

【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】平成 29 年 3 月 30 日 (2017.3.30)

【公開番号】特開 2016-185166 (P2016-185166A)

【公開日】平成 28 年 10 月 27 日 (2016.10.27)

【年通号数】公開・登録公報 2016-061

【出願番号】特願 2016-148272 (P2016-148272)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 5/10

【手続補正書】

【提出日】平成 29 年 2 月 23 日 (2017.2.23)

【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】

第 1 のエキソンを、多機能性対立遺伝子で置き換えるための核酸構築物であって、

(a) 細胞の核酸の標的遺伝子に対して前記核酸構築物を誘導するための標的化アーム
i

(b) 前記標的遺伝子の転写に関してセンス方向の動作配列、および、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 (D S C) であって、前記動作配列が、第 1 のスプライシングアクセプターと、第 1 のレポーターと、第 1 のポリアデニル化配列とを含む、動作配列および D S C ;

(c) アンチセンス方向の目的のヌクレオチド配列 (N S I)、および、アンチセンス方向の C O I N (反転による条件的エレメント) であって、前記 N S I が第 2 のエキソンを含み、前記 C O I N が、第 2 のスプライシングアクセプターと、第 2 のレポーターと、第 2 のポリアデニル化配列とを含む、N S I および C O I N ; ならびに、

(d) 組み換え可能なユニットであって、
第 1 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第 1 の対および第 2 の対と

前記第 1 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の前記第 1 の対または前記第 2 の対に隣接した、前記動作配列、前記 D S C および前記 N S I を含む第 1 の組み換え可能なユニットと、

前記第 1 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の前記第 1 の対または前記第 2 の対に隣接した、前記 N S I を含む第 2 の組み換え可能なユニットと、

第 2 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第 3 の対および第 4 の対と、

第 3 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第 5 の対と、

を含み、ここで、前記第 1 のリコンビナーゼ、前記第 2 のリコンビナーゼ、および前記第 3 のリコンビナーゼは同じではない、組み換え可能なユニット ;

を含み、

前記組み換え可能なユニットは、第1のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記動作配列と前記DSCを欠失し、かつ、前記NSIをセンス方向で、前記COINをアンチセンス方向で含む条件的対立遺伝子を形成するように組み換わり；そして、

前記条件的対立遺伝子は、前記第2のリコンビナーゼに対してさらに暴露されると、前記NSIを欠失し、前記COINをセンス方向で有する対立遺伝子を形成するように組み換わる、核酸構築物。

【請求項2】

第1のエキソンを、多機能性対立遺伝子で置き換えるための核酸構築物であって、

(a) 細胞の核酸の標的遺伝子に対して前記核酸構築物を誘導するための標的化アーム；

(b) 前記標的遺伝子の転写に関してセンス方向の動作配列、および、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)であって、前記動作配列が、第1のスプライシングアクセプターと、第1のレポーターと、第1のポリアデニル化配列とを含む、動作配列およびDSC；

(c) アンチセンス方向の目的のヌクレオチド配列(NSI)、および、アンチセンス方向のCOIN(反転による条件的エレメント)であって、前記NSIが第2のエキソンを含み、前記COINが、第2のスプライシングアクセプターと、第2のレポーターと、第2のポリアデニル化配列とを含む、NSIおよびCOIN；ならびに、

(d) 組み換え可能なユニットであって、

第1のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第1の対および第2の対と

前記第1のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ部位の前記第1の対または前記第2の対に隣接した、前記動作配列、前記DSCおよび前記NSIを含む第1の組み換え可能なユニットと、

前記第1のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の前記第1の対または前記第2の対に隣接した、前記NSIを含む第2の組み換え可能なユニットと、

第2のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第3の対および第4の対と、

第3のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第5の対と、

を含み、ここで、前記第1のリコンビナーゼ、前記第2のリコンビナーゼ、および前記第3のリコンビナーゼは同じではない、組み換え可能なユニット；

を含み、

前記組み換え可能なユニットは、第1のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記動作配列と前記DSCを欠失し、かつ、前記NSIをセンス方向で、前記COINをアンチセンス方向で含む条件的対立遺伝子を形成するように組み換わり；そして、

前記条件的対立遺伝子は、前記第2のリコンビナーゼに対してさらに暴露されると、

(i) 前記NSIを欠失し、前記COINをセンス方向で有する対立遺伝子、または、

(ii) 前記NSIをアンチセンス方向で有し、前記COINをセンス方向で有する対立遺伝子

を形成するように組み換わる、核酸構築物。

【請求項3】

リコンビナーゼ部位の前記第5の対が、前記第3のリコンビナーゼに対して暴露され、かつ前記第1のリコンビナーゼまたは前記第2のリコンビナーゼに対して暴露されないときに、前記第3のリコンビナーゼが前記COIN、前記NSI、および前記DSCを切り出し、そして前記動作配列をセンス方向で維持するように並べられている、請求項2に記載の核酸構築物。

【請求項4】

前記核酸構築物が1つの遺伝子に挿入される、請求項2に記載の核酸構築物であって、前記遺伝子の転写方向に関して5'から3'へ、前記核酸構築物が、センス方向の前記動作配列、センス方向またはアンチセンス方向の前記DSC、アンチセンス方向の前記NSI、およびアンチセンス方向の前記COINを含む、核酸構築物。

【請求項5】

前記DSCがセンス方向である、請求項4に記載の核酸構築物。

【請求項6】

前記核酸構築物が1つの遺伝子に挿入される、請求項2に記載の核酸構築物であって、前記遺伝子の転写方向に関して5'から3'へ、前記核酸構築物が、アンチセンス方向の前記COIN、アンチセンス方向の前記NSI、センス方向またはアンチセンス方向の前記DSC、およびセンス方向の前記動作配列を含む、核酸構築物。

【請求項7】

前記DSCがセンス方向である、請求項6に記載の核酸構築物。

【請求項8】

前記核酸構築物が1つの遺伝子に挿入される、請求項2に記載の核酸構築物であって、前記遺伝子の転写方向に関して5'から3'へ、前記核酸構築物が、アンチセンス方向の前記NSI、センス方向またはアンチセンス方向の前記DSC、センス方向の前記動作配列、およびアンチセンス方向の前記COINを含む、核酸構築物。

【請求項9】

前記DSCがセンス方向である、請求項8に記載の核酸構築物。

【請求項10】

前記核酸構築物が1つの遺伝子に挿入される、請求項2に記載の核酸構築物であって、前記遺伝子の転写方向に関して5'から3'へ、前記核酸構築物が、アンチセンス方向の前記COIN、アンチセンス方向の前記NSI、センス方向またはアンチセンス方向の前記DSC、およびセンス方向の前記動作配列を含む、核酸構築物。

【請求項11】

前記DSCがセンス方向である、請求項10に記載の核酸構築物。

【請求項12】

前記NSIが、

(a) 遺伝子の1つまたは複数の野生型エキソン；

(b) 1つ以上の核酸置換、欠失、または付加を有している、遺伝子の1つまたは複数のエキソン；

(c) 1つのエキソンと、隣接するイントロン配列；

(d) 1つの野生型エキソンと、隣接するイントロン配列；

(e) 1つ以上の核酸置換、欠失、または付加を有している、遺伝子の1つのエキソンと、隣接するイントロン配列；あるいは

(f) 1つのマウスエキソンに相同である1つのヒトエキソン

を含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか一項に記載の構築物を含有している哺乳動物細胞。

【請求項14】

請求項1～12のいずれか一項に記載の構築物を含有しているヒト以外の胚またはヒト以外の動物。

【請求項15】

核酸構築物を含む哺乳動物細胞であって、前記核酸構築物は、

(a) 細胞の核酸の標的遺伝子に対して前記核酸構築物を誘導するための標的化アーム；

(b) 前記標的遺伝子の転写に関してセンス方向の動作配列、および、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)、および、アンチセンス

方向の C O I N (反転による条件的エレメント) ; ならびに、

(d) 組み換え可能なユニットであって、

第 1 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第 1 の対および第 2 の対と

前記第 1 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の前記第 1 の対または前記第 2 の対に隣接した、前記動作配列、前記 D S C および前記 N S I を含む第 1 の組み換え可能なユニットと、

前記第 1 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の前記第 1 の対または前記第 2 の対に隣接した、前記 N S I を含む第 2 の組み換え可能なユニットと、

第 2 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第 3 の対および第 4 の対と、

第 3 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第 5 の対と、

を含み、ここで、前記第 1 のリコンビナーゼ、前記第 2 のリコンビナーゼ、および前記第 3 のリコンビナーゼは同じではない、組み換え可能なユニット ;

を含み、

前記組み換え可能なユニットは、第 1 のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記動作配列と前記 D S C を欠失し、かつ、前記 N S I をセンス方向で、前記 C O I N をアンチセンス方向で含む条件的対立遺伝子を形成するように組み換わり ; そして、

前記条件的対立遺伝子は、前記第 2 のリコンビナーゼに対してさらに暴露されると、前記 N S I を欠失し、前記 C O I N をセンス方向で有する対立遺伝子を形成するように組み換わる、哺乳動物細胞。

【請求項 16】

核酸構築物を含むヒト以外の胚またはヒト以外の動物であって、前記核酸構築物は、

(a) 細胞の核酸の標的遺伝子に対して前記核酸構築物を誘導するための標的化アーム ;

(b) 前記標的遺伝子の転写に関してセンス方向の動作配列、および、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 (D S C) ;

(c) アンチセンス方向の目的のヌクレオチド配列 (N S I)、および、アンチセンス方向の C O I N (反転による条件的エレメント) ; ならびに、

(d) 組み換え可能なユニットであって、

第 1 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第 1 の対および第 2 の対と

前記第 1 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の前記第 1 の対または前記第 2 の対に隣接した、前記動作配列、前記 D S C および前記 N S I を含む第 1 の組み換え可能なユニットと、

前記第 1 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の前記第 1 の対または前記第 2 の対に隣接した、前記 N S I を含む第 2 の組み換え可能なユニットと、

第 2 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第 3 の対および第 4 の対と、

第 3 のリコンビナーゼによって認識される類似するリコンビナーゼ認識部位の第 5 の対と、

を含み、ここで、前記第 1 のリコンビナーゼ、前記第 2 のリコンビナーゼ、および前記第 3 のリコンビナーゼは同じではない、組み換え可能なユニット ;

を含み、

前記組み換え可能なユニットは、第 1 のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記動作配列と前記 D S C を欠失し、かつ、前記 N S I をセンス方向で、前記 C O I N をアンチセンス方向で含む条件的対立遺伝子を形成するように組み換わり ; そして、

前記条件的対立遺伝子は、前記第2のリコンビナーゼに対してさらに暴露されると、前記NSIを欠失し、前記COINをセンス方向で有する対立遺伝子を形成するように組み換わる、ヒト以外の胚またはヒト以外の動物。

【請求項17】

核酸構築物を含む哺乳動物細胞であって、前記核酸構築物は、

薬剤選択カセット(DSC)、レポーター、COIN(反転による条件的エレメント)、目的のヌクレオチド配列(NSI)、ならびに前記レポーター、前記DSC、前記COIN、および前記NSIの間に並べられた、リコンビナーゼ部位の第1の対、第2の対、第3の対、第4の対、および第5の対を含み、

どのリコンビナーゼ部位の対も、任意の他の対とは同一ではなく、リコンビナーゼ部位の前記第1の対と前記第2の対は同じ第1のリコンビナーゼによって認識され、リコンビナーゼ部位の前記第3の対と前記第4の対は同じ第2のリコンビナーゼによって認識され、そしてリコンビナーゼ部位の前記第5の対は第3のリコンビナーゼによって認識され；

ここで、前記第1のリコンビナーゼ、前記第2のリコンビナーゼ、および前記第3のリコンビナーゼは同じではなく、転写方向に関して、前記レポーターはセンス方向であり、前記NSIはアンチセンス方向であり、前記COINはアンチセンス方向であり、そして前記DSCはセンス方向またはアンチセンス方向であり；

ここで、前記リコンビナーゼ部位は、(i)前記第1のリコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ部位の前記第1の対または前記第2の対に隣接した、前記レポーター、前記DSCおよび前記NSIを含む第1の組み換え可能なユニットと；(ii)前記第1のリコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ部位の前記第1の対または前記第2の対に隣接した、前記NSIを含む第2の組み換え可能なユニットと、を含む組み換え可能なユニットにおいて並べられ；そして、

ここで、リコンビナーゼ部位の前記第1の対、前記第2の対、前記第3の対、および前記第4の対は、前記第1のリコンビナーゼに対して暴露されると、条件的対立遺伝子が形成するように並べられており、ここで、リコンビナーゼ部位の前記第1の対と前記第2の対が前記レポーターの切り出し、前記DSCの切り出し、前記NSIのセンス方向への反転を誘導し、前記COINがアンチセンス方向で維持され、かつ(a)リコンビナーゼ部位の前記第3の対と前記第4の対が、前記第2のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記NSIが切り出され、前記COINがセンス方向で配置されるように並べられているか；または(b)リコンビナーゼ部位の前記第3の対と前記第4の対が、前記第2のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記NSIがアンチセンス方向で配置され、前記COINがセンス方向で配置されるように並べられているかのいずれかである、哺乳動物細胞。

【請求項18】

核酸構築物を含むヒト以外の胚またはヒト以外の動物であって、前記核酸構築物は、

薬剤選択カセット(DSC)、レポーター、COIN(反転による条件的エレメント)、目的のヌクレオチド配列(NSI)、ならびに前記レポーター、前記DSC、前記COIN、および前記NSIの間に並べられた、リコンビナーゼ部位の第1の対、第2の対、第3の対、第4の対、および第5の対を含み、

どのリコンビナーゼ部位の対も、任意の他の対とは同一ではなく、リコンビナーゼ部位の前記第1の対と前記第2の対は同じ第1のリコンビナーゼによって認識され、リコンビナーゼ部位の前記第3の対と前記第4の対は同じ第2のリコンビナーゼによって認識され、そしてリコンビナーゼ部位の前記第5の対は第3のリコンビナーゼによって認識され；

ここで、前記第1のリコンビナーゼ、前記第2のリコンビナーゼ、および前記第3のリコンビナーゼは同じではなく、転写方向に関して、前記レポーターはセンス方向であり、前記NSIはアンチセンス方向であり、前記COINはアンチセンス方向であり、そして前記DSCはセンス方向またはアンチセンス方向であり；

ここで、前記リコンビナーゼ部位は、(i) 前記第 1 のリコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ部位の前記第 1 の対または前記第 2 の対に隣接した、前記レポーター、前記 D S C および前記 N S I を含む第 1 の組み換え可能なユニットと；(i i) 前記第 1 のリコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ部位の前記第 1 の対または前記第 2 の対に隣接した、前記 N S I を含む第 2 の組み換え可能なユニットと、を含む組み換え可能なユニットにおいて並べられ；そして、

ここで、リコンビナーゼ部位の前記第 1 の対、前記第 2 の対、前記第 3 の対、および前記第 4 の対は、前記第 1 のリコンビナーゼに対して暴露されると、条件的対立遺伝子が形成するように並べられており、ここで、リコンビナーゼ部位の前記第 1 の対と前記第 2 の対が前記レポーターの切り出し、前記 D S C の切り出し、前記 N S I のセンス方向への反転を誘導し、前記 C O I N がアンチセンス方向で維持され、かつ (a) リコンビナーゼ部位の前記第 3 の対と前記第 4 の対が、前記第 2 のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記 N S I が切り出され、前記 C O I N がセンス方向で配置されるように並べられているか；または (b) リコンビナーゼ部位の前記第 3 の対と前記第 4 の対が、前記第 2 のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記 N S I がアンチセンス方向で配置され、前記 C O I N がセンス方向で配置されるように並べられているかのいずれかである、ヒト以外の胚またはヒト以外の動物。

【請求項 19】

マウス細胞またはラット細胞である、請求項 13、15 または 17 のいずれか一項に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 20】

幹細胞、胚性幹 (E S) 細胞、人工多能性細胞、多能性細胞、または全能細胞である、請求項 19 に記載の哺乳動物細胞。

【請求項 21】

マウスまたはラットである、請求項 14、16 または 18 のいずれか一項に記載のヒト以外の動物。

【請求項 22】

ヒト以外の細胞を修飾するための方法であって、前記方法は：

請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の核酸構築物で前記ヒト以外の細胞中の標的遺伝子を標的化して、標的化された細胞を形成させる工程、

前記標的化された細胞を前記第 1 のリコンビナーゼに対して暴露して、前記条件的対立遺伝子を形成させる工程、および

前記条件的対立遺伝子を、前記 N S I を切り出し、前記 C O I N をセンス方向で配置する第 2 のリコンビナーゼに対して暴露する工程
を包含する、方法。

【請求項 23】

ヒト以外の細胞を修飾するための方法であって、前記方法は：

請求項 2 に記載の核酸構築物で前記ヒト以外の細胞中の標的遺伝子を標的化して、標的化された細胞を形成させる工程、

前記標的化された細胞を前記第 1 のリコンビナーゼに対して暴露して、前記条件的対立遺伝子を形成させる工程、および

前記条件的対立遺伝子を、前記 N S I をアンチセンス方向で配置し、前記 C O I N をセンス方向で配置する第 2 のリコンビナーゼに対して暴露する工程
を包含する、方法。

【請求項 24】

ヒト以外の細胞を修飾するための方法であって、前記方法は：

薬剤選択カセット (D S C)、レポーター、C O I N (反転による条件的エレメント)、目的のヌクレオチド配列 (N S I)、ならびに前記レポーター、前記 D S C、前記 C O I N、および前記 N S I の間に並べられた、リコンビナーゼ部位の第 1 の対、第 2 の対、第 3 の対、第 4 の対、および第 5 の対

を含む核酸構築物で、前記ヒト以外の細胞中の標的遺伝子を標的化して、標的化された細胞を形成させる工程、

前記標的化された細胞を第1のリコンビナーゼに対して暴露して、前記動作配列と前記薬剤カセットを欠失し、かつ、前記目的のヌクレオチド配列をセンス方向で、前記COINをアンチセンス方向で含む条件的対立遺伝子を形成させる工程、および

前記条件的対立遺伝子を、前記目的のヌクレオチド配列を切り出し、前記COINをセンス方向で配置する第2のリコンビナーゼに対して暴露する工程、
を包含し、

どのリコンビナーゼ部位の対も、任意の他の対とは同一ではなく、リコンビナーゼ部位の前記第1の対と前記第2の対は同じ前記第1のリコンビナーゼによって認識され、リコンビナーゼ部位の前記第3の対と前記第4の対は同じ前記第2のリコンビナーゼによって認識され、そしてリコンビナーゼ部位の前記第5の対は第3のリコンビナーゼによって認識され；

ここで、前記第1のリコンビナーゼ、前記第2のリコンビナーゼ、および前記第3のリコンビナーゼは同じではなく、転写方向に関して、前記レポーターはセンス方向であり、前記NSIはアンチセンス方向であり、前記COINはアンチセンス方向であり、そして前記DSCはセンス方向またはアンチセンス方向であり；

ここで、前記リコンビナーゼ部位は、(i)前記第1のリコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ部位の前記第1の対または前記第2の対に隣接した、前記レポーター、前記DSCおよび前記NSIを含む第1の組み換え可能なユニットと；(ii)前記第1のリコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ部位の前記第1の対または前記第2の対に隣接した、前記NSIを含む第2の組み換え可能なユニットと、を含む組み換え可能なユニットにおいて並べられ；そして、

ここで、リコンビナーゼ部位の前記第1の対、前記第2の対、前記第3の対、および前記第4の対は、前記第1のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記条件的対立遺伝子が形成するように並べられており、ここで、リコンビナーゼ部位の前記第1の対と前記第2の対が前記レポーターの切り出し、前記DSCの切り出し、前記NSIのセンス方向への反転を誘導し、前記COINがアンチセンス方向で維持され、かつリコンビナーゼ部位の前記第3の対と前記第4の対が、前記第2のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記NSIが切り出され、前記COINがセンス方向で配置されるように並べられている、方法。

【請求項25】

ヒト以外の細胞を修飾するための方法であって、前記方法は：

薬剤選択カセット(DSC)、レポーター、COIN(反転による条件的エレメント)、目的のヌクレオチド配列(NSI)、ならびに前記レポーター、前記DSC、前記COIN、および前記NSIの間に並べられた、リコンビナーゼ部位の第1の対、第2の対、第3の対、第4の対、および第5の対

を含む核酸構築物で、前記ヒト以外の細胞中の標的遺伝子を標的化して、標的化された細胞を形成させる工程、

前記標的化された細胞を第1のリコンビナーゼに対して暴露して、前記レポーターと前記薬剤カセットを欠失し、かつ、前記目的のヌクレオチド配列をセンス方向で、前記COINをアンチセンス方向で含む条件的対立遺伝子を形成させる工程、および

前記条件的対立遺伝子を、前記目的のヌクレオチド配列をアンチセンス方向で配置し、前記COINをセンス方向で配置する第2のリコンビナーゼに対して暴露する工程、
を包含し、

どのリコンビナーゼ部位の対も、任意の他の対とは同一ではなく、リコンビナーゼ部位の前記第1の対と前記第2の対は同じ前記第1のリコンビナーゼによって認識され、リコンビナーゼ部位の前記第3の対と前記第4の対は同じ前記第2のリコンビナーゼによって認識され、そしてリコンビナーゼ部位の前記第5の対は第3のリコンビナーゼによって認識され；

ここで、前記第 1 のリコンビナーゼ、前記第 2 のリコンビナーゼ、および前記第 3 のリコンビナーゼは同じではなく、転写方向に関して、前記レポーターはセンス方向であり、前記 N S I はアンチセンス方向であり、前記 C O I N はアンチセンス方向であり、そして前記 D S C はセンス方向またはアンチセンス方向であり；

ここで、前記リコンビナーゼ部位は、(i) 前記第 1 のリコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ部位の前記第 1 の対または前記第 2 の対に隣接した、前記レポーター、前記 D S C および前記 N S I を含む第 1 の組み換え可能なユニットと；(i i) 前記第 1 のリコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ部位の前記第 1 の対または前記第 2 の対に隣接した、前記 N S I を含む第 2 の組み換え可能なユニットと、を含む組み換え可能なユニットにおいて並べられ；そして、

ここで、リコンビナーゼ部位の前記第 1 の対、前記第 2 の対、前記第 3 の対、および前記第 4 の対は、前記第 1 のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記条件的対立遺伝子が形成するように並べられており、ここで、リコンビナーゼ部位の前記第 1 の対と前記第 2 の対が前記レポーターの切り出し、前記 D S C の切り出し、前記 N S I のセンス方向への反転を誘導し、前記 C O I N がアンチセンス方向で維持され、かつリコンビナーゼ部位の前記第 3 の対と前記第 4 の対が、前記第 2 のリコンビナーゼに対して暴露されると、前記 N S I がアンチセンス方向で配置され、前記 C O I N がセンス方向で配置されるように並べられている、方法。

【請求項 2 6】

前記標的遺伝子が、1 つの表現型と関係がある 1 つのエキソンまたは 1 つのヌクレオチド配列を含む、請求項 2 2 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記標的遺伝子が前記核酸構築物により置き換えられる、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記標的化された細胞が形成された後であるが、前記第 1 のリコンビナーゼに対して暴露させる前に、前記表現型が最初に決定される、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記第 1 のリコンビナーゼに対して暴露した後に、前記表現型が 2 回目に決定される、請求項 2 8 に記載の方法。