

【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30年6月28日(2018.6.28)

【公表番号】特表2017-520243(P2017-520243A)

【公表日】平成29年7月27日(2017.7.27)

【年通号数】公開・登録公報2017-028

【出願番号】特願2016-571271(P2016-571271)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成30年5月18日(2018.5.18)

【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】

細胞内の標的遺伝子座の連続的修飾方法であって、

(a) 前記標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程であって、前記標的遺伝子座が、(1)第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカーをコードする核酸、および(2)第1ヌクレアーゼ剤のための第1認識部位を含む第1選択カセットを含み、前記第1ヌクレアーゼ認識部位は、前記第1選択マーカーのコード領域又は前記第1選択マーカーのいずれかの非タンパク質コード領域に位置する、工程と、

(b) 前記細胞に、

(i) 前記第1ヌクレアーゼ剤であって、前記第1認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、前記第1選択マーカーの発現又は活性を損なわせる、第1ヌクレアーゼ剤と、

(ii) 前記標的遺伝子座に位置する第1標的部位に対応する第1ホモロジーアームおよび前記標的遺伝子座に位置する第2標的部位に対応する第2ホモロジーアームに隣接する第1挿入ポリヌクレオチドを含む第1ターゲッティングベクターであって、前記第1挿入ポリヌクレオチドは、(1)第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカーをコードする核酸であって、前記第1選択マーカーと前記第2選択マーカーが異なる核酸、および(2)第2ヌクレアーゼ剤のための第2ヌクレアーゼ認識部位を含む第2選択カセットを含み、前記第2ヌクレアーゼ認識部位は、前記第2選択マーカーのコード領域又は前記第2選択マーカーのいずれかの非タンパク質コード領域に位置する、第1ターゲッティングベクターと、

を導入する工程と、

(c) 前記第1標的遺伝子座に前記第1挿入ポリヌクレオチドを含む修飾された細胞を同定する工程であって、前記修飾された細胞は、前記第2選択マーカーの活性を有するが、前記第1選択マーカーの活性を有しない、工程と、

(d) 前記修飾された細胞に、

(i) 前記第2ヌクレアーゼ剤であって、前記第2認識部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、前記第2選択マーカーの発現又は活性を損なわせる、第2ヌクレアーゼ剤と、

(ii) 前記標的遺伝子座に位置する第3標的部位に対応する第3ホモロジーアーム

および前記標的遺伝子座に位置する第4標的部位に対応する第4ホモロジーアームに隣接する第2挿入ポリヌクレオチドを含む第2ターゲッティングベクターであって、前記第2挿入ポリヌクレオチドは、(1)第3選択マーカーをコードする核酸であって、前記第1選択マーカーと前記第3選択マーカーが同一である、核酸、および(2)第3ヌクレアーゼ剤のための第3ヌクレアーゼ認識部位を含む第3選択カセットを含み、前記第3ヌクレアーゼ認識部位は、前記第1ヌクレアーゼ認識部位と同一である、第2ターゲッティングベクターと、

を導入する工程と、

(e) 前記標的遺伝子座に組み込まれた前記第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定する工程と、

を含む、方法。

【請求項2】

(I) 前記同定する工程(c)が、

(i) 前記第1選択マーカーの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で前記細胞を培養すること、又は

(ii) 前記第1及び第2標的部位に組み込まれた前記第1挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定すること、を含む、かつ/又は

(II) 前記同定する工程(e)が、

(i) 前記第2選択マーカーの活性を有さない細胞の同定を可能にする条件下で前記細胞を培養すること、又は

(ii) 前記第3及び第4標的部位に組み込まれた前記第2挿入ポリヌクレオチドを含む少なくとも1つの細胞を同定すること、を含む、

請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記同定する工程(c)が対立遺伝子の修飾(MOA)アッセイを経て実施される、かつ/又は前記同定する工程(e)がMOAアッセイを経て実施される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

工程(c)の前記修飾された細胞における前記選択カセットが、前記第3標的部位及び前記第4標的部位に隣接している、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記第1、前記第2又は前記第3選択マーカーが、抗生物質耐性を付与し、任意選択で、前記抗生物質が、G418、ハイグロマイシン、プラスチシジン、ネオマイシン又はビューロマイシンを含み、

任意選択で、前記第1および前記第3選択マーカーがネオマイシン耐性を付与し、かつ前記第2選択マーカーがハイグロマイシン耐性を付与するか、又は前記第1および前記第3選択マーカーがハイグロマイシン耐性を付与し、かつ前記第2選択マーカーがネオグロマイシン耐性を付与する、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記第1、前記第2又は前記第3選択マーカーが、誘導性プロモーターに作動可能に連結され、前記選択マーカーの発現が、前記細胞に対して毒性であり、

任意選択で、前記第1、前記第2又は前記第3選択マーカーが、ヒポキサンチングアニンホスホリボシリルトランスフェラーゼ(HGprt)又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(Hsv-Tk)を含む、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記第1ヌクレアーゼ剤と前記第1ターゲッティングベクターとの併用により、前記第1ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、ターゲッティング効率の向上をもたらし、

任意選択で、前記第1ターゲッティングベクターの前記ターゲッティング効率が、前記第1ターゲッティングベクター単独での使用と比較して、少なくとも2倍向上している、

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 ヌクレアーゼ剤、前記第 2 ヌクレアーゼ剤又は前記第 3 ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ剤をコードする核酸配列を含む発現コンストラクトを含み、前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記核酸配列が、前記細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結されているか、又は前記第 1 ヌクレアーゼ剤、前記第 2 ヌクレアーゼ剤又は前記第 3 ヌクレアーゼ剤が、前記ヌクレアーゼ剤をコードする mRNA を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 1 ヌクレアーゼ剤、前記第 2 ヌクレアーゼ剤又は前記第 3 ヌクレアーゼ剤が、
(a) ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、
(b) 転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、
(c) メガヌクレアーゼ、又は
(d) クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列 (CRISPR) - 関連 (Cas) タンパク質及びガイド RNA (gRNA) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1 ヌクレアーゼ剤、前記第 2 ヌクレアーゼ剤又は前記第 3 ヌクレアーゼ剤が、前記ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) であり、前記第 1 ヌクレアーゼ認識部位、前記第 2 ヌクレアーゼ認識部位又は前記第 3 ヌクレアーゼ認識部位が、配列番号 9 ~ 12 のいずれか 1 つを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 ヌクレアーゼ剤、前記第 2 ヌクレアーゼ剤又は前記第 3 ヌクレアーゼ剤が、前記 Cas タンパク質及び前記ガイド RNA であり、前記 Cas タンパク質が、Cas 9 であり、前記 gRNA が、

(a) プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列に直接隣接している前記第 1、前記第 2 又は前記第 3 認識部位を標的とする、クラスター化され等間隔にスペーサーが入った短い回文型の反復配列 (CRISPR) RNA (crRNA) と、
(b) トランス活性化 CRISPR RNA (tracrRNA) と、を含み、
任意選択で、前記標的遺伝子座が、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、
請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 gRNA が、配列番号 13 ~ 20 のいずれか 1 つを含む、請求項 11 に記載の方法。

。

【請求項 13】

前記 gRNA が、配列番号 2、3、4、5、6、7 又は 8 のいずれか 1 つを含み、
任意選択で、前記ガイド RNA が、配列番号 3 又は 7 を含む、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 1 ヌクレアーゼ認識部位が、前記第 1 選択マーカーのイントロン、エキソン、プロモーター、プロモーター調節領域又はエンハンサー領域に位置しており、前記第 2 ヌクレアーゼ認識部位が、前記第 2 選択マーカーのイントロン、エキソン、プロモーター、プロモーター調節領域又はエンハンサー領域に位置している、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 1 ヌクレアーゼ剤が、前記第 2 ヌクレアーゼ剤と異なる、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 1 選択マーカーがネオマイシン耐性を付与し、前記第 1 ヌクレアーゼ剤がジンク

フィンガーヌクレアーゼであり、かつ前記第1ヌクレアーゼ認識部位が配列番号9又は10を含み、前記第2選択マーカーがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第2ヌクレアーゼ剤がジンクフィンガーヌクレアーゼであり、かつ前記第2ヌクレアーゼ認識部位が配列番号11又は12を含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記第1選択マーカーがネオマイシン耐性を付与し、前記第1ヌクレアーゼ剤がCas9タンパク質および配列番号13～16のいずれか1つを含むガイドRNAであり、前記第2選択マーカーがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第2ヌクレアーゼ剤がCas9タンパク質および配列番号17～20のいずれか1つを含むガイドRNAであり、

任意選択で、前記第1選択マーカーがネオマイシン耐性を付与し、前記第1ヌクレアーゼ剤が前記Cas9タンパク質および配列番号13を含む前記ガイドRNAであり、前記第2選択マーカーがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第2ヌクレアーゼ剤が前記Cas9タンパク質および配列番号17を含む前記ガイドRNAである、請求項15に記載の方法。

【請求項18】

前記第1ヌクレアーゼ認識部位及び前記第3ヌクレアーゼ認識部位が、互いに同一であり、かつ前記第2ヌクレアーゼ認識部位と異なり、前記第1ヌクレアーゼ剤及び前記第3ヌクレアーゼ剤が、互いに同一であり、かつ前記第2ヌクレアーゼ剤と異なる、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記第1選択マーカーがネオマイシン耐性を付与し、前記第1ヌクレアーゼ剤がジンクフィンガーヌクレアーゼであり、かつ前記第1ヌクレアーゼ認識部位が配列番号9又は10を含み、前記第2選択マーカーがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第2ヌクレアーゼ剤がジンクフィンガーヌクレアーゼであり、かつ前記第2ヌクレアーゼ認識部位が配列番号11又は12を含み、前記第3選択マーカーがネオマイシン耐性を付与し、前記第3ヌクレアーゼ剤がジンクフィンガーヌクレアーゼであり、かつ前記第3ヌクレアーゼ認識部位が配列番号9又は10を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

前記第1選択マーカーがネオマイシン耐性を付与し、前記第1ヌクレアーゼ剤がCas9タンパク質および配列番号13～16のいずれか1つを含むガイドRNAであり、前記第2選択マーカーがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第2ヌクレアーゼ剤がCas9タンパク質および配列番号17～20のいずれか1つを含むガイドRNAであり、前記第3選択マーカーがネオマイシン耐性を付与し、前記第3ヌクレアーゼ剤がCas9タンパク質および配列番号13～16のいずれか1つを含むガイドRNAであり、

任意選択で、前記第1選択マーカーがネオマイシン耐性を付与し、前記第1ヌクレアーゼ剤が前記Cas9タンパク質および配列番号13を含む前記ガイドRNAであり、前記第2選択マーカーがハイグロマイシン耐性を付与し、前記第2ヌクレアーゼ剤が前記Cas9タンパク質および配列番号17を含む前記ガイドRNAであり、前記第3選択マーカーがネオマイシン耐性を付与し、前記第3ヌクレアーゼ剤が前記Cas9タンパク質および配列番号13を含む前記ガイドRNAである、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

(a) 前記第1標的部位及び前記第2標的部位が、前記第1ヌクレアーゼ認識部位に直接隣接している、

(b) 前記第1標的部位及び前記第2標的部位が、前記第1ヌクレアーゼ認識部位から約10ヌクレオチド～約14kbに位置しているか、

(c) 前記第3標的部位及び前記第4標的部位が、前記第2ヌクレアーゼ認識部位に直接隣接しているか、又は

(d) 前記第3標的部位及び前記第4標的部位が、前記第2ヌクレアーゼ認識部位から約10ヌクレオチド～約14kbに位置している、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

(a) 前記第 1 ホモロジーアームと前記第 2 ホモロジーアームの合計が、少なくとも約 10 kb であり、かつ / 又は前記第 3 ホモロジーアームと前記第 4 ホモロジーアームの合計が、少なくとも約 10 kb である、かつ / 又は

(b) 前記第 1 挿入ポリヌクレオチドが、約 5 kb ~ 約 300 kb の長さの範囲であり、かつ / 又は前記第 2 挿入ポリヌクレオチドが、約 5 kb ~ 約 300 kb の長さの範囲である、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記第 1 挿入ポリヌクレオチドが目的の第 1 ポリヌクレオチドを更に含む、かつ / 又は前記第 2 挿入ポリヌクレオチドが目的の第 2 ポリヌクレオチドを含み、

任意選択で、前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び / 又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、ヒトポリヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び / 又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、T 細胞受容体の領域をコードするポリヌクレオチドを含み、

任意選択で、前記 T 細胞受容体が T 細胞受容体 であり、

任意選択で、前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び / 又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、前記 T 細胞受容体 遺伝子座の少なくとも 1 つの可変領域遺伝子セグメント及び / 又は連結領域遺伝子セグメントを含む、

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び / 又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含み、

任意選択で、前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び / 又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に作動可能に連結された、再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の核酸配列を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び / 又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするゲノム核酸配列を含み、

任意選択で、前記ゲノム核酸配列が、再構成されていないヒト 及び / 又は 軽鎖可変領域の核酸配列を含むか、又は前記ゲノム核酸配列が、再構成されたヒト 及び / 又は 軽鎖可変領域の核酸配列を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記目的の第 1 ポリヌクレオチド及び / 又は前記目的の第 2 ポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの疾患対立遺伝子を含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

(I) 前記第 1 挿入ポリヌクレオチドが、

(i) 前記細胞のゲノム内の核酸配列に相同若しくはオルソロガスな核酸配列を含む目的の第 1 ポリヌクレオチド、又は

(i i) 外来の核酸配列を含む目的の第 1 ポリヌクレオチド、を含む、かつ / 又は

(I I) 前記第 2 挿入ポリヌクレオチドが、

(i) 前記細胞のゲノム内の核酸配列に相同若しくはオルソロガスな目的の第 2 ポリヌクレオチド、又は

(i i) 外来の核酸配列を含む目的の第 2 ポリヌクレオチド、を含む、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

(I) 前記第 1 挿入ポリヌクレオチドの前記標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はその組み合わせをもたらし、かつ / 又は

(II) 前記第2挿入ポリヌクレオチドの前記標的遺伝子座への組み込みにより、ノックアウト、ノックイン、点変異、ドメインスワップ、エキソンスワップ、イントロンスワップ、調節配列スワップ、遺伝子スワップ又はその組み合わせをもたらす、請求項1~28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記標的遺伝子座が、前記細胞のゲノム中に存在しているか、又は前記細胞内のベクターに位置している、請求項1~29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

前記標的遺伝子座が、免疫グロブリン遺伝子座を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記標的ゲノム遺伝子座が、T細胞受容体遺伝子座を含み、任意選択で、前記T細胞受容体遺伝子座がT細胞受容体遺伝子座である、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

前記細胞が真核生物細胞であり、任意選択で、前記細胞が哺乳動物細胞であり、任意選択で、前記細胞が、

(a) 非ヒト哺乳動物細胞、

(b) 多能性細胞、

(c) ヒト人工多能性幹細胞、

(d) ヒト線維芽細胞、

(e) 非ヒト胚性幹(ES)細胞、

(f) マウス胚性幹(ES)細胞又はラット胚性幹(ES)細胞、

(g) 造血幹細胞、又は

(h) 神経幹細胞、

(i) 齧歯動物細胞である、請求項1~32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

前記細胞が、前記マウスES細胞又は前記ラットES細胞である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

(f) 前桑実胚期の非ヒト動物の宿主胚に工程(c)で作製された細胞を導入して、修飾された宿主胚を作製する工程、及び

(g) 前記修飾された宿主胚を仮親に移植して、工程(e)で作製された細胞に由来するF0世代を作製する工程、を更に含む、請求項34に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0210

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0210】

他の非限定的な実施形態には、以下のものが含まれる。

1. 細胞内の目的の標的遺伝子座の修飾方法であって、(a) 第1プロモーターに作動可能に連結された第1選択マーカーをコードする核酸を含む第1標的遺伝子座を含む細胞を提供する工程と、(b) 細胞に、(i) Casタンパク質と第1ガイドRNA(gRNA)をコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、各々が、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結され、Casタンパク質が第1核酸中の第1gRNA標的部位でのニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第1選択マーカーの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii) 第2プロモーターに作動可能に連結された第2選択マーカーをコードする第2核酸を含む第1挿入核酸を含む第1ターゲ

ツティングベクターであって、第1挿入核酸が、第1標的遺伝子座に位置する第1及び第2標的部位に対応する第1及び第2ホモロジーアームに隣接している、第1ターゲッティングベクターと、を導入する工程と、(c)第1標的遺伝子座に第1挿入核酸を含む修飾された細胞を同定する工程であって、修飾された細胞は、第2選択マーカーの活性を有するが、第1選択マーカーの活性を有さず、第1及び第2選択マーカーが異なる、工程と、を含む、方法。

2. 第1gRNAが、第1挿入核酸とハイブリダイズしない、実施形態1に記載の方法。

3. 目的の標的遺伝子座が、細胞のゲノム中に位置している、実施形態1に記載の方法。

4. 目的の標的遺伝子座が、細胞内のベクターに位置している、実施形態1に記載の方法。

5. 同定する工程(c)が、第2選択マーカーの活性を有するが、第1選択マーカーの活性を有さない、修飾された細胞の同定を可能にする条件下で細胞を培養することを含む、実施形態1に記載の方法。

6. (d)第1標的遺伝子座で第1挿入核酸を含む修飾された細胞に、(i)Casタンパク質及び第2gRNAをコードする1つ以上の核酸であって、各々が修飾された細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結し、Casタンパク質が、第2核酸を含む第1挿入核酸内の第2gRNA標的部位でのニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第2選択マーカーの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の核酸と、(ii)第3プロモーターに作動可能に連結された第3選択マーカーをコードする第3核酸を含む第2挿入核酸を含む第2ターゲッティングベクターであって、第2挿入核酸が、第2標的遺伝子座に位置する第3及び第4標的部位に対応する第3及び第4ホモロジーアームに隣接している、第2ターゲッティングベクターと、を導入する工程と、(e)第2標的遺伝子座内に第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞を同定する工程であって、第2の修飾された細胞が、第3選択マーカーの活性を有するが、第2選択マーカーの活性を有さず、第2及び第3選択マーカーが異なる工程と、を更に含む、実施形態1に記載の方法。

7. 第1及び第2標的遺伝子座が、各々に隣接して位置している、実施形態6に記載の方法。

8. 第1又は第2標的遺伝子座が、第1又は第2gRNA標的部位から10ヌクレオチド～約14kbに位置している、実施形態6に記載の方法。

9. 第2gRNAが、第2挿入核酸とハイブリダイズしない、実施形態8に記載の方法。

10. 同定する工程(e)が、第3選択マーカーの活性を有するが、第2選択マーカーの活性を有さない第2の修飾された細胞の同定を可能にする条件下で、修飾された細胞を培養することを含む、実施形態6に記載の方法。

11. (f)第2標的遺伝子座に第2挿入核酸を含む第2の修飾された細胞に、(i)第2の修飾された細胞内で活性なプロモーターと各々作動可能に連結されたCasタンパク質及び第3gRNAをコードする1つ以上の発現コンストラクトであって、Casタンパク質が第3核酸を含む第2挿入核酸で第3gRNA標的部位でニック又は二本鎖切断を誘導することにより、第3選択マーカーの発現又は活性を損なわせる、1つ以上の発現コンストラクトと、(ii)第4プロモーターに作動可能に連結された第4選択マーカーをコードする第4核酸を含む第3挿入核酸を含む第3ターゲッティングベクターであって、第3挿入核酸が、第3標的遺伝子座に位置する第5及び第6標的部位に対応する第5及び第6ホモロジーアームに隣接している、第3ターゲッティングベクターと、を導入する工程と、(g)第3標的遺伝子座に第3挿入核酸を含む第3の修飾された細胞を同定する工程であって、第3の修飾された細胞が第4選択マーカーの活性を有するが、第3選択マーカーの活性を有さず、第3及び第4選択マーカーが異なる、工程と、を含む。

12. 第2及び第3標的遺伝子座が、各々直接隣接して位置している、実施形態11に記載の方法。

13. 第2又は第3標的遺伝子座が、第1又は第2 gRNA 標的部位から 10ヌクレオチド～約14kbに位置している、実施形態11に記載の方法。

14. 第1、第2、第3又は第4マーカーが、抗生物質耐性を付与する、実施形態1～13のいずれか1つに記載の方法。

15. 抗生物質が、G418、ハイグロマイシン、プラスチシン、ネオマイシン又はピューロマイシンを含む、実施形態14に記載の方法。

16. 第1、第2、第3又は第4選択マーカーが、ヒポキサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGprt)又は単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(Hsv-Tk)を含む、実施形態1～13のいずれか1つに記載の方法。

17. 第1、第2又は第3 gRNAが、(i)第1、第2又は第3 gRNA 標的部位とハイブリダイズするヌクレオチド配列と、(ii)トランスクレッセイション活性化CRISPR RNA(tracrRNA)と、を含む、実施形態1、6又は11に記載の方法。

18. 第1、第2又は第3標的遺伝子座が、第1、第2又は第3 gRNA 標的部位の近傍に位置し、gRNA 標的部位のニック又は二本鎖切断が、標的遺伝子座でのターゲッティングベクターの相同組換えを促進する、実施形態1、6又は11に記載の方法。

19. Casタンパク質が、Cas9である、実施形態1、6又は11に記載の方法。

20. 第1、第2又は第3 gRNA 標的部位が、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に直接隣接している、実施形態19に記載の方法。

21. 細胞が、原核細胞である、実施形態1、6又は11に記載の方法。

22. 細胞が、真核生物細胞である、実施形態1、6及び11のいずれか1つに記載の方法。

23. 真核生物細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態22に記載の方法。

24. 哺乳動物細胞が、線維芽細胞である、実施形態23に記載の方法。

25. 哺乳動物細胞が、非ヒト哺乳動物細胞である、実施形態23に記載の方法。

26. 哺乳動物細胞が、齧歯動物由来である、実施形態23に記載の方法。

27. 齧歯動物が、ラット、マウス又はハムスターである、実施形態26に記載の方法。

。

28. 真核生物細胞が、多能性細胞である、実施形態22に記載の方法。

29. 多能性細胞が、造血幹細胞又は神経幹細胞である、実施形態28に記載の方法。

30. 多能性細胞が、ヒト人工多能性幹(iPS)細胞である、実施形態28に記載の方法。

31. 多能性細胞が、マウス胚性幹(ES)細胞又はラット胚性幹(ES)細胞である、実施形態28に記載の方法。

32. 第1、第2又は第3 gRNA 標的部位が、第1、第2又は第3選択マーカーをコードする第1、第2又は第3核酸のイントロン、エキソン、プロモーター又はプロモーター調節領域に位置している、実施形態1、6及び11のいずれか1つに記載の方法。

33. 第1、第2又は第3ターゲッティングベクターが、少なくとも約10kbである、実施形態1、6又は11に記載の方法。

34. 第1、第2又は第3挿入核酸が、約5kb～約300kbの範囲である、実施形態1、6又は11に記載の方法。

35. 第1、第2又は第3挿入核酸が、ヒトT細胞受容体 遺伝子座のゲノム領域を含む、実施形態1、6又は11に記載の方法。

36. ゲノム領域が、ヒトT細胞受容体 遺伝子座の少なくとも1つの可変領域遺伝子セグメント及び/又は連結領域遺伝子セグメントを含む、請求項35に記載の方法。

37. 第1及び第3選択マーカーが同じである、実施形態6に記載の方法。

38. 第1及び第3選択マーカーが同じであり、第2及び第4選択マーカーが同じである、実施形態11に記載の方法。

39. 第1及び第3 gRNAが同じである、実施形態38に記載の方法。

40. gRNAがハイグロマイシン又はネオマイシン抵抗性遺伝子に特有である実施形態1、6、37、38又は39に記載の方法。

41. ネオマイシン抵抗性遺伝子に特異的な gRNA が、配列番号 13、14、15 又は 16 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、実施形態 40 に記載の方法。

42. ハイグロマイシン抵抗性遺伝子に特異的な gRNA が、配列番号 17、18、19 又は 20 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、実施形態 40 に記載の方法。

43. a) 第 1 gRNA が、配列番号 13、14、15 又は 16 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされ、第 2 gRNA が、配列番号 17、18、19 又は 20 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされるか、又は b) 第 1 gRNA が、配列番号 17、18、19 又は 20 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされ、第 2 gRNA が、配列番号 13、14、15 又は 16 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によりコード化される、実施形態 6、37、38 又は 39 に記載の方法。