(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-541074
(P2024-541074A)
(43)公表日　令和6年11月6日(2024.11.6)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 15/09 (2006.01)		C12N	15/09	ZZNA　4B065
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13	4C084
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12	4C087
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	

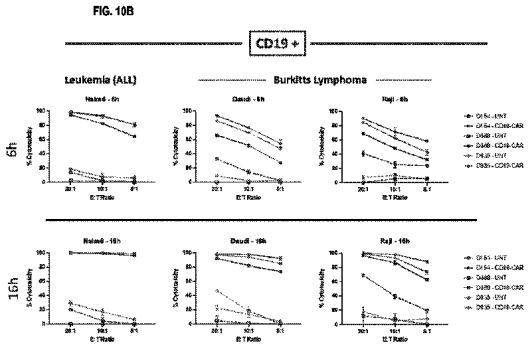
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全153頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-526939(P2024-526939)
(86)(22)出願日　令和4年11月4日(2022.11.4)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月7日(2024.6.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/079288
(87)国際公開番号　WO2023/081811
(87)国際公開日　令和5年5月11日(2023.5.11)
(31)優先権主張番号　63/275,777
(32)優先日　令和3年11月4日(2021.11.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　522418635
サリオジェン セラピューティクス インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１， レキシントン， マグワイアロード １０， ビルディング １， スイート ２００
(74)代理人　110001519
弁理士法人太陽国際特許事務所
(72)発明者　ヒギンズ、ジョセフ、ジェイ.
アメリカ合衆国 ０２１４２ マサチューセッツ ケンブリッジ、ファースト ストリート、２４５ １８階 サリオジェン セラピューティクス インコーポレイテッド 内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　キメラ抗原受容体またはキメラ自己抗体受容体を有する免疫細胞

(57)【要約】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）免疫細胞またはキメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）免疫細胞を、例えば、標的ゲノム統合を実行することができる酵素を用いて作製する方法が提供される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、
対象から得られたサンプルから免疫細胞を得ることであって、前記サンプルが、免疫細胞または免疫細胞前駆体を含む、前記得ることと、
前記免疫細胞を、
標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、任意選択的に、前記第１の核酸が、ＲＮＡである、前記第１の核酸、及び
キメラＣＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる前記酵素によって認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸、
でトランスフェクトし、それによって、トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞を作製することと、を含み、
前記免疫細胞が、Ｔ細胞、マクロファージ、及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞から選択される、前記方法。
【請求項２】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、
対象に、
標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、前記第１の核酸が、ＲＮＡである、前記第１の核酸、及び
キメラＣＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる前記酵素によって認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸、
を投与することを含み、前記投与が、前記第１の核酸及び前記第２の核酸を免疫細胞に指向することができる脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を使用し、それによって、前記ＣＡＲ免疫細胞を作製し、
前記免疫細胞が、Ｔ細胞、マクロファージ、及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞から選択される、前記方法。
【請求項３】
前記免疫細胞が、Ｔ細胞である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞が、ＣＡＲ－Ｔ細胞であり、任意選択的に、同種ＣＡＲ－Ｔ細胞または同種ＣＡＲ－Ｔ細胞から選択される、請求項１または２に記載の方法。
【請求項５】
前記免疫細胞が、マクロファージである、請求項１または２に記載の方法。
【請求項６】
前記トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞が、ＣＡＲ－Ｍ細胞であり、任意選択的に、同種ＣＡＲ－Ｍ細胞または同種ＣＡＲ－Ｍ細胞から選択される、請求項１または２に記載の方法。
【請求項７】
前記免疫細胞が、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項８】
前記トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞が、ＣＡＲ－ＮＫ細胞であり、任意選択的に、同種ＣＡＲ－ＮＫ細胞または同種ＣＡＲ－ＮＫ細胞から選択される、請求項１または２に記載の方法。
【請求項９】
キメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、
対象から得られたサンプルから細胞を得ることであって、前記サンプルが、Ｔ細胞またはＴ細胞前駆体を含む、前記得ることと、
前記細胞を、

標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、前記第１の核酸が、ＲＮＡである、前記第１の核酸、及び
自己抗原またはその断片を含むキメラＣＡＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる前記酵素によって認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸でトランスフェクトし、それによって、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞を作製することと、を含み、
前記免疫細胞が、Ｔ細胞、マクロファージ、及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞から選択される、前記方法。
【請求項１０】
キメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、
対象における皮膚細胞に、
標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、前記第１の核酸が、ＲＮＡである、前記第１の核酸、及び
自己抗原またはその断片を含むキメラＣＡＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる前記酵素によって認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸
を投与することを含み、前記投与が、皮内または皮下送達を介し、かつ前記第１の核酸及び前記第２の核酸を免疫細胞に指向することができる脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を使用して実行され、それによって、ＣＡＲ免疫細胞を作製し、
前記免疫細胞が、Ｔ細胞、マクロファージ、及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞から選択される、前記方法。
【請求項１１】
前記皮膚細胞が、表皮または真皮の皮膚細胞である、請求項２～８または１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記方法が、前記トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞を、前記ＣＡＲ免疫細胞の増殖を選択的に増強する培地中で培養することを含む、請求項１または３～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記ＣＡＲ免疫細胞または前記ＣＡＡＲ免疫細胞が、約１日または約２日で作製される、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記ＣＡＲ免疫細胞または前記ＣＡＡＲ免疫細胞が、約２日未満、または約３日未満、または約７日未満、または約１４日未満で作製される、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記Ｔ細胞が、一次Ｔ細胞を含む、請求項１～４または９～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記方法が、前記ＣＡＲ免疫細胞または前記ＣＡＡＲ免疫細胞のエクスビボでの拡大の使用を排除する、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記サンプルが、血液、リンパ、及び骨髄穿刺液（ＢＭ）から選択される、請求項１、３～９、または１１～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
前記方法が、前記トランスフェクションまたは前記投与前に前記細胞を活性化することを含み、前記活性化が、任意選択的に、前記細胞を抗ＣＤ３抗体またはそのＣＤ３結合断片と接触させることを含む、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
前記方法が、前記トランスフェクションまたは前記投与前に前記細胞を刺激して、細胞

の集団を作製することを含み、前記刺激が、任意選択的に、前記細胞を、抗ＣＤ２８抗体もしくはそのＣＤ２８結合断片、Ｂ７－１もしくはそのＣＤ２８結合断片、またはＢ７－２もしくはそのＣＤ２８結合断片と接触させることを含む、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２０】

前記細胞が、電気穿孔法、ヌクレオフェクション、流体力学的送達、もしくはリン酸カルシウム沈殿によってトランスフェクトされ、及び／または脂質ビヒクル、任意選択的に、Ｎ－［１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、１，２－ビス（オレオイルオキシ）－３－３－（トリメチルアンモニア）プロパン（ＤＯＴＡＰ）、もしくは１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＤＡＰ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、コレステロール、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ　２０００（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ　３０００（カチオン性リポソーム製剤）、ＴＲＡＮＳＦＥＣＴＡＭ（カチオン性リポソーム製剤）、脂質ナノ粒子、もしくはリポソーム、及びそれらの組み合わせを使用して実施される、請求項１、３～９、または１１～１９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２１】

前記自己抗原または前記その断片が、自己抗体またはＢ細胞受容体（ＢＣＲ）を標的とするための細胞外ドメインである、請求項９～２０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２】

前記細胞外ドメインが、ＡＣｈＲ自己抗原である、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】

前記ＡＣｈＲ自己抗原が、ドメインＥ２～Ｅ６を含み、前記ＡＣｈＲ自己抗原が、ＣＤ８アルファ鎖膜貫通ドメイン及びＣＤ１３７－ＣＤ３ｚ細胞質シグナル伝達ドメインに融合されている、請求項２２に記載の方法。

【請求項２４】

前記細胞外ドメインが、筋肉特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）細胞外ドメインである、請求項２１に記載の方法。

【請求項２５】

前記細胞外ドメインが、デスモグレイン３（Ｄｓｇ３）である、請求項２１に記載の方法。

【請求項２６】

前記細胞外ドメインが、デスモグレイン１（Ｄｓｇ１）である、請求項２１に記載の方法。

【請求項２７】

前記自己抗原または前記その断片が、同種である、請求項２１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２８】

前記自己抗原または前記その断片が、異種である、請求項２１～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２９】

前記方法が、前記トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞を、前記ＣＡＡＲ免疫細胞の増殖を選択的に増強する培地中で培養することを含む、請求項２１～２８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３０】

前記トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞が、約１日または約２日で作製される、請求項２１～２９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３１】

前記トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞が、２日未満で作製される、請求項２１

～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３２】
前記方法が、エクスビボでのＣＡＡＲ免疫細胞の拡大の使用を排除する、請求項２１～３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３３】
前記Ｔ細胞が、一次Ｔ細胞を含む、請求項２１～３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞が、同種ＣＡＡＲ免疫細胞である、請求項２１～３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３５】
前記トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞が、自己ＣＡＡＲ免疫細胞である、請求項２１～３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
前記ドナーＤＮＡが、膜貫通ドメインの核酸配列、共刺激分子の細胞内ドメインの核酸配列、及びシグナル伝達ドメインの核酸配列のうちの１つ以上を含むか、またはさらに含む、請求項１～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記ドナーＤＮＡが、ＣＤ８アルファ鎖シグナルペプチドの核酸配列を含むか、またはさらに含む、請求項１～３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】
前記膜貫通ドメインの前記核酸配列が、ＣＤ８アルファ鎖ヒンジ及び膜貫通ドメインをコードする、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記ドナーＤＮＡが、ペプチドリンカーの核酸配列をさらに含む、請求項１～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
前記細胞内シグナル伝達ドメインの前記核酸配列が、ＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む、請求項１～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
前記第２の核酸が、Ｔ細胞細胞質シグナル伝達ドメインに融合されたＣＤ１９に対する細胞外単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）抗体をコードする、請求項１～４０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４２】
前記第２の核酸が、可撓性リンカーによって特異的抗体のＶＨに連結されたＶＬ、膜貫通ドメインの少なくとも一部、内因性タンパク質の細胞質、任意選択的に細胞外ドメインの少なくとも一部を含む単鎖Ｆｖドメイン（ｓｃＦｖ）をコードする、請求項１～４０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
前記ｓｃＦｖドメインが、腫瘍細胞または腫瘍細胞マーカーに対する抗体のｓｃＦｖドメインである、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記ｓｃＦｖドメインが、ウイルスに対する抗体のｓｃＦｖドメインである、請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
前記内因性タンパク質が、リンパ球受容体鎖、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体のポリペプチド、またはＦｃもしくはＩＬ－２受容体のサブユニットである、請求項４２～４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】
前記第２の核酸が、抗原特異的Ｔ細胞受容体のα、β、γ、またはδ鎖をコードする、請求項４２～４５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４７】
前記ドナーＤＮＡが、ＣＡＲの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインをコードする核酸を含む、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４８】
前記細胞内ドメインが、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＩＬ－２Ｒβ、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＧＩＴＲ、ＴＩＭ３、ＤＡＰ１０、ＣＤ４０、ＰＤ－１、ＩＣＯＳ、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、及びそれらの任意の組み合わせから選択される共刺激分子の細胞内ドメインを含む共刺激シグナル伝達領域を含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記ＣＡＲが、
ａ）アルファ葉酸受容体、５Ｔ４、αｖβ６インテグリン、ＢＣＭＡ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ６、ＣＡＩＸ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ４４、ＣＤ４４ｖ６、ＣＤ４４ｖ７／８、ＣＤ７０、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ１２３、ＣＤ１３８、ＣＤ１７１、ＣＥＡ、ＣＳＰＧ４、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ２）を含むＥＧＦＲファミリー、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＧＰ２、ＥＧＰ４０、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、ＥｐＣＡＭ、ＦＡＰ、胎児ＡｃｈＲ、ＧＤ２、ＧＤ３、グリピカン－３（ＧＰＣ３）、ＨＬＡ－Ａ１＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ２＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ３＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ１＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＨＬＡ－Ａ２＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＨＬＡ－Ａ３＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＩＬ－１１Ｒα、ＩＬ－１３Ｒα２、ラムダ、ルイス－Ｙ、カッパ、メソテリン、Ｍｕｃ１、Ｍｕｃ１６、ＮＣＡＭ、ＮＫＧ２Ｄリガンド、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＰＲＡＭＥ、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＯＲ１、ＳＳＸ、サバイビン、ＴＡＧ７２、ＴＥＭ、及びＶＥＧＦＲ２から選択される抗原に結合する細胞外ドメイン、
ｂ）ＣＤ８α、ＣＤ４、ＣＤ２８、ＣＤ４５、ＰＤ－１、及びＣＤ１５２から選択されるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン、
ｃ）ＣＤ２８、ＣＤ５４（ＩＣＡＭ）、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）、ＣＤ１３７（４１ＢＢ）、ＩＬ－２Ｒβ、ＣＤ１５２（ＣＴＬＡ４）、ＣＤ２７３（ＰＤ－Ｌ２）、ＣＤ２７４（ＰＤ－Ｌ１）、及びＣＤ２７８（ＩＣＯＳ）から選択される１つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびに
ｄ）ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインを含む、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５０】
前記細胞外ドメインが、抗原に結合する抗体または抗原結合断片を含む、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記ドナーＤＮＡが、完全なポリペプチドをコードする遺伝子を含む、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５２】
前記ドナーＤＮＡが、１つ以上の逆位末端に隣接している、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５３】
前記方法が、ヘルパーウイルスを含まない、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５４】
前記第２の核酸が、発現ベクターに含まれている、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５５】
前記発現ベクターが、プラスミドを含む、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記発現ベクターが、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含む、請求項５４または５５に記載の方法。
【請求項５７】

前記第２の核酸が、ＤＮＡ、任意選択的にｃＤＮＡ、またはプラスミド、任意選択的にナノプラスミド（ｎａｎｏｐｌａｍｉｄ）である、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５８】

前記第２の核酸が、少なくとも１つのクロマチン要素を有し、前記少なくとも１つのクロマチン要素が、任意選択的に、マトリックス付着領域（ＭＡＲ）要素である、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５９】

前記細胞が、少なくとも１つのクロマチン要素を有する第３の核酸でさらにトランスフェクトされ、前記少なくとも１つのクロマチン要素が、任意選択的に、マトリックス付着領域（ＭＡＲ）要素である、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６０】

前記ドナーＤＮＡが、約２００，０００塩基以下のサイズを有する、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６１】

標的ゲノム統合を実行することができる前記酵素が、リコンビナーゼである、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６２】

前記リコンビナーゼが、インテグラーゼまたは可動要素酵素である、請求項６１に記載の方法。

【請求項６３】

標的ゲノム統合を実行することができる前記酵素が、可動要素酵素である、請求項６１または６２に記載の方法。

【請求項６４】

前記酵素が、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｍｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓ、Ｐａｎ ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、またはホモ・サピエンスに由来する、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６５】

前記酵素が、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｍｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓ、Ｐａｎ ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、またはホモ・サピエンスに由来する酵素の過剰活性形態を含むが、これらに限定されない、操作されたバージョンである、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６６】

前記可動要素酵素が、Ｔｎ１、Ｔｎ２、Ｔｎ３、Ｔｎ５、Ｔｎ７、Ｔｎ９、Ｔｎ１０、Ｔｎ５５２、Ｔｎ９０３、Ｔｎ１０００／ガンマ－デルタ、Ｔｎ／Ｏ、ｔｎｓＡ、ｔｎｓＢ、ｔｎｓＣ、ｔｎｉＱ、ＩＳ１０、ＩＳＳ、ＩＳ９１１、Ｍｉｎｏｓ、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ｂｅａｕｔｙ、ｐｉｇｇｙＢａｃ、Ｔｏｌ２、Ｍｏｓ１、Ｈｉｍａｒ１、Ｈｅｒｍｅｓ、Ｔｏｌ２、Ｍｉｎｏｓ、Ｔｅｌ、Ｐ要素、ＭｕＡ、Ｔｙ１、Ｃｈａｐａｅｖ、トランシブ、Ｔｃ１／マリナー、もしくはＴｃ３ドナーＤＮＡ系、または過剰活性バリアントを含む、それらの生物学的に活性な断片バリアントのうちの１つ以上からのものである、請求項６３～６５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６７】

前記可動要素酵素が、配列番号１のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも約８０％を有するアミノ酸配列、もしくは少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項６３～６６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６８】

前記可動要素酵素が、配列番号１の位置２に対応する位置にセリン以外のアミノ酸を含む、請求項６７に記載の方法。

【請求項６９】

前記アミノ酸が、非極性脂肪族アミノ酸、任意選択的に、任意選択的にＧ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ及びＰ、任意選択的にＡから選択される非極性脂肪族アミノ酸である、請求項６８に記載の方法。

【請求項７０】

前記可動要素酵素が、配列番号１に対して、Ｃ末端に追加の残基を有しない、請求項６７～６９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７１】

前記酵素が、過剰活性を付与する１つ以上の変異を有する、請求項６３～７０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７２】

前記酵素が、配列番号１に対応する位置にＳ８Ｘ１、Ｃ１３Ｘ２、及び／またはＮ１２５Ｘ３から選択される１つ以上のアミノ酸置換を有する、請求項７１に記載の方法。

【請求項７３】

前記酵素が、配列番号１に対応する位置にＳ８Ｘ１、Ｃ１３Ｘ２、及び／またはＮ１２５Ｘ３置換を有する、請求項７１に記載の方法。

【請求項７４】

前記酵素が、配列番号１に対応する位置にＳ８Ｘ１及びＣ１３Ｘ２置換を有する、請求項７１に記載の方法。

【請求項７５】

前記酵素が、配列番号１に対応する位置にＳ８Ｘ１及びＮ１２５Ｘ３置換を有する、請求項７１に記載の方法。

【請求項７６】

前記酵素が、配列番号１に対応する位置にＣ１３Ｘ２及びＮ１２５Ｘ３置換を有する、請求項７１に記載の方法。

【請求項７７】

Ｘ１が、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ及びＰから選択され、Ｘ２が、Ｋ、Ｒ及びＨから選択され、Ｘ３が、Ｋ、Ｒ及びＨから選択される、請求項７１～７６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７８】

Ｘ１が、Ｐであり、Ｘ２が、Ｒであり、及び／またはＸ３が、Ｋである、請求項７７に記載の方法。

【請求項７９】

前記可動要素酵素が、操作された哺乳動物可動要素酵素である、請求項６３に記載の方法。

【請求項８０】

前記可動要素酵素が、哺乳動物由来のヘルパーＲＮＡ可動要素酵素である、請求項６３または７９に記載の方法。

【請求項８１】

前記可動要素酵素が、哺乳動物由来のヘルパーＤＮＡ可動要素酵素である、請求項６３または７９に記載の方法。

【請求項８２】

前記酵素が、ＴＡジヌクレオチド部位に前記ドナーＤＮＡを挿入することができる、請求項６３～８１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８３】
前記酵素が、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）テトラヌクレオチド部位に前記ドナーＤＮＡを挿入することができる、請求項６３～８２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８４】
前記可動要素酵素が、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性（Ｉｎｔ＋）を有し、前記可動要素酵素が、配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、もしくは配列番号４３０のアミノ酸配列、またはそれをコードするヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する、請求項８２または８３に記載の方法。
【請求項８５】
前記可動要素酵素が、配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、または配列番号４３０のアミノ酸配列に対して少なくとも約９５％、または少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％の同一性を有する、請求項８４に記載の方法。
【請求項８６】
前記可動要素酵素が、過剰活性を付与する１つ以上の変異を有する、請求項８４または８５に記載の方法。
【請求項８７】
前記可動要素酵素が、配列番号１、配列番号１０、もしくは配列番号１１のアミノ酸配列、またはその機能的同等物を有する、請求項８４～８６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８８】
前記可動要素酵素が、配列番号５またはそのコドン最適化形態に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列を有する、請求項８４～８６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８９】
前記可動要素酵素が、配列番号３もしくは配列番号４のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＳ８Ｐ及びＧ１７Ｒ変異を有するアミノ酸配列を有する、請求項８７に記載の方法。
【請求項９０】
前記可動要素酵素が、配列番号６のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＩ８３Ｐ及び／またはＶ１１８Ｒ変異を有するアミノ酸配列を有する、請求項８７に記載の方法。
【請求項９１】
前記可動要素酵素が、配列番号７のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＳ２０Ｐ及び／またはＡ２９Ｒ変異を有するアミノ酸配列を有する、請求項８７に記載の方法。
【請求項９２】
前記可動要素酵素が、配列番号９のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＡ１２Ｐ及び／またはＩ２８Ｒ変異及び／またはＲ１５２Ｋ変異を有するアミノ酸配列を有する、請求項８７に記載の方法。
【請求項９３】
前記可動要素酵素が、配列番号８のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＴ４Ｐ及び／またはＬ１３Ｒ変異を有するアミノ酸配列を有する、請求項８７に記載の方法。
【請求項９４】
前記ドナーＤＮＡが、前記可動要素酵素によって認識される左末端及び右末端配列を含むベクターに含まれている、請求項６３～９３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９５】

前記末端配列が、ＭＥＲ、ＭＥＲ７５Ａ、ＭＥＲ７５Ｂ、及びＭＥＲ８５から選択される、請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】
前記末端配列が、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号４４１、及び配列番号２２のヌクレオチド配列、またはそれに対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列から選択される、請求項９４に記載の方法。
【請求項９７】
前記末端配列のうちの１つ以上が、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している、請求項９４～９６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９８】
前記末端配列が、配列番号１２のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１２の前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する前記ヌクレオチド配列からの前記少なくとも１つの反復が、前記ドナーＤＮＡの５’末端に位置付けられている、請求項９７に記載の方法。
【請求項９９】
前記末端配列が、配列番号１７のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１７の前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する前記ヌクレオチド配列からの前記少なくとも１つの反復が、前記ドナーＤＮＡの３’末端に位置付けられている、請求項９７に記載の方法。
【請求項１００】
前記末端配列が、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している、請求項９８または９９に記載の方法。
【請求項１０１】
前記末端配列が、配列番号１３のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１３の前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する前記ヌクレオチド配列からの前記少なくとも１つの反復が、前記ドナーＤＮＡの５’末端に位置付けられている、請求項９７に記載の方法。
【請求項１０２】
前記末端配列が、配列番号１８のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１８の前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する前記ヌクレオチド配列からの前記少なくとも１つの反復が、前記ドナーＤＮＡの３’末端に位置付けられている、請求項９７に記載の方法。
【請求項１０３】
前記末端配列が、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している、請求項１０１または１０２に記載の方法。
【請求項１０４】
前記末端配列が、配列番号１４のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１４の前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する前記ヌクレオチド配列からの前記少なくとも１つの反復が、前記ドナーＤＮＡの５’末端に位置付けられている、請求項９７に記載の方法。
【請求項１０５】
前記末端配列が、配列番号１９のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１９の前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する前記ヌクレオチド配列から

の前記少なくとも１つの反復が、前記ドナーＤＮＡの３’末端に位置付けられている、請求項９７に記載の方法。
【請求項１０６】
前記末端配列が、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している、請求項１０４または１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
前記末端配列が、配列番号１５のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１５の前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する前記ヌクレオチド配列からの前記少なくとも１つの反復が、前記ドナーＤＮＡの５’末端に位置付けられている、請求項９７に記載の方法。
【請求項１０８】
前記末端配列が、配列番号２０のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号２０の前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する前記ヌクレオチド配列からの前記少なくとも１つの反復が、前記ドナーＤＮＡの３’末端に位置付けられている、請求項９７に記載の方法。
【請求項１０９】
前記末端配列が、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している、請求項１０７または１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
前記末端配列が、配列番号１６のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１６の前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する前記ヌクレオチド配列からの前記少なくとも１つの反復が、前記ドナーＤＮＡの５’末端に位置付けられている、請求項９７に記載の方法。
【請求項１１１】
前記末端配列が、配列番号２１または配列番号４４１のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号２１または配列番号４４１の前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有する前記ヌクレオチド配列からの前記少なくとも１つの反復が、前記ドナーＤＮＡの３’末端に位置付けられている、請求項９７に記載の方法。
【請求項１１２】
前記可動要素酵素が、ホモ・サピエンスまたはその先行物から再構築された可動要素酵素の操作された形態である、請求項１１０または１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
前記酵素が、単量体または二量体形態にある、請求項１～１１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１４】
前記酵素が、多量体形態にある、請求項１～１１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１５】
前記酵素が、
標的要素と、
導入遺伝子、キメラＣＡＲ、またはキメラＣＡＡＲを含む前記ドナーＤＮＡを、任意選択的に、ＴＡジヌクレオチド部位またはＴＴＡＡ（配列番号４４０）テトラヌクレオチド部位に、任意選択的に、ゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）に挿入することができる酵素と、を含む、請求項１～１１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１６】
前記ドナーＤＮＡが、完全なポリペプチドをコードする導入遺伝子を含む、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１７】
前記ドナーＤＮＡが、ＣＡＲまたはＣＡＡＲの構成要素である１つ以上の導入遺伝子を含む、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１８】
前記酵素が、過剰活性を付与する１つ以上の変異を有する、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１９】
前記酵素が、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性（Ｉｎｔ＋）を有する、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２０】
前記酵素が、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性の欠如（Ｉｎｔ－）を有する、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２１】
前記可動要素酵素が、キメラ可動要素酵素である、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２２】
前記標的要素が、任意選択的に、触媒不活性、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）、ジンクフィンガー、触媒不活性転写因子、ニッカーゼ、転写活性化因子、転写リプレッサ、リコンビナーゼ、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、父性発現遺伝子１０（ＰＥＧ１０）、及びＴｎｓＤであるＣａｓ酵素と任意選択的に会合するｇＲＮＡのうちの１つ以上を含む、請求項１１５～１２１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２３】
前記標的要素が、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）を含む、請求項１１５～１２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２４】
前記ＴＡＬＥ　ＤＢＤが、１つ以上の反復配列を含む、請求項１２３に記載の方法。
【請求項１２５】
前記ＴＡＬＥ　ＤＢＤが、約１４、または約１５、または約１６、または約１７、または約１８、または約１８．５個の反復配列を含む、請求項１２４に記載の方法。
【請求項１２６】
前記ＴＡＬＥ　ＤＢＤ反復配列が、３３個または３４個のアミノ酸を含む、請求項１２４または１２５に記載の方法。
【請求項１２７】
前記ＴＡＬＥ　ＤＢＤ反復配列のうちの１つ以上が、３３個または３４個のアミノ酸の残基１２または１３に反復可変二残基（ＲＶＤ）を含む、請求項１２４に記載の方法。
【請求項１２８】
前記ＲＶＤが、前記核酸分子内の１つの塩基対を認識する、請求項１２７に記載の方法。
【請求項１２９】
前記ＲＶＤが、前記核酸分子内のＣ残基を認識し、かつＨＤ、Ｎ（ギャップ）、ＨＡ、ＮＤ、及びＨＩから選択される、請求項１２７に記載の方法。
【請求項１３０】
前記ＲＶＤが、前記核酸分子内のＧ残基を認識し、かつＮＮ、ＮＨ、ＮＫ、ＨＮ、及びＮＡから選択される、請求項１２７に記載の方法。
【請求項１３１】
前記ＲＶＤが、前記核酸分子内のＡ残基を認識し、かつＮＩ及びＮＳから選択される、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１３２】
前記ＲＶＤが、前記核酸分子内のＴ残基を認識し、かつＮＧ、ＨＧ、Ｈ（ギャップ）、

及びＩＧから選択される、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１３３】
前記ＧＳＨＳが、染色体内のオープンクロマチン位置にある、請求項１１５～１３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３４】
前記ＧＳＨＳが、アデノ随伴ウイルス部位１（ＡＡＶＳ１）、ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体５（ＣＣＲ５）遺伝子、ＨＩＶ－１コ受容体、及びヒトＲｏｓａ２６遺伝子座から選択される、請求項１１５～１３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３５】
前記ＧＳＨＳが、ヒト染色体２、４、６、１０、１１、１７、２２、またはＸに位置する、請求項１１５～１３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３６】
前記ＧＳＨＳが、ＴＡＬＣ１、ＴＡＬＣ２、ＴＡＬＣ３、ＴＡＬＣ４、ＴＡＬＣ５、ＴＡＬＣ７、ＴＡＬＣ８、ＡＶＳ１、ＡＶＳ２、ＡＶＳ３、ＲＯＳＡ１、ＲＯＳＡ２、ＴＡＬＥＲ１、ＴＡＬＥＲ２、ＴＡＬＥＲ３、ＴＡＬＥＲ４、ＴＡＬＥＲ５、ＳＨＣＨＲ２－１、ＳＨＣＨＲ２－２、ＳＨＣＨＲ２－３、ＳＨＣＨＲ２－４、ＳＨＣＨＲ４－１、ＳＨＣＨＲ４－２、ＳＨＣＨＲ４－３、ＳＨＣＨＲ６－１、ＳＨＣＨＲ６－２、ＳＨＣＨＲ６－３、ＳＨＣＨＲ６－４、ＳＨＣＨＲ１０－１、ＳＨＣＨＲ１０－２、ＳＨＣＨＲ１０－３、ＳＨＣＨＲ１０－４、ＳＨＣＨＲ１０－５、ＳＨＣＨＲ１１－１、ＳＨＣＨＲ１１－２、ＳＨＣＨＲ１１－３、ＳＨＣＨＲ１７－１、ＳＨＣＨＲ１７－２、ＳＨＣＨＲ１７－３、及びＳＨＣＨＲ１７－４から選択される、請求項１１５～１３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３７】
前記標的要素が、Ｃａｓ９酵素ガイドＲＮＡ複合体を含む、請求項１１５～１２２または１３３～１３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３８】
前記Ｃａｓ９酵素ガイドＲＮＡ複合体が、ヌクレアーゼ欠損ｄＣａｓ９ガイドＲＮＡ複合体を含む、請求項１３７に記載の方法。
【請求項１３９】
前記標的要素が、Ｃａｓ１２酵素ガイドＲＮＡ複合体を含むか、または前記標的要素が、ヌクレアーゼ欠損ｄＣａｓ１２ガイドＲＮＡ複合体、任意選択的に、ｄＣａｓ１２ｊガイドＲＮＡ複合体もしくはｄＣａｓ１２ａガイドＲＮＡ複合体を含む、請求項１１５～１２２または１３３～１３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４０】
前記標的要素が、表３Ａ～３Ｆの配列のｇＲＮＡもしくはそれを含むｇＲＮＡ、またはそのバリアント、あるいは表４Ａ～４Ｆの配列のＴＡＬＥ　ＤＢＤもしくはそれを含むＴＡＬＥ　ＤＢＤ、またはそのバリアント、あるいは表５Ａ～５Ｅの配列のＺＮＦもしくはそれを含むＺＮＦ、またはそのバリアントを含む、請求項１１５～１３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４１】
前記標的要素が、遺伝子編集システムの核酸結合構成要素を含む、請求項１１５～１２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４２】
前記酵素及び前記標的要素が、接続されている、請求項１１５～１４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４３】
前記酵素及び前記標的要素が、互いに融合されているか、またはリンカーを介して互いに連結されている、請求項１１５～１４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４４】
前記リンカーが、可撓性リンカーである、請求項１４３に記載の方法。

【請求項１４５】
前記可撓性リンカーが、グリシン及びセリン残基を実質的に含み、任意選択的に、前記可撓性リンカーが、（Gly_4Ser）$_n$を含み、ｎが、約１～約１２である、請求項１４４に記載の方法。
【請求項１４６】
前記可撓性リンカーが、約２０、または約３０、または約４０、または約５０、または約６０個のアミノ酸残基のものである、請求項１４５に記載の方法。
【請求項１４７】
前記ドナーＤＮＡが、完全なポリペプチドをコードする遺伝子を含む、請求項１～１４６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４８】
前記ドナーＤＮＡが、疾患状態において欠陥があるかまたは実質的に存在しない遺伝子を含む、請求項１～１４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４９】
前記ドナーＤＮＡが、１つ以上の逆位末端に隣接している、請求項１～１４８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５０】
前記第１の核酸及び前記第２の核酸のうちの少なくとも１つが、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の形態にある、請求項１～１４９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５１】
前記酵素をコードする前記第１の核酸及び前記ドナーＤＮＡをコードする前記第２の核酸が、任意選択的に共製剤において、同じＬＮＰの形態にある、請求項１～１５０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５２】
前記ＬＮＰが、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウムプロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルアミノエタン－カルバモイルと混合されたカチオン性コレステロール誘導体（ＤＣ－Ｃｈｏｌ）、ホスファチジルコリン（ＰＣ）、トリオレイン（グリセリルトリオレエート）、及び１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［カルボキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＤＳＰＥ－ＰＥＧ）、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００（ＤＭＧ－ＰＥＧ　２Ｋ）、及び１，２－ジステアロール－ｓｎ－グリセロール－３ホスホコリン（ＤＳＰＣ）から選択される１つ以上の脂質を含み、及び／またはポリエチレンイミン（ＰＥＩ）及びポリ（乳酸－グリコール酸共重合体）（ＰＬＧＡ）、及びＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）から選択される１つ以上の分子を含む、請求項１５０または１５１に記載の方法。
【請求項１５３】
前記酵素が、組換え核酸または合成核酸によってコードされる、請求項１～１５２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５４】
前記核酸が、ｍＲＮＡまたはヘルパーＲＮＡである、請求項１５３に記載の方法。
【請求項１５５】
前記核酸が、シュードウリジン置換を有する５’－ｍ７Ｇキャップ（キャップ０、キャップ１、またはキャップ２）、及び約３０、または約５０、または約１００、または約１５０ヌクレオチドの長さのポリＡテールを有するＲＮＡである、請求項１５４に記載の方法。
【請求項１５６】
前記酵素が、ベクターまたはベクター様粒子に組み込まれている、請求項１５３～１５５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５７】
前記ベクターが、非ウイルスベクターである、請求項１５６に記載の方法。

【請求項１５８】
前記酵素及び前記ドナーＤＮＡが、同じベクターに含まれている、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５９】
前記酵素及び前記ドナーＤＮＡが、異なるベクターに含まれている、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６０】
前記酵素及び前記ドナーＤＮＡが、単一の薬学的組成物に含まれている、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６１】
前記酵素及び前記ドナーＤＮＡが、異なる薬学的組成物に含まれている、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６２】
前記酵素及び前記ドナーＤＮＡが、共トランスフェクトされるか、または前記酵素及び前記ドナーＤＮＡが、別々にトランスフェクトされる、先行請求項のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６３】
前記酵素及び前記ドナーＤＮＡが、約１対約４、または約１対約２のドナーＤＮＡ対酵素比でトランスフェクトされる、請求項１～１６２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６４】
請求項１～１６３のいずれか１項に記載の方法によって生成される、遺伝子修飾された免疫細胞。
【請求項１６５】
細胞療法を使用して疾患または状態を治療する方法であって、それを必要とする患者に、請求項１～１６３のいずれか１項に記載の方法によって生成された細胞を投与することを含む、前記方法。
【請求項１６６】
がんを治療するための療法を送達する方法であって、それを必要とする患者に、請求項１６５に記載の遺伝子修飾された免疫細胞を投与することを含む、前記方法。
【請求項１６７】
前記がんが血液癌である、請求項１６６に記載の方法。
【請求項１６８】
前記がんが、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、及び／または多発性骨髄腫である、請求項１６６に記載の方法。
【請求項１６９】
前記がんが、再発性もしくは難治性急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、多発性骨髄腫（ＭＭ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、びまん性大型Ｂ細胞リンパ腫、原発性縦隔Ｂ細胞リンパ腫、高悪性度Ｂ細胞リンパ腫、形質転換濾胞性リンパ腫、及び／またはマントル細胞リンパ腫である、請求項１６６に記載の方法。
【請求項１７０】
前記がんが、任意選択的に、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）、大細胞神経内分泌癌（ＬＣＮＥＣ）、胃癌、結腸癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱尿路上皮癌、転移性黒色腫、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、膵癌、神経膠腫、及び／または膠芽腫から選択される固形腫瘍である、請求項１６６に記載の方法。
【請求項１７１】
前記疾患または前記状態が、自己免疫疾患または状態である、請求項１６５に記載の方法。
【請求項１７２】
前記疾患または前記状態が、尋常性天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、重症筋無力症、及び落

葉状天疱瘡である、請求項１６５に記載の方法。
【請求項１７３】
前記細胞が、前記ＣＡＡＲを発現し、Ｂ細胞上で発現される自己抗体に対して高い親和性を有する、請求項１７１または１７２に記載の方法。
【請求項１７４】
前記細胞が、前記ＣＡＡＲを発現し、自己抗体を発現するＢ細胞の標的死滅を誘導する、請求項１７１または１７２に記載の方法。
【請求項１７５】
前記細胞が、前記ＣＡＡＲを発現し、Ｆｃ受容体に結合した抗体に対して低い親和性を有する、請求項１７１または１７２に記載の方法。
【請求項１７６】
遺伝子療法を送達する方法が、非免疫原性であり、任意選択的にサイトカイン放出症候群を有しない、請求項１６５～１７５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７７】
前記遺伝子療法を送達する方法が、オフターゲット効果を低減または回避する、請求項１６５～１７６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７８】
前記方法が、２回以上の用量を介して送達することを含む、請求項１６５～１７７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７９】
前記方法が、可逆性、誘導性、または死滅スイッチ能力を有する、請求項１６５～１７８のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、部分的には、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）免疫細胞またはキメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）免疫細胞を、例えば、可動要素酵素等の標的ゲノム統合を実行することができる酵素を使用して作製する方法に関する。
【０００２】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年１１月４日に出願された米国仮特許出願第６３／２７５，７７７号に対する優先権及び利益を主張し、その全内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
配列表
これとともに電子的に提出されたテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ読み取り可能な形式のコピー（ファイル名：「Ｓｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ＿ＳＡＬ－００９ＰＣ＿１２６９３３－５００９．ｘｍｌ」、記録日：２０２２年１１月４日、ファイルサイズ：９６２，５６０バイト）。
【背景技術】
【０００４】
２つのタイプのＴ細胞が一緒に働き、自己及び感染病原体に対する異常な攻撃から体を保護する。第１のタイプは、エフェクターＴ細胞と呼ばれ、病原体を排除する。制御性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞と呼ばれる第２のタイプは、自己に対する免疫応答を防止するように機能する。エフェクターＴ細胞応答は概して強力であるが、感染疾患及び腫瘍のサブセットは、Ｔ細胞制御をバイパスするために多種多様な脱出機序を進化させている。同様に、１型糖尿病等の自己免疫疾患の発生率は、Ｔｒｅｇ細胞が異常な免疫応答を予防することに必ずしも成功するとは限らないことを強調している。さらに、臓器移植では、Ｔｒｅｇ細胞はしばしば、免疫拒絶から救命組織を保護することができない。

【０００５】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）技術は、自然に生じるＴ細胞に直面する障壁を克服するためにＴ細胞を再プログラムするための有望なアプローチとして浮上している。ＣＡＲは、ＭＨＣ分子によるペプチド提示を必要とせずに、細胞表面タンパク質に直接結合することによって、Ｔ細胞が抗原を認識する方法を改変するため、ＴＣＲと比較して、ＣＡＲが認識する利用可能な標的が少ない。しかしながら、ＣＡＲ標的は、より特異性を有し、ＨＬＡ制限がなく、感染因子によって使用されるＴ細胞脱出機構の多くを回避し、腫瘍は、ＣＡＲ　Ｔ細胞に対してもはや有効ではない。臨床的成功はＣＡＲ　Ｔ細胞分野にとって比較的新しいものであるが、この概念は、研究者らが、細胞表面タンパク質を認識する標的部分をＣＤ３ζ細胞質尾部等のＴ細胞活性化ドメインと融合させることによってＴ細胞特異性を再指向することができることを示したときの１９９０年代に最初に浮上した。この技術の最初の例は、ＣＤ４をＣＤ３ζ鎖（ＣＤ４ζＣＡＲ）に融合させた。エフェクターＴ細胞で発現すると、この構築物は、ＨＩＶエンベロープタンパク質（Ｅｎｖ）とＣＤ４２との間の相互作用を利用することによって、Ｔ細胞特異性をＨＩＶ感染細胞に再指向した。この概念は１９９０年代後半に臨床に持ち込まれたが、安全で実行可能であることが示されたが、ウイルス感染の持続的な制御は観察されなかった。その間の数年間で、腫瘍を標的とする強力なエフェクターＣＡＲ　Ｔ細胞を操作する方法についての我々の理解は高まっている。加えて、製薬会社は、エフェクターＣＡＲ　Ｔ細胞療法を、ブティックな（ｂｏｕｔｉｑｕｅ）第Ｉ相単一センター臨床試験から、米国及び他の場所にわたり数千人の患者を治療することができる食品医薬品局（ＦＤＡ）承認の療法に移行させることを促進している。

【０００６】
Ｔ細胞は感染疾患及び自己免疫を制御する上で中心的な役割を果たしているため、この分野の多くの人々は、ＣＡＲ　Ｔ細胞療法が、従来の医療アプローチが治癒を提供していないがん以外の疾患にどのように長期的な解決策を提供することができるかを検討している。

【０００７】
キメラ自己抗体受容体Ｔ（ＣＡＡＲ－Ｔ）細胞は、自己反応性Ｂ細胞のような抗体を分泌する細胞を識別し、ＣＡＲ－Ｔ細胞と同様の興奮及び制限をもたらす、ＣＡＲ－Ｔ細胞の修飾形態である。

【０００８】
したがって、ＣＡＲ免疫細胞及びＣＡＡＲ免疫細胞の開発に対する改善されたアプローチの必要性が存在する。

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００９】
態様では、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、対象から得られたサンプルから免疫細胞を得ることであって、サンプルが、免疫細胞または免疫細胞前駆体を含む、得ることと、免疫細胞を、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、任意選択的に、第１の核酸が、ＲＮＡである、第１の核酸、及びキメラＣＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる酵素、例えば、限定されないが、可動要素酵素によって認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸でトランスフェクトし、それによって、トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞を作製することと、を含み、免疫細胞が、Ｔ細胞、マクロファージ、及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞から選択される、方法が提供される。

【００１０】
態様では、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、対象に、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、第１の核酸が、ＲＮＡである、第１の核酸、及びキメラＣＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる酵素、例えば、限定されないが、可動要素酵素によっ

て認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸を投与することを含み、投与が、第１の核酸及び第２の核酸を免疫細胞に指向することができる脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を使用し、それによって、ＣＡＲ免疫細胞を作製し、免疫細胞が、Ｔ細胞、マクロファージ、及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞から選択される、方法が提供される。実施形態では、投与は、対象における皮膚細胞に対するものである。

【００１１】

実施形態では、免疫細胞はＴ細胞である。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞はＣＡＲ－Ｔ細胞であり、任意に同種ＣＡＲ－Ｔ細胞または同種ＣＡＲ－Ｔ細胞から選択される。実施形態では、免疫細胞はマクロファージである。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞はＣＡＲ－Ｍ細胞であり、任意選択的に同種ＣＡＲ－Ｍ細胞または同種ＣＡＲ－Ｍ細胞から選択される。実施形態では、免疫細胞はナチュラルキラー（ＮＫ）である。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞はＣＡＲ－ＮＫ細胞であり、任意選択的に同種ＣＡＲ－ＮＫ細胞または同種ＣＡＲ－ＮＫ細胞から選択される。

【００１２】

実施形態では、ドナーＤＮＡは、膜貫通ドメインの核酸配列、共刺激分子の細胞内ドメインの核酸配列、及びシグナル伝達ドメインの核酸配列のうちの１つ以上を含むか、またはさらに含む。実施形態では、ドナーＤＮＡは、ＣＤ８アルファ鎖シグナルペプチドの核酸配列を含むか、またはさらにそれを含む。実施形態では、膜貫通ドメインの核酸配列は、ＣＤ８アルファ鎖ヒンジ及び膜貫通ドメインをコードする。実施形態では、ドナーＤＮＡはペプチドリンカーの核酸配列をさらに含む。実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインの核酸配列は、ＣＤ３ゼータシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む。実施形態では、第２の核酸は、Ｔ細胞細胞質シグナル伝達ドメインに融合されたＣＤ１９に対する細胞外単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）抗体をコードする。

【００１３】

実施形態では、ＣＡＲは、ａ）アルファ葉酸受容体、５Ｔ４、αｖβ６インテグリン、ＢＣＭＡ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ６、ＣＡＩＸ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ４４、ＣＤ４４ｖ６、ＣＤ４４ｖ７／８、ＣＤ７０、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ１２３、ＣＤ１３８、ＣＤ１７１、ＣＥＡ、ＣＳＰＧ４、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ２）を含むＥＧＦＲファミリー、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＧＰ２、ＥＧＰ４０、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、ＥｐＣＡＭ、ＦＡＰ、胎児ＡｃｈＲ、ＧＤ２、ＧＤ３、グリピカン－３（ＧＰＣ３）、ＨＬＡ－Ａ１＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ２＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ３＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ１＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＨＬＡ－Ａ２＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＨＬＡ－Ａ３＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＩＬ－１１Ｒα、ＩＬ－１３Ｒα２、ラムダ、ルイス－Ｙ、カッパ、メソテリン、Ｍｕｃ１、Ｍｕｃ１６、ＮＣＡＭ、ＮＫＧ２Ｄリガンド、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＰＲＡＭＥ、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＯＲ１、ＳＳＸ、サバイビン、ＴＡＧ７２、ＴＥＭ、及びＶＥＧＦＲ２から選択される抗原に結合する細胞外ドメイン、ｂ）ＣＤ８α、ＣＤ４、ＣＤ２８、ＣＤ４５、ＰＤ－１、及びＣＤ１５２から選択されるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン、ｃ）ＣＤ２８、ＣＤ５４（ＩＣＡＭ）、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）、ＣＤ１３７（４１ＢＢ）、ＩＬ－２Ｒβ、ＣＤ１５２（ＣＴＬＡ４）、ＣＤ２７３（ＰＤ－Ｌ２）、ＣＤ２７４（ＰＤ－Ｌ１）、及びＣＤ２７８（ＩＣＯＳ）から選択される１つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、及び／またはｄ）ＣＤ３ζシグナル伝達ドメインを含む。

【００１４】

態様では、キメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、対象から得られたサンプルから細胞を得ることであって、サンプルが、Ｔ細胞またはＴ細胞前駆体を含む、得ることと、細胞を、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、第１の核酸が、ＲＮＡである、第１の核酸、及び自己抗原またはその断片を含むキメラＣＡＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる酵素、例えば、限定されないが、可動要素酵素によって認識される末端

が隣接する第２の非ウイルス核酸でトランスフェクトし、それによって、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞を作製することと、を含む、方法が提供される。

【００１５】

態様では、キメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、対象における皮膚細胞に、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、第１の核酸が、ＲＮＡである、第１の核酸、及び自己抗原またはその断片を含むキメラＣＡＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる酵素、例えば、限定されないが、可動要素酵素によって認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸を投与することを含み、投与が、皮内または皮下送達を介し、かつ第１の核酸及び第２の核酸を免疫細胞に指向することができる脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を使用して実行され、それによって、ＣＡＲ免疫細胞を作製する、方法が提供される。

【００１６】

実施形態では、免疫細胞はＴ細胞である。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞はＣＡＡＲ－Ｔ細胞であり、任意選択的に同種ＣＡＡＲ－Ｔ細胞または同種ＣＡＡＲ－Ｔ細胞から選択される。実施形態では、免疫細胞はマクロファージである。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞はＣＡＡＲ－Ｍ細胞であり、任意選択的に同種ＣＡＡＲ－Ｍ細胞または同種ＣＡＡＲ－Ｍ細胞から選択される。実施形態では、免疫細胞はナチュラルキラー（ＮＫ）である。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞はＣＡＡＲ－ＮＫ細胞であり、任意選択的に同種ＣＡＡＲ－ＮＫ細胞または同種ＣＡＡＲ－ＮＫ細胞から選択される。

【００１７】

実施形態では、自己抗原またはその断片は、自己抗体またはＢ細胞受容体（ＢＣＲ）を標的とする細胞外ドメインである。実施形態では、細胞外ドメインはＡＣｈＲ自己抗原である。実施形態では、ＡＣｈＲ自己抗原はドメインＥ２～Ｅ６を含み、ＡＣｈＲ自己抗原はＣＤ８アルファ鎖膜貫通ドメイン及びＣＤ１３７－ＣＤ３ｚ細胞質シグナル伝達ドメインに融合されている。実施形態では、細胞外ドメインは、筋肉特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）細胞外ドメインである。実施形態では、細胞外ドメインはデスモグレイン３（Ｄｓｇ３）である。実施形態では、細胞外ドメインはデスモグレイン１（Ｄｓｇ１）である。

【００１８】

実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素は、リコンビナーゼ、例えば、インテグラーゼまたは可動要素酵素である。実施形態では、酵素は、可動要素酵素であり、例えば、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｍｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓ、Ｐａｎ ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、もしくはホモ・サピエンスに由来するか、またはそれらの可動要素酵素の操作されたバージョン、例えば、Ｔｎ１、Ｔｎ２、Ｔｎ３、Ｔｎ５、Ｔｎ７、Ｔｎ９、Ｔｎ１０、Ｔｎ５５２、Ｔｎ９０３、Ｔｎ１０００／ガンマ－デルタ、Ｔｎ／Ｏ、ｔｎｓＡ、ｔｎｓＢ、ｔｎｓＣ、ｔｎｉＱ、ＩＳ１０、ＩＳＳ、ＩＳ９１１、Ｍｉｎｏｓ、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ｂｅａｕｔｙ、ｐｉｇｇｙＢａｃ、Ｔｏｌ２、Ｍｏｓ１、Ｈｉｍａｒ１、Ｈｅｒｍｅｓ、Ｔｏｌ２、Ｍｉｎｏｓ、Ｔｅｌ、Ｐ要素、ＭｕＡ、Ｔｙ１、Ｃｈａｐａｅｖ、トランシブ、Ｔｃ１／マリナー、もしくはＴｃ３ドナーＤＮＡ系、または過剰活性バリアントを含む、それらの生物学的に活性な断片バリアントのうちの１つ以上である。実施形態では、可動要素酵素は、例えば、配列番号１の位置２に対応する位置にセリン以外のアミノ酸（例えば、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ及びＰ、任意選択的にＡから選択される）を有し、配列番号１に対してＣ末端に追加の残基を有さず、及び／または（例えば、表１の）過剰活性を付与する１つ以上の変異を有し、及び／または（例えば、表２Ａもしくは表２Ｂの）調節統合を行う１つ以上の変異を有する、配列番号１のアミノ酸配列、またはそのバリアントを有する。実施形態では、例えば、

（例えば、表１の）過剰活性を付与する１つ以上の変異を有し、及び／または（例えば、表２Ａまたは表２Ｂの）調節統合を行う１つ以上の変異を有する、配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、もしくは配列番号４３０のアミノ酸配列、またはそのバリアントに対して少なくとも約９０％の同一性を有する、可動要素酵素。実施形態では、可動要素酵素は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性（Ｉｎｔ＋）を有する。実施形態では、可動要素酵素は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）を有し、及び／または遺伝子統合活性を欠如（Ｉｎｔ－）している。

【００１９】

実施形態では、酵素は、標的要素と、キメラＣＡＲ、またはキメラＣＡＡＲを含むドナーＤＮＡを、任意選択的に、ＴＡジヌクレオチド部位またはＴＴＡＡ（配列番号４４０）テトラヌクレオチド部位に、任意選択的に、ゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）に挿入することができる酵素と、を含む。実施形態では、可動要素酵素はキメラ可動要素酵素である。実施形態では、標的要素は、任意選択的に、触媒不活性、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）、ジンクフィンガー、触媒不活性転写因子、ニッカーゼ、転写活性化因子、転写リプレッサ、リコンビナーゼ、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、父性発現遺伝子１０（ＰＥＧ１０）、及びＴｎｓＤであるＣａｓ酵素と任意選択的に会合するｇＲＮＡのうちの１つ以上を含む。

【００２０】

実施形態では、ＧＳＨＳは染色体内のオープンクロマチン位置にある。実施形態では、ＧＳＨＳは、アデノ随伴ウイルス部位１（ＡＡＶＳ１）、ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体５（ＣＣＲ５）遺伝子、ＨＩＶ－１コ受容体、及びヒトＲｏｓａ２６遺伝子座から選択される。実施形態では、ＧＳＨＳはヒト染色体２、４、６、１０、１１、１７、２２、またはＸに位置する。実施形態では、ＧＳＨＳは、ＴＡＬＣ１、ＴＡＬＣ２、ＴＡＬＣ３、ＴＡＬＣ４、ＴＡＬＣ５、ＴＡＬＣ７、ＴＡＬＣ８、ＡＶＳ１、ＡＶＳ２、ＡＶＳ３、ＲＯＳＡ１、ＲＯＳＡ２、ＴＡＬＥＲ１、ＴＡＬＥＲ２、ＴＡＬＥＲ３、ＴＡＬＥＲ４、ＴＡＬＥＲ５、ＳＨＣＨＲ２－１、ＳＨＣＨＲ２－２、ＳＨＣＨＲ２－３、ＳＨＣＨＲ２－４、ＳＨＣＨＲ４－１、ＳＨＣＨＲ４－２、ＳＨＣＨＲ４－３、ＳＨＣＨＲ６－１、ＳＨＣＨＲ６－２、ＳＨＣＨＲ６－３、ＳＨＣＨＲ６－４、ＳＨＣＨＲ１０－１、ＳＨＣＨＲ１０－２、ＳＨＣＨＲ１０－３、ＳＨＣＨＲ１０－４、ＳＨＣＨＲ１０－５、ＳＨＣＨＲ１１－１、ＳＨＣＨＲ１１－２、ＳＨＣＨＲ１１－３、ＳＨＣＨＲ１７－１、ＳＨＣＨＲ１７－２、ＳＨＣＨＲ１７－３、及びＳＨＣＨＲ１７－４から選択される。

【００２１】

実施形態では、本開示は、本明細書に記載の方法によって生成されるＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞を提供する。

【００２２】

実施形態では、本開示は、ＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞療法を送達する方法であって、それを必要とする患者に、本明細書に記載の方法によって生成されるＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞を投与することを含む、方法を提供する。

【００２３】

実施形態では、本開示は、ＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞療法を使用して疾患または状態を治療する方法であって、それを必要とする患者に、本明細書に記載の方法によって生成されるＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞を投与することを含む、方法を提供する。

【００２４】

本発明の詳細は、以下の添付の説明に記述されている。本明細書に記載の方法及び材料と同様または等価なものが、本発明の実施または試験で使用され得るが、例解的な方法及び材料がここに記載される。本発明の他の特色、目的、及び利点は、説明及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。本明細書及び添付の特許請求の範囲では、別段文脈が明示的に示さない限り、単数形はまた、複数形を含む。別段定義されない限り、本明細書で

使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１Ａ】標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする核酸（例えば、ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡ）と、可動要素酵素をコードする核酸（ドナーＤＮＡ）と、を含む、本開示の実施形態による系の非限定的な表現を描示する。キメラ、単量体、またはヘッド・トゥ・テール（ｈｅａｄ－ｔｏ－ｔａｉｌ）二量体可動要素酵素は、ジンクフィンガータンパク質（ＺｎＦ）、ＴＡＬＥ及びＣａｓ９／ガイドＲＮＡ　ＤＮＡバインダーを使用して、ヒトゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）を標的とするように設計される。ＤＮＡ構築物及びＲＮＡ構築物の両方が図１Ａ～Ｂに示される。図１Ａ及び図１Ｃは、ＤＮＡヘルパー構築物を示すが、図１Ｂは、ＲＮＡヘルパー構築物を示す。全てのＤＮＡ結合タンパク質は、ＴＴＡＡ部位からのセンスまたはアンチセンス方向のいずれかで、１００塩基対、２００塩基対以内のＴＴＡＡ部位を標的とするように設計される。ＺｎＦ配列は、これらの識別ＤＮＡ結合を支配する（Ｃｈｏｏ　Ｙ，Ｋｌｕｇ　Ａ．１９９４　Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９１：１１１６３－１１１７２、Ｃｈｏｏ　Ｙ，Ｋｌｕｇ　Ａ．１９９７　Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔ　Ｂｉｏｌ　７：１１７－１２５）構造ベース（Ｅｌｒｏｄ－Ｅｒｉｃｋｓｏｎ　Ｍ，Ｐａｂｏ　Ｃ．１９９９　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７４：１９２８１－１９２８５）及びデータベース誘導（Ｄｅｓｊａｒｌａｉｓ　Ｊ　Ｒ，Ｂｅｒｇ　Ｊ　Ｍ．；１９９２　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　１２：１０１－１０４）規則を使用することによる、合理的設計に基づいている。ＴＡＬＥとしては、核局在化シグナル（ＮＬＳ）及び転写活性化因子として機能する活性化ドメイン（ＡＤ）が挙げられる。ＤＮＡ結合ドメインは、ＤＮＡリーディング鎖の塩基における残基可変二残基（ＲＶＤ）を有する３３～３４個のアミノ酸のおよそ１６．５個の反復を有する。図１Ａ～Ｂは、ＺｎＦ、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合タンパク質、またはｄＣａｓを含み、２３個のアミノ酸を超える長さであるリンカーによってそれらに融合されたガイドＲＮＡ、またはインテインによって可動要素酵素のＮ末端に内部スプライシングされたガイドＲＮＡを有するキメラ可動要素酵素構築物を示し、ＤＮＡまたはＲＮＡキメラ可動要素酵素構築物のいずれかを含む。図１Ｃは、プロモーターによって駆動される目的の遺伝子を描示する、２つの認識末端またはＩＴＲに隣接しているＤＮＡドナー構築物を示す。図１Ｄは、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする核酸（例えば、ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡ）と、可動要素酵素をコードする核酸（ドナーＤＮＡ）と、を含む、本開示の実施形態による系の非限定的な表現である。ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡは、特異的末端を認識し、フットプリントを伴わない部位特異的な様式でドナーＤＮＡをヒトゲノムにシームレスに挿入する、生物工学的酵素（例えば、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、または可動要素酵素）に翻訳される。キメラ可動要素酵素は、オープンクロマチンで二量体または四量体を形成して、ＺｎＦ、ｄＣａｓ９／ｇＲＮＡまたはＴＡＬＥによって標的とされるＤＮＡ結合領域の近くのＴＴＡＡ（配列番号４４０）認識部位にドナーＤＮＡを挿入する。ＺｎＦ、ＴＡＬＥ、またはＣａｓ９／ｇＲＮＡのゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）への結合は、単量体または二量体としての可動要素酵素を同じ位置に物理的に隔離し、反復可変二残基（ＲＶＤ）ヌクレオチド配列の近くの近傍のＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列への転位を促進する。

【図１Ｂ】標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする核酸（例えば、ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡ）と、可動要素酵素をコードする核酸（ドナーＤＮＡ）と、を含む、本開示の実施形態による系の非限定的な表現を描示する。キメラ、単量体、またはヘッド・トゥ・テール（ｈｅａｄ－ｔｏ－ｔａｉｌ）二量体可動要素酵素は、ジンクフィンガータンパク質（ＺｎＦ）、ＴＡＬＥ及びＣａｓ９／ガイドＲＮＡ　ＤＮＡバインダーを使用して、ヒトゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）を標的とするように設計される。ＤＮＡ構築物及びＲＮＡ構築物の両方が図１Ａ～Ｂに示される。図１Ａ及び図１Ｃは、ＤＮＡヘルパー構築物を示すが、図１Ｂは、ＲＮＡヘルパー構築物を示す。全てのＤＮＡ結

合タンパク質は、ＴＴＡＡ部位からのセンスまたはアンチセンス方向のいずれかで、１００塩基対、２００塩基対以内のＴＴＡＡ部位を標的とするように設計される。ＺｎＦ配列は、これらの識別ＤＮＡ結合を支配する（Ｃｈｏｏ Ｙ，Ｋｌｕｇ Ａ．１９９４ Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９１：１１１６３－１１１７２、Ｃｈｏｏ Ｙ，Ｋｌｕｇ Ａ．１９９７ Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｌ ７：１１７－１２５）構造ベース（Ｅｌｒｏｄ－Ｅｒｉｃｋｓｏｎ Ｍ，Ｐａｂｏ Ｃ．１９９９ Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７４：１９２８１－１９２８５）及びデータベース誘導（Ｄｅｓｊａｒｌａｉｓ Ｊ Ｒ，Ｂｅｒｇ Ｊ Ｍ．；１９９２ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ １２：１０１－１０４）規則を使用することによる、合理的設計に基づいている。ＴＡＬＥとしては、核局在化シグナル（ＮＬＳ）及び転写活性化因子として機能する活性化ドメイン（ＡＤ）が挙げられる。ＤＮＡ結合ドメインは、ＤＮＡリーディング鎖の塩基における残基可変二残基（ＲＶＤ）を有する３３～３４個のアミノ酸のおよそ１６．５個の反復を有する。図１Ａ～Ｂは、ＺｎＦ、ＴＡＬＥ ＤＮＡ結合タンパク質、またはｄＣａｓを含み、２３個のアミノ酸を超える長さであるリンカーによってそれらに融合されたガイドＲＮＡ、またはインテインによって可動要素酵素のＮ末端に内部スプライシングされたガイドＲＮＡを有するキメラ可動要素酵素構築物を示し、ＤＮＡまたはＲＮＡキメラ可動要素酵素構築物のいずれかを含む。図１Ｃは、プロモーターによって駆動される目的の遺伝子を描示する、２つの認識末端またはＩＴＲに隣接しているＤＮＡドナー構築物を示す。図１Ｄは、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする核酸（例えば、ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡ）と、可動要素酵素をコードする核酸（ドナーＤＮＡ）と、を含む、本開示の実施形態による系の非限定的な表現である。ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡは、特異的末端を認識し、フットプリントを伴わない部位特異的な様式でドナーＤＮＡをヒトゲノムにシームレスに挿入する、生物工学的酵素（例えば、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、または可動要素酵素）に翻訳される。キメラ可動要素酵素は、オープンクロマチンで二量体または四量体を形成して、ＺｎＦ、ｄＣａｓ９／ｇＲＮＡまたはＴＡＬＥによって標的とされるＤＮＡ結合領域の近くのＴＴＡＡ（配列番号４４０）認識部位にドナーＤＮＡを挿入する。ＺｎＦ、ＴＡＬＥ、またはＣａｓ９／ｇＲＮＡのゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）への結合は、単量体または二量体としての可動要素酵素を同じ位置に物理的に隔離し、反復可変二残基（ＲＶＤ）ヌクレオチド配列の近くの近傍のＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列への転位を促進する。

【図１Ｃ】標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする核酸（例えば、ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡ）と、可動要素酵素をコードする核酸（ドナーＤＮＡ）と、を含む、本開示の実施形態による系の非限定的な表現を描示する。キメラ、単量体、またはヘッド・トゥ・テール（ｈｅａｄ－ｔｏ－ｔａｉｌ）二量体可動要素酵素は、ジンクフィンガータンパク質（ＺｎＦ）、ＴＡＬＥ及びＣａｓ９／ガイドＲＮＡ ＤＮＡバインダーを使用して、ヒトゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）を標的とするように設計される。ＤＮＡ構築物及びＲＮＡ構築物の両方が図１Ａ～Ｂに示される。図１Ａ及び図１Ｃは、ＤＮＡヘルパー構築物を示すが、図１Ｂは、ＲＮＡヘルパー構築物を示す。全てのＤＮＡ結合タンパク質は、ＴＴＡＡ部位からのセンスまたはアンチセンス方向のいずれかで、１００塩基対、２００塩基対以内のＴＴＡＡ部位を標的とするように設計される。ＺｎＦ配列は、これらの識別ＤＮＡ結合を支配する（Ｃｈｏｏ Ｙ，Ｋｌｕｇ Ａ．１９９４ Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９１：１１１６３－１１１７２、Ｃｈｏｏ Ｙ，Ｋｌｕｇ Ａ．１９９７ Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｌ ７：１１７－１２５）構造ベース（Ｅｌｒｏｄ－Ｅｒｉｃｋｓｏｎ Ｍ，Ｐａｂｏ Ｃ．１９９９ Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７４：１９２８１－１９２８５）及びデータベース誘導（Ｄｅｓｊａｒｌａｉｓ Ｊ Ｒ，Ｂｅｒｇ Ｊ Ｍ．；１９９２ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ １２：１０１－１０４）規則を使用することによる、合理的設計に基づいている。ＴＡＬＥとしては、核局在化シグナル（ＮＬＳ）及び転写活性化因子として機能する活性化ドメイン（ＡＤ）が挙げられる。ＤＮＡ結合ドメインは、ＤＮＡリーディング鎖の塩基における残基可変二残基（ＲＶＤ）を有する３３～３４個のアミノ酸のおよそ１６．５個の反復を有

する。図１Ａ～Ｂは、ＺｎＦ、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合タンパク質、またはｄＣａｓを含み、２３個のアミノ酸を超える長さであるリンカーによってそれらに融合されたガイドＲＮＡ、またはインテインによって可動要素酵素のＮ末端に内部スプライシングされたガイドＲＮＡを有するキメラ可動要素酵素構築物を示し、ＤＮＡまたはＲＮＡキメラ可動要素酵素構築物のいずれかを含む。図１Ｃは、プロモーターによって駆動される目的の遺伝子を描示する、２つの認識末端またはＩＴＲに隣接しているＤＮＡドナー構築物を示す。図１Ｄは、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする核酸（例えば、ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡ）と、可動要素酵素をコードする核酸（ドナーＤＮＡ）と、を含む、本開示の実施形態による系の非限定的な表現である。ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡは、特異的末端を認識し、フットプリントを伴わない部位特異的な様式でドナーＤＮＡをヒトゲノムにシームレスに挿入する、生物工学的酵素（例えば、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、または可動要素酵素）に翻訳される。キメラ可動要素酵素は、オープンクロマチンで二量体または四量体を形成して、ＺｎＦ、ｄＣａｓ９／ｇＲＮＡまたはＴＡＬＥによって標的とされるＤＮＡ結合領域の近くのＴＴＡＡ（配列番号４４０）認識部位にドナーＤＮＡを挿入する。ＺｎＦ、ＴＡＬＥ、またはＣａｓ９／ｇＲＮＡのゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）への結合は、単量体または二量体としての可動要素酵素を同じ位置に物理的に隔離し、反復可変二残基（ＲＶＤ）ヌクレオチド配列の近くの近傍のＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列への転位を促進する。

【図１Ｄ】標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする核酸（例えば、ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡ）と、可動要素酵素をコードする核酸（ドナーＤＮＡ）と、を含む、本開示の実施形態による系の非限定的な表現を描示する。キメラ、単量体、またはヘッド・トゥ・テール（ｈｅａｄ－ｔｏ－ｔａｉｌ）二量体可動要素酵素は、ジンクフィンガータンパク質（ＺｎＦ）、ＴＡＬＥ及びＣａｓ９／ガイドＲＮＡ　ＤＮＡバインダーを使用して、ヒトゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）を標的とするように設計される。ＤＮＡ構築物及びＲＮＡ構築物の両方が図１Ａ～Ｂに示される。図１Ａ及び図１Ｃは、ＤＮＡヘルパー構築物を示すが、図１Ｂは、ＲＮＡヘルパー構築物を示す。全てのＤＮＡ結合タンパク質は、ＴＴＡＡ部位からのセンスまたはアンチセンス方向のいずれかで、１００塩基対、２００塩基対以内のＴＴＡＡ部位を標的とするように設計される。ＺｎＦ配列は、これらの識別ＤＮＡ結合を支配する（Ｃｈｏｏ　Ｙ，Ｋｌｕｇ　Ａ．１９９４　Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　９１：１１１６３－１１１７２、Ｃｈｏｏ　Ｙ，Ｋｌｕｇ　Ａ．１９９７　Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔ　Ｂｉｏｌ　７：１１７－１２５）構造ベース（Ｅｌｒｏｄ－Ｅｒｉｃｋｓｏｎ　Ｍ，Ｐａｂｏ　Ｃ．１９９９　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７４：１９２８１－１９２８５）及びデータベース誘導（Ｄｅｓｊａｒｌａｉｓ　Ｊ　Ｒ，Ｂｅｒｇ　Ｊ　Ｍ．；１９９２　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　１２：１０１－１０４）規則を使用することによる、合理的設計に基づいている。ＴＡＬＥとしては、核局在化シグナル（ＮＬＳ）及び転写活性化因子として機能する活性化ドメイン（ＡＤ）が挙げられる。ＤＮＡ結合ドメインは、ＤＮＡリーディング鎖の塩基における残基可変二残基（ＲＶＤ）を有する３３～３４個のアミノ酸のおよそ１６．５個の反復を有する。図１Ａ～Ｂは、ＺｎＦ、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合タンパク質、またはｄＣａｓを含み、２３個のアミノ酸を超える長さであるリンカーによってそれらに融合されたガイドＲＮＡ、またはインテインによって可動要素酵素のＮ末端に内部スプライシングされたガイドＲＮＡを有するキメラ可動要素酵素構築物を示し、ＤＮＡまたはＲＮＡキメラ可動要素酵素構築物のいずれかを含む。図１Ｃは、プロモーターによって駆動される目的の遺伝子を描示する、２つの認識末端またはＩＴＲに隣接しているＤＮＡドナー構築物を示す。図１Ｄは、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする核酸（例えば、ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡ）と、可動要素酵素をコードする核酸（ドナーＤＮＡ）と、を含む、本開示の実施形態による系の非限定的な表現である。ヘルパーＲＮＡまたはＤＮＡは、特異的末端を認識し、フットプリントを伴わない部位特異的な様式でドナーＤＮＡをヒトゲノムにシームレスに挿入する、生物工学的酵素（例えば、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、または可動要素酵素）に翻訳される。キメラ可動要素酵素は、オープンクロマチンで

二量体または四量体を形成して、ＺｎＦ、ｄＣａｓ９／ｇＲＮＡまたはＴＡＬＥによって標的とされるＤＮＡ結合領域の近くのＴＴＡＡ（配列番号４４０）認識部位にドナーＤＮＡを挿入する。ＺｎＦ、ＴＡＬＥ、またはＣａｓ９／ｇＲＮＡのゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）への結合は、単量体または二量体としての可動要素酵素を同じ位置に物理的に隔離し、反復可変二残基（ＲＶＤ）ヌクレオチド配列の近くの近傍のＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列への転位を促進する。

【図２】ＣＡＲ免疫（例えば、ＣＡＲ－Ｔ）細胞を産生するための、本開示の本実施形態の概略図を描示する。

【図３】自己抗原ＡｃｈＲをＣＡＡＲ細胞外ドメインとして有するキメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）の概略図を描示する。ＡｃｈＲ　ＣＡＡＲのパネルは、ＣＤ１９臨床試験で首尾よく使用された二量体化能のある（ｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ－ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ）ＣＤ８ａ膜貫通ドメイン及びＣＤ１３７－ＣＤ３ｚ細胞質シグナル伝達ドメインに融合された、細胞外ドメインとしてのＡｃｈＲドメイン（Ｅ２－Ｅ６）を使用して、一次ヒトＴ細胞における発現のために設計された。

【図４】エクスビボでの分析のために３人の異なる健康なドナーからＧＦＰまたはＣＤ１９－ＣＡＲ－Ｔ細胞のいずれかを生成するためのＴ細胞プロセスの実験設計の概略図を描示する。

【図５】ナノプラスミドドナー－ＤＮＡが、採取時の５０％超の統合９０％超の生存率を伴って、Ｔ細胞においてプラスミド及びｄｂＤＮＡ骨格よりも優れていることを示す結果を描示する。Ａは、電気穿孔の１日後及び１１日後でのフローサイトメトリーによるＧＦＰ導入遺伝子発現を描示する。Ｂは、１５日目のヒト一次Ｔ細胞についての統合効率％及び生存％を示す。

【図６】いくつかのｍＲＮＡが、採取時にＴ細胞において、約５０％の発現、６０％超の統合、及び５９～７５％の生存率を達成することができることを示す結果を描示する。Ａは、電気穿孔の１４日後でのＧＦＰ導入遺伝子発現％を描示する。Ｂは、電気穿孔の１４日後での統合効率％を描示する。Ｃは、クリーンキャップ（３４Ａ）ｍＲＮＡについての電気穿孔の１４日後での代表的なフロープロットを描示する。

【図７】１：２及び１：５のドナー：ｍＲＮＡ比が、ＥＰの１１日後で最高のＧＦＰ＋細胞を示すことを示す結果を描示する。Ａは、電気穿孔の１１日後でのＧＦＰ導入遺伝子発現を描示する。Ｂは、電気穿孔の１１日後でのＴ細胞生存率を描示する。Ｃは、電気穿孔の１１日後でのＧＦＰ平均蛍光強度（ＭＦＩ）を描示する。結果は、ＧＦＰ＋細胞の最大数が２ｕｇのドナーにあったことを示す。

【図８】１ｕｇ及び２ｕｇのドナーが、ＥＰの１１日後でより高いｍＲＮＡ比において同様の統合％を示すことを示す結果を描示する。Ａは、電気穿孔の１１日後での代表的なフロープロットを描示する。Ｂは、電気穿孔の１１日後での統合効率％を描示する。結果は、次のステップが１：５の比に焦点を当てるべきであることを示唆している。

【図９】ＭＬＴトランスポザーゼによるＴ細胞の効率的な操作が安定なＧＦＰ及びＣＡＲ発現を示すこと、ならびに良好な安全性プロファイルを示すことを示す結果を描示する。Ａは、電気穿孔の１日後及び１２日後でのＧＦＰ導入遺伝子発現を描示する。Ｂは、電気穿孔の１４日後でのＣＤ１９－ＣＡＲ発現を描示する。Ｃは、経時的な生存細胞の数を描示する。

【図１０】ＣＤ１９発現腫瘍標的細胞を効率的に死滅させるＭＬＴトランスポザーゼによって生成された３人の健康なドナーからのＣＤ１９－ＣＡＲ－Ｔ細胞のエクスビボでの有効性を描示する。Ａは、ＣＤ１９陰性Ｋ５６２赤白血病細胞に対する対照及びＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞毒性を示すＣＤ１９－データを描示する。Ｂは、ＣＤ１９陽性Ｂ細胞白血病及びリンパ腫細胞に対する対照及びＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞毒性を描示する。

【図１１】ＣＤ１９発現腫瘍標的の認識時のＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞による高レベルの炎症誘発性サイトカイン放出を示すことによって、エクスビボでの有効性を描示する。Ａは、対照またはＣＤ１９－もしくはＣＤ１９＋白血病細胞とともにＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ

細胞を共培養した際に上清中に放出されるＩＦＮｇ及びＴＮＦａのレベルを描示する。Ｂは、対照またはＣＤ１９－もしくはＣＤ１９＋白血病細胞とともにＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞を共培養した際に上清中に放出されるＧＺＭＢのレベルを描示する。

【図１２】１４日目の２１～２６％（濃縮なし）のＣＤ１９－ＣＡＲ発現及び９５％超の生存率を描示する。Ａは、収集時の非トランスフェクトＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞のフローサイトメトリーによるＣＡＲ発現を描示する（Ｄ１４）。Ｂは、収集時のＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞の生存率を描示する（Ｄ１４）。

【図１３】ＣＤ１９　ＣＡＲ$^+$Ｔ細胞がＣＡＲ$^-$Ｔ細胞のＣＤ４：ＣＤ８比と同様のＣＤ４：ＣＤ８比を呈することを示す結果を描示する。Ａは、対照及びＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞のフローサイトメトリーによるＣＤ４及びＣＤ８の発現を描示する。Ｂは、図１３Ａに示されるＣＤ４及びＣＤ８集団のパーセンテージを描示する。

【図１４】ＣＤ１９－ＣＡＲ$^+$Ｔ細胞がＣＡＲ$^-$Ｔ細胞と同様の好ましいメモリー表現型を呈することを示す結果を描示する。好ましいメモリー表現型は、ほとんどの場合、T_{CM}及びT_{SCM}のものを呈する。Ａは、メモリーＴ細胞分化の異なる段階の概略図を描示する。Ｂは、T_{scm}、T_{cm}、T_{em}、及びT_{eff}集団の代表的なフロープロット及びパーセンテージを描示する。

【図１５】ＣＤ１９－ＣＡＲ$^+$Ｔ細胞が、２つの疲弊マーカーの低い発現を伴う非疲弊表現型を呈することを示す結果を描示する。疲弊マーカーは、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３である。Ａは、フローサイトメトリーによる疲弊マーカーＰＤ－１、ＬＡＧ－３、及びＴＩＭ－３の発現を描示する。Ｂは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、またはＴＩＭ－３を発現するＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞のパーセンテージを描示する。

【発明を実施するための形態】

【００２６】

本開示は、部分的には、ＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞生成が、酵素転位の使用によってより効率的になることができるという発見に基づく。

【００２７】

態様では、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、対象から得られたサンプルから免疫細胞を得ることであって、サンプルが、免疫細胞または免疫細胞前駆体を含む、得ることと、免疫細胞を、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、任意選択的に、第１の核酸が、ＲＮＡである、第１の核酸、及びキメラＣＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる酵素、例えば、限定されないが、可動要素酵素によって認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸でトランスフェクトし、それによって、トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞を作製することと、を含み、免疫細胞が、Ｔ細胞、マクロファージ、及びＮＫ細胞から選択される、方法が提供される。

【００２８】

態様では、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、対象に、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、第１の核酸が、ＲＮＡである、第１の核酸、及びキメラＣＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる酵素、例えば、限定されないが、可動要素酵素によって認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸を投与することを含み、投与が、第１の核酸及び第２の核酸を免疫細胞に指向することができる脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を使用し、それによって、ＣＡＲ免疫細胞を作製し、免疫細胞が、Ｔ細胞、マクロファージ、及びＮＫ細胞から選択される、方法が提供される。

【００２９】

態様では、キメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、対象から得られたサンプルから細胞を得ることであって、サンプルが、Ｔ細胞またはＴ細胞前駆体を含む、得ることと、細胞を、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、第１の核酸が、ＲＮＡである、第１の核酸、及び自己抗原またはその断片を含むキメラＣＡＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行

することができる酵素、例えば、限定されないが、可動要素酵素によって認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸でトランスフェクトし、それによって、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞を作製することと、を含む、方法が提供される。

【００３０】

態様では、キメラ自己抗体受容体（ＣＡＡＲ）免疫細胞を作製する方法であって、対象における皮膚細胞に、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする第１の核酸であって、第１の核酸が、ＲＮＡである、第１の核酸、及び自己抗原またはその断片を含むキメラＣＡＡＲを含むドナーＤＮＡをコードし、標的ゲノム統合を実行することができる酵素、例えば、限定されないが、可動要素酵素によって認識される末端が隣接する第２の非ウイルス核酸を投与することを含み、投与が、皮内または皮下送達を介し、かつ第１の核酸及び第２の核酸を免疫細胞に指向することができる脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を使用して実行され、それによって、ＣＡＲ免疫細胞を作製する、方法が提供される。

【００３１】

実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素は、導入遺伝子（複数可）をＴＣＲ、ＭＨＣクラスＩ、及びＭＨＣクラスＩＩに挿入する。実施形態では、酵素は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）（例えば、限定されないが、ＴＲＡＣ）における標的ゲノム統合を実行することができる。実施形態では、酵素は、主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩ（例えば、限定されないが、Ｂ２Ｍ）における標的ゲノム統合を実行することができる。実施形態では、酵素は、ＭＨＣクラスＩＩ（例えば、限定されないが、ＣＩＩＴＡ）における標的ゲノム統合を実行することができる。

【００３２】

実施形態では、導入遺伝子は、Ｔ細胞受容体アルファ定常（ＴＲＡＣ）遺伝子である。実施形態では、導入遺伝子は、β２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）遺伝子である。実施形態では、導入遺伝子は、ＣＩＩＴＡ遺伝子である。実施形態では、導入遺伝子は、ＰＤＬ遺伝子、任意選択的に、プログラム細胞死リガンド－１（ＰＤＬ－１）遺伝子である。

【００３３】

実施形態では、酵素は、ＴＣＲに関連する遺伝子、任意選択的に、ＴＲＡＣ遺伝子を標的とすることができる。実施形態では、酵素は、ＭＨＣクラスＩに関連する遺伝子、任意選択的に、Ｂ２Ｍ遺伝子を標的とすることができる。実施形態では、酵素は、ＭＨＣクラスＩＩに関連する遺伝子、任意選択的に、ＣＩＩＴＡ遺伝子を標的とすることができる。

【００３４】

ＣＡＲ免疫細胞、ＣＡＡＲ免疫細胞等の生成

態様では、本開示は、標的ゲノム統合を実行することができる酵素を介するＣＡＲ免疫細胞及び／またはＣＡＡＲ免疫細胞の産生に関する。実施形態では、本方法は、エクスビボまたはインビボで実施される。

【００３５】

実施形態では、免疫細胞は、Ｔ細胞、マクロファージ、及びＮＫ細胞から選択される。

【００３６】

実施形態では、免疫細胞はＴ細胞である。実施形態では、Ｔ細胞は一次Ｔ細胞を含む。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞はＣＡＲ－Ｔ細胞であり、任意に同種ＣＡＲ－Ｔ細胞または同種ＣＡＲ－Ｔ細胞から選択される。

【００３７】

実施形態では、免疫細胞はマクロファージである。実施形態では、マクロファージは一次マクロファージを含む。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞はＣＡＲ－Ｍ細胞であり、任意選択的に同種ＣＡＲ－Ｍ細胞または同種ＣＡＲ－Ｍ細胞から選択される。

【００３８】

実施形態では、免疫細胞はナチュラルキラー（ＮＫ）細胞である。実施形態では、ＮＫ細胞は一次ＮＫ細胞を含む。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞はＣＡＲ－ＮＫ細胞であり、任意選択的に同種ＣＡＲ－ＮＫ細胞または同種ＣＡＲ－ＮＫ細胞

から選択される。

【００３９】

実施形態では、免疫細胞はＴ細胞である。実施形態では、Ｔ細胞は一次Ｔ細胞を含む。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞はＣＡＡＲ－Ｔ細胞であり、任意に同種ＣＡＡＲ－Ｔ細胞または同種ＣＡＡＲ－Ｔ細胞から選択される。

【００４０】

実施形態では、免疫細胞はマクロファージである。実施形態では、マクロファージは一次マクロファージを含む。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞はＣＡＡＲ－Ｍ細胞であり、任意選択的に同種ＣＡＡＲ－Ｍ細胞または同種ＣＡＡＲ－Ｍ細胞から選択される。

【００４１】

実施形態では、免疫細胞はナチュラルキラー（ＮＫ）細胞である。実施形態では、ＮＫ細胞は一次ＮＫ細胞を含む。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞はＣＡＡＲ－ＮＫ細胞であり、任意選択的に同種ＣＡＡＲ－ＮＫ細胞または同種ＣＡＡＲ－ＮＫ細胞から選択される。

【００４２】

実施形態では、本方法は、トランスフェクションまたは投与前に細胞を活性化することを含み、活性化は、任意選択的に、細胞を抗ＣＤ３抗体またはそのＣＤ３結合断片と接触させることを含む。

【００４３】

実施形態では、本方法は、トランスフェクションまたは投与前に細胞を刺激して、細胞の集合を作製することを含み、刺激は、任意選択的に、細胞を、抗ＣＤ２８抗体もしくはそのＣＤ２８結合断片、Ｂ７－１もしくはそのＣＤ２８結合断片、またはＢ７－２もしくはそのＣＤ２８結合断片と接触させることを含む。

【００４４】

実施形態では、キメラＣＡＡＲは、自己抗原またはその断片を含む。実施形態では、自己抗原またはその断片は、自己抗体またはＢ細胞受容体（ＢＣＲ）を標的とする細胞外ドメインである。実施形態では、細胞外ドメインはＡＣｈＲ自己抗原である。実施形態では、ＡＣｈＲ自己抗原はドメインＥ２～Ｅ６を含み、ＡＣｈＲ自己抗原はＣＤ８アルファ鎖膜貫通ドメイン及びＣＤ１３７－ＣＤ３ｚ細胞質シグナル伝達ドメインに融合されている。実施形態では、細胞外ドメインは、筋肉特異的キナーゼ（ＭｕＳＫ）細胞外ドメインである。実施形態では、細胞外ドメインはデスモグレイン３（Ｄｓｇ３）である。実施形態では、細胞外ドメインはデスモグレイン１（Ｄｓｇ１）である。実施形態では、自己抗原またはその断片は、同種である。実施形態では、自己抗原またはその断片は、異種である。実施形態では、本方法は、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞を、ＣＡＡＲ免疫細胞の増殖を選択的に増強する培地中で培養することを含む。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞は、約１日または約２日で作製される。実施形態では、トランスフェクトされたＣＡＡＲ免疫細胞は、２日未満で作製される。実施形態では、本方法は、エクスビボでのＣＡＡＲ－免疫細胞の拡大の使用を排除する。

【００４５】

実施形態では、ＣＡＡＲは、Ｂ細胞上で発現される自己抗体、膜貫通ドメイン、及び／または細胞内シグナル伝達ドメインに結合する細胞外ドメインを含む。実施形態では、Ｂ細胞上で発現される自己抗体に結合する細胞外ドメインは、Ｄｓｇ１、Ｄｓｇ３、またはその断片を含む。実施形態では、ＣＡＡＲは、本明細書の他の場所で開示されているもの等の膜貫通ドメインを含む。実施形態では、ＣＡＡＲは、膜貫通ドメイン、例えば、これらに限定されないが、ヒトＴ細胞表面糖タンパク質ＣＤ８アルファ鎖ヒンジ及び／または膜貫通ドメインを含む。実施形態では、ＣＡＡＲは、本明細書の他の場所で開示されているもの等の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。実施形態では、ＣＡＡＲは、抗原受容体の関与に続いて、シグナル伝達を開始するために協力して作用するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）及び共受容体の細胞質部分等の細胞内シグナル伝達ドメイン、ならびにその任意の誘導

体またはバリアントを含む。

【００４６】

実施形態では、ドナーＤＮＡは、膜貫通ドメインの核酸配列、共刺激分子の細胞内ドメインの核酸配列、及びシグナル伝達ドメインの核酸配列のうちの１つ以上を含むか、またはさらに含む。実施形態では、ドナーＤＮＡは、ＣＤ８アルファ鎖シグナルペプチドの核酸配列を含むか、またはさらにそれを含む。実施形態では、膜貫通ドメインの核酸配列は、ＣＤ８アルファ鎖ヒンジ及び膜貫通ドメインをコードする。実施形態では、ドナーＤＮＡはペプチドリンカーの核酸配列をさらに含む。実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインの核酸配列は、ＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含む。実施形態では、第２の核酸は、Ｔ細胞細胞質シグナル伝達ドメインに融合されたＣＤ１９に対する細胞外単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）抗体をコードする。実施形態では、第２の核酸は、可撓性リンカーによって特異的抗体のＶＨに連結されたＶＬ、膜貫通ドメインの少なくとも一部、内因性タンパク質の細胞質、任意選択的に細胞外ドメインの少なくとも一部を含む単鎖Ｆｖドメイン（ｓｃＦｖ）をコードする。実施形態では、ｓｃＦｖドメインは、腫瘍細胞または腫瘍細胞マーカーに対する抗体のｓｃＦｖドメインである。実施形態では、ｓｃＦｖドメインは、ウイルスに対する抗体のｓｃＦｖドメインである。

【００４７】

実施形態では、内因性タンパク質は、リンパ球受容体鎖、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体のポリペプチド、またはＦｃもしくはＩＬ－２受容体のサブユニットである。実施形態では、第２の核酸は、抗原特異的Ｔ細胞受容体のα、β、γ、またはδ鎖をコードする。

【００４８】

実施形態では、ドナーＤＮＡは、ＣＡＲの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインをコードする核酸を含む。

【００４９】

実施形態では、細胞内ドメインは、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＩＬ－２Ｒβ、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＧＩＴＲ、ＴＩＭ３、ＤＡＰ１０、ＣＤ４０、ＰＤ－１、ＩＣＯＳ、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、及びそれらの任意の組み合わせから選択される共刺激分子の細胞内ドメインを含む共刺激シグナル伝達領域を含む。

【００５０】

実施形態では、ＣＡＲは、アルファ葉酸受容体、５Ｔ４、αｖβ６インテグリン、ＢＣＭＡ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ６、ＣＡＩＸ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ４４、ＣＤ４４ｖ６、ＣＤ４４ｖ７／８、ＣＤ７０、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ１２３、ＣＤ１３８、ＣＤ１７１、ＣＥＡ、ＣＳＰＧ４、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ２）を含むＥＧＦＲファミリー、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＧＰ２、ＥＧＰ４０、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、ＥｐＣＡＭ、ＦＡＰ、胎児ＡｃｈＲ、ＧＤ２、ＧＤ３、グリピカン－３（ＧＰＣ３）、ＨＬＡ－Ａ１＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ２＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ３＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ１＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＨＬＡ－Ａ２＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＨＬＡ－Ａ３＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＩＬ－１１Ｒα、ＩＬ－１３Ｒα２、ラムダ、ルイス－Ｙ、カッパ、メソテリン、Ｍｕｃ１、Ｍｕｃ１６、ＮＣＡＭ、ＮＫＧ２Ｄリガンド、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＰＲＡＭＥ、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＯＲ１、ＳＳＸ、サバイビン、ＴＡＧ７２、ＴＥＭ、及びＶＥＧＦＲ２から選択される抗原に結合する細胞外ドメインを含む。

【００５１】

実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ８α、ＣＤ４、ＣＤ２８、ＣＤ４５、ＰＤ－１、及びＣＤ１５２から選択されるポリペプチドに由来する膜貫通ドメインを含む。

【００５２】

実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ２８、ＣＤ５４（ＩＣＡＭ）、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）、ＣＤ１３７（４１ＢＢ）、ＩＬ－２Ｒβ、ＣＤ１５２（ＣＴＬＡ４）、ＣＤ２７３（ＰＤ－Ｌ２）、ＣＤ２７４（ＰＤ－Ｌ１）、及びＣＤ２７８（ＩＣＯＳ）から選択される１

つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【００５３】

実施形態では、ＣＡＲは、ＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）シグナル伝達ドメインを含む。

【００５４】

実施形態では、ＣＡＲは、アルファ葉酸受容体、５Ｔ４、αｖβ６インテグリン、ＢＣＭＡ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ６、ＣＡＩＸ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ４４、ＣＤ４４ｖ６、ＣＤ４４ｖ７／８、ＣＤ７０、ＣＤ７９ａ、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ１２３、ＣＤ１３８、ＣＤ１７１、ＣＥＡ、ＣＳＰＧ４、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ２）を含むＥＧＦＲファミリー、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＧＰ２、ＥＧＰ４０、ＥＰＣＡＭ、ＥｐｈＡ２、ＥｐＣＡＭ、ＦＡＰ、胎児ＡｃｈＲ、ＧＤ２、ＧＤ３、グリピカン－３（ＧＰＣ３）、ＨＬＡ－Ａ１＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ２＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ３＋ＭＡＧＥ１、ＨＬＡ－Ａ１＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＨＬＡ－Ａ２＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＨＬＡ－Ａ３＋ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＩＬ－１１Ｒα、ＩＬ－１３Ｒα２、ラムダ、ルイス－Ｙ、カッパ、メソテリン、Ｍｕｃ１、Ｍｕｃ１６、ＮＣＡＭ、ＮＫＧ２Ｄリガンド、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＰＲＡＭＥ、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＯＲ１、ＳＳＸ、サバイビン、ＴＡＧ７２、ＴＥＭ、及びＶＥＧＦＲ２から選択される抗原に結合する細胞外ドメイン；ＣＤ８α、ＣＤ４、ＣＤ２８、ＣＤ４５、ＰＤ－１、及びＣＤ１５２から選択されるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン；ＣＤ２８、ＣＤ５４（ＩＣＡＭ）、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）、ＣＤ１３７（４１ＢＢ）、ＩＬ－２Ｒβ、ＣＤ１５２（ＣＴＬＡ４）、ＣＤ２７３（ＰＤ－Ｌ２）、ＣＤ２７４（ＰＤ－Ｌ１）、及びＣＤ２７８（ＩＣＯＳ）から選択される１つ以上の細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン；ならびにＣＤ３ゼータ（ＣＤ３ζ）シグナル伝達ドメインを含む。

【００５５】

実施形態では、本開示の方法で使用されるＣＡＲは、（ｉ）抗原特異的標的ドメイン、（ｉｉ）スペーサードメイン、（ｉｉｉ）膜貫通ドメイン、（ｉｖ）少なくとも１つの共刺激ドメイン、及び／または（ｖ）細胞内シグナル伝達ドメインを含む組換えキメラ受容体である。

【００５６】

実施形態では、本開示の方法で使用されるＣＡＲの細胞外ドメインは、目的の標的抗原に結合する機能を有する抗原特異的標的ドメインを含む。実施形態では、抗原特異的標的ドメインは、標的抗原に特異的に結合する、任意の自然に生じる、合成、半合成、または組換え技術により産生された分子、タンパク質、ペプチド、またはオリゴペプチドであり得る。可能な抗原特異的標的ドメインの例としては、抗体または抗体断片もしくは誘導体、分子を含む標的受容体の合成または自然に生じるリガンド、受容体の結合または細胞外ドメイン、あるいは結合タンパク質が挙げられる。実施形態では、抗原特異的標的ドメインは、抗体であるか、または抗体に由来する。抗体は、抗原と結合することができる免疫グロブリンに由来するタンパク質またはポリペプチド配列である。本明細書で使用される抗体としては、天然または組換え供給源に由来するかどうかにかかわらず、ポリクローナルまたはモノクローナル、多重または単鎖抗体、及び免疫グロブリンが挙げられる。抗体由来の標的ドメインは、抗体の断片または抗体の１つ以上の断片の遺伝子操作された生成物であり得、断片は、抗原との結合に関与する。例としては、可変領域（Ｆｖ）、相補性決定領域（ＣＤＲ）、Ｆａｂ、単鎖抗体（ｓｃＦｖ）、重鎖可変領域（ＶＦＩ）、軽鎖可変領域（ＶＬ）、及びラクダ科抗体（ＶＨＨ）が挙げられる。実施形態では、結合ドメインは単鎖抗体（ｓｃＦｖ）である。ｓｃＦｖは、マウス、ヒト、またはヒト化ｓｃＦｖであり得る。

【００５７】

実施形態では、本開示の方法で使用されるＣＡＲは、抗原特異的標的ドメインを膜貫通ドメインに接続する細胞外スペーサードメインを含む。スペーサーとして使用される最も一般的な配列は、定常免疫グロブリンＩｇＧ１ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３　Ｆｃドメインである。このスペーサーの変異体及び／またはバリアント、例えば、Ｆｃ受容体結合を低減

するものが用いられ得る。

【００５８】

実施形態では、本開示の方法で使用されるＣＡＲは、スペーサードメインとシグナル伝達ドメインとの間に膜貫通ドメインを含む。実施形態では、膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来し得る。実施形態では、天然供給源に由来するドメインは、Ｉ型、ＩＩ型、またはＩＩＩ型膜貫通タンパク質のうちのいずれかを含む、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質からの膜貫通配列を含み得る。実施形態では、ＣＡＲで使用され得る膜貫通領域は、Ｔ細胞受容体、ＣＤ２８、ＣＤ３エプシロン、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、ＣＤ２４４（２Ｂ４）、ＤＡＰ１０、またはＤＡＰ１２のアルファ、ベータ、またはゼータ鎖に由来し得る。実施形態では、合成供給源に由来するドメインは、ロイシン及びバリン等の残基を含む疎水性配列を主に含む。

【００５９】

実施形態では、本開示の方法で使用されるＣＡＲは、例えば、細胞質尾部に、１つ以上の共刺激ドメインを含み得る。そのようなドメインは、１つ以上の共刺激タンパク質受容体（例えば、ＣＤ２８、４１ＢＢ、ＩＣＯＳ）の細胞内シグナル伝達ドメインからなり得る。実施形態では、共刺激ドメインは、細胞に追加のシグナルを提供し、したがって、細胞の拡大、細胞の生存、及びメモリー細胞の発達を増強する。実施形態では、本開示の方法で使用されるＣＡＲは、ＴＮＦＲスーパーファミリーのメンバー、ＣＤ２８、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）、Ｄａｐ１０、ＣＤ２７、ＣＤ２、ＣＤ５、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１、Ｌｃｋ、ＴＮＦＲ－１、ＴＮＦＲ－ＩＩ、Ｆａｓ、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ２４４（２Ｂ４）、ＤＡＰ１２、またはそれらの組み合わせの細胞内ドメインからなる群から選択される１つ以上の共刺激ドメインを含み得る。共刺激ドメインのさらなる例が、ＣＡＲにおいて当業者によって採用され得る。

【００６０】

実施形態では、本開示の方法で使用されるＣＡＲはまた、細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。このドメインは、細胞質であり得、活性化シグナルを伝達し、その特殊な機能を実行するように細胞を指向する。細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、Ｔ細胞受容体のｚ鎖またはその相同体のうちのいずれか（例えば、ｈ鎖、ＦｃＲｌｙ及びｂ鎖、ＭＢ１（Ｉｇａ）鎖、Ｂ２９（ＩｇＰ）鎖等）、ＣＤ３ポリペプチド（Ｄ、ｄ及びｅ）、ｓｙｋファミリーチロシンキナーゼ（Ｓｙｋ、ＺＡＰ７０等）、ｓｒｃファミリーチロシンキナーゼ（Ｌｃｋ、Ｆｙｎ、Ｌｙｎ等）、及びＴ細胞シグナル伝達に関与する他の分子、例えば、ＣＤ２、ＣＤ５及びＣＤ２８が挙げられるが、これらに限定されない。実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトＣＤ３ゼータ鎖、ＦｃｙＲＩＩＩ、ＦｃｓＲＩ、Ｆｃ受容体の細胞質尾部、細胞質受容体を有する免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）、またはそれらの組み合わせであり得る。実施形態では、シグナル伝達ドメインは、ヒトＣＤ３ゼータ鎖の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【００６１】

実施形態では、本方法は、トランスフェクトされたＣＡＲ免疫細胞を、ＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞の増殖を選択的に増強する培地中で培養することを含む。

【００６２】

実施形態では、ＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞は、約１日または約２日で作製される。実施形態では、ＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞は、約２日未満、または約３日未満、または約７日未満、または約１４日未満で作製される。

【００６３】

実施形態では、本方法は、ＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞のエクスビボでの拡大の使用を排除する。

【００６４】

実施形態では、皮膚細胞は、表皮または真皮の皮膚細胞である。

【００６５】
実施形態では、細胞外ドメインは、抗原と結合する抗体または抗原結合断片を含む。
【００６６】
実施形態では、細胞は、電気穿孔法、ヌクレオフェクション、流体力学的送達、もしくはリン酸カルシウム沈殿によってトランスフェクトされ、及び／または脂質ビヒクル、任意選択的に、Ｎ－［１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、１，２－ビス（オレオイルオキシ）－３－３－（トリメチルアンモニア）プロパン（ＤＯＴＡＰ）、もしくは１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＤＡＰ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、コレステロール、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ　２０００（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ　３０００（カチオン性リポソーム製剤）、ＴＲＡＮＳＦＥＣＴＡＭ（カチオン性リポソーム製剤）、脂質ナノ粒子、もしくはリポソーム、及びそれらの組み合わせを使用して実施される。
【００６７】
実施形態では、細胞をトランスフェクトすることは、電気穿孔法またはリン酸カルシウム沈殿を使用して実施される。
【００６８】
実施形態では、細胞をトランスフェクトすることは、脂質ビヒクル、任意選択的に、Ｎ－［１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、１，２－ビス（オレオイルオキシ）－３－３－（トリメチルアンモニア）プロパン（ＤＯＴＡＰ）、もしくは１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＤＡＰ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、コレステロール、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ　２０００（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ　３０００（カチオン性リポソーム製剤）、ＴＲＡＮＳＦＥＣＴＡＭ（カチオン性リポソーム製剤）、脂質ナノ粒子、またはリポソーム、及びそれらの組み合わせを使用して実施される。
【００６９】
実施形態では、細胞をトランスフェクトすることは、以下のカテゴリー：カチオン性脂質、アニオン性脂質、中性脂質、多価荷電脂質、及び両性イオン性脂質のうちの１つ以上から選択される脂質を使用して実施される。実施形態では、カチオン性脂質は、核酸との電荷－電荷相互作用を促進するために使用され得る。実施形態では、脂質は中性脂質である。実施形態では、中性脂質は、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、またはコレステロールである。実施形態では、コレステロールは、植物供給源に由来する。他の実施形態では、コレステロールは、動物、真菌、細菌、または古細菌供給源に由来する。実施形態では、脂質はカチオン性脂質である。実施形態では、カチオン性脂質は、Ｎ－［１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、１，２－ビス（オレオイルオキシ）－３－３－（トリメチルアンモニア）プロパン（ＤＯＴＡＰ）、または１，２－ジオレオイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＤＡＰ）である。実施形態では、リン脂質１８：０ＰＣ、１８：１ＰＣ、１８：２ＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＳＰＥ、ＤＯＰＥ、１８：２ＰＥ、ＤＭＰＥ、またはそれらの組み合わせのうちの１つ以上が脂質として使用される。実施形態では、脂質は、任意選択的に約１：１の比で、ＤＯＴＭＡ及びＤＯＰＥである。実施形態では、脂質は、任意選択的に約１：１の比で、ＤＨＤＯＳ及びＤＯＰＥである。実施形態では、脂質は、市販の製品（例えば、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ　２０００（カチオン性リポソーム製剤）、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ　３０００（カチオン

性リポソーム製剤）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））である。
【００７０】
実施形態では、細胞をトランスフェクトすることは、カチオン性ビヒクル、任意選択的に、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮまたはＴＲＡＮＳＦＥＣＴＡＭを使用して実施される。
【００７１】
実施形態では、細胞をトランスフェクトすることは、脂質ナノ粒子またはリポソームを使用して実施される。
【００７２】
実施形態では、本方法は、ヘルパーウイルスを含まない。
【００７３】
実施形態では、第２の核酸は、発現ベクターに含まれている。実施形態では、発現ベクターは、プラスミド含む。実施形態では、発現ベクターは、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含む。
【００７４】
実施形態では、第２の核酸は、ＤＮＡ、任意選択的にｃＤＮＡである。実施形態では、第２の核酸は、プラスミド、任意選択的にナノプラスミド（ｎａｎｏｐｌａｍｉｄ）である。
【００７５】
実施形態では、第２の核酸は、少なくとも１つのクロマチン要素を有し、少なくとも１つのクロマチン要素は、任意選択的に、マトリックス付着領域（ＭＡＲ）要素である。
【００７６】
後成的調節要素は、導入遺伝子を含むベクター上の導入遺伝子の近くに配置されたときに、導入遺伝子を望ましくない後成的効果から保護するために使用され得る。Ｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，ＰｌｏＳ　Ｏｎｅ　ｖｏｌ．８，４　ｅ６２７８４．３０　Ａｐｒ．２０１３、ｄｏｉ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．００６２７８４を参照されたい。例えば、ＭＡＲは、ヒトＭＡＲ１－６８によって例示されるように、ヘテロクロマチンのサイレンシングを防止しながら、導入遺伝子のゲノム統合及び統合を増加させることが示された。同文献を参照されたく、また、Ｇｒａｎｄｊｅａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２０１１　Ａｕｇ；３９（１５）：ｅ１０４も参照されたい。ＭＡＲはまた、インスレーターとして作用し、それによって、隣接する細胞遺伝子の活性化を防止し得る。Ｇａｕｓｓｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．２０１２　Ｊａｎ；１９（１）：１５－２４。ＣＨＯ細胞内にヒトＭＡＲを含有するｐｉｇｇｙＢａｃドナーＤＮＡは、抗生物質選択手順なしで生成された細胞集団を使用して、いくつかの導入遺伝子コピーからの効率的かつ持続した発現を媒介したことが示されている。Ｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）を参照されたい。
【００７７】
実施形態では、細胞は、少なくとも１つのクロマチン要素を有する第３の核酸でさらにトランスフェクトされ、少なくとも１つのクロマチン要素は、任意選択的に、マトリックス付着領域（ＭＡＲ）要素である。ＭＡＲは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＩＢ２０１０／００２３３７（ＷＯ２０１１０３３３７５）に記載されるように、導入遺伝子発現を増強及び／または促進するために使用される発現増強、後成的調節要素である。ＭＡＲ要素は、ドナーＤＮＡに対してシスまたはトランスに位置し得る。
【００７８】
実施形態では、ドナーＤＮＡは、約１００，０００塩基以下、例えば、約１００，０００塩基、もしくは約５０，０００塩基、もしくは約３０，０００塩基、もしくは約１０，０００塩基、もしくは約５，０００塩基、または約１０，０００～約１００，０００塩基、もしくは約３０，０００～約１００，０００塩基、もしくは約５０，０００～約１００，０００塩基、もしくは約１０，０００～約５０，０００塩基、もしくは約１０，０００～約３０，０００塩基、もしくは約３０，０００～約５０，０００塩基のサイズを有する

。
【００７９】
実施形態では、ドナーＤＮＡは、約２００，０００塩基以下、例えば、約２００，０００塩基、または約１０，０００～約２００，０００塩基、もしくは約３０，０００～約２００，０００塩基、もしくは約５０，０００～約２００，０００塩基、もしくは約１００，０００～約２００，０００塩基、もしくは約１５０，０００～約２００，０００塩基のサイズを有する。
【００８０】
実施形態では、酵素及びドナーＤＮＡは、約１対約５、または約１対約４、または約１対約３、または約１対約２、または約１対約１のドナーＤＮＡ対酵素比でトランスフェクトされる。
【００８１】
実施形態では、トランスフェクトされるドナーＤＮＡの量は、約１μｇ～約１０μｇ、もしくは約１μｇ～約８μｇ、もしくは約１μｇ～約６μｇ、もしくは約１μｇ～約４μｇ、または約１μｇ、もしくは約２μｇ、もしくは約５μｇ、もしくは約１０μｇである。
【００８２】
実施形態では、トランスフェクトされるドナーＤＮＡの量は、約１μｇである。
【００８３】
実施形態では、トランスフェクトされるドナーＤＮＡの量は、約２μｇである。
【００８４】
実施形態では、トランスフェクトされるドナーＤＮＡの量は、約１μｇであり、トランスフェクトされる酵素ＲＮＡの量は、約２μｇ、または約５μｇ、または約１０μｇである。
【００８５】
実施形態では、トランスフェクトされたドナーＤＮＡの量は、約２μｇであり、トランスフェクトされた酵素ＲＮＡの量は、約４μｇ、または約８μｇ、または約１０μｇ、または約２０μｇである。
【００８６】
実施形態では、本方法は、トランスフェクション後、約１０日間、または約１２日間、または約１４日間、または約１６日間培養することを含む。実施形態では、得られる細胞は、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９９％の生存率を有する。
【００８７】
実施形態では、本方法は、標的、例えば、腫瘍細胞に対して細胞毒性であるＣＡＲ　Ｔ細胞をもたらす。実施形態では、本方法は、腫瘍細胞における標的認識時にサイトカインの放出を引き起こすＣＡＲ　Ｔ細胞をもたらす。実施形態では、本方法は、腫瘍細胞における標的認識時に、ＩＦＮガンマ、ＴＮＦアルファ、及びグランザイムＢのうちの１つ以上の放出を引き起こすＣＡＲ　Ｔ細胞をもたらす。実施形態では、本方法は、疲弊していないＣＡＲ　Ｔ細胞をもたらす。実施形態では、本方法は、ＰＤ－１及び／またはＬＡＧ－３の低い発現を有するＣＡＲ　Ｔ細胞をもたらす。実施形態では、本方法は、メモリー受容能力がある（ｍｅｍｏｒｙ　ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ）ＣＡＲ　Ｔ細胞をもたらす。
【００８８】
酵素
実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素は、ドナーＤＮＡを１つの位置（例えば、限定されないが、ドナーＤＮＡ）から対象のゲノム内の特定の部位及び／または遺伝子座に挿入させる任意のタイプの酵素である。
【００８９】
実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素は、リコンビナーゼである。

【００９０】
実施形態では、リコンビナーゼは、インテグラーゼである。実施形態では、酵素は、可動要素酵素である。実施形態では、リコンビナーゼは、インテグラーゼまたは可動要素酵素である。
【００９１】
実施形態では、可動要素酵素は、操作された哺乳動物の可動要素酵素である。実施形態では、可動要素酵素は、哺乳動物由来のヘルパーＲＮＡ可動要素酵素である。メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）は、ＲＮＡが体細胞遺伝子療法用途のための可動要素酵素の供給源としてのＤＮＡのより安全な代替物であることを考慮して、体細胞及び組織を標的とするための可動要素酵素の供給源としてのＤＮＡの有効な代替物である。例えば、Ｗｉｌｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１３，６２５－６３０（２００６）を参照されたい。インビトロ転写されたｍＲＮＡの可動要素酵素の一過性供給源としての成功した使用、ならびに培養されたヒト細胞及び生きたマウスにおけるその後の転位は、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ可動要素酵素に関して以前に報告されていた。同文献を参照されたい。インビトロ転写されたＵＴＲ安定化可動要素酵素コードｍＲＮＡは、培養された体細胞におけるＳｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ媒介性転位のための可動要素酵素の供給源として使用され得ることができることが実証された。同文献。また、Ｈｏｅｒｒ ｅｔ ａｌ．は、特異的細胞毒性Ｔ細胞応答及び循環抗原特異的抗体が、インビトロ転写されたＵＴＲ安定化、及びプロタミン縮合細菌ｌａｃＺ ｍＲＮＡをＢａｌｂ／Ｃマウスの耳介に投与した後に検出されたことを報告した。Ｈｏｅｒｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０００；３０：１－７；また、Ｗｉｌｂｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００６）も参照されたい。
【００９２】
実施形態では、可動要素酵素は、哺乳動物由来のＤＮＡ可動要素酵素である。実施形態では、可動要素酵素はキメラ可動要素酵素である。
【００９３】
実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素は、可動要素酵素であり、可動要素酵素は、（ａ）遺伝子編集システムであるかまたはそれを含む標的要素と、（ｂ）本明細書の他の場所で記載されるように、導入遺伝子、キメラＣＡＲ、またはキメラＣＡＡＲを含むドナーＤＮＡを、任意選択的に、ＴＡジヌクレオチド部位またはＴＴＡＡ（配列番号４４０）テトラヌクレオチド部位に、任意選択的に、ゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）に挿入することができる可動要素酵素と、を含む。
【００９４】
実施形態では、酵素は、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｍｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓ、Ｐａｎ ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、またはホモ・サピエンスに由来する。実施形態では、酵素は、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｍｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓ、Ｐａｎ ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、またはホモ・サピエンスに由来する酵素の過剰活性形態を含むが、これらに限定されない、操作されたバージョンである。
【００９５】
実施形態では、酵素は、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｒｈｉｎ

olophus ferrumequinum、Rousettus aegyptiacus、Phyllostomus discolor、Myotis myotis、Pteropus vampyrus、Pipistrellus kuhlii、Molossus molossus、Pan troglodytes、またはホモ・サピエンスに由来する可動要素酵素である。実施形態では、酵素は、Bombyx mori、Xenopus tropicalis、Trichoplusia ni、Myotis lucifugus、Rhinolophus ferrumequinum、Rousettus aegyptiacus、Phyllostomus discolor、Myotis myotis、Pteropus vampyrus、Pipistrellus kuhlii、Molossus molossus、Pan troglodytes、またはホモ・サピエンスに由来する可動要素酵素の過剰活性形態を含むが、これらに限定されない、操作されたバージョンである。

【００９６】

実施形態では、可動要素酵素は、Ｔｎ１、Ｔｎ２、Ｔｎ３、Ｔｎ５、Ｔｎ７、Ｔｎ９、Ｔｎ１０、Ｔｎ５５２、Ｔｎ９０３、Ｔｎ１０００／ガンマ－デルタ、Ｔｎ／Ｏ、ｔｎｓＡ、ｔｎｓＢ、ｔｎｓＣ、ｔｎｉＱ、ＩＳ１０、ＩＳＳ、ＩＳ９１１、Ｍｉｎｏｓ、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ｂｅａｕｔｙ、ｐｉｇｇｙＢａｃ、Ｔｏｌ２、Ｍｏｓ１、Ｈｉｍａｒ１、Ｈｅｒｍｅｓ、Ｔｏｌ２、Ｍｉｎｏｓ、Ｔｅｌ、Ｐ要素、ＭｕＡ、Ｔｙ１、Ｃｈａｐａｅｖ、トランシブ、Ｔｃ１／マリナー、もしくはＴｃ３ドナーＤＮＡ系、または過剰活性変異体を含む、それらの生物学的に活性な断片バリアント（例えば、限定されないが、表１から選択される、もしくはその同等物）のうちの１つ以上からのものである。

【００９７】

実施形態では、可動要素酵素は、小型の茶色コウモリ（Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ）または他のコウモリ可動要素酵素、例えば、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、及びＭｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓから得られるカット・アンド・ペーストＭＬＴ要素に基づくＭＬＴドナーＤＮＡ系からのものである。その全体が参照により本明細書に組み込まれるＭｉｔｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１３ Ｊａｎ ２；１１０（１）：２３４－９、Ｊｅｂｂ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，ｖｏｌｕｍｅ ５８３，ｐａｇｅｓ ５７８－５８４（２０２０）を参照されたい。実施形態では、コウモリ可動要素酵素の過剰活性形態が使用される。ＭＬＴ可動要素酵素は、コウモリ、ヒト、及び酵母細胞内での転位が可能であることが示されている。ＭＬＴ可動要素酵素の過剰活性形態は、転位プロセスを増強する。加えて、キメラＭＬＴ可動要素酵素は、ゲノム統合なしで部位特異的切除が可能である。

【００９８】

実施形態では、可動要素酵素は、野生型、単量体、二量体、四量体（または別の多量体）、過剰活性、Ｉｎｔ－変異体、または任意の他の形態のいずれかである、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ可動要素酵素（ＭＬＴ）である。

【００９９】

実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有するバリアント、ならびにＬ５７３Ｘ、Ｅ５７４Ｘ、及びＳ２Ｘから選択される１つ以上の変異を有し、Ｘは、任意のアミノ酸または非アミノ酸であり、任意選択的に、Ｘは、Ａ、Ｇ、または欠失であり、任意選択的に、変異は、Ｌ５７３ｄｅｌ Ｅ５７４ｄｅｌ、及びＳ２Ａである）。実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号２のヌクレオチド配列（ＭＬＴのコドン最適化形態である）、またはそれに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約

９９％の同一性を有するヌクレオチド配列を有する。
配列番号１は、以下である：
ＭＡＱＨＳＤＹＳＤＤＥＦＣＡＤＫＬＳＮＹＳＣＤＳＤＬＥＮＡＳＴＳＤＥＤＳＳＤＤＥ
ＶＭＶＲＰＲＴＬＲＲＲＲＩＳＳＳＳＳＤＳＥＳＤＩＥＧＧＲＥＥＷＳＨＶＤＮＰＰＶＬ
ＥＤＦＬＧＨＱＧＬＮＴＤＡＶＩＮＮＩＥＤＡＶＫＬＦＩＧＤＤＦＦＥＦＬＶＥＥＳＮＲ
ＹＹＮＱＮＲＮＮＦＫＬＳＫＫＳＬＫＷＫＤＩＴＰＱＥＭＫＫＦＬＧＬＩＶＬＭＧＱＶＲ
ＫＤＲＲＤＤＹＷＴＴＥＰＷＴＥＴＰＹＦＧＫＴＭＴＲＤＲＦＲＱＩＷＫＡＷＨＦＮＮＮ
ＡＤＩＶＮＥＳＤＲＬＣＫＶＲＰＶＬＤＹＦＶＰＫＦＩＮＩＹＫＰＨＱＱＬＳＬＤＥＧＩ
ＶＰＷＲＧＲＬＦＦＲＶＹＮＡＧＫＩＶＫＹＧＩＬＶＲＬＬＣＥＳＤＴＧＹＩＣＮＭＥＩ
ＹＣＧＥＧＫＲＬＬＥＴＩＱＴＶＶＳＰＹＴＤＳＷＹＨＩＹＭＤＮＹＹＮＳＶＡＮＣＥＡ
ＬＭＫＮＫＦＲＩＣＧＴＩＲＫＮＲＧＩＰＫＤＦＱＴＩＳＬＫＫＧＥＴＫＦＩＲＫＮＤＩ
ＬＬＱＶＷＱＳＫＫＰＶＹＬＩＳＳＩＨＳＡＥＭＥＥＳＱＮＩＤＲＴＳＫＫＫＩＶＫＰＮ
ＡＬＩＤＹＮＫＨＭＫＧＶＤＲＡＤＱＹＬＳＹＹＳＩＬＲＲＴＶＫＷＴＫＲＬＡＭＹＭＩ
ＮＣＡＬＦＮＳＹＡＶＹＫＳＶＲＱＲＫＭＧＦＫＭＦＬＫＱＴＡＩＨＷＬＴＤＤＩＰＥＤ
ＭＤＩＶＰＤＬＱＰＶＰＳＴＳＧＭＲＡＫＰＰＴＳＤＰＰＣＲＬＳＭＤＭＲＫＨＴＬＱＡ
ＩＶＧＳＧＫＫＫＮＩＬＲＲＣＲＶＣＳＶＨＫＬＲＳＥＴＲＹＭＣＫＦＣＮＩＰＬＨＫＧ
ＡＣＦＥＫＹＨＴＬＫＮＹ
【０１００】
実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有するバリアントを有し、配列番号１の位置２に対応する位置にセリン以外のアミノ酸を含む。実施形態では、アミノ酸は、非極性脂肪族アミノ酸、任意選択的に、任意選択的にＧ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ及びＰ、任意選択的にＡから選択される非極性脂肪族アミノ酸である。実施形態では、可動要素酵素は、配列番号１に対してＣ末端に追加の残基を有しない。
【０１０１】
実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、それぞれ、配列番号２のヌクレオチド配列（コドン最適化されている）及びアミノ酸配列配列番号１を有する。実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号２のヌクレオチド配列、またはそれに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有するヌクレオチド配列、またはそれらのコドン最適化形態を有する。実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、アミノ酸配列配列番号１、またはそれに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有する。
【０１０２】
実施形態では、可動要素酵素は、ＭＬＴ左末端、またはそれに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有する配列に作用することができ、ＭＬＴ左末端（５’から３’へ）のヌクレオチド配列は、以下の通りである：
ｔｔａａｃａｃｔｔｇｇａｔｔｇｃｇｇｇａａａｃｇａｇｔｔａａｇｔｃｇｇｃｔｃｇｃ
ｇｔｇａａｔｔｇｃｇｃｇｔａｃｔｃｃｇｃｇｇｇａｇｃｃｇｔｃｔｔａａｃｔｃｇｇｔ
ｔｃａｔａｔａｇａｔｔｔｇｃｇｇｔｇｇａｇｔｇｃｇｇｇｇａａａｃｇｔｇｔａａａｃｔ
ｃｇｇｇｃｃｇａｔｔｇｔａａｃｔｇｃｇｔａｔｔａｃｃａａａｔａｔｔｔｇｔｔ（配列番号２１）
【０１０３】
実施形態では、可動要素酵素は、ＭＬＴ右末端、またはそれに対して少なくとも約９０

％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有する配列に作用することができ、ＭＬＴ右末端（５’から３’へ）のヌクレオチド配列は、以下の通りである：

ａａｔｔａｔｔｔａｔｇｔａｃｔｇａａｔａｇａｔａａａａａａａｔｇｔｃｔｇｔｇａｔ
ｔｇａａｔａａａｔｔｔｔｃａｔｔｔｔｔｔａｃａｃａａｇａａａｃｃｇａａａａｔｔｔ
ｃａｔｔｔｃａａｔｃｇａａｃｃｃａｔａｃｔｔｃａａａａｇａｔａｔａｇｇｃａｔｔｔ
ｔａａａｃｔａａｃｔｃｔｇａｔｔｔｔｇｃｇｃｇｇｇａａａｃｃｔａａａｔａａｔｔｇ
ｃｃｃｇｃｇｃｃａｔｃｔｔａｔａｔｔｔｔｇｇｃｇｇｇａａａｔｔｃａｃｃｃｇａｃａ
ｃｃｇｔＡｇｔｇｔｔａａ（配列番号２２）

【０１０４】

実施形態では、ドナーＤＮＡは、１つ以上の末端に隣接している。実施形態では、ドナーＤＮＡは、競合ポリペプチドをコードする遺伝子であるかまたはそれを含む。実施形態では、ドナーＤＮＡは、疾患状態において欠陥があるかまたは実質的に存在しない遺伝子であるか、またはそのような遺伝子を含む。

【０１０５】

実施形態では、本明細書に記載のいずれかを含む酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素、例えば、限定されないが、ＭＬＴ可動要素酵素）は、過剰活性を付与する１つ以上の変異を有する。

【０１０６】

実施形態では、酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素、例えば、限定されないが、ＭＬＴ可動要素酵素）は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性（Ｉｎｔ＋）活性を有する。実施形態では、酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素、例えば、限定されないが、ＭＬＴ可動要素酵素）は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性の欠如（Ｉｎｔ－）を有する。

【０１０７】

実施形態では、可動要素酵素、例えば、限定されないが、ＭＬＴ可動要素酵素は、過剰活性変異、例えば、約１、もしくは約２、もしくは約３、もしくは約４、もしくは約５つの過剰活性変異、またはそれらの組み合わせを含む。実施形態では、可動要素酵素には、本明細書に記載の任意の数の過剰活性変異、またはその同等物を含めることができる。

【０１０８】

実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、過剰活性変異、例えば、約１、もしくは約２、もしくは約３、もしくは約４、もしくは約５つの過剰活性変異、またはそれらの組み合わせを含む。実施形態では、可動要素酵素には、本明細書に記載の任意の数の過剰活性変異、またはその同等物を含めることができる。

【０１０９】

実施形態では、酵素は、表１に対応する１つ以上の変異、またはそれに対応する位置を含み、これは、理論に拘束されることなく、過剰活性変異を提供する。配列番号１のタンパク質のアミノ酸配列及び配列番号２の核酸配列に対する相対的な番号付け。

【表１】

表１：

ヌクレオチド変化	アミノ酸変化
T13C	S5P
T22C	S8P
T22C/T37C	S8P/C13R
A26G	D9G
A29G	D10G
A32G	E11G
T37C	C13R
C41T	A14V
A106G	S36G
G161A	S54N
T375G	N125K
A389C	K130T
G715A	G239S
A880G	T294A
A898G	T300A
A1033G	I345V
G1280A	R427H
A1424G	D475G
A1441G	M481V
C1472A	P491Q
G1558A	A520T
G1681A	A561T

【０１１０】
実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１に対応する位置で、Ｓ８Ｘ１、Ｃ１３Ｘ２、及び／またはＮ１２５Ｘ３から選択される１つ以上のアミノ酸置換を有し、Ｘ１は、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ及びＰから選択され、Ｘ２は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択され、Ｘ３は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択されるか、またはＸ１は、Ｐであり、Ｘ２は、Ｒであり、及び／またはＸ３は、Ｋである。
【０１１１】
実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１に対応する位置で、Ｓ８Ｘ１、Ｃ１３Ｘ２、及びＮ１２５Ｘ３の置換を有し、Ｘ１は、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ及びＰから選択され、Ｘ２は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択され、Ｘ３は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択されるか、またはＸ１は、Ｐであり、Ｘ２は、Ｒであり、及び／またはＸ３は、Ｋである。
【０１１２】
実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１に対応する位置で、Ｓ８Ｘ１及びＣ１３Ｘ２の置換を有し、Ｘ１は、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ及びＰから選択され、Ｘ２は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択され、Ｘ３は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択されるか、またはＸ１は、Ｐであり、Ｘ２は、Ｒであり、及び／またはＸ３は、Ｋである。
【０１１３】

実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１に対応する位置で、Ｓ８Ｘ１及びＮ１２５Ｘ３の置換を有し、Ｘ１は、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ及びＰから選択され、Ｘ２は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択され、Ｘ３は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択されるか、またはＸ１は、Ｐであり、Ｘ２は、Ｒであり、及び／またはＸ３は、Ｋである。

【０１１４】

実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１に対応する位置で、Ｃ１３Ｘ２及びＮ１２５Ｘ３の置換を有し、Ｘ１は、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ及びＰから選択され、Ｘ２は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択され、Ｘ３は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択されるか、またはＸ１は、Ｐであり、Ｘ２は、Ｒであり、及び／またはＸ３は、Ｋである。

【０１１５】

実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１のアミノ酸配列、またはそのバリアント、ならびにＳ８Ｐ及びＣ１３Ｒ変異（配列番号１１）を有する。実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対して、Ｓ８Ｐ及びＣ１３Ｒ変異のうちの少なくとも１つに対応する位置に変異を有するアミノ酸配列を有する。実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１のアミノ酸またはその機能的同等物に対して、Ｓ８Ｐ及びＣ１３Ｒ変異に対応する位置に変異を有するアミノ酸配列を有する。

【０１１６】

実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、配列番号１のアミノ酸配列、またはそのバリアント、ならびにＳ８Ｐ、Ｃ１３Ｒ、及びＮ１２５Ｋ変異（配列番号１０）を有する。

【０１１７】

実施形態では、配列番号１のアミノ酸配列またはそのバリアントを含むＭＬＴ可動要素酵素は、位置Ｓ５、Ｓ８、Ｄ９、Ｄ１０、Ｅ１１、Ｃ１３、Ａ１４、Ｓ３６、Ｓ５４、Ｎ１２５、Ｋ１３０、Ｇ２３９、Ｔ２９４、Ｔ３００、Ｉ３４５、Ｒ４２７、Ｄ４７５、Ｍ４８１、Ｐ４９１、Ａ５２０、及びＡ５６１、またはそれらに対応する位置のうちの１つ以上における置換または欠失から選択される１つ以上の過剰活性変異を含む。

【０１１８】

実施形態では、配列番号１のアミノ酸配列またはそのバリアントを含むＭＬＴ可動要素酵素は、Ｓ５Ｐ、Ｓ８Ｐ、Ｓ８Ｐ／Ｃ１３Ｒ、Ｄ９Ｇ、Ｄ１０Ｇ、Ｅ１１Ｇ、Ｃ１３Ｒ、Ａ１４Ｖ、Ｓ３６Ｇ、Ｓ５４Ｎ、Ｎ１２５Ｋ、Ｋ１３０Ｔ、Ｇ２３９Ｓ、Ｔ２９４Ａ、Ｔ３００Ａ、Ｉ３４５Ｖ、Ｒ４２７Ｈ、Ｄ４７５Ｇ、Ｍ４８１Ｖ、Ｐ４９１Ｑ、Ａ５２０Ｔ、及びＡ５６１Ｔ、またはそれらに対応する位置から選択される１つ以上の過剰活性変異を含む。

【０１１９】

実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、Ｓ８$Ｘ_{1}$、Ｃ１３$Ｘ_{2}$、及び／またはＮ１２５$Ｘ_{3}$から選択される過剰活性変異体のうちの１つ以上（例えば、Ｓ８$Ｘ_{1}$、Ｃ１３$Ｘ_{2}$、及びＮ１２５$Ｘ_{3}$の全て、Ｓ８$Ｘ_{1}$及びＣ１３$Ｘ_{2}$、Ｓ８$Ｘ_{1}$及びＮ１２５$Ｘ_{3}$、ならびにＣ１３$Ｘ_{2}$及びＮ１２５$Ｘ_{3}$）を含み、$Ｘ_{1}$、$Ｘ_{2}$、及び$Ｘ_{3}$は、各々独立して、任意のアミノ酸であるか、または$Ｘ_{1}$は、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ及びＰから選択される非極性脂肪族アミノ酸であり、$Ｘ_{2}$は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択される正に荷電したアミノ酸であり、及び／または$Ｘ_{3}$は、Ｋ、Ｒ及びＨから選択される正に荷電したアミノ酸である。実施形態では、$Ｘ_{1}$は、Ｐであり、$Ｘ_{2}$は、Ｒであり、及び／または$Ｘ_{3}$は、Ｋである。

【０１２０】

実施形態では、酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素、例えば、限定されないが、ＭＬＴ可動要素酵素）は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性（Ｉｎｔ＋）を有する。実施形態では、酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素）は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性の欠如（Ｉｎｔ－）を有する。実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性（Ｉｎｔ＋）を有する。実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性の欠如（Ｉｎｔ－）を有する。

【０１２１】
実施形態では、可動要素酵素、例えば、限定されないが、ＭＬＴ可動要素酵素は、統合が低減された、もしくは統合が欠如した変異、例えば、約１、もしくは約２、もしくは約３、もしくは約４、もしくは約５つの統合が低減された、もしくは統合が欠如した変異、またはそれらの組み合わせを含む。実施形態では、可動要素酵素には、本明細書に記載の統合が低減された、または統合が欠如した変異、あるいはそれらの同等物のいずれかが任意の数含まれ得る。
【０１２２】
実施形態では、ＭＬＴ可動要素酵素は、統合が低減された、もしくは統合が欠如した変異、例えば、約１、もしくは約２、もしくは約３、もしくは約４、もしくは約５つの統合が低減された、もしくは統合が欠如した変異、またはそれらの組み合わせを含む。実施形態では、可動要素酵素には、本明細書に記載の統合が低減された、または統合が欠如した変異、あるいはそれらの同等物のいずれかが任意の数含まれ得る。
【０１２３】
実施形態では、酵素は、表２Ａに対応する１つ以上の変異、またはそれに対応する位置を含み、これは、理論に拘束されることなく、統合が低減された、または統合が欠如した変異を提供する。配列番号１のタンパク質のアミノ酸配列及び配列番号２の核酸配列に対する相対的な番号付け。

【表２】
表２Ａ：

アミノ酸変化
Y281A
C282A
G283A
E284A
G285A
N310A
G330A
T331A
I332A
R333A
K334A
N335A
R336A
G337A
I338A
P339A
D416A
K286A
R287A
N310A
K286A/R287A
K286A/N310A
K286A/K369A
R287A/N310A
R287A/K369A
N310A/K369A
R287A/N310A

【０１２４】
実施形態では、酵素は、表２Ｂに対応する１つ以上の変異、またはそれに対応する位置を含み、これは、理論に拘束されることなく、切除陽性及び統合が欠如した変異を提供する。配列番号１のタンパク質のアミノ酸配列及び配列番号２の核酸配列に対する相対的な番号付け。

【表３－１】

表２Ｂ：

MLT骨格	MLT変異体1	MLT変異体2	MLT変異体3
S8P/C13R	R164N	0	0
S8P/C13R	W168V	0	0
S8P/C13R	W168V	K369A	0
S8P/C13R	M278A	0	0
S8P/C13R	K286A	0	0
S8P/C13R	K286A	R287	
S8P/C13R	K286A	N310N	
S8P/C13R	K286A	K369A	
S8P/C13R	R287A	0	0
S8P/C13R	R287A	N310A	
S8P/C13R	R287A	K369A	
S8P/C13R	R287A	N310A	K369A
S8P/C13R	N310A	K369A	
S8P/C13R	R333A	0	0
S8P/C13R	R333A	E284A	0
S8P/C13R	R333A	E284A	R336A
S8P/C13R	K334A	0	0
S8P/C13R	N335A	0	0
S8P/C13R	K349A	0	0
S8P/C13R	K350A	0	0
S8P/C13R	K368A	0	0
S8P/C13R	K369A	0	0
S8P/C13R	D416N	0	0
S8P/C13R	D416N	K286A	0
S8P/C13R	D416N	R287A	0
S8P/C13R	D416N	R333A	0
S8P/C13R	D416N	K334A	0

【表３－２】

S8P/C13R	D416N	R336A	0
S8P/C13R	D416N	K349A	0
S8P/C13R	D416N	K350A	0
S8P/C13R	D416N	K368A	0
S8P/C13R	D416N	K369A	0
S8P/C13R	D416N	N310A	0

【０１２５】
実施形態では、配列番号１のアミノ酸配列またはそのバリアントを含むＭＬＴ可動要素酵素は、Ｓ８Ｐ及び／またはＣ１３Ｒ、ならびにＲ１６４Ｎ、Ｗ１６８Ｖ、Ｍ２７８Ａ、Ｋ２８６Ａ、Ｒ２８７Ａ、Ｒ３３３Ａ、Ｋ３３４Ａ、Ｎ３３５Ａ、Ｋ３４９Ａ、Ｋ３５０Ａ、Ｋ３６８Ａ、Ｋ３６９Ａ、及びＤ４１６Ｎのうちの１つから選択される１つ以上の変異を含む。
【０１２６】
実施形態では、配列番号１のアミノ酸配列またはそのバリアントを含むＭＬＴ可動要素酵素は、Ｓ８Ｐ及び／またはＣ１３Ｒ、ならびにＲ１６４Ｎ、Ｗ１６８Ｖ、Ｍ２７８Ａ、Ｋ２８６Ａ、Ｒ２８７Ａ、Ｒ３３３Ａ、Ｋ３３４Ａ、Ｎ３３５Ａ、Ｋ３４９Ａ、Ｋ３５０Ａ、Ｋ３６８Ａ、Ｋ３６９Ａ、及びＤ４１６Ｎのうちの１つ、及び／またはＥ２８４Ａ、Ｋ２８６Ａ、Ｒ２８７Ａ、Ｎ３１０Ａ、Ｒ３３３Ａ、Ｋ３３４Ａ、Ｒ３３６Ａ、Ｋ３４９Ａ、Ｋ３５０Ａ、Ｋ３６８Ａ、及びＫ３６９Ａのうちの１つ以上から選択される１つ以上の変異を含む。
【０１２７】
実施形態では、配列番号１のアミノ酸配列またはそのバリアントを含むＭＬＴ可動要素酵素は、Ｓ８Ｐ及び／またはＣ１３Ｒ、ならびにＲ１６４Ｎ、Ｗ１６８Ｖ、Ｍ２７８Ａ、Ｋ２８６Ａ、Ｒ２８７Ａ、Ｒ３３３Ａ、Ｋ３３４Ａ、Ｎ３３５Ａ、Ｋ３４９Ａ、Ｋ３５０Ａ、Ｋ３６８Ａ、Ｋ３６９Ａ、及びＤ４１６Ｎのうちの１つ、及び／またはＥ２８４Ａ、Ｋ２８６Ａ、Ｒ２８７Ａ、Ｎ３１０Ａ、Ｒ３３３Ａ、Ｋ３３４Ａ、Ｒ３３６Ａ、Ｋ３４９Ａ、Ｋ３５０Ａ、Ｋ３６８Ａ、及びＫ３６９Ａのうちの１つ以上、及び／または１つのＲ３３６Ａから選択される１つ以上の変異を含む。
【０１２８】
実施形態では、可動要素酵素は、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、及びＭｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓのうちのいずれかであるか、またはそれらのうちのいずれかに由来する。実施形態では、可動要素酵素は、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ（配列番号４３３）、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ（配列番号４３５、配列番号４３６、配列番号４３８、または配列番号４３９）、またはＰｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ（配列番号４３４）のうちのいずれかであるか、またはそれらのうちのいずれかに由来する。実施形態では、可動要素酵素は、表１、表２Ａ、及び／または表２Ｂから選択される１つ以上の過剰活性及び／または統合が欠如した変異、またはそれらの同等物を有する。当業者は、そのような変異体を、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ（配列番号４３３）、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ（配列番号４３７）、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏ

ｔｉｓ（配列番号４３５、配列番号４３６、配列番号４３８、もしくは配列番号４３９）、またはＰｔｅｒｏｐｕｓ　ｖａｍｐｙｒｕｓ（配列番号４３４）、例えば、Ｔｒｉｃｈｎｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ

【化１】

```
  1 MGSSLDDEHI LSALLQSDDE LVGEDSDSEI SDHVSEDDVQ SDTEEAFIDE VHEVQPTSSG
 61 SEILDEQNVI EQPGSSLASN KILTLPQRTI RGKNKHCWST SKSTRRSRVS ALNIVRSQRG
121 PTRMCRNIYD PLLCFKLFFT DEIISEIVKW TNAEISLKRR ESMTGATFRD TNEDEIYAFF
181 GILVMTAVRK DNHMSTDDLF DRSLSMVYVS VMSRDRFDFL IRCLRMDDKS IRPTLRENDV
241 FTPVRKIWDL FIHQCIQNYT PGAHLTIDEQ LLGFRGRCPF RMYIPNKPSK YGIKILMMCD
301 SGTKYMINGM PYLGRGTQTN GVPLGEYYVK ELSKPVRGSC RNITCDNWFT SIPLAKNLLQ
361 EPYKLTIVGT VRSNKREIPE VLKNSRSRPV GTSMFCFDGP LTLVSYKPKP AKMVYLLSSC
421 DEDASINEST GKPQMVMYYN QTKGGVDTLD QMCSVMTCSR KTNRWPMALL YGMINIACIN
481 SFIIYSHNVS SKGEKVQSRK KFMRNLYMSL TSSFMRKRLE APTLKRYLRD NISNILPNEV
541 PGTSDDSTEE PVTKKRTYCT YCPSKIRRKA NASCKKCKKV ICREHNIDMC QSCF
```

（配列番号４３３）

Ｐｔｅｒｏｐｕｓ　ｖａｍｐｙｒｕｓ

【化２】

```
  1 MSNPRKRSIP TCDVNFVLEQ LLAEDSFDES DFSEIDDSDD FSDSASEDYT VRPPSDSESD
 61 GNSPTSADSG RALKWSTRVM IPRQRYDFTG TPGRKVDVSD TTDPLQYFEL FFTEELVSKI
121 TSEMNAQAAL LASKPPGPKG FSRMDKWKDT DNDELKVFFA VMLLQGIVQK PELEMFWSTR
181 PLLDIPYLRQ IMTGERFLLL LRCLHFVNNS SISAGQSKAQ ISLQKIKPVF DFLVNKFSTV
241 YTPNRNIAVD ESLMLFKGRL AMKQYIPTKM NLKDSADGLK (配列番号434)
```

Ｍｙｏｔｉｓ　ｍｙｏｔｉｓ（「２ａ」）

【化３】

```
  1 MDLRCQHTVL SIRESRGLLP NLKMKTSRMK KGDIIFSRKG DILLLAWKDK RVVRMISIHD
 61 TSVSTTGKKN RKTGENIVKP ACIKEYNAHM KGVDRADQFL SCCSILRKMM KWTKKVVLYL
121 INCGLFNSFR VYNVLNPQAK MKYKQFLLSV ARDWIMDDNN EGSPEPETNL SSPSPGGARR
181 APRKDPPKRL SGDMKQHEPT CIPASGKKKF PTRACRVCAH GKRSESRYLC KFCLVPLHRG
241 KCFTQYHTLK KY (配列番号435)
```

Ｍｙｏｔｉｓ　ｍｙｏｔｉｓ（「１」）

【化４】

```
  1 MKAFLGVILN MGVLNHPNLQ SYWSMDFESH IPFFRSVFKR ERFLQIFWML HLKNDQKSSK
 61 DLRTRTEKVN CFLSYLEMKF RERFCPGREI AVDEAVVGFK GKIHFITYNP KKPTKWGIRL
121 YVLSDSKCGY VHSFVPYYGG ITSETLVRPD LPFTSRIVLE LHERLKNSVP GSQGYHFFTD
181 RYYTSVTLAK ELFKEKTHLT GTIMPNRKDN PPVIKHQKLK KGEIVAFRDE NVMLLAWKDK
241 RIVTLSTWDS ETESVERRVG GGKEIVLKPK VVTNYTKFMG GVDIADYTST YCFMRKTLKW
301 WRTLFFWGLE VSVVNSYILY KECQKRKNEK PITHVKFIRK LVHDLVGEFR DGTLTSRGRL
361 LSTNLEQRLD GKLHIITPHP NKKHKDCVVC SNRKIKGGRR ETIYICETCE CKPGLHVGEC
421 FKKYHTMKNY RD (配列番号436)
```

Ｍｙｏｔｉｓ　ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ（「２」）

【化５】

```
  1 MPSLRKRKET NETDTLPEVF NDNLSDIPSE IEDADDCFDD SGDDSTDSTD SEIIRPVRKR
 61 KVAVLSSDSD TDEATDNCWS EIDTPPRLQM FEGHAGVTTF PSQCDSVPSV TNLFFGDELF
121 EMLCKELSNY HDQTAMKRKT PSRTLKWSPV TQKDIKKFLG LIILMGQTRK DSLKDYWSTD
181 PLICTPIFPQ TMSRHRFEQI WTFWHFNDNA KMDSRSGRLF KIQPVLDYFL HKFRTIYKPK
241 QQLSLDEGMI PWRGRFKFRT YNPAKITKYG LLVRMVCESD TGYICSMEIY TAEGRKLQET
301 VLSVLGPYLG IWHHIYQDNY YNATSTAELL LQNKTRVCGT IRESRGLPPN LEMKTSRMKK
361 GDIIFSRKGD ILLLAWKDKR VVRMISTIHD TSVSTTGKKN RKTGENIVKP TCIKEYNAHM
421 KGVDRADQFL SCCSILRKTM KWTKKVVLYL INCGLFNSFR VYNVLNPQAK MKYKQFLLSV
481 ARDWITDDNN EGSPEPETNL SSPSPGGARR APRKDPPKRL SGDMKQHEPT CIPASGKKKF
541 PTRACRVCAA HGKRSESRYL CKFCLVPLHR GKCFTQYHTL KKYMDLRCQH TVLSTVGRGY
601 SVLARFKPRT NERTGSSHCH VQVPAGGQGP PSTIIANGCG CKLEPMVRTR SPTCLVIEFG
661 CM (配列番号 437)
```

Ｍｙｏｔｉｓ　ｍｙｏｔｉｓ（「２」）

【化６】

```
  1 MPSLRKRKET NETDTLPEVF NDNLSDIPSE IEDADDCFDD SGDDSTDSTE SEIIRPVRKR
 61 KVAVLSSDSN TDEATDNCWS EIDTPPRLQM FEGHAGVTTF PSQCDSVPSV TNLFFGDELF
121 EMLCKELSNY HDQTAMKRKT PSRTLKWSPV TQKDIKKFLG LIILMGQTRK DSWKDYWSTD
181 PLICTPIFPQ TMSRHRFEQI WTFWHFNDNA KMDSCSGRLF KIQPVLDYFL HKFRTIYKPK
241 QQLSLDEGMI PWRGRLKFTY NPAITKYGLL VRMVCESDTG YICNMEIYTA ERKKLQETVL
301 SVLGPYLGIW HHIYQDNYYN ATSTAELLLQ NKTRVCGTIR ESRGLPPNLK MKTSRMKKGD
361 IIFSRKGDIL LLAWKDKRVV RMISTIHDTS VSTTGKKNRK TGENIVKPTC IKEYNAHMKG
421 VDRADQFLSC CSILRKTTKW TKKVVLYLIN CGLFNSFRVY NILNPQAKMK YKQFLLSVAR
481 DWITDDNNEG SPEPETNLSS PSSGGARRAP RKDQPKRLSG DMKQHEPTCI PASGKKKFPT
541 ACRVCAAHGK RSESRYLRKF CFVPLRGKCF MYHTLKKYSE LFSLIVVSKI QNVIIYKTTK
601 VYMRYVMRSH CPLSFLVFAP SVKDRSRVFS FFTRHLLWTL DVNTLSCPHR MKRSHWWKPC
661 RSIYEKLYNC TNP (配列番号 438)
```

Ｍｙｏｔｉｓ　ｍｙｏｔｉｓ（「２ｂ」）

【化７】

```
  1 MDLRCQHTVL SIRESRGLPP NLKMKTSRMK KGDIIFSRKG DILLLAWKDK RVVRMISTIH
 61 DTSVSTTGKK NRKTGENIVK PACIKEYNAH MKGVDRADQF LSCCSILRKT MKWTKKVVLY
121 LINCGLFNSF RVYNVLNPQA KMKYKQFLLS VARDWITDDN NEGSPEPETN LSSPSPGGAR
181 RAPRKDPPKR LSGDMKQHEP TCIPASGKKK FPTRACRVCA AHGKRSESRY LCKFCLVPLH
241 RGKCFTQYHT LKKY ( 配列番号439)
```

のうちのいずれかからの可動要素酵素に対応させることができる。

【０１２９】

実施形態では、可動要素酵素は、Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、またはＴｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉに由来する。実施形態では、可動要素酵素は、Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、またはＴｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉに由来する単量体、二量体、四量体、過剰活性、またはＩｎｔ－形態を含むが、これらに限定されない、操作されたバージョンの可動要素酵素である。

【０１３０】

実施形態では、可動要素酵素は、Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ、またはＭｙｏｔｉｓ　ｌｕｃｉｆｕｇｕｓに由来する。実施形態では、可動要素酵素は、単量体、二量体、四量体（もしくは別の多量体）、過剰活性であるか、またはＢｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ、もしくはＭｙｏｔｉｓ　ｌｕｃｉｆｕｇｕｓに由来する非ＴＴＡＡ（配列番号４４０）認識部位（Ｉｎｔ－）との相互作用が低減している可動要素酵素を含むが、これに限定されない、操作されたバージョンである。実施形態では、可動要素酵素は、表１、表２Ａ、及び表２Ｂから選択される１つ以上

の過剰活性及び／または統合が欠如した変異、またはそれらの同等物を有する。

【０１３１】

実施形態では、当業者は、そのような変異体を、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐａｎ ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、及びＭｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓのうちのいずれかからの可動要素酵素に対応させることができる。

【０１３２】

実施形態では、可動要素酵素は、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉｍ、Ｐａｎ ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、及びＭｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓのうちのいずれかのヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有するヌクレオチド配列を有する。実施形態では、可動要素酵素は、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、及びＭｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓのうちのいずれかのアミノ酸配列に対して少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有する。Ｊｅｂｂ，ｅｔ ａｌ．（２０２０）を参照されたい。

【０１３３】

実施形態では、酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素）は、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｍｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓ、Ｐａｎ ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、またはホモ・サピエンスに由来する。実施形態では、酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素）は、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｍｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓ、Ｐａｎ ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、またはホモ・サピエンスに由来する可動要素酵素の過剰活性形態を含むが、これらに限定されない、操作されたバージョンである。酵素は、野生型、単量体、二量体、四量体、過剰活性、またはＩｎｔ－変異体のいずれかである。実施形態では、可動要素酵素は、表１、表２Ａ、及び／または表２Ｂから選択される１つ以上の過剰活性及び／または統合が欠如した変異、またはそれらの同等物を有する。

【０１３４】

実施形態では、可動要素酵素は、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｍｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓ、及びＰａ

ｎ　ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓのうちのいずれかのヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有するヌクレオチド配列を有する。実施形態では、可動要素酵素は、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ　ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ　ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ　ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ　ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ　ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ　ｋｕｈｌｉｉ、Ｍｏｌｏｓｓｕｓ　ｍｏｌｏｓｓｕｓ、Ｐａｎ　ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、及びホモ・サピエンスのうちのいずれかのアミノ酸配列に対して少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【０１３５】

実施形態では、可動要素酵素は、単量体、二量体、四量体、過剰活性であるか、またはＢｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ　ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ　ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ　ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ　ｍｙｏｔｉｓ、Ｍｙｏｔｉｓ　ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ　ｋｕｈｌｉｉ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ　ｖａｍｐｙｒｕｓ、及びＭｏｌｏｓｓｕｓ　ｍｏｌｏｓｓｕｓ　Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ　ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ、Ｐａｎ　ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、Ｍｙｏｔｉｓ　ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、及びホモ・サピエンスのうちのいずれかに由来する、非ＴＴＡＡ（配列番号４４０）認識部位（Ｉｎｔ－）との相互作用が低減している可動要素酵素を含むが、これらに限定されない、操作されたバージョンである。可動要素酵素は、野生型、単量体、二量体、四量体、もしくは別の多量体、過剰活性、またはＩｎｔ－変異体のいずれかである。

【０１３６】

実施形態では、可動要素酵素は、Ｔｃ１／マリナードナーＤＮＡ系からのものである。例えば、Ｐｌａｓｔｅｒｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．１９９９；１５（８）：３２６－３２を参照されたい。

【０１３７】

実施形態では、可動要素酵素は、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙドナーＤＮＡ系（例えば、Ｃｅｌｌ．１９９７；９１：５０１－５１０を参照されたい）、例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙの過剰活性形態（ｈｙｐＳＢ）、例えば、ＳＢ１００Ｘ（Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　ｖｏｌｕｍｅ　１８，ｐａｇｅｓ　８４９－８５６（２０１１）を参照されたい、またはｐｉｇｇｙＢａｃ（ＰＢ）ドナーＤＮＡ系（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＴｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１５　Ｓｅｐ；３３（９）：５２５－３３を参照されたい）、例えば、７個のアミノ酸置換（例えば、ｍＰＢ上のＩ３０Ｖ、Ｓ１０３Ｐ、Ｇ１６５Ｓ、Ｍ２８２Ｖ、Ｓ５０９Ｇ、Ｎ５７０Ｓ、Ｎ５３８Ｋ、または非ｍＰＢにおける機能的同等物、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＭｏｌ　Ｔｈｅｒ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ．２０１２　Ｏｃｔ；１（１０）：ｅ５０を参照されたい）を有する、例えば、ＰＢ可動要素酵素の過剰活性形態（ｈｙｐＰＢ）からのものであり、また、Ｙｕｓａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ　Ｊａｎｕａｒｙ　２５，２０１１　１０８（４）１５３１－１５３６、Ｖｏｉｇｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ　ｖｏｌｕｍｅ　７，Ａｒｔｉｃｌｅ　ｎｕｍｂｅｒ：１１１２６（２０１６）も参照されたい。

【０１３８】

ＰｉｇｇｙＢａｃ可動要素酵素は、ＩＳ４可動要素酵素ファミリーに属する。Ｄｅ　Ｐａｌｍｅｎａｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＢＭＣ　Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ　Ｂｉｏｌｏｇｙ．２００８；８：１８．ｄｏｉ：１０．１１８６／１４７１－２１４８－８－１８。ｐｉｇｇｙＢａｃファミリーは、非常に多様なドナーＤＮＡを含み、これらのドナーＤＮＡのうちのいずれも、本開示の実施形態で使用することができる。例えば、Ｂｏｕａｌｌｅｇ

ｕｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌ Ｅｖｏｌ．２０１７；９（２）：３２３－３３９を参照されたい。ｐｉｇｇｙＢａｃ（スーパー）ファミリーの創設メンバーである昆虫ｐｉｇｇｙＢａｃは、もともとキャベツルーパー蛾（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａｎｉ ｎｉ）において識別され、インビボ及びインビトロの両方で研究された。昆虫ｐｉｇｇｙＢａｃは、多くのリコンビナーゼによって共有されるＲＮａｓｅ Ｈフォールドに似ている触媒部位を有する要素コードされた可動要素酵素によって促進される典型的なカット・アンド・ペースト機序によって転位することが知られている。昆虫ｐｉｇｇｙＢａｃドナーＤＮＡ系は、ショウジョウバエ及びマウスを含む広範囲の動物において高度に活性であることが示されており、遺伝子タグ付け及びゲノム操作のための強力なツールとして開発されている。ｐｉｇｇｙＢａｃスーパーファミリーに属する他のドナーＤＮＡは、Ｘｅｎｏｐｕｓ及びＢｏｍｂｙｘを含む節足動物及び脊椎動物において一般的である。本開示の実施形態で使用することができる過剰活性哺乳動物ｐｉｇｇｙＢａｃバリアントを含む哺乳動物ｐｉｇｇｙＢａｃドナーＤＮＡ及び可動要素酵素は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際出願第ＷＯ２０１００８５６９９号に記載されている。

【０１３９】

実施形態では、可動要素酵素は、ＬＥＡＰ－ＩＮ １型またはＬＥＡＰ－ＩＮドナーＤＮＡ系（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ．２０１８ Ｏｃｔ；１３（１０）：ｅ１７００７４８．ｄｏｉ：１０．１００２／ｂｉｏｔ．２０１７００７４８．Ｅｐｕｂ ２０１８ Ｊｕｎ １１）からのものである。ＬＥＡＰＩＮ可動要素酵素系は、可動要素酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素ｍＲＮＡ）、ならびにドナーＤＮＡ同族逆位末端及び転位認識モチーフ（ＴＴＡＴ）に隣接している、１つ以上の目的の遺伝子（ドナーＤＮＡ）、選択マーカー、調節要素、インスレーター等を含有するベクターを含む。ベクターＤＮＡ及び可動要素酵素ｍＲＮＡの共トランスフェクション時に、一過性に発現された酵素は、宿主細胞のゲノムにわたる１つ以上の部位におけるドナーＤＮＡカセットの単一コピー（末端間の全ての配列）の高効率かつ正確な統合を触媒する。Ｈｏｔｔｅｎｔｏｔ ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ｇｅｎｏｔｙｐｉｎｇ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．Ｗｈｉｔｅ ＳＪ，Ｃａｎｔｓｉｌｉｅｒｉｓ Ｓ，ｅｄｓ：１８５－１９６．（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ：Ｓｐｒｉｎｇｅｒ）：２０１７．ｐｐ．１８５－１９６。ＬＥＡＰＩＮ可動要素酵素は、主にオープンクロマチンセグメントにおいて、複数のゲノム遺伝子座における単一コピーの統合を含む、様々な有利な特徴を有する安定的な導入遺伝子統合物を生成し、ペイロード制限がないので、複数の独立した転写単位を単一構築物から発現させることができ、統合された導入遺伝子は、それらの構造的及び機能的完全性を維持し、導入遺伝子完全性の維持は、全ての組換え細胞における所望の鎖比を確保する。

【０１４０】

実施形態では、可動要素酵素は、ホモ・サピエンスまたはその先行物から再構築された可動要素酵素の操作された形態である。

【０１４１】

ヒトにおけるドナーＤＮＡは、ＰｉｇｇｙＢａｃドメイン（ＰＧＢＤ）１、ＰＧＢＤ２、ＰＧＢＤ３、ＰＧＢＤ４、及びＰＧＢＤ５と称される５つの不活性要素を有する。ＰＧＢＤ１、ＰＧＢＤ２、及びＰＧＢＤ３は、複数のコードエクソンを有するが、いずれの場合も、可動要素酵素関連配列は、単一の連続した３’末端エクソンによってコードされる。したがって、ＰＧＢＤ１及びＰＧＢＤ２は、可動要素酵素ＯＲＦが３’スプライス部位によって上流に隣接し、ポリアデニル化部位によって下流に隣接するＰＧＢＤ３ドナーＤＮＡに類似し得る。Ｎｅｗｍａｎ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｇｅｎｅｔ ２００８；４：ｅ１０００００３１．ＰＬｏＳ Ｇｅｎｅｔ ４（３）：ｅ１０００００３１．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｇｅｎ．１０００００３１、Ｇｒａｙ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｇｅｎｅｔ ８（９）：ｅ１００２９７２．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｇｅｎ．１００２９７２を参照されたい。

【０１４２】
ＰＧＢＤ５不活性可動要素酵素配列は、Ｐｆａｍ構造のＲＮａｓｅ Ｈクランに属し、一方、ＰＧＢＤ３は、必須の触媒三残基ＤＤＤ（Ｄ）において単一のＤからＮへの変異のみを維持しており、上流のｐｉｇｇｙＢａｃ末端逆位反復に結合する能力を保持している。Ｂａｉｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，ＤＮＡ Ｒｅｐａｉｒ（Ａｍｓｔ）２０１２；１１：４８８－５０１。ＰＧＢＤ５可動要素酵素は、活性要素に見出される触媒ＤＤＤ（Ｄ）モチーフを保持しておらず、可動要素酵素は、不活性であるだけでなく、インビボでＤＮＡまたはクロマチンのいずれとも会合しない。Ｐａｖｅｌｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｂ ＤＮＡ ２０１３；４：２３。しかしながら、インビトロ研究は、ＨＥＫ２９３細胞において転位的に活性であることを示した。Ｈｅｎｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｅｌｉｆｅ ２０１５；４を参照されたい。ＰＧＢＤ１及びＰＧＢＤ２は、哺乳動物の共通の祖先に存在すると考えられているが、ＰＧＢＤ３及びＰＧＢＤ４は、霊長類に限定されている。Ｓａｒｋａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ２００３；２７０：１７３－８０を参照されたい。Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ可動要素酵素は、ＰＧＢＤ４と密接に関連しており、切除機序に関与するＤＤＤ触媒ドメイン及びＣ末端領域を共有している。Ｍｉｔｒａ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ ２００８；２７：１０９７－１０９を参照されたい。

【０１４３】
遺伝子切断及び／または遺伝子統合活性を有する哺乳動物の可動要素酵素は、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ可動要素酵素のＰＧＢＤ１、ＰＧＢＤ２、ＰＧＢＤ３、ＰＧＢＤ４、及びＰＧＢＤ５配列に対するアミノ酸配列のアラインメントに基づいて構築することができる。また、実施形態では、哺乳動物の可動要素酵素は、組換え哺乳動物の可動要素酵素に過剰活性を付与する変異を有する。したがって、実施形態では、可動要素酵素は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性（Ｉｎｔ＋）を有する。実施形態では、可動要素酵素は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）を有し、及び／または遺伝子統合活性を欠如（Ｉｎｔ－）している。

【０１４４】
いくつかの態様では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素は、ヒトゲノムからのいくつかの不活性可動要素酵素配列をＰｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ可動要素酵素配列にアラインメントすることによって部分的に誘導された、組換え哺乳動物の可動要素酵素である。実施形態では、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ可動要素酵素は、配列番号４３０（またはその機能的同等物）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）を有する。実施形態では、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ可動要素酵素は、配列番号４３０のアミノ酸配列またはその機能的同等物を有する。実施形態では、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ可動要素酵素は、配列番号４２９またはそのコドン最適化バリアントに対して少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）を有する。

【０１４５】
実施形態では、可動要素酵素は、コウモリ、例えば、限定されないが、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓからの可動要素酵素等の哺乳動物の可動要素酵素である。

【０１４６】
実施形態では、可動要素酵素は、ホモ・サピエンスまたはその先行物から再構築された可動要素酵素に基づく操作された形態である。実施形態では、可動要素酵素は、ホモ・サピエンスまたはその先行物から再構築された可動要素酵素の操作されたバージョンの、単量体、二量体、四量体（もしくは別の多量体）、過剰活性であるか、または非ＴＴＡＡ（配列番号４４０）認識部位（Ｉｎｔ－）との相互作用が低減している操作されたバージョ

ンを含むが、これらに限定されない。

【０１４７】

実施形態では、可動要素酵素は、哺乳動物種から再構築された可動要素酵素に基づく操作された形態である。実施形態では、可動要素酵素は、哺乳動物種から再構築された可動要素酵素の、単量体、二量体、四量体（もしくは別の多量体）、過剰活性であるか、または非ＴＴＡＡ（配列番号４４０）認識部位（Ｉｎｔ－）との相互作用が低減している操作を含むが、これらに限定されない。

【０１４８】

実施形態では、ドナーＤＮＡは、標的ゲノム統合を実行することができる酵素、例えば、限定されないが、可動要素酵素によって認識される左末端及び右末端配列を含む、ベクターに含まれている。

【０１４９】

実施形態では、末端配列は、ＭＥＲ、ＭＥＲ７５Ａ、ＭＥＲ７５Ｂ、及びＭＥＲ８５から選択される。

【０１５０】

実施形態では、末端配列は、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号４４１、及び配列番号２２のヌクレオチド配列、またはそれらに対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有する配列）から選択される。実施形態では、末端配列のうちの１つ以上は、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している。

【０１５１】

実施形態では、末端配列は、配列番号１２のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１２のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復は、ドナーＤＮＡの５’末端に位置付けられている。末端配列は、配列番号１７のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復をさらに含み得、配列番号１７のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復は、ドナーＤＮＡの３’末端に位置付けられている。末端配列は、例えば、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓからのものであり得、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している。

【０１５２】

実施形態では、末端配列は、配列番号１３のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１３のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または

少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復は、ドナーＤＮＡの５’末端に位置付けられている。末端配列は、配列番号１８のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復をさらに含み得、配列番号１８のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復は、ドナーＤＮＡの３’末端に位置付けられている。末端配列は、例えば、ＰＧＢＤ４であり得、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している。

【０１５３】

実施形態では、末端配列は、配列番号１４のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１４のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復は、ドナーＤＮＡの５’末端に位置付けられている。末端配列は、配列番号１８のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１９のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復は、ドナーＤＮＡの３’末端に位置付けられている。末端配列は、例えば、ＭＥＲ７５であり得、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している。

【０１５４】

実施形態では、末端配列は、配列番号１５のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１５のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復は、ドナーＤＮＡの５’末端に位置付けられている。末端配列は、配列番号２０のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号２０のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復は、ドナーＤＮＡの３’末端に位置付けられている。末端配列は、例えば、ＭＥＲ７５Ｂであり得、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している。

【０１５５】
実施形態では、末端配列は、配列番号１６のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号１６のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復は、ドナーＤＮＡの５’末端に位置付けられている。末端配列は、配列番号２１または配列番号４４１のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復を含み、配列番号２１または配列番号４４１のヌクレオチド配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列）からの少なくとも１つの反復は、ドナーＤＮＡの３’末端に位置付けられている。末端配列は、例えば、ＭＥＲ７５Ａであり得、任意選択的に、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に隣接している。

【０１５６】
実施形態では、ドナーＤＮＡは、例えば、可動要素酵素等の酵素によって認識される１つ以上の末端配列を含むドナーＤＮＡを含む、ベクターであるかまたはそれを含む。実施形態では、末端配列は、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ　ｖａｍｐｙｒｕｓ、ＭＥＲ７５、ＭＥＲ７５Ａ、及びＭＥＲ７５Ｂから選択される。ＭＥＲは、ｐｉｇｇｙＢａｃ様可動要素と類似性を有する末端配列を含有し、それらの推定ＴＴＡＡ（配列番号４４０）標的部位の重複を呈する。実施形態では、末端配列は、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、配列番号２１、配列番号４４１、及び配列番号２２のヌクレオチド配列、またはそれらに対して少なくとも約９０％の同一性を有するヌクレオチド配列（例えば、少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有する配列）から選択される。

【０１５７】
実施形態では、可動要素酵素は、配列番号３、配列番号４、配列番号６、配列番号７、配列番号８、もしくは配列番号９のアミノ酸配列、またはそれらに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性、もしくは少なくとも約１０個の変異、もしくは少なくとも約９個の変異、もしくは少なくとも約８個の変異、もしくは少なくとも約７個の変異、もしくは少なくとも約６個の変異、もしくは少なくとも約５個の変異、もしくは少なくとも約４個の変異、もしくは少なくとも約３個の変異、もしくは少なくとも約２個の変異、もしくは少なくとも約１個の変異を有するバリアント配列を有する。

【０１５８】
実施形態では、可動要素酵素は、配列番号４のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＳ８Ｐ、Ｇ１７Ｒ、及び／またはＫ１３４Ｋ変異を有するアミノ酸配列を有する。

【０１５９】
実施形態では、可動要素酵素は、配列番号５のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＳ８Ｐ、Ｇ１７Ｒ、及び／またはＫ１３４Ｋ変異を有するアミノ酸配列を有する。

【０１６０】

実施形態では、可動要素酵素は、配列番号６のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＩ８３Ｐ及び／またはＶ１１８Ｒ変異を有するアミノ酸配列を有する。

【０１６１】

実施形態では、可動要素酵素は、配列番号７のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＳ２０Ｐ及び／またはＡ２９Ｒ変異を有するアミノ酸配列を有する。

【０１６２】

実施形態では、可動要素酵素は、配列番号８のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＴ４Ｐ及び／またはＬ１３Ｒ変異を有するアミノ酸配列を有する。

【０１６３】

実施形態では、可動要素酵素は、配列番号９のアミノ酸配列またはその機能的同等物に対してＡ１２Ｐ及び／またはＩ２８Ｒ変異及び／またはＲ１５２Ｋ変異を有するアミノ酸配列を有する。

【０１６４】

実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素）は、単量体または二量体形態にある。実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素）は、多量体形態にある。

【０１６５】

実施形態では、酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素）は、単量体、二量体、四量体、過剰活性であるか、または非ＴＴＡＡ（配列番号４４０）認識部位（Ｉｎｔ－）との相互作用が低減しており、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉ、Ｘｅｎｏｐｕｓ ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ、Ｍｙｏｔｉｓ ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ、Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ ｆｅｒｒｕｍｅｑｕｉｎｕｍ、Ｒｏｕｓｅｔｔｕｓ ａｅｇｙｐｔｉａｃｕｓ、Ｐｈｙｌｌｏｓｔｏｍｕｓ ｄｉｓｃｏｌｏｒ、Ｍｙｏｔｉｓ ｍｙｏｔｉｓ、Ｐｔｅｒｏｐｕｓ ｖａｍｐｙｒｕｓ、Ｐｉｐｉｓｔｒｅｌｌｕｓ ｋｕｈｌｉｉ、Ｐａｎ ｔｒｏｇｌｏｄｙｔｅｓ、Ｍｏｌｏｓｓｕｓ ｍｏｌｏｓｓｕｓ、またはホモ・サピエンスのうちのいずれかに由来する、可動要素酵素を含むが、これに限定されない、操作されたバージョンである。実施形態では、可動要素酵素は、野生型、単量体、二量体、四量体、もしくは別の多量体、過剰活性、またはＩｎｔ－変異体のいずれかである。

【０１６６】

標的キメラ構築物

態様では、本開示は、標的キメラを提供し、例えば、実施形態では、酵素、限定されないが、可動要素酵素は、標的要素を含む。

【０１６７】

実施形態では、標的要素と会合する酵素、限定されないが、可動要素酵素は、任意選択的に、ゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）におけるＴＡジヌクレオチド部位またはＴＴＡＡ（配列番号４４０）テトラヌクレオチド部位に、キメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲを含むドナーＤＮＡを挿入することができる。

【０１６８】

実施形態では、標的要素と会合する酵素、限定されないが、可動要素酵素は、過剰活性を付与する１つ以上の変異を有する。

【０１６９】

実施形態では、標的要素と会合する酵素、限定されないが、可動要素酵素は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または遺伝子統合活性（Ｉｎｔ＋）を有する。

【０１７０】

実施形態では、標的要素と会合する酵素、限定されないが、可動要素酵素は、遺伝子切断活性（Ｅｘｃ＋）及び／または低減された統合活性（Ｉｎｔ－）を有する。

【０１７１】

実施形態では、標的要素は、核酸に結合することができる１つ以上のタンパク質または核酸を含む。

【０１７２】
実施形態では、標的要素は、任意選択的に、触媒不活性、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）、ジンクフィンガー、触媒不活性転写因子、ニッカーゼ、転写活性化因子、転写リプレッサ、リコンビナーゼ、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、父性発現遺伝子１０（ＰＥＧ１０）、及びＴｎｓＤであるＣａｓ酵素と任意選択的に会合するｇＲＮＡのうちの１つ以上を含む。
【０１７３】
実施形態では、標的要素は、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）を含む。
【０１７４】
実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤは、１つ以上の反復配列を含む。実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤは、約１４、または約１５、または約１６、または約１７、または約１８、または約１８．５個の反復配列を含む。実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤ繰り返し配列は３３個または３４個のアミノ酸を含む。実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤ反復配列は、３３個または３４個のアミノ酸の残基１２または１３に反復可変二残基（ＲＶＤ）を含む。実施形態では、ＲＶＤは核酸分子内の１つの塩基対を認識する。実施形態では、ＲＶＤは核酸分子内のＣ残基を認識し、ＨＤ、Ｎ（ギャップ）、ＨＡ、ＮＤ、及びＨＩから選択される。実施形態では、ＲＶＤは核酸分子内のＧ残基を認識し、ＮＮ、ＮＨ、ＮＫ、ＨＮ、及びＮＡから選択される。実施形態では、ＲＶＤは、核酸分子内のＡ残基を認識し、かつＮＩ及びＮＳから選択される。実施形態では、ＲＶＤは、核酸分子内のＴ残基を認識し、かつＮＧ、ＨＧ、Ｈ（ギャップ）、及びＩＧから選択される。実施形態では、ＧＳＨＳは染色体内のオープンクロマチン位置にある。実施形態では、ＧＳＨＳは、アデノ随伴ウイルス部位１（ＡＡＶＳ１）、ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体５（ＣＣＲ５）遺伝子、ＨＩＶ－１コ受容体、及びヒトＲｏｓａ２６遺伝子座から選択される。実施形態では、ＧＳＨＳはヒト染色体２、４、６、１０、１１、１７、２２、またはＸに位置する。実施形態では、ＧＳＨＳは、ＴＡＬＣ１、ＴＡＬＣ２、ＴＡＬＣ３、ＴＡＬＣ４、ＴＡＬＣ５、ＴＡＬＣ７、ＴＡＬＣ８、ＡＶＳ１、ＡＶＳ２、ＡＶＳ３、ＲＯＳＡ１、ＲＯＳＡ２、ＴＡＬＥＲ１、ＴＡＬＥＲ２、ＴＡＬＥＲ３、ＴＡＬＥＲ４、ＴＡＬＥＲ５、ＳＨＣＨＲ２－１、ＳＨＣＨＲ２－２、ＳＨＣＨＲ２－３、ＳＨＣＨＲ２－４、ＳＨＣＨＲ４－１、ＳＨＣＨＲ４－２、ＳＨＣＨＲ４－３、ＳＨＣＨＲ６－１、ＳＨＣＨＲ６－２、ＳＨＣＨＲ６－３、ＳＨＣＨＲ６－４、ＳＨＣＨＲ１０－１、ＳＨＣＨＲ１０－２、ＳＨＣＨＲ１０－３、ＳＨＣＨＲ１０－４、ＳＨＣＨＲ１０－５、ＳＨＣＨＲ１１－１、ＳＨＣＨＲ１１－２、ＳＨＣＨＲ１１－３、ＳＨＣＨＲ１７－１、ＳＨＣＨＲ１７－２、ＳＨＣＨＲ１７－３、及びＳＨＣＨＲ１７－４から選択される。
【０１７５】
実施形態では、標的要素は、Ｃａｓ９酵素ガイドＲＮＡ複合体を含む。実施形態では、Ｃａｓ９酵素ガイドＲＮＡ複合体は、ヌクレアーゼ欠損ｄＣａｓ９ガイドＲＮＡ複合体を含む。実施形態では、標的要素は、Ｃａｓ１２酵素ガイドＲＮＡ複合体を含む。実施形態では、標的要素は、ヌクレアーゼ欠損ｄＣａｓ１２ガイドＲＮＡ複合体、任意選択的に、ｄＣａｓ１２ｊガイドＲＮＡ複合体またはｄＣａｓ１２ａガイドＲＮＡ複合体を含む。実施形態では、標的要素は、Ｃａｓ１２ｋ酵素ガイドＲＮＡ複合体を含む。実施形態では、標的要素は、ヌクレアーゼ欠損ｄＣａｓ１２ガイドＲＮＡ複合体、任意選択的にｄＣａｓ１２ｋガイドＲＮＡ複合体を含む。
【０１７６】
実施形態では、可動要素酵素に融合したＤＢＤを有する標的キメラ系または構築物は、標的ゲノム統合を実行することができる酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素）の、酵素認識部位の近くの特定の配列（例えば、転写活性化因子様エフェクタータンパク質（ＴＡＬＥ）反復可変二残基（ＲＶＤ）またはｇＲＮＡ）への結合を指向する。したがって、酵素がランダムな認識部位に結合するのを防止する。実施形態では、標的キメラ構築物は、ヒトＧＳＨＳに結合する。実施形態では、ｄＣａｓ９（すなわち、ヌクレアーゼ

活性が欠損している）は、ＧＳＨＳ内の所望のＤＮＡ配列で結合するように指向されるｇＲＮＡでプログラムされる。

【０１７７】

実施形態では、本明細書に記載のＴＡＬＥは、例えば、可動要素酵素等の酵素をＧＳＨＳに物理的に隔離し、ＲＶＤ　ＴＡＬＥヌクレオチド配列に近接した近傍のＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列への転位を促進することができる。オープンクロマチン部位におけるＧＳＨＳは、可動要素酵素がオープンクロマチンに挿入する傾向に基づいて特異的に標的とされる。

【０１７８】

実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素（例えば、限定されないが、リコンビナーゼ、インテグラーゼ、または限定されないが、哺乳動物の可動要素酵素等の可動要素酵素）は、ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）または例えば、Ｃａｓ９もしくはそのバリアント等のＣａｓベースの遺伝子編集システムに連結されているか、またはそれと融合している。

【０１７９】

実施形態では、標的要素は、酵素を目的の遺伝子座に標的する。実施形態では、標的要素は、ＣＲＩＳＰＲ（クラスター化され、規則的な間隔の空いた短い回文配列の反復）関連タンパク質９（Ｃａｓ９）またはそのバリアントを含む。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ツールは、ＤＮＡ切断のためのＣａｓ９ヌクレアーゼ、及び標的特異性のための単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）のみを必要とする。Ｊｉｎｅｋ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３３７，８１６－８２１、Ｃｈｙｌｉｎｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　４２，６０９１－６１０５を参照されたい。ヌクレアーゼ欠損（または不活性、もしくは「触媒的に死んだ」）Ｃａｓ９であるＣａｓ９の不活性化形態は、典型的には、「ｄＣａｓ９」として示され、実質的なヌクレアーゼ活性を有しない。Ｑｉ，Ｌ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．（２０１３）．Ｃｅｌｌ　１５２，１１７３－１１８３。ＣＲＩＳＰＲ／ｄＣａｓ９は、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）配列の標的を通じて、特定のゲノム配列に正確に結合する。Ｄｏｍｉｎｇｕｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．２０１６；１７：５－１５、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０１６；８５：２２７－６４を参照されたい。ｄＣａｓ９は、ゲノム中の所望の部位及び／または遺伝子座の転写結合部位に適用されるときに、遺伝子発現を編集するために利用される。ｄＣａｓ９タンパク質がガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）にカップリングしてｄＣａｓ９ガイドＲＮＡ複合体を作製すると、ｄＣａｓ９は、生物のゲノムに有害であり得る反復コドン及びＤＮＡ配列の増殖を防止する。本質的に、複数の反復コドンが産生されるとき、それは応答を引き出すか、またはそれらのコドンの過剰産生に対抗し、転写のシャットダウンをもたらすために豊富なｄＣａ９を動員する。したがって、ｄＣａｓ９はｇＲＮＡと相乗的に作用し、転写を継続することからＤＮＡポリメラーゼＩＩに直接影響を与える。

【０１８０】

実施形態では、標的要素は、ヌクレアーゼ欠損Ｃａｓ酵素ガイドＲＮＡ複合体を含む。実施形態では、標的要素は、ヌクレアーゼ欠損（または不活性、もしくは「触媒的に死んだ」Ｃａｓ、例えば、Ｃａｓ９、典型的には「ｄＣａｓ」または「ｄＣａｓ９」として示される）ガイドＲＮＡ複合体を含む。

【０１８１】

実施形態では、ｄＣａｓ９／ｇＲＮＡ複合体は、ＧＴＴＴＡＧＣＴＣＡＣＣＣＧＴＧＡＧＣＣ（配列番号９１）、ＣＣＣＡＡＴＡＴＴＡＴＴＧＴＴＣＴＣＴＧ（配列番号９２）、ＧＧＧＧＴＧＧＧＡＴＡＧＧＧＧＡＴＡＣＧ（配列番号９３）、ＧＧＡＴＣＣＣＣＣＣＴＣＴＡＣＡＴＴＴＡＡ（配列番号９４）、ＧＴＧＡＴＣＴＴＧＴＡＣＡＡＡＴＣＡＴＴ（配列番号９５）、ＣＴＡＣＡＣＡＧＡＡＴＣＴＧＴＴＡＧＡＡ（配列番号９６）、ＴＡＡＧＣＴＡＧＡＧＡＡＴＡＧＡＴＣＴＣ（配列番号９７）、及びＴＣＡＡＴＡＣＡＣＴＴＡＡＴＧＡＴＴＴＡ（配列番号９８）から選択されるガイドＲＮＡを含み、当該ガイドＲＮ

Ａは、酵素をケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体５（ＣＣＲ５）遺伝子に指向する。

【０１８２】

実施形態では、ｄＣａｓ９／ｇＲＮＡ複合体は、ＣＡＣＣＧＧＧＡＧＣＣＡＣＧＡＡＡＡＣＡＧＡＴＣＣ（配列番号９９）、ＣＡＣＣＧＣＧＡＡＡＡＣＡＧＡＴＣＣＡＧＧＧＡＣＡ（配列番号１００）、ＣＡＣＣＧＡＧＡＴＣＣＡＧＧＧＡＣＡＣＧＧＴＧＣＴ（配列番号１０１）、ＣＡＣＣＧＧＡＣＡＣＧＧＴＧＣＴＡＧＧＡＣＡＧＴＧ（配列番号１０２）、ＣＡＣＣＧＧＡＡＡＡＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＧＣＣＴＣ（配列番号１０３）、ＣＡＣＣＧＧＣＣＴＧＧＣＣＧＧＣＣＴＧＡＣＣＡＣＴ（配列番号１０４）、ＣＡＣＣＧＣＴＧＡＧＣＡＣＴＧＡＡＧＧＣＣＴＧＧＣ（配列番号１０５）、ＣＡＣＣＧＴＧＧＴＴＴＣＣＡＣＴＧＡＧＣＡＣＴＧＡ（配列番号１０６）、ＣＡＣＣＧＧＡＴＡＧＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣＴＴＴＣＧ（配列番号１０７）、ＣＡＣＣＧＧＣＧＣＴＴＣＣＡＧＴＧＣＴＣＡＧＡＣＴ（配列番号１０８）、ＣＡＣＣＧＣＡＧＴＧＣＴＣＡＧＡＣＴＡＧＧＧＡＡＧ（配列番号１０９）、ＣＡＣＣＧＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＴＴＣＡＧＡＧＣＣ（配列番号１１０）、ＣＡＣＣＧＴＣＣＴＴＣＡＧＡＧＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣ（配列番号１１１）、ＣＡＣＣＧＴＧＧＴＴＴＣＣＧＡＧＣＴＴＧＡＣＣＣＴ（配列番号１１２）、ＣＡＣＣＧＣＴＧＣＡＧＡＧＴＡＴＣＴＧＣＴＧＧＧＧ（配列番号１１３）、ＣＡＣＣＧＣＧＴＴＣＣＴＧＣＡＧＡＧＴＡＴＣＴＧＣ（配列番号１１４）、ＴＣＣＣＣＴＣＣＣＡＧＡＡＡＧＡＣＣＴＧ（配列番号１３１）、ＴＧＧＧＣＴＣＣＡＡＧＣＡＡＴＣＣＴＧＧ（配列番号１３２）、ＧＴＧＧＣＴＣＡＧＧＡＧＧＴＡＣＣＴＧＧ（配列番号１３３）、ＧＡＧＣＣＡＣＧＡＡＡＡＡＣＡＧＡＴＣＣＡ（配列番号１３４）、ＡＡＧＴＧＡＡＣＧＧＧＧＡＡＧＧＧＡＧＧ（配列番号１３５）、ＧＡＣＡＡＡＡＧＣＣＧＡＡＧＴＣＣＡＧＧ（配列番号１３６）、ＧＴＧＧＴＴＧＡＴＡＡＡＣＣＣＡＣＧＴＧ（配列番号１３７）、ＴＧＧＧＡＡＣＡＧＣＣＡＣＡＧＣＡＧＧＧ（配列番号１３８）、ＧＣＡＧＧＧＧＡＡＣＧＧＧＧＡＴＧＣＡＧ（配列番号１３９）、ＧＡＧＡＴＧＧＴＧＧＡＣＧＡＧＧＡＡＧＧ（配列番号１４０）、ＧＡＧＡＴＧＧＣＴＣＣＡＧＧＡＡＡＴＧＧ（配列番号１４１）、ＴＡＡＧＧＡＡＴＣＴＧＣＣＴＡＡＣＡＧＧ（配列番号１４２）、ＴＣＡＧＧＡＧＡＣＴＡＧＧＡＡＧＧＡＧＧ（配列番号１４３）、ＴＡＴＡＡＧＧＴＧＧＴＣＣＣＡＧＣＴＣＧ（配列番号１４４）、ＣＴＧＧＡＡＧＡＴＧＣＣＡＴＧＡＣＡＧＧ（配列番号１４５）、ＧＣＡＣＡＧＡＣＴＡＧＡＧＡＧＧＴＡＡＧ（配列番号１４６）、ＡＣＡＧＡＣＴＡＧＡＧＡＧＧＴＡＡＧＧＧ（配列番号１４７）、ＧＡＧＡＧＧＴＧＡＣＣＣＧＡＡＴＣＣＡＣ（配列番号１４８）、ＧＣＡＣＡＧＧＣＣＣＣＡＧＡＡＧＧＡＧＡ（配列番号１４９）、ＣＣＧＧＡＧＡＧＧＡＣＣＣＡＧＡＣＡＣＧ（配列番号１５０）、ＧＡＧＡＧＧＡＣＣＣＡＧＡＣＡＣＧＧＧＧ（配列番号１５１）、ＧＣＡＡＣＡＣＡＧＣＡＧＡＧＡＧＣＡＡＧ（配列番号１５２）、ＧＡＡＧＡＧＧＧＡＧＴＧＧＡＧＧＡＡＧＡ（配列番号１５３）、ＡＡＧＡＣＧＧＡＡＣＣＴＧＡＡＧＧＡＧＧ（配列番号１５４）、ＡＧＡＡＡＧＣＧＧＣＡＣＡＧＧＣＣＣＡＧ（配列番号１５５）、ＧＧＧＡＡＡＣＡＧＴＧＧＧＣＣＡＧＡＧＧ（配列番号１５６）、ＧＴＣＣＧＧＡＣＴＣＡＧＧＡＧＡＧＡＧＡ（配列番号１５７）、ＧＧＣＡＣＡＧＣＡＡＧＧＧＣＡＣＴＣＧＧ（配列番号１５８）、ＧＡＡＧＡＧＧＧＧＡＡＧＴＣＧＡＧＧＧＡ（配列番号１５９）、ＧＧＧＡＡＴＧＧＴＡＡＧＧＡＧＧＣＣＴＧ（配列番号１６０）、ＧＣＡＧＡＧＴＧＧＴＣＡＧＣＡＣＡＧＡＧ（配列番号１６１）、ＧＣＡＣＡＧＡＧＴＧＧＣＴＡＡＧＣＣＣＡ（配列番号１６２）、ＧＡＣＧＧＧＧＴＧＴＣＡＧＣＡＴＡＧＧＧ（配列番号１６３）、ＧＣＣＣＡＧＧＧＣＣＡＧＧＡＡＣＧＡＣＧ（配列番号１６４）、ＧＧＴＧＧＡＧＴＣＣＡＧＣＡＣＧＧＣＧＣ（配列番号１６５）、ＡＣＡＧＧＣＣＧＣＣＡＧＧＡＡＣＴＣＧＧ（配列番号１６６）、ＡＣＴＡＧＧＡＡＧＴＧＴＧＴＡＧＣＡＣＣ（配列番号１６７）、ＡＴＧＡＡＴＡＧＣＡＧＡＣＴＧＣＣＣＣＧ（配列番号１６８）、ＡＣＡＣＣＣＣＴＡＡＡＡＧＣＡＣＡＧＴＧ（配列番号１６９）、ＣＡＡＧＧＡＧＴＴＣＣＡＧＣＡＧＧＴＧＧ（配列番号１７０）、ＡＡＧＧＡＧＴＴＣＣＡＧＣＡＧＧＴＧＧＧ（配列番号１７１）、ＴＧＧＡＡＡＧＡＧＧＡＧＧＧＡＡＧＡＧＧ（配列番号１７２）、ＴＣＧＡＡＴＴＣＣＴＡＡＣＴＧＣＣＣＣＧ（配列番号１７３）、ＧＡＣＣＴＧＣＣＣＡＧＣＡＣＡＣＣＣＴＧ（配列番号１７４）、Ｇ

ＧＡＧＣＡＧＣＴＧＣＧＧＣＡＧＴＧＧＧ（配列番号１７５）、ＧＧＧＡＧＧＧＡＧＡＧ
ＣＴＴＧＧＣＡＧＧ（配列番号１７６）、ＧＴＴＡＣＧＴＧＧＣＣＡＡＧＡＡＧＣＡＧ（
配列番号１７７）、ＧＣＴＧＡＡＣＡＧＡＧＡＡＧＡＧＣＴＧＧ（配列番号１７８）、Ｔ
ＣＴＧＡＧＧＧＴＧＧＡＧＧＧＡＣＴＧＧ（配列番号１７９）、ＧＧＡＧＡＧＧＴＧＡＧ
ＧＧＡＣＴＴＧＧＧ（配列番号１８０）、ＧＴＧＡＡＣＣＡＧＧＣＡＧＡＣＡＡＣＧＡ（
配列番号１８１）、ＣＡＧＧＴＡＣＣＴＣＣＴＧＡＧＣＣＡＣＧ（配列番号１８２）、Ｇ
ＧＧＧＧＡＧＴＡＧＧＧＧＣＡＴＧＣＡＧ（配列番号１８３）、ＧＣＡＡＡＴＧＧＣＣＡ
ＧＣＡＡＧＧＧＴＧ（配列番号１８４）、ＣＡＡＡＴＧＧＣＣＡＧＣＡＡＧＧＧＴＧＧ（
配列番号３０９）、ＧＣＡＧＡＡＣＣＴＧＡＧＧＡＴＡＴＧＧＡ（配列番号３１０）、Ａ
ＡＴＡＣＡＣＡＧＡＡＴＧＡＡＡＡＴＡＧ（配列番号３１１）、ＣＴＧＧＴＧＡＣＴＡＧ
ＡＡＴＡＧＧＣＡＧ（配列番号３１２）、ＴＧＧＴＧＡＣＴＡＧＡＡＴＡＧＧＣＡＧＴ（
配列番号３１３）、ＴＡＡＡＡＧＡＡＴＧＴＧＡＡＡＡＧＡＴＧ（配列番号３１４）、Ｔ
ＣＡＧＧＡＧＴＴＣＡＡＧＡＣＣＡＣＣＣ（配列番号３１５）、ＴＧＴＡＧＴＣＣＣＡＧ
ＴＴＡＴＧＣＡＧＧ（配列番号３１６）、ＧＧＧＴＴＣＡＣＡＣＣＡＣＡＡＡＴＧＣＡ（
配列番号３１７）、ＧＧＣＡＡＡＴＧＧＣＣＡＧＣＡＡＧＧＧＴ（配列番号３１８）、Ａ
ＧＡＡＡＣＣＡＡＴＣＣＣＡＡＡＧＣＡＡ（配列番号３１９）、ＧＣＣＡＡＧＧＡＣＡＣ
ＣＡＡＡＡＣＣＣＡ（配列番号３２０）、ＡＧＴＧＧＴＧＡＴＡＡＧＧＣＡＡＣＡＧＴ（
配列番号３２１）、ＣＣＴＧＡＧＡＣＡＧＡＡＧＴＡＴＴＡＡＧ（配列番号３２２）、Ａ
ＡＧＧＴＣＡＣＡＣＡＡＴＧＡＡＴＡＧＧ（配列番号３２３）、ＣＡＣＣＡＴＡＣＴＡＧ
ＧＧＡＡＧＡＡＧＡ（配列番号３２４）、ＣＡＡＴＡＣＣＣＴＧＣＣＣＴＴＡＧＴＧＧ（
配列番号３２７）、ＡＡＴＡＣＣＣＴＧＣＣＣＴＴＡＧＴＧＧＧ（配列番号３２５）、Ｔ
ＴＡＧＴＧＧＧＧＧＧＴＧＧＡＧＴＧＧＧ（配列番号３２６）、ＧＴＧＧＧＧＧＧＴＧＧ
ＡＧＴＧＧＧＧＧＧ（配列番号３２８）、ＧＧＧＧＧＧＴＧＧＡＧＴＧＧＧＧＧＧＴＧ（
配列番号３２９）、ＧＧＧＧＴＧＧＡＧＴＧＧＧＧＧＧＴＧＧＧ（配列番号３３０）、Ｇ
ＧＧＴＧＧＡＧＴＧＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧ（配列番号３３１）、ＧＧＧＧＧＴＧＧＧＧＡ
ＡＡＧＡＣＡＴＣＧ（配列番号３３２）、ＧＣＡＧＣＴＧＴＧＡＡＴＴＣＴＧＡＴＡＧ（
配列番号３３３）、ＧＡＧＡＴＣＡＧＡＧＡＡＡＣＣＡＧＡＴＧ（配列番号３３４）、Ｔ
ＣＴＡＴＡＣＴＧＡＴＴＧＣＡＧＣＣＡＧ（配列番号３３５）、ＣＡＣＣＧＡＡＴＣＧＡ
ＧＡＡＧＣＧＡＣＴＣＧＡＣＡ（配列番号１８５）、ＣＡＣＣＧＧＴＣＣＣＴＧＧＧＣＧ
ＴＴＧＣＣＣＴＧＣ（配列番号１８６）、ＣＡＣＣＧＣＣＣＴＧＧＧＣＧＴＴＧＣＣＣＴ
ＧＣＡＧ（配列番号１８７）、ＣＡＣＣＧＣＣＧＴＧＧＧＡＡＧＡＴＡＡＡＣＴＡＡＴ（
配列番号１８８）、ＣＡＣＣＧＴＣＣＣＣＴＧＣＡＧＧＧＣＡＡＣＧＣＣＣ（配列番号１
８９）、ＣＡＣＣＧＧＴＣＧＡＧＴＣＧＣＴＴＣＴＣＧＡＴＴＡ（配列番号１９０）、Ｃ
ＡＣＣＧＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＣＣＧＴＣＴＴＧＴＡ（配列番号１９１）、ＣＡＣＣＧＧ
ＡＧＴＧＣＣＧＣＡＡＴＡＣＣＴＴＴＡＴ（配列番号１９２）、ＣＡＣＣＧＡＣＡＣＴＴ
ＴＧＧＴＧＧＴＧＣＡＧＣＡＡ（配列番号１９３）、ＣＡＣＣＧＴＣＴＣＡＡＡＴＧＧＴ
ＡＴＡＡＡＡＣＴＣ（配列番号１９４）、ＣＡＣＣＧＡＡＴＣＣＣＧＣＣＣＡＴＡＡＴＣ
ＧＡＧＡ（配列番号１９５）、ＣＡＣＣＧＴＣＣＣＧＣＣＣＡＴＡＡＴＣＧＡＧＡＡＧ（
配列番号１９６）、ＣＡＣＣＧＣＣＣＡＴＡＡＴＣＧＡＧＡＡＧＣＧＡＣＴ（配列番号１
９７）、ＣＡＣＣＧＧＡＧＡＡＧＣＧＡＣＴＣＧＡＣＡＴＧＧＡ（配列番号１９８）、Ｃ
ＡＣＣＧＧＡＡＧＣＧＡＣＴＣＧＡＣＡＴＧＧＡＧＧ（配列番号１９９）、ＣＡＣＣＧＧ
ＣＧＡＣＴＣＧＡＣＡＴＧＧＡＧＧＣＧＡ（配列番号２００）、ＡＡＡＣＴＧＴＣＧＡＧ
ＴＣＧＣＴＴＣＴＣＧＡＴＴＣ（配列番号２０１）、ＡＡＡＣＧＣＡＧＧＧＣＡＡＣＧＣ
ＣＣＡＧＧＧＡＣＣ（配列番号２０２）、ＡＡＡＣＣＴＧＣＡＧＧＧＣＡＡＣＧＣＣＣＡ
ＧＧＧＣ（配列番号２０３）、ＡＡＡＣＡＴＴＡＧＴＴＴＡＴＣＴＴＣＣＣＡＣＧＧＣ（
配列番号２０４）、ＡＡＡＣＧＧＧＣＧＴＴＧＣＣＣＴＧＣＡＧＧＧＧＡＣ（配列番号２
０５）、ＡＡＡＣＴＡＡＴＣＧＡＧＡＡＧＣＧＡＣＴＣＧＡＣＣ（配列番号２０６）、Ａ
ＡＡＣＴＡＣＡＡＧＡＣＧＧＧＡＧＧＣＡＧＣＡＧＣ（配列番号２０７）、ＡＡＡＣＡＴ
ＡＡＡＧＧＴＡＴＴＧＣＧＧＣＡＣＴＣＣ（配列番号２０８）、ＡＡＡＣＴＴＧＣＴＧＣ
ＡＣＣＡＣＣＡＡＡＧＴＧＴＣ（配列番号２０９）、ＡＡＡＣＧＡＧＴＴＴＴＡＴＡＣＣ

ＡＴＴＴＧＡＧＡＣ（配列番号２１０）、ＡＡＡＣＴＣＴＣＧＡＴＴＡＴＧＧＧＣＧＧＧＡＴＴＣ（配列番号２１１）、ＡＡＡＣＣＴＴＣＴＣＧＡＴＴＡＴＧＧＧＣＧＧＧＡＣ（配列番号２１２）、ＡＡＡＣＡＧＴＣＧＣＴＴＣＴＣＧＡＴＴＡＴＧＧＧＣ（配列番号２１３）、ＡＡＡＣＴＣＣＡＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧＣＴＴＣＴＣＣ（配列番号２１４）、ＡＡＡＣＣＣＴＣＣＡＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧＣＴＴＣＣ（配列番号２１５）、ＡＡＡＣＴＣＧＣＣＴＣＣＡＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧＣＣ（配列番号２１６）、ＣＡＣＣＧＡＣＡＧＧＧＴＴＡＡＴＧＴＧＡＡＧＴＣＣ（配列番号２１７）、ＣＡＣＣＧＴＣＣＣＣＣＴＣＴＡＣＡＴＴＴＡＡＡＧＴ（配列番号２１８）、ＣＡＣＣＧＣＡＴＴＴＡＡＡＧＴＴＧＧＴＴＴＡＡＧＴ（配列番号２１９）、ＣＡＣＣＧＴＴＡＧＡＡＡＡＴＡＴＡＡＡＧＡＡＴＡＡ（配列番号２２０）、ＣＡＣＣＧＴＡＡＡＴＧＣＴＴＡＣＴＧＧＴＴＴＧＡＡ（配列番号２２１）、ＣＡＣＣＧＴＣＣＴＧＧＧＴＣＣＡＧＡＡＡＡＡＧＡＴ（配列番号２２２）、ＣＡＣＣＧＴＴＧＧＧＴＧＧＴＧＡＧＣＡＴＣＴＧＴＧ（配列番号２２３）、ＣＡＣＣＧＣＧＧＧＧＡＧＡＧＴＧＧＡＧＡＡＡＡＡＧ（配列番号２２４）、ＣＡＣＣＧＧＴＴＡＡＡＡＣＴＣＴＴＴＡＧＡＣＡＡＣ（配列番号２２５）、ＣＡＣＣＧＧＡＡＡＡＴＣＣＣＣＡＣＴＡＡＧＡＴＣＣ（配列番号２２６）、ＡＡＡＣＧＧＡＣＴＴＣＡＣＡＴＴＡＡＣＣＣＴＧＴＣ（配列番号２２７）、ＡＡＡＣＡＣＴＴＴＡＡＡＴＧＴＡＧＡＧＧＧＧＧＡＣ（配列番号２２８）、ＡＡＡＣＡＣＴＴＡＡＡＣＣＡＡＣＴＴＴＡＡＡＴＧＣ（配列番号２２９）、ＡＡＡＣＴＴＡＴＴＣＴＴＴＡＴＡＴＴＴＴＣＴＡＡＣ（配列番号２３０）、ＡＡＡＣＴＴＣＡＡＡＣＣＡＧＴＡＡＧＣＡＴＴＴＡＣ（配列番号２３１）、ＡＡＡＣＡＴＣＴＴＴＴＴＣＴＧＧＡＣＣＣＡＧＧＡＣ（配列番号２３２）、ＡＡＡＣＣＡＣＡＧＡＴＧＣＴＣＡＣＣＡＣＣＣＡＡＣ（配列番号２３３）、ＡＡＡＣＣＴＴＴＴＴＣＴＣＣＡＣＴＣＴＣＣＣＣＧＣ（配列番号２３４）、ＡＡＡＣＧＴＴＧＴＣＴＡＡＡＧＡＧＴＴＴＴＡＡＣＣ（配列番号２３５）、ＡＡＡＣＧＧＡＴＣＴＴＡＧＴＧＧＧＧＡＴＴＴＴＣＣ（配列番号２３６）、ＡＧＴＡＧＣＡＧＴＡＡＴＧＡＡＧＣＴＧＧ（配列番号２３７）、ＡＴＡＣＣＣＡＧＡＣＧＡＧＡＡＡＧＣＴＧ（配列番号２３８）、ＴＡＣＣＣＡＧＡＣＧＡＧＡＡＡＧＣＴＧＡ（配列番号２３９）、ＧＧＴＧＧＴＧＡＧＣＡＴＣＴＧＴＧＴＧＧ（配列番号２４０）、ＡＡＡＴＧＡＧＡＡＧＡＡＧＡＧＧＣＡＣＡ（配列番号２４１）、ＣＴＴＧＴＧＧＣＣＴＧＧＧＡＧＡＧＣＴＧ（配列番号２４２）、ＧＣＴＧＴＡＧＡＡＧＧＡＧＡＣＡＧＡＧＣ（配列番号２４３）、ＧＡＧＣＴＧＧＴＴＧＧＧＡＡＧＡＣＡＴＧ（配列番号２４４）、ＣＴＧＧＴＴＧＧＧＡＡＧＡＣＡＴＧＧＧＧ（配列番号２４５）、ＣＧＴＧＡＧＧＡＴＧＧＧＡＡＧＧＡＧＧＧ（配列番号２４６）、ＡＴＧＣＡＧＡＧＴＣＡＧ
ＣＡＧＡＡＣＴＧ（配列番号２４７）、ＡＡＧＡＣＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＧＡＡＧＧ（配列番号２４８）、ＴＣＡＡＧＣＡＣＡＧＡＡＧＧＡＧＧＡＧＧ（配列番号２４９）、ＡＡＣＣＧＴＣＡＡＴＡＧＧＣＡＡＡＧＧＧ（配列番号２５０）、ＣＣＧＴＡＴＴＴＣＡＧＡＣＴＧＡＡＴＧＧ（配列番号２５１）、ＧＡＧＡＧＧＡＣＡＧＧＴＧＣＴＡＣＡＧＧ（配列番号２５２）、ＡＡＣＣＡＡＧＧＡＡＧＧＧＣＡＧＧＡＧＧ（配列番号２５３）、ＧＡＣＣＴＣＴＧＧＧＴＧＧＡＧＡＣＡＧＡ（配列番号２５４）、ＣＡＧＡＴＧＡＣＣＡＴＧＡＣＡＡＧＣＡＧ（配列番号２５５）、ＡＡＣＡＣＣＡＧＴＧＡＧＴＡＧＡＧＣＧＧ（配列番号２５６）、ＡＧＧＡＣＣＴＴＧＡＡＧＣＡＣＡＧＡＧＡ（配列番号２５７）、ＴＡＣＡＧＡＧＧＣＡＧＡＣＴＡＡＣＣＣＡ（配列番号２５８）、ＡＣＡＧＡＧＧＣＡＧＡＣＴＡＡＣＣＣＡＧ（配列番号２５９）、ＴＡＡＡＴＧＡＣＧＴＧＣＴＡＧＡＣＣＴＧ（配列番号２６０）、ＡＧＴＡＡＣＣＡＣＴＣＡＧＧＡＣＡＧＧＧ（配列番号２６１）、ＡＣＣＡＣＡＡＡＡＣＡＧＡＡＡＣＡＣＣＡ（配列番号２６２）、ＧＴＴＴＧＡＡＧＡＣＡＡＧＣＣＴＧＡＧＧ（配列番号２６３）、ＧＣＴＧＡＡＣＣＣＣＡＡＡＡＧＡＣＡＧＧ（配列番号２６４）、ＧＣＡＧＣＴＧＡＧＡＣＡＣＡＣＡＣＣＡＧ（配列番号２６５）、ＡＧＧＡＣＡＣＣＣＣＡＡＡＧＡＡＧＣＴＧ（配列番号２６６）、ＧＧＡＣＡＣＣＣＣＡＡＡＧＡＡＧＣＴＧＡ（配列番号２６７）、ＣＣＡＧＴＧＣＡＡＴＧＧＡＣＡＧＡＡＧＡ（配列番号２６８）、ＡＧＡＡＧＡＧＧＧＡＧＣＣＴＧＣＡＡＧＴ（配列番号２６９）、ＧＴＧＴＴＴＧＧＧＣＣＣＴＡＧＡＧＣＧＡ（配列番号２７０）、ＣＡＴＧＴＧＣＣＴＧＧＴ

ＧＣＡＡＴＧＣＡ（配列番号２７１）、ＴＡＣＡＡＡＧＡＧＧＡＡＧＡＴＡＡＧＴＧ（配列番号２７２）、ＧＴＣＡＣＡＧＡＡＴＡＣＡＣＣＡＣＴＡＧ（配列番号２７３）、ＧＧＧＴＴＡＣＣＣＴＧＧＡＣＡＴＧＧＡＡ（配列番号２７４）、ＣＡＴＧＧＡＡＧＧＧＴＡＴＴＣＡＣＴＣＧ（配列番号２７５）、ＡＧＡＧＴＧＧＣＣＴＡＧＡＣＡＧＧＣＴＧ（配列番号２７６）、ＣＡＴＧＣＴＧＧＡＣＡＧＣＴＣＧＧＣＡＧ（配列番号２７７）、ＡＧＴＧＡＡＡＧＡＡＧＡＧＡＡＡＡＴＴＣ（配列番号２７８）、ＴＧＧＴＡＡＧＴＣＴＡＡＧＡＡＡＣＣＴＡ（配列番号２７９）、ＣＣＣＡＣＡＧＣＣＴＡＡＣＣＡＣＣＣＴＡ（配列番号２８０）、ＡＡＴＡＴＴＴＣＡＡＡＧＣＣＣＴＡＧＧＧ（配列番号２８１）、ＧＣＡＣＴＣＧＧＡＡＣＡＧＧＧＴＣＴＧＧ（配列番号２８２）、ＡＧＡＴＡＧＧＡＧＣＴＣＣＡＡＣＡＧＴＧ（配列番号２８３）、ＡＡＧＴＴＡＧＡＧＣＡＧＣＣＡＧＧＡＡＡ（配列番号２８４）、ＴＡＧＡＧＣＡＧＣＣＡＧＧＡＡＡＧＧＧＡ（配列番号２８５）、ＴＧＡＡＴＡＣＣＣＴＴＣＣＡＴＧＴＣＣＡ（配列番号２８６）、ＣＣＴＧＣＡＴＴＧＣＡＣＣＡＧＧＣＡＣＡ（配列番号２８７）、ＴＣＴＡＧＧＧＣＣＣＡＡＡＣＡＣＡＣＣＴ（配列番号２８８）、ＴＣＣＣＴＣＣＡＴＣＴＡＴＣＡＡＡＡＧＧ（配列番号２８９）、ＡＧＣＣＣＴＧＡＧＡＣＡＧＡＡＧＣＡＧＧ（配列番号２９０）、ＧＣＣＣＴＧＡＧＡＣＡＧＡＡＧＣＡＧＧＴ（配列番号２９１）、ＡＧＧＡＧＡＴＧＣＡＧＴＧＡＴＡＣＧＣＡ（配列番号２９２）、ＡＣＡＡＴＡＣＣＡＡＧＧＧＴＡＴＣＣＧＧ（配列番号２９３）、ＴＧＡＴＡＡＡＧＡＡＡＡＣＡＡＡＧＴＧＡ（配列番号２９４）、ＡＡＡＧＡＡＡＡＣＡＡＡＧＴＧＡＧＧＧＡ（配列番号２９５）、ＧＴＧＧＣＡＡＧＴＧＧＡＧＡＡＡＴＴＧＡ（配列番号２９６）、ＣＡＡＧＴＧＧＡＧＡＡＡＴＴＧＡＧＧＧＡ（配列番号２９７）、ＧＴＧＧＴＧＡＴＧＡＴＴＧＣＡＧＣＴＧＧ（配列番号２９８）、ＣＴＡＴＧＴＧＣＣＴＧＡＣＡＣＡＣＡＧＧ（配列番号２９９）、ＧＧＧＴＴＧＧＡＣＣＡＧＧＡＡＡＧＡＧＧ（配列番号３００）、ＧＡＴＧＣＣＴＧＧＡＡＡＡＧＧＡＡＡＧＡ（配列番号３０１）、ＴＡＧＴＡＴＧＣＡＣＣＴＧＣＡＡＧＡＧＧ（配列番号３０２）、ＴＡＴＧＣＡＣＣＴＧＣＡＡＧＡＧＧＣＧＧ（配列番号３０３）、ＡＧＧＧＧＡＡＧＡＡＧＡＧＡＡＧＣＡＧＡ（配列番号３０４）、ＧＣＴＧＡＡＴＣＡＡＧＡＧＡＣＡＡＧＣＧ（配列番号３０５）、ＡＡＧＣＡＡＡＴＡＡＡＴＣＴＣＣＴＧＧＧ（配列番号３０６）、ＡＧＡＴＧＡＧＴＧＣＴＡＧＡＧＡＣＴＧＧ（配列番号３０７）、及びＣＴＧＡＴＧＧＴＴＧＡＧＣＡＣＡＧＣＡＧ（配列番号３０８）から選択されるガイドＲＮＡを含む。

【０１８３】

実施形態では、ガイドＲＮＡは、ＡＡＴＣＧＡＧＡＡＧＣＧＡＣＴＣＧＡＣＡ（配列番号４２５）及びｔｇｃｃｃｔｇｃａｇｇｇｇａｇｔｇａｇｃ（配列番号４２６）である。実施形態では、ガイドＲＮＡは、ｇａａｇｃｇａｃｔｃｇａｃａｔｇｇａｇｇ（配列番号４２７）及びｃｃｔｇｃａｇｇｇｇａｇｔｇａｇｃａｇｃ（配列番号４２８）である。

【０１８４】

実施形態では、オープンクロマチンの領域におけるｇＲＮＡベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、例えば、限定されないが、ｄＣａｓは、表３Ａ～３Ｆに示される。

【０１８５】

実施形態では、オープンクロマチンの領域におけるｇＲＮＡベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、例えば、限定されないが、ｄＣａｓは、表３Ａに示される通りである：

【表４－１】

GSHS	識別子	配列
AAVS1	14F	ggagccacgaaaacagatcc(配列番号800)
AAVS1	15F	cgaaaacagatccagggaca(配列番号801)
AAVS1	16F	agatccagggacacggtgct(配列番号802)
AAVS1	17F	gacacggtgctaggacagtg(配列番号803)
AAVS1	18F	gaaaatgacccaacagcctc(配列番号804)
AAVS1	19F	gcctggccggcctgaccact(配列番号805)
AAVS1	20F	ctgagcactgaaggcctggc(配列番号806)
AAVS1	21F	tggtttccactgagcactga(配列番号807)
AAVS1	22F	gatagccaggagtcctttcg(配列番号808)
AAVS1	23F	gcgcttccagtgctcagact(配列番号809)
AAVS1	24F	cagtgctcagactagggaag(配列番号810)
AAVS1	25F	gccccteetcettcagagcc(配列番号811)
AAVS1	26F	tccttcagagccaggagtcc(配列番号812)
AAVS1	27F	tggtttccgagcttgaccct(配列番号813)
AAVS1	28F	ctgcagagtatctgctgggg(配列番号814)
AAVS1	29F	cgttcctgcagagtatctgc(配列番号815)
AAVS1	29R	AAACGCAGATACTCTGCAGGAACGC(配列番号130)
AAVS1	AAVS1	TCCCCTCCCAGAAAGACCTG(配列番号131)
AAVS1	gAAVS2	TGGGCTCCAAGCAATCCTGG(配列番号132)
AAVS1	gAAVS3	GTGGCTCAGGAGGTACCTGG(配列番号133)
AAVS1	gAAVS4	GAGCCACGAAAACAGATCCA(配列番号134)
AAVS1	gAAVS5	AAGTGAACGGGGAAGGGAGG(配列番号135)
AAVS1	gAAVS6	GACAAAAGCCGAAGTCCAGG(配列番号136)
AAVS1	gAAVS7	GTGGTTGATAAACCCACGTG(配列番号137)
AAVS1	gAAVS8	TGGGAACAGCCACAGCAGGG(配列番号138)
AAVS1	gAAVS9	GCAGGGGAACGGGGATGCAG(配列番号139)
AAVS1	gAAVS10	GAGATGGTGGACGAGGAAGG(配列番号140)
AAVS1	gAAVS11	GAGATGGCTCCAGGAAATGG(配列番号141)
AAVS1	gAAVS12	TAAGGAATCTGCCTAACAGG(配列番号142)
AAVS1	gAAVS13	TCAGGAGACTAGGAAGGAGG(配列番号143)
AAVS1	gAAVS14	TATAAGGTGGTCCCAGCTCG(配列番号144)

【表４－２】

AAVS1	gAAVS15	CTGGAAGATGCCATGACAGG(配列番号145)
AAVS1	gAAVS16	GCACAGACTAGAGAGGTAAG(配列番号146)
AAVS1	gAAVS17	ACAGACTAGAGAGGTAAGGG(配列番号147)
AAVS1	gAAVS18	GAGAGGTGACCCGAATCCAC(配列番号148)
AAVS1	gAAVS19	GCACAGGCCCCAGAAGGAGA(配列番号149)
AAVS1	gAAVS20	CCGGAGAGGACCCAGACACG(配列番号150)
AAVS1	gAAVS21	GAGAGGACCCAGACACGGGG(配列番号151)
AAVS1	gAAVS22	GCAACACAGCAGAGAGCAAG(配列番号152)
AAVS1	gAAVS23	GAAGAGGGAGTGGAGGAAGA(配列番号153)
AAVS1	gAAVS24	AAGACGGAACCTGAAGGAGG(配列番号154)
AAVS1	gAAVS25	AGAAAGCGGCACAGGCCCAG(配列番号155)
AAVS1	gAAVS26	GGGAAACAGTGGGCCAGAGG(配列番号156)
AAVS1	gAAVS27	GTCCGGACTCAGGAGAGAGA(配列番号157)
AAVS1	gAAVS28	GGCACAGCAAGGGCACTCGG(配列番号158)
AAVS1	gAAVS29	GAAGAGGGGAAGTCGAGGGA(配列番号159)
AAVS1	gAAVS30	GGGAATGGTAAGGAGGCCTG(配列番号160)
AAVS1	gAAVS31	GCAGAGTGGTCAGCACAGAG(配列番号161)
AAVS1	gAAVS32	GCACAGAGTGGCTAAGCCCA(配列番号162)
AAVS1	gAAVS33	GACGGGGTGTCAGCATAGGG(配列番号163)
AAVS1	gAAVS34	GCCCAGGGCCAGGAACGACG(配列番号164)
AAVS1	gAAVS35	GGTGGAGTCCAGCACGGCGC(配列番号165)
AAVS1	gAAVS36	ACAGGCCGCCAGGAACTCGG(配列番号166)
AAVS1	gAAVS37	ACTAGGAAGTGTGTAGCACC(配列番号167)
AAVS1	gAAVS38	ATGAATAGCAGACTGCCCCG(配列番号168)
AAVS1	gAAVS39	ACACCCCTAAAAGCACAGTG(配列番号169)
AAVS1	gAAVS40	CAAGGAGTTCCAGCAGGTGG(配列番号170)
AAVS1	gAAVS41	AAGGAGTTCCAGCAGGTGGG(配列番号171)
AAVS1	gAAVS42	TGGAAAGAGGAGGGAAGAGG(配列番号172)
AAVS1	gAAVS43	TCGAATTCCTAACTGCCCCG(配列番号173)
AAVS1	gAAVS44	GACCTGCCCAGCACACCCTG(配列番号174)
AAVS1	gAAVS45	GGAGCAGCTGCGGCAGTGGG(配列番号175)
AAVS1	gAAVS46	GGGAGGGAGAGCTTGGCAGG(配列番号176)

【表４－３】

AAVS1	gAAVS47	GTTACGTGGCCAAGAAGCAG(配列番号177)
AAVS1	gAAVS48	GCTGAACAGAGAAGAGCTGG(配列番号178)
AAVS1	gAAVS49	TCTGAGGGTGGAGGGACTGG(配列番号179)
AAVS1	gAAVS50	GGAGAGGTGAGGGACTTGGG(配列番号180)
AAVS1	gAAVS51	GTGAACCAGGCAGACAACGA(配列番号181)
AAVS1	gAAVS52	CAGGTACCTCCTGAGCCACG(配列番号182)
AAVS1	gAAVS53	GGGGGAGTAGGGGCATGCAG(配列番号183)
hROSA26	gHROSA26-1	GCAAATGGCCAGCAAGGGTG(配列番号184)
hROSA26	gHROSA26-2	CAAATGGCCAGCAAGGGTGG(配列番号309)
hROSA26	gHROSA26-3	GCAGAACCTGAGGATATGGA(配列番号310)
hROSA26	gHROSA26-3	AATACACAGAATGAAAATAG(配列番号311)
hROSA26	gHROSA26-4	CTGGTGACTAGAATAGGCAG(配列番号312)
hROSA26	gHROSA26-5	TGGTGACTAGAATAGGCAGT(配列番号313)
hROSA26	gHROSA26-6	TAAAAGAATGTGAAAAGATG(配列番号314)
hROSA26	gHROSA26-7	TCAGGAGTTCAAGACCACCC(配列番号315)
hROSA26	gHROSA26-8	TGTAGTCCCAGTTATGCAGG(配列番号316)
hROSA26	gHROSA26-9	GGGTTCACACCACAAATGCA(配列番号317)
hROSA26	gHROSA26-10	GGCAAATGGCCAGCAAGGGT(配列番号318)
hROSA26	gHROSA26-11	AGAAACCAATCCCAAAGCAA(配列番号319)
hROSA26	gHROSA26-12	GCCAAGGACACCAAAACCCA(配列番号320)
hROSA26	gHROSA26-13	AGTGGTGATAAGGCAACAGT(配列番号321)
hROSA26	gHROSA26-14	CCTGAGACAGAAGTATTAAG(配列番号322)
hROSA26	gHROSA26-15	AAGGTCACACAATGAATAGG(配列番号323)
hROSA26	gHROSA26-16	CACCATACTAGGGAAGAAGA(配列番号324)
hROSA26	gHROSA26-17	CAATACCCTGCCCTTAGTGG(配列番号327)
hROSA26	gHROSA26-18	AATACCCTGCCCTTAGTGGG(配列番号325)
hROSA26	gHROSA26-19	TTAGTGGGGGGTGGAGTGGG(配列番号326)
hROSA26	gHROSA26-20	GTGGGGGGTGGAGTGGGGGG(配列番号328)
hROSA26	gHROSA26-21	GGGGGGTGGAGTGGGGGGTG(配列番号329)
hROSA26	gHROSA26-22	GGGGTGGAGTGGGGGGTGGG(配列番号330)
hROSA26	gHROSA26-23	GGGTGGAGTGGGGGGTGGGG(配列番号331)
hROSA26	gHROSA26-24	GGGGGTGGGGAAAGACATCG(配列番号332)

【表４－４】

hROSA26	gHROSA26-25	GCAAATGGCCAGCAAGGGTG(配列番号184)
hROSA26	gHROSA26-26	CAAATGGCCAGCAAGGGTGG(配列番号309)
hROSA26	gHROSA26-27	GCAGAACCTGAGGATATGGA(配列番号310)
hROSA26	gHROSA26-28	AATACACAGAATGAAAATAG(配列番号311)
hROSA26	gHROSA26-29	CTGGTGACTAGAATAGGCAG(配列番号312)
hROSA26	gHROSA26-30	TGGTGACTAGAATAGGCAGT(配列番号313)
hROSA26	gHROSA26-31	TAAAAGAATGTGAAAAGATG(配列番号314)
hROSA26	gHROSA26-32	TCAGGAGTTCAAGACCACCC(配列番号315)
hROSA26	gHROSA26-33	TGTAGTCCCAGTTATGCAGG(配列番号316)
hROSA26	gHROSA26-34	GGGTTCACACCACAAATGCA(配列番号317)
hROSA26	gHROSA26-35	GGCAAATGGCCAGCAAGGGT(配列番号318)
hROSA26	gHROSA26-36	AGAAACCAATCCCAAAGCAA(配列番号319)
hROSA26	gHROSA26-37	GCCAAGGACACCAAAACCCA(配列番号320)
hROSA26	gHROSA26-38	AGTGGTGATAAGGCAACAGT(配列番号321)
hROSA26	gHROSA26-39	CCTGAGACAGAAGTATTAAG(配列番号322)
hROSA26	gHROSA26-40	AAGGTCACACAATGAATAGG(配列番号323)
hROSA26	gHROSA26-41	CACCATACTAGGGAAGAAGA(配列番号324)
hROSA26	gHROSA26-42	CAATACCCTGCCCTTAGTGG(配列番号327)
hROSA26	gHROSA26-43	AATACCCTGCCCTTAGTGGG(配列番号325)
hROSA26	gHROSA26-44	TTAGTGGGGGGTGGAGTGGG(配列番号326)
hROSA26	gHROSA26-45	GTGGGGGGTGGAGTGGGGGG(配列番号328)
hROSA26	gHROSA26-46	GGGGGGTGGAGTGGGGGGTG(配列番号329)
hROSA26	gHROSA26-47	GGGGTGGAGTGGGGGGTGGG(配列番号330)
hROSA26	gHROSA26-48	GGGTGGAGTGGGGGGTGGGG(配列番号331)
hROSA26	gHROSA26-49	GGGGGTGGGGAAAGACATCG(配列番号332)
hROSA26	gHROSA26-50	GCAGCTGTGAATTCTGATAG(配列番号333)
hROSA26	gHROSA26-51	GAGATCAGAGAAACCAGATG(配列番号334)
hROSA26	gHROSA26-52	TCTATACTGATTGCAGCCAG(配列番号335)
hROSA26	gHROSA26-1	GCAAATGGCCAGCAAGGGTG(配列番号184)
hROSA26	44F	CACCGAATCGAGAAGCGACTCGACA(配列番号185)
hROSA26	45F	CACCGGTCCCTGGGCGTTGCCCTGC(配列番号186)
hROSA26	46F	CACCGCCCTGGGCGTTGCCCTGCAG(配列番号187)

【表４－５】

hROSA26	1nF	CACCGCCGTGGGAAGATAAACTAAT(配列番号188)
hROSA26	2nF	CACCGTCCCCTGCAGGGCAACGCCC(配列番号189)
hROSA26	3nF	CACCGGTCGAGTCGCTTCTCGATTA(配列番号190)
hROSA26	4nF	CACCGCTGCTGCCTCCCGTCTTGTA(配列番号191)
hROSA26	5nF	CACCGGAGTGCCGCAATACCTTTAT(配列番号192)
hROSA26	6nF	CACCGACACTTTGGTGGTGCAGCAA(配列番号193)
hROSA26	7nF	CACCGTCTCAAATGGTATAAAACTC(配列番号194)
hROSA26	8nF	CACCGCCGTGGGAAGATAAACTAAT(配列番号188)
hROSA26	9F	CACCGAATCCCGCCCATAATCGAGA(配列番号195)
hROSA26	10F	CACCGTCCCGCCCATAATCGAGAAG(配列番号196)
hROSA26	11F	CACCGCCCATAATCGAGAAGCGACT(配列番号197)
hROSA26	12F	CACCGGAGAAGCGACTCGACATGGA(配列番号198)
hROSA26	13F	CACCGGAAGCGACTCGACATGGAGG(配列番号199)
hROSA26	14F	CACCGGCGACTCGACATGGAGGCGA(配列番号200)
hROSA26	44F	AAACTGTCGAGTCGCTTCTCGATTC(配列番号201)
hROSA26	45F	AAACGCAGGGCAACGCCCAGGGACC(配列番号202)
hROSA26	46F	AAACCTGCAGGGCAACGCCCAGGGC(配列番号203)
hROSA26	1nR	AAACATTAGTTTATCTTCCCACGGC(配列番号204)
hROSA26	2nR	AAACGGGCGTTGCCCTGCAGGGGAC(配列番号205)
hROSA26	3nR	AAACTAATCGAGAAGCGACTCGACC(配列番号206)
hROSA26	4nR	AAACTACAAGACGGGAGGCAGCAGC(配列番号207)
hROSA26	5nR	AAACATAAAGGTATTGCGGCACTCC(配列番号208)
hROSA26	6nR	AAACTTGCTGCACCACCAAAGTGTC(配列番号209)
hROSA26	7nR	AAACGAGTTTTATACCATTTGAGAC(配列番号210)
hROSA26	8nR	AAACATTAGTTTATCTTCCCACGGC(配列番号204)
hROSA26	9R	AAACTCTCGATTATGGGCGGGATTC(配列番号211)
hROSA26	10R	AAACCTTCTCGATTATGGGCGGGAC(配列番号212)
hROSA26	11R	AAACAGTCGCTTCTCGATTATGGGC(配列番号213)
hROSA26	12R	AAACTCCATGTCGAGTCGCTTCTCC(配列番号214)
hROSA26	13R	AAACCCTCCATGTCGAGTCGCTTCC(配列番号215)
hROSA26	14R	AAACTCGCCTCCATGTCGAGTCGCC(配列番号216)
CCR5	1F	CACCGACAGGGTTAATGTGAAGTCC(配列番号217)

【表４－６】

CCR5	2F	CACCGTCCCCCTCTACATTTAAAGT(配列番号218)
CCR5	3F	CACCGCATTTAAAGTTGGTTTAAGT(配列番号219)
CCR5	4F	CACCGTTAGAAAATATAAAGAATAA(配列番号220)
CCR5	5	CACCGTAAATGCTTACTGGTTTGAA(配列番号221)
CCR5	6F	CACCGTCCTGGGTCCAGAAAAAGAT(配列番号222)
CCR5	7F	CACCGTTGGGTGGTGAGCATCTGTG(配列番号223)
CCR5	8F	CACCGCGGGGAGAGTGGAGAAAAAG(配列番号224)
CCR5	9F	CACCGGTTAAAACTCTTTAGACAAC(配列番号225)
CCR5	10F	CACCGGAAAATCCCCACTAAGATCC(配列番号226)
CCR5	1R	AAACGGACTTCACATTAACCCTGTC(配列番号227)
CCR5	2R	AAACACTTTAAATGTAGAGGGGGAC(配列番号228)
CCR5	3R	AAACACTTAAACCAACTTTAAATGC(配列番号229)
CCR5	4R	AAACTTATTCTTTATATTTTCTAAC(配列番号230)
CCR5	5R	AAACTTCAAACCAGTAAGCATTTAC(配列番号231)
CCR5	6R	AAACATCTTTTTCTGGACCCAGGAC(配列番号232)
CCR5	7R	AAACCACAGATGCTCACCACCCAAC(配列番号233)
CCR5	8R	AAACCTTTTTCTCCACTCTCCCCGC(配列番号234)
CCR5	9R	AAACGTTGTCTAAAGAGTTTTAACC(配列番号235)
CCR5	10R	AAACGGATCTTAGTGGGGATTTTCC(配列番号236)
CCR5	gCCR5-1	AGTAGCAGTAATGAAGCTGG(配列番号237)
CCR5	gCCR5-2	ATACCCAGACGAGAAAGCTG(配列番号238)
CCR5	gCCR5-3	TACCCAGACGAGAAAGCTGA(配列番号239)
CCR5	gCCR5-4	GGTGGTGAGCATCTGTGTGG(配列番号240)
CCR5	gCCR5-5	AAATGAGAAGAAGAGGCACA(配列番号241)
CCR5	gCCR5-6	CTTGTGGCCTGGGAGAGCTG(配列番号242)
CCR5	gCCR5-7	GCTGTAGAAGGAGACAGAGC(配列番号243)
CCR5	gCCR5-8	GAGCTGGTTGGGAAGACATG(配列番号244)
CCR5	gCCR5-9	CTGGTTGGGAAGACATGGGG(配列番号245)
CCR5	gCCR5-10	CGTGAGGATGGGAAGGAGGG(配列番号246)
CCR5	gCCR5-11	ATGCAGAGTCAGCAGAACTG(配列番号247)
CCR5	gCCR5-12	AAGACATCAAGCACAGAAGG(配列番号248)

【表４－７】

CCR5	gCCR5-13	TCAAGCACAGAAGGAGGAGG(配列番号249)
CCR5	gCCR5-14	AACCGTCAATAGGCAAAGGG(配列番号250)
CCR5	gCCR5-15	CCGTATTTCAGACTGAATGG(配列番号251)
CCR5	gCCR5-16	GAGAGGACAGGTGCTACAGG(配列番号252)
CCR5	gCCR5-17	AACCAAGGAAGGGCAGGAGG(配列番号253)
CCR5	gCCR5-18	GACCTCTGGGTGGAGACAGA(配列番号254)
CCR5	gCCR5-19	CAGATGACCATGACAAGCAG(配列番号255)
CCR5	gCCR5-20	AACACCAGTGAGTAGAGCGG(配列番号256)
CCR5	gCCR5-21	AGGACCTTGAAGCACAGAGA(配列番号257)
CCR5	gCCR5-22	TACAGAGGCAGACTAACCCA(配列番号258)
CCR5	gCCR5-23	ACAGAGGCAGACTAACCCAG(配列番号259)
CCR5	gCCR5-24	TAAATGACGTGCTAGACCTG(配列番号260)
CCR5	gCCR5-25	AGTAACCACTCAGGACAGGG(配列番号261)
chr2	gchr2-1	ACCACAAAACAGAAACACCA(配列番号262)
chr2	gchr2-2	GTTTGAAGACAAGCCTGAGG(配列番号263)
chr4	gchr4-1	GCTGAACCCCAAAAGACAGG(配列番号264)
chr4	gchr4-2	GCAGCTGAGACACACACCAG(配列番号265)
chr4	gchr4-3	AGGACACCCCAAAGAAGCTG(配列番号266)
chr4	gchr4-4	GGACACCCCAAAGAAGCTGA(配列番号267)
chr6	gchr6-1	CCAGTGCAATGGACAGAAGA(配列番号268)
chr6	gchr6-2	AGAAGAGGGAGCCTGCAAGT(配列番号269)
chr6	gchr6-3	GTGTTTGGGCCCTAGAGCGA(配列番号270)
chr6	gchr6-4	CATGTGCCTGGTGCAATGCA(配列番号271)
chr6	gchr6-5	TACAAAGAGGAAGATAAGTG(配列番号272)
chr6	gchr6-6	GTCACAGAATACACCACTAG(配列番号273)
chr6	gchr6-7	GGGTTACCCTGGACATGGAA(配列番号274)
chr6	gchr6-8	CATGGAAGGGTATTCACTCG(配列番号275)
chr6	gchr6-9	AGAGTGGCCTAGACAGGCTG(配列番号276)
chr6	gchr6-10	CATGCTGGACAGCTCGGCAG(配列番号277)
chr6	gchr6-11	AGTGAAAGAAGAGAAAATTC(配列番号278)
chr6	gchr6-12	TGGTAAGTCTAAGAAACCTA(配列番号279)
chr6	gchr6-13	CCCACAGCCTAACCACCCTA(配列番号280)

【表４－８】

chr6	gchr6-14	AATATTTCAAAGCCCTAGGG(配列番号281)
chr6	gchr6-15	GCACTCGGAACAGGGTCTGG(配列番号282)
chr6	gchr6-16	AGATAGGAGCTCCAACAGTG(配列番号283)
chr6	gchr6-17	AAGTTAGAGCAGCCAGGAAA(配列番号284)
chr6	gchr6-18	TAGAGCAGCCAGGAAAGGGA(配列番号285)
chr6	gchr6-19	TGAATACCCTTCCATGTCCA(配列番号286)
chr6	gchr6-20	CCTGCATTGCACCAGGCACA(配列番号287)
chr6	gchr6-21	TCTAGGGCCCAAACACACCT(配列番号288)
chr6	gchr6-22	TCCCTCCATCTATCAAAAGG(配列番号289)
chr10	gchr10-1	AGCCCTGAGACAGAAGCAGG(配列番号290)
chr10	gchr10-2	GCCCTGAGACAGAAGCAGGT(配列番号291)
chr10	gchr10-3	AGGAGATGCAGTGATACGCA(配列番号292)
chr10	gchr10-4	ACAATACCAAGGGTATCCGG(配列番号293)
chr10	gchr10-5	TGATAAAGAAAACAAAGTGA(配列番号294)
chr10	gchr10-6	AAAGAAAACAAAGTGAGGGA(配列番号295)
chr10	gchr10-7	GTGGCAAGTGGAGAAATTGA(配列番号296)
chr10	gchr10-8	CAAGTGGAGAAATTGAGGGA(配列番号297)
chr10	gchr10-9	GTGGTGATGATTGCAGCTGG(配列番号298)
chr11	gchr11-1	CTATGTGCCTGACACACAGG(配列番号299)
chr11	gchr11-2	GGGTTGGACCAGGAAAGAGG(配列番号300)
chr17	gchr17-1	GATGCCTGGAAAAGGAAAGA(配列番号301)
chr17	gchr17-2	TAGTATGCACCTGCAAGAGG(配列番号302)
chr17	gchr17-3	TATGCACCTGCAAGAGGCGG(配列番号303)
chr17	gchr17-4	AGGGGAAGAAGAGAAGCAGA(配列番号304)
chr17	gchr17-5	GCTGAATCAAGAGACAAGCG(配列番号305)
chr17	gchr17-6	AAGCAAATAAATCTCCTGGG(配列番号306)
chr17	gchr17-7	AGATGAGTGCTAGAGACTGG(配列番号307)
chr17	gchr17-8	CTGATGGTTGAGCACAGCAG(配列番号308)

【０１８６】

実施形態では、ｈＲＯＳＡ２６におけるＴＴＡＡ部位（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ３：９，３９６，１３３－９，３９６，３０５）に対して、ｇＲＮＡベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのｇＲＮＡ、例えば、限定されないが、ｄＣａｓは、表３Ｂに示される：

【表５】

HROSA26ガイド番号	DNA配列	配列番号
ガイド44	AATCGAGAAGCGACTCGACA	425
ガイド45-C	GTCCCTGGGCGTTGCCCTGC	442
ガイド46-C	CCCTGGGCGTTGCCCTGCAG	443
SPGガイド1-C	GAGTGAGCAGCTGTAAGATT	444
SPGガイド2-C	CAGGGGAGTGAGCAGCTGTA	445
SPGガイド3-C	CCTGCAGGGGAGTGAGCAGC	428
SPGガイド4-C	TGCCCTGCAGGGGAGTGAGC	426
SPGガイド5-C	CGTTGCCCTGCAGGGGAGTG	446
SPGガイド6-C	TGGGCGTTGCCCTGCAGGGG	447
SPGガイド7-C	TTGGTCCCTGGGCGTTGCCC	448
SPGガイド8	AAGAATCCCGCCCATAATCG	449
SPGガイド9	AATCCCGCCCATAATCGAGA	450
SPGガイド10	TCCCGCCCATAATCGAGAAG	451
SPGガイド11	CCCATAATCGAGAAGCGACT	452
SPGガイド12	GAGAAGCGACTCGACATGGA	453
SPGガイド13	GAAGCGACTCGACATGGAGG	427
SPGガイド14	GCGACTCGACATGGAGGCGA	454
ガイドN1	CCGTGGGAAGATAAACTAAT	455
ガイドN2	TCCCCTGCAGGGCAACGCCC	456
ガイドN3-C	GTCGAGTCGCTTCTCGATTA	457
ガイドO12	CGACACCAACTCTAGTCCGT	458
ガイドO13	CAGCTGCTCACTCCCCTGCA	459
ガイドO14-C	AGTCGCTTCTCGATTATGGG	460

【０１８７】

実施形態では、ＡＡＶＳ１（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ１９：５５，１１２，８５１－５５，１１３，３２４）に対して、ｇＲＮＡベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのｇＲＮＡ、例えば、限定されないが、ｄＣａｓは、表３Ｃに示される：

【表６】

AAVS1ガイド番号	DNA配列	配列番号
AAVガイド12	ACCCTTGGAAGGACCTGGCTGGG	461
AAVガイド13C	TCCGAGCTTGACCCTTGGAA	462
AAVガイド14	GGAGCCACGAAAACAGATCCAGG	463
AAVガイド14C	TGGTTTCCGAGCTTGACCCT	112
AAVガイド15	GGAGCCACGAAAACAGATCCAGG	463
AAVガイド16	AGATCCAGGGACACGGTGCTAGG	464
AAVガイド17	GACACGGTGCTAGGACAGTGGGG	465
AAVガイド18	GAAAATGACCCAACAGCCTCTGG	466
AAVガイド19	GCCTGGCCGGCCTGACCACTGGG	467
AAVガイド20	CTGAGCACTGAAGGCCTGGCCGG	468
AAVガイド21	TGGTTTCCACTGAGCACTGAAGG	469
AAVガイド22	GGTGCTTTCCTGAGGACCGATAG	470
AAVガイド23	GCGCTTCCAGTGCTCAGACTAGG	471
AAVガイド24	CAGTGCTCAGACTAGGGAAGAGG	472
AAVガイド25	GCCCCTCCTCCTTCAGAGCCAGG	473
AAVガイド26	TCCTTCAGAGCCAGGAGTCCTGG	474
AAVガイド27	CCAAGGGTCAAGCTCGGAAACCA	475
AAVガイド28	CTGCAGAGTATCTGCTGGGGTGG	476
AAVガイド29	CGTTCCTGCAGAGTATCTGCTGG	477
AAVガイド30C	GTGGGGAAAATGACCCAACA	478
AAVガイド31	GAAGGCCTGGCCGGCCTGAC	479
AAVガイド32C	ACTCCTGGCTCTGAAGGAGG	480
AAVガイド33C	GGGCTGGGGGCCAGGACTCC	481
AAVガイド34	GTCCTTCCAAGGGTCAAGCT	482
AAVガイド35	TCAAGCTCGGAAACCACCCC	483

【０１８８】

実施形態では、染色体４（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ４：３０，７９３，５３４－３０，８７５，４７６、またはｈｇ３８　ｃｈｒ４：３０，７９３，５３３－３０，７９３，５３７（９６７７）、ｃｈｒ４：３０，８７５，４７２－３０，８７５，４７６（８９４８））に対して、ｇＲＮＡベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのｇＲＮＡ、例えば、限定されないが、ｄＣａｓは、表３Ｄに示される：

【表７－１】

CHR4ガイドRNA番号	DNA配列	配列番号
ガイドC4-1	ATTGTCTTCACTAAACCCGTTGG	484
ガイドC4-2	TAAACCCGTTGGGAATACAATGG	485
ガイドC4-3	TTGTCTTCACTAAACCCGTTGGG	486
ガイドC4-4	TGATTCATAGGAGTCTATTAAGG	487
ガイドC4-5	TTACATATGCTTCGAGTTTGTGG	488
実施例1ガイドC4-6	ACTCTTAAGGTAGGACTAATTGG	489
ガイドC4-7	TATGTGTGCAATAGCGTTAAAGG	490
ガイドC4-8	CGTTGGGAATACAATGGCTTAGG	491
ガイドC4-9	TCACAATGGAACTCTGCCTTTGG	492
ガイドC4-10	GACCACAAATCAATGCCCAAAGG	493
ガイドC4-11	CTAAGCCATTGTATTCCCAACGG	494
ガイドC4-12	AGCATTCTGGAGTGTCACAATGG	495
ガイドC4-13	CAATAGCCCACTTTAATACTAGG	496
ガイドC4-14	CTTTATCCAAGTGAATCCTTTGG	497
ガイドC4-15	GGCATTGATTTGTGGTCATTTGG	498
ガイドC4-16	TAAGCCATTGTATTCCCAACGGG	499
ガイドC4-17	AATACAATCACTCTTAAGGTAGG	500
ガイドC4-18	GAAGTACCTTTCACTATTTTGGG	501
ガイドC4-19	CAAGCAACAAATGACTTCTAAGG	502
ガイドC4-20	TTTGAATACAATCACTCTTAAGG	503
ガイドC4A1	ACAAACGGACTACGTAAACTTGG	504
ガイドC4A2	ACAAGATGTGAACACGACGATGG	505
ガイドC4A3	GTTGCACCGTTGATTCCTTCAGG	506
ガイドC4A4	AGTAATATTGAATTAGGGCGTGG	507
ガイドC4A5	CCTGATGTTGGCTCGACATTAGG	508
ガイドC4A6	CTTTGTTGGGTCTTAGCTTAAGG	509
ガイドC4A7	TCGGAACAGCTCCTTCCTGAAGG	510
ガイドC4A8	AGTAGTTTCTGAGGTCATGTTGG	511
ガイドC4A9	CTTGAAAATACGATGATGTGAGG	512
ガイドC4A10	GCATTAATCTAGAGAGAGGGAGG	513
ガイドC4A11	GGGTCATGTTAGAATTCATGTGG	514
ガイドC4A12	TGATGCATTAATCTAGAGAGAGG	515
ガイドC4A13	ACATCATCGTATTTTCAAGTTGG	516
ガイドC4A14	CTAGCTGACAAACATGTGAGTGG	517
ガイドC4A15	AACATGACCCAAGTGAGTCCAGG	518
ガイドC4A16	GATTCCGTATTTGCTTTGTTGGG	519
ガイドC4A17	TACGATGATGTGAGGAAATAAGG	520
ガイドC4A18	GTAATATGTCTAAGTACTGATGG	521

【表７－２】

ガイドC4A19	GTAAAGTGAGCTGGTTCATTAGG	522
ガイドC4A20	ACTAGAGTCCTTAAGAAGGGGGG	523

【０１８９】

実施形態では、染色体２２（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ２２：３５，３７０，０００－３５，３８０，０００、またはｈｇ３８　ｃｈｒ２２：３５，３７３，９１２－３５，３７３，９１６（８６１）、ｃｈｒ２２：３５，３７７，８４３－３５，３７７，８４７（１１５３））に対して、ｇＲＮＡベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノ

ムセーフハーバー部位を標的とするためのｇＲＮＡ、例えば、限定されないが、ｄＣａｓは、表３Ｅに示される：

【表８－１】

CHR22ガイド番号	DNA配列	配列番号
ガイドC22-1	ATAACACGTGAGCCGTCCTAAGG	524
ガイドC22-2	GGAAGACTTTTCTCTATACGAGG	525
ガイドC22-3	GCATTCCTTTCATCCATGGCAGG	526
ガイドC22-4	GACATATGGTTATAAAAATCAGG	527
ガイドC22-5	GGAGTGCAGTCCCTGACATATGG	528
ガイドC22-6	GTGGGTTAGGGTGGTTAACTGGG	529
ガイドC22-7	AGGTGCAAAAAGGTTGCTGTGGG	530
ガイドC22-8	CGTGACAAGGCAAAGTGGCGTGG	531
ガイドC22-9	GAAGGACTGCCCCTGACGTCAGG	532
ガイドC22-10	CTGCCCCTGACGTCAGGAGTTGG	533
ガイドC22-11	TGTGGGTTAGGGTGGTTAACTGG	534
ガイドC22-12	ACCCTTTTAGAGTTTTCTGCTGG	535
ガイドC22-13	AACTTCCTGCCATGGATGAAAGG	536
ガイドC22-14	GCAAAAAGGTTGCTGTGGGTTGG	537
ガイドC22-15	AATTTGGGGGTAGATAGGCATGG	538
ガイドC22-16	AGAAAACTCTAAAAGGGTATAGG	539
ガイドC22-17	ATTAGCATTCCTTTCATCCATGG	540
ガイドC22-18	CCCAGCAGAAAACTCTAAAAGGG	541
ガイドC22-19	CAGGTGCAAAAAGGTTGCTGTGG	542
ガイドC22-20	GCAAGAGATGAAATTCCATATGG	543
ガイドC22A1	GGGCTGTTCTAACGAAGTCTGGG	544
ガイドC22A2	TGTCCATTCAGCGACCCTAGAGG	545
ガイドC22A3	GGCTGTTCTAACGAAGTCTGGGG	546
ガイドC22A4	GTCCATTCAGCGACCCTAGAGGG	547
ガイドC22A5	GGGGCTGTTCTAACGAAGTCTGG	548
ガイドC22A6	GGCTGAATCAGCATGCGAAAGGG	549
ガイドC22A7	TTCCAATGGGGGGCATAGCCTGG	550
ガイドC22A8	TACCCTCTAGGGTCGCTGAATGG	551
ガイドC22A9	ATCCTCTTGGGCCTTATAAGAGG	552
ガイドC22A10	GGCCAGGCTATGCCCCCCATTGG	553
ガイドC22A11	CTAGAGGACCAGAACAACTCTGG	554
ガイドC22A12	TCCCTCTTATAAGGCCCAAGAGG	555
ガイドC22A13	AGGCTGAATCAGCATGCGAAAGG	556
ガイドC22A14	GGACCAGAACAACTCTGGCCTGG	557
ガイドC22A15	GGGCTTTTATTTGGCCCAGCAGG	558
ガイドC22A16	GTCGCTGAATGGACAGACTCTGG	559
ガイドC22A17	CTCATGAGTTTTACCCTCTAGGG	560
ガイドC22A18	TCCTCTTGGGCCTTATAAGAGGG	561

【表８－２】

ガイドC22A19	TCTTGGGCCTTATAAGAGGGAGG	562
ガイドC22A20	TAGAACAGCCCCCCACACAGTGG	563

【０１９０】

実施形態では、染色体Ｘ（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒＸ：１３４，４１９，６６１－１３４，５４１，１７２、またはｈｇ３８　ｃｈｒＸ：１３４，４７６，３０４－１３４，

４７６，３０７（８５）、ｃｈｒＸ：１３４，４７６，３３７－１３４，４７６，３４０（５１））に対して、ｇＲＮＡベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのｇＲＮＡ、例えば、限定されないが、ｄＣａｓは、表３Ｆに示される：

【表９】

CHRXガイド番号	DNA配列	配列番号
ガイドCX-1	GTTACGTTATGACTAATCTTTGG	564
ガイドCX-2	TACGTTATGACTAATCTTTGGGG	565
ガイドCX-3	GGAAGTAGTGTTATGATGTATGG	566
ガイドCX-4	GTTATGATGTATGGGCATAAAGG	567
ガイドCX-5	GAAGTAGTGTTATGATGTATGGG	568
ガイドCX-6	ATAGCTGCTGGCAGTATAACTGG	569
ガイドCX-7	GCATCACAACATTGACACTGTGG	570
ガイドCX-8	AAGGCGAGTTTCTACAAAGATGG	571
ガイドCX-9	TTACGTTATGACTAATCTTTGGG	572
ガイドCX-10	CAAGACTGATTAAGACTGATGGG	573
ガイドCX-11	AGCAGCAATGTATTAAAGGCTGG	574
ガイドCX-12	CTACAGGATTGATGTAAACATGG	575
ガイドCX-13	TGGGCATAAAGGGTTTTAATGGG	576
ガイドCX-14	ACATCAATCCTGTAGGTGATTGG	577
ガイドCX-15	ATTCTAGTCATTATAGCTGCTGG	578
ガイドCX-16	CATCAATCCTGTAGGTGATTGGG	579
ガイドCX-17	GTTATAAGATCAATTCTGAGTGG	580
ガイドCX-18	GGCAGACTGTGGATCAAAAGTGG	581
ガイドCX-19	ATGGCTGCCCAATCACCTACAGG	582
ガイドCX-20	TCAAAGCATGTACTTAGAGTTGG	583

【０１９１】

実施形態では、ｇＲＮＡは、本明細書に概説する配列のうちの１つ以上、または少なくとも約１０個の変異、もしくは少なくとも約９個の変異、もしくは少なくとも約８個の変異、もしくは少なくとも約７個の変異、もしくは少なくとも約６個の変異、もしくは少なくとも約５個の変異、もしくは少なくとも約４個の変異、もしくは少なくとも約３個の変異、もしくは少なくとも約２個の変異、もしくは少なくとも約１個の変異を有するバリアント配列を含む。

【０１９２】

実施形態では、Ｃａｓベースの標的要素は、Ｃａｓ１２またはそのバリアント、例えば、限定されないが、Ｃａｓ１２ａ（例えば、ｄＣａｓ１２ａ）、またはＣａｓ１２ｊ（例えば、ｄＣａｓ１２ｊ）、またはＣａｓ１２ｋ（例えば、ｄＣａｓ１２ｋ）を含む。実施形態では、標的要素は、Ｃａｓ１２酵素ガイドＲＮＡ複合体を含む。実施形態では、ヌクレアーゼ欠損ｄＣａｓ１２ガイドＲＮＡ複合体、任意選択的に、ｄＣａｓ１２ｊガイドＲＮＡ複合体またはｄＣａｓ１２ａガイドＲＮＡ複合体を含む。

【０１９３】

実施形態では、標的要素は、ジンクフィンガー（ＺＦ）、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）、メガヌクレアーゼ、及びクラスター化され、規則的な間隔の空いた短い回文配列の反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連タンパク質から選択され、これらのうちのいずれかは、実施形態では、触媒不活性である。実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質は、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）、及びそのｇＲＮＡ複合体から選択される。実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質は、Ｃａｓ９、ｘＣａｓ９、

Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１４、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、クラス１Ｃａｓタンパク質、クラス２Ｃａｓタンパク質、ＭＡＤ７、ＭＧ１ヌクレアーゼ、ＭＧ２ヌクレアーゼ、ＭＧ３ヌクレアーゼ、またはそれらの触媒不活性形態、及びそれらのｇＲＮＡ複合体から選択される。

【０１９４】

実施形態では、可動要素酵素は、核酸分子のゲノムセーフハーバー部位（ＧＳＨＳ）内のＴＡジヌクレオチド部位またはＴＴＡＡテトラヌクレオチド部位にドナーＤＮＡを挿入することができる。可動要素酵素は、生体細胞と接触したときにＧＳＨＳ内のドナーＤＮＡの挿入を引き起こすのに好適である。

【０１９５】

実施形態では、標的要素は、可動要素酵素をＧＳＨＳ配列に指向するのに好適である。

【０１９６】

実施形態では、標的要素は、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）を含む。ＴＡＬＥ　ＤＢＤは、１つ以上の反復配列を含む。例えば、実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤは、約１４、または約１５、または約１６、または約１７、または約１８、または約１８．５個の反復配列を含む。実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤ繰り返し配列は３３個または３４個のアミノ酸を含む。

【０１９７】

実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤ反復配列のうちの１つ以上は、３３個または３４個のアミノ酸の残基１２または１３に反復可変二残基（ＲＶＤ）を含む。

【０１９８】

実施形態では、標的要素（例えば、ＴＡＬＥまたはＣａｓ（例えば、Ｃａｓ９もしくはＣａｓ１２、またはそれらのバリアント）ＤＢＤは、哺乳動物の可動要素酵素をヒトＧＳＨＳに特異的に結合させる。実施形態では、ＴＡＬＥまたはＣａｓ　ＤＢＤは、可動要素酵素をＧＳＨＳに隔離し、反復可変二残基（ＲＶＤ）ＴＡＬＥまたはｇＲＮＡヌクレオチド配列に近接して位置し得る、近傍のＴＡジヌクレオチドまたはＴＴＡＡテトラヌクレオチド部位への転位を促進する。ＧＳＨＳ領域は、可動要素酵素活性の影響を受けやすいオープンクロマチン部位に位置する。したがって、哺乳動物の可動要素酵素は、ＴＡまたはＴＴＡＡ部位を認識するその能力に基づいて作動するだけでなく、ＴＡＬＥまたはＣａｓ　ＤＢＤに近接する特定の位置にキメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲを含むドナーＤＮＡを指向する。本開示の実施形態によるキメラ可動要素酵素は、遺伝毒性のリスクが極めて低く、既存の遺伝子療法と比較して優れた特色を呈する。

【０１９９】

実施形態では、キメラ可動要素酵素は、オフターゲット配列の結合が低減または阻害されることを特徴とし、その結果、転位のために、ＴＡＬＥまたはＣａｓ　ＤＢＤ等、それに融合したＤＢＤに依存するように変異される。

【０２００】

記載される細胞、組成物、及び方法は、変異原性リスクを増加させるベクター及び導入遺伝子の挿入を低減させることを可能にする。記載される細胞及び方法は、ウイルス及びヌクレアーゼ媒介遺伝子療法と比較して遺伝毒性を低減する遺伝子導入系を利用する。二重系は、活性可動要素酵素の持続を回避し、著しい細胞毒性を伴わずにヒト細胞を効率的にトランスフェクトするように設計されている。

【０２０１】

実施形態では、ＴＡＬＥまたはＣａｓ　ＤＢＤは、カスタマイズ可能であり、ＴＡＬＥまたはＣａｓ　ＤＢＤ等は、特定のゲノム位置を標的とするために選択される。実施形態では、ゲノム位置は、ＴＡジヌクレオチド部位またはＴＴＡＡ（配列番号４４０）テトラヌクレオチド部位に近接している。

【０２０２】

本開示の実施形態は、宿主ゲノム内の特定の部位を標的とするＴＡＬＥまたはＣａｓまたはｄＣａｓ９／ｇＲＮＡ　ＤＢＤの能力を利用する。ＴＡＬＥまたはＣａｓ　ＤＢＤま

たはｄＣａｓ９／ｇＲＮＡ　ＤＢＤのＤＮＡ標的能力は、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に連結されるＴＡＬＥ反復配列（例えば、モジュラーアレイ）またはｇＲＮＡによって提供される。各ＴＡＬＥまたはｇＲＮＡは、ある特定の塩基対（複数可）または残基（複数可）を認識することができる。

【０２０３】

ＴＡＬＥヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）は、ゲノム編集及び標的二本鎖切断の導入のための既知のツールである。ＴＡＬＥＮは、カスタマイズ可能なＤＢＤに融合したＦｏｋＩヌクレアーゼドメインなどのエンドヌクレアーゼを含む。このＤＢＤは、宿主植物細胞内の遺伝子の転写を改変させるためにキサントモナス細菌によって分泌されるタンパク質である、ＴＡＬＥからの高度に保存された反復から構成される。ＤＢＤは、発散した１２番目及び１３番目のアミノ酸を有する反復された高度に保存された３３～３４アミノ酸配列を含む。ＲＶＤと称されるこれらの２つの位置は、高度に可変であり、特定の塩基対またはヌクレオチド認識との強い相関を示す。アミノ酸配列とＤＮＡ認識との間のこの直接的な関係は、適切なＲＶＤを含有する反復セグメントの組み合わせを選択することによって、特定のＤＢＤの操作を可能にした。Ｂｏｃｈ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．２０１１；２９（２）：１３５－６。

【０２０４】

したがって、ＴＡＬＥＮは、モジュラーＤＮＡ結合ＴＡＬＥ反復ドメインを標的結合部位内の個々の塩基に関連付ける「タンパク質－ＤＮＡコード」を使用して容易に設計することができる。Ｊｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．２０１３；１４（１）：４９－５５．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｒｍ３４８６を参照されたい。例えば、次の表にそのようなコードを示す：

【表１０】

ＲＶＤ	ヌクレオチド	ＲＶＤ	ヌクレオチド
ＨＤ	Ｃ	ＮＩ	Ａ
ＮＨ	Ｇ	ＮＮ	Ｇ、Ａ
ＮＫ	Ｇ	ＮＳ	Ｇ、Ｃ、Ａ
ＮＧ	Ｔ、ｍＣ		

【０２０５】

ＴＡＬＥＮを使用して、ヒト細胞内の目的の任意のＤＮＡ配列を本質的に標的とすることができることが実証されている。Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１；２９：１４３－１４８。潜在的な標的部位の選択及びＧ塩基の認識のための特定のＴＡＬＥ反復ドメイン（超可変位置にＮＨ残基を保有する）の使用のためのガイドラインが提案されている。Ｓｔｒｅｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１２；３０：５９３－５９５を参照されたい。

【０２０６】

したがって、実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤは、１つ以上の反復配列を含む。実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤは、約１５、または約１６、または約１７、または約１８、または約１８．５個の反復配列を含む。実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤ繰り返し配列は３３個または３４個のアミノ酸を含む。

【０２０７】

実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤ反復配列のうちの１つ以上は、３３個または３４個のアミノ酸の残基１２または１３にＲＶＤを含む。ＲＶＤは、ある特定の塩基対（複数可）または残基（複数可）を認識することができる。実施形態では、ＲＶＤは核酸分子内の１つの塩基対を認識する。実施形態では、ＲＶＤは核酸分子内のＣ残基を認識し、ＨＤ、Ｎ（ギャップ）、ＨＡ、ＮＤ、及びＨＩから選択される。実施形態では、ＲＶＤは核酸分子

内のＧ残基を認識し、ＮＮ、ＮＨ、ＮＫ、ＨＮ、及びＮＡから選択される。実施形態では、ＲＶＤは、核酸分子内のＡ残基を認識し、かつＮＩ及びＮＳから選択される。実施形態では、ＲＶＤは、核酸分子内のＴ残基を認識し、かつＮＧ、ＨＧ、Ｈ（ギャップ）、及びＩＧから選択される。

【０２０８】

実施形態では、ＧＳＨＳは染色体内のオープンクロマチン位置にある。実施形態では、ＧＳＨＳは、アデノ随伴ウイルス部位１（ＡＡＶＳ１）、ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体５（ＣＣＲ５）遺伝子、ＨＩＶ－１コ受容体、及びヒトＲｏｓａ２６遺伝子座から選択される。実施形態では、ＧＳＨＳは、ヒト染色体２、４、６、１０、１１、１７、２２、またはＸに位置する。

【０２０９】

実施形態では、ＧＳＨＳは、ＴＡＬＣ１、ＴＡＬＣ２、ＴＡＬＣ３、ＴＡＬＣ４、ＴＡＬＣ５、ＴＡＬＣ７、ＴＡＬＣ８、ＡＶＳ１、ＡＶＳ２、ＡＶＳ３、ＲＯＳＡ１、ＲＯＳＡ２、ＴＡＬＥＲ１、ＴＡＬＥＲ２、ＴＡＬＥＲ３、ＴＡＬＥＲ４、ＴＡＬＥＲ５、ＳＨＣＨＲ２－１、ＳＨＣＨＲ２－２、ＳＨＣＨＲ２－３、ＳＨＣＨＲ２－４、ＳＨＣＨＲ４－１、ＳＨＣＨＲ４－２、ＳＨＣＨＲ４－３、ＳＨＣＨＲ６－１、ＳＨＣＨＲ６－２、ＳＨＣＨＲ６－３、ＳＨＣＨＲ６－４、ＳＨＣＨＲ１０－１、ＳＨＣＨＲ１０－２、ＳＨＣＨＲ１０－３、ＳＨＣＨＲ１０－４、ＳＨＣＨＲ１０－５、ＳＨＣＨＲ１１－１、ＳＨＣＨＲ１１－２、ＳＨＣＨＲ１１－３、ＳＨＣＨＲ１７－１、ＳＨＣＨＲ１７－２、ＳＨＣＨＲ１７－３、及びＳＨＣＨＲ１７－４から選択される。

【０２１０】

実施形態では、ＧＳＨＳは、ＴＧＧＣＣＧＧＣＣＴＧＡＣＣＡＣＴＧＧ（配列番号２３）、ＴＧＡＡＧＧＣＣＴＧＧＣＣＧＧＣＣＴＧ（配列番号２４）、ＴＧＡＧＣＡＣＴＧＡＡＧＧＣＣＴＧＧＣ（配列番号２５）、ＴＣＣＡＣＴＧＡＧＣＡＣＴＧＡＡＧＧＣ（配列番号２６）、ＴＧＧＴＴＣＣＡＣＴＧＡＧＣＡＣＴＧ（配列番号２７）、ＴＧＧＧＧＡＡＡＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡ（配列番号２８）、ＴＡＧＧＡＣＡＧＴＧＧＧＧＡＡＡＡＴＧ（配列番号２９）、ＴＣＣＡＧＧＧＡＣＡＣＧＧＴＧＣＴＡＧ（配列番号３０）、ＴＣＡＧＡＧＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣＴＧＧ（配列番号３１）、ＴＣＣＴＴＣＡＧＡＧＣＣＡＧＧＡＧＴＣ（配列番号３２）、ＴＣＣＴＣＣＴＴＣＡＧＡＧＣＣＡＧＧＡ（配列番号３３）、ＴＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＴＴＣＡ（配列番号３４）、ＴＣＣＧＡＧＣＴＴＧＡＣＣＣＴＴＧＧＡ（配列番号３５）、ＴＧＧＴＴＴＣＣＧＡＧＣＴＴＧＡＣＣＣ（配列番号３６）、ＴＧＧＧＧＴＧＧＴＴＴＣＣＧＡＧＣＴＴ（配列番号３７）、ＴＣＴＧＣＴＧＧＧＧＴＧＧＴＴＴＣＣＧ（配列番号３８）、ＴＧＣＡＧＡＧＴＡＴＣＴＧＣＴＧＧＧＧ（配列番号３９）、ＣＣＡＡＴＣＣＣＣＴＣＡＧＴ（配列番号４０）、ＣＡＧＴＧＣＴＣＡＧＴＧＧＡＡ（配列番号４１）、ＧＡＡＡＣＡＴＣＣＧＧＣＧＡＣＴＣＡ（配列番号４２）、ＴＣＧＣＣＣＣＴＣＡＡＡＴＣＴＴＡＣＡ（配列番号４３）、ＴＣＡＡＡＴＣＴＴＡＣＡＧＣＴＧＣＴＣ（配列番号４４）、ＴＣＴＴＡＣＡＧＣＴＧＣＴＣＡＣＴＣＣ（配列番号４５）、ＴＡＣＡＧＣＴＧＣＴＣＡＣＴＣＣＣＣＴ（配列番号４６）、ＴＧＣＴＣＡＣＴＣＣＣＣＴＧＣＡＧＧＧ（配列番号４７）、ＴＣＣＣＣＴＧＣＡＧＧＧＣＡＡＣＧＣＣ（配列番号４８）、ＴＧＣＡＧＧＧＣＡＡＣＧＣＣＣＡＧＧＧ（配列番号４９）、ＴＣＴＣＧＡＴＴＡＴＧＧＧＣＧＧＧＡＴ（配列番号５０）、ＴＣＧＣＴＴＣＴＣＧＡＴＴＡＴＧＧＧＣ（配列番号５１）、ＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧＣＴＴＣＴＣＧＡＴ（配列番号５２）、ＴＣＣＡＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧＣＴＴＣＴ（配列番号５３）、ＴＣＧＣＣＴＣＣＡＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧ（配列番号５４）、ＴＣＧＴＣＡＴＣＧＣＣＴＣＣＡＴＧＴＣ（配列番号５５）、ＴＧＡＴＣＴＣＧＴＣＡＴＣＧＣＣＴＣＣ（配列番号５６）、ＧＣＴＴＣＡＧＣＴＴＣＣＴＡ（配列番号５７）、ＣＴＧＴＧＡＴＣＡＴＧＣＣＡ（配列番号５８）、ＡＣＡＧＴＧＧＴＡＣＡＣＡＣＣＴ（配列番号５９）、ＣＣＡＣＣＣＣＣＣＣＡＣＴＡＡＧ（配列番号６０）、ＣＡＴＴＧＧＣＣＧＧＧＣＡＣ（配列番号６１）、ＧＣＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＧＡＧＡ（配列番号６２）、ＡＣＡＣＣＣＧＡＴＣＣＡＣＴＧＧＧ（配列番号６３）、ＧＣＴＧＣＡＴＣＡＡＣＣＣＣ（配列番号６４）、ＧＣＣＡＣＡＡＡＣＡＧＡ

ＡＡＴＡ（配列番号６５）、ＧＧＴＧＧＣＴＣＡＴＧＣＣＴＧ（配列番号６６）、ＧＡＴＴＴＧＣＡＣＡＧＣＴＣＡＴ（配列番号６７）、ＡＡＧＣＴＣＴＧＡＧＧＡＧＣＡ（配列番号６８）、ＣＣＣＴＡＧＣＴＧＴＣＣＣ（配列番号６９）、ＧＣＣＴＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧ（配列番号７０）、ＡＴＧＧＧＣＴＴＣＡＣＧＧＡＴ（配列番号７１）、ＧＡＡＡＣＴＡＴＧＣＣＴＧＣ（配列番号７２）、ＧＣＡＣＣＡＴＴＧＣＴＣＣＣ（配列番号７３）、ＧＡＣＡＴＧＣＡＡＣＴＣＡＧ（配列番号７４）、ＡＣＡＣＣＡＣＴＡＧＧＧＧＴ（配列番号７５）、ＧＴＣＴＧＣＴＡＧＡＣＡＧＧ（配列番号７６）、ＧＧＣＣＴＡＧＡＣＡＧＧＣＴＧ（配列番号７７）、ＧＡＧＧＣＡＴＴＣＴＴＡＴＣＧ（配列番号７８）、ＧＣＣＴＧＧＡＡＡＣＧＴＴＣＣ（配列番号７９）、ＧＴＧＣＴＣＴＧＡＣＡＡＴＡ（配列番号８０）、ＧＴＴＴＴＧＣＡＧＣＣＴＣＣ（配列番号８１）、ＡＣＡＧＣＴＧＴＧＧＡＡＣＧＴ（配列番号８２）、ＧＧＣＴＣＴＣＴＴＣＣＴＣＣＴ（配列番号８３）、ＣＴＡＴＣＣＣＡＡＡＡＣＴＣＴ（配列番号８４）、ＧＡＡＡＡＡＣＴＡＴＧＴＡＴ（配列番号８５）、ＡＧＧＣＡＧＧＣＴＧＧＴＴＧＡ（配列番号８６）、ＣＡＡＴＡＣＡＡＣＣＡＣＧＣ（配列番号８７）、ＡＴＧＡＣＧＧＡＣＴＣＡＡＣＴ（配列番号８８）、ＣＡＣＡＡＣＡＴＴＴＧＴＡＡ（配列番号８９）、及びＡＴＴＴＣＣＡＧＴＧＣＡＣＡ（配列番号９０）のうちの１つ以上を含む。

【０２１１】

実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤは、ＴＧＧＣＣＧＧＣＣＴＧＡＣＣＡＣＴＧＧ（配列番号２３）、ＴＧＡＡＧＧＣＣＴＧＧＣＣＧＧＣＣＴＧ（配列番号２４）、ＴＧＡＧＣＡＣＴＧＡＡＧＧＣＣＴＧＧＣ（配列番号２５）、ＴＣＣＡＣＴＧＡＧＣＡＣＴＧＡＡＧＧＣ（配列番号２６）、ＴＧＧＴＴＴＣＣＡＣＴＧＡＧＣＡＣＴＧ（配列番号２７）、ＴＧＧＧＧＡＡＡＡＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡ（配列番号２８）、ＴＡＧＧＡＣＡＧＴＧＧＧＧＡＡＡＡＴＧ（配列番号２９）、ＴＣＣＡＧＧＧＡＣＡＣＧＧＴＧＣＴＡＧ（配列番号３０）、ＴＣＡＧＡＧＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣＴＧＧ（配列番号３１）、ＴＣＣＴＴＣＡＧＡＧＣＣＡＧＧＡＧＴＣ（配列番号３２）、ＴＣＣＴＣＣＴＴＣＡＧＡＧＣＣＡＧＧＡ（配列番号３３）、ＴＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＴＴＣＡ（配列番号３４）、ＴＣＣＧＡＧＣＴＴＧＡＣＣＣＴＴＧＧＡ（配列番号３５）、ＴＧＧＴＴＴＣＣＧＡＧＣＴＴＧＡＣＣＣ（配列番号３６）、ＴＧＧＧＧＴＧＧＴＴＴＣＣＧＡＧＣＴＴ（配列番号３７）、ＴＣＴＧＣＴＧＧＧＧＴＧＧＴＴＴＣＣＧ（配列番号３８）、ＴＧＣＡＧＡＧＴＡＴＣＴＧＣＴＧＧＧＧ（配列番号３９）、ＣＣＡＡＴＣＣＣＣＴＣＡＧＴ（配列番号４０）、ＣＡＧＴＧＣＴＣＡＧＴＧＧＡＡ（配列番号４１）、ＧＡＡＡＣＡＴＣＣＧＧＣＧＡＣＴＣＡ（配列番号４２）、ＴＣＧＣＣＣＣＴＣＡＡＡＴＣＴＴＡＣＡ（配列番号４３）、ＴＣＡＡＡＴＣＴＴＡＣＡＧＣＴＧＣＴＣ（配列番号４４）、ＴＣＴＴＡＣＡＧＣＴＧＣＴＣＡＣＴＣＣ（配列番号４５）、ＴＡＣＡＧＣＴＧＣＴＣＡＣＴＣＣＣＣＴ（配列番号４６）、ＴＧＣＴＣＡＣＴＣＣＣＣＴＧＣＡＧＧＧ（配列番号４７）、ＴＣＣＣＣＴＧＣＡＧＧＧＣＡＡＣＧＣＣ（配列番号４８）、ＴＧＣＡＧＧＧＣＡＡＣＧＣＣＣＡＧＧＧ（配列番号４９）、ＴＣＴＣＧＡＴＴＡＴＧＧＧＣＧＧＧＡＴ（配列番号５０）、ＴＣＧＣＴＴＣＴＣＧＡＴＴＡＴＧＧＧＣ（配列番号５１）、ＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧＣＴＴＣＴＣＧＡＴ（配列番号５２）、ＴＣＣＡＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧＣＴＴＣＴ（配列番号５３）、ＴＣＧＣＣＴＣＣＡＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧ（配列番号５４）、ＴＣＧＴＣＡＴＣＧＣＣＴＣＣＡＴＧＴＣ（配列番号５５）、ＴＧＡＴＣＴＣＧＴＣＡＴＣＧＣＣＴＣＣ（配列番号５６）、ＧＣＴＴＣＡＧＣＴＴＣＣＴＡ（配列番号５７）、ＣＴＧＴＧＡＴＣＡＴＧＣＣＡ（配列番号５８）、ＡＣＡＧＴＧＧＴＡＣＡＣＡＣＣＴ（配列番号５９）、ＣＣＡＣＣＣＣＣＣＡＣＴＡＡＧ（配列番号６０）、ＣＡＴＴＧＧＣＣＧＧＧＣＡＣ（配列番号６１）、ＧＣＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＧＡＧＡ（配列番号６２）、ＡＣＡＣＣＣＧＡＴＣＣＡＣＴＧＧＧ（配列番号６３）、ＧＣＴＧＣＡＴＣＡＡＣＣＣＣ（配列番号６４）、ＧＣＣＡＣＡＡＡＣＡＧＡＡＡＴＡ（配列番号６５）、ＧＧＴＧＧＣＴＣＡＴＧＣＣＴＧ（配列番号６６）、ＧＡＴＴＴＧＣＡＣＡＧＣＴＣＡＴ（配列番号６７）、ＡＡＧＣＴＣＴＧＡＧＧＡＧＣＡ（配列番号６８）、ＣＣＣＴＡＧＣＴＧＴＣＣＣ（配列番号６９）、ＧＣＣＴＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧ（配列番号７０）、ＡＴＧＧＧＣＴＴＣＡＣＧＧＡＴ（配列番号７１）、Ｇ

ＡＡＡＣＴＡＴＧＣＣＴＧＣ（配列番号７２）、ＧＣＡＣＣＡＴＴＧＣＴＣＣＣ（配列番号７３）、ＧＡＣＡＴＧＣＡＡＣＴＣＡＧ（配列番号７４）、ＡＣＡＣＣＡＣＴＡＧＧＧＧＴ（配列番号７５）、ＧＴＣＴＧＣＴＡＧＡＣＡＧＧ（配列番号７６）、ＧＧＣＣＴＡＧＡＣＡＧＧＣＴＧ（配列番号７７）、ＧＡＧＧＣＡＴＴＣＴＴＡＴＣＧ（配列番号７８）、ＧＣＣＴＧＧＡＡＡＣＧＴＴＣＣ（配列番号７９）、ＧＴＧＣＴＣＴＧＡＣＡＡＴＡ（配列番号８０）、ＧＴＴＴＴＧＣＡＧＣＣＴＣＣ（配列番号８１）、ＡＣＡＧＣＴＧＴＧＧＡＡＣＧＴ（配列番号８２）、ＧＧＣＴＣＴＣＴＴＣＣＴＣＣＣＴ（配列番号８３）、ＣＴＡＴＣＣＣＡＡＡＡＣＴＣＴ（配列番号８４）、ＧＡＡＡＡＡＣＴＡＴＧＴＡＴ（配列番号８５）、ＡＧＧＣＡＧＧＣＴＧＧＴＴＧＡ（配列番号８６）、ＣＡＡＴＡＣＡＡＣＣＡＣＧＣ（配列番号８７）、ＡＴＧＡＣＧＧＡＣＴＣＡＡＣＴ（配列番号８８）、ＣＡＣＡＡＣＡＴＴＴＧＴＡＡ（配列番号８９）、及びＡＴＴＴＣＣＡＧＴＧＣＡＣＡ（配列番号９０）のうちの１つに結合する。

【０２１２】

実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤは、

ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ、

ＮＨ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ、

ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ、

ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ、

ＮＨ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ、

ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ、

ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＧ　ＮＨ、

ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＨ、

ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ、

ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＧ　ＨＤ、

ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ、

ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＩ、

ＨＤ　ＨＤ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ、

ＮＨ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＨＤ　ＨＤ、

ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＧ、

ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＨ、

ＮＨ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ、

ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＧ、

ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＩ、

NH NI NI NI HD NI NG HD HD NH NH HD NH NI
HD NG HD NI、
HD NH HD HD HD HD NG HD NI NI NI NG HD NG
NG NI HD NI、
HD NI NI NI NG HD NG NG NI HD NI NH HD NG
NH HD NG HD、
HD NG NG NI HD NI NH HD NG NH HD NG HD NI
HD NG HD HD、
NI HD NI NH HD NG NH HD NG HD NI HD NG HD
HD HD HD NG、
NH HD NG HD NI HD NG HD HD HD HD NG NH HD
NI NH NH NH、
HD HD HD HD NG NH HD NI NH NH NH HD NI NI
HD NH HD HD、
NH HD NI NH NH NH HD NI NI HD NH HD HD HD
NI NH NH NH、
HD NG HD NH NI NG NG NI NG NH NH NH HD NH
NH NH NI NG、
HD NH HD NG NG HD NG HD NH NI NG NG NI NG
NH NH NH HD、
NH NG HD NH NI NH NG HD NH HD NG NG HD NG
HD NH NI NG、
HD HD NI NG NH NG HD NH NI NH NG HD NH HD
NG NG HD NG、
HD NH HD HD NG HD HD NI NG NH NG HD NH NI
NH NG HD NH、
HD NH NG HD NI NG HD NH HD HD NG HD HD NI
NG NH NG HD、
NH NI NG HD NG HD NH NG HD NI NG HD NH HD
HD NG HD HD、
NH HD NG NG HD NI NH HD NG NG HD HD NG NI、
HD NG NK NG NH NI NG HD NI NG NH HD HD NI、
NI HD NI NN NG NN NN NG NI HD NI HD NI HD HD NG、
HD HD NI HD HD HD HD HD HD NI HD NG NI NI NN、
HD NI NG NG NN NN HD HD NN NN NN HD NI HD、
NN HD NG NG NN NI NI HD HD HD NI NN NN NI NN NI、
NI HD NI HD HD HD NN NI NG HD HD NI HD NG
NN NN NN、NN HD NG NN HD NI NG HD NI NI HD
HD HD HD、
NN NN HD NI HD NN NI NI NI HD NI HD HD HD
NG HD HD、
NN NN NG NN NN HD NG HD NI NG NN HD HD NG NN、
NN NI NG NG NG NN HD NI HD NI NN HD NG HD NI NG、
NI NI NH HD NG HD NG NH NI NH NH NI NH HD、
HD HD HD NG NI NK HD NG NH NG HD HD HD HD、
NH HD HD NG NI NH HD NI NG NH HD NG NI NH、
NI NG NH NH NH HD NG NG HD NI HD NH NH NI NG、
NH NI NI NI HD NG NI NG NH HD HD NG NH HD、
NH HD NI HD HD NI NG NG NH HD NG HD HD HD、
NH NI HD NI NG NH HD NI NI HD NG HD NI NH、

ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＧ、
ＮＨ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ、
ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ、
ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＧ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＨ、
ＮＮ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＮ　ＮＮ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＮ　ＮＧ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ、
ＮＮ　ＮＧ　ＮＮ　ＨＤ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＮ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＧ　ＮＩ、
ＮＮ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＮ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＮ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ、
ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＮ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＮ　ＮＧ　ＮＮ　ＮＮ　ＮＩ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＮ　ＮＧ、
ＨＤ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＮ　ＮＩ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＮ　ＮＩ　ＮＮ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ
ＮＮ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＮ、
ＨＤ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＧ、
ＮＨ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＧ、
ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ、
ＨＤ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＧ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＩ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＮ　ＨＤ、
ＮＩ　ＮＧ　ＮＮ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＮ　ＮＮ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ、
ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＮ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＩ、及び
ＮＩ　ＮＧ　ＮＧ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＮ　ＮＧ　ＮＮ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ
のうちの１つ以上を含む。

【０２１３】

実施形態では、ＴＡＬＥ　ＤＢＤは、本明細書に概説する配列のうちの１つ以上、またはそれに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性、もしくは少なくとも約１０個の変異、もしくは少なくとも約９個の変異、もしくは少なくとも約８個の変異、もしくは少なくとも約７個の変異、もしくは少なくとも約６個の変異、もしくは少なくとも約５個の変異、もしくは少なくとも約４個の変異、もしくは少なくとも約３個の変異、もしくは少なくとも約２個の変異、もしくは少なくとも約１個の変異を有するバリアント配列を含む。

【０２１４】

実施形態では、ＧＳＨＳ及びＴＡＬＥ　ＤＢＤ配列は、
ＴＧＧＣＣＧＧＣＣＴＧＡＣＣＡＣＴＧＧ（配列番号２３）及びＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ
ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ、
ＴＧＡＡＧＧＣＣＴＧＧＣＣＧＧＣＣＴＧ（配列番号２４）及びＮＨ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＨ
ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ、
ＴＧＡＧＣＡＣＴＧＡＡＧＧＣＣＴＧＧＣ（配列番号２５）及びＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ
ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ、
ＴＣＣＡＣＴＧＡＧＣＡＣＴＧＡＡＧＧＣ（配列番号２６）及びＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ
ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＨＤ、
ＴＧＧＴＴＴＣＣＡＣＴＧＡＧＣＡＣＴＧ（配列番号２７）及びＮＨ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＧ
ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ、
ＴＧＧＧＧＡＡＡＡＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡ（配列番号２８）及びＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ
ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ、
ＴＡＧＧＡＣＡＧＴＧＧＧＧＡＡＡＡＴＧ（配列番号２９）及びＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ
ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＩ　ＮＧ　ＮＨ、
ＴＣＣＡＧＧＧＡＣＡＣＧＧＴＧＣＴＡＧ（配列番号３０）及びＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ
ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＩ　ＨＤ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＧ　ＮＨ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＩ　ＮＨ、
ＴＣＡＧＡＧＣＣＡＧＧＡＧＴＣＣＴＧＧ（配列番号３１）及びＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＩ
ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＧ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＨ　ＮＨ、
ＴＣＣＴＴＣＡＧＡＧＣＣＡＧＧＡＧＴＣ（配列番号３２）及びＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＮＧ
ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＨＤ　ＨＤ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＨ　ＮＩ　ＮＨ　ＮＧ　ＨＤ、
ＴＣＣＴＣＣＴＴＣＡＧＡＧＣＣＡＧＧＡ（配列番号３３）及びＨＤ　ＨＤ　ＮＧ　ＨＤ

ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＨＤ ＮＩ ＮＨ ＮＩ ＮＨ ＨＤ ＨＤ ＮＩ ＮＨ ＮＨ ＮＩ、
ＴＣＣＡＧＣＣＣＣＴＣＣＴＣＣＴＴＣＡ（配列番号３４）及びＨＤ ＨＤ ＮＩ ＮＨ
ＨＤ ＨＤ ＨＤ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＨＤ ＮＩ、
ＴＣＣＧＡＧＣＴＴＧＡＣＣＣＴＴＧＧＡ（配列番号３５）及びＨＤ ＨＤ ＮＨ ＮＩ
ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＮＨ ＮＩ ＨＤ ＨＤ ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＮＨ ＮＨ ＮＩ、
ＴＧＧＴＴＴＣＣＧＡＧＣＴＴＧＡＣＣＣ（配列番号３６）及びＮＨ ＮＨ ＮＧ ＮＧ
ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＮＨ ＮＩ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＮＨ ＮＩ ＨＤ ＨＤ ＨＤ、
ＴＧＧＧＧＴＧＧＴＴＴＣＣＧＡＧＣＴＴ（配列番号３７）及びＮＨ ＮＨ ＮＨ ＮＨ
ＮＧ ＮＨ ＮＨ ＮＧ ＮＧ ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＮＨ ＮＩ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＧ、
ＴＣＴＧＣＴＧＧＧＧＴＧＧＴＴＴＣＣＧ（配列番号３８）及びＨＤ ＮＧ ＮＨ ＨＤ
ＮＧ ＮＨ ＮＨ ＮＨ ＮＨ ＮＧ ＮＨ ＮＨ ＮＧ ＮＧ ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＮＨ、
ＴＧＣＡＧＡＧＴＡＴＣＴＧＣＴＧＧＧＧ（配列番号３９）及びＮＨ ＨＤ ＮＩ ＮＨ
ＮＩ ＮＨ ＮＧ ＮＩ ＮＧ ＨＤ ＮＧ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＨ ＮＨ ＮＨ ＮＨ、
ＣＣＡＡＴＣＣＣＣＴＣＡＧＴ（配列番号４０）及びＨＤ ＨＤ ＮＩ ＮＩ ＮＧ Ｈ
Ｄ ＨＤ ＨＤ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＩ ＮＨ ＮＧ、
ＣＡＧＴＧＣＴＣＡＧＴＧＧＡＡ（配列番号４１）及びＨＤ ＮＩ ＮＨ ＮＧ ＮＨ
ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＩ ＮＨ ＮＧ ＮＨ ＮＨ ＮＩ ＮＩ、
ＧＡＡＡＣＡＴＣＣＧＧＣＧＡＣＴＣＡ（配列番号４２）及びＮＨ ＮＩ ＮＩ ＮＩ
ＨＤ ＮＩ ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＮＨ ＮＨ ＨＤ ＮＨ ＮＩ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＩ、
ＴＣＧＣＣＣＣＴＣＡＡＡＴＣＴＴＡＣＡ（配列番号４３）及びＨＤ ＮＨ ＨＤ ＨＤ
ＨＤ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＩ ＮＩ ＮＩ ＮＧ ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＮＩ ＨＤ ＮＩ、
ＴＣＡＡＡＴＣＴＴＡＣＡＧＣＴＧＣＴＣ（配列番号４４）及びＨＤ ＮＩ ＮＩ ＮＩ
ＮＧ ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＮＩ ＨＤ ＮＩ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＨＤ、
ＴＣＴＴＡＣＡＧＣＴＧＣＴＣＡＣＴＣＣ（配列番号４５）及びＨＤ ＮＧ ＮＧ ＮＩ
ＨＤ ＮＩ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＩ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＨＤ、
ＴＡＣＡＧＣＴＧＣＴＣＡＣＴＣＣＣＣＴ（配列番号４６）及びＮＩ ＨＤ ＮＩ ＮＨ
ＨＤ ＮＧ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＩ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＨＤ ＨＤ ＮＧ、
ＴＧＣＴＣＡＣＴＣＣＣＣＴＧＣＡＧＧＧ（配列番号４７）及びＮＨ ＨＤ ＮＧ ＨＤ
ＮＩ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＨＤ ＨＤ ＮＧ ＮＨ ＨＤ ＮＩ ＮＨ ＮＨ ＮＨ、
ＴＣＣＣＣＴＧＣＡＧＧＧＣＡＡＣＧＣＣ（配列番号４８）及びＨＤ ＨＤ ＨＤ ＨＤ
ＮＧ ＮＨ ＨＤ ＮＩ ＮＨ ＮＨ ＮＨ ＨＤ ＮＩ ＮＩ ＨＤ ＮＨ ＨＤ ＨＤ、
ＴＧＣＡＧＧＧＣＡＡＣＧＣＣＣＡＧＧＧ（配列番号４９）及びＮＨ ＨＤ ＮＩ ＮＨ
ＮＨ ＮＨ ＨＤ ＮＩ ＮＩ ＨＤ ＮＨ ＨＤ ＨＤ ＨＤ ＮＩ ＮＨ ＮＨ ＮＨ、
ＴＣＴＣＧＡＴＴＡＴＧＧＧＣＧＧＧＡＴ（配列番号５０）及びＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＨ
ＮＩ ＮＧ ＮＧ ＮＩ ＮＧ ＮＨ ＮＨ ＮＨ ＨＤ ＮＨ ＮＨ ＮＨ ＮＩ ＮＧ、
ＴＣＧＣＴＴＣＴＣＧＡＴＴＡＴＧＧＧＣ（配列番号５１）及びＨＤ ＮＨ ＨＤ ＮＧ
ＮＧ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＨ ＮＩ ＮＧ ＮＧ ＮＩ ＮＧ ＮＨ ＮＨ ＮＨ ＨＤ、
ＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧＣＴＴＣＴＣＧＡＴ（配列番号５２）及びＮＨ ＮＧ ＨＤ ＮＨ
ＮＩ ＮＨ ＮＧ ＨＤ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＨ ＮＩ ＮＧ、
ＴＣＣＡＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧＣＴＴＣＴ（配列番号５３）及びＨＤ ＨＤ ＮＩ ＮＧ
ＮＨ ＮＧ ＨＤ ＮＨ ＮＩ ＮＨ ＮＧ ＨＤ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＨＤ ＮＧ、
ＴＣＧＣＣＴＣＣＡＴＧＴＣＧＡＧＴＣＧ（配列番号５４）及びＨＤ ＮＨ ＨＤ ＨＤ
ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＮＩ ＮＧ ＮＨ ＮＧ ＨＤ ＮＨ ＮＩ ＮＨ ＮＧ ＨＤ ＮＨ、
ＴＣＧＴＣＡＴＣＧＣＣＴＣＣＡＴＧＴＣ（配列番号５５）及びＨＤ ＮＨ ＮＧ ＨＤ
ＮＩ ＮＧ ＨＤ ＮＨ ＨＤ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＮＩ ＮＧ ＮＨ ＮＧ ＨＤ、
ＴＧＡＴＣＴＣＧＴＣＡＴＣＧＣＣＴＣＣ（配列番号５６）及びＮＨ ＮＩ ＮＧ ＨＤ
ＮＧ ＨＤ ＮＨ ＮＧ ＨＤ ＮＩ ＮＧ ＨＤ ＮＨ ＨＤ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＨＤ、
ＧＣＴＴＣＡＧＣＴＴＣＣＴＡ（配列番号５７）及びＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＨＤ Ｎ
Ｉ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＧ ＨＤ ＨＤ ＮＧ ＮＩ、
ＣＴＧＴＧＡＴＣＡＴＧＣＣＡ（配列番号５８）及びＨＤ ＮＧ ＮＫ ＮＧ ＮＨ Ｎ

ＩＮＧＨＤＮＩＮＧＮＨＨＤＨＤＮＩ、
ＡＣＡＧＴＧＧＴＡＣＡＣＡＣＣＴ（配列番号５９）及びＮＩＨＤＮＩＮＮＮＧ
ＮＮＮＮＮＧＮＩＨＤＮＩＨＤＮＩＨＤＨＤＮＧ、
ＣＣＡＣＣＣＣＣＣＣＡＣＴＡＡＧ（配列番号６０）及びＨＤＨＤＮＩＨＤＨＤ
ＨＤＨＤＨＤＨＤＮＩＨＤＮＧＮＩＮＩＮＮ、
ＣＡＴＴＧＧＣＣＧＧＧＣＡＣ（配列番号６１）及びＨＤＮＩＮＧＮＧＮＮＮ
ＮＨＤＨＤＮＮＮＮＮＮＨＤＮＩＨＤ、
ＧＣＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＧＡＧＡ（配列番号６２）及びＮＮＨＤＮＧＮＧＮＮ
ＮＩＮＩＨＤＨＤＨＤＮＩＮＮＮＮＮＩＮＮＮＩ、
ＡＣＡＣＣＣＧＡＴＣＣＡＣＴＧＧＧ（配列番号６３）及びＮＩＨＤＮＩＨＤＨ
ＤＨＤＮＮＮＩＮＧＨＤＨＤＮＩＨＤＮＧＮＮＮＮＮＮ、
ＧＣＴＧＣＡＴＣＡＡＣＣＣＣ（配列番号６４）及びＮＮＨＤＮＧＮＮＨＤＮ
ＩＮＧＨＤＮＩＮＩＨＤＨＤＨＤＨＤ、
ＧＣＣＡＣＡＡＡＣＡＧＡＡＡＴＡ（配列番号６５）及びＮＮＮＮＨＤＮＩＨＤ
ＮＮＮＩＮＩＮＩＨＤＮＩＨＤＨＤＨＤＮＧＨＤＨＤ、
ＧＧＴＧＧＣＴＣＡＴＧＣＣＴＧ（配列番号６６）及びＮＮＮＮＮＧＮＮＮＮ
ＨＤＮＧＨＤＮＩＮＧＮＮＨＤＨＤＮＧＮＮ、
ＧＡＴＴＴＧＣＡＣＡＧＣＴＣＡＴ（配列番号６７）及びＮＮＮＩＮＧＮＧＮＧ
ＮＮＨＤＮＩＨＤＮＩＮＮＨＤＮＧＨＤＮＩＮＧ、
ＡＡＧＣＴＣＴＧＡＧＧＡＧＣＡ（配列番号６８）及びＮＩＮＩＮＨＨＤＮＧ
ＨＤＮＧＮＨＮＩＮＨＮＨＮＩＮＨＨＤ、
ＣＣＣＴＡＧＣＴＧＴＣＣＣ（配列番号６９）及びＨＤＨＤＨＤＮＧＮＩＮＫ
ＨＤＮＧＮＨＮＧＨＤＨＤＨＤＨＤ、
ＧＣＣＴＡＧＣＡＴＧＣＴＡＧ（配列番号７０）及びＮＨＨＤＨＤＮＧＮＩＮ
ＨＨＤＮＩＮＧＮＨＨＤＮＧＮＩＮＨ、
ＡＴＧＧＧＣＴＴＣＡＣＧＧＡＴ（配列番号７１）及びＮＩＮＧＮＨＮＨＮＨ
ＨＤＮＧＮＧＨＤＮＩＨＤＮＨＮＨＮＩＮＧ、
ＧＡＡＡＣＴＡＴＧＣＣＴＧＣ（配列番号７２）及びＮＨＮＩＮＩＮＩＨＤＮ
ＧＮＩＮＧＮＨＨＤＨＤＮＧＮＨＨＤ、
ＧＣＡＣＣＡＴＴＧＣＴＣＣＣ（配列番号７３）及びＮＨＨＤＮＩＨＤＨＤＮ
ＩＮＧＮＧＮＨＨＤＮＧＨＤＨＤＨＤ、
ＧＡＣＡＴＧＣＡＡＣＴＣＡＧ（配列番号７４）及びＮＨＮＩＨＤＮＩＮＧＮ
ＨＨＤＮＩＮＩＨＤＮＧＨＤＮＩＮＨ、
ＡＣＡＣＣＡＣＴＡＧＧＧＧＴ（配列番号７５）及びＮＩＨＤＮＩＨＤＨＤＮ
ＩＨＤＮＧＮＩＮＨＮＨＮＨＮＨＮＧ、
ＧＴＣＴＧＣＴＡＧＡＣＡＧＧ（配列番号７６）及びＮＨＮＧＨＤＮＧＮＨＨ
ＤＮＧＮＩＮＨＮＩＨＤＮＩＮＨＮＨ、
ＧＧＣＣＴＡＧＡＣＡＧＧＣＴＧ（配列番号７７）及びＮＨＮＨＨＤＨＤＮＧ
ＮＩＮＨＮＩＨＤＮＩＮＨＮＨＨＤＮＧＮＨ、
ＧＡＧＧＣＡＴＴＣＴＴＡＴＣＧ（配列番号７８）及びＮＨＮＩＮＨＮＨＨＤ
ＮＩＮＧＮＧＨＤＮＧＮＧＮＩＮＧＨＤＮＨ、
ＧＣＣＴＧＧＡＡＡＣＧＴＴＣＣ（配列番号７９）及びＮＮＨＤＨＤＮＧＮＮ
ＮＮＮＩＮＩＮＩＨＤＮＮＮＧＮＧＨＤＨＤ、
ＧＴＧＣＴＣＴＧＡＣＡＡＴＡ（配列番号８０）及びＮＮＮＧＮＮＨＤＮＧＨ
ＤＮＧＮＮＮＩＨＤＮＩＮＩＮＧＮＩ、
ＧＴＴＴＴＧＣＡＧＣＣＴＣＣ（配列番号８１）及びＮＮＮＧＮＧＮＧＮＧＮ
ＮＨＤＮＩＮＮＨＤＨＤＮＧＨＤＨＤ、
ＡＣＡＧＣＴＧＴＧＧＡＡＣＧＴ（配列番号８２）及びＮＩＨＤＮＩＮＮＨＤ
ＮＧＮＮＮＧＮＮＮＮＩＮＩＨＤＮＮＮＧ、
ＧＧＣＴＣＴＣＴＴＣＣＴＣＣＴ（配列番号８３）及びＨＤＮＩＮＩＮＮＮＩ

ＨＤ ＨＤ ＮＮ ＮＩ ＮＮ ＨＤ ＮＩ ＨＤ ＮＧ ＮＮ ＨＤ ＮＧ ＮＮ、
ＣＴＡＴＣＣＣＡＡＡＡＣＴＣＴ（配列番号８４）及びＨＤ ＮＧ ＮＩ ＮＧ ＨＤ
ＨＤ ＨＤ ＮＩ ＮＩ ＮＩ ＮＩ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＧ、
ＧＡＡＡＡＡＣＴＡＴＧＴＡＴ（配列番号８５）及びＮＨ ＮＩ ＮＩ ＮＩ ＮＩ Ｎ
Ｉ ＨＤ ＮＧ ＮＩ ＮＧ ＮＨ ＮＧ ＮＩ ＮＧ、
ＡＧＧＣＡＧＧＣＴＧＧＴＴＧＡ（配列番号８６）及びＮＩ ＮＨ ＮＨ ＨＤ ＮＩ
ＮＨ ＮＨ ＨＤ ＮＧ ＮＨ ＮＨ ＮＧ ＮＧ ＮＨ ＮＩ、
ＣＡＡＴＡＣＡＡＣＣＡＣＧＣ（配列番号８７）及びＨＤ ＮＩ ＮＩ ＮＧ ＮＩ Ｈ
Ｄ ＮＩ ＮＩ ＨＤ ＨＤ ＮＩ ＨＤ ＮＮ ＨＤ、
ＡＴＧＡＣＧＧＡＣＴＣＡＡＣＴ（配列番号８８）及びＮＩ ＮＧ ＮＮ ＮＩ ＨＤ
ＮＮ ＮＮ ＮＩ ＨＤ ＮＧ ＨＤ ＮＩ ＮＩ ＨＤ ＮＧ、ならびに
ＣＡＣＡＡＣＡＴＴＴＧＴＡＡ（配列番号８９）及びＨＤ ＮＩ ＨＤ ＮＩ ＮＩ Ｈ
Ｄ ＮＩ ＮＧ ＮＧ ＮＧ ＮＮ ＮＧ ＮＩ ＮＩから選択される。

【０２１５】

実施形態では、ＧＳＨＳは、ＴＡジヌクレオチド部位またはＴＴＡＡ（配列番号４４０）テトラヌクレオチド部位の約２５、または約５０、または約１００、または約１５０、または約２００、または約３００、または約５００ヌクレオチド内にある。

【０２１６】

様々な実施形態に包含される、ＴＡＬＥを介するオープンクロマチンの領域におけるヒトゲノムセーフハーバーのための例解的なＤＮＡ結合コードが、表４Ａ～４Ｆに提供される。実施形態では、表４Ａ～４Ｆに提供される様々な実施形態に包含される、例えば、表４Ａ～４Ｆにおける配列のうちのいずれかに対して少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列を有する、ＴＡＬＥのバリアントが提供される。

【０２１７】

様々な実施形態に包含される、ＴＡＬＥを介するオープンクロマチンの領域におけるヒトゲノムセーフハーバーのための例解的なＤＮＡ結合コードが、表４Ａに提供される。

【表１１－１】

GSHS	ID	配列	TALE(DNA結合コード)
AAVS1	1	TGGCCGGCCTGACCACTGG(配列番号23)	NH NH HD HD NH NH HD HD NG NH NI HD HD NI HD NG NH NH
AAVS1	2	TGAAGGCCTGGCCGGCCTG(配列番号24)	NH NI NI NH NH HD HD NG NH NH HD HD NH NH HD HD NG NH
AAVS1	3	TGAGCACTGAAGGCCTGGC(配列番号25)	NH NI NH HD NI HD NG NH NI NI NH NH HD HD NG NH NH HD
AAVS1	4	TCCACTGAGCACTGAAGGC(配列番号26)	HD HD NI HD NG NH NI NH HD NI HD NG NH NI NI NH NH HD
AAVS1	5	TGGTTTCCACTGAGCACTG(配列番号27)	NH NH NG NG NG HD HD NI HD NG NH NI NH HD NI HD NG NH
AAVS1	6	TGGGGAAAATGACCCAACA(配列番号28)	NH NH NH NH NI NI NI NI NG NH NI HD HD HD NI NI HD NI
AAVS1	7	TAGGACAGTGGGGAAAATG(配列番号29)	NI NH NH NI HD NI NH NG NH NH NH NH NI NI NI NI NG NH
AAVS1	8	TCCAGGGACACGGTGCTAG(配列番号30)	HD HD NI NH NH NH NI HD NI HD NH NH NG NH HD NG NI NH
AAVS1	9	TCAGAGCCAGGAGTCCTGG(配列番号31)	HD NI NH NI NH HD HD NI NH NH NI NH NG HD HD NG NH NH
AAVS1	10	TCCTTCAGAGCCAGGAGTC(配列番号32)	HD HD NG NG HD NI NH NI NH HD HD NI NH NH NI NH NG HD
AAVS1	11	TCCTCCTTCAGAGCCAGGA(配列番号33)	HD HD NG HD HD NG NG HD NI NH NI NH HD HD NI NH NH NI

【表１１－２】

AAVS1	12	TCCAGCCCCTCCTCCTTCA(配列番号34)	HD HD NI NH HD HD HD HD NG HD HD NG HD HD NG NG HD NI
AAVS1	13	TCCGAGCTTGACCCTTGGA(配列番号35)	HD HD NH NI NH HD NG NG NH NI HD HD HD NG NG NH NH NI
AAVS1	14	TGGTTTCCGAGCTTGACCC(配列番号36)	NH NH NG NG NG HD HD NH NI NH HD NG NG NH NI HD HD HD
AAVS1	15	TGGGGTGGTTTCCGAGCTT(配列番号37)	NH NH NH NH NG NH NH NG NG NG HD HD NH NI NH HD NG NG
AAVS1	16	TCTGCTGGGGTGGTTTCCG(配列番号38)	HD NG NH HD NG NH NH NH NH NG NH NH NG NG NG HD HD NH
AAVS1	17	TGCAGAGTATCTGCTGGGG(配列番号39)	NH HD NI NH NI NH NG NI NG HD NG NH HD NG NH NH NH NH
AAVS1	AVS1	CCAATCCCCTCAGT(配列番号40)	HD HD NI NI NG HD HD HD HD NG HD NI NH NG
AAVS1	AVS2	CAGTGCTCAGTGGAA(配列番号41)	HD NI NH NG NH HD NG HD NI NH NG NH NH NI NI
AAVS1	AVS3	GAAACATCCGGCGACTCA(配列番号42)	NH NI NI NI HD NI NG HD HD NH NH HD NH NI HD NG HD NI
hROSA26	1F	TCGCCCCTCAAATCTTACA(配列番号43)	HD NH HD HD HD HD NG HD NI NI NI NG HD NG NG NI HD NI

【表１１－３】

hROSA26	2F	TCAAATCTTACAGCTGCTC(配列番号44)	HD NI NI NI NG HD NG NG NI HD NI NH HD NG NH HD NG HD
hROSA26	3F	TCTTACAGCTGCTCACTCC(配列番号45)	HD NG NG NI HD NI NH HD NG NH HD NG HD NI HD NG HD HD
hROSA26	4F	TACAGCTGCTCACTCCCCT(配列番号46)	NI HD NI NH HD NG NH HD NG HD NI HD NG HD HD HD HD NG

【表１１－４】

hROSA26	5F	TGCTCACTCCCCTGCAGGG(配列番号47)	NH HD NG HD NI HD NG HD HD HD HD NG NH HD NI NH NH NH
hROSA26	6F	TCCCCTGCAGGGCAACGCC(配列番号48)	HD HD HD HD NG NH HD NI NH NH NH HD NI NI HD NH HD HD
hROSA26	7F	TGCAGGGCAACGCCCAGGG(配列番号49)	NH HD NI NH NH NH HD NI NI HD NH HD HD HD NI NH NH NH
hROSA26	8R	TCTCGATTATGGGCGGGAT(配列番号50)	HD NG HD NH NI NG NG NI NG NH NH NH HD NH NH NH NI NG
hROSA26	9R	TCGCTTCTCGATTATGGGC(配列番号51)	HD NH HD NG NG HD NG HD NH NI NG NG NI NG NH NH NH HD
hROSA26	10R	TGTCGAGTCGCTTCTCGAT(配列番号52)	NH NG HD NH NI NH NG HD NH HD NG NG HD NG HD NH NI NG
hROSA26	11R	TCCATGTCGAGTCGCTTCT(配列番号53)	HD HD NI NG NH NG HD NH NI NH NG HD NH HD NG NG HD NG
hROSA26	12R	TCGCCTCCATGTCGAGTCG(配列番号54)	HD NH HD HD NG HD HD NI NG NH NG HD NH NI NH NG HD NH
hROSA26	13R	TCGTCATCGCCTCCATGTC(配列番号55)	HD NH NG HD NI NG HD NH HD HD NG HD HD NI NG NH NG HD
hROSA26	14R	TGATCTCGTCATCGCCTCC(配列番号56)	NH NI NG HD NG HD NH NG HD NI NG HD NH HD HD NG HD HD
hROSA26	ROSA1	GCTTCAGCTTCCTA(配列番号57)	NH HD NG NG HD NI NH HD NG NG HD HD NG NI
hROSA26	ROSA2	CTGTGATCATGCCA(配列番号58)	HD NG NK NG NH NI NG HD NI NG NH HD HD NI
hROSA26	TALER2	ACAGTGGTACACACCT(配列番号59)	NI HD NI NN NG NN NN NG NI HD NI HD NI HD HD NG

【表１１－５】

hROSA26	TALER3	CCACCCCCCACTAAG(配列番号60)	HD HD NI HD HD HD HD HD HD NI HD NG NI NI NN
hROSA26	TALER4	CATTGGCCGGGCAC(配列番号61)	HD NI NG NG NN NN HD HD NN NN NN HD NI HD
hROSA26	TALER5	GCTTGAACCCAGGAGA(配列番号62)	NN HD NG NG NN NI NI HD HD HD NI NN NN NI NN NI
CCR5	TALC3	ACACCCGATCCACTGGG(配列番号63)	NI HD NI HD HD HD NN NI NG HD HD NI HD NG NN NN NN
CCR5	TALC4	GCTGCATCAACCCC(配列番号64)	NN HD NG NN HD NI NG HD NI NI HD HD HD HD
CCR5	TALC5	GCCACAAACAGAAATA(配列番号65)	NN NN HD NI HD NN NI NI NI HD NI HD HD HD NG HD HD
CCR5	TALC7	GGTGGCTCATGCCTG(配列番号66)	NN NN NG NN NN HD NG HD NI NG NN HD HD NG NN
CCR5	TALC8	GATTTGCACAGCTCAT(配列番号67)	NN NI NG NG NG NN HD NI HD NI NN HD NG HD NI NG
Chr2	SHCHR2-1	AAGCTCTGAGGAGCA(配列番号68)	NI NI NH HD NG HD NG NH NI NH NH NI NH HD
Chr2	SHCHR2-2	CCCTAGCTGTCCC(配列番号69)	HD HD HD NG NI NK HD NG NH NG HD HD HD HD
Chr2	SHCHR2-3	GCCTAGCATGCTAG(配列番号70)	NH HD HD NG NI NH HD NI NG NH HD NG NI NH
Chr2	SHCHR2-4	ATGGGCTTCACGGAT(配列番号71)	NI NG NH NH NH HD NG NG HD NI HD NH NH NI NG
Chr4	SHCHR4-1	GAAACTATGCCTGC(配列番号72)	NH NI NI NI HD NG NI NG NH HD HD NG NH HD
Chr4	SHCHR4-2	GCACCATTGCTCCC(配列番号73)	NH HD NI HD HD NI NG NG NH HD NG HD HD HD
Chr4	SHCHR4-3	GACATGCAACTCAG(配列番号74)	NH NI HD NI NG NH HD NI NI HD NG HD NI NH
Chr6	SHCHR6-1	ACACCACTAGGGGT(配列番号75)	NI HD NI HD HD NI HD NG NI NH NH NH NH NG
Chr6	SHCHR6-2	GTCTGCTAGACAGG(配列番号76)	NH NG HD NG NH HD NG NI NH NI HD NI NH NH

【表１１－６】

Chr6	SHCHR6-3	GGCCTAGACAGGCTG(配列番号77)	NH NH HD HD NG NI NH NI HD NI NH NH HD NG NH
Chr6	SHCHR6-4	GAGGCATTCTTATCG(配列番号78)	NH NI NH NH HD NI NG NG HD NG NG NI NG HD NH
Chr10	SHCHR10-1	GCCTGGAAACGTTCC(配列番号79)	NN HD HD NG NN NN NI NI NI HD NN NG NG HD HD
Chr10	SHCHR10-2	GTGCTCTGACAATA(配列番号80)	NN NG NN HD NG HD NG NN NI HD NI NI NG NI
Chr10	SHCHR10-3	GTTTTGCAGCCTCC(配列番号81)	NN NG NG NG NG NN HD NI NN HD HD NG HD HD
Chr10	SHCHR10-4	ACAGCTGTGGAACGT(配列番号82)	NI HD NI NN HD NG NN NG NN NN NI NI HD NN NG
Chr10	SHCHR10-5	GGCTCTCTTCCTCCT(配列番号83)	HD NI NI NN NI HD HD NN NI NN HD NI HD NG NN HD NG NN
Chr11	SHCHR11-1	CTATCCCAAAACTCT(配列番号84)	HD NG NI NG HD HD HD NI NI NI NI HD NG HD NG
Chr11	SHCHR11-2	GAAAAACTATGTAT(配列番号85)	NH NI NI NI NI NI HD NG NI NG NH NG NI NG
Chr11	SHCHR11-3	AGGCAGGCTGGTTGA(配列番号86)	NI NH NH HD NI NH NH HD NG NH NH NG NG NH NI
Chr17	SHCHR17-1	CAATACAACCACGC(配列番号87)	HD NI NI NG NI HD NI NI HD HD NI HD NN HD
Chr17	SHCHR17-2	ATGACGGACTCAACT(配列番号88)	NI NG NN NI HD NN NN NI HD NG HD NI NI HD NG
Chr17	SHCHR17-3	CACAACATTTGTAA(配列番号89)	HD NI HD NI NI HD NI NG NG NG NN NG NI NI
Chr17	SHCHR17-4	ATTTCCAGTGCACA(配列番号90)	NI NG NG NG HD HD NI NN NG NN HD NI HD NI

【０２１８】

実施形態では、ｈＲＯＳＡ２６におけるＴＴＡＡ部位（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ３：９，３９６，１３３－９，３９６，３０５）に対して、ＴＡＬＥベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのＴＡＬＥは、表４Ｂに示される：

【表１２】

名称	DNA配列(配列番号)	RVDアミノ酸コード
R1	TCGCCCCTCAAATCTTACAG(584)	HD NH HD HD HD HD NG HD NI NI NI NG HD NG NG NI HD NI NH
R2	TCAAATCTTACAGCTGCTCA(585)	HD NI NI NI NG HD NG NG NI HD NI NH HD NG NH HD NG HD NI
R3	TCTTACAGCTGCTCACTCCC(586)	HD NG NG NI HD NI NH HD NG NH HD NG HD NI HD NG HD HD HD
R4	TACAGCTGCTCACTCCCCTG(587)	NI HD NI NH HD NG NH HD NG HD NI HD NG HD HD HD HD NG NH
R5	TGCTCACTCCCCTGCAGGGC(588)	NH HD NG HD NI HD NG HD HD HD HD NG NH HD NI NH NH NH HD
R6	TCCCCTGCAGGGCAACGCCC(456)	HD HD HD HD NG NH HD NI NH NH NH HD NI NI HD NH HD HD HD
R7	TGCAGGGCAACGCCCAGGGA(589)	NH HD NI NH NH NH HD NI NI HD NH HD HD HD NI NH NH NH NI
R8	TCTCGATTATGGGCGGGATT(590)	HD NG HD NH NI NG NG NI NG NH NH NH HD NH NH NH NI NG NG
R9	TCGCTTCTCGATTATGGGCG(591)	HD NH HD NG NG HD NG HD NH NI NG NG NI NG NH NH NH HD NH
R10	TGTCGAGTCGCTTCTCGATT(592)	NH NG HD NH NI NH NG HD NH HD NG NG HD NG HD NH NI NG NG
R11	TCCATGTCGAGTCGCTTCTC(593)	HD HD NI NG NH NG HD NH NI NH NG HD NH HD NG NG HD NG HD
R12	TCGCCTCCATGTCGAGTCGC(594)	HD NH HD HD NG HD HD NI NG NH NG HD NH NI NH NG HD NH HD
R13	TCGTCATCGCCTCCATGTCG(595)	HD NH NG HD NI NG HD NH HD HD NG HD HD NI NG NH NG HD NH
R14	TGATCTCGTCATCGCCTCCA(596)	NH NI NG HD NG HD NH NG HD NI NG HD NH HD HD NG HD HD NI

【０２１９】

実施形態では、ＡＡＶＳ１（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ１９：５５，１１２，８５１－５５，１１３，３２４）に対して、ＴＡＬＥベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのＴＡＬＥは、表４Ｃに示される：

【表１３－１】

名称	DNA配列(配列番号)	RVDアミノ酸コード
AAV1c	TGGCCGGCCTGACCACTGGG(597)	NH NH HD HD NH NH HD HD NG NH NI HD HD NI HD NG NH NH NH
AAV2c	TGAAGGCCTGGCCGGCCTGA(598)	NH NI NI NH NH HD HD NG NH NH HD HD NH NH HD HD NG NH NI
AAV3c	TGAGCACTGAAGGCCTGGCC(599)	NH NI NH HD NI HD NG NH NI NI NH NH HD HD NG NH NH HD HD
AAV4c	TCCACTGAGCACTGAAGGCC(600)	HD HD NI HD NG NH NI NH HD NI HD NG NH NI NI NH NH HD HD
AAV5c	TGGTTTCCACTGAGCACTGA(601)	NH NH NG NG NG HD HD NI HD NG NH NI NH HD NI HD NG NH NI
AAV6	TGGGGAAAATGACCCAACAG(602)	NH NH NH NH NI NI NI NI NG NH NI HD HD HD NI NI HD NI NH
AAV7	TAGGACAGTGGGGAAAATGA(603)	NI NH NH NI HD NI NH NG NH NH NH NH NI NI NI NI NG NH NI
AAV8	TCCAGGGACACGGTGCTAGG(604)	HD HD NI NH NH NH NI HD NI HD NH NH NG NH HD NG NI NH NH
AAV9	TCAGAGCCAGGAGTCCTGGC(605)	HD NI NH NI NH HD HD NI NH NH NI NH NG HD HD NG NH NH HD
AAV10	TCCTTCAGAGCCAGGAGTCC(606)	HD HD NG NG HD NI NH NI NH HD HD NI NH NH NI NH NG HD HD
AAV11	TCCTCCTTCAGAGCCAGGAG(607)	HD HD NG HD HD NG NG HD NI NH NI NH HD HD NI NH NH NI NH
AAV12	TCCAGCCCCTCCTCCTTCAG(608)	HD HD NI NH HD HD HD HD NG HD HD NG HD HD NG NG HD NI NH
AAV13c	TCCGAGCTTGACCCTTGGAA(462)	HD HD NH NI NH HD NG NG NH NI HD HD HD NG NG NH NH NI NI
AAV14c	TGGTTTCCGAGCTTGACCCT(112)	NH NH NG NG NG HD HD NH NI NH HD NG NG NH NI HD HD HD NG
AAV15c	TGGGGTGGTTTCCGAGCTTG(609)	NH NH NH NH NG NH NH NG NG NG HD HD NH NI NH HD NG NG NH
AAV16c	TCTGCTGGGGTGGTTTCCGA(610)	HD NG NH HD NG NH NH NH NH NG NH NH NG NG NG HD HD NH NI
AAV17c	TGCAGAGTATCTGCTGGGGT(611)	NH HD NI NH NI NH NG NI NG HD NG NH HD NG NH NH NH NH NG

【０２２０】

実施形態では、染色体４（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ４：３０，７９３，５３４－３０，８７５，４７６、またはｈｇ３８　ｃｈｒ４：３０，７９３，５３３－３０，７９３，５３７（９６７７）、ｃｈｒ４：３０，８７５，４７２－３０，８７５，４７６（８９４８））に対して、ＴＡＬＥベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのＴＡＬＥは、表４Ｄに示される：

【表１４－１】

名称	DNA配列(配列番号)	RVDアミノ酸コード
TALE4-R001	TCTTCCTAGTATTAAAGT(612)	HD NG NG HD HD NG NI NH NG NI NG NG NI NI NI NH NG
TALE4-R002	TCCTTAATATTACCAGT(613)	HD HD NG NG NI NI NG NI NG NG NI HD HD NI NH NG
TALE4-F003	TACCAAGCTGAAATGACACAAAAGT(614)	NI HD HD NI NI NH HD NG NH NI NI NI NG NH NI HD NI HD NI NI NI NI NH NG
TALE4-F004	TGGCTGTGTCACATACCAGCAGAAT(615)	NH NH HD NG NH NG NH NG HD NI HD NI NG NI HD HD NI NH HD NI NH NI NI NG
TALE4-F005	TGTTAATTTGAATACAATCACT(616)	NH NG NG NI NI NG NG NG NH NI NI NG NI HD NI NI NG HD NI HD NG
TALE4-F006	TGTGTCACATACCAGCAGAAT(617)	NH NG NH NG HD NI HD NI NG NI HD HD NI NH HD NI NH NI NI NG
TALE4-R007	TGGTAACTACTAATTT(618)	NH NH NG NI NI HD NG NI HD NG NI NI NG NG NG
TALE4-F008	TGTCACATACCAGCAGAAT(619)	NH NG HD NI HD NI NG NI HD HD NI NH HD NI NH NI NI NG
TALE4-R009	TGTGACACAGCCATCAACAAT(620)	NH NG NH NI HD NI HD NI NH HD HD NI NG HD NI NI HD NI NI NG
TALE4-F010	TCCTTTGATGAACAGT(621)	HD HD NG NG NG NH NI NG NH NI NI HD NI NH NG
TALE4-F011	TGTGTGCAATAGCGTTAAAGGAACTACAT(622)	NH NG NH NG NH HD NI NI NG NI NH HD NH NG NG NI NI NI NH NH NI NI HD NG NI HD NI NG
TALE4-F012	TCTTTCAATAGCCCACT(623)	HD NG NG NG HD NI NI NG NI NH HD HD HD NI HD NG

【表１４－２】

TALE4-R013	TCTCAAATGACAAGAGCACAGT(624)	HD NG HD NI NI NI NG NH NI HD NI NI NH NI NH HD NI HD NI NH NG
TALE4-F014	TACCAGTTAATTAGCACT(625)	NI HD HD NI NH NG NG NI NI NG NG NI NH HD NI HD NG
TALE4-F015	TGTTGTGACCTAAGCCAT(626)	NH NG NG NH NG NH NI HD HD NG NI NI NH HD HD NI NG
TALE4-R016	TCTCATGTTTTAAAGTCAAGAAT(627)	HD NG HD NI NG NH NG NG NG NG NI NI NI NH NG HD NI NI NH NI NI NG
TALE4-F017	TCCTGAATTCAGAACAGAT(628)	HD HD NG NH NI NI NG NG HD NI NH NI NI HD NI NH NI NG
TALE4-F018	TAGCATGATGTTTCATGTTGTGACCT(629)	NI NH HD NI NG NH NI NG NH NG NG NG HD NI NG NH NG NG NH NG NH NI HD HD NG
TALE4-F019	TGTTTCATGTTGTGACCTAAGCCAT(630)	NH NG NG NG HD NI NG NH NG NG NH NG NH NI HD HD NG NI NI NH HD HD NI NG
TALE4-F020	TACAACAGTCTATTTCAT(631)	NI HD NI NI HD NI NH NG HD NG NI NG NG NG HD NI NG

【０２２１】

実施形態では、染色体２２（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ２２：３５，３７０，０００－３５，３８０，０００、またはｈｇ３８　ｃｈｒ２２：３５，３７３，９１２－３５，３７３，９１６（８６１）、ｃｈｒ２２：３５，３７７，８４３－３５，３７７，８４７（１１５３））に対して、ＴＡＬＥベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのＴＡＬＥは、表４Ｅに示される：

【表１５－１】

名称	DNA配列(配列番号)	RVDアミノ酸コード
TALE22F-R001	TCTTCCTAGTCTCTTCTCTACCCAGT(632)	HD NG NG HD HD NG NI NH NG HD NG HD NG NG HD NG HD NG NI HD HD HD NI NH NG
TALE22-F002	TACACTCCAGCCTGGGAAACAGAGT(633)	NI HD NI HD NG HD HD NI NH HD HD NG NH NH NH NI NI NI HD NI NH NI NH NG
TALE22-F003	TCTTTTCCTTAGGACGGCT(634)	HD NG NG NG NG HD HD NG NG NI NH NH NI HD NH NH HD NG
TALE22-F004	TCGCTCAGGCCTGTCAT(635)	HD NH HD NG HD NI NH NH HD HD NG NH NG HD NI NG
TALE22-F005	TCCATATGGAAGACTT(636)	HD HD NI NG NI NG NH NH NI NI NH NI HD NG NG
TALE22-F006	TACCCAGTTAACCACCCT(637)	NI HD HD HD NI NH NG NG NI NI HD HD NI HD HD HD NG
TALE22-F007	TGGCGCATGCCTGTAATCCCAGCTACT(638)	NH NH HD NH HD NI NG NH HD HD NG NH NG NI NI NG HD HD HD NI NH HD NG NI HD NG
TALE22-F008	TATACGAGGAGAAAATTAGCATTCCT(639)	NI NG NI HD NH NI NH NH NI NH NI NI NI NI NG NG NI NH HD NI NG NG HD HD NG
TALE22-R009	TCTGCCTCCCAGGTTCACGCAAT(640)	HD NG NH HD HD NG HD HD HD NI NH NH NG NG HD NI HD NH HD NI NI NG
TALE22-F010	TGCCTTGTCACGTTTTCACAGT(641)	NH HD HD NG NG NH NG HD NI HD NH NG NG NG NG HD NI HD NI NH NG

【表１５－２】

TALE22-F001A	TGTCACCTTCTGTATGTGCAACCAT(642)	NH NG HD NI HD HD NG NG HD NG NH NG NI NG NH NG NH HD NI NI HD HD NI NG
TALE22-F002A	TCTGTATGTGCAACCAT(643)	HD NG NH NG NI NG NH NG NH HD NI NI HD HD NI NG
TALE22-R03A	TAGTCAAGCAACAGGAT(644)	NI NH NG HD NI NI NH HD NI NI HD NI NH NH NI NG
TALE22-F004A	TCCAAGATAATTCCCCAT(645)	HD HD NI NI NH NI NG NI NI NG NG HD HD HD HD NI NG
TALE22-F005A	TCTGCAAGATCCTTTT(646)	HD NG NH HD NI NI NH NI NG HD HD NG NG NG NG
TALE22-F006A	TGCTATGTAAGGTAGCAAAAAGGTAACCT (647)	NH HD NG NI NG NH NG NI NI NH NH NG NI NH HD NI NI NI NI NI NH NH NG NI NI HD HD NG
TALE22-R007A	TCTCTCTCCTCCTGCT(648)	HD NG HD NG HD NG HD HD NG HD HD NG NH HD NG
TALE22-R008A	TCCAAATGCTATTCTCTCT(649)	HD HD NI NI NI NG NH HD NG NI NG NG HD NG HD NG HD NG
TALE22-R009A	TGCTGATTCAGCCTCCT(650)	NH HD NG NH NI NG NG HD NI NH HD HD NG HD HD NG
TALE22-F010A	TAGAACAGCCCCCCACACAGT(651)	NI NH NI NI HD NI NH HD HD HD HD HD HD NI HD NI HD NI NH NG

【０２２２】

実施形態では、染色体Ｘ（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒＸ：１３４，４１９，６６１－１３４，５４１，１７２、またはｈｇ３８　ｃｈｒＸ：１３４，４７６，３０４－１３４，４７６，３０７（８５）、ｃｈｒＸ：１３４，４７６，３３７－１３４，４７６，３４０（５１））に対して、ＴＡＬＥベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのＴＡＬＥは、表４Ｆに示される：

【表１６－１】

名称	DNA配列(配列番号)	RVDアミノ酸コード
TALE F002	TTTAGCAGATGCATCAGC(652)	NG NG NI NH HD NI NH NI NG NH HD NI NG HD NI NH HD
TALE F003	TGACCAGGGGCATGTCCTGG(653)	NH NI HD HD NI NH NH NH NH HD NI NG NH NG HD HD NG NH NH
TALE F004	TGGTCCACCTACCTGAAAATG(654)	HD NI NI NH NH NI NH NG NG HD NG NH NH HD NG NH NH NH NG HD
TALE F007	TGTCCCACAGGTATTACGGGC(655)	NH NG HD HD HD NI HD NI NH NH NG NI NG NG NI HD NH NH NH HD
TALE F008	TACGGGCCAACCTGACAATAC(656)	NI HD NH NH NH HD HD NI NI HD HD NG NH NI HD NI NI NG NI HD
TALE F009	TGAGCTTTGGGGACTGAAAGA(657)	NH NI NH HD NG NG NG NH NH NH NH NI HD NG NH NI NI NI NH NI
TALE R002	CTGGCATAATCTTTTCCCCCA(658)	NH NH NH NH NH NI NI NI NI NH NI NG NG NI NG NH HD HD NI NH
TALE R003	CCAGCCTCCTGGCCATGTGCA(659)	NH HD NI HD NI NG NH NH HD HD NI NH NH NI NH NH HD NG NH NH
TALE R004	GGCCATGTGCACAGGGGCTGA(660)	HD NI NH HD HD HD HD NG NH NG NH HD NI HD NI NG NH NH HD HD
TALE R005	CTGATATGTGAAGGTTTAGCA(661)	NH HD NG NI NI NI HD HD NG NG HD NI HD NI NG NI NG HD NI NH
TALE R007	TGACCAGGCGTGGTGGCTCAC(662)	NH NI HD HD NI NH NH HD NH NG NH NH NG NH NH HD NG HD NI HD
TALE F020*	TATAGACATTTTCACT(663)	NI NG NI NH NI HD NI NG NG NG NG HD NI HD NG

【表１６－２】

TALE F021*	TCTACATTTAACTATCAACCT(664)	HD NG NI HD NI NG NG NG NI NI HD NG NI NG HD NI NI HD HD NG
TALE F030*	TCGTGCAAACGTTTGAT(665)	HD NH NG NH HD NI NI NI HD NH NG NG NG NH NI NG
TALE F031*	TACATCAATCCTGTAGGT*(666)	NI HD NI NG HD NI NI NG HD HD NG NH NG NI NH NH NG
TALE F034*	TCTATTTTAGTGACCCAAGT(667)	HD NG NI NG NG NG NG NI NH NG NH NI HD HD HD NI NI NH NG
TALE F036*	TAGAGTCAAAGCATGTACT(668)	NI NH NI NH NG HD NI NI NI NH HD NI NG NH NG NI HD NG
TALE F037*	TCCTACCCATAAGCTCCT(669)	HD HD NG NI HD HD HD NI NG NI NI NH HD NG HD HD NG
TALE F040*	TCCCCATCCCCATCAGT(670)	HD HD HD HD NI NG HD HD HD HD NI NG HD NI NH NG
TALE R022*	TCTTTAATTCAAGCAAGACTTTAACAAGT (671)	HD NG NG NG NI NI NG NG HD NI NI NH HD NI NI NH NI HD NG NG NG NI NI HD NI NI NH NG
TALE R033*	TGCAGTCCCCTTTCTT(672)	NH HD NI NH NG HD HD HD HD NG NG NG HD NG NG
TALE R035*	TCTGCACAAATCCCCAAAGAT(673)	HD NG NH HD NI HD NI NI NI NG HD HD HD HD NI NI NI NH NI NG
TALE R038*	TACATGCTTTGACTCT(674)	NI HD NI NG NH HD NG NG NG NH NI HD NG HD NG
TALE R039*	TGGCCAGTTATACTGCCAGCAGCTATAAT (675)	NH NH HD HD NI NH NG NG NI NG NI HD NG NH HD HD NI NH HD NI NH HD NG NI NG NI NI NG

【０２２３】

実施形態では、可動要素酵素は、ＴＡジヌクレオチド部位にドナーＤＮＡを挿入することができる。実施形態では、可動要素酵素は、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）テトラヌクレオチド部位にドナーＤＮＡを挿入することができる。

【０２２４】

様々な実施形態に包含される、ＺＮＦを介するオープンクロマチンの領域におけるヒトゲノムセーフハーバーのための例解的なＤＮＡ結合コードが、表５Ａ～５Ｅに提供される。実施形態では、表５Ａ～５Ｅに提供される様々な実施形態に包含される、例えば、表５Ａ～５Ｅにおける配列のうちのいずれかに対して少なくとも約９０％、または少なくとも約９３％、または少なくとも約９５％、または少なくとも約９７％、または少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する配列を有する、ＺＮＦのバリアントが提供される。

【０２２５】

実施形態では、ｈＲＯＳＡ２６におけるＴＴＡＡ部位（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ３：９，３９６，１３３－９，３９６，３０５）に対して、ＺＮＦベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのＺＮＦは、表５Ａに示される：

【表１７－１】

hROSA26 TTAA	名称	標的(配列番号)	スコア	ZFPアミノ酸コード(配列番号)
5’	ZnF3a	TGG GAA GAT AAA CTA(676)	58.64	LEPGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGKKTS(677)
5’	ZnF5a	ACT CCC CTG CAG GGC AAC(678)	56.25	LEPGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKHLAEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGKKTS(679)
5’	ZnF5b	CCC CTG CAG GGC AAC GCC(680)	56.25	LEPGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKHLAEHQRTHTGKKTS(681)
5’	ZnF5c	CTG CAG GGC AAC GCC CAG(682)	60.58	LEPGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGKKTS(683)
5’	ZnF5d	CAG GGC AAC GCC CAG GGA(684)	58.08	LEPGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGKKTS(685)
5’	ZnF5e	GGC AAC GCC CAG GGA CCA(686)	57.32	LEPGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGKKTS(687)

【表１７－２】

5'	ZnF5f	AAC GCC CAG GGA CCA AGT(688)	54.99	LEPGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECG KSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRAD NLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGK KTS(689)
5'	ZnF5g	GCC CAG GGA CCA AGT TAG(690)	55.31	LEPGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECG KSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRA HLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQR THTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGKK TS(691)
5'	ZnF5h	CAG GGA CCA AGT TAG CCC(692)	50.76	LEPGEKPYKCPECGKSFSSKKHLAEHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECG KSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHS LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGKKTS (693)
3'	ZnF12 a	GCC TAG GCA AAA GAA(694)	59.09	LEPGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRE DNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARH QRTHTGKKTS(695)
3'	ZnF13 a	CGC GAG GAG GAA AGG AGG(696)	57.19	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECG KSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSD NLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGKK TS(697)
3'	ZnF13 b	GAG GAG GAA AGG AGG GAG(698)	57.80	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECG KSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSS NLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGK KTS(699)

【表１７－３】

3'	ZnF13 c	GAG GAA AGG AGG GAG GGC(700)	57.61	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECG KSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSD HLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGKKT S(701)

【０２２６】

実施形態では、ＡＡＶＳ１（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ１９：５５，１１２，８５１－５５，１１３，３２４）に対して、ＺＮＦベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのＺＮＦは、表５Ｂに示される：

【表１８－１】

AAVS1 TTAA	名称	標的(配列番号)	スコア	ZFPアミノ酸コード(配列番号)
5’	ZnF11a	TAG GAC AGT GGG GAA AAT GAC CCA ACA GCC(702)	57.08	LEPGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGKKTS(703)
5’	ZnF10a	AGA GGG AGC CAC GAA AAC AGA(704)	56.91	LEPGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGKKTS(705)
3’	ZnF12b	GCA GAT AGC CAG GAG(706)	59.97	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGKKTS(707)
3’	ZnF13b	AGA TAG CCA GGA GTC CTT(708)	56.80	LEPGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGKKTS(709)

【表１８－２】

5’	ZnF14a	CCC AGT GGT CAG GCC GGC CAG GCC(710)	61.78	LEPGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTH TGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHT GEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSSKKHLAEHQRTHTGKKTS (711)
5’	ZnF15a	GGC CGG CCA GGC CTT CAG(712)	58.15	LEPGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTH TGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHT GEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGKK TS(713)
5’	ZnF16a	AGT GCT CAG TGG AAA CCA CGA AAG GAC(714)	58.65	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGNLVRHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSQSGHLTEHQRTH TGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHT GEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGKKTS (715)
5’	ZnF17a	TGG CCC CCA GCC CCT CCT GCC(716)	60.89	LEPGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTH TGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHT GEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSKKHLAEHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGKKT S(717)

【表１８－３】

5’	ZnF18a	AGA GCC AGG AGT CCT GGC CCC CAG CCC(718)	57.23	LEPGEKPYKCPECGKSFSSKKHLAEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKHLAEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGKKTS(719)
3’	ZnF19a	GCA GGA GGG GCT GGG GGC CAG GAC(720)	59.93	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGKKTS(721)
3’	ZnF20b	ATA GCC CTG GGC CCA CGG CTT CGT(722)	59.53	LEPGEKPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGKKT(723)
3’	ZnF21b	GAA GGA CCT GGC TGG(724)	55.22	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGKKTS(725)

【表１８－４】

5’	ZnF22a	GCA GGA ACG AAG CCG TGG GCC CAG GGC(726)	56.47	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTH TGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHT GEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSRNDTLTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSRTDTLRDHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGKKTS (727)
5’	ZnF23a	GGA AAC CAC CCC AGC AGA(728)	52.63	LEPGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTH TGEKPYKCPECGKSFSSKKHLAEHQRTHT GEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGKK TS(729)
5’	ZnF24a	AAG GGT CAA GCT CGG AAA CCA CCC CAG CAG ATA(730)	55.09	LEPGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTH TGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHT GEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSSKKHLAEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKC PECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPE CGKSFSRKDNLKNHQRTHTGKKTS(731)

【０２２７】

実施形態では、染色体４（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ４：３０，７９３，５３４－３０，８７５，４７６、またはｈｇ３８　ｃｈｒ４：３０，７９３，５３３－３０，７９３，５３７（９６７７）、ｃｈｒ４：３０，８７５，４７２－３０，８７５，４７６（８９４８））に対して、ＺＮＦベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのＺＮＦは、表５Ｃに示される：

【表１９－１】

Chr4 TTAA	名称	標的(配列番号)	スコア	ZFPアミノ酸コード(配列番号)
5'	ZnF31F	CTTTGATGAACAGTCACA(732)	58.41	LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLAS HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTE HQRTHTGKKTS(733)
5'	ZnF32F	CTTCCAATTAGTCCTACC(734)	55.84	LEPGEKPYKCPECGKSFSDKKDLTRHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEH QRTHTGKKTS(735)
5'	ZnF33F	ATACTAGGAAGAAATACAATA(736)	57.27	LEPGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQR THTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLER HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTE HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIA HQRTHTGKKTS(737)
5'	ZnF34F	GCTCTTGTCATTTGAGAT(738)	57.38	LEPGEKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVR HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTE HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVR HQRTHTGKKTS(739)

【表１９－２】

5’	ZnF35F	CCAAGCTGAAATGACACAAAAGTTAAAACAAAG(740)	58.23	LEPGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQR THTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTSGSLVRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQR THTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSDPGNLVRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQR THTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQR THTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRT HTGKKTS(741)
5’	ZnF36F	CTTATACCAGTTAATTAGCAC(742)	49.93	LEPGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQR THTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTSGSLVRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRT HTGKKTS(743)
3’	ZnF37R	AACGCTATTGCACACATAGTTACA(744)	57.67	LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSTSGSLVRHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQR THTGKKTS(745)
3’	ZnF38R	TGAATTCAGGAACAAAGTATA(746)	53.21	LEPGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNHQR THTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQR THTGKKTS(747)

【表１９－３】

3’	ZnF39R	GCTGGTATGTGAC ACAGCCATCAACA A(748)	50.63	LEPGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQR THTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQR THTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQR THTGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQR THTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQR THTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQR THTGKKTS(749)

【０２２８】

実施形態では、染色体２２（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒ２２：３５，３７０，０００－３５，３８０，０００、またはｈｇ３８　ｃｈｒ２２：３５，３７３，９１２－３５，３７３，９１６（８６１）、ｃｈｒ２２：３５，３７７，８４３－３５，３７７，８４７（１１５３））に対して、ＺＮＦベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのＺＮＦは、表５Ｄに示される：

【表２０－１】

Chr22 TTAA	名称	標的(配列番号)	スコア	ZFP(配列番号)
5'	ZnF1a	CTTCCTGAAAGCAAGAGATGAAAT(750)	57.34	LEPGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTHTGKKTS(751)
5'	ZnF1b	CTGAAAGCAAGAGATGAAATTCCA(752)	58.92	LEPGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGKKTS(753)
5'	ZnF2a	ATACGAGGAGAAAATTAGCAT(754)	51.25	LEPGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGHLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGKKTS(755)
5'	ZnF3a	CATCCATGGCAGGAAGTTGAAGCCAAAATAAATCTG(756)	58.67	LEPGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGKKTS(757)

【表２０－２】

5’	ZnF3b	ATGGCAGGAAGTTGAAGCCAAAATAAA(758)	54.14	LEPGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGKKTS(759)
3’	ZnF5aR	GAAAAGAAGACTCAAGGAAACAGAGCCAAACAC(760)	55.40	LEPGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGKKTS(761)
3’	ZnF5bR	AGGAAACAGAGCCAAACACTTACA(762)	54.66	LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGKKTS(763)

【表２０－３】

3'	ZnF6aR	ATGCAGATTTGGACACAGAGTAGTAAACTGTGAAAACGTGACAAGGCAAAGTGGCGTGGG(764)	58.57	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGKKTS(765)
3'	ZnF6bR	GGACACAGAGGTAGTAAAC(766)	55.80	LEPGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGKKTS(767)
5'	ZnF10F	AAAGCTAGCAGCATGGCA(768)	57.55	LEPGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGKKTS(769)
5'	ZnF11F	CCTCTTATAAGGCCCAAGAGGATA(770)	52.55	LEPGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKHLAEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGKKTS(771)

【表２０－４】

5’	ZnF12F	CAACATCCTTGACTTAATCAC(772)	55.00	LEPGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGKKTS(773)
5’	ZnF13F	GGTAGCAAAAAGGTAACC(774)	46.33	LEPGEKPYKCPECGKSFSDKKDLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGKKTS(775)
3’	ZnF14R	TGGGGTGCAAGAGGCCAGGCCAGAGTTGTTCTGGTC(776)	61.28	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGKKTS(777)
3’	ZnF15R	CGCATGCTGATTCAGCCTCCTGAC(778)	58.41	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGKKTS(779)
3’	ZnF14R	AGTCAAGCAACAGGATGA(780)	50.89	LEPGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGKKTS(781)

【表２０－５】

3’	ZnF15R	GTCAAGCAA CAGGATGAT CCAAATGCT ATT(782)	59.22	LEPGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECG KSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTS GNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQR THTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGKKTS(783)

【０２２９】

実施形態では、染色体Ｘ（例えば、ｈｇ３８　ｃｈｒＸ：１３４，４１９，６６１－１３４，５４１，１７２、またはｈｇ３８　ｃｈｒＸ：１３４，４７６，３０４－１３４，４７６，３０７（８５）、ｃｈｒＸ：１３４，４７６，３３７－１３４，４７６，３４０（５１））に対して、ＺＮＦベースの標的要素のうちのいずれかを使用してヒトゲノムセーフハーバー部位を標的とするためのＺＮＦは、表５Ｅに示される：

【表２１－１】

ChrXTTAA	名称	標的(配列番号)	スコア	ZFPアミノ酸コード(配列番号)
5'	ZnF41F	GTAGAAACTCGCCTTATG(784)	54.04	LEPGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGKKTS(785)
5'	ZnF42F	TGAATGAGTCCTGTCCATCTT(786)	55.08	LEPGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGKKTS(787)
5'	ZnF43F	AAGATTAGAACAAATGTCCAG(788)	60.20	LEPGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGKKTS(789)
3'	ZnF44R	ACTCTAAGCAGCAATGTA(790)	59.94	LEPGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGKKTS(791)
5'	ZnF45R	TGGGATAGTGAAAATGTC(792)	57.10	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGKKTS(793)

【表２１－２】

5’	ZnF46R	AAAACTTGGGTCACTAAAATAGATGAT(794)	61.20	LEPGEKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGKKTS(795)
5’	ZnF47R	AAACATGGAAAAGGTCAAAAACTTGGG(796)	43.59	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGKKTS(797)
3’	ZnF48R	AATGACTAGAATGAAGTCCTACTG(798)	59.44	LEPGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGKKTS(799)

【０２３０】

実施形態では、可動要素酵素は、ＴＡジヌクレオチド部位にドナーＤＮＡを挿入することができる。実施形態では、可動要素酵素は、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）テトラヌクレオチド部位にドナーＤＮＡを挿入することができる。

【０２３１】

実施形態では、本開示は、酵素及びドナーＤＮＡをそれぞれコードする核酸を有する系に関する。図１Ａ～１Ｄは、本開示の実施形態による系の例を示す。

【０２３２】

リンカー

実施形態では、標的要素は、遺伝子編集システムの核酸結合構成要素を含む。実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素（例えば、限定されないが、キメラ可動要素酵素）及び標的要素、例えば、遺伝子編集システムの核酸結合構成要素は、互いに融合しているか、または連結されている。例えば、実施形態では、可動要素酵素及び標的要素、例えば、遺伝子編集システムの核酸結合構成要素は、互いに融合しているか、または連結されている。実施形態では、可動要素酵素及び標的要素、例えば、遺伝子編集システムの核酸結合構成要素は、リンカーを介して接続されている。

【０２３３】

実施形態では、リンカーは、可撓性リンカーである。実施形態では、可撓性リンカーは、グリシン及びセリン残基を実質的に含み、任意選択的に、可撓性リンカーは、（Ｇｌｙ

$_4$Ｓｅｒ）$_n$を含み、ｎは、約１～約１２である。実施形態では、可撓性リンカーは、約２０個、または約３０個、または約４０個、または約５０個、または約６０個のアミノ酸残基のものである。

【０２３４】

実施形態では、可塑性リンカーは、約５０個、または約１００個、または約１５０個、または約２００個のアミノ酸残基の長さである。実施形態では、可塑性リンカーは、少なくとも約１５０ヌクレオチド（ｎｔ）、または少なくとも約２００ｎｔ、または少なくとも約２５０ｎｔ、または少なくとも約３００ｎｔ、または少なくとも約３５０ｎｔ、または少なくとも約４００ｎｔ、または少なくとも約４５０ｎｔ、または少なくとも約５００ｎｔ、または少なくとも約５００ｎｔ、または少なくとも約６００ｎｔを含む。実施形態では、可塑性リンカーは、約４５０ｎｔ～約５００ｎｔを含む。

【０２３５】

実施形態では、可動要素酵素及び標的要素、例えば、遺伝子編集システムの核酸結合構成要素は、単一のポリペプチドにコードされる。

【０２３６】

インテイン

インテイン（ＩＮＴｅｒｖｅｎｉｎｇ　ｐｒｏｔＥＩＮＳ）は、タンパク質スプライシングのプロセスを実行する能力を有する、自然界に見出されるタンパク質ドメインである可動遺伝要素である。その全体が参照により本明細書に組み込まれるＳａｒｍｉｅｎｔｏ＆Ｃａｍａｒｅｒｏ（２０１９）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ＆Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，２０（５），４０８－４２４を参照されたい。タンパク質スプライシングは、インテインに隣接する前駆体ポリペプチドセグメント間のペプチド結合の切断及び形成をもたらす、翻訳後の生化学的修飾である。同文献。インテインは、タンパク質スプライシングを介して前駆体タンパク質から翻訳後に自身を切除するための標準的な酵素戦略を適用する。Ｎａｎｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ　ｖｏｌ．８，１２　２００４．１６　Ｄｅｃ．２０２０、ｄｏｉ：１０．３３９０／ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ８１２２００４。インテインは、その隣接するＮ末端及びＣ末端ドメインをスプライシングして、成熟タンパク質となり、配列から自身を切除することができる。例えば、スプリットインテインは、トランスジェニック生物への異種遺伝子の送達を制御するために使用されている。Ｗｏｏｄ＆Ｃａｍａｒｅｒｏ（２０１４）Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．２８９（２１）：１４５１２－１４５１９を参照されたい。このアプローチは、標的タンパク質を２つのセグメントにスプリットすることに依存し、次いで、これらは、タンパク質トランススプライシング（ＰＴＳ）によってインビボで翻訳後に再構築される。Ａｂｏｙｅ＆Ｃａｍａｒｅｒｏ（２０１２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８７，２７０２６－２７０３２を参照されたい。より最近では、Ｃａｓ９を細胞に組み込み、ヌクレアーゼ活性を効率的に再構築するためのインテイン媒介性スプリットＣａｓ９系が開発されている。Ｔｒｕｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２０１５，４３（１３），６４５０－６４５８。タンパク質スプライシングは、前駆体タンパク質の内部領域を切除し、次いで、Ｎ－エクステイン及びＣ－エクステイン断片のライゲーションを行い、２つのポリペプチド（切除されたインテイン、及びＣ－エクステインとＮ－エクステインとを接合することによって産生される新しいポリペプチド）をもたらす。Ｓａｒｍｉｅｎｔｏ＆Ｃａｍａｒｅｒｏ（２０１９）。

【０２３７】

実施形態では、限定されないが、ｄＣａｓ９、ｄＣａｓ１２ｊ、またはＴＡＬＥ等のＤＮＡバインダーのインテイン媒介性の組み込みは、２つのより小さい断片からの完全長酵素、例えば、ＭＬＴ可動要素酵素の再構築を可能にする、限定されないが、スプリットＭＬＴ可動要素酵素系等のスプリット酵素系の作製を可能にする。これにより、酵素、例えば、ＭＬＴ可動要素酵素のＮ末端またはＣ末端にＤＮＡバインダーを発現する必要性を回避することが可能になる。このアプローチでは、酵素、例えば、ＭＬＴ可動要素酵素の２つの部分をインテインに融合させ、共発現後、インテインは、翻訳後修飾による完全長酵

素、例えば、ＭＬＴ可動要素酵素を産生することが可能になる。したがって、実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素をコードする核酸は、インテインを含む。実施形態では、核酸は、酵素からのインテインの翻訳後切除時に、第１及び第２の部分が機能的酵素に融合されるように、第１の部分と第２の部分との間にインテインがコードされている第１及び第２の部分の形態で酵素をコードする。

【０２３８】

実施形態では、インテインは、好適なリガンド依存性インテイン、例えば、米国特許第９，２００，０４５号、Ｍｏｏｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２００２；１２４，９０４４－９０４５、Ｍｏｏｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２００３；１２５，１０５６１－１０５６９、Ｂｕｓｋｉｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２００４；１０１，１０５０５－１０５１０、Ｓｋｒｅｔａｓ＆Ｗｏｏｄ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．２００５；１４，５２３－５３２、Ｓｃｈｗａｒｔｚ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２００７；３，５０－５４、Ｐｅｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２０１１；１８（５），６１９－６３０（これらの各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものから選択されるインテインである。

【０２３９】

実施形態では、インテインは、ＮｐｕＮ（インテイン－Ｎ）（配列番号４２３）及び／またはＮｐｕＣ（インテイン－Ｃ）（配列番号４２４）、またはそのバリアント、例えば、それに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有する配列である。

配列番号４２３：ＮｐｕＮ（インテイン－Ｎ）のヌクレオチド配列

ＧＧＣＧＧＡＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＴＧＣＴＧＡＧＴＡＴＴＧＴＣＴＧＡＧＴＴＡＣＧ
ＡＡＡＣＧＧＡＡＡＴＡＣＴＣＡＣＧＧＴＴＧＡＧＴＡＴＧＧＧＣＴＴＣＴＴＣＣＡＡＴ
ＴＧＧＣＡＡＡＡＴＣＧＴＴＧＡＡＡＡＧＣＧＣＡＴＡＧＡＧＴＧＴＡＣＧＧＴＧＴＡＴ
ＴＣＣＧＴＣＧＡＴＡＡＣＡＡＣＧＧＴＡＡＴＡＴＣＴＡＣＡＣＣＣＡＧＣＣＧＧＴＡＧ
ＣＴＣＡＧＴＧＧＣＡＣＧＡＣＣＧＡＧＧＣＧＡＡＣＡＧＧＡＡＧＴＧＴＴＣＧＡＧＴＡ
ＴＴＧＣＴＴＧＧＡＡＧＡＴＧＧＣＴＣＣＣＴＴＡＴＣＣＧＣＧＣＣＡＣＴＡＡＡＧＡＣ
ＣＡＴＡＡＧＴＴＴＡＴＧＡＣＧＧＴＴＧＡＣＧＧＧＣＡＧＡＴＧＣＴＧＣＣＴＡＴＡＧ
ＡＣＧＡＡＡＴＡＴＴＴＧＡＧＡＧＡＧＣＴＧＧＡＣＴＴＧＡＴＧＡＧＡＧＴＣＧＡ
ＴＡＡＴＣＴＧＣＣＡＡＡＴ

配列番号４２４：ＮｐｕＣ（インテイン－Ｃ）のヌクレオチド配列

ＧＧＣＧＧＡＴＣＴＧＧＣＧＧＴＡＧＴＧＧＧＧＧＴＴＣＣＧＧＡＴＣＣＡＴＡＡＡＧＡ
ＴＡＧＣＴＡＣＴＡＧＧＡＡＡＴＡＴＣＴＴＧＧＣＡＡＡＣＡＡＡＡＣＧＴＣＴＡＴＧＡ
ＣＡＴＡＧＧＡＧＴＴＧＡＧＣＧＡＧＡＴＣＡＣＡＡＴＴＴＴＧＣＴＴＴＧＡＡＧＡＡＴ
ＧＧＧＴＴＣＡＴＣＧＣＧＴＣＴＡＡＴＴＧＣＴＴＣＡＡＣＧＣＴＡＧＣＧＧＣＧＧＧＴ
ＣＡＧＧＡＧＧＣＴＣＴＧＧＴＧＧＡＡＧＣ

【０２４０】

本開示の核酸

実施形態では、酵素をコードする核酸は、ＲＮＡである。実施形態では、ドナーＤＮＡをコードする核酸は、ＤＮＡである。

【０２４１】

実施形態では、ドナーＤＮＡは、完全なポリペプチドをコードする遺伝子を含む。実施形態では、ドナーＤＮＡは、疾患状態において欠陥があるかまたは実質的に存在しない遺伝子を含む。

【０２４２】

実施形態では、酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素）は、組換え核酸または合成核酸によってコードされる。実施形態では、核酸は、ＲＮＡ、任意選択的にヘルパーＲＮＡである。実施形態では、核酸は、任意選択的にシュードウリジン置換（例えば、限

定されないが、ｎ－メチル－シュードウリジン）及び／または５－メトキシ置換（例えば、限定されないが、５－メトキシ－Ｕ）を有する５’－ｍ７Ｇキャップ（キャップ０、またはキャップ１、またはキャップ２）、ならびに任意選択的に約３０、または約３４、または約５０、または約５５、または約７０、または約８０、または約１００、約１５０ヌクレオチドの長さのポリＡテールを有するＲＮＡである。実施形態では、ポリＡテールは、約３０ヌクレオチドの長さ、任意選択的に３４ヌクレオチドの長さのものである。実施形態では、核局在化シグナルは、Ｎ末端、任意選択的にＣ末端での酵素開始コドンの前に配置される。

【０２４３】

実施形態では、第１の核酸ＲＮＡは、１つ以上のウリジン修飾を含む。実施形態では、第１の核酸ＲＮＡは、Ｎ１－メチル－擬似Ｕ及び／または５－メトキシ－Ｕを含む。

【０２４４】

実施形態では、第１の核酸ＲＮＡは、約８０ヌクレオチドの長さのポリＡテールを含む。

【０２４５】

実施形態では、ＲＮＡである核酸は、５’－ｍ７Ｇキャップ（キャップ０、またはキャップ１、またはキャップ２）を有する。

【０２４６】

実施形態では、核酸は、５’キャップ構造、Ｋｏｚａｋコンセンサス配列を含む５’－ＵＴＲ、インビボでＲＮＡの安定性を増加させる配列を含む５’－ＵＴＲ、インビボでＲＮＡの安定性を増加させる配列を含む３’－ＵＴＲ、及び／または３’ポリ（Ａ）テールを含む。

【０２４７】

実施形態では、酵素（例えば、限定されないが、可動要素酵素）は、ベクターまたはベクター様粒子に組み込まれている。実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。

【０２４８】

実施形態では、本開示の実施形態による酵素をコードする核酸は、ＤＮＡである。

【０２４９】

様々な実施形態では、ドナーＤＮＡを含む構築物は、核酸構築物、プラスミド、またはベクター等の任意の好適な遺伝子構築物である。様々な実施形態では、構築物は、本明細書においてドナーＤＮＡと称されるＤＮＡである。実施形態では、ドナーＤＮＡをコードする核酸の配列は、哺乳動物系において改善されたｍＲＮＡ安定性及びタンパク質発現を提供するようにコドン最適化されている。

【０２５０】

実施形態では、酵素とドナーＤＮＡは異なるベクターに含まれている。実施形態では、酵素とドナーＤＮＡは同じベクターに含まれる。

【０２５１】

様々な実施形態では、標的ゲノム統合を実行することができる酵素（例えば、限定されないが、キメラ可動要素酵素である可動要素酵素）をコードする核酸は、ＲＮＡ（例えば、ヘルパーＲＮＡ）であり、ドナーＤＮＡをコードする核酸は、ＤＮＡである。

【０２５２】

当該技術分野において理解されるであろうように、ドナーＤＮＡは、多くの場合、ドナーＤＮＡの中央の導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレームと、ドナーＤＮＡの５’及び３’末端の末端反復配列と、を含む。翻訳された可動要素酵素は、ドナーＤＮＡの５’及び３’配列に結合し、転位機能を実行する。

【０２５３】

実施形態では、可動要素は、自身のコピーを他のポリヌクレオチドに挿入することができるポリヌクレオチドを指すために使用される。可動要素という用語は、当業者に周知であり、配列の編成、例えば、各末端の逆位末端配列、及び／または末端の直接反復される

長い末端反復（ＬＴＲ）に基づいて区別することができる可動要素のクラスを含む。実施形態では、本明細書に記載の可動要素は、ｐｉｇｇｙＢａｃ様要素、例えば、ＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列を認識し、挿入部位における配列を元のＴＴＡＡ（配列番号４４０）配列に戻す、そのトレースレス切除を特徴とする可動要素として記載され得る。

【０２５４】

実施形態では、ドナーＤＮＡまたは導入遺伝子は、可動要素と互換的に使用される。

【０２５５】

実施形態では、ドナーＤＮＡは、１つ以上の末端配列または末端に隣接している。実施形態では、ドナーＤＮＡは、完全なポリペプチドをコードする遺伝子であるかまたはそれを含む。実施形態では、ドナーＤＮＡは、疾患状態において欠陥があるかまたは実質的に存在しない遺伝子であるか、またはそのような遺伝子を含む。

【０２５６】

実施形態では、可動要素は、ＭＬＴ可動要素酵素（例えば、限定されないが、配列番号１、配列番号１０、または配列番号１１のアミノ酸配列に対して少なくとも約９０％の同一性を有するＭＬＴ可動要素酵素）を含む。例えば、可動要素酵素は、配列番号４３１のヌクレオチド配列、またはそれに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有する配列を有する左末端に作用することができる。実施形態では、酵素は、配列番号４３２のヌクレオチド配列、またはそれに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有する配列を有する右末端に作用することができる。実施形態では、酵素は、それぞれ配列番号４３１及び配列番号４３２のヌクレオチド配列、またはそれに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性を有する配列を有する、ＭＬＴ左末端及びＭＬＴ右末端の両方に作用する。

【０２５７】

実施形態では、ＭＬＴ左末端（５’から３’へ）は、以下の通りである
ＴＴＡＡＣＡＣＴＴＧＧＡＴＴＧＣＧＧＧＡＡＡＣＧＡＧＴＴＡＡＧＴＣＧＧＣＴＣＧＣＧＴＧＡＡＴＴＧＣＧＣＧＴＡＣＴＣＣＧＣＧＧＧＡＧＣＣＧＴＣＴＴＡＡＣＴＣＧＧＴＴＣＡＴＡＴＡＧＡＴＴＴＧＣＧＧＴＧＧＡＧＴＧＣＧＧＧＡＡＡＣＧＴＧＴＡＡＡＣＴＣＧＧＧＣＣＧＡＴＴＧＴＡＡＣＴＧＣＧＴＡＴＴＡＣＣＡＡＡＴＡＴＴＴＧＴＴ（配列番号４３１）

【０２５８】

実施形態では、ＭＬＴ右末端（５’から３’へ）は、以下の通りである
ＡＡＴＴＡＴＴＴＡＴＧＴＡＣＴＧＡＡＴＡＧＡＴＡＡＡＡＡＡＡＴＧＴＣＴＧＴＧＡＴＴＧＡＡＴＡＡＡＴＴＴＴＣＡＴＴＴＴＴＴＡＣＡＣＡＡＧＡＡＡＣＣＧＡＡＡＡＴＴＴＣＡＴＴＴＣＡＡＴＣＧＡＡＣＣＣＡＴＡＣＴＴＣＡＡＡＡＧＡＴＡＴＡＧＧＣＡＴＴＴＴＡＡＡＣＴＡＡＣＴＣＴＧＡＴＴＴＴＧＣＧＣＧＧＧＡＡＡＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＴＧＣＣＣＧＣＧＣＣＡＴＣＴＴＡＴＡＴＴＴＴＧＧＣＧＧＧＡＡＡＴＴＣＡＣＣＣＧＡＣＡＣＣＧＴＧＧＴＧＴＴＡＡ（配列番号４３２）

【０２５９】

実施形態では、ドナーＤＮＡ、例えば、キメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲの導入遺伝子は、導入遺伝子を有する構築物の安定な発現を確実にするために選択される様々な調節要素と会合している。したがって、実施形態では、導入遺伝子は、近傍遺伝子の活性化または不活性化を防止または軽減する１つ以上のインスレーター配列を含むことができる非ウイルスベクター（例えば、限定されないが、ＤＮＡプラスミド）によってコードされる。インスレーターは、ドナーＤＮＡ（導入遺伝子カセット）に隣接して、転写サイレンシング、及び染色体配列によって付与される位置効果を低減する。追加の効果として、絶縁体は、導入遺伝子エンハンサー及びプロモーター配列と隣接する染色体配列との機能的相

互作用を排除することができる。実施形態では、１つ以上のインスレーター配列は、ＨＳ４インスレーター（１．２－ｋｂ５’－ＨＳ４ニワトリβ－グロビン（ｃＨＳ４）インスレーター因子）及びＤ４Ｚ４インスレーター（顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）に関連するタンデムマクロサテライト反復）を含む。実施形態では、ＨＳ４インスレーター及びＤ４Ｚ４インスレーターの配列は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＲｉｖａｌ－Ｇｅｒｖｉｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１３ Ａｕｇ；２１（８）：１５３６－５０に記載されている通りである。

【０２６０】

実施形態では、ドナーＤＮＡ、例えば、キメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲは、宿主ゲノム内のＧＳＨＳ位置に挿入される。これらの部位内の統合は、原がん遺伝子の活性化、腫瘍抑制因子の不活性化、または挿入変異原性等の有害作用と関連付けられないため、ＧＳＨＳは、遺伝子導入に十分に適した遺伝子座として定義される。ＧＳＨＳは、以下の基準によって定義することができる：（１）任意の遺伝子の５’末端から少なくとも５０ｋｂの距離、（２）任意のがん関連遺伝子から少なくとも３００ｋｂの距離、（３）任意のマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）から少なくとも３００ｋｂの距離、（４）転写単位の外側の位置、及び（５）ヒトゲノムの超保存領域（ＵＣＲ）の外側の位置。Ｐａｐａｐｅｔｒｏｕ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２０１１；２９：７３－８、Ｂｊｅｒａｎｏ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００４；３０４：１３２１－５を参照されたい。

【０２６１】

さらに、ＧＳＨＳ位置の使用は、複数の細胞型にわたる安定な導入遺伝子発現を可能にすることができる。そのような部位の１つであるケモカインＣ－Ｃモチーフ受容体５（ＣＣＲ５）が識別されており、組み込み遺伝子導入に使用されている。ＣＣＲ５は、βケモカイン受容体ファミリーのメンバーであり、一次感染に関与するＲ５トロピックウイルス株の侵入に必要である。ＣＣＲ５遺伝子におけるホモ接合３２ｂｐの欠失により、ヒトにおけるＨＩＶ－１ウイルス感染に対する耐性が付与される。白人集団の約１％において自然に生じるＣＣＲ５発現の妨害は、免疫の低減をもたらすとは思われない。Ｌｏｂｒｉｔｚ ａｔ ａｌ．，Ｖｉｒｕｓｅｓ ２０１０；２：１０６９－１０５。臨床試験は、標的可能なヌクレアーゼを介してＣＣＲ５を破壊する安全性及び有効性を実証している。Ｔｅｂａｓ ａｔ ａｌ．，ＨＩＶ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１４；３７０：９０１－１０。

【０２６２】

実施形態では、ドナーＤＮＡは、組織特異的プロモーターの制御下にある。組織特異的プロモーターは、例えば、限定されないが、肝臓特異的プロモーターである。実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、実施形態では、ヒトＬＰ１プロモーターである、ＬＰ１プロモーターである。ＬＰ１プロモーターは、例えば、Ｎａｔｈｗａｎｉ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ ｖｏｌ．２００６；１０７（７）：２６５３－６１に記載されており、限定されないが、Ｎａｔｈａｗａｎｉ ｅｔ ａｌ．に記載されているように構築される。

【０２６３】

しかしながら、他の組織特異的プロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター等を含む、種々のプロモーターを使用することができることを理解されたい。

【０２６４】

実施形態では、本核酸は、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチド、またはそれらの類似体もしくは誘導体のいずれかである、任意の長さのヌクレオチドの重合体形態を含む。実施形態では、二本鎖及び一本鎖ＤＮＡ、ならびに二本鎖及び一本鎖ＲＮＡ、ならびにＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッドが提供される。実施形態では、メチル化またはキャップされたポリヌクレオチド等の転写活性化ポリヌクレオチドが提供される。実施形態では、本組成物は、ｍＲＮＡまたはＤＮＡである。

【０２６５】

実施形態では、本非ウイルスベクターは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を含み、制御配列に作動可能に連結されている線状または環状のＤＮＡ分子であり、制御配列が、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を提供する。実施形態では、非ウイルスベクターは、プロモーター配列、ならびに転写及び翻訳停止シグナル配列を含む。そのようなベクターとしては、とりわけ、染色体及びエピソームベクター、例えば、ベクター細菌プラスミド、ドナーＤＮＡ、酵母エピソーム、挿入因子、酵母染色体要素からのベクター、ならびにそれらの組み合わせからのベクターを挙げることができる。本構築物は、発現を調節ならびに発生させる制御領域を含有し得る。

【０２６６】

実施形態では、酵素及び／またはドナーＤＮＡを含む構築物は、コドン最適化されている。ドナーＤＮＡのコドン最適化は、ドナーＤＮＡの治療可能性及び宿主生物におけるその発現を最適化するために使用される。ドナーＤＮＡにおけるコドン使用量を、宿主生物または細胞における各コドンについてのトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）の存在量と一致させるために、コドン最適化が実行される。コドン最適化方法は、当該技術分野において既知であり、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２００７／１４２９５４に記載されている。最適化戦略としては、例えば、翻訳開始領域の修飾、ｍＲＮＡ構造的因子の改変、及び異なるコドンバイアスの使用を挙げることができる。

【０２６７】

実施形態では、酵素及び／またはドナーＤＮＡを含む構築物は、構築物の安定な発現を確実にするために選択されるいくつかの他の調節要素を含む。したがって、実施形態では、非ウイルスベクターは、近傍の遺伝子の活性化または不活性化を防止または軽減する１つ以上のインスレーター配列を含み得るＤＮＡプラスミドである。実施形態では、１つ以上のインスレーター配列は、ＨＳ４インスレーター（１．２－ｋｂ５’－ＨＳ４ニワトリβ－グロビン（ｃＨＳ４）インスレーター因子）及びＤ４Ｚ４インスレーター（顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨＤ）に関連するタンデムマクロサテライト反復）を含む。実施形態では、ＨＳ４インスレーター及びＤ４Ｚ４インスレーターの配列は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＲｉｖａｌ－Ｇｅｒｖｉｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１３ Ａｕｇ；２１（８）：１５３６－５０に記載されている通りである。実施形態では、酵素及び／またはドナーＤＮＡを含む構築物の遺伝子は、可動要素酵素の存在下で転位することができる。実施形態では、本開示の実施形態による非ウイルスベクターは、可動要素酵素をコードする核酸構築物を含む。可動要素酵素は、ＲＮＡ可動要素酵素プラスミドである。実施形態では、非ウイルスベクターは、ＤＮＡ可動要素酵素プラスミドをコードする核酸構築物をさらに含む。実施形態では、可動要素酵素は、インビトロ転写されたｍＲＮＡ可動要素酵素である。可動要素酵素は、酵素及び／またはドナーＤＮＡを含む構築物から部位または遺伝子座特異的ゲノム領域に遺伝子を切除及び／または転位することができる。

【０２６８】

実施形態では、酵素とドナーＤＮＡは同じベクターに含まれる。

【０２６９】

実施形態では、酵素は、導入遺伝子、例えば、キメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲを有するドナーＤＮＡと同じ（シス）または異なるベクター（トランス）上に配置される。したがって、実施形態では、酵素と、導入遺伝子、例えば、キメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲを包含するドナーＤＮＡとは、それらが同じベクターに含まれるような、シス構成にある。実施形態では、酵素と、導入遺伝子、例えば、キメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲを包含するドナーＤＮＡとは、それらが異なるベクターに含まれるような、トランス構成にある。ベクターは、本開示による任意の非ウイルスベクターである。

【０２７０】

いくつかの態様では、本開示の実施形態による、標的ゲノム統合を実行することができる酵素（例えば、可動要素酵素またはキメラ可動要素酵素）をコードする核酸が提供される。核酸はＤＮＡまたはＲＮＡであるか、またはこれらから構成される。実施形態では、酵素をコードする核酸は、ＤＮＡである。実施形態では、標的ゲノム統合を実行すること

ができる酵素（例えば、キメラ可動要素酵素）をコードする核酸は、例えば、ヘルパーＲＮＡ等のＲＮＡである。実施形態では、キメラ可動要素酵素は、ベクターに組み込まれている。実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。

【０２７１】

実施形態では、本開示の実施形態による、導入遺伝子、例えば、キメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲをコードする核酸が提供される。核酸はＤＮＡまたはＲＮＡであるか、またはこれらから構成される。実施形態では、ｔ導入遺伝子、例えば、キメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲをコードする核酸は、ＤＮＡである。実施形態では、導入遺伝子、例えば、キメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲをコードする核酸は、例えば、ヘルパーＲＮＡ等のＲＮＡである。実施形態では、導入遺伝子は、ベクターに組み込まれている。実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。

【０２７２】

実施形態では、本酵素は、ＲＮＡまたはＤＮＡの形態であり得、タンパク質を核内により効率的にシャトルするための１つまたは２つのＮ末端核局在化シグナル（ＮＬＳ）を有する。例えば、実施形態では、本酵素は、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、またはそれ以上のＮＬＳをさらに含む。ＮＬＳの例は、Ｋｏｓｕｇｉ　ｅｔ　ａｌ．（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．（２００９）２８４：４７８－４８５、参照により本明細書に組み込まれる）において提供される。特定の実施形態では、ＮＬＳは、コンセンサス配列Ｋ（Ｋ／Ｒ）Ｘ（Ｋ／Ｒ）（配列番号３４８）を含む。一実施形態では、ＮＬＳは、コンセンサス配列（Ｋ／Ｒ）（Ｋ／Ｒ）X_{10-12}（Ｋ／Ｒ）$_{3/5}$（配列番号３４９）を含み、（Ｋ／Ｒ）$_{3/5}$は、５つのアミノ酸のうちの少なくとも３つが、リジンまたはアルギニンのいずれかであることを表す。一実施形態では、ＮＬＳは、ｃ－ｍｙｃ　ＮＬＳを含む。特定の実施形態では、ｃ－ｍｙｃ　ＮＬＳは、配列ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ（配列番号３５０）を含む。特定の実施形態では、ＮＬＳは、ヌクレオプラスミンＮＬＳである。実施形態では、ヌクレオプラスミンＮＬＳは、配列ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号３５１）を含む。実施形態では、ＮＬＳは、ＳＶ４０ラージＴ抗原ＮＬＳを含む。実施形態では、ＳＶ４０ラージＴ抗原ＮＬＳは、配列ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号３５２）を含む。特定の実施形態では、ＮＬＳは、３つのＳＶ４０ラージＴ抗原ＮＬＳ（例えば、ＤＰＫＫＫＲＫＶＤＰＫＫＫＲＫＶＤＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号３５３）を含む。実施形態では、ＮＬＳは、それらが１つ以上の置換、付加、または欠失（例えば、約１、または約２、または約３、または約４、または約５、または約１０の置換、付加、または欠失）を含有するように、上記の配列に変異／変形を含み得る。

【０２７３】

いくつかの態様では、本開示の実施形態による核酸を含む、宿主細胞が提供される。

【０２７４】

脂質

実施形態では、第１の核酸及び第２の核酸のうちの少なくとも１つは、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の形態にある。実施形態では、第１の核酸及び第２の核酸を含む組成物は、ＬＮＰの形態にある。

【０２７５】

実施形態では、酵素をコードする核酸及び導入遺伝子、例えば、キメラＣＡＲまたはキメラＣＡＡＲをコードする核酸は、同じ脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内に含有される。実施形態では、酵素をコードする核酸及びドナーＤＮＡをコードする核酸は、同じＬＮＰに組み込まれるか、またはそれと会合する混合物である。実施形態では、酵素をコードする核酸及びドナーＤＮＡをコードする核酸は、同じＬＮＰに組み込まれるか、またはそれと会合する共製剤の形態にある。

【０２７６】

実施形態では、ＬＮＰは、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウムプロパン（ＤＯＴＡＰ）、ジメチルアミノエタン－カルバモイルと混合されたカチオン性コレステロール誘導体（ＤＣ－Ｃｈｏｌ）、ホスファチジルコリン（ＰＣ）、トリオレイン（グ

リセリルトリオレエート）、及び１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［カルボキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＤＳＰＥ－ＰＥＧ）、１，２－ジミリストイル－ｒａｃ－グリセロ－３－メトキシポリエチレングリコール－２０００（ＤＭＧ－ＰＥＧ　２Ｋ）、及び１，２－ジステアロール－ｓｎ－グリセロール－３ホスホコリン（ＤＳＰＣ）から選択され、及び／またはポリエチレンイミン（ＰＥＩ）及びポリ（乳酸－グリコール酸共重合体）（ＰＬＧＡ）、及びＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）から選択される１つ以上の分子を含む。

【０２７７】

実施形態では、ＬＮＰは、例えば、Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｒｅｌｅａｓｅ　２０１９；３０３：９１－１００に記載されている通りである。ＬＮＰは、構造脂質（例えば、ＤＳＰＣ）、ＰＥＧコンジュゲート脂質（ＣＤＭ－ＰＥＧ）、カチオン性脂質（ＭＣ３）、コレステロール、及び標的リガンド（例えば、ＧａｌＮＡｃ）のうちの１つ以上を含むことができる。

【０２７８】

実施形態では、ナノ粒子は、約１０００ｎｍ未満の直径を有する粒子である。実施形態では、本開示のナノ粒子は、約５００ｎｍ以下、または約４００ｎｍ以下、または約３００ｎｍ以下、または約２００ｎｍ以下、または約１００ｎｍ以下の最大寸法（例えば、直径）を有する。実施形態では、本発明のナノ粒子は、約５０ｎｍ～約１５０ｎｍ、または約７０ｎｍ～約１３０ｎｍ、または約８０ｎｍ～約１２０ｎｍ、または約９０ｎｍ～約１１０ｎｍの範囲の最大寸法を有する。実施形態では、本開示のナノ粒子は、約１００ｎｍの最大寸法（例えば、直径）を有する。

【０２７９】

いくつかの態様では、本開示による細胞は、インビボ遺伝子修飾方法を介して調製される。実施形態では、本開示による遺伝子修飾は、エクスビボ方法を介して実行される。

【０２８０】

いくつかの態様では、本開示による細胞は、細胞を、インビボで標的ゲノム統合を実行することができる酵素（例えば、限定されないが、哺乳動物の可動要素酵素）と接触させることによって調製される。実施形態では、細胞を、エクスビボで酵素と接触させる。

【０２８１】

実施形態では、本方法は、非キメラ可動要素酵素を用いる方法と比較して、低減された挿入変異原性または発がんを提供する。

【０２８２】

治療用途

実施形態では、本開示は、本明細書に記載の方法によって生成されるＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞を提供する。

【０２８３】

実施形態では、本開示は、ＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞を送達する方法であって、それを必要とする患者に、本明細書に記載の方法によって生成されるＣＡＲ免疫細胞を投与することを含む、方法を提供する。

【０２８４】

実施形態では、本開示は、ＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞療法を使用して疾患または状態を治療する方法であって、それを必要とする患者に、本明細書に記載の方法によって生成されるＣＡＲ免疫細胞を投与することを含む、方法を提供する。

【０２８５】

実施形態では、疾患または状態は、がんであるか、またはがんを含む。実施形態では、がんは、副腎癌、胆道癌、膀胱癌、骨／骨髄癌、脳癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、頭頸部癌、肝胆道癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膵癌、骨盤癌、胸膜癌、前立腺癌、腎癌、皮膚癌、胃癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宮癌、リンパ腫、黒色腫、多発性骨髄腫、もしくは白血病であるか、またはそれらを含む。

【０２８６】

実施形態では、がんは、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳及び中枢神経系癌、乳癌、腹膜癌、子宮頸癌、絨毛癌、大腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌（ｇａｓｔｒｉｃ　ｃａｎｃｅｒ）、膠芽腫、肝癌、肝細胞癌、上皮内新生物、腎臓または腎癌、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮細胞癌、胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ　ｃａｎｃｅｒ）、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫、小リンパ球性（ＳＬ）ＮＨＬ、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、中悪性度びまん性ＮＨＬ、高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非分割細胞ＮＨＬ、巨大腫瘤病変ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、ならびにヘアリー細胞白血病のうちの１つ以上から選択される。

【０２８７】

実施形態では、がんは、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳及び中枢神経系癌、乳癌、腹膜癌、子宮頸癌、絨毛癌、大腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌（胃腸癌を含む）、膠芽腫、肝癌、肝細胞腫、上皮内新生物、腎臓または腎癌、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、及び肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌（唇、舌、口、及び咽頭）、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮または子宮内膜癌、泌尿器系癌、外陰癌、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、ならびにＢ細胞リンパ腫を含むリンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、小リンパ球性（ＳＬ）ＮＨＬ、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、中悪性度びまん性ＮＨＬ、高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非分割細胞ＮＨＬ、巨大腫瘤病変ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病を含む）、ならびに他のがん腫及び肉腫、及び移植後リンパ増殖性障害（ＰＴＬＤ）、ならびに母斑症、浮腫に関連する異常な血管増殖（脳腫瘍に関連するもの等）、及びメグズ症候群のうちの１つ以上から選択される。

【０２８８】

実施形態では、疾患または状態は、任意選択的に、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、及び／または多発性骨髄腫から選択されるがんであるか、またはがんを含む。実施形態では、がんは、再発性もしくは難治性急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、多発性骨髄腫（ＭＭ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、びまん性大型Ｂ細胞リンパ腫、原発性縦隔Ｂ細胞リンパ腫、高悪性度Ｂ細胞リンパ腫、形質転換濾胞性リンパ腫、及び／またはマントル細胞リンパ腫である。実施形態では、疾患または状態は、がん、任意選択的に、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）、大細胞神経内分泌癌（ＬＣＮＥＣ）、胃癌、結腸癌、腎細胞癌、肝細胞癌、膀胱尿路上皮癌、転移性黒色腫、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、膵癌、神経膠腫、及び／または膠芽腫から選択される固形腫瘍であるか、またはそれらを含む。

【０２８９】

実施形態では、疾患または状態は、自己免疫疾患または障害であるか、またはそれを含む。実施形態では、自己免疫疾患は、多発性硬化症、真性糖尿病、ループス、セリアック病、クローン病、潰瘍性大腸炎、ギラン・バレー症候群、強皮症、グッドパスチャー症候群、ウェゲナー肉芽腫症、自己免疫てんかん、ラスムッセン脳炎、原発性胆道硬化症、硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、アディソン病、橋本甲状腺炎、線維筋痛症、メニエール症候群、移植拒絶（例えば、同種移植拒絶の防止）、悪性貧血、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、エリテマトーデス、多発性硬化症、重症

筋無力症、ライター症候群、グレイブ病、及び他の自己免疫疾患であるか、またはそれらを含む。

【０２９０】

実施形態では、疾患または状態は、尋常性天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、重症筋無力症、及び落葉状天疱瘡である。

【０２９１】

実施形態では、細胞は、ＣＡＡＲを発現し、Ｂ細胞上で発現される自己抗体に対して高い親和性を有する。

【０２９２】

実施形態では、細胞は、ＣＡＡＲを発現し、自己抗体を発現するＢ細胞の標的死滅を誘導する。

【０２９３】

実施形態では、細胞は、ＣＡＡＲを発現し、Ｆｃ受容体に結合した抗体に対して低い親和性を有する。

【０２９４】

実施形態では、遺伝子療法を送達する方法は、非免疫原性であり、任意選択的にサイトカイン放出症候群を有しない。実施形態では、遺伝子療法を送達する方法は、オフターゲット効果を低減または回避する。

【０２９５】

実施形態では、本方法は、２つ以上の用量を介する送達を含む。実施形態では、本方法は、可逆性、誘導性、または死滅スイッチ能力を有する。

【０２９６】

実施形態では、ＣＡＲ免疫細胞は、注射または注入によって投与される。

【０２９７】

実施形態では、ＣＡＲ免疫細胞を送達する方法は、２回以上の用量を介する送達を含む。

【０２９８】

実施形態では、ＣＡＲ免疫細胞を送達する方法は、対象においてＣＡＲ免疫細胞の高いコピー数を作製することを含む。

【０２９９】

実施形態では、本方法は、単回投与を必要とする。実施形態では、本方法は、複数回の投与を必要とする。

【０３００】

単離された細胞

本開示のいくつかの態様では、単離されたＣＡＲ免疫細胞が提供される。

【０３０１】

本開示のいくつかの態様では、本開示の実施形態によるトランスフェクトされた細胞を含む単離されたＣＡＲ免疫細胞が提供される。

【０３０２】

いくつかの態様では、本開示は、エクスビボ遺伝子療法アプローチを提供する。したがって、実施形態では、遺伝性または後天性疾患の治療を必要とする患者においてそれを行うために使用される方法は、（ａ）患者（自己）または別の個体（同種）から得られた細胞を、本開示の実施形態によるトランスフェクトされた細胞と接触させることと、（ｂ）細胞を、それを必要とする患者に投与することと、を含む。

【０３０３】

エクスビボ遺伝子療法の利点のうちの１つは、患者の投与前に形質導入された細胞を「サンプリング」する能力である。これによって、有効性が促進され、細胞（複数可）を患者に導入する前に安全性確認を実施することが可能になる。例えば、組み込みの形質導入効率及び／またはクローン性を、生成物の注入の前に評価することができる。本開示は、エクスビボ遺伝子修飾に効果的に使用することができるトランスフェクトされた細胞及び

方法を提供する。

【０３０４】

実施形態では、本開示によるトランスフェクトされた細胞を含む組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む。

【０３０５】

好適な薬学的組成物を製剤化する方法は、当該技術分野において既知であり、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２１ｓｔ ｅｄ．，２００５、及びＤｒｕｇｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓシリーズの本であるａ Ｓｅｒｉｅｓ ｏｆ Ｔｅｘｔｂｏｏｋｓ ａｎｄ Ｍｏｎｏｇｒａｐｈｓ（Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎ．Ｙ．）を参照されたい。例えば、注射可能な使用に好適な薬学的組成物は、滅菌注射溶液または分散液を即時調製するための、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液、及び滅菌粉末を含み得る。静脈内投与に好適な担体としては、生理学的生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ ＥＬ（商標）（ＢＡＳＦ，Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ．）、またはリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌されなければならず、流体は、シリンジによって容易に吸い上げられる必要がある。その組成物は、製造及び保存条件下で安定である必要があり、細菌及び真菌等の微生物の汚染作用を受けないように保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、及びそれらの好適な混合物を含有する、溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用によって、分散の場合には必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサール等によって達成され得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖、ポリアルコール（マンニトール、ソルビトール等）、及び塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましいであろう。吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物中に含むことによって、注射組成物の持続的吸収をもたらすことができる。

【０３０６】

滅菌注射溶液は、上に列挙された成分のうちの１つまたは組み合わせを含む適切な溶媒中に、活性化合物を必要な量で組み込み、必要に応じて、その後濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散液は、活性化合物を、基本的な分散媒、及び上に列挙されたものとは異なる必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって、調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、真空乾燥及び凍結乾燥であり、これらによって、予め滅菌濾過したその溶液から、活性成分及び任意の所望の追加成分の粉末が得られる。

【０３０７】

治療化合物は、インプラント及びマイクロカプセル化送達系を含む放出制御製剤等の、体内からの急速な放出に対して治療化合物を保護するであろう担体とともに調製され得る。コラーゲン、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物（例えば、ポリ［１，３－ビス（カルボキシフェノキシ）プロパン－コ－セバシン酸］（ＰＣＰＰ－ＳＡ）マトリックス、脂肪酸二量体－セバシン酸（ＦＡＤ－ＳＡ）コポリマー、ポリ（ラクチド－コ－グリコリド））、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリエチレングリコールでコーティングされたリポソーム、及びポリ乳酸等の生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。そのような製剤は、標準的な技法を使用して調製することができるか、または例えば、Ａｌｚａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ及びＮｏｖａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．から商業的に入手することができる。また、リポソーム懸濁液は、薬学的に許容される担体として使用され得る。これらは、例えば、米国特許第４，５２２，８１１号に記載の、当業者に既知の方法に従って調製され得る。例えば、手術部位への投与が望ましい場合、半固体、ゲル化、軟質ゲル、または他の製剤（制御放出を含む）が使用され得

る。そのような製剤を作製する方法は、当該技術分野において既知であり、生分解性、生体適合性ポリマーの使用を含み得る。例えば、Ｓａｗｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｙａｌｅ Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｍｅｄ．２００６；７９（３－４）：１４１－１５２を参照されたい。

【０３０８】

実施形態では、本開示の方法によって形質転換された細胞を含み得るトランスジェニック生物が提供される。実施形態では、生物は、哺乳動物または昆虫であり得る。生物が哺乳動物である場合、生物は、限定されないが、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギ、パンダ等を挙げることができる。生物が昆虫である場合、生物は、限定されないが、ミバエ、蚊、アメリカタバコガの幼虫等を挙げることができる。

【０３０９】

実施形態では、本開示の実施形態により産生された細胞、及び／または細胞を生成するための構成要素は、容器、キット、パック、またはディスペンサーに、投与のための指示書と一緒に含まれている。

【０３１０】

また、本酵素及びドナーＤＮＡをコードする１つ以上の遺伝子構築物、ならびにそれらを使用するための指示書及び／または試薬を含むキットが本明細書で提供される。

【０３１１】

また、ｉ）本開示の実施形態によるトランスフェクトされた細胞、ｉｉ）トランスフェクトされた細胞の使用のための指示書を含むキットが本明細書で提供される。

【０３１２】

さらに、実施形態では、ＣＡＲ免疫細胞またはＣＡＡＲ免疫細胞を作製するためのキット、及びそれらを作製するための指示書、ならびに任意選択的に、それらのための試薬（例えば、培地、因子等）が提供される。

【０３１３】

実施形態では、本開示の実施形態による酵素（例えば、限定されないが、組換え哺乳動物の可動要素酵素）または核酸、ならびに酵素を使用して細胞にＤＮＡ及び／またはＲＮＡを導入するための指示書を含むキットが提供される。

【０３１４】

定義

以下の定義は、本明細書に開示される開示に関連して使用される。別段定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【０３１５】

本明細書で使用される場合、「ａ」、「ａｎ」、または「ｔｈｅ」は、１つ、または２つ以上を意味し得る。

【０３１６】

さらに、言及された数値表示に関連して使用される場合の「約」という用語は、その言及された数値表示に、その言及された数値表示の最大１０％を加算または減算することを意味する。例えば、「約５０」という言葉は、４５から５５の範囲を包含する。

【０３１７】

医療用途に関連して使用される場合の「有効量」は、対象とする疾患の測定可能な治療、予防、または発病速度の低減をもたらすのに有効な量である。

【０３１８】

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。

【０３１９】

「エクスビボ」という用語は、対象の体から除去された細胞、組織、及び／または臓器に対する治療または手順の実施に関与する事象を指す。適切な場合、細胞、組織、及び／または臓器は、治療または手術の方法で対象の体に戻され得る。

【０３２０】

本明細書で使用される場合、「バリアント」という用語は、ある特定の位置での１つ以

上の置換、欠失、及び／または付加の方式によって参照の核酸またはアミノ酸配列とは異なる核酸またはアミノ酸配列を含む核酸またはタンパク質を包含するが、これらに限定されない。バリアントは、１つ以上の保存的置換を含み得る。保存的置換は、例えば、同様に荷電されたまたは荷電されていないアミノ酸の置換を含み得る。

【０３２１】

本明細書で使用される場合、「担体」または「ビヒクル」は、薬物投与に好適な担体材料を指す。本明細書で有用な担体及びビヒクルとしては、当該技術分野において既知の任意のそのような材料、例えば、無毒であり、かつ有害な様式で組成物の他の構成要素と相互作用しない任意の液体、ゲル、溶媒、液体希釈剤、可溶化剤、界面活性剤、脂質等が挙げられる。

【０３２２】

「薬学的に許容される」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または妥当な利益／リスク比に見合った他の問題もしくは合併症を伴わずにヒト及び動物の組織と接触して使用するのに好適な、化合物、材料、組成物、及び／または投薬形態を指す。

【０３２３】

「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、任意の及び全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、ならびに不活性成分を含むことが意図される。活性薬学的成分へのそのような薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤の使用は、当業者に周知である。任意の従来の薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤が活性薬学的成分と不適合でない限り、本開示の治療組成物におけるその使用が企図される。他の薬物等の追加の活性薬学的成分も、記載の組成物及び方法に組み込まれ得る。

【０３２４】

本明細書で言及される場合、全ての組成パーセンテージは、別段の指定がない限り、組成物の総重量によるものである。本明細書で使用される場合、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」という単語及びその変形は、リスト内のアイテムの列挙が、本技術の組成物及び方法でも有用であり得る他の同様のアイテムを除外するものではないように、非限定的であることを意図する。同様に、「し得る（ｃａｎ）」及び「し得る（ｍａｙ）」という用語、ならびにそれらの変形は、一実施形態が、ある特定の要素または特色を含み得る（ｃａｎ）かまたは含み得る（ｍａｙ）列挙が、それらの要素または特色を含まない本技術の他の実施形態を除外しないように、非限定的であることを意図する。

【０３２５】

含むこと（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）、含有すること、または有すること等の同義語としての「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」というオープンエンドの用語は、本明細書では本発明を説明及び特許請求するために使用されるが、本発明またはその実施形態は、代替的に、「からなること」または「から本質的になること」等の代替的な用語を使用して記載され得る。

【０３２６】

本明細書で使用される場合、「好ましい」及び「好ましくは」という単語は、ある特定の状況下である特定の利益をもたらす技術の実施形態を指す。しかしながら、他の実施形態も、同じかまたは他の状況下で好ましい場合がある。さらに、１つ以上の好ましい実施形態の列挙は、他の実施形態が有用でないことを意味せず、本技術の範囲から他の実施形態を除外することを意図しない。

【０３２７】

治療効果を達成するために必要な本明細書に記載の組成物の量は、特定の目的のための従来の手順に従って経験的に決定され得る。一般に、治療目的で治療剤を投与するために、治療剤は薬理学的有効用量で投与される。「薬理学的有効量」、「薬理学的有効用量」、「治療有効量」、または「有効量」は、特に障害または疾患の治療のために、所望の生理学的作用を生じさせるのに十分な量または所望の結果を達成することができる量を指す

。本明細書で使用される場合、有効量としては、例えば、障害または疾患の症状の発生を遅延させるため、障害または疾患の症状の経過を改変するため（例えば、疾患の症状の進行を遅らせるため）、障害または疾患の１つ以上の症状または徴候を低減または排除するため、及び障害または疾患の症状を元に戻すために十分な量が挙げられるであろう。治療的利益には、改善が実現されているか否かにかかわらず、基礎疾患または障害の進行を停止させるかまたは遅らせることも含まれる。

【０３２８】

有効量、毒性、及び治療有効性は、例えば、ＬＤ$_{50}$（集団の約５０％に対する致死用量）、及びＥＤ$_{50}$（集団の約５０％における治療有効用量）を決定するための細胞培養物または実験動物における、標準的な薬学的手順によって決定され得る。投与量は、用いられる剤形及び利用される投与経路に応じて変動する場合がある。毒性と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、これは、ＬＤ$_{50}$／ＥＤ$_{50}$の比で表すことができる。実施形態では、大きい治療指数を呈する組成物及び方法が好ましい。治療的有効用量は、例えば、細胞培養アッセイを含む、インビトロアッセイから最初に推定され得る。また、用量は、細胞培養物において、または適切な動物モデルにおいて決定したＩＣ$_{50}$を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルにおいて製剤化され得る。血漿中の記載の組成物のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。任意の特定の投与量の効果は、好適なバイオアッセイによって監視され得る。投与量は、医師によって決定され、必要に応じて、治療の観察された効果に適合するように調整され得る。

【０３２９】

本明細書で使用される場合、「治療方法」は、本明細書に記載の疾患もしくは障害を治療するための組成物の使用、及び／または本明細書に記載の疾患もしくは障害を治療するための薬剤の製造における、使用のための組成物及び／またはその使用に等しく適用可能である。

【０３３０】

選択された配列

実施形態では、本開示は、以下を含む本明細書で提供される配列、及びそれに対して少なくとも約９０％、もしくは少なくとも約９３％、もしくは少なくとも約９５％、もしくは少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９８％、もしくは少なくとも約９９％の同一性、または少なくとも約１０個の変異、もしくは少なくとも約９個の変異、もしくは少なくとも約８個の変異、もしくは少なくとも約７個の変異、もしくは少なくとも約６個の変異、もしくは少なくとも約５個の変異、もしくは少なくとも約４個の変異、もしくは少なくとも約３個の変異、もしくは少なくとも約２個の変異、もしくは少なくとも約１個の変異を有するバリアント配列のうちのいずれかを提供する。

ＭＬＴ可動要素酵素タンパク質

ＭＡＱＨＳＤＹＳＤＤＥＦＣＡＤＫＬＳＮＹＳＣＤＳＤＬＥＮＡＳＴＳＤＥＤＳＳＤＤＥ
ＶＭＶＲＰＲＴＬＲＲＲＲＩＳＳＳＳＳＤＳＥＳＤＩＥＧＧＲＥＥＷＳＨＶＤＮＰＰＶＬ
ＥＤＦＬＧＨＱＧＬＮＴＤＡＶＩＮＮＩＥＤＡＶＫＬＦＩＧＤＤＦＦＥＦＬＶＥＥＳＮＲ
ＹＹＮＱＮＲＮＮＦＫＬＳＫＫＳＬＫＷＫＤＩＴＰＱＥＭＫＫＦＬＧＬＩＶＬＭＧＱＶＲ
ＫＤＲＲＤＤＹＷＴＴＥＰＷＴＥＴＰＹＦＧＫＴＭＴＲＤＲＦＲＱＩＷＫＡＷＨＦＮＮＮ
ＡＤＩＶＮＥＳＤＲＬＣＫＶＲＰＶＬＤＹＦＶＰＫＦＩＮＩＹＫＰＨＱＱＬＳＬＤＥＧＩ
ＶＰＷＲＧＲＬＦＦＲＶＹＮＡＧＫＩＶＫＹＧＩＬＶＲＬＬＣＥＳＤＴＧＹＩＣＮＭＥＩ
ＹＣＧＥＧＫＲＬＬＥＴＩＱＴＶＶＳＰＹＴＤＳＷＹＨＩＹＭＤＮＹＹＮＳＶＡＮＣＥＡ
ＬＭＫＮＫＦＲＩＣＧＴＩＲＫＮＲＧＩＰＫＤＦＱＴＩＳＬＫＫＧＥＴＫＦＩＲＫＮＤＩ
ＬＬＱＶＷＱＳＫＫＰＶＹＬＩＳＳＩＨＳＡＥＭＥＥＳＱＮＩＤＲＴＳＫＫＫＩＶＫＰＮ
ＡＬＩＤＹＮＫＨＭＫＧＶＤＲＡＤＱＹＬＳＹＹＳＩＬＲＲＴＶＫＷＴＫＲＬＡＭＹＭＩ
ＮＣＡＬＦＮＳＹＡＶＹＫＳＶＲＱＲＫＭＧＦＫＭＦＬＫＱＴＡＩＨＷＬＴＤＤＩＰＥＤ
ＭＤＩＶＰＤＬＱＰＶＰＳＴＳＧＭＲＡＫＰＰＴＳＤＰＰＣＲＬＳＭＤＭＲＫＨＴＬＱＡ
ＩＶＧＳＧＫＫＫＮＩＬＲＲＣＲＶＣＳＶＨＫＬＲＳＥＴＲＹＭＣＫＦＣＮＩＰＬＨＫＧ
ＡＣＦＥＫＹＨＴＬＫＮＹ（配列番号１）

ＭＬＴコドン最適化可動要素酵素ＤＮＡ

ＡＴＧＧＣＣＣＡＧＣＡＣＡＧＣＧＡＣＴＡＣＡＧＣＧＡＣＧＡＣＧＡＧＴＴＣＴＧＴＧ
ＣＣＧＡＴＡＡＧＣＴＧＡＧＴＡＡＣＴＡＣＡＧＣＴＧＣＧＡＣＡＧＣＧＡＣＣＴＧＧＡ
ＡＡＡＣＧＣＣＡＧＣＡＣＡＴＣＣＧＡＣＧＡＧＧＡＣＡＧＣＴＣＴＧＡＣＧＡＣＧＡＧ
ＧＴＧＡＴＧＧＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＡＡＣＣＣＴＧＡＧＡＣＧＧＡＧＡＡＧＡＡＴＣＡ
ＧＣＡＧＣＴＣＴＡＧＣＡＧＣＧＡＣＴＣＴＧＡＡＴＣＣＧＡＣＡＴＣＧＡＧＧＧＣＧＧ
ＣＣＧＧＧＡＡＧＡＧＴＧＧＡＧＣＣＡＣＧＴＧＧＡＣＡＡＣＣＣＴＣＣＴＧＴＴＣＴＧ
ＧＡＡＧＡＴＴＴＣＴＧＧＧＣＣＡＴＣＡＧＧＧＣＣＴＧＡＡＣＡＣＣＧＡＣＧＣＣＧ
ＴＧＡＴＣＡＡＣＡＡＣＡＴＣＧＡＧＧＡＴＧＣＣＧＴＧＡＡＧＣＴＧＴＴＣＡＴＡＧＧ
ＡＧＡＴＧＡＴＴＴＣＴＴＴＧＡＧＴＴＣＣＴＧＧＴＣＧＡＧＧＡＡＴＣＣＡＡＣＣＧＣ
ＴＡＴＴＡＣＡＡＣＣＡＧＡＡＴＡＧＡＡＡＣＡＡＣＴＴＣＡＡＧＣＴＧＡＧＣＡＡＧＡ
ＡＡＡＧＣＣＴＧＡＡＧＴＧＧＡＡＧＧＡＣＡＴＣＡＣＣＣＣＴＣＡＧＧＡＧＡＴＧＡＡ
ＡＡＡＧＴＴＣＣＴＧＧＧＡＣＴＧＡＴＣＧＴＴＣＴＧＡＴＧＧＧＡＣＡＧＧＴＧＣＧＧ
ＡＡＧＧＡＣＡＧＡＡＧＧＧＡＴＧＡＴＴＡＣＴＧＧＡＣＡＡＣＣＧＡＡＣＣＴＴＧＧＡ
ＣＣＧＡＧＡＣＣＣＣＴＴＡＣＴＴＴＧＧＣＡＡＧＡＣＣＡＴＧＡＣＣＡＧＡＧＡＣＡＧ
ＡＴＴＣＡＧＡＣＡＧＡＴＣＴＧＧＡＡＡＧＣＣＴＧＧＣＡＣＴＴＣＡＡＣＡＡＣＡＡＴ
ＧＣＴＧＡＴＡＴＣＧＴＧＡＡＣＧＡＧＴＣＴＧＡＴＡＧＡＣＴＧＴＧＴＡＡＡＧＴＧＣ
ＧＧＣＣＡＧＴＧＴＴＧＧＡＴＴＡＣＴＴＣＧＴＧＣＣＴＡＡＧＴＴＣＡＴＣＡＡＣＡＴ
ＣＴＡＴＡＡＧＣＣＴＣＡＣＣＡＧＣＡＧＣＴＧＡＧＣＣＴＧＧＡＴＧＡＡＧＧＣＡＴＣ
ＧＴＧＣＣＣＴＧＧＣＧＧＧＧＣＡＧＡＣＴＧＴＴＣＴＴＣＡＧＡＧＴＧＴＡＣＡＡＴＧ
ＣＴＧＧＣＡＡＧＡＴＣＧＴＣＡＡＡＴＡＣＧＧＣＡＴＣＣＴＧＧＴＧＣＧＣＣＴＴＣＴ
ＧＴＧＣＧＡＧＡＧＣＧＡＴＡＣＡＧＧＣＴＡＣＡＴＣＴＧＴＡＡＴＡＴＧＧＡＡＡＴＣ
ＴＡＣＴＧＣＧＧＣＧＡＧＧＧＣＡＡＡＡＧＡＣＴＧＣＴＧＧＡＡＡＣＣＡＴＣＣＡＧＡ
ＣＣＧＴＣＧＴＴＴＣＣＣＣＴＴＡＴＡＣＣＧＡＣＡＧＣＴＧＧＴＡＣＣＡＣＡＴＣＴＡ
ＣＡＴＧＧＡＣＡＡＣＴＡＣＴＡＣＡＡＴＴＣＴＧＴＧＧＣＣＡＡＣＴＧＣＧＡＧＧＣＣ
ＣＴＧＡＴＧＡＡＧＡＡＣＡＡＧＴＴＴＡＧＡＡＴＣＴＧＣＧＧＣＡＣＡＡＴＣＡＧＡＡ
ＡＡＡＡＣＡＧＡＧＧＣＡＴＣＣＣＴＡＡＧＧＡＣＴＴＣＣＡＧＡＣＣＡＴＣＴＣＴＣＴ
ＧＡＡＧＡＡＧＧＧＣＧＡＡＡＣＣＡＡＧＴＴＣＡＴＣＡＧＡＡＡＧＡＡＣＧＡＣＡＴＣ
ＣＴＧＣＴＣＣＡＡＧＴＧＴＧＧＣＡＧＴＣＣＡＡＧＡＡＡＣＣＣＧＴＧＴＡＣＣＴＧＡ
ＴＣＡＧＣＡＧＣＡＴＣＣＡＴＡＧＣＧＣＣＧＡＧＡＴＧＧＡＡＧＡＡＡＧＣＣＡＧＡＡ
ＣＡＴＣＧＡＣＡＧＡＡＣＡＡＧＣＡＡＧＡＡＧＡＡＧＡＴＣＧＴＧＡＡＧＣＣＣＡＡＴ
ＧＣＴＣＴＧＡＴＣＧＡＣＴＡＣＡＡＣＡＡＧＣＡＣＡＴＧＡＡＡＡＧＧＣＧＴＧＧＡＣＣ
ＧＧＧＣＣＧＡＣＣＡＧＴＡＣＣＴＧＴＣＴＴＡＴＴＡＣＴＣＴＡＴＣＣＴＧＡＧＡＡＧ
ＡＡＣＡＧＴＧＡＡＡＴＧＧＡＣＣＡＡＧＡＧＡＣＴＧＧＣＣＡＴＧＴＡＣＡＴＧＡＴＣ
ＡＡＴＴＧＣＧＣＣＣＴＧＴＴＣＡＡＣＡＧＣＴＡＣＧＣＣＧＴＧＴＡＣＡＡＧＴＣＣＧ
ＴＧＣＧＡＣＡＡＡＧＡＡＡＡＡＴＧＧＧＡＴＴＣＡＡＧＡＴＧＴＴＣＣＴＧＡＡＧＣＡ
ＧＡＣＡＧＣＣＡＴＣＣＡＣＴＧＧＣＴＧＡＣＡＧＡＣＧＡＣＡＴＴＣＣＴＧＡＧＧＡＣ
ＡＴＧＧＡＣＡＴＴＧＴＧＣＣＡＧＡＴＣＴＧＣＡＡＣＣＴＧＴＧＣＣＣＡＧＣＡＣＣＴ
ＣＴＧＧＴＡＴＧＡＧＡＧＣＴＡＡＧＣＣＴＣＣＣＡＣＣＡＧＣＧＡＴＣＣＴＣＣＡＴＧ
ＴＡＧＡＣＴＧＡＧＣＡＴＧＧＡＣＡＴＧＣＧＧＡＡＧＣＡＣＡＣＣＣＴＧＣＡＧＧＣＣ
ＡＴＣＧＴＣＧＧＣＡＧＣＧＧＣＡＡＧＡＡＧＡＡＧＡＡＣＡＴＣＣＴＴＡＧＡＣＧＧＴ
ＧＣＡＧＧＧＴＧＴＧＣＡＧＣＧＴＧＣＡＣＡＡＧＣＴＧＣＧＧＡＧＣＧＡＧＡＣＴＣＧ
ＧＴＡＣＡＴＧＴＧＣＡＡＧＴＴＴＴＧＣＡＡＣＡＴＴＣＣＣＣＴＧＣＡＣＡＡＧＧＧＡ
ＧＣＣＴＧＣＴＴＣＧＡＧＡＡＧＴＡＣＣＡＣＡＣＣＣＴＧＡＡＧＡＡＴＴＡＣＴＡＧ（
配列番号２）

ＰＧＢＤ４アミノ酸配列（５８５個のアミノ酸）。（配列番号３）

50

【化８】

```
MSNPRKRSIP MRDSNTGLEQ LLAEDSFDES DFSEIDDSDN FSDSALEADK 50
IRPLSHLESD GKSSTSSDSG RSMKWSARAM IPRQRYDFTG TPGRKVDVSD 100
ITDPLQYFEL FFTEELVSKI TRETNAQAAL LASKPPGPKG FSRMDKWKDT 150
DNDELKVFFA VMLLQGIVQK PELEMFWSTR PLLDTPYLRQ IMTGERFLLL 200
FRCLHFVNNS SISAGQSKAQ ISLQKIKPVF DFLVNKFSTV YTPNRNIAVD 250
ESLMLFKGPL AMKQYLPTKR VRFGLKLYVL CESQSGYVWN ALVHTGPGMN 300
LKDSADGLKS SRIVLTLVND LLGQGYCVFL DNFNISPMLF RELHQNRTDA 350
VGTARLNRKQ IPNDLKKRIA KGTTVARFCG ELMALKWCDG KEVTMLSTFH 400
NDTVIEVNNR NGKKTKRPRV IVDYNENMGA VDSADQMLTS YPSERKRHKV 450
WYKKFFHHLL HITVLNSYIL FKKDNPEHTM SHINFRLALI ERMLEKHHKP 500
GQQHLRGRPC SDDVTPLRLS GRHFPKSIPA TSGKQNPTGR CKICCSQYDK 550
DGKKIRKETR YFCAECDVPL CVVPCFEIYH TKKNY                 585
```

ＰＧＢＤ４過剰活性変異体（Ｓ８Ｐ、Ｇ１７Ｒ、Ｋ１３４Ｋ）アミノ酸配列（５８５個のアミノ酸）。（配列番号４）

【化９】

```
MSNPRKRPIP MRDSNTRLEQ LLAEDSFDES DFSEIDDSDN FSDSALEADK 50
IRPLSHLESD GKSSTSSDSG RSMKWSARAM IPRQRYDFTG TPGRKVDVSD 100
ITDPLQYFEL FFTEELVSKI TRETNAQAAL LASKPPGPKG FSRMDKWKDT 150
DNDELKVFFA VMLLQGIVQK PELEMFWSTR PLLDTPYLRQ IMTGERFLLL 200
FRCLHFVNNS SISAGQSKAQ ISLQKIKPVF DFLVNKFSTV YTPNRNIAVD 250
ESLMLFKGPL AMKQYLPTKR VRFGLKLYVL CESQSGYVWN ALVHTGPGMN 300
LKDSADGLKS SRIVLTLVND LLGQGYCVFL DNFNISPMLF RELHQNRTDA 350
VGTARLNRKQ IPNDLKKRIA KGTTVARFCG ELMALKWCDG KEVTMLSTFH 400
NDTVIEVNNR NGKKTKRPRV IVDYNENMGA VDSADQMLTS YPSERKRHKV 450
WYKKFFHHLL HITVLNSYIL FKKDNPEHTM SHINFRLALI ERMLEKHHKP 500
GQQHLRGRPC SDDVTPLRLS GRHFPKSIPA TSGKQNPTGR CKICCSQYDK 550
DGKKIRKETR YFCAECDVPL CVVPCFEIYH TKKNY                 585
```

ＰＧＢＤ４過剰活性変異体（Ｓ８Ｐ、Ｇ１７Ｒ、Ｋ１３４Ｋ）ヌクレオチド配列（１７５８ｂｐ）。（配列番号５）

【化１０】

```
ATGTCAAATC CTAGAAAACG TCCCATTCCT ATGCGTGATA GTAATACCCG TCTCGAACAG     60
TTGTTGGCTG AAGATTCATT TGATGAATCT GATTTTTCGG AAATAGATGA TTCTGATAAT    120
TTTTCGGATA GTGCTTTAGA AGCCGATAAG ATCAGGCCTC TGTCCCATTT AGAATCTGAT    180
GGAAAGAGCT CTACATCAAG TGACTCAGGG CGCTCCATGA AATGGTCAGC TCGTGCTATG    240
ATTCCACGTC AAAGGTATGA CTTTACCGGC ACACCTGGCA GAAAAGTCGA TGTCAGTGAT    300
ATCACTGACC CATTGCAGTA TTTTGAACTG TTCTTTACTG AGGAATTAGT TTCAAAAATT    360
ACTAGAGAAA CAAATGCCCA AGCTGCCTTG TTGGCTTCAA AGCCACCGGG TCCGAAAGGA    420
TTTTCGCGAA TGGATAAATG GAAAGACACT GACAATGACG AGCTCAAAGT CTTTTTTGCA    480
GTAATGTTAC TGCAAGGTAT TGTGCAGAAA CCTGAGCTGG AGATGTTTTG GTCAACAAGG    540
CCTCTTTTGG ATACACCTTA TCTCAGGCAA ATTATGACTG GTGAAAGATT TTTACTTTTG    600
TTTCGGTGCC TGCATTTTGT CAACAATTCT TCTATATCTG CTGGTCAATC AAAGGCCCAG    660
ATTTCATTGC AGAAGATCAA ACCTGTGTTC GACTTTCTTG TAAATAAATT TTCCACTGTA    720
TATACTCCAA ACAGAAACAT TGCAGTTGAT GAATCACTGA TGCTGTTCAA GGGGCCATTA    780
GCTATGAAGC AGTACCTCCC GACAAAACGA GTACGATTTG GTCTGAAGCT ATATGTACTT    840
TGTGAAAGTC AGTCTGGTTA TGTGTGGAAT GCGCTTGTTC ACACAGGGCC TGGCATGAAT    900
TTGAAAGATT CAGCGGATGG CCTGAAATCA TCACGCATTG TTCTTACCTT GGTCAATGAC    960
CTTCTTGGCC AAGGGTATTG TGTCTTCCTC GATAACTTTA ATATATCTCC CATGCTTTTC   1020
AGAGAATTAC ATCAAAATAG GACTGATGCA GTTGGGACAG CTCGTTTGAA CAGAAAACAG   1080
ATTCCAAATG ATCTGAAAAA AAGGATTGCA AAGGGGACGA CTGTAGCCAG ATTCTGTGGT   1140
GAACTTATGG CACTGAAATG GTGTGACGGC AAGGAGGTGA CAATGTTGTC AACATTCCAC   1200
AATGATACTG TGATTGAAGT AAACAATAGA AATGGAAAGA AAACTAAAAG GCCACGTGTC   1260
ATTGTGGATT ATAACGAGAA TATGGGAGCA GTGGACTCGG CTGATCAAAT GCTTACTTCT   1320
TATCCATCTG AGCGCAAAAG ACACAAGGTT TGGTATAAGA AATTCTTTCA CCATCTTCTA   1380
CACATTACAG TGCTGAACTC CTACATCCTG TTCAAGAAGG ATAATCCTGA GCACACGATG   1440
AGCCATATAA ACTTCAGACT GGCATTGATT GAAAGAATGC TGGAAAAGCA TCACAAGCCA   1500
GGGCAGCAAC ATCTTCGAGG TCGTCCTTGC TCCGATGATG TCACACCTCT TCGTCTGTCT   1560
GGAAGACATT TCCCCAAGAG CATACCAGCA ACGTCCGGGA AACAGAATCC AACTGGTCGC   1620
TGCAAAATTT GCTGCTCCCA ATACGACAAG GATGGCAAGA AGATCCGGAA AGAAACGCGC   1680
TATTTTTGTG CCGAATGTGA TGTTCCGCTT TGTGTTGTTC CGTGCTTTGA AATTTACCAC   1740
ACGAAAAAAA ATTATTAA                                                 1758
```

ＰＧＢＤ１アミノ酸配列（８０９個のアミノ酸）。（配列番号６）

【化１１】

```
MYEALPGPAP ENEDGLVKVK EEDPTWEQVC NSQEGSSHTQ EICRLRFRHF CYQEAHGPQE      60
ALAQLRELCH QWLRPEMHTK EQIMELLVLE QFLTILPKEL QPCVKTYPLE SGEEAVTVLE     120
NLETGSGDTG QQASVYIQGQ DMHPMVAEYQ GVSLECQSLQ LLPGITTLKC EPPQRPQGNP     180
QEVSGPVPHG SAHLQEKNPR DKAVVPVFNP VRSQTLVKTE EETAQAVAAE KWSHLSLTRR     240
NLCGNSAQET VMSLSPMTEE IVTKDRLFKA KQETSEEMEQ SGEASGKPNR ECAPQIPCST     300
PIATERTVAH LNTLKDRHPG DLWARMHISS LEYAAGDITR KGRKKDKARV SELLQGLSFS     360
GDSDVEKDNE PEIQPAQKKL KVSCFPEKSW TKRDIKPNFP SWSALDSGLL NLKSEKLNPV     420
ELFELFFDDE TFNLIVNETN NYASQKNVSL EVTVQEMRCV FGVLLLSGFM RHPRREMYWE     480
VSDTDQNLVR DAIRRDRFEL IFSNLHFADN GHLDQKDKFT KLRPLIKQMN KNFLLYAPLE     540
EYYCFDKSMC ECFDSDQFLN GKPIRIGYKI WCGTTTQGYL VWFEPYQEES TMKVDEDPDL     600
GLGGNLVMNF ADVLLERGQY PYHLCFDSFF TSVKLLSALK KKGVRATGTI RENRTEKCPL     660
MNVEHMKKMK RGYFDFRIEE NNEIILCRWY GDGIISLCSN AVGIEPVNEV SCCDADNEEI     720
PQISQPSIVK VYDECKEGVA KMDQIISKYR VRIRSKKWYS ILVSYMIDVA MNNAWQLHRA     780
CNPGASLDPL DFRRFVAHFY LEHNAHLSD                                       809
```

ＰＧＢＤ２アミノ酸配列（５９２個のアミノ酸）。（配列番号７）

【化１２】

```
MASTSRDVIA GRGIHSKVKS AKLLEVLNAM EEEESNNNRE EIFIAPPDNA AGEFTDEDSG     60
DEDSQRGAHL PGSVLHASVL CEDSGTGEDN DDLELQPAKK RQKAVVKPQR IWTKRDIRPD    120
FGSWTASDPH IEDLKSQELS PVGLFELFFD EGTINFIVNE TNRYAWQKNV NLSLTAQELK    180
CVLGILILSG YISYPRRRMF WETSPDSHHH LVADAIRRDR FELIFSYLHF ADNNELDASD    240
RFAKVRPLII RMNCNFQKHA PLEEFYSFGE SMCEYFGHRG SKQLHRGKPV RLGYKIWCGT    300
TSRGYLVWFE PSQGTLFTKP DRSLDLGGSM VIKFVDALQE RGFLPYHIFF DKVFTSVKLM    360
SILRKKGVKA TGTVREYRTE RCPLKDPKEL KKMKRGSFDY KVDESEEIIV CRWHDSSVVN    420
ICSNAVGIEP VRLTSRHSGA AKTRTQVHQP SLVKLYQEKV GGVGRMDQNI AKYKVKIRGM    480
KWYSSFIGYV IDAALNNAWQ LHRICCQDAQ VDLLAFRRYI ACVYLESNAD TTSQGRRSRR    540
LETESRFDMI GHWIIHQDKR TRCALCHSQT NTRCEKCQKG VHAKCFREYH IR        592
```

10

ＰＧＢＤ３アミノ酸配列（５９３個のアミノ酸）。（配列番号８）

【化１３】

```
MPRTLSLHEI TDLLETDDSI EASAIVIQPP ENATAPVSDE ESGDEEGGTI NNLPGSLLHT     60
AAYLIQDGSD AESDSDDPSY APKDDSPDEV PSTFTVQQPP PSRRRKMTKI LCKWKKADLT    120
VQPVAGRVTA PPNDFFTVMR TPTEILELFL DDEVIELIVK YSNLYACSKG VHLGLTSSEF    180
KCFLGIIFLS GYVSVPRRRM FWEQRTDVHN VLVSAAMRRD RFETIFSNLH VADNANLDPV    240
DKFSKLRPLI SKLNERCMKF VPNETYFSFD EFMVPYFGRH GCKQFIRGKP IRFGYKFWCG    300
ATCLGYICWF QPYQGKNPNT KHEEYGVGAS LVLQFSEALT EAHPGQYHFV FNNFFTSIAL    360
LDKLSSMGHQ ATGTVRKDHI DRVPLESDVA LKKKERGTFD YRIDGKGNIV CRWNDNSVVT    420
VASSGAGIHP LCLVSRYSQK LKKKIQVQQP NMIKVYNQFM GGVDRADENI DKYRASIRGK    480
KWYSSPLLFC FELVLQNAWQ LHKTYDEKPV DFLEFRRRVV CHYLETHGHP PEPGQKGRPQ    540
KRNIDSRYDG INHVIVKQGK QTRCAECHKN TTFRCEKCDV ALHVKCSVEY HTE        593
```

20

ＰＧＢＤ５アミノ酸配列（５２４個のアミノ酸）。（配列番号９）

【化１４】

```
MAEGGGGARR RAPALLEAAR ARYESLHISD DVFGESGPDS GGNPFYSTSA ASRSSSAASS     60
DDEREPPGPP GAAPPPPRAP DAQEPEEDEA GAGWSAALRD RPPPRFEDTG GPTRKMPPSA    120
SAVDFFQLFV PDNVLKNMVV QTNMYAKKFQ ERFGSDGAWV EVTLTEMKAF LGYMISTSIS    180
HCESVLSIWS GGFYSNRSLA LVMSQARFEK ILKYFHVVAF RSSQTTHGLY KVQPFLDSLQ    240
NSFDSAFRPS QTQVLHEPLI DEDPVFIATC TERELRKRKK RKFSLWVRQC SSTGFIIQIY    300
VHLKEGGGPD GLDALKNKPQ LHSMVARSLC RNAAGKNYII FTGPSITSLT LFEEFEKQGI    360
YCCGLLRARK SDCTGLPLSM LTNPATPPAR GQYQIKMKGN MSLICWYNKG HFRFLTNAYS    420
PVQQGVIIKR KSGEIPCPLA VEAFAAHLSY ICRYDDKYSK YFISHKPNKT WQQVFWFAIS    480
IAINNAYILY KMSDAYHVKR YSRAQFGERL VRELLGLEDA SPTH              524
```

30

過剰活性変異を有するＭｙｏｔｉｓ　ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ（野生型）アミノ酸配列（Ｓ８Ｐ、Ｃ１３Ｒ、Ｎ１２５Ｋ）５７２個のアミノ酸。（配列番号１０）

【化１５】

```
MSQHSDYPDD EFRADKLSNY SCDSDLENAS TSDEDSSDDE VMVRPRTLRR RRISSSSSDS     60
ESDIEGGREE WSHVDNPPVL EDFLGHQGLN TDAVINNIED AVKLFIGDDF FEFLVEESNR    120
YYNQKRNNFK LSKKSLKWKD ITPQEMKKFL GLIVLMGQVR KDRRDDYWTT EPWTETPYFG    180
KTMTRDRFRQ IWKAWHFNNN ADIVNESDRL CKVRPVLDYF VPKFINIYKP HQQLSLDEGI    240
VPWRGRLFFR VYNAGKIVKY GILVRLLCES DTGYICNMEI YCGEGKRLLE TIQTVVSPYT    300
DSWYHIYMDN YYNSVANCEA LMKNKFRICG TIRKNRGIPK DFQTISLKKG ETKFIRKNDI    360
LLQVWQSKKP VYLISSIHSA EMEESQNIDR TSKKKIVKPN ALIDYNKHMK GVDRADQYLS    420
YYSILRRTVK WTKRLAMYMI NCALFNSYAV YKSVRQRKMG FKMFLKQTAI HWLTDDIPED    480
MDIVPDLQPV PSTSGMRAKP PTSDPPCRLS MDMRKHTLQA IVGSGKKKNI LRRCRVCSVH    540
KLRSETRYMC KFCNIPLHKG ACFEKYHTLK NY                   572
```

過剰活性変異を有するＭｙｏｔｉｓ　ｌｕｃｉｆｕｇｕｓの補正されたアミノ酸配列（Ｓ８Ｐ、Ｃ１３Ｒ）５７１個のアミノ酸。（配列番号１１）

ＭＡＱＨＳＤＹＰＤＤＥＦＲＡＤＫＬＳＮＹＳＣＤＳＤＬＥＮＡＳＴＳＤＥＤＳＳＤＤＥ
ＶＭＶＲＰＲＴＬＲＲＲＲＩＳＳＳＳＳＤＳＥＳＤＩＥＧＧＲＥＥＷＳＨＶＤＮＰＰＶＬ
ＥＤＦＬＧＨＱＧＬＮＴＤＡＶＩＮＮＩＥＤＡＶＫＬＦＩＧＤＤＦＦＥＦＬＶＥＥＳＮＲ
ＹＹＮＱＮＲＮＮＦＫＬＳＫＫＳＬＫＷＫＤＩＴＰＱＥＭＫＫＦＬＧＬＩＶＬＭＧＱＶＲ
ＫＤＲＲＤＤＹＷＴＴＥＰＷＴＥＴＰＹＦＧＫＴＭＴＲＤＲＦＲＱＩＷＫＡＷＨＦＮＮＮ

50

ＡＤＩＶＮＥＳＤＲＬＣＫＶＲＰＶＬＤＹＦＶＰＫＦＩＮＩＹＫＰＨＱＱＬＳＬＤＥＧＩ
ＶＰＷＲＧＲＬＦＦＲＶＹＮＡＧＫＩＶＫＹＧＩＬＶＲＬＬＣＥＳＤＴＧＹＩＣＮＭＥＩ
ＹＣＧＥＧＫＲＬＬＥＴＩＱＴＶＶＳＰＹＴＤＳＷＹＨＩＹＭＤＮＹＹＮＳＶＡＮＣＥＡ
ＬＭＫＮＫＦＲＩＣＧＴＩＲＫＮＲＧＩＰＫＤＦＱＴＩＳＬＫＫＧＥＴＫＦＩＲＫＮＤＩ
ＬＬＱＶＷＱＳＫＫＰＶＹＬＩＳＳＩＨＳＡＥＭＥＥＳＱＮＩＤＲＴＳＫＫＫＩＶＫＰＮ
ＡＬＩＤＹＮＫＨＭＫＧＶＤＲＡＤＱＹＬＳＹＹＳＩＬＲＲＴＶＫＷＴＫＲＬＡＭＹＭＩ
ＮＣＡＬＦＮＳＹＡＶＹＫＳＶＲＱＲＫＭＧＦＫＭＦＬＫＱＴＡＩＨＷＬＴＤＤＩＰＥＤ
ＭＤＩＶＰＤＬＱＰＶＰＳＴＳＧＭＲＡＫＰＰＴＳＤＰＰＣＲＬＳＭＤＭＲＫＨＴＬＱＡ
ＩＶＧＳＧＫＫＫＮＩＬＲＲＣＲＶＣＳＶＨＫＬＲＳＥＴＲＹＭＣＫＦＣＮＩＰＬＨＫＧ
ＡＣＦＥＫＹＨＴＬＫＮＹ

Ｐｔｅｒｏｐｕｓ　ｖａｍｐｙｒｕｓ左末端配列

配列３８１ｂｐ。（配列番号１２）

【化１６】

```
TTAACCCATT TCCTGTTTGC CCCGAGAATA CTCACCAGCG GCACTTGCAG CTGCAGCGTT    60
TACCCCGAGA TAACTCGTCG ATTACAGTCC TAACCTTACC CCCAAAGTTT GCCATGAAAT    120
ATCTCGCTTT TATTATTATT TTCGCATCGC TCTAGTATAT CGATAGTCTT TGGAAACAAA    180
TGACATCATT CTATTTACAG CATTCTGTTT TTAGTAGTGG TATTTCCATT TACAAAATAT    240
AGTAATTTTC TATCGCTGAA AATGTCAAAT CCTAGAAAAC GTAGCATTCC TACATGTGAT    300
GTTAACTTCG TTCTCGAACA GTTGTTAGCC GAAGATTCAT TTGATGAATC CGATTTTTCC    360
GAAATAGACG ATTCTGATGA T                                  381
```

ＰＧＢＤ４左末端ヌクレオチド配列

配列３７３ｂｐ。（配列番号１３）

【化１７】

```
TTAACTCATT TCTCCTTAGC CCCGAGATTA CGCGCTGCTG TGCCTGCGAC TGCAGCGTTT    60
ACGCCGAGAT AACTCGTGGA TTACAGTGCC AACCTTACTC CCAAAGTTTG CCACGAAATA    120
TCTCGCTTCT GTTATTTTCG CATGGTTCTG GTATATTGAC TTTTGAAACA AAAGACATCA    180
TTCTGTTTAT AGCATTCTGT TTTTAGTAGT GGGATTTCCA TCTACAAAAT ATAGTAATTC    240
TCGATCGCTG AAATGTCAAA TCCTAGAAAA CGTAGCATTC CTATGCGTGA TAGTAATACC    300
GGTCTCGAAC AGTTGTTGGC TGAAGATTCA TTTGATGAAT CTGATTTTTC GGAAATAGAT    360
GATTCTGATA ATT                                   373
```

ＭＥＲ７５左末端ヌクレオチド配列

配列３４４ｂｐ。（配列番号１４）

【化１８】

```
TTAACCCTTT TCCCGTTTGC CCCGAGAATA CTCGCCGGCG GCGCTTGCGG CTGCAGCGTT    60
TACCCCGAGA TAACTTTGCC ACGAAATATC TCGCTTTTAT TATTATTTTC GCATCGCTCT    120
AGTATATCGA CTTTGGAAAC AAAAGACATC ATTCTATTTA TAGCATTCTG TTTTTAGTAG    180
TGGTATTTCC ATTTACAAAA TATAGTAATT CTCGATCGCT GAAAATGTCA AATCCTAGAA    240
AACGTAGCAT TCCTACGCGT GATGTTAACA TCGTTCTCGA ACAGTTGTTG GCCGAAGATT    300
CATTTGATGA ATCCGATTTT TCCGAAATAG ACGATTCTGA TGAT             344
```

ＭＥＲ７５Ｂ左末端ヌクレオチド配列

配列９１ｂｐ。（配列番号１５）

【化１９】

```
TTAACCCATT TCCCGTTTGC CCCGAGAATA CTCTTGTCTC TAATCCTAAT GTAACATCAT    60
ATACATTTCT GTTACATTAG GATTAGAGAC A                       91
```

ＭＥＲ７５Ａ左末端ヌクレオチド配列

配列３２ｂｐ。（配列番号１６）

ＴＴＡＡＣＣＣＡＴＴ　ＴＣＣＣＧＴＴＴＧＣ　ＣＣＣＧＡＧＡＡＴＡ　ＣＴ　　３２

Ｐｔｅｒｏｐｕｓ　ｖａｍｐｙｒｕｓ右末端配列

配列１７１ｂｐ。（配列番号１７）

【化２０】

```
TAGGATTAGA GACAAGTTCT GTTTAGAAAT AACTCCAAGA ACAGTTTTTA TATTTTATTT    60
TCACATTGAA AACCAGTCAG ATTTGCTTCA GCCTCAAAGA GCATGTTTAT GTAAAATTAA    120
ATTAACGCTG GCAGCGAGCT GCACTTTTTT TCTAAACGGG AAATGGGTTA A        171
```

ＰＧＢＤ４右末端ヌクレオチド配列
配列１７６ｂｐ。（配列番号１８）
【化２１】

```
CCTGGGATTA TAGGCATGAG CCACTGCGCC TAGCACCAAG AACAGTTTTT ATATTTTATT    60
TTCACATTGA AAATCAGTCA GATTTGCTTC AGCCTCAAAG AGGGTGTTTA TGTAAAACTA    120
AATGAGTGCA GGCAGCGAGC TACACTTTTT TTTTTCCTAA ATGGAAAATG GGTTAA      176
```

ＭＥＲ７５右末端ヌクレオチド配列
配列１７８ｂｐ。（配列番号１９）
【化２２】

```
TCAGACGATT CTGATGTTAG TTCTGTTTAG AAATAACTCC AAGAACAGTT TTTATATTTT    60
ATTTTCACAT TGAAAATCAG TCAGATTTGC TTCAGCCTCA AAGAGCGTGT TTATGTAAAA    120
TTAAATGAGC GCTGGCAGCG AGCTGCACTT TTTTTTTTCT AAACGGGAAA AGGGTTAA     178
```

ＭＥＲ７５Ｂ右末端ヌクレオチド配列
配列１６０ｂｐ。（配列番号２０）
【化２３】

```
AGTTCTGTTT AGAAATAACT CCAAGAACAG TTTTTATATT TTATTTTCAC ATTGAAAATC    60
AGTCAGATTT GCTTCAGCCT CAAAGAGCGT GTTTATGTAA AATTAAATGA GCGCTGGCAG    120
CGAGCTGCAC TTTTTTTTTT CTAAACGGGA AAAGGGTTAA               160
```

ＭＥＲ７５Ａ右末端ヌクレオチド配列
配列４６ｂｐ。（配列番号４４１）
【化２４】

```
 CGCTGGCAGC GAGCTGCACT TTTTTTCTAA ACGGGAAATG GGTTAA             46
```

伸長されたＰｔｅｒｏｐｕｓ　ｖａｍｐｙｒｕｓヌクレオチド配列＊２２１０ＢＰ（配列番号４２９）

【化２５】

```
CCCATTTCCT GTTTGCCCCG AGAATACTCA CCAGCGGCAC TTGCAGCTGC AGCGTTTACC     60
CCGAGATAAC TCGYCGATTA CAGTCCTAAC CTTACCCCCA AAGTTTGCCA TGAAATATCT    120
CGCTTTTATT ATTATTTTCG CATCGCTCTA GTATATCGAT AGTCTTTGGA AACAAATGAC    180
ATCATTNTAT TTACAGCATT CTGTTTTTAN TAGTGGTATT TCCATTTACA AAATATAGTA    240
ATTTTCTATC GCTGAAAATG TCAAATCCTA GAAAACGTAG CATTCCTACA TGTGATGTTA    300
ACTTCGTTCT CGAACAGTTG TTAGCCGAAG ATTCATTTGA TGAATCCGAT TTTTCCGAAA    360
TAGACGATTC TGATGATTTT TCGGATAGTG CTTCGGAAGA CTATACGGTC AGGCCTCCGT    420
CCGATTCGGA ATCTGATGGA AATAGCCCTA CATCAGCTGA CTCGGGTCGC GCTCTGAAAT    480
GGTCAACTCG TGTTATGATT CCACGTCAAA GGTATGACTT TACCGGCACA CCTGGCAGAA    540
AAGTTGATGT CAGTGATACC ACTGACCCAC TGCAGTATTT TGAACTGTTC TTTACTGAGG    600
AATTAGTTTC AAAAATTACC AGTGAAATGA ATGCCCAAGC TGCCTTGTTG GCTTCAAAGC    660
CACCTGGTCC GAAAGGATTT TCGCGAATGG ATAAATGGAA AGACACTGAC AATGATGAAC    720
TGAAAGTCTT TTTTGCAGTA ATGTTACTGC AAGGTATTGT GCAGAAACCT GAGCTGGAGA    780
TGTTTTGGTC GACAAGGCCT CTTTTGGATA TACCTTATCT CAGGCAAATT ATGACTGGTG    840
AAAGATTTTT ACTTTTGCTT CGGTGCCTGC ATTTTGTCAA CAATTCTTCC ATATCCGCTG    900
GTCAATCAAA GGCCCAGATT TCATTGCAGA AGATCAAACC TGTGTTCGAC TTTCTTGTAA    960
ATAAGTTTTC AACTGTATAT ACTCCAAACA GAAACATTGC AGTCGATGAA TCACTGATGC   1020
TGTTCAAGGG GCGGTTAGCT ATGAAGCAGT ACATCCCGAC GAAATGtGCA CGATTTGGTC   1080
TCAAGCTNTA TGTACTTTGT GAAAGTCAAT CTGGTTACGT GTGGAATGCG CTTGTTCACA   1140
CAGGGCCCAG TATGAATTTG AAAGATTCAG CTGATGGTCT GAAATCGTCA TGCATTGTTC   1200
TTACCTTGGT CAATGACCTT CTTGGCCAAG GATATTGTGT CTTCCTCAAT AACTTTTATA   1260
CATCTCCCAT GCTTTTCAGA GAATTACATC AAAACAGGAC TGATGCAGTT GGGACAGCTC   1320
GTTTGAACAG AAAACAGATG CCAAATGATC TGAAAAAAAG GATTGCAAAG GGGACGACTG   1380
TAGCCAGATT CTGTGGTGAA CTTATGGCAC TGAAATGGTG TGACAAGAAG GAGGTGACAA   1440
TGTTGTCAAC ATTCCACAAT GATACTGTGA TTGAAGTAGA CAACAGAAAT GGAAAGAAAA   1500
CTAAGAAGCC ATGTGTCATT GTGGATTATA ACGAGAATAT GGGAGCAGTG GACTCGGCTG   1560
ATCAGATGCT CACTTCTTAT CCAACTGAGC GCAAAAGGCA CAAGTTTTGG TATAAGAAAT   1620
TCTTTCGCCA CCTTCTAAAC ATTACAGTGC TGAACTCCTA CATCCTGTTC AAGAAGGACA   1680
ATCCTGAGCA CACGATCAGC CATGTAAACT TCAGACTGAC GTTGATTGAA AGAATGCTGG   1740
AAAAGCATCA CAAGCCAGGG CAGCAACGTC TTCGAGGTCG TCCGTGCTCT GATGATGTCA   1800
CACCTCTTCG CCTGTCTGGA AGACATTTCC CCAAGAGCAT ACCACCAACA TCAGGGAAAC   1860
AGAATCCAAC TGGTCGCTGC AAAGTTTGCT GCTCGCACGA CAAGGATGGC AAGAAGATCC   1920
GGAGAGAAAC GTtATATTTT TGTGCGGAAT GTGATGTTCC GCTTTGTGTT GTTCCGTGCT   1980
TTGAAATTTA CCACACGAAA AAAAATTATT AAATACTGAT CATCATATAC ATTTCTGTTA   2040
CATTAGGATT AGAGACAAGT TCTGTTTAGA AATAACTCCA AGAACAGTTT TTATATTTTA   2100
TTTTCACATT GAAAACCAGT CAGATTTGCT TCAGCCTCAA AGAGCATGTT TATGTAAAAT   2160
TAAATTAACG CTGGCAGCGA GCTGCACTTN TTTTCTAAAC GGGAAATGGG          2210
```

伸長されたＰｔｅｒｏｐｕｓ　ｖａｍｐｙｒｕｓアミノ酸配列　５８４個のアミノ酸。（配列番号４３０）

【化２６】

```
MSNPRKRSIP TCDVNFVLEQ LLAEDSFDES DFSEIDDSDD FSDSASEDYT VRPPSDSESD     60
GNSPTSADSG RALKWSTRVM IPRQRYDFTG TPGRKVDVSD TTDPLQYFEL FFTEELVSKI    120
TSEMNAQAAL LASKPPGPKG FSRMDKWKDT DNDELKVFFA VMLLQGIVQK PELEMFWSTR    180
PLLDIPYLRQ IMTGERFLLL LRCLHFVNNS SISAGQSKAQ ISLQKIKPVF DFLVNKFSTV    240
YTPNRNIAVD ESLMLFKGRL AMKQYIPTKC ARFGLKLYVL CESQSGYVWN ALVHTGPSMN    300
LKDSADGLKS SCIVLTLVND LLGQGYCVFL NNFYTSPMLF RELHQNRTDA VGTARLNRKQ    360
MPNDLKKRIA KGTTVARFCG ELMALKWCDK KEVTMLSTFH NDTVIEVDNR NGKKTKKPCV    420
IVDYNENMGA VDSADQMLTS YPTERKRHKF WYKKFFRHLL NITVLNSYIL FKKDNPEHTI    480
SHVNFRLTLI ERMLEKHHKP GQQRLRGRPC SDDVTPLRLS GRHFPKSIPP TSGKQNPTGR    540
CKVCCSHDKD GKKIRRETLY FCAECDVPLC VVPCFEIYHT KKNY
```

ＭＬＴ左末端（５’から３’へ）は、以下の通りである

ＴＴＡＡＣＡＣＴＴＧＧＡＴＴＧＣＧＧＧＡＡＡＣＧＡＧＴＴＡＡＧＴＣＧＧＣＴＣＧＣＧＴＧＡＡＴＴＧＣＧＣＧＴＡＣＴＣＣＧＣＧＧＧＡＧＣＣＧＴＣＴＴＡＡＣＴＣＧＧＴＴＣＡＴＡＴＡＧＡＴＴＴＧＣＧＧＴＧＧＡＧＴＧＣＧＧＧＧＡＡＡＣＧＴＧＴＡＡＡＣＴＣＧＧＧＣＣＧＡＴＴＧＴＡＡＣＴＧＣＧＴＡＴＴＡＣＣＡＡＡＴＡＴＴＴＧＴＴ（配列番号４３１）

ＭＬＴ右末端（５’から３’へ）は、以下の通りである
ＡＡＴＴＡＴＴＴＡＴＧＴＡＣＴＧＡＡＴＡＧＡＴＡＡＡＡＡＡＡＴＧＴＣＴＧＴＧＡＴ
ＴＧＡＡＴＡＡＡＴＴＴＴＣＡＴＴＴＴＴＴＡＣＡＣＡＡＧＡＡＡＣＣＧＡＡＡＡＴＴＴ
ＣＡＴＴＴＣＡＡＴＣＧＡＡＣＣＣＡＴＡＣＴＴＣＡＡＡＡＧＡＴＡＴＡＧＧＣＡＴＴＴ
ＴＡＡＡＣＴＡＡＣＴＣＴＧＡＴＴＴＴＧＣＧＣＧＧＧＡＡＡＣＣＴＡＡＡＴＡＡＴＴＧ
ＣＣＣＧＣＧＣＣＡＴＣＴＴＡＴＡＴＴＴＴＧＧＣＧＧＧＡＡＡＴＴＣＡＣＣＣＧＡＣＡ
ＣＣＧＴＧＧＴＧＴＴＡＡ（配列番号４３２）
Ｔｒｉｃｈｎｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ
【化２７】

```
  1 MGSSLDDEHI LSALLQSDDE LVGEDSDSEI SDHVSEDDVQ SDTEEAFIDE VHEVQPTSSG
 61 SEILDEQNVI EQPGSSLASN KILTLPQRTI RGKNKHCWST SKSTRRSRVS ALNIVRSQRG
121 PTRMCRNIYD PLLCFKLFFT DEIISEIVKW TNAEISLKRR ESMTGATFRD TNEDEIYAFF
181 GILVMTAVRK DNHMSTDDLF DRSLSMVYVS VMSRDRFDFL IRCLRMDDKS IRPTLRENDV
241 FTPVRKIWDL FIHQCIQNYT PGAHLTIDEQ LLGFRGRCPF RMYIPNKPSK YGIKILMMCD
301 SGTKYMINGM PYLGRGTQTN GVPLGEYYVK ELSKPVRGSC RNITCDNWFT SIPLAKNLLQ
361 EPYKLTIVGT VRSNKREIPE VLKNSRSRPV GTSMFCFDGP LTLVSYKPKP AKMVYLLSSC
421 DEDASINEST GKPQMVMYYN QTKGGVDTLD QMCSVMTCSR KTNRWPMALL YGMINIACIN
481 SFIIYSHNVS SKGEKVQSRK KFMRNLYMSL TSSFMRKRLE APTLKRYLRD NISNILPNEV
541 PGTSDDSTEE PVTKKRTYCT YCPSKIRRKA NASCKKCKKV ICREHNIDMC QSCF
```

（配列番号４３３）
Ｐｔｅｒｏｐｕｓ　ｖａｍｐｙｒｕｓ
【化２８】

```
  1 MSNPRKRSIP TCDVNFVLEQ LLAEDSFDES DFSEIDDSDD FSDSASEDYT VRPPSDSESD
 61 GNSPTSADSG RALKWSTRVM IPRQRYDFTG TPGRKVDVSD TTDPLQYFEL FFTEELVSKI
121 TSEMNAQAAL LASKPPGPKG FSRMDKWKDT DNDELKVFFA VMLLQGIVQK PELEMFWSTR
181 PLLDIPYLRQ IMTGERFLLL LRCLHFVNNS SISAGQSKAQ ISLQKIKPVF DFLVNKFSTV
241 YTPNRNIAVD ESLMLFKGRL AMKQYIPTKM NLKDSADGLK (配列番号434)
```

Ｍｙｏｔｉｓ　ｍｙｏｔｉｓ（「２ａ」）
【化２９】

```
  1 MDLRCQHTVL SIRESRGLLP NLKMKTSRMK KGDIIFSRKG DILLLAWKDK RVVRMISIHD
 61 TSVSTTGKKN RKTGENIVKP ACIKEYNAHM KGVDRADQFL SCCSILRKMM KWTKKVVLYL
121 INCGLFNSFR VYNVLNPQAK MKYKQFLLSV ARDWIMDDNN EGSPEPETNL SSPSPGGARR
181 APRKDPPKRL SGDMKQHEPT CIPASGKKKF PTRACRVCAH GKRSESRYLC KFCLVPLHRG
241 KCFTQYHTLK KY (配列番号435)
```

Ｍｙｏｔｉｓ　ｍｙｏｔｉｓ（「１」）
【化３０】

```
  1 MKAFLGVILN MGVLNHPNLQ SYWSMDFESH IPFFRSVFKR ERFLQIFWML HLKNDQKSSK
 61 DLRTRTEKVN CFLSYLEMKF RERFCPGREI AVDEAVVGFK GKIHFITYNP KKPTKWGIRL
121 YVLSDSKCGY VHSFVPYYGG ITSETLVRPD LPFTSRIVLE LHERLKNSVP GSQGYHFFTD
181 RYYTSVTLAK ELFKEKTHLT GTIMPNRKDN PPVIKHQKLK KGEIVAFRDE NVMLLAWKDK
241 RIVTLSTWDS ETESVERRVG GGKEIVLKPK VVTNYTKFMG GVDIADYTST YCFMRKTLKW
301 WRTLFFWGLE VSVVNSYILY KECQKRKNEK PITHVKFIRK LVHDLVGEFR DGTLTSRGRL
361 LSTNLEQRLD GKLHIITPHP NKKHKDCVVC SNRKIKGGRR ETIYICETCE CKPGLHVGEC
421 FKKYHTMKNY RD (配列番号436)
```

Ｍｙｏｔｉｓ　ｌｕｃｉｆｕｇｕｓ（「２」）

【化３１】

```
  1 MPSLRKRKET NETDTLPEVF NDNLSDIPSE IEDADDCFDD SGDDSTDSTD SEIIRPVRKR
 61 KVAVLSSDSD TDEATDNCWS EIDTPPRLQM FEGHAGVTTF PSQCDSVPSV TNLFFGDELF
121 EMLCKELSNY HDQTAMKRKT PSRTLKWSPV TQKDIKKFLG LIILMGQTRK DSLKDYWSTD
181 PLICTPIFPQ TMSRHRFEQI WTFWHFNDNA KMDSRSGRLF KIQPVLDYFL HKFRTIYKPK
241 QQLSLDEGMI PWRGRFKFRT YNPAKITKYG LLVRMVCESD TGYICSMEIY TAEGRKLQET
301 VLSVLGPYLG IWHHIYQDNY YNATSTAELL LQNKTRVCGT IRESRGLPPN LEMKTSRMKK
361 GDIIFSRKGD ILLLAWKDKR VVRMISTIHD TSVSTTGKKN RKTGENIVKP TCIKEYNAHM
421 KGVDRADQFL SCCSILRKTM KWTKKVVLYL INCGLFNSFR VYNVLNPQAK MKYKQFLLSV
481 ARDWITDDNN EGSPEPETNL SSPSPGGARR APRKDPPKRL SGDMKQHEPT CIPASGKKKF
541 PTRACRVCAA HGKRSESRYL CKFCLVPLHR GKCFTQYHTL KKYMDLRCQH TVLSTVGRGY
601 SVLARFKPRT NERTGSSHCH VQVPAGGQGP PSTIIANGCG CKLEPMVRTR SPTCLVIEFG
661 CM (配列番号437)
```

Ｍｙｏｔｉｓ　ｍｙｏｔｉｓ（「２」）

【化３２】

```
  1 MPSLRKRKET NETDTLPEVF NDNLSDIPSE IEDADDCFDD SGDDSTDSTE SEIIRPVRKR
 61 KVAVLSSDSN TDEATDNCWS EIDTPPRLQM FEGHAGVTTF PSQCDSVPSV TNLFFGDELF
121 EMLCKELSNY HDQTAMKRKT PSRTLKWSPV TQKDIKKFLG LIILMGQTRK DSWKDYWSTD
181 PLICTPIFPQ TMSRHRFEQI WTFWHFNDNA KMDSCSGRLF KIQPVLDYFL HKFRTIYKPK
241 QQLSLDEGMI PWRGRLKFTY NPAITKYGLL VRMVCESDTG YICNMEIYTA ERKKLQETVL
301 SVLGPYLGIW HHIYQDNYYN ATSTAELLLQ NKTRVCGTIR ESRGLPPNLK MKTSRMKKGD
361 IIFSRKGDIL LLAWKDKRVV RMISTIHDTS VSTTGKKNRK TGENIVKPTC IKEYNAHMKG
421 VDRADQFLSC CSILRKTTKW TKKVVLYLIN CGLFNSFRVY NILNPQAKMK YKQFLLSVAR
481 DWITDDNNEG SPEPETNLSS PSSGGARRAP RKDQPKRLSG DMKQHEPTCI PASGKKKFPT
541 ACRVCAAHGK RSESRYLRKF CFVPLRGKCF MYHTLKKYSE LFSLIVVSKI QNVIIYKTTK
601 VYMRYVMRSH CPLSFLVFAP SVKDRSRVFS FFTRHLLWTL DVNTLSCPHR MKRSHWWKPC
661 RSIYEKLYNC TNP (配列番号438)
```

Ｍｙｏｔｉｓ　ｍｙｏｔｉｓ（「２ｂ」）

【化３３】

```
  1 MDLRCQHTVL SIRESRGLPP NLKMKTSRMK KGDIIFSRKG DILLLAWKDK RVVRMISTIH
 61 DTSVSTTGKK NRKTGENIVK PACIKEYNAH MKGVDRADQF LSCCSILRKT MKWTKKVVLY
121 LINCGLFNSF RVYNVLNPQA KMKYKQFLLS VARDWITDDN NEGSPEPETN LSSPSPGGAR
181 RAPRKDPPKR LSGDMKQHEP TCIPASGKKK FPTRACRVCA AHGKRSESRY LCKFCLVPLH
241 RGKCFTQYHT LKKY (配列番号439)
```

ＴＴＡＡ（配列番号４４０）

【０３３１】

本発明は、以下の非限定的な実施例によりさらに例解される。

【実施例】

【０３３２】

以下、実施例を参照して、本開示はさらに詳細に記載される。これらの実施例は、例解目的に過ぎず、本発明の範囲を限定するように解釈されるべきではない。加えて、本発明の技術的範囲から逸脱することなく、様々な修正及び変形を行うことができる。

【０３３３】

実施例１：ＣＡＲ免疫細胞の生成

図１Ａ～Ｄ及び図２は、ＣＡＲ免疫（例えば、ＣＡＲ－Ｔ）細胞を産生するプロセスの概略図を描示する。

【０３３４】

例解的な方法では、サンプル（例えば、血液）を患者（ドナー）から得、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、例えば、白血球搬出を介して分離し、血液の残りを、任意選択的に患者に戻す（１日未満）。ＰＢＭＣを洗浄し、例えば、膜分離の遠心分離を使用して濃縮する（１日未満）。細胞はこの時点でも選別することができる。本酵素（例えば、配列番号

２の酵素、またはそのバリアント）及び本ドナーＤＮＡを、例えば、電気穿孔法、ヌクレオフェクション、または流体力学によってドナー細胞に導入する。細胞を洗浄し、注入緩衝液に製剤化し（１日）、次いで、さらなる拡大を必要とせずに患者に注入する。

【０３３５】

例解的な方法では、３×１０^{9}個のＰＢＭＣを処理することは、７０ｋｇの患者について、２．１×１０^{6}個のＣＡＲ免疫細胞／ｋｇに相当する、１．５×１０^{8}個のＣＡＲ免疫細胞を生成する。例解的な方法では、産生時間は、およそ１～２日である。

【０３３６】

ＣＡＡＲ－Ｔ細胞を作製するための例解的なプロセスを図３に示す。

【０３３７】

実施例２：ドナーＤＮＡ及びＭＬＴトランスポザーゼ酵素によるヒト一次Ｔ細胞の操作

図４、図５Ａ～Ｂ、図６Ａ～Ｃ、図７Ａ～Ｃ、及び図８Ａ～Ｂについての方法。

【０３３８】

末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、標準的なフィコール勾配精製法を使用して、健康なドナー（ＨｅｍａＣａｒｅ）から得られたＬｅｕｋｏｐａｋｓから精製された。活性化Ｔ細胞を生成するために、ＰＢＭＣ細胞を、５％のヒトＡＢ血清（Ｖａｌｌｅｙ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ、カタログ番号ＨＰ１０２２ＨＩ）及び１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９７－７４８）、ならびに５０ｎｇ／ｍＬの可溶性抗ＣＤ３（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９３－３８７）及び抗ＣＤ２８抗体（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９３－３７５）を補充したＴｅｘＭＡＣＳ培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９７－１９６）中で、３７℃で３日間増殖させた。活性化後、Ｔ細胞を収集し、製造元のプロトコルに従ってＬｏｎｚａの４Ｄ－ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒデバイスを使用して電気穿孔した。簡潔に述べると、１０^{6}個の活性化Ｔ細胞を、２μｇのドナーＤＮＡ及び３μｇのＭＬＴトランスポザーゼヘルパーｍＲＮＡを有する１６ｗストリップ（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号Ｖ４ＸＰ－３０３２）を使用して電気穿孔した。対照として、細胞を、電気穿孔しなかったか、またはドナーＤＮＡのみで電気穿孔した。電気穿孔後、細胞を、５％のヒトＡＢ血清及び１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充したＴｅｘＭＡＣＳ培地中で培養に戻し、４日間回復させた。培養の７日目（電気穿孔後４日目）に、細胞をＴｒａｎｓＡｃｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－１１１－１６０）で再刺激し、２４ｗ　Ｇ－Ｒｅｘ（ＷｉｌｓｏｎＷｏｌｆ、カタログ番号８０１９２Ｍ）でさらに７日間拡大させた。細胞生存率及び導入遺伝子発現を、ＣｙｔｏＦＬＥＸフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ）を使用してフローサイトメトリーにより評価した。

【０３３９】

言及された場合、統合効率は以下のように計算した。［（Ｄ１４でのサンプルのＧＦＰ発現％）－（Ｄ１４でのドナーのみのＧＦＰ発現％）／（ＥＰ後Ｄ１でのサンプルのＧＦＰ発現％）］×１００。

【０３４０】

実施例３：ＭＬＴトランスポザーゼを使用するヒト一次Ｔ細胞の有効な操作のための異なるドナーＤＮＡ設計の評価

ＣＡＧプロモーター（ＣＡＧ－ＧＦＰドナー）によってその発現が駆動された、レポーター遺伝子ＧＦＰをコードするドナーＤＮＡの３つの異なるバージョン：標準的なプラスミドＤＮＡ（ＶｅｃｔｏｒＢｕｉｌｄｅｒ）、ナノプラスミド（Ｎａｔｕｒｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、ＮＴＣ）、及びドギーボーン（ｄｏｇｇｙｂｏｎｅ）（Ｔｏｕｃｈｌｉｇｈｔ）を評価した。活性化Ｔ細胞を上記のように操作し、細胞生存率及びＧＦＰ導入遺伝子発現を、電気穿孔の２４時間後及び培養終了時にフローサイトメトリーによって決定した。電気穿孔による一次活性化Ｔ細胞への環状ＣＡＧ－ＧＦＰプラスミドまたはナノプラスミドの送達は、ドナーのみまたはドナー及びヘルパーｍＲＮＡでトランスフェクトされたサンプルにおける電気穿孔の２４時間後での高いＧＦＰ発現（６０％超のＧＦＰ陽性細胞）によって示されるように、非常に効率的であった（図５Ａ

～Ｂ）。注目すべきことに、線状ｄｓＤＮＡ（ドギーボーン）の電気穿孔効率は、プラスミドまたはナノプラスミドのものよりも低かった（ｄｂＤＮＡに対する３５～４０％のＧＦＰ発現、図５Ａ～Ｂ）。ＭＬＴトランスポザーゼ酵素の不在下では、Ｔ細胞のゲノムへのドナーＤＮＡの安定な統合が存在せず、ＧＦＰの発現は、Ｔ細胞が経時的に分裂するにつれて希釈されるエピソームＤＮＡ分子に由来するため、Ｔ細胞の拡大時には、ドナーのみでトランスフェクトされたサンプルにおいてＧＦＰの発現が失われた。ドナー及びヘルパーでトランスフェクトされたサンプルは、経時的に持続したＧＦＰ発現を示し、ナノプラスミドドナーは、Ｄ１４で最高レベルの発現を示した（４０％超のＧＦＰ陽性、図５Ａ～Ｂ）。この結果と一致して、ＣＡＧ－ＧＦＰナノプラスミドドナーは、標準的なプラスミドまたはｄｂＤＮＡ（２０％未満）と比較して最高の統合効率（およそ５０％）をもたらした（図５Ａ～Ｂ）。注目すべきことに、培養のＤ１４で、全てのサンプルが高い生存率を示した（９０％超、図５Ａ～Ｂ）。

【０３４１】

実施例４：ヒト一次Ｔ細胞の有効な操作のための異なるＭＬＴトランスポザーゼヘルパーｍＲＮＡ設計の評価

ＭＬＴトランスポザーゼを使用してＴ細胞を操作するための有効なｍＲＮＡ設計を決定するために、異なるＣＡＰ、ヌクレオチド修飾、及びポリ（Ａ）テール長を含有する７つの異なるＭＬＴトランスポザーゼコードｍＲＮＡを評価した（表６）。ＣＡＧ－ＧＦＰナノプラスミドドナーＤＮＡ及び７つの異なるＭＬＴトランスポザーゼコードｍＲＮＡの各々との活性化Ｔ細胞のヌクレオフェクションは、電気穿孔の２４時間後で高いＧＦＰ発現（６０％超）をもたらし、異なるｍＲＮＡ設計またはドナーのみの対照サンプル間に有意差はなかった（データは示さず）。しかしながら、培養のＤ１４でのＧＦＰ発現及び統合効率は、未修飾または５－メトキシ－Ｕ修飾ヌクレオチドのいずれかで、ワクチニアキャップＭＬＴトランスポザーゼｍＲＮＡ及びクリーンキャップＭＬＴトランスポザーゼｍＲＮＡについて有意により低かった。重要なことに、Ｎ１－メチル－擬似Ｕ修飾ヌクレオチドを有するクリーンキャップＭＬＴトランスポザーゼｍＲＮＡは、Ｄ１４で最高のＧＦＰ発現及び統合効率を提供し、より長いポリ（Ａ）テールのＧＦＰ発現及び統合効率は、最良の結果を提供する（図６Ａ～Ｃ）。

【表２２】

表６．ｍＲＮＡ設計

遺伝子	販売者	ＣＡＰ	ポリ（Ａ）長さ（ｎｔ）	ヌクレオチド修飾
ハイパーＭＬＴトランスポザーゼ	ＴｒｉＬｉｎｋ	クリーンキャップ	８０	未修飾
ハイパーＭＬＴトランスポザーゼ	ＴｒｉＬｉｎｋ	クリーンキャップ	８０	５－メトキシ－Ｕ
ハイパーＭＬＴトランスポザーゼ	ＴｒｉＬｉｎｋ	クリーンキャップ	５５	Ｎ１－メチル－擬似Ｕ
ハイパーＭＬＴトランスポザーゼ	ＴｒｉＬｉｎｋ	クリーンキャップ	８０	Ｎ１－メチル－擬似Ｕ
ハイパーＭＬＴトランスポザーゼ	ＴｒｉＬｉｎｋ	クリーンキャップ	３０Ａ、リンカー、７０Ａ	Ｎ１－メチル－擬似Ｕ
ハイパーＭＬＴトランスポザーゼ	ＴｒｉＬｉｎｋ	クリーンキャップ	３４Ａ	Ｎ１－メチル－擬似Ｕ
ハイパーＭＬＴトランスポザーゼ	Ａｌｄｅｖｒｏｎ	ワクチニア	３４Ａ	Ｎ１－メチル－擬似Ｕ

【０３４２】

実施例５：ＭＬＴトランスポザーゼを使用するヒト一次Ｔ細胞の効率的な操作のための有効なドナーＤＮＡ：ヘルパーｍＲＮＡ比の決定

ヒト一次Ｔ細胞を操作するための有効なドナーＤＮＡ：ヘルパーｍＲＮＡ比を決定するために、活性化Ｔ細胞を、広範囲の濃度及び比を包含する異なる量のＣＡＧ－ＧＦＰドナーナノプラスミド（Ｎａｔｕｒｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）ＤＮＡ及びＭＬＴトランスポザーゼｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋ）で電気穿孔した（表７）。１４日目の培養終了時の生存率は、全てのサンプルにわたって高かった（６０％超）（図７Ａ～Ｃ）。１４日目のＧＦＰ発現及びＭＦＩ（平均蛍光強度）は、トランスフェクトされたドナーＤＮＡの量とともに、及びより高いドナー対ヘルパー比で増加した（図７Ａ～Ｃ）。結果は、活性化Ｔ細胞を２μｇのＣＡＧ－ＧＦＰドナーＤＮＡでトランスフェクトする場合、１：２及び１：５のドナー対ヘルパー比が、培養のＤ１４でＧＦＰ陽性細胞の最高のパーセンテージを提供することを示す（図７Ａ～Ｃ）。さらに、１μｇまたは２μｇのドナーＤＮＡをトランスフェクトする場合、１：５のドナー：ヘルパー比が、最高の統合効率を提供した（図７Ａ～Ｃ及び図８Ａ～Ｂ）。

【表２３】

表７．実験で使用されたドナーＤＮＡ量及びドナー：ヘルパー比のマトリックス

Ｄ：Ｈ比マトリックス	ドナーＤＮＡ（ｕｇ）				比
ヘルパー酵素ＳａｌｉｏＢ　ｍＲＮＡ（ｕｇ）	０．２５	０．５	１	２	
	０	０	０	０	ｍＲＮＡなし
	０．１２５	０．２５	０．５	１	２：１
	０．２５	０．５	１	２	１：１
	０．５	１	２	４	１：２
	１．２５	２．５	５	１０	１：５
	２．５	５	１０	２０	１：１０

【０３４３】

実施例６：ＭＬＴトランスポザーゼによるＴ細胞の効率的な操作を示すための方法

図９Ａ～Ｃ、図１０Ａ～Ｂ、図１１Ａ～Ｂ、図１２Ａ～Ｂ、図１３Ａ～Ｂ、図１４Ａ～Ｃ、及び図１５Ａ～Ｂについての方法。

【０３４４】

サイトカイン非依存性成長アッセイ

活性化Ｔ細胞を、５％のヒトＡＢ血清（Ｖａｌｌｅｙ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ、カタログ番号ＨＰ１０２２ＨＩ）及び１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び５０ｎｇ／ｍＬの可溶性抗ＣＤ３（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９３－３８７）、ならびに抗ＣＤ２８抗体（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９３－３７５）を補充したＴｅｘＭＡＣＳ培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９７－１９６）中で、３７℃で３日間増殖させた健康なドナーＰＢＭＣ細胞から生成した。活性化後、Ｔ細胞を収集し、製造元のプロトコルに従ってＬｏｎｚａの４Ｄ－ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒデバイスを使用して電気穿孔した。簡潔に述べると、10^6個の活性化Ｔ細胞を、２μｇのドナーＤＮＡ、３μｇのＭＬＴトランスポザーゼヘルパーｍＲＮＡ、またはその両方を有する１６ｗストリップ（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号Ｖ４ＸＰ－３０３２）を使用して電気穿孔した。対照として、細胞を、核酸の添加なしで電気穿孔した。電気穿孔後、細胞を２つに分割し、１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の不在下または存在下で、ＴｅｘＭＡＣＳ培地中で培養に戻した。細胞増殖を、２～３日毎に、合計で少なくとも２０日間、ＣｏｕｎｔＢｒｉｇｈｔビーズ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号Ｃ３６９９５）を使用してフローサイトメトリーにより細胞数を計数して評価した。

【０３４５】

ＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞の生成

末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、標準的なフィコール勾配精製法を使用して、健康なドナー（ＨｅｍａＣａｒｅ）から得られたＬｅｕｋｏｐａｋｓから精製された。活性化Ｔ細胞を生成するために、ＰＢＭＣ細胞を、５％のヒトＡＢ血清（Ｖａｌｌｅｙ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ、カタログ番号ＨＰ１０２２ＨＩ）及び１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９７－７４８）、ならびに５０ｎｇ／ｍＬの可溶性抗ＣＤ３（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９３－３８７）及び抗ＣＤ２８抗体（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９３－３７５）を補充したＴｅｘＭＡＣＳ培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９７－１９６）中で、３７℃で３日間増殖させた。活性化後、Ｔ細胞を収集し、製造元のプロトコルに従ってＬｏｎｚａの４

Ｄ－ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒデバイスを使用して電気穿孔した。簡潔に説明すると、５ｅ^{6}個の活性化Ｔ細胞を、４μｇのＣＤ１９－ＣＡＲドナーＤＮＡナノプラスミド（Ｎａｔｕｒｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）及び６μｇのＭＬＴトランスポザーゼヘルパーｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋ）を有する１００μＬのキュベット（Ｌｏｎｚａ、カタログ番号Ｖ４ＸＰ－３０２４）を使用して電気穿孔した。対照として、細胞を、電気穿孔しなかったか、またはドナーＤＮＡのみ、もしくは核酸なしで電気穿孔した。電気穿孔後、細胞を、５％のヒトＡＢ血清及び１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充したＴｅｘＭＡＣＳ培地中で培養に戻し、４日間回復させた。培養の７日目（電気穿孔後４日目）に、細胞をＴｒａｎｓＡｃｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－１１１－１６０）で再刺激し、６ｗ　Ｇ－Ｒｅｘ（ＷｉｌｓｏｎＷｏｌｆ、カタログ番号８０２４０Ｍ）でさらに７日間拡大させた。培養の１４日目に細胞を収集し、ＣｒｙｏＳｔｏｒ　ＣＳ１０細胞保存培地（ＳｔｅｍＣｅｌｌＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号ＣＳ１０）を使用して凍結保存した。

【０３４６】

ルシフェラーゼベースの細胞毒性アッセイ

ＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞の死滅能力を、ルシフェラーゼ発現腫瘍標的を用いる生体発光ベースのアッセイを使用して評価した（表８）。ＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞及びルシフェラーゼ発現標的の共培養を平底９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、カタログ番号３５３２９６）中にセットした。簡潔に述べると、１ｅ^{5}細胞／ｍＬの濃度での１００μＬのルシフェラーゼ発現標的を、ウェル当たり三連で添加した。エフェクター細胞を、１００μＬの体積で、１０：１、５：１、及び２．５：１のエフェクター対標的比で添加した。エフェクター細胞なしで、または１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＩＣＮ１９４８５４５０）でインキュベートした標的細胞を、それぞれ自発的溶解及び最大溶解の尺度として使用した。プレートを３７℃で６時間または１６時間インキュベートし、１００μＬのＢｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ（商標）ルシフェラーゼアッセイ基質（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｅ２６２０）を添加し、Ｉｎｆｉｎｉｔｅ（登録商標）２００ＰＲＯプレートリーダー（Ｔｅｃａｎ）で発光シグナルを測定することによって、ルシフェラーゼ活性を決定した。

【０３４７】

細胞毒性は以下の式に従って計算した：細胞毒性％＝１００－［（試験計数－Ｔ×１００計数）／（Ｔ細胞計数なし－Ｔ×１００計数））×１００］。

【表２４】

表８．細胞毒性アッセイで使用された腫瘍標的のリスト

細胞株	疾患	販売者	カタログ番号
Ｒａｊｉ－Ｆｌｕｃ－ＥｍＧＦＰ	バーキットリンパ腫	Ｉｍａｎｉｓ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ	ＣＬ １５９
Ｎａｌｍ６－Ｆｌｕｃ－Ｎｅｏ／ｅＧＦＰ－Ｐｕｒｏ	急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）	Ｉｍａｎｉｓ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ	ＣＬ １５０
Ｄａｕｄｉ－Ｆｌｕｃ－ｅＧＦＰ	バーキットリンパ腫	Ｉｍａｎｉｓ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ	ＣＬ １５８
Ｋ－５６２－ｌｕｃ２	赤白血病	ＡＴＣＣ	ＣＣＬ－２４３－ＬＵＣ２

【０３４８】

サイトカイン放出アッセイ

ＣＤ１９－ＣＡＲ Ｔ細胞または対照の非トランスフェクトＴ細胞を、腫瘍標的と１：１の比で、平底９６ｗプレート、５ｅ^{5}細胞／ウェルにおいて三連で２４時間共培養し、上清中に放出された炎症誘発性サイトカインＩＦＮγ及びＴＮＦα、ならびに溶解顆粒プロテアーゼグランザイムＢの量を、製造元の指示書に従ってＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ）によって測定した。

【０３４９】

ＣＡＲ Ｔ細胞の表現型分析

ＣＤ１９－ＣＡＲの発現を、ａｔｔｏ６４７Ｎ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号ＡＴＭ９２６９）にコンジュゲートしたヒト組換えＣＤ１９タンパク質を使用してフローサイトメトリーによって評価した。ＣＤ４／ＣＤ８比、ならびにメモリー及び疲弊マーカーの発現を、表９に示される抗体のうちの１つまたはいくつかを用いてフローサイトメトリー分析によって評価した。染色したサンプルをＣｙｔｏＦＬＥＸフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）において取得した。

【表２５】

表９．ＣＡＲ　Ｔ細胞の免疫表現型に使用される抗体

抗体	クローン	フルオロフォア	販売者	カタログ番号
ＣＤ３	ＳＫ７	ＦＩＴＣ	ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ	３４４８０４
ＣＤ４	ＳＫ３／ＯＫＴ４	ＢＶ７１１	ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ	３４４６４８
ＣＤ８	ＳＫ１	ＢＶ５１０	ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ	３４４７３２
ＣＤ６２Ｌ	ＤＲＥＧ－５６	ＰＥ	ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ	３０４８０６
ＣＣＲ７	Ｇ０４３Ｈ７	ＰＥ－Ｃｙ７	ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ	３５３２２６
ＣＤ４５ＲＡ	ＨＩ１００	ＰｅｒＣＰ	ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ	３０４１５６
ＰＤ－１	ＥＨ１２．２Ｈ７	ＰＥ	ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ	３２９９０６
ＴＩＭ－３	Ｆ３８－２Ｅ２	ＰＥ－Ｃｙ７	ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ	３４５０１４
ＬＡＧ－３	Ｃ９Ｂ７Ｗ	ＰＥ－Ｄａｚｚｌｅ５９４	ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ	１２５２２４

【０３５０】

実施例７：ＭＬＴトランスポザーゼによるＴ細胞の効率的な操作は、安定なＧＦＰ及びＣＡＲ発現ならびに良好な安全性プロファイルを示す。

一次活性化Ｔ細胞を、ＭＬＴトランスポザーゼ発現ヘルパーｍＲＮＡを含むかまたは含まず、レポーターＧＦＰまたはＣＤ１９－ＣＡＲ受容体をコードするドナーＤＮＡで電気穿孔した。操作されたＴ細胞をインビトロで拡大させ、持続したＧＦＰまたはＣＡＲ発現を、それぞれ、電気穿孔の１２日後または１４日後にフローサイトメトリーによって評価した。図９Ａ～Ｃに示すように、導入遺伝子の発現は、ドナーＤＮＡのみでトランスフェクトした細胞において失われたが、持続したＧＦＰ（およそ４０％）またはＣＤ１９－ＣＡＲ（２０～２５％）の発現は、ドナー及びＭＬＴトランスポザーゼｍＲＮＡヘルパーでトランスフェクトした細胞において観察され、ＤＮＡドナーの安定なＭＬＴトランスポザーゼ媒介性ゲノム統合と一致した。

【０３５１】

ＭＬＴトランスポザーゼ－操作されたＴ細胞の安全性を評価するために、一次活性化Ｔ細胞を、ドナーＤＮＡのみ、ヘルパーｍＲＮＡのみ、またはドナーＤＮＡ及びヘルパーｍＲＮＡで電気穿孔し、ＩＬ－２の存在下または不在下でのそれらの成長を評価して、それらの腫瘍発生可能性を評価した（図９Ａ～Ｃ）。対照として、操作されていないＴ細胞（ＥＰなし）を並行して試験した。図９Ａ～Ｃに示すように、操作されていないＴ細胞は、ＩＬ－２の存在下で、最初の１０日間に増殖し、Ｄ１５でプラトーに到達し、次いで、その成長は、Ｄ２５まで着実に低下し得る。ヘルパーｍＲＮＡで操作されたＴ細胞は、非常に類似したパターンにしか従わないが、ドナーのみまたはドナー及びヘルパーで操作されたＴ細胞の増殖は、電気穿孔中のＤＮＡのより高い毒性に起因して、より早くプラトーに

なる。重要なことに、ＩＬ－２の不在下では、操作された及び操作されていないＴ細胞の増殖は、電気穿孔の直後に着実に低下し、細胞の大部分は、Ｄ１６までに死滅する（図９Ａ～Ｃ）。ＭＬＴトランスポザーゼ－操作されたＴ細胞の異常な制御不能な増殖の欠如は、ヒト一次Ｔ細胞がＭＬＴトランスポザーゼで安全に操作され得ることを示唆している。

【０３５２】

図１２Ａ～Ｂは、１４日目の２１～２６％（濃縮なし）のＣＤ１９－ＣＡＲ発現及び９５％超の生存率を描示する。図１２Ａは、収集時の非トランスフェクトＣＤ１９－ＣＡＲＴ細胞のフローサイトメトリーによるＣＡＲ発現を描示する（Ｄ１４）。図１２Ｂは、収集時のＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞の生存率を描示する（Ｄ１４）。

【０３５３】

実施例８：エクスビボでの有効性－ＭＬＴトランスポザーゼによって生成された３人の健康なドナーからのＣＤ１９－ＣＡＲ－Ｔ細胞は、ＣＤ１９発現腫瘍標的細胞を効率的に死滅させる

ＭＬＴトランスポザーゼ－操作されたＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞毒性の可能性を、ＣＤ１９陽性白血病（Ｎａｌｍ６）またはリンパ腫細胞（Ｄａｕｄｉ、Ｒａｊｉ）との共培養においてエクスビボで評価した。ＣＤ１９陰性赤白血病Ｋ５６２細胞を、対照として使用した。図１０Ａ～Ｂに示すように、全ての３人のドナーからのＣＤ１９－ＣＡＲＴ細胞は、操作されていないＴ細胞と比較して、６時間及び１６時間の両方の評価した時点で、ＣＤ１９陽性腫瘍標的を非常に効率的に死滅させる。重要なことに、細胞毒性は、ＣＤ１９陰性Ｋ５６２細胞がＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞によって死滅しないため、非常に特異的である。注目すべきことに、ドナーＤ１５４は、Ｋ５６２細胞に対して反応するようである。この反応性は、操作されていないＴ細胞及びＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞の両方が、細胞毒性応答がＣＤ１９に依存しないことを示す等しく良好なＫ５６２細胞を死滅させるため、アロ応答に起因する可能性が高い。全体として、ＭＬＴトランスポザーゼ－操作されたＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞は細胞毒性が高く、その細胞毒性は標的細胞によるＣＤ１９腫瘍抗原の発現に非常に特異的である。

【０３５４】

実施例９：エクスビボでの有効性－ＣＤ１９発現腫瘍標的の認識時のＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞による高レベルの炎症誘発性サイトカイン放出

ＭＬＴトランスポザーゼの操作されたＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞が、ＣＤ１９発現腫瘍標的の認識時にサイトカインを放出する能力を、ＣＤ１９陽性または陰性の腫瘍標的との腫瘍共培養において、エクスビボで評価した。図１１Ａ～Ｂに示すように、ＣＤ１９陽性Ｂ細胞白血病またはリンパ腫標的と一晩インキュベートした後、全ての３人のドナーからのＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞は、高レベルの炎症誘発性サイトカイン（すなわち、ＩＮＦγ、ＴＮＦα）及び溶解顆粒プロテアーゼグランザイムＢを放出した。注目すべきことに、より高いレベルの炎症誘発性サイトカイン及びグランザイムＢが、Ｄａｕｄｉ及びＮａｌｍ－６腫瘍標的について観察された。重要なことに、腫瘍標的の不在下またはＣＤ１９陰性Ｋ５６２細胞との共培養において、サイトカインの非常に低いまたは検出不能なレベルが観察された。これは、ＭＬＴトランスポザーゼの操作されたＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔが非常に特異的であり、緊張性シグナル伝達を示さないことを示す。

【０３５５】

実施例１０：ＭＬＴトランスポザーゼの操作されたＣＤ１９－ＣＡＲ Ｔ細胞の免疫表現型

ＭＬＴトランスポザーゼの操作されたＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞の細胞免疫表現型を決定するために、異なる細胞表面マーカーの発現をフローサイトメトリーによって評価した（表９）。全てのドナーからのＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞は、バランスのとれたＣＤ４：ＣＤ８比を有し（図１３Ａ～Ｂ）、それらの比は、操作されていないＴ細胞のものと同様であった。重要なことに、ＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞は、セントラルメモリーまたはエフェクターメモリー表現型を有する細胞のパーセンテージが高く、完全に分化したエフェクター細胞のパーセンテージが低かった（図１４Ａ～Ｃ）。これは、低分化Ｔ細胞で濃縮されたＣＡＲ－Ｔ生成物が、より良好な臨床性能と関連し、インビボでより長く持続するこ

とが示されているため、好ましいメモリー表現型と一致する。最後に、疲弊マーカーＰＤ－１、ＬＡＧ－３、及びＴＩＭ－３の発現を評価した。この分析の結果は、ＭＬＴトランスポザーゼの操作されたＣＤ１９－ＣＡＲ　Ｔ細胞が、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の低い発現ならびにＴＩＭ－３のより高い発現を伴って、これらの疲弊マーカーのバランスのとれた発現を有することを示す（図１５Ａ～Ｂ）。

【０３５６】

同等物

本発明は、その特定の実施形態に関連して記載したが、さらなる修正が可能であり、本出願は、一般に、本発明の原理に従って、本発明の任意の変型、使用、または適応を網羅するものであり、本発明が属する技術分野において知られているか、または慣行に含まれるような本開示からの逸脱、及び前述される本質的な特徴に適用され得るもの、ならびに添付の請求項の範囲に含まれるような本開示からの逸脱を含むことを理解されたい。

【０３５７】

当業者は、単なる日常的な実験を使用して、本明細書に具体的に記載される特定の実施形態に対する多数の同等物を認識し、または確認することができるであろう。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲の範囲内に包含されることが意図される。

【０３５８】

参照による組み込み

本明細書で参照される全ての特許及び刊行物は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０３５９】

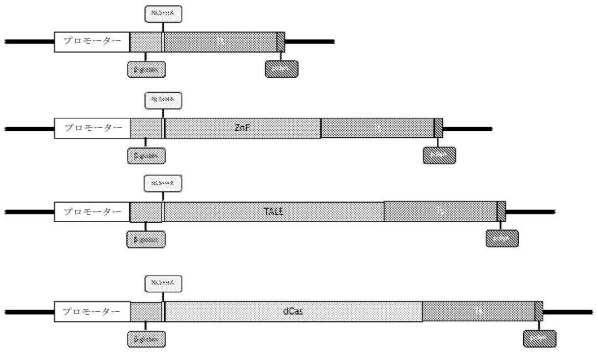
本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日前のそれらの開示に対してのみ提供される。本明細書におけるいかなるものも、本発明が、先行発明のためにそのような刊行物に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。

【０３６０】

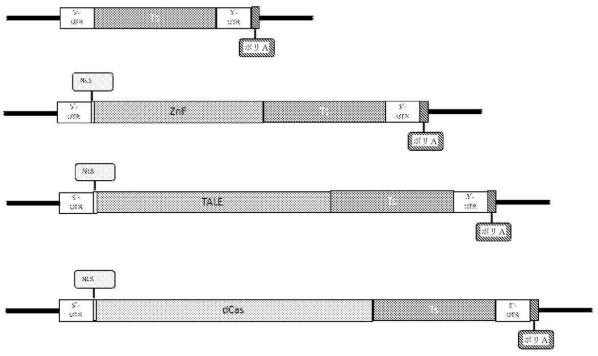
本明細書で使用される場合、全ての見出しは単に本明細書の構成のためのものであり、いかなる様式においても開示を制限することを意図したものではない。いかなる個々のセクションの内容も、全てのセクションに等しく適用可能であり得る。

【図面】

【図１Ａ】



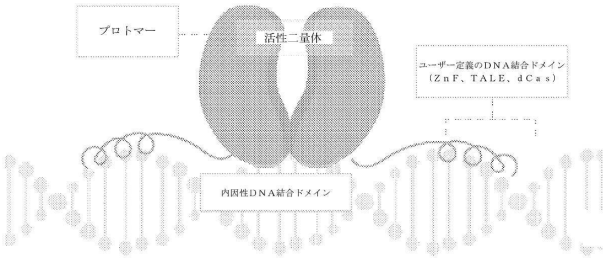
【図１Ｂ】



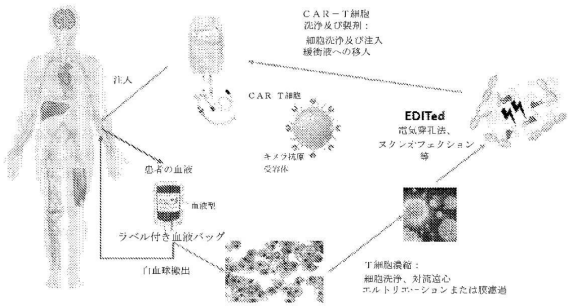
【図１Ｃ】


左
末端
プロモーター
GOI
polyA
右
末端

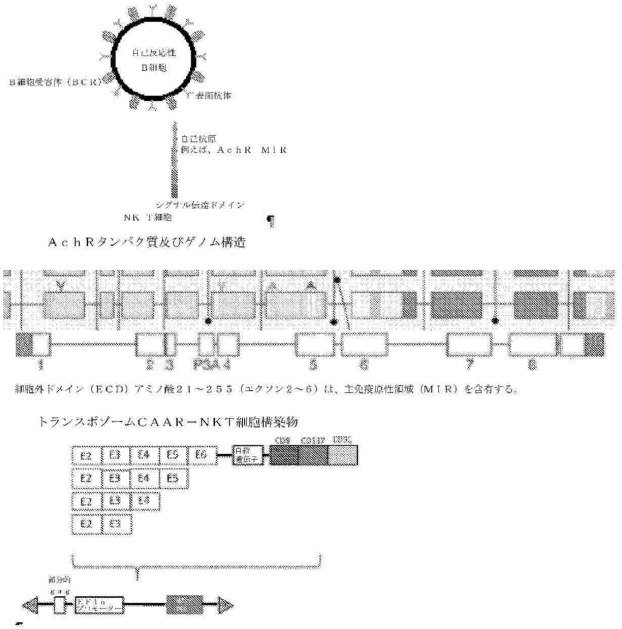
【図１Ｄ】


プロトマー
活性二量体
ユーザー定義のＤＮＡ結合ドメイン
（ＺｎＦ、ＴＡＬＥ、ｄＣａｓ）
内因性ＤＮＡ結合ドメイン

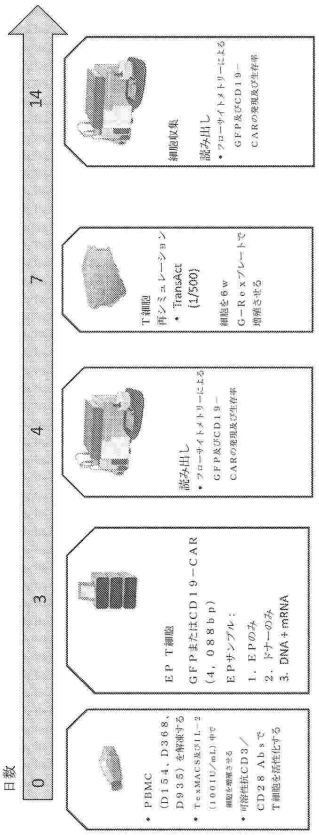
【図２】


ＣＡＲ－Ｔ細胞
洗浄及び製剤：
細胞洗浄及び注入
輸血液への移入
注入
ＣＡＲ Ｔ細胞
キメラ抗原
受容体
ＥＤＩＴed
電気穿孔法、
ヌクレオフェクション
等
患者の血液
血液型
ラベル付き血液バッグ
白血球搬出
Ｔ細胞濃縮：
細胞洗浄、対流遠心
エルトリエーションまたは膜濾過

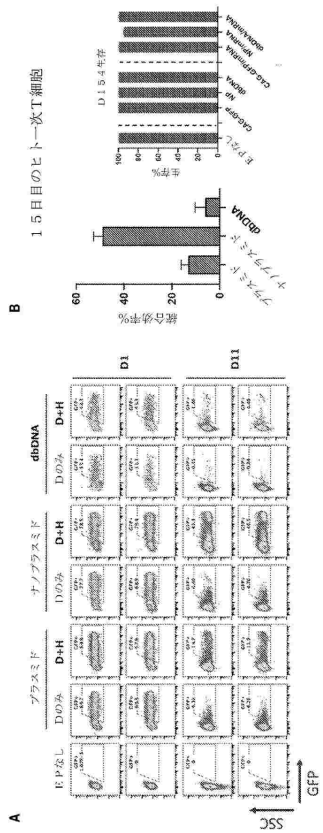
【図３】


自己反応性
Ｂ細胞
Ｂ細胞受容体（ＢＣＲ）
表面抗体
自己抗原
例えば、ＡｃｈＲ Ｍ１Ｒ
シグナル伝達ドメイン
ＮＫ Ｔ細胞
ＡｃｈＲタンパク質及びゲノム構造
細胞外ドメイン（ＥＣＤ）アミノ酸２１～２５５（エクソン２～６）は、主免疫原性領域（ＭＩＲ）を含有する。
トランスポゾームＣＡＡＲ－ＮＫＴ細胞構築物

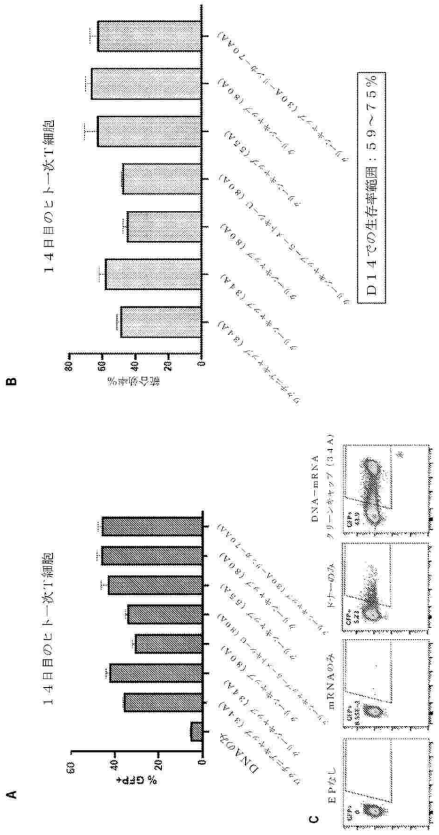
【図４】


日数
0
3
4
7
14
PBMC
(D154, D368, D935) を解凍する
TexMACS及びIL-2 (100IU/mL)中で細胞を増殖させる
可溶性抗CD3/CD28 Abs で T細胞を活性化する
EP T細胞
GFPまたはCD19−CAR (4, 088bp)
EPサンプル：
1. EPのみ
2. ドナーのみ
3. DNA+mRNA
読み出し
フローサイトメトリーによる GFP及びCD19−CAR の発現及び生存率
T細胞
再シミュレーション
TransAct (1/500)
細胞を6w G−Rexプレートで増殖させる
細胞収集
読み出し
フローサイトメトリーによる GFP及びCD19−CAR の発現及び生存率

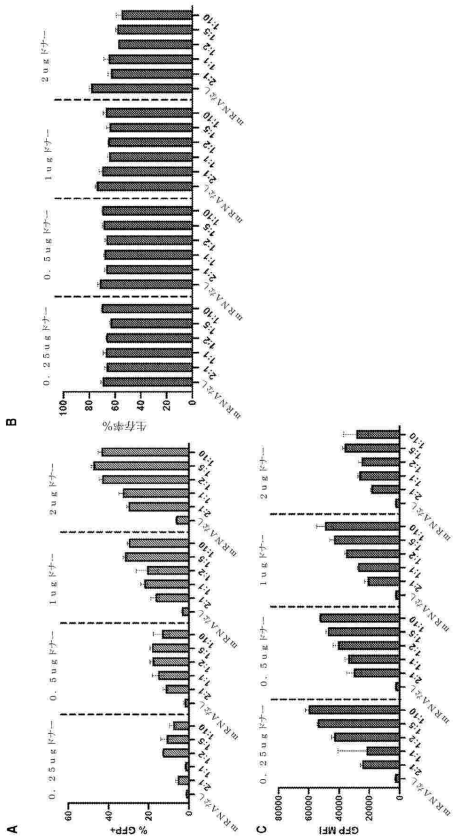
【図５】


A
EPなし
Dのみ
D+H
プラスミド
ナノプラスミド
dbDNA
D1
D11
SSC
GFP
B
15日目のヒト一次T細胞
D154生存
生存%
総合効率%
EPなし
CAG-GFP
NP
dbDNA
CAG-GFP/mRNA
NP/mRNA
dbDNA/mRNA

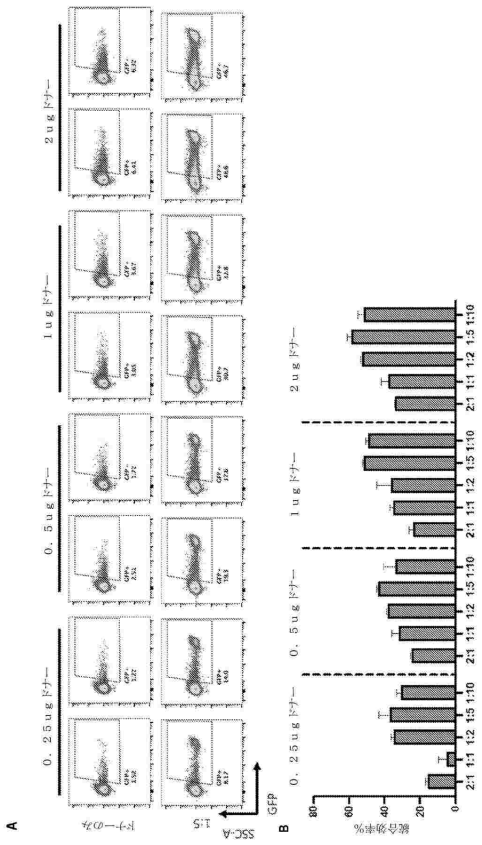
【図６】


A
14日目のヒト一次T細胞
% GFP+
DNAのみ
C
EPなし
mRNAのみ
ドナーのみ
DNA−mRNA
クリーンキャップ (34A)
B
14日目のヒト一次T細胞
総合効率%
D14での生存率範囲：59〜75%

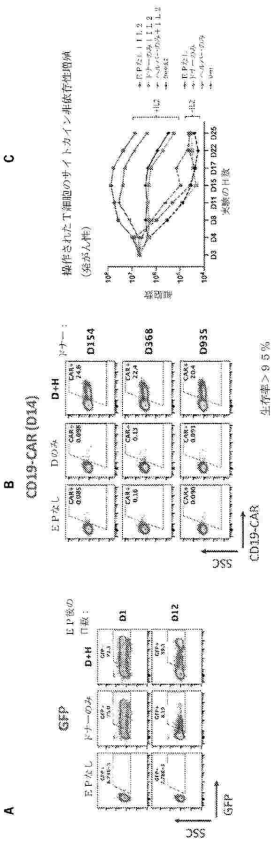
【図７】


A
% GFP+
0.25ugドナー
0.5ugドナー
1ugドナー
2ugドナー
mRNAなし
B
生存率%
C
GFP MFI

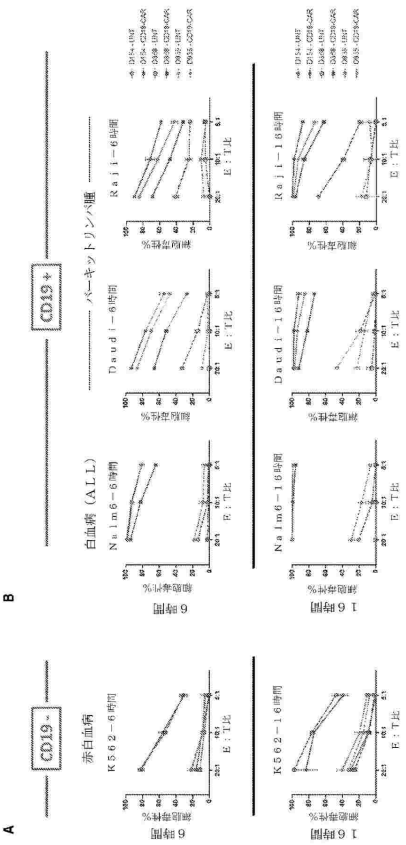
【図８】



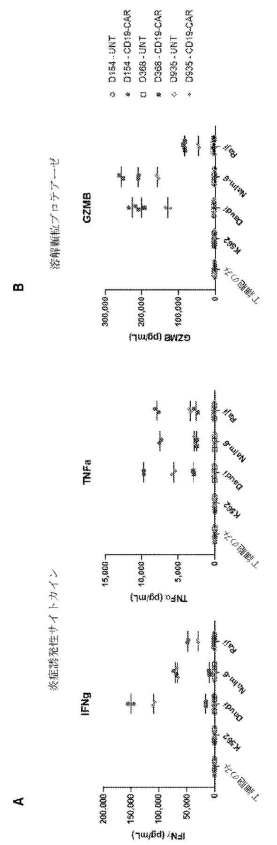
【図９】



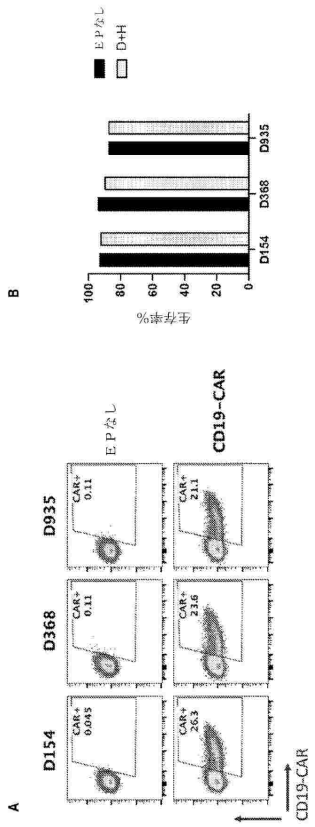
【図１０】



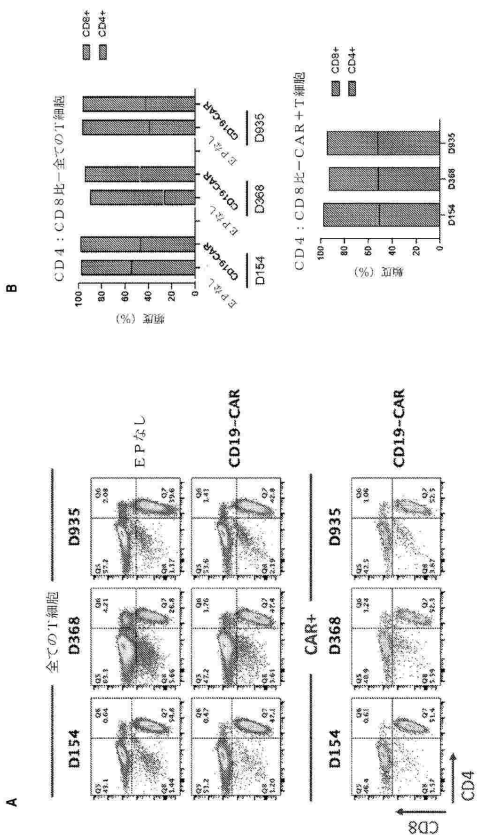
【図１１】



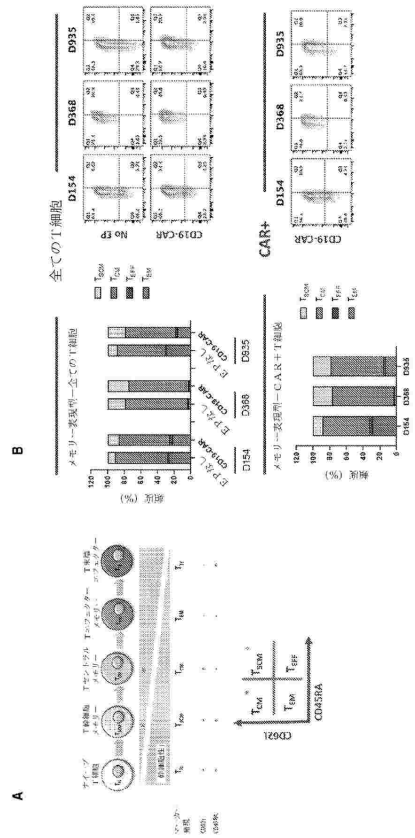
【図１２】



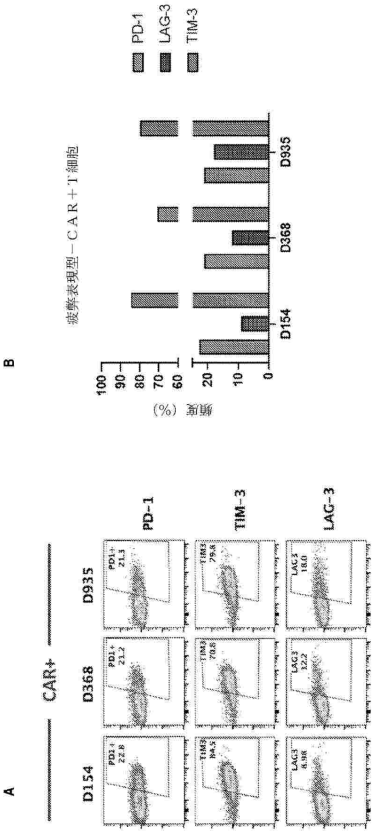
【図１３】



【図１４】



【図１５】



【配列表】
20245410740000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C07K 14/705, A61K 48/00 (2023.01)
ADD. C07K 16/28 (2023.01)
CPC - INV. A61K 39/0008
ADD. A61K 39/001102, A61K 2039/5158, C07K 2319/02, A61K 2039/505
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2021/0230548 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 29 July 2021 (29.07.2021); abstract; para [0007], [0015], [0109], [0167], [0186]-[0188], [0218]; claim 14	1, (3-8)/(1) (5-8)/(2)
X — Y	US 2019/0048060 A1 (SANGAMO THERAPEUTICS, INC.) 14 February 2019 (14.02.2019); abstract; para [0019], [0031], [0043], [0045], [0219], [0228], [0243], [0249], [0266]	2, (3-4)/(2) (5-8)/(2)

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 January 2023 (20.01.2023)	MAR 22 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79288

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79288

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 11-179
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—See Supplemental Box —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-8

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79288

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-8, directed to a method of making a chimeric antigen [e.g. tumor antigen, see instant specification, pg 3, para 3] receptor (CAR)-immune cell comprising: obtaining an subject immune cell; transfecting the immune cell with a first nucleic acid encoding a genomic targeting enzyme and a second, non-viral nucleic acid encoding a donor DNA comprising a chimeric CAR, to thereby create a transfected CAR T-cell or NK cell.

Group II: Claims 9-10, directed to a method of making a chimeric autoantibody [instant specification, pg 4, para 3] receptor (CAAR)-immune cell comprising: obtaining an subject immune cell; transfecting the immune cell with a first nucleic acid encoding a genomic targeting enzyme and a second, non-viral nucleic acid encoding a donor DNA comprising a chimeric CAR, to thereby create a transfected CAR T-cell or NK cell.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I requires a method of making a CAR-immune cell comprising an antigen [listed in instant specification, pg 3, para 3], not required by group II.

Group II requires a method of making a CAAR-immune cell comprising an autoantigen; applicant's listed autoantigens do not overlap with CAR antigens [instant specification, pg 4, para 3], not required by group I.

Common Technical Features

The common technical feature shared by Groups I and II is a method of making a chimeric antigen receptor immune cell, the method comprising: obtaining an immune cell from a sample obtained from a subject, the sample comprising immune cells or immune cell progenitors; and transfecting the immune cell with a first nucleic acid encoding an enzyme capable of performing targeted genomic integration, optionally wherein the first nucleic acid is RNA, and a second, non-viral nucleic acid encoding a donor DNA comprising a chimeric CAR and flanked by ends recognized by the enzyme capable of performing targeted genomic integration, to thereby create a transfected CAR-immune cell, wherein the immune cell is selected from a T cell, macrophage, and a natural killer (NK) cell.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2021/0230548 A1 to Board of Regents, The University of Texas System (hereinafter "Univ Texas").

Texas teaches a method of making a chimeric antigen receptor (CAR)-immune cell (abstract - "Provided herein are methods for producing NK cells expressing chimeric antigen receptors"), the method comprising: obtaining an immune cell from a sample obtained from a subject (para [0007] - " the NK cells are allogeneic or autologous"; claim 14 - " obtaining a starting population of NK cells"), the sample comprising immune cells or immune cell progenitors (para [0007] - " the NK cells are allogeneic or autologous"; claim 14 - " obtaining a starting population of NK cells"); and transfecting the immune cell with a first nucleic acid encoding an enzyme capable of performing targeted genomic integration (para [0167] - "Such methods include, but are not limited to, direct delivery of DNA such as by ex vivo transfection"; para [0188] - "In some embodiments the TALEN s are introduced as trans genes encoded by one or more plasmid vectors"; para [0187] - "TALE repeats are assembled to specifically target a gene"), and a second, non-viral nucleic acid encoding a donor DNA comprising a chimeric CAR and flanked by ends recognized by the enzyme capable of performing targeted genomic integration (claim 14 - "introducing a CAR and/or TCR expression vector into the NK cells"; para [0186] - "the TALEN recognizes and cleaves the target sequence in the gene. In some aspects, cleavage of the DNA results in double-stranded breaks. In some aspects the breaks stimulate the rate of homologous recombination or non-homologous end joining"; para [0187] - "TALE repeats are assembled to specifically target a gene"), to thereby create a transfected CAR-immune cell, wherein the immune cell is selected from a T cell, macrophage, and a natural killer (NK) cell (abstract - "Provided herein are methods for producing NK cells expressing chimeric antigen receptors"; para [0167] - "Such methods include, but are not limited to, direct delivery of DNA such as by ex vivo transfection").

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4, continued: claims 11-179 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a) regarding multiply dependent claims

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		
Ｃ１２Ｎ	*5/0786(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0786		
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/87 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/87	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/85 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/85	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/90 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１００	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/90	Ｚ	
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	
Ａ６１Ｋ	*35/12 (2015.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12		
Ａ６１Ｋ	*35/15 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
		Ａ６１Ｋ	35/17		
		Ａ６１Ｋ	35/15		

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　タビビアザール、レイ
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ　ケンブリッジ、ファースト　ストリート、２４５　１８階　サリオジェン　セラピューティクス　インコーポレイテッド　内
(72)発明者　ハランディ、オミッド、エフ．
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ　ケンブリッジ、ファースト　ストリート、２４５　１８階　サリオジェン　セラピューティクス　インコーポレイテッド　内
(72)発明者　ナバルロ、フランシスコ
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ　ケンブリッジ、ファースト　ストリート、２４５　１８階　サリオジェン　セラピューティクス　インコーポレイテッド　内
(72)発明者　ヘムフィル、ジェームズ、ビー．
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ　ケンブリッジ、ファースト　ストリート、２４５　１８階　サリオジェン　セラピューティクス　インコーポレイテッド　内
(72)発明者　ラモラ、ジョシュア
アメリカ合衆国　０２１４２　マサチューセッツ　ケンブリッジ、ファースト　ストリート、２４５　１８階　サリオジェン　セラピューティクス　インコーポレイテッド　内

Ｆターム（参考）　4B065　AA94X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44
4C084　AA13 MA66 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
4C087　AA01 AA02 AA03 BB33 BB43 BB65 MA66 NA14 ZB26 ZB27