

【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26年5月8日 (2014.5.8)

【公表番号】特表2013-523180(P2013-523180A)

【公表日】平成25年6月17日 (2013.6.17)

【年通号数】公開・登録公報2013-031

【出願番号】特願2013-505077(P2013-505077)

【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 Z N A A

C 1 2 N 5/00 1 0 2

【手続補正書】

【提出日】平成26年3月20日 (2014.3.20)

【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】

少なくとも一つの異種タンパク質の発現が内因性調節系により調節されるように、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列を細胞の染色体内にインテグレートする方法であって、該方法が：

a) (i) 少なくとも一つの標的エンドヌクレアーゼあるいは標的エンドヌクレアーゼをコードする核酸、該標的エンドヌクレアーゼは標的配列に結合することができ、かつ内因性タンパク質をコードする標的とされる染色体配列における切断部位を切断することができるものである；および (ii) 異種タンパク質コード配列を形成するために 2 A ペプチドをコードする配列に連結される、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列を含み、該異種タンパク質コード配列が切断部位の両側と実質的な配列同一性を有する上流配列および下流配列に挟まれるものである、少なくとも一つのドナーポリヌクレオチドを、細胞内に導入すること；および

b) 標的エンドヌクレアーゼにより標的とされる染色体配列内に導入された二本鎖切断が、該ドナーポリヌクレオチドにおける異種タンパク質コード配列が、標的とされる染色体配列内にインフレームでインテグレートされ、それにより少なくとも一つの異種タンパク質の発現が、内因性タンパク質の発現を調節する内因性調節系により調節されるように、相同性指向修復過程により修復されるような条件下で、細胞を維持すること、を含む方法。

【請求項 2】

標的エンドヌクレアーゼがジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

2 A ペプチドをコードする配列が異種タンパク質をコードする配列に 5 ' または 3 ' で連結される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

異種タンパク質コード配列が、標的とされる染色体配列のタンパク質コード配列の開始付近または終止付近にインテグレートされる、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

少なくとも一つの異種タンパク質が抗体の重鎖または軽鎖である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

細胞がヒト細胞またはほ乳類細胞である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

標的とされる染色体配列が、アクチン、チューブリン、またはラミンタンパク質をコードする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

標的エンドヌクレアーゼが、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、および 8 から選択される配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列に結合するジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

配列同一性が 85 %、90 %、95 %、99 %、または 100 % である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

細胞がチャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞であり、標的とされる染色体配列がアクチンタンパク質をコードし、かつジンクフィンガーヌクレアーゼが配列番号 7 および配列番号 8 から選択される配列に結合する、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 11】**

少なくとも一つの異種タンパク質をコードする、染色体にインテグレートされた配列を含み、少なくとも一つの異種タンパク質をコードする配列が、少なくとも一つの異種タンパク質の発現が内因性タンパク質の発現と協調的に制御されるように、内因性タンパク質をコードする染色体配列とインフレイムでインテグレートされるものである、細胞。

**【請求項 12】**

内因性タンパク質および異種タンパク質のそれぞれが個別の構成要素として生成される、請求項 11 に記載の細胞。

**【請求項 13】**

少なくとも一つの異種タンパク質の発現を調節するために、内因性調節系を使用するための方法であって、該方法が：

(a) 2 A ペプチドをコードする配列に連結された少なくとも一つの異種タンパク質をコードする、染色体にインテグレートされた配列を含み、異種タンパク質および 2 A ペプチドをコードする配列が内因性タンパク質をコードする染色体配列とインフレイムでインテグレートされるものである、細胞を提供すること；および

(b) 内因性調節系の活性化が、異種タンパク質、2 A ペプチド、および内因性タンパク質をコードする 1 つの転写産物を生成し、ここに 2 A ペプチドが、異種タンパク質および内因性タンパク質のそれぞれが個別の構成要素として生産されるように翻訳を分断させるものであるような条件下で、細胞を維持すること、を含む方法。

**【請求項 14】**

染色体配列が、アクチン、チューブリン、またはラミンタンパク質をコードする、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

細胞がチャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞であり、染色体配列がアクチンタンパク質をコードし、かつ異種タンパク質が抗体の重鎖または軽鎖である、請求項 13 に記載の方法。