

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和5年9月11日(2023.9.11)

【国際公開番号】WO2021/046243

【公表番号】特表2022-546592(P2022-546592A)

【公表日】令和4年11月4日(2022.11.4)

【年通号数】公開公報(特許)2022-203

【出願番号】特願2022-514694(P2022-514694)

【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/09(2006.01)

A 6 1 K 35/76(2015.01)

A 6 1 K 48/00(2006.01)

A 6 1 P 43/00(2006.01)

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

A 6 1 K 45/00(2006.01)

C 1 2 N 15/11(2006.01)

C 1 2 N 15/54(2006.01)

C 1 2 N 15/41(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

20

C 1 2 N 5/0781(2010.01)

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0784(2010.01)

C 1 2 N 5/0786(2010.01)

C 1 2 N 5/0787(2010.01)

C 1 2 N 15/38(2006.01)

C 1 2 N 15/86(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 0 0

A 6 1 K 35/76

30

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 43/00 1 2 1

C 1 2 N 15/11 Z

C 1 2 N 15/54

C 1 2 N 15/41

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/0781

40

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 5/0784

C 1 2 N 5/0786

C 1 2 N 5/0787

C 1 2 N 15/38

C 1 2 N 15/86 Z

【手続補正書】

【提出日】令和5年9月1日(2023.9.1)

【手続補正1】

50

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的ヒト細胞集団のゲノムに組み込まれた DNA 配列から外来ヒト治療用ポリペプチドを発現させる方法であって、

(a) 1 つもしくは複数の RNA 分子を標的ヒト細胞集団に接触させるステップであって、該 1 つもしくは複数の RNA 分子は：

(i) 挿入配列であって、外来ヒト治療用ポリペプチドをコードする DNA 配列の逆相補鎖である RNA 配列を含む、挿入配列、および

(i i) 標的をプライマーとする逆転写 (T P R T) 活性を有するポリペプチドをコードする RNA 配列を含むヒト可動性遺伝因子

を含む、ステップ；

(b) 前記ヒト可動性遺伝因子を翻訳して T P R T 活性を有するポリペプチドを産生させるステップ；

(c) ステップ (b) で翻訳されたポリペプチドの T P R T 活性を介して前記外来ヒト治療用ポリペプチドをコードする DNA 配列の逆相補鎖である RNA 配列を逆転写することにより、前記外来ヒト治療用ポリペプチドをコードする DNA 配列を産生させるステップ

；

(d) 前記外来ヒト治療用ポリペプチドをコードする DNA 配列を前記標的ヒト細胞集団の標的ヒト細胞のゲノム DNA 中に標的部位で組み込むステップ；および

(e) ゲノムに組み込まれた外来ヒト治療用ポリペプチドをコードする DNA 配列から前記標的ヒト細胞中で前記外来ヒト治療用ポリペプチドを発現させるステップ

を含み、

T P R T 活性を有するポリペプチドは、ヒト長鎖散在反復配列 (L I N E) 1 (L 1) O R F 2 p ポリペプチドまたはその機能性断片を含み、

挿入配列は 1 0 0 ~ 1 2 0 0 0 塩基長である、方法。

【請求項 2】

前記 1 つもしくは複数の RNA 分子が mRNA である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 1 つもしくは複数の RNA 分子が、i n v i t r o で転写された RNA 分子、合成 RNA 分子、精製された RNA 分子、または単離された RNA 分子である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 T P R T 活性を有するポリペプチドをコードする RNA 配列が、L I N E 1 O R F 2 p 逆転写酵素 (R T) を含む、ヒト O R F 2 p ポリペプチドまたはその機能性断片をコードする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 T P R T 活性を有するポリペプチドをコードする RNA 配列が、さらにエンドヌクレアーゼをコードし、該エンドヌクレアーゼは O R F 2 p エンドヌクレアーゼまたはその断片である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 T P R T 活性を有するポリペプチドをコードする RNA 配列が、さらにヒト O R F 1 p またはその機能性断片を含むポリペプチドをコードする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ヒト O R F 2 p ポリペプチドをコードする RNA 配列およびヒト O R F 1 p ポリペプチドをコードする RNA 配列が、単一の RNA 分子上にある、請求項 5 または 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

ヒトORF 1 pポリペプチドをコードする配列とヒトORF 2 pポリペプチドをコードする配列のコピー数の間の比率が少なくとも2 : 1である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記1つもしくは複数のRNA分子が第1のRNA分子と第2のRNA分子を含み、第1のRNA分子はヒトORF 1 pまたはその機能性断片をコードする配列を含み、第2のRNA分子はヒトORF 2 pまたはその機能性断片をコードする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 10】

組成物中の第1のRNA分子の第2のRNA分子に対する比率が、(a) 少なくとも2 : 1である、(b) 最大で5 : 1である、または(c) 約3 : 1である、請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記ヒト可動性遺伝因子が、配列番号 55 に少なくとも90%の配列同一性を持つポリペプチドをコードする配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ヒトORF 1 pポリペプチドをコードする配列とヒトORF 2 pポリペプチドをコードする配列が、前記外来ヒト治療用ポリペプチドをコードするDNA配列の逆相補鎖であるRNA配列とインフレームではない、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 13】

前記外来ヒト治療用ポリペプチドをコードするDNA配列が、さらにプロモーターを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 14】

前記外来ヒト治療用ポリペプチドをコードする配列が、リガンド、抗体、受容体、酵素、輸送タンパク質、構造タンパク質、ホルモン、収縮タンパク質、貯蔵タンパク質、転写因子、キメラ抗原受容体(CAR)またはT細胞受容体(TCR)である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 15】

前記外来ヒト治療用ポリペプチドをコードする配列がイントロンを含まない、請求項 1 または 2 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記外来ヒト治療用ポリペプチドをコードする配列が、標的部位で前記標的ヒト細胞集団の標的ヒト細胞のゲノムDNA中にレトロ転移し、標的部位はリボソームRNA座位ではなく；標的部位は、(i) ゲノムの遺伝子または遺伝子の調節領域であり、それによって遺伝子を破壊するかまたは遺伝子の発現を下方制御する；(ii) ゲノムの遺伝子または遺伝子の調節領域であり、それによって遺伝子の発現を上方制御する；(iii) ゲノムの遺伝子であり、ゲノムの遺伝子を置き換える；または(iv) セーフハーバー座位である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 17】

前記RNA配列を含むヒト可動性遺伝因子が、メガTALヌクレアーゼドメイン、TAL E Nドメイン、CRISPR-Casタンパク質ドメイン、ジンクフィンガー結合ドメイン、またはAAV由来のRep 7 8等の反復配列に結合するDNA結合ドメインから選択される、ORF 2 に由来しない異種タンパク質またはその断片に由来するドメインをコードする配列をさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記異種タンパク質またはその断片に由来するドメインをコードする配列が、特定の標的部位に対するガイドRNA(gRNA)を伴うCRISPR-Casタンパク質ドメインをコードする、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記CRISPR-Casタンパク質ドメインが、Cas 9、Cas 12 a、Cas 12

50

b、Cas13、CasX、またはCasYタンパク質由来のエンドヌクレアーゼドメインである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記RNA配列を含むヒト可動性遺伝因子が、異種タンパク質由来のドメインをコードする配列をさらに含み、該異種タンパク質由来のドメインはヒトORF2pエンドヌクレアーゼドメインに融合したCRISPR-Cas9エンドヌクレアーゼドメインを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

前記ORF2pエンドヌクレアーゼドメインが変異を含み、変異はORF2pエンドヌクレアーゼの活性を低下または抑制する欠失または点変異である、請求項20に記載の方法

10

【請求項22】

変異がS228P変異である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

CRISPR-Cas9エンドヌクレアーゼドメインがCas9ニッカーゼである、請求項20に記載の方法。

【請求項24】

前記ヒトORF2pポリペプチドが核局在化配列(NLS)をN末端に、C末端に、または両方に含む、請求項4に記載の方法。

【請求項25】

前記外来ヒト治療用ポリペプチドが、前記標的ヒト細胞集団の標的ヒト細胞のゲノムDNAから2日より長い間にわたり安定的に発現する、請求項1に記載の方法。

20

【請求項26】

外来ヒト治療用ポリペプチドをコードするDNA配列のヒト細胞のゲノムへの安定した組み込みのための組成物であって、該組成物は非LTRレトロトランスポゾン系を含み、該非LTRレトロトランスポゾン系は、

(i) 挿入配列であって、外来ヒト治療用ポリペプチドをコードするDNA配列の逆相補鎖であるRNA配列を含む、挿入配列、および

(ii) 標的をプライマーとする逆転写(TPRT)活性を有するポリペプチドをコードするRNA配列を含むヒト可動性遺伝因子

30

を含む、1つもしくは複数の組換えmRNA分子を含み、

前記TPRT活性を有するポリペプチドをコードするRNA配列が、ヒトORF2p逆転写酵素(RT)およびエンドヌクレアーゼを含む、ヒトORF2pポリペプチドまたはその機能性断片を含むポリペプチドをコードし、

挿入配列は100~12000塩基長である、組成物。

【請求項27】

前記エンドヌクレアーゼがヒトLINE1ORF2pエンドヌクレアーゼである、請求項26に記載の組成物。

【請求項28】

前記TPRT活性を有するポリペプチドをコードするRNA配列が、さらにヒトLINE1ORF1pポリペプチドまたはその機能性断片をコードする、請求項26に記載の組成物。

40

【請求項29】

5'UTR配列および該5'UTR配列の下流にある3'UTR配列をさらに含む、請求項26に記載の組成物であって；該5'UTR配列または該3'UTR配列はヒトLINE1ORF2pポリペプチドまたはヒトLINE1ORF1pポリペプチドまたはその機能性断片のための結合部位を含む、組成物。

【請求項30】

ヒトLINE1ORF2pポリペプチドまたはその機能性断片を含むポリペプチドをコードするRNA配列と、ヒトORF1pポリペプチドまたはその機能性断片を含むポリペ

50

プチドをコードするRNA配列とが単一のRNA分子上にあり、ヒトORF1pポリペプチドをコードする配列とヒトORF2pポリペプチドをコードする配列のコピー数の間の比率が少なくとも2:1である、請求項29に記載の組成物。

【請求項31】

ヒトLINE1ORF2pポリペプチドまたはその機能性断片を含むポリペプチドをコードする配列と、ヒトORF1pポリペプチドまたはその機能性断片を含むポリペプチドをコードするRNA配列とがリンカー配列によって分離され、該リンカー配列はT2A、E2A、またはP2A配列をコードする、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】

前記1つもしくは複数の組換えmRNA分子が第1のRNA分子と第2のRNA分子を含み、第1のRNA分子はヒトORF1pポリペプチドまたはその機能性断片をコードする配列を含み、第2のRNA分子はヒトORF2pポリペプチドまたはその機能性断片をコードし、組成物中の第1のRNA分子の第2のRNA分子に対する比率が、(a)少なくとも2:1である、(b)最大で5:1である、または(c)約3:1である、請求項26に記載の組成物。

10

【請求項33】

前記ヒト可動性遺伝因子が、配列番号55に少なくとも90%の配列同一性を持つポリペプチドをコードする配列を含む、請求項26に記載の組成物。

【請求項34】

前記ヒト可動性遺伝因子が、配列番号53に少なくとも90%の配列同一性を持つポリペプチドをコードする配列を含む、請求項26に記載の組成物。

20

【請求項35】

前記ヒトORF2pポリペプチドが核局在化配列(NLS)をN末端に、C末端に、または両方に含む、請求項26に記載の組成物。

【請求項36】

前記外来ヒト治療用ポリペプチドをコードする配列が、リガンド、抗体、受容体、酵素、輸送タンパク質、構造タンパク質、ホルモン、収縮タンパク質、貯蔵タンパク質、転写因子、キメラ抗原受容体(CAR)またはT細胞受容体(TCR)である、請求項26に記載の組成物。

【手続補正2】

30

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0405

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0405】

国際出願時の請求の範囲の記載は以下のとおりである。

〔項1〕

核酸配列を細胞のゲノムに組み込む方法であって、組換えmRNAまたはmRNAをコードするベクターを細胞に導入するステップを含み、mRNAが、

(a)挿入配列であって、

40

(i)外来配列、または

(ii)外来配列の逆相補鎖である配列

を含む、挿入配列、

(b)5'UTR配列および該5'UTR配列の下流にある3'UTR配列であって、5'UTR配列または3'UTR配列がヒトORFタンパク質のための結合部位を含む、5'UTR配列および3'UTR配列

を含み、挿入配列が細胞のゲノムに組み込まれる、方法。

〔項2〕

5'UTR配列または3'UTR配列がヒトORF2pのための結合部位を含む、請求項

50

1に記載の方法。

〔項3〕

核酸配列を免疫細胞のゲノムに組み込むための方法であって、組換えmRNAまたはmRNAをコードするベクターを導入するステップを含み、mRNAが、

(a)挿入配列であって、(i)外来配列または(ii)外来配列の逆相補鎖である配列を含む、挿入配列、

(b)5'UTR配列および該5'UTR配列の下流にある3'UTR配列であって、5'UTR配列または3'UTR配列がエンドヌクレアーゼ結合部位および/または逆転写酵素結合部位を含む、5'UTR配列および3'UTR配列

を含み、

10

導入遺伝子配列が免疫細胞のゲノムに組み込まれる、方法。

〔項4〕

核酸配列を細胞のゲノムに組み込むための方法であって、組換えmRNAまたはmRNAをコードするベクターを導入するステップを含み、mRNAが、

(a)挿入配列であって、(i)外来配列または(ii)外来配列の逆相補鎖である配列を含む、挿入配列、

(b)5'UTR配列、該5'UTR配列の下流にあるヒトレトロトランスポゾンの配列、および該ヒトレトロトランスポゾンの配列の下流にある3'UTR配列であって、5'UTR配列または3'UTR配列がエンドヌクレアーゼ結合部位および/または逆転写酵素結合部位を含む、5'UTR配列、ヒトレトロトランスポゾンの配列、および3'UTR配列

20

を含み、ヒトレトロトランスポゾンの配列が、2つのORFを含有する単一RNAから翻訳される2つのタンパク質をコードし、

挿入配列が細胞のゲノムに組み込まれる、方法。

〔項5〕

5'UTR配列または3'UTR配列がORF2p結合部位を含む、請求項3または4に記載の方法。

〔項6〕

ORF2p結合部位が3'UTR配列におけるポリA配列である、請求項2または5に記載の方法。

30

〔項7〕

mRNAがヒトレトロトランスポゾンの配列を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

〔項8〕

ヒトレトロトランスポゾンの配列が5'UTR配列の下流にある、請求項7に記載の方法。

〔項9〕

ヒトレトロトランスポゾンの配列が3'UTR配列の上流にある、請求項7または8に記載の方法。

〔項10〕

ヒトレトロトランスポゾンの配列が、2つのORFを含有する単一RNAから翻訳される2つのタンパク質をコードする、請求項7から9のいずれか一項に記載の方法。

40

〔項11〕

2つのORFが非重複ORFである、請求項4または10に記載の方法。

〔項12〕

2つのORFがORF1およびORF2である、請求項4、10、または11に記載の方法。

〔項13〕

ORF1がORF1pをコードし、ORF2がORF2pをコードする、請求項12に記載の方法。

50

〔項 1 4〕

ヒトレトロトランスポゾンの配列が非 L T R レトロトランスポゾンの配列を含む、請求項 4 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 5〕

ヒトレトロトランスポゾンの配列が L I N E - 1 レトロトランスポゾンを含む、請求項 4 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 6〕

L I N E - 1 レトロトランスポゾンがヒト L I N E - 1 レトロトランスポゾンである、請求項 1 5 に記載の方法。

〔項 1 7〕

ヒトレトロトランスポゾンの配列が、エンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素をコードする配列を含む、請求項 4 から 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 8〕

エンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素が O R F 2 p である、請求項 1 7 に記載の方法。

〔項 1 9〕

逆転写酵素がグループ I I イントロン逆転写酵素ドメインである、請求項 1 7 に記載の方法。

〔項 2 0〕

エンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素がミンククジラエンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素である、請求項 1 7 に記載の方法。

〔項 2 1〕

ヒトレトロトランスポゾンの配列が O R F 2 p をコードする配列を含む、請求項 4 から 1 6 または 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 2〕

挿入配列が、O R F 2 p のエンドヌクレアーゼドメインの特異性を使用して、ポリ T 部位においてゲノムに組み込まれる、請求項 2 1 に記載の方法。

〔項 2 3〕

ポリ T 部位が配列 T T T T T A を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

〔項 2 4〕

(i) ヒトレトロトランスポゾンの配列が O R F 1 p をコードする配列を含むか、(i i) m R N A が O R F 1 p をコードする配列を含まないか、または(i i i) m R N A が、相補遺伝子由来の 5 ' U T R 配列を有する、O R F 1 p をコードする配列の置換配列を含む、請求項 4 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 5〕

m R N A が、O R F 1 p をコードする第 1 の m R N A 分子とエンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素をコードする第 2 の m R N A 分子とを含む、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 6〕

m R N A が、O R F 1 p をコードする第 1 の配列とエンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素をコードする第 2 の配列とを含む m R N A 分子である、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 7〕

O R F 1 p をコードする第 1 の配列とエンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素をコードする第 2 の配列とがリンカー配列によって分離される、請求項 2 6 に記載の方法。

〔項 2 8〕

リンカー配列が内部リボソーム進入配列 (I R E S) を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

〔項 2 9〕

I R E S が C V B 3 または E V 7 1 由来の I R E S である、請求項 2 8 に記載の方法。

〔項 3 0〕

10

20

30

40

50

リンカー配列が自己切断ペプチド配列をコードする、請求項 27 に記載の方法。

〔項 31〕

リンカー配列が T2A、E2A、または P2A 配列をコードする、請求項 27 に記載の方法。

〔項 32〕

ヒトレトロトランスポゾンの配列が、追加のタンパク質配列と融合した ORF1p をコードする配列および / または追加のタンパク質配列と融合した ORF2p をコードする配列を含む、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 33〕

ORF1p および / または ORF2p が核内保留配列と融合する、請求項 32 に記載の方法。

10

〔項 34〕

核内保留配列が A1u 配列である、請求項 33 に記載の方法。

〔項 35〕

ORF1p および / または ORF2p が MS2 コートタンパク質と融合する、請求項 32 に記載の方法。

〔項 36〕

5' UTR 配列または 3' UTR 配列が少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、またはそれよりも多くの MS2 ヘアピン配列を含む、請求項 1 から 35 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 37〕

20

5' UTR 配列または 3' UTR 配列が、mRNA のポリ A 尾部とエンドヌクレアーゼおよび / または逆転写酵素との相互作用を促進または増強する配列を含む、請求項 17 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 38〕

5' UTR 配列または 3' UTR 配列が、ポリ A 結合タンパク質 (PABP) とエンドヌクレアーゼおよび / または逆転写酵素との相互作用を促進または増強する配列を含む、請求項 17 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 39〕

5' UTR 配列または 3' UTR 配列が、エンドヌクレアーゼおよび / または逆転写酵素の mRNA に対する特異性を、細胞によって発現される別の mRNA と比べて向上させる配列を含む、請求項 17 から 38 のいずれか一項に記載の方法。

30

〔項 40〕

5' UTR 配列または 3' UTR 配列が A1u エlement 配列を含む、請求項 1 から 32 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 41〕

ORF1p をコードする第 1 の配列とエンドヌクレアーゼおよび / または逆転写酵素をコードする第 2 の配列とが同じプロモーターを有する、請求項 26 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 42〕

挿入配列が、ORF1p をコードする第 1 の配列のプロモーターと異なるプロモーターを有する、請求項 24 から 41 のいずれか一項に記載の方法。

40

〔項 43〕

挿入配列が、エンドヌクレアーゼおよび / または逆転写酵素をコードする第 2 の配列のプロモーターと異なるプロモーターを有する、請求項 17 から 42 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 44〕

ORF1p をコードする第 1 の配列ならびに / またはエンドヌクレアーゼおよび / もしくは逆転写酵素をコードする第 2 の配列が、誘導性プロモーター、CMV プロモーターまたは転写開始部位、T7 プロモーターまたは転写開始部位、EF1a プロモーターまたは転写開始部位、およびそれらの組合せからなる群から選択されるプロモーターまたは転写

50

開始部位を有する、請求項 2 6 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 4 5〕

挿入配列が、誘導性プロモーター、CMVプロモーターまたは転写開始部位、T7プロモーターまたは転写開始部位、EF1aプロモーターまたは転写開始部位、およびそれらの組合せからなる群から選択されるプロモーターまたは転写開始部位を有する、請求項 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 4 6〕

ORF1pをコードする第1の配列とエンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素をコードする第2の配列とが、ヒト細胞における発現に対してコドン最適化される、請求項 2 6 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 4 7〕

mRNAがWPREエレメントを含む、請求項 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 4 8〕

mRNAが選択マーカを含む、請求項 1 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 4 9〕

mRNAが親和性タグをコードする配列を含む、請求項 1 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 5 0〕

親和性タグがエンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素をコードする配列と連結する、請求項 4 9 に記載の方法。

〔項 5 1〕

3'UTRがポリA配列を含むか、またはポリA配列が*in vitro*においてmRNAに付加される、請求項 1 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 5 2〕

ポリA配列がエンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素をコードする配列の下流にある、請求項 5 1 に記載の方法。

〔項 5 3〕

挿入配列がポリA配列の上流にある、請求項 5 1 または 5 2 に記載の方法。

〔項 5 4〕

3'UTR配列が挿入配列を含む、請求項 1 から 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 5 5〕

挿入配列が、外来ポリペプチドをコードする配列の逆相補鎖である配列を含む、請求項 1 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 5 6〕

挿入配列がポリアデニル化部位を含む、請求項 1 から 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 5 7〕

挿入配列がSV40ポリアデニル化部位を含む、請求項 1 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 5 8〕

挿入配列が、外来ポリペプチドをコードする配列の逆相補鎖である配列の上流にポリアデニル化部位を含む、請求項 1 から 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 5 9〕

挿入配列が、リボソーム座位ではない座位においてゲノムに組み込まれる、請求項 1 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 0〕

挿入配列が遺伝子または遺伝子の調節領域に組み込まれ、それによって遺伝子を破壊するかまたは遺伝子の発現を下方制御する、請求項 1 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 1〕

挿入配列が遺伝子または遺伝子の調節領域に組み込まれ、それによって遺伝子の発現を

10

20

30

40

50

上方制御する、請求項 1 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 2〕

挿入配列がゲノムに組み込まれ、遺伝子を置き換える、請求項 1 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 3〕

挿入配列がゲノムに安定に組み込まれる、請求項 1 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 4〕

挿入配列がゲノムにレトロ転移する、請求項 1 から 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 5〕

挿入配列が、mRNA によってコードされるエンドヌクレアーゼによる標的部位の DNA 鎖の切断によってゲノムに組み込まれる、請求項 1 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 6〕

挿入配列が、標的をプライマーとする逆転写 (T P R T) を介してゲノムに組み込まれる、請求項 1 から 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 7〕

挿入配列が、mRNA のゲノムの DNA 標的部位への逆スプライシングを介してゲノムに組み込まれる、請求項 1 から 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 8〕

細胞が免疫細胞である、請求項 1 または 4 から 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 6 9〕

免疫細胞が T 細胞または B 細胞である、請求項 3 または 6 8 に記載の方法。

〔項 7 0〕

免疫細胞が骨髄細胞である、請求項 3 または 6 8 に記載の方法。

〔項 7 1〕

免疫細胞が、単球、マクロファージ、樹状細胞、樹状前駆細胞、およびマクロファージ前駆細胞からなる群から選択される、請求項 3 または 6 8 に記載の方法。

〔項 7 2〕

mRNA が自己組み込み mRNA である、請求項 1 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 7 3〕

細胞に mRNA を導入するステップを含む、請求項 1 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 7 4〕

細胞に mRNA をコードするベクターを導入するステップを含む、請求項 1 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 7 5〕

mRNA または mRNA をコードするベクターを細胞に *ex vivo* において導入するステップを含む、請求項 1 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 7 6〕

前記細胞をヒト対象に投与するステップをさらに含む、請求項 7 5 に記載の方法。

〔項 7 7〕

mRNA または mRNA をコードするベクターをヒト対象に投与するステップを含む、請求項 1 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 7 8〕

免疫応答がヒト対象において誘発されない、請求項 7 6 または 7 7 に記載の方法。

〔項 7 9〕

mRNA またはベクターが実質的に非免疫原性である、請求項 7 6 または 7 7 に記載の方法。

〔項 8 0〕

10

20

30

40

50

ベクターがプラスミドまたはウイルスベクターである、請求項 1 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 8 1〕

ベクターが非 L T R レトロトランスポゾンを含む、請求項 1 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 8 2〕

ベクターがヒト L 1 エlementを含む、請求項 1 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 8 3〕

ベクターが L 1 レトロトランスポゾン O R F 1 遺伝子を含む、請求項 1 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 8 4〕

ベクターが L 1 レトロトランスポゾン O R F 2 遺伝子を含む、請求項 1 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 8 5〕

ベクターが L 1 レトロトランスポゾンを含む、請求項 1 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 8 6〕

m R N A が少なくとも約 1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または 3 キロベースである、請求項 1 から 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 8 7〕

m R N A が最大で約 2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、または 5 キロベースである、請求項 1 から 8 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 8 8〕

m R N A が m R N A の分解を阻害または防止する配列を含む、請求項 1 から 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 8 9〕

m R N A の分解を阻害または防止する配列が、エキソヌクレアーゼまたは R N A s e による m R N A の分解を阻害または防止する、請求項 8 8 に記載の方法。

〔項 9 0〕

m R N A の分解を阻害または防止する配列が、G 4 構造、シュードノット、または三重鎖配列である、請求項 8 8 に記載の方法。

〔項 9 1〕

m R N A の分解を阻害または防止する配列が、フラビウイルス R N A 由来のエキソリボヌクレアーゼ耐性 R N A 構造または K S V 由来の E N E エlementである、請求項 8 8 に記載の方法。

〔項 9 2〕

m R N A の分解を阻害または防止する配列が、デアデニラーゼによる m R N A の分解を阻害または防止する、請求項 8 8 に記載の方法。

〔項 9 3〕

m R N A の分解を阻害または防止する配列が、m R N A のポリ A 尾部の内部または末端に非アデノシンヌクレオチドを含む、請求項 8 8 に記載の方法。

〔項 9 4〕

m R N A の分解を阻害または防止する配列が m R N A の安定性を向上させる、請求項 8 8 に記載の方法。

〔項 9 5〕

外来配列が外来ポリペプチドをコードする配列を含む、請求項 1 から 9 4 のいずれか一

10

20

30

40

50

項に記載の方法。

〔項 9 6〕

外来ポリペプチドをコードする配列が、エンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素をコードする配列とインフレームではない、請求項 9 5 に記載の方法。

〔項 9 7〕

外来ポリペプチドをコードする配列が、エンドヌクレアーゼおよび/または逆転写酵素をコードする配列とインフレームではない、請求項 9 5 または 9 6 に記載の方法。

〔項 9 8〕

外来配列がイントロンを含まない、請求項 9 5 から 9 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 9 9〕

外来配列が、酵素、受容体、輸送タンパク質、構造タンパク質、ホルモン、抗体、収縮タンパク質、および貯蔵タンパク質からなる群から選択される外来ポリペプチドをコードする配列を含む、請求項 9 5 から 9 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 0 0〕

外来配列が、キメラ抗原受容体 (CAR)、リガンド、抗体、受容体、および酵素からなる群から選択される外来ポリペプチドをコードする配列を含む、請求項 9 5 から 9 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 0 1〕

外来配列が調節配列を含む、請求項 1 から 9 4 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 0 2〕

調節配列がシス作用性調節配列を含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

〔項 1 0 3〕

調節配列が、エンハンサー、サイレンサー、プロモーター、または応答エレメントからなる群から選択されるシス作用性調節配列を含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

〔項 1 0 4〕

調節配列がトランス作用性調節配列を含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

〔項 1 0 5〕

調節配列が、転写因子をコードするトランス作用性調節配列を含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

〔項 1 0 6〕

挿入配列の組み込みが細胞の健康状態に悪影響を及ぼさない、請求項 1 から 1 0 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 0 7〕

エンドヌクレアーゼ、逆転写酵素、またはその両方が、挿入配列の部位特異的組み込みが可能である、請求項 1 から 1 0 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 0 8〕

mRNA が、追加のヌクレアーゼドメインまたは ORF 2 に由来しないヌクレアーゼドメインをコードする配列を含む、請求項 1 から 1 0 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 0 9〕

mRNA が、メガTALヌクレアーゼドメイン、TALEドメイン、Cas9ドメイン、R2レトロエレメント由来のジンクフィンガー結合ドメイン、またはAAV由来のRep78等の反復配列に結合するDNA結合ドメインをコードする配列を含む、請求項 1 から 1 0 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 0〕

エンドヌクレアーゼが、エンドヌクレアーゼの活性を、変異を有しないエンドヌクレアーゼと比較して低下させる変異を含む、請求項 1 7 から 1 0 9 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 1〕

エンドヌクレアーゼがORF 2 pエンドヌクレアーゼであり、変異がS228Pである、請求項 1 1 0 に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔項 1 1 2〕

mRNA が、逆転写酵素の正確性および / またはプロセシング能を向上させるドメインをコードする配列を含む、請求項 1 7 から 1 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 3〕

逆転写酵素が、ORF 2 以外のレトロエレメント由来の逆転写酵素、または ORF 2 p の逆転写酵素と比較してより高い正確性および / もしくはプロセシング能を有する逆転写酵素である、請求項 1 7 から 1 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 4〕

逆転写酵素がグループ I イントロン逆転写酵素である、請求項 1 1 3 に記載の方法。

〔項 1 1 5〕

グループ I イントロン逆転写酵素が、グループ I A イントロン逆転写酵素、グループ I B イントロン逆転写酵素、またはグループ I C イントロン逆転写酵素である、請求項 1 1 4 に記載の方法。

〔項 1 1 6〕

グループ I イントロン逆転写酵素が TGIRT - I I または TGIRT - I I I である、請求項 1 1 4 に記載の方法。

〔項 1 1 7〕

mRNA が、A1u エレメントおよび / またはリボソーム結合アプタマーを含む配列を含む、請求項 1 から 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 8〕

mRNA が、DNA 結合ドメインを含むポリペプチドをコードする配列を含む、請求項 1 から 1 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 1 9〕

3' UTR 配列がウイルス 3' UTR またはベータ - グロビン 3' UTR に由来する、請求項 1 から 1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 2 0〕

組換え mRNA または mRNA をコードするベクターを含む組成物であって、mRNA が、

(i) ヒト LINE - 1 トランスポゾン 5' UTR 配列、

(ii) 該ヒト LINE - 1 トランスポゾン 5' UTR 配列の下流にある ORF 1 p をコードする配列、

(iii) 該 ORF 1 p をコードする配列の下流にある ORF 間リンカー配列、

(iv) 該 ORF 間リンカー配列の下流にある ORF 2 p をコードする配列、および

(v) 該 ORF 2 p をコードする配列の下流にあるヒト LINE - 1 トランスポゾンに由来する 3' UTR 配列

を含むヒト LINE - 1 トランスポゾン配列を含み、

3' UTR 配列が挿入配列を含み、挿入配列が、外来ポリペプチドをコードする配列の逆相補鎖または外来調節エレメントをコードする配列の逆相補鎖である、組成物。

〔項 1 2 1〕

挿入配列が、細胞に導入される場合、細胞のゲノムに組み込まれる、請求項 1 2 0 に記載の組成物。

〔項 1 2 2〕

挿入配列が状態または疾患と関連する遺伝子に組み込まれ、それによって遺伝子を破壊するかまたは遺伝子の発現を下方制御する、請求項 1 2 1 に記載の組成物。

〔項 1 2 3〕

挿入配列が遺伝子に組み込まれ、それによって遺伝子の発現を上方制御する、請求項 1 2 1 に記載の組成物。

〔項 1 2 4〕

mRNA が、配列番号 3 5 ~ 5 0 からなる群から選択される配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 2 1 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

〔項 1 2 5〕

組換え mRNA または mRNA をコードするベクターが単離または精製される、請求項 1 2 1 に記載の組成物。

〔項 1 2 6〕

(a) 長鎖散在反復配列 (LINE) ポリペプチドであって、ヒト ORF 1 p およびヒト ORF 2 p を含む、LINE ポリペプチドと、(b) 挿入配列であって、外来ポリペプチドをコードする配列の逆相補鎖または外来調節エレメントをコードする配列の逆相補鎖である、挿入配列とをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む組成物であって、実質的に非免疫原性である、組成物。

〔項 1 2 7〕

ヒト ORF 1 p およびヒト ORF 2 p タンパク質を含む、請求項 1 2 6 に記載の組成物。

〔項 1 2 8〕

前記核酸と複合体を形成したヒト ORF 1 p およびヒト ORF 2 p を含むリボ核タンパク質 (RNP) を含む、請求項 1 2 6 または 1 2 7 に記載の組成物。

〔項 1 2 9〕

核酸が mRNA である、請求項 1 2 7 または 1 2 8 に記載の組成物。

〔項 1 3 0〕

請求項 1 2 0 から 1 2 9 のいずれか一項に記載の組成物を含む細胞を含む組成物。

〔項 1 3 1〕

細胞が免疫細胞である、請求項 1 3 0 に記載の組成物。

〔項 1 3 2〕

免疫細胞が T 細胞または B 細胞である、請求項 1 3 1 に記載の組成物。

〔項 1 3 3〕

免疫細胞が骨髄細胞である、請求項 1 3 1 に記載の組成物。

〔項 1 3 4〕

免疫細胞が、単球、マクロファージ、樹状細胞、樹状前駆細胞、およびマクロファージ前駆細胞からなる群から選択される、請求項 1 3 1 に記載の組成物。

〔項 1 3 5〕

挿入配列が外来ポリペプチドをコードする配列の逆相補鎖であり、外来ポリペプチドがキメラ抗原受容体 (CAR) である、請求項 1 2 0 から 1 3 4 のいずれか一項に記載の組成物。

〔項 1 3 6〕

請求項 1 2 0 から 1 3 5 のいずれか一項に記載の組成物と、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

〔項 1 3 7〕

遺伝子療法における使用のための、請求項 1 3 6 に記載の医薬組成物。

〔項 1 3 8〕

疾患または状態を処置するための医薬の製造における使用のための、請求項 1 3 6 に記載の医薬組成物。

〔項 1 3 9〕

疾患または状態を処置することにおける使用のための、請求項 1 3 6 に記載の医薬組成物。

〔項 1 4 0〕

対象における疾患を処置する方法であって、疾患または状態を有する対象に請求項 1 3 6 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

〔項 1 4 1〕

対象におけるタンパク質または機能性 RNA の量または活性を増加する、請求項 1 4 0 に記載の方法。

〔項 1 4 2〕

対象が不十分な量または活性のタンパク質または機能性 RNA を有する、請求項 1 4 0

10

20

30

40

50

または 1 4 1 に記載の方法。

〔項 1 4 3〕

不十分な量または活性のタンパク質または機能性 RNA が、疾患もしくは状態と関連するかまたは疾患もしくは状態を引き起こす、請求項 1 4 2 に記載の方法。

〔項 1 4 4〕

ヒトサイレンシングハブ (HUSH) 複合体を阻害する薬剤、FAM208A を阻害する薬剤、または TRIM28 を阻害する薬剤を投与するステップをさらに含む、請求項 1 4 0 から 1 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 1 4 5〕

ヒトサイレンシングハブ (HUSH) 複合体を阻害する薬剤が、ペリフィリン、TASOR、および / または MPP8 を阻害する薬剤である、請求項 1 4 4 に記載の方法。

〔項 1 4 6〕

ヒトサイレンシングハブ (HUSH) 複合体を阻害する薬剤が HUSH 複合体の集合を阻害する、請求項 1 4 4 に記載の方法。

〔項 1 4 7〕

ファンコニ貧血複合体を阻害する薬剤を投与するステップをさらに含む、請求項 1 4 0 から 1 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

配列

[0489] 以下は、実施例において使用される構築物の例示的な配列である。これらの配列は参照例示を目的としており、当業者によって過度の実験を行わずに想到される配列の変形および最適化は本開示によって企図および包含される。配列の表題に mRNA 配列と記載される場合、構築物は DNA 鋳型のヌクレオチドを記載しており、当業者は対応する mRNA 配列を容易に得ることができる。

10

20

30

40

50