基対の距離を隔たっている部位を含む；当業者は、明示的に記載される範囲内にあるあらゆる範囲及び値、例えば、約1,000~約10,000塩基対又は約500~約500,000塩基対が企図されることを直ちに理解するであろう。或いは、外来性DNAの挿入のため、又は部位間のDNAの鋳型駆動型修復のため、外来性DNAが細胞又は胚に加えられてもよい。複数の部位における修飾を用いることで、遺伝子修飾された細胞、胚、偶蹄類、及び家畜を作製し得る。

30

#### 【0045】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ

ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)は、ジンクフィンガーDNA結合ドメインをDNA切断ドメインと融合することにより生成される人工的な制限酵素である。ジンクフィンガードメインは、所望のDNA配列を標的化するように操作することができ、これによりジンクフィンガーヌクレアーゼが複合的なゲノム内にあるユニーク配列を標的化することが可能になる。内在性DNA修復機構を利用することにより、これらの試薬を使用して高等生物のゲノムを改変することができる。ZFNは、遺伝子を不活性化させる方法において用いられ得る。

40

#### 【0046】

ジンクフィンガーDNA結合ドメインは約30アミノ酸を有し、安定な構造に折り畳まれている。各フィンガーは主としてDNA基質内のトリプレットに結合する。鍵となる位置にあるアミノ酸残基が、DNA部位との配列特異的相互作用の大部分に寄与する。これらのアミノ酸を、残りのアミノ酸を維持して必要な構造を保ちながら変化させることがで

50

きる。いくつかのドメインをタンデムに連結することにより、さらに長いDNA配列との結合が達成される。非特異的FokI切断ドメイン(N)、転写活性化因子ドメイン(A)、転写リプレッサードメイン(R)及びメチラーゼ(M)などの他の機能をZFPと融合させて、それぞれのZFN、ジンクフィンガー転写活性化因子(ZFA)、ジンクフィンガー転写リプレッサー(ZFR、及びジンクフィンガーメチラーゼ(ZFM)を形成することができる。遺伝子修飾動物の作製にジンクフィンガー及びジンクフィンガーヌクレアーゼを使用するための材料及び方法は、例えば、米国特許第8,106,255号明細書、米国特許出願公開第20120192298号明細書、米国特許出願公開第20110023159号明細書、及び米国特許出願公開第20110281306号明細書に記載される。

10

#### 【0047】

クラスターを形成する規則的に間隔が置かれた短いパリンドロームリピート

クラスターを形成する規則的に間隔が置かれた短いパリンドロームリピート(CRISPR)は、細菌/古細菌適応免疫防御から誘導される。CRISPR活性には、CRISPR遺伝子座への侵入ウイルス又はプラスミドDNAからの「スペーサー」の組み込み、スペーサー-リピート単位からなる低分子ガイドCRISPR RNA(crRNA)の発現及びプロセッシング、並びにスペーサーと相補的な核酸の切断が関わる。ヌクレアーゼCas9は、crRNAと一致する配列を探して切断する。正しいプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)が3'末端にも存在する場合にのみ、Cas9はDNAを切断する。ゲノム操作ツールとして、gRNA指向性Cas9切断の特異性は極めて有用である。

20

#### 【0048】

例えば、DiCarloら(Nucl. Acids Res. 41(5)(2013))は、CRISPR-Cas構成要素のCas9遺伝子及びCRISPRガイドRNA(gRNA)を標的化するデザイナーゲノムが、酵母の標的化された内在性ゲノム遺伝子座においてロバストで特異的なRNAガイドエンドヌクレアーゼ活性を示したことを報告した。構成的Cas9発現及び一過性のgRNAカセットを使用すると、標的化された二本鎖切断により、一本鎖及び二本鎖オリゴヌクレオチドドナーの相同組換え比率がそれぞれ5倍及び130倍に増加したことが示された。加えて、Cas9を構成的に発現する細胞におけるgRNAプラスミド及びドナーDNAの同時形質転換により、ドナーDNA組換え頻度がほぼ100%になった。用語CRISPRは、本明細書では、これらの技術を用いる遺伝子操作ツールを指して使用される。

30

#### 【0049】

またCongらが、CRISPR系及び関連するCas9ヌクレアーゼを低分子RNAに指向させることにより、ヒト及びマウス細胞において内在性ゲノム遺伝子座に正確な切断を誘導できたことを報告した。Cas9はまたニッキング酵素にも変換され、最小限の変異原活性による相同性指向型修復を促進した。最後に、複数のガイド配列を単一のCRISPR配列にコードすることが可能で、哺乳類ゲノム内のいくつかの部位を同時にエディティングすることが可能であったことから、CRISPR技術が容易にプログラム可能であること、及び幅広い適用性を有することが実証された。

40

#### 【0050】

ベクター及び核酸

ノックアウトを目的として、遺伝子の不活性化のため、遺伝子の発現を得るため、又は他の目的で、様々な核酸が偶蹄類細胞又は他の細胞に導入され得る。本明細書で使用されるとき、用語の核酸には、DNA、RNA、及び核酸類似体、及び二本鎖又は一本鎖(即ち、センス又はアンチセンス一本鎖)である核酸が含まれる。核酸類似体を塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格で修飾することにより、例えば、核酸の安定性、ハイブリダイゼーション、又は溶解度が向上し得る。塩基部分の修飾には、デオキシチミジンに対するデオキシウリジン、並びにデオキシシチジンに対する5-メチル-2'-デオキシシチジン及び5-プロモ-2'-ドキシシチジン(doxycytidine)が含まれる。糖部分の修飾には、2'-O-メチル糖又は2'-O-アリル糖を形成するリボース糖の2'ヒ

50



ドロキシルの修飾が含まれる。デオキシリボースリン酸骨格は、各塩基部分が6員モルホリノ環に連結されているモルホリノ核酸か、又はデオキシリン酸骨格が擬ペプチド骨格によって置換されており、且つ4塩基が維持されているペプチド核酸が生じるように修飾することができる。Summertan and Weller (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7 (3) : 187 ; 及び Hyrupら (1996) Bioorgan. Med. Chem. 4 : 5 を参照のこと。加えて、デオキシリン酸骨格は、例えば、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエート骨格、ホスホラミダイト (phosphoroamidite)、又はアルキルリン酸トリエステル骨格で置換することができる。

#### 【0051】

標的核酸配列は、プロモーターなどの調節領域に作動可能に連結され得る。調節領域はブタ調節領域であってもよく、又は他の種由来であってもよい。本明細書で使用されるとき、作動可能に連結されとは、標的核酸の転写を可能にし又は促進するような方法で調節領域を核酸配列に対して位置させることを指す。

#### 【0052】

任意の種類のプロモーターを標的核酸配列に作動可能に連結させることができる。プロモーターの例としては、限定なしに、組織特異的プロモーター、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、及び特定の刺激に応答性又は非応答性のプロモーターが挙げられる。好適な組織特異的プロモーターは、細胞における核酸転写物の選択発現をもたらすことができ、例えばヒトインスリンプロモーターが含まれる。他の組織特異的プロモーターは、例えば、肝実質細胞又は心臓組織における選択発現をもたらすことができ、それぞれアルブミン又はミオシン重鎖プロモーターが含まれ得る。他の実施形態では、顕著な組織特異性又は時間的特異性のない核酸分子の発現を促進するプロモーターが用いられ得る (即ち、構成的プロモーター)。例えば、  
- アクチンプロモーター、例えばニワトリ  
- アクチン遺伝子プロモーター、ユビキチンプロモーター、ミニCAGsプロモーター、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーター、又は3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーターを使用し得るとともに、ウイルスプロモーター、例えば、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ (HSV - TK) プロモーター、SV40プロモーター、又はサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターも使用し得る。一部の実施形態では、ニワトリ アクチン遺伝子プロモーターとCMVエンハンサーとの融合物がプロモーターとして使用される。例えば、Xuら (2001) Hum. Gene Ther. 12 : 563 ; 及び Kiwakira (1996) Hum. Gene Ther. 7 : 821 を参照のこと。

#### 【0053】

誘導性プロモーターの例は、核酸の転写調節に使用することのできるテトラサイクリン (tet) - オンプロモーター系である。この系では、変異Tetリプレッサー (TetR) が単純ヘルペスウイルスVP16トランス活性化因子タンパク質の活性化ドメインと融合され、テトラサイクリン制御性転写活性化因子 (tTA) が作り出され、これはtet又はドキシサイクリン (dox) によって調節される。抗生物質の非存在下では転写は最小限である一方、tet又はdoxの存在下では転写が誘導される。代替的な誘導性の系としては、エクジソン系又はラパマイシン系が挙げられる。エクジソンは昆虫脱皮ホルモンであり、その産生は、エクジソン受容体とウルトラスピラクル遺伝子 (USP) の産物とのヘテロ二量体によって制御される。発現は、エクジソン又はムリステロンAなどのエクジソンの類似体で処理することにより誘導される。誘導性系を惹起するために動物に投与される薬剤は、誘導剤と称される。

#### 【0054】

核酸コンストラクトにおいて有用となり得るさらなる調節領域としては、限定はされないが、ポリアデニル化配列、翻訳制御配列 (例えば、配列内リボソーム進入セグメント、IRES)、エンハンサー、誘導性エレメント、又はイントロンが挙げられる。かかる調節領域は必須ではないが、mRNAの転写、安定性、翻訳効率などに影響を及ぼすことに

10

20

30

40

50

より発現を増加させ得る。かかる調節領域を必要に応じて核酸コンストラクトに含めることで、細胞における核酸の最適な発現を達成することができる。しかしながら、かかる追加的なエレメントなしに十分な発現が達成されることもある。

#### 【0055】

シグナルペプチド又は選択可能なマーカーをコードする核酸コンストラクトが用いられ得る。シグナルペプチドを使用して、コードされるポリペプチドが特定の細胞部位（例えば細胞表面）を指向するようにし得る。選択可能なマーカーの非限定的な例としては、ピユーロマイシン、ガンシクロビル、アデノシンデアミナーゼ（ADA）、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ（ネオマイシン（neo）、G418、APH）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ（p h o s p h o t r a n s f e r a s e）、チミジンキナーゼ（TK）、及びキサンチン Guanine phospho ribosyl transferase（XGPRT）が挙げられる。かかるマーカーは、培養下で安定な形質転換体を選択するのに有用である。他の選択可能なマーカーとしては、蛍光ポリペプチド、例えば緑色蛍光タンパク質又は黄色蛍光タンパク質が挙げられる。

10

#### 【0056】

一部の実施形態では、選択可能なマーカーをコードする配列には、例えば Cre 又は Flp などの、リコンビナーゼ認識配列が隣接し得る。例えば、選択可能なマーカーには loxP 認識部位（Cre リコンビナーゼによって認識される 34 bp の認識部位）又は FRT 認識部位が隣接してもよく、これによりコンストラクトからその選択可能なマーカーを切り出すことができる。Cre / lox 技術のレビューに関する Orbanら, Proc. Natl. Acad. Sci. (1992) 89: 6861、及び Brand and Dymecki, Dev. Cell (2004) 6: 7 を参照のこと。選択可能なマーカー遺伝子によって分断された Cre 活性化可能又は Flp 活性化可能導入遺伝子を含むトランスポゾンを使用して、導入遺伝子の条件付き発現を含むトランスジェニック動物を得ることもできる。例えば、マーカー / 導入遺伝子のプロモーター駆動発現は、遍在性であっても、或いは組織特異的であってもよく、これが F0 動物（例えばブタ）においてマーカーの遍在的又は組織特異的発現をもたらし得る。導入遺伝子の組織特異的活性化は、例えば、マーカーで分断された導入遺伝子を遍在的に発現するブタを、Cre 又は Flp を組織特異的な形で発現するブタと交配することによるか、又はマーカーで分断された導入遺伝子を組織特異的な形で発現するブタを、Cre 又は Flp リコンビナーゼを遍在的に発現するブタと交配することにより達成され得る。導入遺伝子の制御された発現又はマーカーの制御された切り出しにより、導入遺伝子の発現が可能となる。

20

30

#### 【0057】

一部の実施形態では、外来性核酸はポリペプチドをコードする。ポリペプチドをコードする核酸配列は、続くコードされたポリペプチドの操作を容易にするように（例えば位置特定又は検出を容易にするように）設計された「タグ」をコードするタグ配列を含み得る。タグ配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列において、コードされたタグがポリペプチドのカルボキシル末端又はアミノ末端のいずれかに位置するように挿入することができ、コードされるタグの非限定的な例としては、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）及び FLAG（商標）タグ（Kodak, New Haven, CT）が挙げられる。

40

#### 【0058】

核酸コンストラクトは、SssI CpGメチラーゼ（New England Biolabs, Ipswich, MA）を使用してメチル化することができる。一般には、核酸コンストラクトが緩衝液中 37 °C で S-アデノシルメチオニン及び SssI CpG-メチラーゼと共にインキュベートされ得る。コンストラクトを 1 単位の HinP1I エンドヌクレアーゼと共に 37 °C で 1 時間インキュベートし、アガロースゲル電気泳動によってアッセイすることにより、過剰メチル化を確認することができる。

50

## 【0059】

核酸コンストラクトは、例えば、卵母細胞又は卵などの生殖細胞、前駆細胞、成体又は胚性幹細胞、始原生殖細胞、PK-15細胞などの腎細胞、脾細胞、細胞、肝細胞、又は皮膚線維芽細胞などの線維芽細胞を含めた任意の種類の胚、胎仔、又は成体偶蹄類細胞に、様々な技術を使用して導入することができる。技術の非限定的な例としては、トランスポゾン系、細胞を感染させることのできる組換えウイルス、又はリポソームの使用、又は核酸を細胞に送達する能力を有する他の非ウイルス性的方法、例えば、電気穿孔、マイクロインジェクション、若しくはリン酸カルシウム沈殿が挙げられる。

## 【0060】

トランスポゾン系では、核酸コンストラクトの転写単位、即ち外来性核酸配列に作動可能に連結された調節領域に、トランスポゾンの逆方向反復が隣接する。いくつかのトランスポゾン系、例えば、スリーピングビューティー (Sleeping Beauty) (米国特許第6,613,752号明細書及び米国特許出願公開第2005/0003542号明細書を参照)；フロッグプリンス (Frog Prince) (Miskeyら (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:6873)；Tol2 (Kawakami (2007) *Genome Biology* 8 (Suppl.1):S7；ミノス (Minos) (Pavlopoulosら (2007) *Genome Biology* 8 (Suppl.1):S2)；Hsmar1 (Miskeyら (2007) *Mol Cell Biol.* 27:4589)；及びパスポート (Passport) が、マウス、ヒト、及びブタ細胞を含め、細胞に核酸を導入するために開発されている。スリーピングビューティー (Sleeping Beauty) トランスポゾンは特に有用である。トランスポザゼは、同じ核酸コンストラクトで外来性核酸としてコードされるタンパク質として送達されてもよく、別個の核酸コンストラクトに導入されてもよく、又はmRNA (例えば、インビトロで転写及びキャッピングされるmRNA) として提供されてもよい。

## 【0061】

外来性核酸の発現を維持し、且つ宿主遺伝子の望ましくない転写を阻害するため、インスレーターエレメントもまた核酸コンストラクトに含めることができる。例えば、米国特許出願公開第2004/0203158号明細書を参照のこと。典型的には、インスレーターエレメントは転写単位の両側に隣接し、トランスポゾンの逆方向反復に対して内側にある。インスレーターエレメントの非限定的な例としては、マトリクス付着領域 (MAR) 型インスレーターエレメント及び境界型インスレーターエレメントが挙げられる。例えば、米国特許第6,395,549号明細書、同第5,731,178号明細書、同第6,100,448号明細書、及び同第5,610,053号明細書、及び米国特許出願公開第2004/0203158号明細書を参照のこと。

## 【0062】

核酸はベクターに組み込まれ得る。ベクターは、担体から標的DNAに移るように設計された任意の特異的なDNAセグメントを含む広義の用語である。ベクターは、発現ベクター、又はベクター系と称されることもあり、これは、ゲノム又は他の標的とされるDNA配列、例えばエピソーム、プラスミド、又はさらにはウイルス/ファージDNAセグメントへのDNA挿入をもたらすのに必要な一組の構成要素である。動物における遺伝子デリバリーに使用されるベクター系、例えば、ウイルスベクター (例えば、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス及び組込みファージウイルス)、及び非ウイルスベクター (例えばトランスポゾン) は、2つの基本的な構成要素を有する：1) DNA (又はcDNAに逆転写されるRNA) を含むベクター、及び2) トランスポザゼ、リコンビナーゼ、又はその他の、ベクター及びDNA標的配列の両方を認識し且つ標的DNA配列にベクターを挿入するインテグラーゼ酵素。ベクターは、ほとんどの場合に、1つ以上の発現制御配列を含む1つ以上の発現カセットを含み、ここで発現制御配列は、別のDNA配列又はmRNAのそれぞれ転写及び/又は翻訳を制御及び調節するDNA配列である。

## 【0063】

多くの異なる種類のベクターが知られている。例えば、プラスミド及びウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクターが知られている。哺乳類発現プラスミドは、典型的には複製起点、好適なプロモーター及び任意選択のエンハンサーを有し、また任意の必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与・受容部位、転写終結配列、及び5'フランキング非転写配列も有する。ベクターの例としては、プラスミド（これはまた、別の種類のベクターの担体にもなり得る）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レンチウイルス（例えば、修飾HIV-1、SIV又はFIV）、レトロウイルス（例えば、ASV、ALV又はMoMLV）、及びトランスポゾン（例えば、スリーピングビューティー（Sleeping Beauty）、P-エレメント、Tol-2、フロッグプリンス（Frog Prince）、ピギーバック（piggyBac））が挙げられる。

10

#### 【0064】

本明細書で使用されるとき、用語の核酸は、例えば、cDNA、ゲノムDNA、合成の（例えば、化学的に合成された）DNA、並びに天然に存在する及び化学的に修飾された核酸、例えば、合成塩基又は代替的な骨格を含めた、RNA及びDNAの両方を指す。核酸分子は二本鎖又は一本鎖（即ち、センス又はアンチセンス一本鎖）であってよい。用語のトランスジェニックは、本明細書では広義に使用され、遺伝子操作技術を使用して遺伝物質が改変されている遺伝子修飾された生物又は遺伝子操作された生物を指す。従って、ノックアウト偶蹄類は、外来性遺伝子又は核酸が動物又はその子孫で発現するか否かに関わらず、トランスジェニックである。

20

#### 【0065】

##### 遺伝子修飾動物

動物は、TALEN、ジンクフィンガー、CRISPR/Cas9、又はリコンビナーゼ融合タンパク質、若しくは公知の様々なベクターを含む他の遺伝子操作ツールを使用して修飾され得る。動物を遺伝子修飾する材料及び方法は、2009年11月10日出願された米国特許出願公開第2012/0222143号明細書、米国特許出願公開第2012/0220037号明細書及び米国特許出願公開第2010/0251395号明細書（これらは、本明細書によってあらゆる目的から参照により本明細書に援用される）にさらに詳述される；矛盾が生じた場合、本明細書が優先する。用語のトランス作用性は、異なる分子から標的遺伝子に（即ち分子間で）作用する過程を指す。トランス作用エレメントは、通常、遺伝子を含むDNA配列である。この遺伝子は、標的遺伝子の調節において使用されるタンパク質（又はマイクロRNA又は他の拡散性分子）をコードする。トランス作用遺伝子は、標的遺伝子と同じ染色体上にあってもよいが、活性は、中間タンパク質又はそれをコードするRNAを介する。ドミナントネガティブを用いた遺伝子の不活性化には、概して、トランス作用エレメントが関わる。用語のシス調節又はシス作用は、タンパク質又はRNAをコードしない作用を意味する；遺伝子不活性化との関連において、これは概して、遺伝子のコード部分、又は機能性遺伝子の発現に必要なプロモーター及び/又はオペレーターの不活性化を意味する。

30

#### 【0066】

当該技術分野において公知の様々な技法を用いて核酸コンストラクトを動物に導入することにより、創始動物を産生して動物系統を作製することができ、核酸コンストラクト（又は遺伝子のノックアウト）がゲノムに組み込まれる。かかる技法には、限定なしに、前核マイクロインジェクション（米国特許第4,873,191号明細書）、生殖系列へのレトロウイルス媒介遺伝子導入（Van der Puttenら（1985）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-1652）、胚性幹細胞への遺伝子ターゲティング（Thompsonら（1989）Cell 56, 313-321）、胚の電気穿孔（Lo（1983）Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814）、精子媒介遺伝子導入（Lavitranoら（2002）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 14230-14235；Lavitranoら（2006）Reprod. Fert. Develop. 18, 19-23）、及び体細胞

40

50

、例えば卵丘若しくは乳腺細胞、又は成体、胎仔、若しくは胚性幹細胞のインビトロ形質転換と、続く核移植 (Wilmutら (1997) Nature 385, 810-813; 及び Wakayamaら (1998) Nature 394, 369-374) が含まれる。前核マイクロインジェクション、精子媒介遺伝子導入、及び体細胞核移植が特に有用な技術である。ゲノム修飾されている動物は、その生殖系列細胞を含め、その細胞の全てが遺伝子修飾を有する動物である。その遺伝子修飾がモザイクである動物を産生する方法が用いられる場合、動物は同系交配されてもよく、ゲノム修飾されている子孫が選択され得る。例えば、その細胞が胚盤胞期に修飾される場合、モザイク動物の作製にクローニングが用いられてもよく、又は単一の細胞が修飾されるときにはゲノム修飾が行われ得る。修飾されており、従って性的に成熟しない動物は、用いられる具体的な手法に応じて、修飾に関してホモ接合体又はヘテロ接合体であってよい。特定の遺伝子がノックアウト修飾により不活性化される場合、通常はホモ接合性が必要となり得る。特定の遺伝子がRNA干渉又はドミナントネガティブ戦略により不活性化される場合、ヘテロ接合性が適していることが多い。

10

#### 【0067】

典型的には、前核マイクロインジェクションでは、核酸コンストラクトが受精卵に導入される；精子頭部及び卵からの遺伝物質を含む前核が原形質内に見えることに伴い、1つ又は2つの細胞受精卵が使用される。前核期受精卵はインビトロ又はインビボ（即ち、ドナー動物の卵管から外科的に回収される）で得ることができる。インビトロ受精卵は、以下のとおり産生することができる。例えば、屠殺場でブタ卵巣を収集し、輸送中は22～28℃に維持することができる。卵巣を洗浄し、卵胞吸引のため単離することができ、及び4～8mmの範囲の卵胞を、18ゲージ針を使用して、且つ真空下で、50mLコニカル遠心管に吸引することができる。卵胞液及び吸引された卵母細胞を、市販のTL-HEPES (Minitube, Verona, WI) を含むプレフィルターに通してリンスすることができる。卵丘の凝集塊に取り囲まれた卵母細胞を選択し、0.1mg/mLシステイン、10ng/mL上皮成長因子、10%ブタ卵胞液、50µM 2-メルカプトエタノール、0.5mg/mL cAMP、各10IU/mLの妊馬血清性ゴナドトロピン (PMSG) 及びヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を補足したTCM-199卵母細胞成熟培地 (Minitube, Verona, WI) に、38.7℃及び5%CO<sub>2</sub>の加湿空気下約22時間置くことができる。続いて、卵母細胞を新鮮なTCM-199成熟培地に移し（この培地はcAMP、PMSG又はhCGを含まない）、さらに22時間インキュベートすることができる。0.1%ヒアルロニダーゼ中で1分間ボルテックスすることにより、成熟卵母細胞をその卵丘細胞から剥がし取ることができる。

20

30

#### 【0068】

ブタについては、成熟卵母細胞は、Minitube 5ウェル受精用ディッシュ中の500µl Minitube PORC PRO IVF培地系 (Minitube, Verona, WI) において受精させることができる。インビトロ受精 (IVF) に備え、採取したばかりの又は凍結された雄ブタ精液を洗浄し、 $4 \times 10^5$ 精子となるようにPORC PRO IVF培地に再懸濁することができる。コンピュータ支援精液分析 (SPERMVISION, Minitube, Verona, WI) によって精子濃度を分析することができる。最終的なインビトロ受精を、雄ブタに応じて、10µl容量において約40運動精子/卵母細胞の最終濃度で実施することができる。全ての受精卵母細胞を、5.0%CO<sub>2</sub>雰囲気下38.7℃で6時間インキュベートする。授精6時間後、予定接合子をNCSU-23中で2回洗浄し、0.5mLの同じ培地中に移すことができる。この系は、10～30%の多精子受精率で、ほとんどの雄ブタにわたり常に20～30%の胚盤胞を産生することができる。

40

#### 【0069】

線状化した核酸コンストラクトを前核の1つに注入することができる。次に、注入された卵をレシピエント雌に（例えばレシピエント雌の卵管内に）移植し、レシピエント雌において発育させてトランスジェニック動物を産生することができる。詳細には、インビト

50

口受精胚を15,000×gで5分間遠心して脂質を沈降させ、前核の可視化を可能にすることができる。胚は、Eppendorf FEMTOJET注入器を使用して注入することができ、胚盤胞形成まで培養することができる。胚分割及び胚盤胞形成の速度及び質を記録することができる。

#### 【0070】

胚は、非同期レシピエントの子宮に外科的に移植することができる。典型的には、100～200個（例えば150～200個）の胚を、5.5インチTOMCAT（登録商標）カテーテルを使用して卵管の膨大部-峡部接合部に置くことができる。手術後、妊娠のリアルタイム超音波検査を実施することができる。

#### 【0071】

体細胞核移植では、上記に記載する核酸コンストラクトを含むトランスジェニック偶蹄類細胞（例えば、トランスジェニックブタ細胞又はウシ細胞）、例えば、胚割球、胎仔線維芽細胞、成体耳線維芽細胞、又は顆粒膜細胞を除核卵母細胞に導入し、複合細胞を樹立することができる。卵母細胞は、極体近傍で部分的に透明帯を切開し、次に切開範囲で細胞質を押し出すことにより除核することができる。典型的には、鋭く斜めに切られた先端を有する注入ピペットを使用して、第2減数分裂で停止した除核卵母細胞にトランスジェニック細胞を注入する。ある種の慣例では、第2減数分裂で停止した卵母細胞が卵と呼ばれる。ブタ又はウシ胚の産生後（例えば、卵母細胞を融合して活性化させることによる）、活性化から約20～24時間後、胚をレシピエント雌の卵管に移植する。例えば、Cibelliら（1998）Science 280, 1256-1258及び米国特許第6,548,741号明細書を参照のこと。ブタについては、レシピエント雌は、胚移植後約20～21日で妊娠を検査することができる。他の家畜も同等のプロセスを有する。

#### 【0072】

標準的な育種技法を用いることにより、最初のヘテロ接合体創始動物から、外来性核酸に関してホモ接合体の動物を作出することができる。しかしながらホモ接合性が必須でないこともある。本明細書に記載される修飾動物ブタを、目的の他の動物と繁殖させることができる。

#### 【0073】

一部の実施形態では、目的の核酸及び選択可能なマーカーを別個のトランスポゾンに提供し、胚又は細胞のいずれかに等量ではなしに提供することができ、ここで選択可能なマーカーを含むトランスポゾンの量は、目的の核酸を含むトランスポゾンよりはるかに過剰（5～10倍過剰）である。目的の核酸を発現するトランスジェニック細胞又は動物は、選択可能なマーカーの存在及び発現に基づき単離することができる。トランスポゾンは正確な且つ関係付けのない形でゲノムに組み込まれるため（独立した転移イベント）、目的の核酸と選択可能なマーカーとが遺伝的に関係付けられることはなく、標準的な育種を用いた遺伝的分離によって容易に分けることができる。従って、公衆安全の観点からある種懸念される問題である、後続の世代における選択可能なマーカーの保持に制約されないトランスジェニック動物を産生することができる。

#### 【0074】

トランスジェニック動物の生成後、標準的な技法を用いて外来性核酸の発現を評価することができる。初期スクリーニングは、サザンブロット解析によってコンストラクトの組み込みが行われたかどうかを決定することにより達成することができる。サザン解析の説明は、Sambrookら, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press, Plainview; NYの第9.37～9.52節を参照のこと。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技法もまた初期スクリーニングにおいて用いることができる。PCRは、標的核酸を増幅する手法又は技法を指す。一般には、目的の領域の末端又はその外側からの配列情報を用いることにより、配列が増幅しようとする鋳型の逆ストランドと同一の又は類似したオリゴヌクレオチドプライマーが設計される。PCRを使用すると、全ゲノムDNA又は全細胞RNAの配列を含め、DNA並びにRNAの特定の配列を増幅す

10

20

30

40

50

ることができる。プライマーは、典型的には14～40ヌクレオチド長であるが、10ヌクレオチド長から数百ヌクレオチド長にも及び得る。PCRについては、例えばPCR Primer: A Laboratory Manual, ed. Diefenbach and Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995に記載される。核酸はまた、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、自家持続配列複製法、又は核酸配列ベース増幅によって増幅することもできる。例えば、Lewis (1992) Genetic Engineering News 12, 1; Guatelliら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874; 及び Weiss (1991) Science 254: 1292を参照のこと。胚盤胞期には、PCR、サザンハイブリダイゼーション及びスプリンカレット (splinkerette) PCRによる分析のために、胚を個別に処理することができる (例えば、Dupuyら Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2002) 99: 4495を参照のこと)。

10

#### 【0075】

トランスジェニック動物の組織においてポリペプチドをコードする核酸配列の発現は、例えば、動物から採取した組織試料のノーザンブロット解析、インサイチュハイブリダイゼーション分析、ウエスタン分析、酵素結合免疫吸着アッセイなどのイムノアッセイ、及び逆転写酵素PCR (RT-PCR) を含む技法を用いて評価することができる。

#### 【0076】

創始動物、動物系統、形質、及び繁殖

20

創始動物は、クローニング及び本明細書に記載される他の方法により産生され得る。創始動物は、接合子又は初代細胞がホモ接合性の修飾を受ける場合のように、遺伝子修飾に関してホモ接合体であり得る。同様に、ヘテロ接合体の創始動物もまた作製され得る。創始動物はゲノム修飾されていてもよく、即ち、そのゲノムにおける細胞の全てが修飾を受けていてもよい。創始動物は、ベクターが胚における複数の細胞のうちの1つに、典型的には胚盤胞期に導入されたときに起こり得るように、修飾に関してモザイクであってもよい。モザイク動物の子孫を試験することにより、ゲノム修飾されている子孫を同定し得る。有性生殖することができる、又は生殖補助技術により生殖できる動物であって、異種又はホモ接合体の子孫が一貫して修飾を発現する動物のプールが作り出されたとき、動物系統が樹立される。

30

#### 【0077】

家畜においては、多くの対立遺伝子が、生産形質、体型形質、作業性) 形質、及び他の機能形質などの様々な形質に関係付けられることが知られている。当業者は、これらの形質を観察し及び定量化することに慣れているであろう、例えば、Visscherら, Livestock Production Science, 40 (1994) 123-137、米国特許第7,709,206号明細書、米国特許出願公開第2001/0016315号明細書、米国特許出願公開第2011/0023140号明細書、及び米国特許出願公開第2005/0153317号明細書。動物系統は、生産形質、体型形質、作業性形質、繁殖形質、母性形質、及び耐病性形質からなる群の形質から選択される形質を含み得る。さらなる形質には、組換え遺伝子産物の発現が含まれる。

40

#### 【0078】

リコンビナーゼ

本発明の実施形態は、1つ又は複数のTALEN又はジンクフィンガーヌクレアーゼをリコンビナーゼ又はDNA組換えに関連する他のDNA結合タンパク質と共に投与することを含む。実施形態はまた、リコンビナーゼ融合タンパク質、例えば、米国特許出願公開第2011/0059160号明細書にあるとおりのRecA-gal4融合物の投与により、細胞染色体に二本鎖切断を作成することを含む。

#### 【0079】

リコンビナーゼは核酸断片とフィラメントを形成し、事実上、細胞DNAを探してその配列と実質的に相同なDNA配列を見つけ出す。TALEN-リコンビナーゼ実施形態の

50

実施形態は、リコンビナーゼを、鋳型として働く核酸配列と組み合わせることを含む。鋳型配列は、T A L E N / T A L E N 対による切断の標的となる部位と実質的な相同性を有する。本明細書に記載されるとおり、鋳型配列は、対立遺伝子の配置、インデルの作成、外来性DNAの挿入により、又は他の変化を伴い、天然DNAに変化を提供する。T A L E N は細胞又は胚に、本明細書に記載される方法によってタンパク質、mRNAとして置かれるか、又はベクターを使用することにより置かれる。リコンビナーゼは鋳型配列と組み合わせさせてフィラメントを形成し、細胞内に置かれる。リコンビナーゼ及び/又はリコンビナーゼと組み合わせる鋳型配列は、細胞又は胚に、タンパク質、mRNAとして置かれても、又はリコンビナーゼをコードするベクターで置かれてもよい。米国特許出願公開第2011/0059160号明細書の開示が、本明細書によってあらゆる目的から参照により本明細書に援用される；矛盾が生じた場合、本明細書が優先する。用語のリコンビナーゼは、細胞において、2つの比較的長いDNA鎖の間における比較的短いDNA断片の接合を酵素的に触媒する遺伝子組換え酵素を指す。リコンビナーゼには、Creリコンビナーゼ、Hinリコンビナーゼ、RecA、RAD51、Cre、及びFLPが含まれる。Creリコンビナーゼは、loxP部位間のDNAの部位特異的組換えを触媒するP1バクテリオファージ由来のI型トポイソメラーゼである。Hinリコンビナーゼは、細菌のサルモネラ属(*Salmonella*)に見出される198アミノ酸から構成される21kDのタンパク質である。Hinは、DNA切断及び組換えの開始を活性部位セリンに頼るDNAインペルターゼのセリンリコンビナーゼファミリーに属する。RAD51はヒト遺伝子である。この遺伝子によりコードされるタンパク質は、DNA二本鎖切断の修復を助けるRAD51タンパク質ファミリーのメンバーである。RAD51ファミリーメンバーは、細菌RecA及び酵母Rad51と相同である。Creリコンビナーゼは実験用酵素であり、実験室試験において、HIVにより挿入されたDNAを感染細胞から取り除くことに成功している。この酵素は、HIVマーカー（これはloxP部位が結合せず、従ってCre-lox組換えの試みを許容しない）の同定を目的として、選択的突然変異によりCreリコンビナーゼから誘導された。FLPは、パン酵母サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の2µプラスミドから誘導されるフリッパーゼ組換え酵素(FLP又はFlp)を指す。

#### 【0080】

同様にリコンビナーゼ活性をプロセッシングするRecAの真核生物相同体が、Rad51タンパク質であり、最初は酵母サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)において同定された。Bishopら、(1992)Cell 69:439-56及びShinoharaら、(1992)Cell:457-70 Aboussekhrara、(1992)Mol. Cell. Biol. 72, 3224-3234. Basileら、(1992)Mol. Cell. Biol. 12, 3235-3246。植物Rad51配列については、米国特許第6,541,684号明細書；同第6,720,478号明細書；同第6,905,857号明細書及び同第7,034,117号明細書に記載される。RecAと相同な別の酵母タンパク質は、Dmc1タンパク質である。大腸菌(*E. coli*)及びS.セレビスエ(*S. cerevisiae*)以外の生物におけるRecA/Rad51相同体について記載されている。Moritaら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6577-6580; Shinoharaら(1993)Nature Genet. 4:239-243; Heyer(1994)Experientia 50:223-233; Maeshimaら(1995)Gene 160:195-200; 米国特許第6,541,684号明細書及び同第6,905,857号明細書。

#### 【0081】

本明細書では、「RecA」又は「RecAタンパク質」は、同じ機能、特に：(i) DNAポリメラーゼによる続く伸長のため、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドをその相同標的に適切に位置決めする能力；(ii) DNA合成のため、二重鎖核酸のトポロジを調製する能力；及び、(iii) RecA/オリゴヌクレオチド又はRecA



／ポリヌクレオチド複合体が効率的に相補配列を見つけ出してそれと結合する能力、のうちの本質的に全て又はほとんどを備える RecA 様組換えタンパク質を指す。最も良く特徴付けられている RecA タンパク質は、大腸菌 (E. coli) 由来のものである；このタンパク質の当初の対立形質に加え、いくつかの変異 RecA 様タンパク質、例えば RecA803 が同定されている。さらに、多くの生物が、例えば、酵母、ショウジョウバエ属 (Drosophila)、ヒトを含む哺乳動物、及び植物を含めて、RecA 様鎖転移タンパク質を有する。これらのタンパク質には、例えば、Rec1、Rec2、Rad51、Rad51B、Rad51C、Rad51D、Rad51E、XRCC2 及び DMC1 が含まれる。組換えタンパク質の実施形態は、大腸菌 (E. coli) の RecA タンパク質である。或いは、RecA タンパク質は、大腸菌 (E. coli) の変異 RecA-803 タンパク質、別の細菌供給源由来の RecA タンパク質又は別の生物由来の相同組換えタンパク質であってもよい。

10

#### 【0082】

核タンパク質フィラメント、又は「フィラメント」が形成されてもよい。用語のフィラメントは、リコンビナーゼとの構造の形成に関連して、当該技術分野の当業者に知られている用語である。次にそのように形成された核タンパク質フィラメントを、例えば、別の核酸と接触させるか又は細胞に導入することができる。核タンパク質フィラメントであって、リコンビナーゼ活性を有するポリペプチド配列と核酸とを含むフィラメントの形成方法は、当該技術分野において周知されている。例えば、Cuiら (2003) Marine Biotechnol. 5: 174-184 及び米国特許第 4,888,274 号明細書；同第 5,763,240 号明細書；同第 5,948,653 号明細書及び同第 7,199,281 号明細書を参照のこと（これらの開示は、リコンビナーゼを核酸と結合させて核タンパク質フィラメントを形成する例示的な技法を開示する目的で、参照により援用される）。

20

#### 【0083】

一般に、リコンビナーゼ活性を有する分子は、線状の一本鎖核酸に接触される。線状の一本鎖核酸はプローブであってもよい。かかる一本鎖核酸の調製方法は公知である。反応混合物は、典型的にはマグネシウムイオンを含有する。場合により、反応混合物は緩衝され、場合によりまた ATP、dATP 又は非加水分解性 ATP 類似体、例えば -チオ-ATP (ATP-S) 又は -チオ-GTP (GTP-S) も含有する。反応混合物はまた、場合により ATP 生成系も含有する。二本鎖 DNA 分子を、フィラメント形成の前に、或いはその最中に、（例えば、熱又はアルカリによって）変性させることができる。リコンビナーゼと核酸とのモル比の最適化は、当該分野の技術の範囲内である。例えば、種々のリコンビナーゼ濃度の系列を一定量の核酸に添加することができ、アガロース又はアクリルアミドゲルにおける移動度によってフィラメント形成をアッセイすることができる。結合したタンパク質がポリヌクレオチドの電気泳動移動度を減速させるため、核酸移動度の減速によってフィラメント形成が明らかとなる。移動度の減速に伴う最大減速度、又は最大核酸移動量のいずれかを使用して、最適ナリコンビナーゼ：核酸比を指示することができる。タンパク質-DNA 会合もまた、ポリヌクレオチドがニトロセルロースに結合する能力を測定することにより定量化できる。

30

40

#### 【0084】

##### ポリペプチド

ある場合には、ペプチドと本明細書に示される配列との同一性パーセントの決定が必要となり得る。そのような場合、同一性パーセントは、ペプチド、又はペプチドの一部分の残基の数の点で計測される。例えば 90% の同一性のポリペプチドが、より大きいペプチドの一部分であることもあり得る。実施形態には、本明細書に示される配列の指示される同一性及び／又は保存的置換を有するかかるポリペプチドが含まれる。

#### 【0085】

単離されているという用語は、ポリペプチドに関連して本明細書で使用されるとき、天然に存在しない対応物を有するか（例えば、ペプチドミメティクス）、又は化学的に合成

50

された、従って実質的に他のポリペプチドに汚染されていないか、又は天然では共存するほとんどの細胞成分（例えば、他の細胞タンパク質、ポリヌクレオチド、又は細胞成分から分離又は精製されたポリペプチドを指す。

#### 【0086】

##### 研究ツール及び調査

本明細書における細胞及び胚の修飾方法は、幅広い研究ツールに適用することができる。細胞又は胚それ自体もまた、研究に有用である。例えば、伝統的な育種プログラムは、しばしば、繁殖させる動物の遺伝子成分を理解することに多く頼っている。望ましい形質を有する動物は、品種育成のため繁殖される。これらの形質は、動物の遺伝子及び遺伝子の組み合わせに大きく依存する。遺伝子を細胞又は胚に入れると、又はそれらの遺伝子を修飾すると、遺伝子がどのように相互作用して目的とする形質を生み出すかに関する価値ある情報が提供される。細胞又は胚は好適な時間にわたり培養され、次に試験され得る。胚は、任意の意味のある発生段階に達する前に破壊されるが、それにもかかわらず有用な洞察を提供する。

#### 【0087】

1. 本明細書に記載される修飾に関して細胞又は動物をスクリーニングするためのスクリーニングテストを提供する。明らかなことだが、スクリーニングした生物の条件を理解することは、研究プロセスの次のステップを決定するのに有用である。さらに、口蹄疫に曝露された群れの場合、群れの中のどの動物が遺伝的に疾患に対して抵抗性であるか、及びどれが抵抗性でないかを知ることが有用である。スクリーニングは、例えばDNAを調べること、又はプロテアーゼ抵抗性eIF4Gタンパク質の存在について調べることを含み得る。ある実施形態は、口蹄疫に対する抵抗性の存在をスクリーニングする試験又は方法であり、これは、修飾eIF4G遺伝子及び/又は修飾eIF4Gタンパク質を含むかどうかを決定するため細胞、胚、又は動物を調べるステップを含む。例えば、細胞、又は生物の1つ以上の細胞を破壊して、前記遺伝子又は前記タンパク質、又はその両方の発現を決定することができる。

#### 【0088】

##### 参考文献

以下の参考文献は、全て本明細書によって参照により本明細書に援用される。本書に示される特許及び特許出願もまた、本明細書によって参照により本明細書に援用される。矛盾が生じた場合には、本明細書が優先する。1. Thompson, D., et al., Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. Rev. Sci. Tech., 2002. 21: p. 657-687. 2. Grubman, M.J. and B. Baxt, Foot-and-mouth disease. Clin. Microbiol. Rev., 2004. 17: p. 465-493. 3. Cao, X., et al., Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. J. Virol., 1995. 69: p. 560-563. 4. Glaser, W. and T. Skern, Extremely efficient cleavage of eIF4G by picornaviral proteinases L and 2A in vitro. FEBS Lett., 2000. 480: p. 151-155. 5. Gradi, A., et al., Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site in vitro. J. Virol., 2004. 78: p. 3271-3278. 6.

nton, T.M., et al., Functional analysis of individual binding activities of the scaffold protein eIF4G. *J. biol. Chem.*, 2007. 282: p. 1695-1708. 7. Aitken, C.E. and J.R. Lorsch, A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Rev. Struc. Mol. Biol.*, 2012. 19: p. 568-576. 8. Kerekatte, V., et al., Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J. Virol.*, 1999. 73: p. 709-717. 9. Foeger, N., et al., The binding of foot-and-mouth disease virus leader proteinase to eIF4GI involves conserved ionic interactions. *FEBS J.*, 2005. 272: p. 2602-2611. 10. Prevot, D., J.L. Darlix, and T. Ohlmann, Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell.*, 2003. 95: p. 141-156. 11. Lloyd, R.E., Translational control by viral proteinases. *Virus Res.*, 2006. 119: p. 76-88. 12. Truniger, V. and M.A. Aranda, Recessive resistance to plant viruses. *Adv. Virus Res.*, 2009. 75: p. 120-159. 13. de los Santos, T., The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J. Virol.*, 2006. 80: p. 1906-1914. 14. Perez-Martin, E., et al., Bovine type III interferon significantly delays and reduces the severity of foot-and-mouth disease in cattle. *J. Virol.*, 2012. 86: p. 4477-4487. 15. Wang, D., et al., The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus negatively regulates the interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase. *J. Virol.*, 2011. 85: p. 3758-3766. 16. Wang, D., et al., Foot-and-mouth disease virus leader proteinase inhibits dsRNA-induced type I interferon transcription by decreasing interferon regulatory factor 3/7 in protein levels. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2010. 399: p. 72-78. 17. de los Santos, T., F. Diaz-San Segundo, and M.J. Grubman, Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J. Virol.*, 2007. 81: p.

10

20

30

40

50

12803-12815. 18. Borman, A.M., et al., eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA*, 1997. 3: p. 186-196. 19. Zhao, X., et al., Protection of cap-dependent protein synthesis in vivo and in vitro with an eIF4G-1 variant highly resistant to cleavage by Coxsackievirus 2A protease. *J. Biol. Chem.*, 2003. 278: p. 4449-4457. 20. Lopez de Quinto, S. and E. Martinez-Salas, Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA*, 2000, 6: p. 1380-1392. 21. Saleh, L., et al., Functional interaction of translation initiation factor eIF4G with the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site. *J. Gen. Virol.*, 2001. 82: p. 757-763. 22. Hinton, T.M., et al., Conservation of L and 3C proteinase activities across distantly related aphthoviruses. *J. Gen. Virol.*, 2002. 83: p. 3111-3121. 23. Belsham, G.J., G.M. McInerney, and N. Ross-Smith, Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J. Virol.*, 2000. 74: p. 272-280. 24. Strong, R. and G.J. Belsham, Sequential modification of translation initiation factor eIF4GI by two different foot-and-mouth disease virus proteases within infected baby hamster kidney cells: identification of the 3C pro cleavage site. *J. Gen. Virol.*, 2004. 85: p. 2953-2962. 25. Piccone, M.E., et al., The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J. Virol.*, 1995. 69: p. 5372-5382. 26. Mason, P.W. et al., Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology*, 1997. 227: p. 96-102. 27. Chinsangaram, J., P.W. Mason, and M.J. Grubman, Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 1998. 16: p. 1516-1522. 28. Chinsangaram,

J., M. Koster, and M.J. Grubman, Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Virol.*, 2001. 75: p. 5498-5503. 29. Fabian, M.R. and N. Sonenberg, The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature Rev. Struc. Mol. Biol.*, 2012. 19: p. 586-593. 30. Drake, J.W. and J.J. Holland, Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999. 96: p. 13910-13913. 31. Pfeiffer, J.K. and K. Kirkegaard, Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog.*, 2005. 1: p. e11. 32. Freistadt, M.S., J.A. Vaccaro, and K.E. Eberle, Biochemical characterization of the fidelity of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virol. J.*, 2007. 4: p. 44. 33. Lee, S.W., Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science*, 2012. 337: p. 188. 34. Carlson, D.F., S.C. Fahrenkrug, and P.B. Hackett, Targeting DNA with fingers and TALENs. *Mol. Ther. Nuc. Acids*, 2012. 1: p. e3. 35. Tan, S., Precision editing of large animal genomes. *Adv. Genet.*, 2012. 80: p. (in press). 36. Lamphear, B.J. and R.E. Rhoads, A single amino acid change in protein synthesis initiation factor 4G renders cap-dependent translation resistant to picornaviral 2A proteases. *Biochemistry*, 1996. 35: p. 15726-15733. 37. A.M. GEURTS et al., Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases, 325 *Science* (2009). 38. I.D. CARBERY, et al., Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases, 186 *Genetics* (2010). 39. Carlson, D. F., J. R. Garbe, et al. (2011). "Strategies for selection marker-free swine transgenesis using the Sleeping Beauty transposon system." *Transgenic research* 20(5): 1125-1137. 40. Carlson, D. F., W. Tan, et al. (2012). "Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(12): 4684-4689.

es of America 109(43): 17382-17387. 41.  
Guschin, D. Y., A. J. Waite, et al. (2010). "A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification." *Methods in molecular biology* 649: 247-256. Patent applications also incorporated by reference herein: US 2010/0146655, US 2010/0105140, US 2011/0059160, US 2011/0197290, US 2010/0146655, US 2011/0197290, US 2012/0222143 and U.S. Serial No. 61/662,767

10

#### 【実施例】

#### 【0089】

材料及び方法は、TALENの作製を含め、特に指示されない限り概して2012年8月24日に出願された米国特許出願第13/594,694号明細書に記載されるとおりである。これらのプロセスは、初代細胞において対立遺伝子を変化させるのに有効であることが実証されており、次にこの初代細胞を使用することにより、それらの対立遺伝子を有してその子孫に受け継ぐ遺伝子修飾された創始動物が作製される。

#### 【0090】

#### 実施例 1

20

図2を参照すると、ブタEIF4GIの一部がパネルAに示される。野生型配列はL<sup>P</sup>「<sup>o</sup>切断部位(矢印)と比べてマイナス3位及び2位にアスパラギン及びロイシン残基を有する。この例では、HDR鑄型がマイナス3位及び2位の残基をアスパラギン酸及びフェニルアラニンに置き換えることで、修飾EIF4GIをL<sup>P</sup>「<sup>o</sup>切断に対して抵抗性にする。野生型EIF4GIを切断して相同組換えを刺激するように2対のTALEN(上)を設計した。パネルB:各TALEN対をトランスフェクトしたブタ線維芽細胞のサーベイヤー(Cell-I)アッセイ。パネルC:相同組換え効率を決定するためのRFLPアッセイ。

#### 【0091】

初期継代(2代未満)の初代ブタ線維芽細胞においてトランスフェクションを実施した。トランスフェクションで使用するため70~90%コンフルエンスで線維芽細胞を回収した。2マイクログラムのTALEN mRNA ssEIF4G14.1又はssEIF4G14.2を、0.2nモルの90mer相同オリゴヌクレオチド(5'-ccccagacttcactccgtccctttgcccagacttcggcccgaccagcccttagc aaccgtgggcccccaagggtgggcccaggtgggagctgcc)(配列番号18)と共に、以下の設置でNEONヌクレオフェクション系(Life Technologies)を使用して500,000個の線維芽細胞にトランスフェクトした:1パルス、1800v;20ms幅及び100µlティップ。トランスフェクト細胞を3日間摂氏30度で培養した後、サーベイヤーアッセイ(Transgenomic)(Carlson,Tanら2012)によりインデル解析を行い、EagIを使用して定量RFLP解析を行った。産物を10%PAGEゲルで分離し、デシトメトリーにより切断産物を測定する。Guschinら(Guschin,Waiteら2010)に記載されるとおりパーセントNHEJを計算したものを、以下に示す。パーセント相同組換えは、切断された産物の密度の合計を全産物の合計で除すことにより計算した。

30

40

#### 【0092】

将来、EIF4GIに対するさらなるL<sup>P</sup>「<sup>o</sup>切断部位突然変異が同じ方法によって導入され得る。

#### 【0093】

#### 実施例 2

50

コロニー単離については、細胞を計数し、 $1 \sim 20$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の密度範囲で  $10 \text{ cm}$  ディッシュ上に播き得る。細胞は、直径  $3 \sim 4 \text{ mm}$  の個々のコロニーが存在するまで、 $10 \sim 15$  日間培養し得る。個々のコロニーを  $p - 200$  ピペッターで穏やかな吸引下に吸引し、 $500 \mu\text{l}$  の成長培地を含む  $24$  ウェルプレートのウェルに吐き出し得る (Carlson, Garbe ら 2011)。明確に画定されたコロニー (約  $10 \sim 30$  / プレート) を含むプレートをコロニー吸引用を選択し、複数のコロニーから細胞が吸引される可能性を抑え得る。コロニーが  $24$  ウェルディッシュにおいて  $70 \sim 90$  パーセントコンフルエントに達したところで、RFP-L 分析用に一部を回収し、残りを凍結保存し得る。目的の特徴の獲得に成功したことが決定されたコロニーから細胞を取り出し、それをクロニングに使用して創始動物を作製し得る。

10

#### 【0094】

上記の具体的な実施形態は例示を目的とするもので、限定することは意図していない。さらなる実施形態が、本明細書に記載される広義の概念の範囲内にある。加えて、本発明は特定の実施形態に関連して記載されているが、当業者は、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく形態及び詳細に変更を加え得ることを認識するであろう。本明細書における文献の参照による援用はいずれも、本明細書の明示的な開示に反する主題が援用されないように限定される。

#### 【図 1】

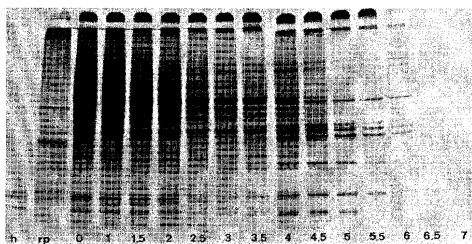
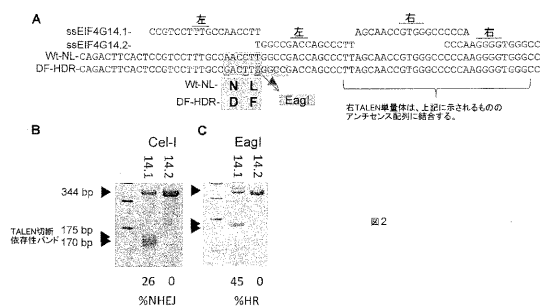


FIG. 1

#### 【図 2】



【配列表】

0006446360000001.app



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)		C 1 2 N 15/873	Z
C 1 2 N 15/85 (2006.01)		A 0 1 K 67/027	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)		C 1 2 N 15/12	Z N A
		C 1 2 N 15/85	Z
		C 0 7 K 14/47	

(72)発明者 ダニエル・エフ・カールソン  
アメリカ合衆国 5 5 0 7 6 ミネソタ州インバー・グローブ・ハイツ、ベントン・サークル 6 8 1 6 番

(72)発明者 スコット・シー・ファーレンクラッグ  
アメリカ合衆国 5 5 4 1 8 ミネソタ州ミネアポリス、ヘイズ・ストリート・ノースイースト 2 7 5 1 番

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 中国特許出願公開第 1 0 2 5 5 9 7 6 2 ( C N , A )  
国際公開第 2 0 1 1 / 1 5 4 3 9 3 ( W O , A 1 )  
国際公開第 2 0 1 1 / 0 1 9 3 8 5 ( W O , A 1 )  
Biochimie (2012) 94 pp.711-718  
Tan W, et al., "Precision Editing of Large Animal Genomes", Advances in Genetics (2012 ) Vol.80, Chapter 2, pp.37-97  
Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. (2005) Vol.24, No.1, pp.275-283, [ 検索日 平成29年4月25 日 ], インターネット<URL: <http://vet.hcmuaf.edu.vn/data/file/application%20of%20biotechnology%20of%20animal%20health%20and%20production%20Disease-resistant%20genetically%20modified%20animals.pdf>>  
EMBO J. (2003) Vol.22, No.8, pp.1909-1921  
Journal of Virology (2004) vol.78, No.7, pp.3271-3278  
Journal of General Virology (2004) Vol.85, pp.2953-2962  
FEBS Letters (2001) Vol.507, pp.1-5

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C 1 2 N 5 / 0 0  
C 1 2 N 1 5 / 0 0  
A 0 1 K 6 7 / 0 2 7  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S / W P I X ( S T N )