

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-518638
(P2025-518638A)

(43)公表日 令和7年6月18日(2025.6.18)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54		Z N A 4 C 0 7 6
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10		4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全65頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2025-513495(P2025-513495)			(71)出願人	524415593
(86)(22)出願日	令和5年5月12日(2023.5.12)				インテグラ セラピューティクス
(85)翻訳文提出日	令和6年12月26日(2024.12.26)				スペイン国, 0 8 0 0 3 バルセロナ,
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/062736				8 8 , カレ デル ドクター・アイグエダ
(87)国際公開番号	WO2023/218021				ー, バルセロナ バイオメディカル リサ
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)				ーチ パーク
(31)優先権主張番号	63/341,619			(71)出願人	523227812
(32)優先日	令和4年5月13日(2022.5.13)				ユニバーシタット ポンベウ ファブラ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				スペイン国, 0 8 0 0 2 バルセロナ,
(31)優先権主張番号	22191966.5			(74)代理人	100114775
(32)優先日	令和4年8月24日(2022.8.24)				弁理士 高岡 亮一
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)			(74)代理人	100121511
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ				弁理士 小田 直
			最終頁に続く	(74)代理人	100202751
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 導入遺伝子の発現および核局在化を改善するためのトランスポザーゼの使用

(57)【要約】

本発明は、トランスポザーゼを使用して、細胞集団における目的の導入遺伝子の発現を増大させ、および／または細胞集団における目的の導入遺伝子の核局在化を増大させる方法に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞集団において少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の核局在化を増大させる *in vitro* での方法であって、前記細胞集団を、

トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、またはそれをコードする核酸、および

前記少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と接触させるステップを含む、方法。

【請求項 2】

前記少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子が、少なくとも1つの末端逆位配列 (ITR) をさらに含む、請求項 1 に記載の *in vitro* での方法。

【請求項 3】

前記トランスポザーゼもしくはフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチドが、トランスポザーゼまたはそのフラグメントと、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質とを含む融合タンパク質である、請求項 1 または 2 に記載の *in vitro* での方法。

【請求項 4】

前記少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質が、ヌクレアーゼである、請求項 3 に記載の *in vitro* での方法。

【請求項 5】

前記融合タンパク質が、配列番号 2 と少なくとも 75 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 3 または 4 に記載の *in vitro* での方法。

【請求項 6】

前記細胞集団をガイド RNA (gRNA) と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の *in vitro* での方法。

【請求項 7】

前記少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質が、アプタマー結合タンパク質である、請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の *in vitro* での方法。

【請求項 8】

前記アプタマー結合タンパク質が、好ましくは配列番号 39 を有する、MS2 バクテリオファージコートタンパク質 (MCP) である、請求項 7 に記載の *in vitro* での方法。

【請求項 9】

前記融合タンパク質が、MCP を介して gRNA 分子と、共有結合によりまたは非共有結合により相互作用するかまたは相互作用することが可能であり、前記 gRNA が、少なくとも1つの MS2 アプタマーを含み、好ましくは、MS2 アプタマーが、配列番号 40 を有するリボ核酸配列を有する、請求項 8 に記載の *in vitro* での方法。

【請求項 10】

前記トランスポザーゼが、高活性 PiggyBac トランスポザーゼ、PiggyBac トランスポザーゼ、Sleeping Beauty トランスポザーゼ、SB11 トランスポザーゼ、Tol2 トランスポザーゼ、Mos1 トランスポザーゼ、および Frog Prince トランスポザーゼからなる群から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記トランスポザーゼが、配列番号 1 を有する高活性 PiggyBac トランスポザーゼのアミノ酸配列と比較して少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、改変された高活性 PiggyBac トランスポザーゼである、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記トランスポザーゼまたはそのフラグメントが、触媒作用を有しない、請求項 1 ~ 11

10

20

30

40

50

1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記触媒作用を有しないトランスポザーゼが、配列番号 3 と少なくとも 75 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

それを必要とする対象の遺伝性疾患の処置に使用するための、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、またはそれをコードする核酸であって、

前記それを必要とする対象に、少なくとも 1 つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子をさらに投与し、

前記それを必要とする対象の少なくとも 1 つの細胞での前記目的の導入遺伝子の発現が、前記遺伝性疾患の原因である遺伝子欠損を補う、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、またはそれをコードする核酸。

【請求項 1 5】

請求項 2 ～ 1 3 のいずれか 1 つ以上に記載の特性をさらに含む請求項 1 4 に記載の使用のための、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、またはそれをコードする核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞集団において導入遺伝子の発現を改善するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞および組織の中に核酸またはタンパク質を導入するための効率的な方法を有することは、遺伝子操作にとって重要である。この目的のため、たとえばウイルス感染、エレクトロポレーション、ポリマーおよびナノ粒子によるトランスフェクションなどの様々な方法が開発されている。これらの方法は、トランスフェクションにおいて高い効率を可能にするが、目的の DNA の核の中への導入は、依然として主要な課題となっている。

【0003】

実際に、細胞に侵入した後、外来 DNA は、核に到達する前に様々な障害に直面する。まず、哺乳動物細胞は、インターフェロン系などの外来 DNA を検知かつ制御することを目的とする防御機構を備えている。Semenova ら (Nucleic acids research 2019, vol. 47, 19) は、トランスフェクション後数時間以内に細胞質 DNA がトランスフェクトした DNA に結合し、炎症誘発性応答をもたらすことを報告している。第 2 に、外来 DNA 分子は、核膜の障壁を通り抜けなければならない。Vandenbroucke ら (Nucleic acids research 2007, vol. 35, 12) は、核原形質輸送を増大させるため両親媒性分子によって核膜孔複合体 (NPC) の活性を調節することを提案した；しかしながら、両親媒性分子は、特定のレベルの毒性に関連しており、これらは、特定の DNA 担体に関する核への取り込みの増大を可能にしないように思われる。

【0004】

外来 DNA を核内に転移させる場合の他のさらなる障害は、輸送、細胞タイプの特異性、および細胞分裂であり得る (レビューに関しては、Bai et al. “Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA.” Bioscience reports, 2017, vol. 37, 6 を参照されたい)。

【0005】

よって、外来 DNA が (in vivo および in vitro にて) 真核細胞の核に到達することが困難であることは、多くのトランスフェクション法が克服しようと試みて

10

20

30

40

50

きた問題である。本発明は、目的の導入遺伝子をITRで囲み、トランスフェクション混合物にトランスポザーゼを添加することによりこの外来DNAの核内への局在化を助けることにある解決策を提供する。

【0006】

トランスポザーゼは、原核生物のゲノムDNA（たとえばTn3、Tn5、およびTn7）または真核生物のゲノムDNA（たとえばSleeping BeautyおよびPiggyBac）の中にDNAフラグメントを「カットアンドペースト」または「コピーアンドペースト」するように天然に発達した酵素である。これらの酵素は、ゲノムの毒性を回避するように低い転移効率で特定の種のゲノムに見出されている。トランスポザーゼは、トランスポゾンと呼ばれる特異的な末端逆位配列（ITR）を含むペイロードDNAに結合し、この配列をコピーまたはカットして無作為なまたは半無作為なゲノム部位にこれをペーストする。大部分のDNA結合タンパク質と同様に、トランスポザーゼは、核局在化シグナルにより核に天然に向けられる（たとえばKeith et al. “Analysis of the piggyBac transposase reveals a functional nuclear targeting signal in the 94 c-terminal residues.” BMC Molecular Biology 2008, vol. 9, 72を参照）。

10

【0007】

最先端技術は、それらの効率を増大させ、哺乳動物のゲノム編集のためのツールを作製するように改変された異なるトランスポザーゼ、たとえばSB100または高活性PiggyBacを含む。トランスポザーゼはまた、特定のゲノムDNA位置を特異的に標的とし、編集するために、たとえばCas9（たとえば国際特許公開公報第2022129438号または同第2020243085号参照）、dead Cas9（たとえばHewらの“RNA-guided piggyBac transposition in human cells.” Synthetic Biology 2019, vol. 4, 1を参照）などのDNA結合ドメインに融合している。

20

【0008】

しかしながら、トランスポザーゼは、ゲノム編集のためのツールとして記載されているが（たとえばZhaoらの“PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene encoding.” Translational Lung Cancer Research 2016, vol. 5, 1を参照）、それらの適用は、宿主細胞のDNAに遺伝子を挿入するためまたは遺伝子を破壊するためにそれらの挿入活性に依存しており、このことはまた挿入変異誘発の問題も呈する。

30

【0009】

さらに、能動的に分裂（増殖）する細胞は、非分裂性の休止状態の細胞よりもかなり良好に核酸を内部移行するため（Bai et al. 2017）、トランスフェクションは、通常能動的に分裂（増殖）する細胞で行われ、特に、培養物において分裂しないコンフルエントな細胞または特定の細胞タイプをトランスフェクトすることは特に困難である。よって、非分裂性細胞におけるトランスフェクション効率を改善する必要がある。

40

【0010】

よって、本発明は、核酸の細胞質形質導入を促進するビヒクルと共にトランスポザーゼを使用することにより、目的のDNAの核局在化または核での取り込みを増大させることができ、そこでこれを細胞により発現（すなわち一過性に発現、トランスフェクト）させる、またはゲノムDNAに挿入することができるというエビデンスを提供する。また本発明の方法は、休止状態の細胞の効率的なトランスフェクションを可能にする。最後に、本発明の方法はまた、触媒的に不活性なトランスポザーゼを使用する場合に、挿入活性を伴わずに効率的なトランスフェクションを可能にする。

【発明の概要】

【0011】

50

本発明の目的は、細胞集団において少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の発現を増大させる方法であって、細胞集団を、

トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸、および

少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と接触させるステップを含む、方法である。

【0012】

本発明の別の目的は、細胞集団において少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の核局在化を増大させる方法であって、細胞集団を、

トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸、および

少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と接触させるステップを含む、方法である。

【0013】

本発明の別の目的は、細胞集団のゲノムを編集する方法であって、細胞集団を、

トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸、および

少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と接触させるステップを含む、方法である。

【0014】

本発明の別の目的は、それを必要とする対象の遺伝性疾患を処置する方法であって、前記対象に、

トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸、および

少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の治療上有効量を投与するステップを含み、

それを必要とする対象の少なくとも1つの細胞における目的の導入遺伝子の発現が、前記遺伝性疾患の原因である遺伝子欠損を補う、方法である。

【0015】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、デオキシリボ核酸（DNA）分子である。一部の実施形態では、DNA分子は、相補DNA（cDNA）分子である。一部の実施形態では、DNA分子は、ゲノムDNA（gDNA）分子である。

【0016】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、少なくとも1つの末端逆位配列（ITR）をさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、2つのITR配列をさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのITR配列は、目的の導入遺伝子に隣接している。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、目的の導入遺伝子の両端に存在する2つのITR配列をさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのITR配列は、トランスポザーゼと相互作用するかまたは非共有結合により結合する。

【0017】

一部の実施形態では、DNA分子は、前記細胞集団のゲノム内に挿入される。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、細胞集団により安定して発現される。

【0018】

一部の実施形態では、目的の導入遺伝子は、外因性遺伝子である。一部の実施形態では、目的の導入遺伝子は、内因性遺伝子である。

【0019】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、プラスミド、フォスミド、コスミド、人工染色体、またはウイルスベクターに含まれている。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、プラスミドに含まれている。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、ウイルスベクターに含まれている。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、デュープロドナウイルス域 (Duplodnaviria)、モノドナウイルス域 (Monodnaviria)、およびバリドナウイルス域 (Varidnaviria) の域に由来するウイルスからなる群から選択されるDNAウイルスベースのベクターに含まれている。

10

【0020】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドは、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の核局在化を増大させる。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドは、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子を核へと転移させるか、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の核への転移を促進する。

【0021】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドは、トランスポザーゼまたはそのフラグメントと、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質とを含む融合タンパク質である。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、RNA誘導型ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、Casヌクレアーゼである。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、Cas9ヌクレアーゼである。

20

【0022】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、リンカーをさらに含む。

【0023】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2と少なくとも75%のアミノ酸配列同一性を有する。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を含むかまたはからなる。

30

【0024】

一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、アプタマー結合タンパク質である。一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、MS2バクテリオファージコートタンパク質 (MCP) である。一部の実施形態では、融合タンパク質は、少なくとも1つのMS2アプタマーを含むgRNA分子とMCPを介して共有結合によりまたは非共有結合により相互作用するかまたは相互作用することが可能である。一部の実施形態では、gRNA分子は、RNA誘導型ヌクレアーゼと、少なくとも1つのMS2アプタマーを介して共有結合によりまたは非共有結合により相互作用するかまたは相互作用することが可能である。

40

【0025】

一部の実施形態では、トランスポザーゼは、高活性PiggyBacトランスポザーゼ、PiggyBacトランスポザーゼ、Sleeping Beautyトランスポザーゼ、SB11トランスポザーゼ、Tol2トランスポザーゼ、Mos1トランスポザーゼ、およびFrog Princeトランスポザーゼからなる群から選択される。一部の実施形態では、トランスポザーゼは、高活性PiggyBacトランスポザーゼおよびSleeping Beautyトランスポザーゼからなる群から選択される。一部の実施形態では、トランスポザーゼは、高活性PiggyBacトランスポザーゼである。一部の実施形態では、トランスポザーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を有する高活性Piggy

50

y B a c トランスポザーゼである。一部の実施形態では、トランスポザーゼは、配列番号 1 の高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼのアミノ酸配列と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含む、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼである。一部の実施形態では、トランスポザーゼは、S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼである。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントは、低い触媒活性を有する。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントは、触媒作用を有しない。一部の実施形態では、触媒作用を有しないトランスポザーゼは、配列番号 3 と少なくとも 75 % のアミノ酸配列同一性を有する。一部の実施形態では、触媒作用を有しないトランスポザーゼは、配列番号 3 のアミノ酸配列を含むかまたはからなる。

【0026】

一部の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドは、トランスポザーゼフラグメントを含む。一部の実施形態では、トランスポザーゼフラグメントは、少なくとも 1 つのトランスポザーゼの機能的なドメインを含むかまたはからなる。一部の実施形態では、トランスポザーゼフラグメントは、I T R 結合ドメインを含むかまたはからなる。一部の実施形態では、トランスポザーゼフラグメントは、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼまたは S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼのフラグメントである。一部の実施形態では、トランスポザーゼフラグメントは、好ましくは I T R 結合ドメインを含む、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼのフラグメントである。一部の実施形態では、トランスポザーゼフラグメントは、好ましくは S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼの S B 1 0 0 ドメインおよび N 5 7 ドメインからなる群から選択される、S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼのフラグメントである。

【0027】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、リボ核酸 (R N A) 分子または D N A 分子である。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、R N A 分子である。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、メッセンジャー R N A (m R N A) 分子である。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、c D N A 分子またはプラスミドである。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、トランスフェクションまたは形質転換により細胞集団に送達される。一部の実施形態では、トランスフェクションは、リポフェクション、エレクトロポレーション、超音波処理、ナノ粒子、マイクロインジェクション、ならびに非組込み (n o n - i n t e g r a t i v e) ウイルスベクター感染および組み込みウイルスベクター感染を含むウイルスベクター感染からなる群から選択される。一部の実施形態では、形質転換は、組み込みウイルスベクターまたは改変された組み込みウイルスを使用することを含む。

【0028】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも 1 つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と共に細胞集団に送達される。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも 1 つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子より前に細胞集団に送達される。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも 1 つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の 1 時間 ~ 72 時間前に、細胞集団に送達される。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも 1 つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の約 4 時間前に、細胞集団に送達される。

【0029】

一部の実施形態では、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質も

10

20

30

40

50

しくはポリペプチド、または同物質をコードする核酸は、少なくとも1つの許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物に含まれている。

【0030】

一部の実施形態では、細胞集団は、真核細胞または原核細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、真核細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、原核細胞集団である。一部の実施形態では、本方法は、*in vitro*で行われる。一部の実施形態では、細胞集団は、*in vitro*で培養された細胞の集団である。一部の実施形態では、本方法は、*ex vivo*で行われる。一部の実施形態では、本方法は、*in vivo*で行われる。

【0031】

一部の実施形態では、細胞集団は、生体の組織または臓器に含まれている。一部の実施形態では、生物は、動物である。一部の実施形態では、生物は哺乳動物である。一部の実施形態では、生物はヒトである。

【0032】

一部の実施形態では、本方法は、細胞集団を、トランスポザゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸を含むベクターと接触させるステップと、1時間～72時間の範囲の期間、細胞集団を培養するステップと、細胞集団を少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子を含むベクターと接触させるステップとを含む。

【0033】

一部の実施形態では、本方法は、細胞集団を、トランスポザゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドを含むベクターと接触させるステップと、細胞集団を、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子を含むベクターと接触させるステップとを含む。

【0034】

定義

本発明において、以下の用語は、以下の意味を有する。

【0035】

「Cas9」または「Cas9ヌクレアーゼ」は、Cas9タンパク質またはそのフラグメント（たとえばCas9の活性または不活性DNA切断ドメイン、および／またはCas9のgRNA結合ドメインを含むタンパク質）を含むRNA誘導型ヌクレアーゼを指す。Cas9ヌクレアーゼはまた、場合によりcasn1ヌクレアーゼまたはCRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) 関連ヌクレアーゼとも呼ばれる。CRISPRは、可動性遺伝子エレメント（ウイルス、転移因子、接合性プラスミド）に対する保護を提供する適応免疫系である。CRISPRクラスターは、スペーサー、先行する可動性エレメントに相補的な配列、および核酸を侵す標的を含む。CRISPRクラスターは転写され、CRISPR RNA (crRNA) へとプロセシングされる。II型CRISPR系では、プレcrRNAの正確なプロセシングは、トランスにコードされた小分子RNA (tracrRNA)、内因性リボヌクレアーゼ3 (rnc)、およびCas9タンパク質を必要とする。tracrRNAは、プレcrRNAのリボヌクレアーゼ3により支援されるプロセシングのためのガイドとして機能する。その後、Cas9/crRNA/tracrRNA複合体は、エンドヌクレアーゼにより、スペーサーに相補的な直鎖状または環状dsDNA標的を切断する。crRNAに相補的でない標的鎖は、最初にエンドヌクレアーゼにより切断され、次に、3' - 5'にてエキソヌクレアーゼによりトリミングされる。本来、DNAの結合および切断は、典型的に、タンパク質および両RNAを必要

10

20

30

40

50

とする。しかしながら、シングルガイドRNA（「sgRNA」または単純に「gRNA」）を、crRNAおよびtracrRNAの両方の態様を単一のRNA種へ組み込むように操作することができる。Cas9は、CRISPR反復配列の短いモチーフ（PAMまたはプロトスペーサー隣接モチーフ）を認識し、自己を非自己と区別するのを助ける。Cas9ヌクレアーゼの配列および構造は、当業者に周知である。Cas9オルソログは、限定するものではないが、A群溶血性レンサ球菌（*S. pyogenes*）およびストレプトコッカスサーモフィルス（*S. thermophilus*）を含む様々な種で記載されている。

【0036】

「外因性」は、目的の細胞または生物に天然に存在しないが、1つ以上の遺伝的、生化学的、または他の方法によりそれに導入することができる任意の分子を指す。細胞または生物中の分子の天然の存在はまた、特定の発達段階およびその環境条件に即して決定され得る。よって、たとえば、筋肉の胚発達の間のみ存在する分子は、成体筋細胞に対して外因性分子である。同様に、熱ショックにより誘導される分子は、熱ショックを受けていない細胞に対して外因性分子である。外因性分子は、たとえば、機能不全の内因性分子の機能するバージョン、または正常に機能する内因性分子の機能不全型を含み得る。対照的に、用語「内因性」は、特定の環境条件下での特定の発達期の細胞または生物に通常存在する任意の分子を意味する。

【0037】

「融合タンパク質」は、共に融合した2つ以上の（すなわち2つ以上の異なるタンパク質および／またはペプチド由来の）アミノ酸配列を含む一本鎖ハイブリッドポリペプチドを指す。2つ以上のアミノ酸配列を、直接のペプチド結合を介するかまたはペプチドリナーを介して間接的に、共に融合させることができる。融合タンパク質は、特に、単一の核酸配列により完全にコードされてもよい。

【0038】

「遺伝子」は、典型的に、タンパク質をコードするDNA領域（すなわちコード領域）を指す。この用語はまた、それ自体がタンパク質をコードしないDNA領域（すなわち非コード領域）も含み得る。後者は、たとえば、機能的な非コードRNA分子（たとえば転移RNA、リボソームRNA、制御RNA（regulatory RNA）など）に転写される領域を含む。他の非コード領域は、コード領域の転写および翻訳を制御し（すなわち制御エレメント）、または構築上のエレメント（たとえばスキヤフォールド／マトリックス結合領域）、DNAの複製起点、セントロメア、もしくはテロメアなどとして機能する。制御エレメントは、限定するものではないが、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳制御配列（たとえばリボソーム結合部位〔RBS〕および配列内リボソーム進入部位〔IRES〕）、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス結合部位、および遺伝子座調節領域を含む。

【0039】

「同一性」または「同一の」は、2つ以上のアミノ酸配列または2つ以上の核酸配列の配列間の関係で使用される場合、2つ以上のアミノ酸残基または核酸残基の鎖間の一致数により決定される、アミノ酸配列間または核酸配列間の配列の関連性の度合いを指す。「同一性」は、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち「アルゴリズム」）により提示される（存在する場合は）ギャップアライメントを伴う2つ以上の配列の小さいほうの間の同一の一致のパーセントを測定する。関連するアミノ酸配列または核酸配列の同一性は、公知の方法により容易に計算され得る。このような方法は、限定するものではないが、Lesk A. M. (1988). Computational molecular biology: Sources and methods for sequence analysis. New York, NY: Oxford University Press; Smith D. W. (1993). Biocomputing: Informatics and genome projects. San Diego, CA: Academic Press; Gr

iffin A. M. & Griffin H. G. (1994). Computer analysis of sequence data, Part 1. Totowa, NJ: Humana Press; von Heijne G. (1987). Sequence analysis in molecular biology: treasure trove or trivial pursuit. San Diego, CA: Academic press; Gribskov M. R. & Devereux J. (1991). Sequence analysis primer. New York, NY: Stockton Press; Carillo et al., 1988. SIAM J Appl Math. 48 (5): 1073-82に記載されるものを含む。同一性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間で最大の一致を提供するように設計されている。同一性を決定する方法は、公開されたコンピュータプログラムで説明されている。2つの配列間の同一性を決定するための好ましいコンピュータプログラム法は、GAP (Genetic Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI; Devereux et al., 1984. Nucleic Acids Res. 12 (1 Pt 1): 387-95)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschul et al., 1990. J Mol Biol. 215 (3): 403-10)を含む、GCGプログラムパッケージを含。BLASTXプログラムは、アメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) および他の供給源 (BLAST Manual, Altschul et al., NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894) から公開されている。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

10

20

30

40

50

【0040】

「挿入」および「組み込み」は、核酸配列の、第2の核酸配列またはそのゲノムもしくは一部の中への付加を指す。挿入は、「特異的」であってもよく「部位特異的」であってもよく、「標的化」されてもよく、または「オンターゲット」であってもよい：これら形容詞は、第2の核酸の特定の部位またはそのゲノムもしくは一部の特定の部位（すなわち、挿入に関して意図的に選択されている部位）の中への核酸の挿入を定義する。逆に、形容詞「無作為の」、「標的化されていない」または「オフターゲットの」は、望ましくない部位への核酸の非特異的および／または意図していない挿入を指す。用語「総合的な」または「全体的な」は、挿入の総数を指す。

【0041】

「リンカー」は、2つの隣接する分子または部分を連結する化学基または分子を指す。

【0042】

「改変された」は、対応する非改変タンパク質または核酸の配列とは異なるタンパク質または核酸の配列を指す。

【0043】

配列（たとえばアミノ酸配列または核酸配列）に関連する「変異した」は、配列が、野生型配列などの参照配列とは異なることを意味する。典型的に、変異した配列は、対応する野生型配列などの参照配列と比較して、1つ以上の残基の置換、付加、または欠失のうちの少なくとも1つを含む。

【0044】

「変異」は、配列、たとえば核酸もしくはアミノ酸の配列内の残基の別の残基での置換、および／または核酸もしくはアミノ酸の配列内の1つ以上の残基の欠失もしくは挿入を指す。変異は、本明細書において、典型的に、元の残基、次いで配列内の残基の位置を同定し、次に新規に置換された残基の同一性を同定することにより説明される。本明細中提供されるアミノ酸置換（変異）を作製するための様々な方法が、当該分野で周知であり、たとえばGreen & Sambrook, 2012 (Molecular cloning: a laboratory manual (4th Ed.)). Co

ld Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) に記載されている。

【0045】

「ヌクレアーゼ」は、核酸配列内の核酸の加水分解を触媒する酵素を指す。ヌクレアーゼ活性は、DNAまたはRNAであり得る一本鎖または二本鎖の核酸分子の破断をもたらし得る。

【0046】

「核酸（分子／配列）」および「ヌクレオチド配列」は、単量体のヌクレオチドから構成されるかまたはこれを含むいずれかの分子を指すように互換可能に使用され得る。核酸は、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであってもよく；これは、DNA、RNA、またはそれらの混合物であり得る。これは、化学的に改変されてもよくまたは人工的であってもよく、たとえばこれは、ペプチド核酸（PNA）、モルフォリノおよびロックド核酸（LNA）、ならびにグリコール核酸（GNA）およびトレオース核酸（TNA）を包有する。これらの核酸はそれぞれ、分子の骨格の変化により天然に存在するDNAまたはRNAと異なる。また、ホスホロチオエートヌクレオチドを使用してもよい。他のデオキシヌクレオチドアナログは、限定するものではないが、メチルホスホン酸、ホスホロアミド酸、ホスホロジチオアート、N3' P5' ホスホロアミド酸およびオリゴリボヌクレオチドホスホロチオエート、およびそれらの2' O-アリアルアナログおよび本開示の核酸で使用され得る2' O-メチルリボヌクレオチドメチルホスホン酸を含む。

【0047】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」、および「アミノ酸配列」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換可能に使用される。明記されない限り、アミノ酸残基のポリマーは、任意の長さであってもよい。またこの用語は、1つ以上のアミノ酸が、対応する天然に存在するアミノ酸の化学的アナログまたは改変された誘導体であるアミノ酸ポリマーにも当てはまる。

【0048】

「防止」およびそのいずれかの語形変化は、予防的および防止的手段を指し、この目的は、対象が所定の期間にわたり所定の病態または障害を発症する機会を低減させることである。このような低減は、たとえば対象の病態または障害の少なくとも1つの症状の発症の遅延によって反映され得る。

【0049】

「特異性」は、選択された配列に対して、配列同一性の度合いを共有する配列に選択的に結合する能力を指す。

【0050】

「対象」は、哺乳動物、好ましくはヒトを指す。対象は、「患者」、すなわち、医療の受診を待機しているか、または医療を受診しているか、または過去／現在／将来に医療の対象であった／ある／あり得るか、または疾患の発症に関してモニタリングされている温血動物、好ましくはヒトであり得る。用語「哺乳動物」は、ここでは、ヒト、飼育動物および家畜、ならびに動物園の、競技用、またはペット用の動物、たとえばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む任意の哺乳動物を指す。好ましくは、哺乳動物は、霊長類、より好ましくはヒトである。

【0051】

「形質導入」およびそのいずれかの語形変化は、ウイルスベクター担体、たとえば限定するものではないがレトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、およびそれらに由来するベクターを含むウイルス、ウイルス粒子、またはウイルスベクターを使用した、1つ以上の細胞内への1つ以上の核酸分子（DNAおよび／またはRNA）の導入を指す。

【0052】

「トランスフェクション」およびその語形変化は、*in vitro*または*in vivo*に関わらず、非ウイルス性的手段による1つ以上の核酸分子（DNAおよび／または

10

20

30

40

50

R N A) の 1 つ以上の細胞内への導入を指す。言い換えると、「トランスフェクション」は、核酸分子またはカーゴの細胞質内の形質導入を促進または増大させる当該分野で公知である任意の方法、技術、またはビヒクルを指す。トランスフェクションのための方法は、当該分野で周知であり、たとえばリポフェクション、P E I、およびエレクトロポレーションを含む。

【 0 0 5 3 】

「導入遺伝子」は、遺伝子産物をコードする外因性核酸配列、特に外因性 D N A または c D N A を指す。遺伝子産物は、R N A、ペプチド、またはタンパク質であり得る。遺伝子産物のコード領域 (C D S) に加え、導入遺伝子は、発現を促進または亢進するための 1 つ以上の操作可能な配列、たとえばプロモーター、エンハンサー、応答エレメント、レポーターエレメント、インスレーターエレメント、ポリアデニル化シグナル、および／または他の機能的なエレメントを含んでもよく、またはこれらと会合してもよい。本開示の実施形態は、それ以外であることが明記されない限り、任意の既知の適切なプロモーター、エンハンサー、応答エレメント、レポーターエレメント、インスレーターエレメント、ポリアデニル化シグナル、および／または他の機能的なエレメントを利用してもよい。適切なエレメントおよび配列は、当業者に周知である。

10

【 0 0 5 4 】

「トランスポザーゼ」は、トランスポゾンの末端に結合し、カットアンドペーストの機構または複製的な転移機構によりゲノムの別の位置へのトランスポゾンの移動を触媒する酵素を指す。本発明の範囲内において、トランスポザーゼは、トランスポザーゼのフラグメント、たとえば I T R 結合ドメインまたは機能的なドメイン、好ましくは I T R 結合ドメインであり得る。

20

【 0 0 5 5 】

「処置」、「軽減」、「キュレーション」、およびそれらのいずれかの語形変化は、予防的または防止的手段を除外した治療上の処置を表し、ここでの目的は、目的の病態または障害の発展を遅延、減弱、停止、またはさらには (部分的もしくは完全に) 反転させることである。処置を必要とするものは、障害をすでに有するもの、および障害を有する疑いのあるものを含む。対象が目的の病態または障害に関する処置を受けた後に、病態または障害に関連する 1 つ以上の症状の観察可能および／もしくは測定可能な低減；ある程度までの軽減；罹患率および／もしくは死亡率の低下；ならびに／またはクオリティオブライフの改善を示す場合に、当該病態または障害に関する「処置」は成功している。処置の成功および疾患の改善を評価するための上記のパラメータは、医師によく知られている規定の手法により容易に測定可能である。

30

【 0 0 5 6 】

「ベクター」は、本明細書中使用される場合、たとえば目的の第 2 のポリヌクレオチドを有することができ、たとえば標的細胞に遺伝子配列を移入することができる、任意のポリヌクレオチドを指す。よって、この用語は、クローニング、および発現ビヒクル、および組み込みベクターを含む。

【 0 0 5 7 】

詳細な説明

40

細胞の集団において目的の導入遺伝子を発現させることを試みる場合、生じ得る主な障害の 1 つは、目的の導入遺伝子を有する D N A 分子を核に到達させることが困難であることにより引き起こされ得る不十分な発現レベルである。本発明は、この問題に対処する。

【 0 0 5 8 】

よって、本発明は、細胞集団において少なくとも 1 つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の発現を増大させる方法に関する。

【 0 0 5 9 】

本発明はまた、細胞集団において少なくとも 1 つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の核局在化を増大させる方法にも関する。

【 0 0 6 0 】

50

本発明はまた、特に細胞集団のゲノムに少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子を挿入することにより、細胞集団のゲノムを編集する方法にも関する。

【0061】

本発明はまた、細胞集団、好ましくは非分裂性細胞集団において少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子をトランスフェクトする方法にも関する。

【0062】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子を、リポフェクション、エレクトロポレーション、超音波処理、ナノ粒子、マイクロインジェクション、PEI、ならびに非組み込みウイルスベクター感染および組み込みウイルスベクター感染を含むウイルスベクター感染を含むかまたはからなる群から選択される少なくとも1つの技術により細胞集団にトランスフェクトする。

10

【0063】

本発明は、細胞質トランスポザーゼが、細胞の核に核酸を送達することにより、その核局在化を増大させることが可能であるとの本発明者らによる知見に基づく。特に、細胞質トランスポザーゼは、核酸を、休止状態の細胞を含む細胞の核に転移する、または転移を促進することが可能である。よって、核局在化の増大は、核酸の発現レベルの増大を誘導する。興味深いことに、本発明者らは、トランスポザーゼによる核局在化の増大がその酵素活性に依存しないことを観察した。

【0064】

少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードするDNA分子は、細胞の細胞質に送達される際に、外来DNAの存在に対する応答（たとえば炎症性応答）を誘導する細胞の免疫系により検知されることが理解されている。加えて、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードするDNA分子はまた、核に到達するためには核膜を通過する必要がある。これらの問題は、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードするDNA分子が細胞質トランスポザーゼにより転移される場合に克服される。

20

【0065】

本発明では、これらの方法は、細胞集団を、

少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子、および

トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸と接触させるステップを含む。

30

【0066】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、トランスフェクションにより細胞集団に送達される。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、リポフェクション、エレクトロポレーション、超音波処理、ナノ粒子、マイクロインジェクション、PEI、ならびに非組み込みウイルスベクター感染および組み込みウイルスベクター感染を含むウイルスベクター感染を含むかまたはからなる群から選択される少なくとも1つの技術により細胞集団にトランスフェクトされる。

【0067】

一部の実施形態では、細胞集団を、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子、およびトランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸と、任意の順序で接触させてもよい。

40

【0068】

一部の実施形態では、細胞集団を、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸と同時に、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と接触させる。

【0069】

一実施形態では、細胞集団を、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸と接触させた後に、少なく

50

とも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と接触させる。別の実施形態では、細胞集団を、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と接触させた後に、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸と接触させる。

【0070】

用語「少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子」は、少なくとも1つの目的の産物をコードする、細胞、好ましくは真核細胞、より好ましくは哺乳動物細胞（ヒト細胞を含む）のゲノムに挿入される核酸配列を指す。目的の産物は、タンパク質またはそのフラグメントであってもよく；この場合、目的の導入遺伝子は、コード核酸配列と呼ばれる。しかしながら、この用語はまた、非コード核酸配列、すなわち、タンパク質またはそのフラグメントをコードしないが、たとえば転移RNA、リボソームRNA、小分子RNA、長鎖非コードRNAなどの「RNA遺伝子」（または「非コードRNA」）を発現する核酸配列を包有する。

10

【0071】

一部の実施形態では、目的の導入遺伝子は、ペプチドまたはタンパク質（限定するものではないが、酵素、転写因子、増殖因子、栄養性因子、ホルモン、サイトカイン、抗体、抗原、受容体、免疫調節因子、分化因子、自殺タンパク質、細胞周期改变タンパク質、抗増殖性タンパク質、血管新生因子、抗血管新生因子、ゲノム編集因子（genome editor）、ヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、トランスポザーゼ、神経伝達物質、およびレポーター（それらのいずれかの前駆体および融合タンパク質を含む））をコードする核酸配列である。この場合、目的の配列は、典型的に、mRNA、cDNA、gDNA、合成核酸、またはそれらのいずれかの組み合わせであり得る（またはそれに由来し得る）。

20

【0072】

一部の実施形態では、目的の導入遺伝子は、あるいは、非コードRNAの核酸配列である。

【0073】

非コードRNAの例として、限定するものではないが、転移RNA（tRNA）、リボソームRNA（rRNA）、核内低分子RNA（snRNA）、核小体低分子RNA（snoRNA）、SmY RNA、小分子Cajal体に特異的なRNA（scaRNA）、ガイドRNA（gRNA）、Y RNA、テロメラーゼRNA要素（TERC）、スプライスリーダーRNA（SL RNA）、触媒RNA（すなわちリボザイム；たとえばリボヌクレアーゼP、リボヌクレアーゼMRPなど）、アンチセンスRNA（aRNA）、cis-天然のアンチセンス転写物（cis-NAT）、CRISPR RNA（crRNA）、長鎖非コードRNA（lncRNA）、マイクロRNA（miRNA）、Piwi結合RNA（piRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）、トランス作動性siRNA（tasRNA）、リピート関連siRNA（rasRNA）、7SK RNA（7SK）、エンハンサーRNA（eRNA）、およびRNAアプタマーが挙げられる。

30

【0074】

目的の導入遺伝子の例は、治療目的の分子をコードする任意の核酸配列、たとえば対象において欠如しているか、欠損しているか、および／または非機能的である、ペプチドもしくはタンパク質をコードする任意の核酸配列、または非コードRNAを含む。

40

【0075】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、少なくとも1つの導入遺伝子および少なくとも1つの制御エレメントを含む。制御エレメントの例として、限定するものではないが、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、インスレーターなどが挙げられる。好ましくは、少なくとも1つの制御エレメントは、少なくとも1つの目的の導入遺伝子上流、すなわち5'に位置している。

【0076】

50

少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、二本鎖または一本鎖であり得る。

【0077】

少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、デオキシリボ核酸（DNA）分子、リボ核酸（RNA）分子、またはそれらの混合物であってもよく、好ましくは、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、DNA分子である。

【0078】

少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、典型的に、天然のヌクレオチドを含む。しかしながらこれはまた、非天然のヌクレオチドをも含み得る。本明細書中使用される場合、「天然のヌクレオチド」は、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）、およびウラシル（U）を指す。本明細書中使用される場合、用語「非天然のヌクレオチド」は、化学修飾されたA、T、U、C、またはGのヌクレオチドを指す。

10

【0079】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、少なくとも10塩基対（bp）、たとえば少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000bp、またはそれ以上の長さを有する。

20

【0080】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、相補DNA（cDNA）およびゲノムDNA（gDNA）を含むかまたはからなる群から選択されるDNA分子である。一部の実施形態では、DNA分子は、cDNAである。一部の実施形態では、DNA分子は、gDNAである。

【0081】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、少なくとも1つの末端逆位配列（ITR）をさらに含む。

【0082】

本明細書中使用される場合、「ITR配列」は、真核細胞の転移エレメント（またはトランスポゾン）の末端で天然に見出される核酸配列を指す。これらは、「5' ITR」および「3' ITR」と呼ばれる。典型的に、5' ITRおよび3' ITRは、相補的であり、ヘアピン構造を形成することが可能である。ITR配列は、トランスポザーゼ酵素によるトランスポゾンの認識にとって有用である。一部の実施形態では、ITR配列は、回文構造である。

30

【0083】

ITR配列の一部の非限定的な例として、配列番号55～60、およびそれらの相補配列が挙げられる。

配列番号55 c c c t a g a a a g a t a g t c t g c g t a a a a t t g a c g c a t g

40

配列番号56 c c c t a g a a a g a t a g t c t g c g t a a a a t t g a c g c a t g a g a t a a t c a a t a t t g t g a c g t a c g t t a a

配列番号57

c c c t a g a a a g a t a g t c t g c g t a a a a t t g a c g c a t g a g a t a a t c a a t a t t g t g a c g t a c g t t a a a g a t a a t c a t g c g t a a a a t t g a c g c a t g

配列番号58 g a t t a t c t t t t c t a g g g

配列番号59 c a c a a t a t g a t t a t c t t t t c t a g g g

配列番号60 c a t g c g t c a a t t t t a c g c a t g a t t a t c t t t t a a c

50

g t a c g t a c g t c a c a a t a t g a t t a t c t t t c t a g g g
【 0 0 8 4 】

一部の実施形態では、少なくとも1つのITR配列は、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドと相互作用するか、または非共有結合により結合する。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドは、少なくとも1つのITR配列を特異的に認識するかまたはこれに結合する。

【 0 0 8 5 】

一部の実施形態では、少なくとも1つのITR配列は、目的の導入遺伝子に隣接している。「隣接している」は、少なくとも1つのITR配列と目的の導入遺伝子の間にヌクレオチドがないことを意味する。あるいは、少なくとも1つのITR配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドなどの少なくとも1つのヌクレオチドによって、目的の導入遺伝子と隔てられ得る。

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、2つのITR配列を含む。好ましくは、2つのITR配列は、目的の導入遺伝子の両端に存在する。一部の実施形態では、2つのITR配列は、目的の導入遺伝子のすぐ両端に存在し、すなわち、2つの隣接するITR配列と目的の導入遺伝子の間にヌクレオチドはない。あるいは、目的の導入遺伝子は、2つのITR配列のうちの1つと、または両ITR配列と、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドによって、隔てられ得る。

【 0 0 8 7 】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、細胞集団により安定してまたは一過性に発現され、好ましくは安定して発現される。

【 0 0 8 8 】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、一過性に発現される。好ましい実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、トランスフェクトされる。一部の実施形態では、トランスフェクションは、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の細胞質形質導入を促進または増大させる少なくとも1つのビヒクルおよび／または方法の使用を含む。トランスフェクション技術の例として、限定するものではないが、リポフェクション、エレクトロポレーション、超音波処理、ナノ粒子、マイクロインジェクション、PEI、ならびに非組み込みウイルスベクター感染および組み込みウイルスベクター感染を含むウイルスベクター感染が挙げられる。

【 0 0 8 9 】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、細胞集団の細胞のゲノム内に挿入されるDNA分子である。用語「ゲノムに挿入される」は、DNA分子が、有糸分裂の間に細胞のゲノムと並行して複製されることを暗示する。

【 0 0 9 0 】

目的の導入遺伝子は、外因性遺伝子または内因性遺伝子であり得る。

【 0 0 9 1 】

一部の実施形態では、導入遺伝子は、外因性遺伝子である。本明細書中使用される場合、「外因性遺伝子」は、細胞に天然では存在しないが、1つ以上の遺伝的方法、生化学的方法、または他の方法により細胞内に導入することができる遺伝子を指す。細胞に天然に存在することは、細胞の特定の発達段階および環境条件に関して決定され得る。たとえば、胚発達の間の細胞にのみ存在する分子は、成体期の細胞に対しては外因性である。同様に、細胞を熱ショックすることにより誘導される分子は、熱ショックを受けていない細胞に対しては外因性である。

10

20

30

40

50

【0092】

一部の実施形態では、目的の導入遺伝子は、内因性遺伝子である。本明細書中使用される場合、「内因性遺伝子」は、少なくとも1つのコピーが細胞の集団のゲノムに天然に存在する遺伝子を指す。一部の実施形態では、少なくとも1つのコピーは、アレル、すなわち、少なくとも1つの変異を含む遺伝子のバージョンであり得る。特定の実施形態では、トランスジェニック内因性遺伝子の発現は、遺伝子の全発現レベル（すなわち転写物）を増大させる。

【0093】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、ベクター、たとえば限定するものではないが、プラスミド、フォスミド、コスミド、人工染色体、またはウイルスベクターなどに含まれている。

10

【0094】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、プラスミドに含まれている。プラスミドは、環状または直鎖状であってもよく、好ましくは環状であってもよい。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、フォスミドに含まれている。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、コスミドに含まれている。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、人工染色体（たとえばヒト人工染色体）に含まれている。

【0095】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、ウイルスベクターに含まれている。

20

【0096】

ウイルスベクターは、DNAウイルススペースのベクターであり得る。このようなDNAウイルススペースのベクターの一部の非限定的な例として、デュープロドナウイルス域、モノドナウイルス域、またはバリドナウイルス域のウイルス由来のベクターが挙げられる。

【0097】

一部の実施形態では、DNAウイルススペースのベクターは、デュープロドナウイルス域のウイルスに由来する。デュープロドナウイルス域由来のウイルスは、ヘルペスウイルス目のウイルスを含む。よって一部の実施形態では、DNAウイルススペースのベクターは、ヘルペスウイルス科由来、たとえば単純ヘルペスウイルス由来のベクターである。

30

【0098】

一部の実施形態では、DNAウイルススペースのベクターは、モノドナウイルス域のウイルスに由来する。モノドナウイルス域のウイルスは、パピローマウイルス科およびポリオーマウイルス科のウイルスを含む。よって、一部の実施形態では、DNAウイルススペースのベクターは、パピローマウイルス科またはポリオーマウイルス科に由来するベクターである。

【0099】

一部の実施形態では、DNAウイルススペースのベクターは、バリドナウイルス域のウイルスに由来する。バリドナウイルス域のウイルスは、アデノウイルス科およびポックスウイルス科のウイルスを含む。よって、一部の実施形態では、DNAウイルススペースのベクターは、アデノウイルス科由来、たとえばアデノウイルス由来、またはポックスウイルス科由来、たとえばワクシニアウイルス由来のベクターである。

40

【0100】

一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子を、ベクターから切除してもよい。一部の実施形態では、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子を、少なくとも1つのITR配列により、典型的にトランスポザーゼまたはそのバリエーションもしくはフラグメントにより、ベクターから切除してもよい。

【0101】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質また

50

はポリペプチドは、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の核局在化を増大させる。

【0102】

本明細書中使用される場合、「核局在化を増大させる」は、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドの存在下での少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の核局在化が、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドの非存在下での条件と比較して、少なくとも1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、またはそれ以上増大することを意味する。

10

【0103】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドは、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子を核へ転移するか、またはこの転移を促進する。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントは、(i) 少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と相互作用し、および／または非共有結合により結合し、(ii) 核へ転移する。

【0104】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントは、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子をゲノム内に挿入および／または転移しない。

20

【0105】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントは、核膜を介した少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の通過を、少なくとも1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、またはそれ以上増大させる。

【0106】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントは、細胞の検知機構および／または防御機構から少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子を保護する。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントは、炎症誘発性および／または炎症性応答を誘導しない。

30

【0107】

一部の実施形態では、トランスポザーゼは、高活性PiggyBacトランスポザーゼ、PiggyBacトランスポザーゼ、Sleeping Beautyトランスポザーゼ、SB11トランスポザーゼ、Tol2トランスポザーゼ、Mos1トランスポザーゼ、およびFrog Princeトランスポザーゼからなる群から選択される。

【0108】

一部の実施形態では、トランスポザーゼは、高活性PiggyBacトランスポザーゼおよびSleeping Beautyトランスポザーゼからなる群から選択される。

【0109】

一部の実施形態では、トランスポザーゼは、高活性PiggyBacトランスポザーゼである。

40

【0110】

一部の実施形態では、トランスポザーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を有する高活性PiggyBacトランスポザーゼである。

50

【表 1】

配列番号1

MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEVSDHVS EDDVQSDTEEAFIDEVHEV
 QPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKNKHCWSTSKPTRRSRV
 SALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFTDEIISEIVKWTNAEISLKRRESMTS
 ATRDRTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDNHMSTDDLFDRSLSMVYVSVMSRDRFD
 FLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFTPVVKIWDLFIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLG
 FRGRCPFRVYIPNKPSKYGIKILMMCDSGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGE
 YYVKELSKPVHGS CRNITCDNWFTSIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPE
 VLKNSRSRPVGTSMFCFDGPLTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQ
 MVMYYNQTKGGVDTLDMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYS
 HNVSSKGEKVQSRKKFMRNLYMGLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPKE
 VPGTSDDSTEPPVMKKRTYCTYCPSKIRRKASASCKKCKKVICREHNIDMCQS
 CF

10

20

【0111】

一部の実施形態では、トランスポザーゼは、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼである。「改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼ」は、配列番号1のアミノ酸配列を有する高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼと比較して、1つ以上のアミノ酸置換、典型的に1以下、2以下、3以下、4以下、5以下、6以下、7以下、8以下、9以下、または10以下のアミノ酸置換を含むトランスポザーゼと呼ばれる。より具体的には、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、(i) 配列番号1のアミノ酸配列を有する高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼと比較して切除活性を増大させるための1つ以上のアミノ酸置換、および／または(ii) 配列番号1のアミノ酸配列を有する高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼと比較してDNA結合活性を減少させるための1つ以上のアミノ酸置換を含み得る。

30

【0112】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号1に記載される配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0113】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、切除活性を増大させるための1つ以上のアミノ酸変異を含む。

【0114】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、アミノ酸位置番号[194-200]、[214-222]、[434-442]、または[446-456]により定義される領域内のアミノ酸変異から選択される切除活性を増大させるための1つ以上のアミノ酸変異；たとえば位置D198、D201、R202、M212、および／またはS213でのアミノ酸置換を含む（前記位置番号は、配列番号1を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応する）。

40

【0115】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、位置450、560、564、573、589、592、および／または594でのアミノ酸変異から選択される切除活性を増大させるための1つ以上のアミノ酸変異を含む（前記位置

50

番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応する)。

【0116】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、M194 および／または D450 の位置のアミノ酸変異から選択される切除活性を増大させるための 1 つ以上のアミノ酸変異を含む（前記位置番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応し、好ましくは、アミノ酸置換は、M194V および／または D450N である）。

【0117】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、DNA 結合活性を減少させるための 1 つ以上のアミノ酸変異を含む。

10

【0118】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、位置 254、275、277、347、372、375、および／または 465 のアミノ酸変異から選択される DNA 結合活性を減少させるための 1 つ以上のアミノ酸変異を含む（前記位置番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応する）。

【0119】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、R275、N347、R372、K375、R376、E377、および E380 から選択される DNA 結合活性を減少させるための 1 つ以上のアミノ酸変異を含む（前記位置番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応する）。

20

【0120】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、R372、K375、R376、E377、および E380 から選択される DNA 結合活性を減少させるための 1 つ以上のアミノ酸変異を含む（前記位置番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応し、好ましくは、アミノ酸置換は、R372A、K375A、R376A、E377A、および／または E380A である）。

【0121】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、N347、R372、および K375 から選択される DNA 結合活性を減少させるための 1 つ以上のアミノ酸変異を含む（前記位置番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応し、好ましくは、アミノ酸置換は、N347S、N347A、R372A、および／または K375A であり、より好ましくは、アミノ酸置換は、N347S または N347A である）。

30

【0122】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、上記に定義される切除活性を増大させるための 1 つ以上のアミノ酸変異と、上記に定義される DNA 結合活性を減少させるための 1 つ以上のアミノ酸変異とを含む。

【0123】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、D245 位の切除活性を増大させるための少なくとも 1 つのアミノ酸置換と、位置 N347、R372、および K375 の DNA 結合活性を減少させるための少なくとも 2 つのアミノ酸置換とを含み、好ましくは前記改変された高活性 P i g g y B a c のトランスポザーゼは、二重変異 N347S および D450N、または三重変異 D450N、R372A および K375A を含む（前記位置番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応する）。

40

【0124】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c のトランスポザーゼは、二重変異 N347S および D450N を含む（前記位置番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応する）。

【0125】

50

一部の実施形態では、上記の実施形態で開示された改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、アミノ酸位置番号 [158-169] により定義される領域の少なくとも1つの変異、たとえば A166S ; および位置 Y527、R518、K525、N463 で少なくとも1つの変異をさらに含む。

【0126】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、位置 34、43、117、202、230、245、268、275、277、287、290、315、325、341、346、347、350、351、356、357、388、409、411、412、432、447、460、461、465、517、560、564、571、573、576、586、587、589、592、および／または 594 で1つ以上のアミノ酸置換をさらに含む（前記位置番号は、配列番号1を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応する）。

10

【0127】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、以下のアミノ酸置換またはアミノ酸置換の組み合わせのうちの1つを含む：V34M、T43I、Y177H、R202K、S230N、R245A、D268N、K287A、K290A、K287A/K290A、R315A、G325A、R341A、D346N、N347A、N347S、T350A、S351E、S351P、S351A、K356E、N357A、R388A、K409A、A411T、K412A、K432A、D447A、D447N、D450N、R460A、K461A、W465A、S517A、T560A、S564P、S571N、S573A、K576A、H586A、I587A、M589V、S592G、F594L、D450N/R372A/K375A、R275A/R277A、K409A/K412A、R460A/K461A、R275A/R277A/N347S/K375A/T560A/S573A/M589V/S592G、または R245A/R275A/R277A/R372A/W465A。

20

【0128】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、以下のアミノ酸置換またはアミノ酸置換の組み合わせのうちの1つを含む：

- R372A/K375A/D450N、
- R372A/K375A/R376A/D450N、
- K375A/R376A/E377A/E380A/D450N、
- R372A/K375A/R376A/E377A/E380A/D450N、
- M194V、
- M194V/R372A/K375A、
- S351A/R372A/K375A/R388A/D450N/W465A/S573A/M589V/S592G/F594L、
- R245A/R275A/R277A/R372A/W465A/M589V、
- R275A/325A/R372A/T560A、
- N347A/D450N、
- N347S/D450N/T560A/S573A/F594L、
- R202K/R275A/N347S/R372A/D450N/T560A/F594L、
- R275A/N347S/K375A/D450N/S592G、
- R275A/N347S/R372A/D450N/T560A/F594L、
- R275A/R277A/N347S/R372A/D450N/T560A/S564P/F594L、
- R245A/N347S/R372A/D450N/T560A/S564P/S573A/S592G、
- R277A/G325A/N347A/K375A/D450N/T560A/S564P/S573A/S592G/F594L、

30

40

50

- V 3 4 M / R 2 7 5 A / G 3 2 5 A / N 3 4 7 S / S 3 5 1 A / R 3 7 2 A / K 3 7 5
 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6 4 P、
 - G 3 2 5 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 7 3 A / M 5 8 9 V / S 5 9
 2 G、
 - S 2 3 0 N / R 2 7 7 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N、
 - T 4 3 I / R 3 7 2 A / K 3 7 5 A / A 4 1 1 T / D 4 5 0 N、
 - G 3 2 5 A / N 3 4 7 S / S 3 5 1 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 7 3 A / M 5 8
 9 V / S 5 9 2 G、または
 - Y 1 7 7 H / R 2 7 5 A / G 3 2 5 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6
 4 P / S 5 9 2 G

10

(前記位置番号は、配列番号1を有する高活性P i g g y B a cのアミノ酸数に対応する)。

【0129】

一部の好ましい改変された高活性P i g g y B a cトランスポザーゼは、以下のアミノ酸置換の組み合わせのうちの1つを含む改変された高活性P i g g y B a cを含む：

- R 3 7 2 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N、
 - S 3 5 1 A / R 3 7 2 A / K 3 7 5 A / R 3 8 8 A / D 4 5 0 N / W 4 6 5 A / S 5 7
 3 A / M 5 8 9 V / S 5 9 2 G / F 5 9 4 L、
 - R 2 4 5 A / R 2 7 5 A / R 2 7 7 A / R 3 7 2 A / W 4 6 5 A / M 5 8 9 V、
 - N 3 4 7 A / D 4 5 0 N、
 - N 3 4 7 S / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 7 3 A / F 5 9 4 L、
 - R 2 0 2 K / R 2 7 5 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / F 5 9
 4 L、
 - R 2 7 5 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 9 2 G、
 - R 2 7 5 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / F 5 9 4 L、
 - R 2 7 5 A / R 2 7 7 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6
 4 P / F 5 9 4 L、
 - R 2 4 5 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6 4 P / S 5 7
 3 A / S 5 9 2 G、
 - R 2 7 7 A / G 3 2 5 A / N 3 4 7 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6
 4 P / S 5 7 3 A / S 5 9 2 G / F 5 9 4 L、
 - V 3 4 M / R 2 7 5 A / G 3 2 5 A / N 3 4 7 S / S 3 5 1 A / R 3 7 2 A / K 3 7 5
 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6 4 P、
 - G 3 2 5 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 7 3 A / M 5 8 9 V / S 5 9
 2 G、
 - S 2 3 0 N / R 2 7 7 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N、
 - T 4 3 I / R 3 7 2 A / K 3 7 5 A / A 4 1 1 T / D 4 5 0 N、
 - G 3 2 5 A / N 3 4 7 S / S 3 5 1 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 7 3 A / M 5 8
 9 V / S 5 9 2 G、
 - Y 1 7 7 H / R 2 7 5 A / G 3 2 5 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6
 4 P / S 5 9 2 G、または
 - R 2 7 5 A / 3 2 5 A / R 3 7 2 A / T 5 6 0 A、
 (前記位置番号は、配列番号1を有する高活性P i g g y B a cのアミノ酸数に対応する)

20

30

40

【0130】

一部の実施形態では、改変された高活性P i g g y B a cトランスポザーゼは、以下のアミノ酸置換の組み合わせのうちの1つを含む：

- R 2 4 5 A / R 2 7 5 A / R 2 7 7 A / R 3 7 2 A / W 4 6 5 A / M 5 8 9 V、
 - R 2 7 5 A / 3 2 5 A / R 3 7 2 A / T 5 6 0 A、
 - N 3 4 7 A / D 4 5 0 N、

50

- N 3 4 7 S / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 7 3 A / F 5 9 4 L、
 - R 2 0 2 K / R 2 7 5 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / F 5 9
 4 L、
 - R 2 7 5 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 9 2 G、
 - R 2 7 5 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / F 5 9 4 L、
 - R 2 7 5 A / R 2 7 7 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6
 4 P / F 5 9 4 L、
 - R 2 4 5 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6 4 P / S 5 7
 3 A / S 5 9 2 G、
 - R 2 7 7 A / G 3 2 5 A / N 3 4 7 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6
 4 P / S 5 7 3 A / S 5 9 2 G / F 5 9 4 L、
 - G 3 2 5 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 7 3 A / M 5 8 9 V / S 5 9
 2 G、
 - S 2 3 0 N / R 2 7 7 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N、
 - G 3 2 5 A / N 3 4 7 S / S 3 5 1 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 7 3 A / M 5 8
 9 V / S 5 9 2 G、または
 - Y 1 7 7 H / R 2 7 5 A / G 3 2 5 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6
 4 P / S 5 9 2 G、

(前記位置番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応する)。

【0131】

一部の好ましい改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、以下のアミノ酸置換の組み合わせのうちの 1 つを含む：

- N 3 4 7 A / D 4 5 0 N、
 - N 3 4 7 S / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 7 3 A / F 5 9 4 L、
 - R 2 0 2 K / R 2 7 5 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / F 5 9
 4 L、
 - R 2 7 5 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 9 2 G、
 - R 2 7 5 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / F 5 9 4 L、
 - R 2 7 5 A / R 2 7 7 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6
 4 P / F 5 9 4 L、
 - R 2 4 5 A / N 3 4 7 S / R 3 7 2 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6 4 P / S 5 7
 3 A / S 5 9 2 G、
 - R 2 7 7 A / G 3 2 5 A / N 3 4 7 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6
 4 P / S 5 7 3 A / S 5 9 2 G / F 5 9 4 L、
 - G 3 2 5 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 7 3 A / M 5 8 9 V / S 5 9
 2 G、
 - S 2 3 0 N / R 2 7 7 A / N 3 4 7 S / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N、
 - G 3 2 5 A / N 3 4 7 S / S 3 5 1 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / S 5 7 3 A / M 5 8
 9 V / S 5 9 2 G、または
 - Y 1 7 7 H / R 2 7 5 A / G 3 2 5 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N / T 5 6 0 A / S 5 6
 4 P / S 5 9 2 G、

(前記位置番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応する)。

【0132】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、R 3 7 2 A / K 3 7 5 A / D 4 5 0 N 置換を含み、前記位置番号は、配列番号 1 を有する高活性 P i g g y B a c のアミノ酸数に対応する。前記改変されたトランスポザーゼは、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する。

【0133】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 5 ～ 26 を含むかまたはからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0134】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 5 ～ 13 を含むかまたはからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0135】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 14 ～ 26 を含むかまたはからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0136】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼと比較して、たとえば配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸 268 および／または 346（たとえば D268N および／または D346N）で、保存された触媒三残基に関与する 1 つ以上の変異を含み得る。

【0137】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼと比較して、たとえば配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸 287、287／290、および／または 460／461（たとえば K287A、K287A／K290A、および／または R460A／K461A）で、切除に重要な 1 つ以上の変異を含み得る。

【0138】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼと比較して、たとえば配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸 351、356、および／または 379（たとえば S351E、S351P、S351A、および／または K356E）で、標的との結合に関与する 1 つ以上の変異を含み得る。

【0139】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼと比較して、たとえば配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸 560、564、571、573、589、592、および／または 594（たとえば T560A、S564P、S571N、S573A、M589V、S592G、および／または F594L）で、組み込みのために重要な 1 つ以上の変異を含み得る。

【0140】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼと比較して、たとえば配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸 325、347、350、357、および／または 465（たとえば G325A、N347A、N347S、T350A、および／または W465A）での、アライメントに関与する 1 つ以上の変異を含み得る。

【0141】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼと比較して、たとえば配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸 576 および／または 587（たとえば K576A および／または I587A）で、良好に保存されている 1 つ以上の変異を含み得る。

【0142】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼと比較して、たとえば配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸 586（たとえば H586A）で、 Zn^{2+} の結合に関与する 1 つ以上の変異を含み得る。

【0143】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、高活性

10

20

30

40

50

P i g g y B a c トランスポザーゼと比較して、たとえば配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応する 3 1 5、3 4 1、3 7 2、および／または 3 7 5（たとえば R 3 1 5 A、R 3 4 1 A、R 3 7 2 A、および／または K 3 7 5 A）で、組み込みに関与する 1 つ以上の変異を含み得る。

【0144】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、高活性 P i g g y B a c と比較して、ゲノム内への D N A 組み込みのその高い特異性に関して選択される。

【0145】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 と比較して本明細書中開示される改変のうちの 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 5 ～ 2 6 のいずれかと少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、またはそれ以上の配列同一性を保持する。

【0146】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応する、アミノ酸 2 4 5、2 7 5、2 7 7、3 2 5、3 4 7、3 5 1、3 7 2、3 7 5、3 8 8、4 5 0、4 6 5、5 6 0、5 6 4、5 7 3、5 8 9、5 9 2、および 5 9 4 から選択されるアミノ酸のうちの 1 つ以上の変異を含み得る。

【0147】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応する、R 2 4 5 A、R 2 7 5 A、R 2 7 7 A、R 2 7 5 A / R 2 7 7 A、G 3 2 5 A、N 3 4 7 A、N 3 4 7 S、S 3 5 1 E、S 3 5 1 P、S 3 5 1 A、R 3 7 2 A、K 3 7 5 A、R 3 8 8 A、D 4 5 0 N、W 4 6 5 A、T 5 6 0 A、S 5 6 4 P、S 5 7 3 A、M 5 8 9 V、S 5 9 2 G、および F 5 9 4 L から選択されるアミノ酸置換のうちの 1 つ以上を含み得る。

【0148】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸置換 D 4 5 0 N を含む。

【0149】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸置換 R 2 4 5 A および D 4 5 0 を含む。

【0150】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸置換 R 2 4 5 A、G 3 2 5 A、および S 5 7 3 P を含む。

【0151】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸置換 R 2 4 5 A、G 3 2 5 A、D 4 5 0、および S 5 7 3 P を含む。

【0152】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸置換 N 3 4 7 S または N 3 4 7 A を含む。

【0153】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸置換 N 3 4 7 S および D 4 5 0 N を含む。

【0154】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 のアミノ酸の番号付けに対応するアミノ酸置換 N 3 4 7 A および D 4 5 0 N を含む。この改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0155】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 1 を有するアミノ酸配列を含み、

34 位のアミノ酸残基は V もしくは M であり、
 43 位のアミノ酸残基は T もしくは I であり、
 177 位のアミノ酸残基は Y もしくは H であり、
 202 位のアミノ酸残基は R もしくは K であり、
 230 位のアミノ酸残基は S もしくは N であり、
 245 位のアミノ酸残基は A であり、
 268 位のアミノ酸残基は D もしくは N であり、
 277 位のアミノ酸残基は R もしくは A であり、
 275 位のアミノ酸残基は R もしくは A であり、
 277 位のアミノ酸残基は R もしくは A であり、
 325 位のアミノ酸残基は A もしくは G であり、
 347 位のアミノ酸残基は S もしくは A であり、
 351 位のアミノ酸残基は E、P、もしくは A であり、
 372 位のアミノ酸残基は R もしくは A であり、
 375 位のアミノ酸残基は K もしくは A であり、
 388 位のアミノ酸残基は R もしくは A であり、
 409 位のアミノ酸残基は K もしくは A であり、
 411 位のアミノ酸残基は A もしくは T であり、
 412 位のアミノ酸残基は K もしくは A であり、
 450 位のアミノ酸残基は D もしくは N であり、
 460 位のアミノ酸残基は R もしくは A であり、
 465 位のアミノ酸残基は W もしくは A であり、
 517 位のアミノ酸残基は S もしくは A であり、
 560 位のアミノ酸残基は T もしくは A であり、
 564 位のアミノ酸残基は P もしくは S であり、
 571 位のアミノ酸残基は S もしくは N であり、
 573 位のアミノ酸残基は S もしくは A であり、
 576 位のアミノ酸残基は K もしくは A であり、
 586 位のアミノ酸残基は H もしくは A であり、
 587 位のアミノ酸残基は I もしくは A であり、
 589 位のアミノ酸残基は M もしくは V であり、
 592 位のアミノ酸残基は G もしくは S であり、かつ／または
 594 位のアミノ酸残基は L もしくは F である。

10

20

30

【0156】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 4、配列番号 5、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、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 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、および配列番号 26 を含むかまたはからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、またはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはからなる。

40

【0157】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 5、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、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 22、配列

50

番号 23、配列番号 24、配列番号 25、および配列番号 26 を含むかまたはからなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、またはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはからなる。

【0158】

一部の実施形態では、改変された高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼは、H i m a r 1 C 9 変異体ではない。

【0159】

一部の実施形態では、トランスポザーゼは、S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼである。

【0160】

一部の実施形態では、トランスポザーゼは、配列番号 61 のアミノ酸配列を有する高活性 S l e e p i n g B e a u t y S B 1 0 0 トランスポザーゼである。

【表 2】

配列番号 61

MGKSKEISQDLRKRIVDLHKSGSSLGAISKRLAVPRSSVQTIVRKYKHHGTTQP
SYRSGRRRVLSPRDERTLVKQVQINPRTTAKDLVKMLEETGTKVSISTVKRVLY
RHNKLGHSARKKPLLQNRHKKARLRFATAHGDKDRTFWRNVLWSDETKIELF
GHNDHRYVWRKKGEACKPKNTIPTVKHGGGSIMLWGCFAAGGTGALHKIDGI
MDAVQYVDILKQHLKTSVRKLLGRKWVVFQHDNDPKHTSKVVAKWLKDNKV
KVLEWPSQSPDLNPIENLWAEKLRVRARRPTNLTQLHQLCQEEWAKIHPNYC
GKLVEGYPKRLTQVKQFKGNATKY

【0161】

一部の実施形態では、トランスポザーゼは、改変されていない S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼのアミノ酸配列と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換、たとえば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の置換を含む、改変された高活性 S l e e p i n g B e a u t y S B 1 0 0 トランスポザーゼである。

【0162】

一部の実施形態では、改変された高活性 S l e e p i n g B e a u t y S B 1 0 0 トランスポザーゼは、配列番号 61 のアミノ酸の番号付けに対応する、C 1 7 6、H 1 8 7、I 2 1 2、P 2 4 7、および K 2 4 8 から選択される位置でのアミノ酸置換のうちの 1 つ以上を含む。

【0163】

一部の実施形態では、改変された高活性 S l e e p i n g B e a u t y S B 1 0 0 トランスポザーゼは、配列番号 61 のアミノ酸の番号付けに対応する、C 1 7 6 S、H 1 8 7 V / P、I 2 1 2 S、P 2 4 7 R / S、および K 2 4 8 A / C / I / L / M / N / R / S / T / V から選択されるアミノ酸置換のうちの 1 つ以上を含む。

【0164】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントは、減少した触媒活性を有する。本明細書中使用される場合、「触媒活性の減少」は、野生型トランスポザーゼおよび／または高活性トランスポザーゼと比較して、1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.8 倍、1.9 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、20 倍の減少、またはそれ以上の減少を意味する。

【0165】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントは、触媒作用を有しな

い。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントは、いずれの触媒活性も発揮しない。一部の実施形態では、触媒作用を有しないトランスポザーゼは、他のタンパク質、ポリペプチド、および／または核酸分子に結合するそれらの能力を保持する。

【0166】

一部の実施形態では、触媒作用を有しないトランスポザーゼは、配列番号3を有する触媒作用を有しない高活性PiggyBacトランスポーズ（transpose）（dead hyPB）と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、またはそれ以上の配列同一性を有する。一部の実施形態では、触媒作用を有しないhyPBは、配列番号3を有するアミノ酸配列を含むかまたはからなる。

【表3】

配列番号3

```
MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEVSDHVS EDDVQSDTEEAFIDEVHEV
QPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKNKHCWSTSKPTRRSRV
SALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFTDEIISEIVKWTNAEISLKRRESMTS
ATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDNHMSTDDLFDRLSMVYVSVMSRDRFD
FLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFTPVVKIWDLFIHQCIQNYTPGAHLTIAEQLLG
FRGRCPFRVYIPNKPSKYGIKILMMCDSGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGE
YYVKELSKPVHGS CRNITCANWFTSIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVASNAREIPE
VLKNSRSRPVGTSMFCFDGPLTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQ
MVMYYNQTKGGVDTLNQMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYS
HNVSSKGEKVQSRKKFMRNLYMGLTSSFMKRKRL EAPTLKRYLRDNISNILPKE
VPGTSDDSTE EPMKKRTYCTYCPSKIRRKASASCKKCKKVICREHNIDMCQS
CF
```

【0167】

一部の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドは、トランスポザーゼフラグメントを含む。

【0168】

一部の実施形態では、トランスポザーゼフラグメントは、少なくとも1つのトランスポザーゼの機能的なドメインを含むかまたはからなる。

【0169】

一部の実施形態では、トランスポザーゼフラグメントは、ITR結合ドメインを含むかまたはからなる。

【0170】

ITR結合ドメインの例として、限定するものではないが、配列番号62～64が挙げられ、ここで配列番号62および63は、高活性PiggyBacトランスポザーゼのITR結合ドメインであり、配列番号64は、Sleeping BeautyトランスポザーゼのITR結合ドメイン（「N57標的化ドメイン」とも呼ばれる）である。

配列番号62

```
ILPKEVPGTSDDSTE EPMKKRTYCTYCPSKIRRKASASCKKCKKVICREHNIDMCQSCF
```

配列番号63

```
MKKRTYCTYCPSKIRRKASASCKKCKKVICREHNIDMCQS
```

C F

配列番号 6 4

M G K S K E I S Q D L R K R I V D L H K S G S S L G A I S K R L A V P R S S V Q
T I V R K Y K H H G T T Q P S Y R

【0171】

一部の実施形態では、トランスポザーゼフラグメントは、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼまたは S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼのフラグメントである。

【0172】

一部の実施形態では、トランスポザーゼフラグメントは、好ましくは I T R 結合ドメインを含む、高活性 P i g g y B a c トランスポザーゼのフラグメントである。

【0173】

一部の実施形態では、トランスポザーゼフラグメントは、好ましくは S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼの S B 1 0 0 ドメインおよび N 5 7 ドメインからなる群から選択される、S l e e p i n g B e a u t y トランスポザーゼのフラグメントである。

【0174】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドは、トランスポザーゼまたはそのフラグメントと、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質とを含む融合タンパク質である。

【0175】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドは、トランスポザーゼまたはそのフラグメントと、少なくとも2つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質とを含む融合タンパク質である。

【0176】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、単一の連続したポリペプチド鎖を含む。

【0177】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、融合タンパク質の2つのポリペプチドまたはタンパク質の間に、少なくとも1つのリンカー、特に少なくとも1つのペプチドリンカーをさらに含む。

【0178】

例示的なリンカーとして、限定するものではないが、 $(G)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ （配列番号49を伴う）、 $(GGGGS)_n$ （配列番号50を伴う）、 $(EAAAK)_n$ （配列番号51を伴う）、X T E N リンカー、および $(XP)_n$ 、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる（ここで n は1～50の整数である）。

【0179】

一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、グリシン／セリンリッチリンカーである。一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、および配列番号46を含むかまたはからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

配列番号 4 1 : G G S G G G S G G G

配列番号 4 2 : G G S G G S G G S G G S

配列番号 4 3 : G G S G G S G G S G G S G G S

配列番号 4 4 : G G S G G S G G S G G S G G S G

配列番号 4 5 : G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S

配列番号 4 6 : G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S G G S

【0180】

一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号47を含むかまたはからなる X T E N リンカーである。

配列番号 4 7 : S G S E T P G T S E S A T P E S

【0181】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号 48 を含むかまたはからなる。

配列番号 48 : G S A G S A A G S G E F

【0182】

一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号 55 を含むかまたはからなる。

配列番号 55 : G I H G V P A A

【0183】

当業者に周知のよく知られている方法を使用して、適切な転写／翻訳制御シグナルと併せて融合タンパク質のコード配列を含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、*in vitro*での組み換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*での組み換え／遺伝子組み換えを含む。たとえば、Sambrook et al., 2012 (Molecular cloning: A laboratory manual (4th ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載される技術を参照されたい。発現ベクターは、プラスミド、ウイルスの一部であってもよく、または核酸フラグメントであってもよい。発現ベクターは、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド（すなわちコード領域）がプロモーターおよび／または他の転写もしくは翻訳制御エレメントと作動可能に結合してクロニングされる発現カセットを含む。本明細書中使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部である。「ストップコドン」(TAG、TGA、またはTAA)はアミノ酸に翻訳されないが、これは、存在する場合はコード領域の一部とみなされてもよいが、たとえばいずれかの隣接する配列、たとえばプロモーター、リボソーム結合部位、転写終結因子、イントロン、5'および3'の非翻訳領域などは、コード領域の一部ではない。2つ以上のコード領域が、単一のポリペプチドコンストラクトに、たとえば単一のベクター上に存在することができ、または個別のポリヌクレオチドコンストラクトに、たとえば個別の(異なる)ベクター上に存在することができる。さらに、任意のベクターは、単一のコード領域を含んでもよく、または2つ以上のコード領域を含んでもよく、たとえば本発明のベクターは、タンパク質分解による切断を介して最終産物へと翻訳後または翻訳と同時に分離される、1つ以上のポリペプチドをコードしてもよい。さらに、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、本発明の融合タンパク質(フラグメント)、またはそのバリエーションもしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドに融合しているかまたは融合していない、異種性コード領域をコードし得る。異種性コード領域は、限定するものではないが、特化したエレメントまたはモチーフ、たとえば分泌性シグナルペプチドまたは異種性機能性ドメインを含む。作動可能な結合は、遺伝子産物、たとえばポリペプチドのコード領域が、遺伝子産物の発現が制御配列の影響下または制御下になるように1つ以上の制御性配列に結合している場合の結合である。2つのDNAフラグメント(たとえば、ポリペプチドコード領域およびそれに結合したプロモーター)は、プロモーター機能の誘導が、望ましい遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合、および2つのDNAフラグメント間の結合の性質が、発現制御性配列が遺伝子産物の発現を指示する能力を妨害しないか、またはDNAテンプレートが転写される能力を妨害しない場合に、「作動可能に結合している」。よって、プロモーター領域は、プロモーターが核酸の転写を行うことが可能である場合にポリペプチドをコードする当該核酸と作動可能に結合している。プロモーターは、既定の細胞に限ってDNAの実質的な転写を指示する細胞特異的プロモーターであり得る。プロモーター以外の他の転写制御エレメント、たとえばエンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終結シグナルは、細胞特異的転写を指示するようにポリヌクレオチドと作動可能に結合し得る。適切なプロモーターおよび他の転写制御領域が、本明細書中開示されている。様々な転写制御領域が当業者に公知である。これらは、限定するものではないが、脊椎動物細胞で機能する転写制御領域、たとえば限定するものではないが、サイトメガロウイルス由来のプロモーターおよびエンハンサーセグメント(たとえば、イントロンAと結合した最初期プロモーター)、サルウイルス40由来のプロモーターおよびエンハンサーセグメント(たとえば初期プロモーター)、およびレトロウイルス(たとえばラウス肉腫ウイルス)由来のプロ

モーターおよびエンハンサーセグメントを含む。他の転写制御領域は、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、およびウサギのαグロブリンなどの脊椎動物遺伝子に由来するもの、ならびに真核細胞で遺伝子発現を制御することが可能な他の配列を含む。さらなる適切な転写制御領域は、組織特異的プロモーターおよびエンハンサー、ならびに誘導性プロモーター（たとえばテトラサイクリン誘導型プロモーター）を含む。同様に、様々な翻訳制御エレメントが当業者に公知である。これらは、限定するものではないが、リボソーム結合部位、翻訳開始コドンおよび翻訳終結コドン、ならびにウイルス系に由来するエレメント（特にはCITE配列とも呼ばれる、配列内リボソーム進入部位またはIRES）を含む。発現カセットはまた、他の特性、たとえば複製起点、および／または染色体組み込みエレメント、たとえばレトロウイルス末端反復配列（LTR）、またはアデノ随伴ウイルス（AAV）末端逆位配列（ITR）も含み得る。

10

【0184】

本明細書中記載されるように調製された融合タンパク質は、たとえば高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィーなどの当該分野で公知の技術により精製され得る。特定のタンパク質を精製するために使用される実際の条件は、正味の電荷、疎水性、親水性などの要因に部分的に依存しており、これは当業者に明らかである。アフィニティークロマトグラフィーの精製では、融合タンパク質が結合する抗体、リガンド、受容体、または抗原を使用することができる。融合タンパク質の純度は、ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィーなどを含む周知の様々な分析法のいずれかにより決定され得る。

20

【0185】

一部の実施形態では、融合タンパク質をコードする核酸は、融合タンパク質全体をコードする単一の核酸分子としてまたは共発現される複数の（たとえば2つ以上の）核酸分子として発現され得る。共発現される核酸分子によりコードされるポリペプチドは、機能的な融合タンパク質を形成するために、たとえばジスルフィド結合または他の手段を介して結合してもよい。

【0186】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、リンカーを介して直接または間接的に少なくとも1つのタンパク質またはポリペプチドのC末端に融合したトランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むかまたはからなる。他の実施形態では、融合タンパク質は、直接またはリンカーを介して間接的に少なくとも1つのタンパク質またはポリペプチドのN末端に融合したトランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むかまたはからなる。

30

【0187】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、三重融合タンパク質であり、すなわち融合タンパク質は、トランスポザーゼまたはそのフラグメントと、少なくとも2つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質とを含む。

【0188】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、核局在化配列（NLS）をさらに含む。一般的に、1つ以上のNLSは、細胞の核における融合タンパク質の蓄積を駆動するために十分な強度を有する。一般的に、核局在化活性の強度は、NLSの数および位置、ならびに融合タンパク質に使用される1つ以上の特異的なNLSにより決定される。

40

【0189】

一部の実施形態では、NLSは、融合タンパク質のN末端および／またはC末端に位置し得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のNLSを含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、N末端またはN末端付近に約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のNLSを含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、C末端またはC末端付近に約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のNLSを含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、これらの組み合わせ、たとえばN末端に1つ以上のNLSおよびC末端に1つ以上のNLSを含む。

50

【0190】

1 超の N L S が存在する場合、各 N L S は、他の N L S とは無関係に選択され得る。一部の実施形態では、融合タンパク質は、2 つの N L S を含み、たとえば 2 つの N L S は、それぞれ N 末端および C 末端に位置している。

【0191】

一般的に、N L S は、タンパク質の表面に露出した正に荷電したリジンまたはアルギニンの 1 つ以上の短い配列からなるが、他のタイプの N L S もまた、当該分野で公知である。N L S の非限定的な例として、(M) K K R K V (配列番号 52 を伴う)、(M) P K K R K V (配列番号 53 を伴う)、または (M) S G G S P K K K R K V (配列番号 54 を伴う) が挙げられる (ここで (M) は、N L S が N 末端に位置している場合に存在し得るか、または翻訳後に除去され得、N L S が C 末端に位置している場合は存在しないイニシエーターのメチオニンを示す)。

10

【0192】

さらに、融合タンパク質はまた、細胞における融合タンパク質の望ましい局在化に応じて、他の局在化配列、たとえば細胞質局在化配列、葉緑体局在化配列、ミトコンドリア局在化配列などを含み得る。

【0193】

一部の実施形態では、少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼである。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、デオキシリボヌクレアーゼまたはリボヌクレアーゼである。

20

【0194】

一部の実施形態では、少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、R N A 誘導型ヌクレアーゼである。

【0195】

一部の実施形態では、少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、C a s ヌクレアーゼである。

【0196】

一部の実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、C a s 9、C a s 12 a (C p f 1)、C a s 12 b、C a s 12 f、および C a s X を含むかまたはからなる群から選択される。そのバリエーションおよび機能的なフラグメント、たとえばニッカーゼ C a s (n C a s) または d e a d C a s (d C a s) バリエーションもまた包有されることを理解されたい。

30

【0197】

C a s 9 ヌクレアーゼの例として、限定するものではないが、化膿レンサ球菌 (*S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s*) C a s 9 (S p C a s 9)、スタフィロコッカス・ヘモリチカス (*S t a p h y l o c o c c u s h a e m o l y t i c u s*) (S h C a s 9)、およびカンピロバクター・ジェジュニ (*C a m p y l o b a c t e r j e j u n i*) C a s 9 (C j C a s 9) が挙げられる。

【0198】

一部の実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、配列番号 27 を有する S p C a s 9、配列番号 28 を有する S h C a s 9、配列番号 29 を有する C p f 1、配列番号 30 を有する C j C a s 9、配列番号 31 を有する n C a s 9、および／または配列番号 32 を有する n C a s 9 の配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 %、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有する。

40

【表 4】

配列番号 27

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD
 SGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVE
 EDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMI
 KFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
 SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDT
 YDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKR
 YDEHHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKP
 ILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLL
 KDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGAS
 AQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFL
 SGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT
 YHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVM
 KQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDS
 LTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH
 KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGKELGSQILKEHPVENTQLQN
 EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSD
 KNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL
 DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFR
 KDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVR
 KMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW
 DKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD
 PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDF
 LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
 FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLD
 KVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV
 LDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD

10

20

30

40

配列番号 28

MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGAR
 RLKRRRRRHRIQRVKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAA
 LLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKD
 GEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGP

50

GEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVI
TRDENEKLEYEYKFQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPE
FTNLKVYHDIKDITARKEIHENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQE
EIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQ
KEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIELAREKNSKDAQM
INEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLED
LLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKIS
YETFKKHILNLAAGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATR
GLMNNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEAL
IIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIK
HIKDFKDYKYSHRVDKKNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDND
KLKKLINKSPEKLLMYHHDPPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYLT
KYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNHLDTDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLD
NGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKKKISNQAEFIASFYNNDLI
KINGELRVIGVNNDLLNRIEVMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSI
KKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG

10

20

配列番号 29

SNAMSKLEKFTNCYLSKTLRFKAIPVGKTQENIDNKRLLEVEDEKRAEDYKGV
KKLLDRYYLSFINDVLHSIKLKNLNNYISLFRKKTRTEKENKELENLEINLRKEI
AKAFKGNEGYKSLFKKDIETILPEFLDDKDEIALVNSFNGFTTAFTGFFDNREN
MFSEEAKSTSIAFRICINENLTRYISNMDIFEKVDAIFDKHEVQEIKEILNSDYD
VEDFFEGEFFNFVLTQEGIDVYNAIIGGFVTESGEKIKGLNEYINLYNQKTKQKL
PKFKPLYKQVLSDRESLSFYGEGYTSDEEVLEVFRNTLNKNSEIFSSIKKLEKLF
KNFDEYSSAGIFVKNGPAISTISKDIFGEWNVIRDKWNAEYDDIHLKKKAVVTE
KYEDDRRKSFKKIGSFSLEQLQEYADADLSVVEKLKEIIIQKVDEIYKVYGSSEK
LFDADFVLEKSLKKNDAVVAIMKDLLDSVKSFENYIKAFFGEGKETNRDESFY
GDFVLAYDILLKVDHIYDAIRNYVTQKPYSKDKFKLYFQNPQFMGGWDKDKE
TDYRATILRYGSKYYLAIMDKKYAKCLQKIDKDDVNGNYEKINYKLLPGPNK
MLPKVFFSKKWMAYYNPSEDIQKIYKNGTFKKGDMFNLNDCHKLIDFFKDSIS
RYPKWSNAYDFNFSETEKYKDIAGFYREVEEQGYKVSFESASKKEVDKLVEEG
KLYMFQIYNKDFSDKSHGTPNLHTMYFKLLFDENNHGQIRLSGGAELFMRRAS
LKKEELVVHPANSPIANKNPDPKKTTLTSDVYKDKRFSQYELHIPIAINK
CPKNIFKINTEVRVLLKHDDNPYVIGIDRGERNLLYIVVVDGKGNIVEQYSLNEI

30

40

50

INNFNIGIRIKTDYHSLDDKKEKERFEARQNWTSIENIKELKAGYISQVVHKICEL
VEKYDAVIALEDLNSGFKNRSRVKVEKQVYQKFEKMLIDKLNVMVDKKSNPCA
TGGALKGYQITNKFESFKSMSTQNGFIFYIPAWLTSKIDPSTGFVNLLKTKYTSI
ADSKKFISFDRIMYVPEEDLFEFALDYKNFSRTDADYIKKWKLYSYGNRIRIFR
NPKKNNVFDWEEVCLTSAYKELFNKYGINYQQGDIRALLCEQSDKAFYSSFMA
LMSLMLQMRNSITGRTDVDFLISPVKNSDGIFYDSRNYEAQENAILPKNADAN
GAYNIARKVLWAIGQFKKAEDEKLDKVKIAISNKEWLEYAQTSVKH

10

配列番号 30

MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLARSAR
KRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNEDYQSFDESLAKAYKGLISPYELRFRAL
NELLSKQDFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYQSVG
EYLYKEYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIAQSFLKDELKLIFKKQREFGFS
FSKKFEEEVLSVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRI
INLLNNLKNTEGILYTKDDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKLLGLSDDYEFKGE
KGTIFYIEFKKYKEFIKALGEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLN
QNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTPLMLEGKKYDEACNELNLKVAINEDK
KDFLPAFNETYYKDEVTPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGVHVKINIELAREV
GKNHSQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEKLGLKINSKNILKLRLFKEQKEFC
AYSGEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSDDSYMNKVLVFTKQNQEKLNQTPF
EAFGNDSAKWQKIEVLAKNLPKKQKRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDTRYI
ARLVLNKYTKDYLDLPLSDDENTKLNLTQKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTWG
FSAKDRNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDY
KNKRKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQSYG
GKEGVLKALELGKIRKVNGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFAL
KVLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCSLYKDSLILIQTKDMQEPEFVYY
NAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFEKYI
VSALGEVTKAEFRQREDFKK

20

30

配列番号 31

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD
SGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVE
EDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHMI
KFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL

40

SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDT
YDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKR
YDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKP
ILEKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPL
KDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGAS
AQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFL
SGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT
HDLLKIIKDKDFLDNEENEDIEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVM
KQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDS
LTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGRH
KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGELGSQILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSD
KNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELK
AGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFR
KDFQFYKVBREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVR
KMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW
DKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD
PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDF
LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLD
KVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV
LDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD

10

20

配列番号 32

MKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGAR
RLKRRRRRHRIQRVKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAA
LLHLAKRRGVHNVNEVEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKD
GEVRGSINRFKTS DYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGP
GEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVI
TRDENEKLEYEKFQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPE
FTNLKVYHDIKDITARKEIENAEELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQE
EIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRKLKLVKKVDLSQQ

30

40

50

KEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIHELAREKNSKDAQKM
INEMQKRNRQTNERIEEIIHRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLED
LLNNPFNYEVDHIIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKIS
YETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATR
GLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDAL
IIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIK
HIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDND
KLKKLINKSPEKLLMYHHDPPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYLT
KYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNALDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLD
NGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYNNDLI
KINGELRVIGVNNDLLNRIEVMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSI
KKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG

10

20

【0199】

一部の実施形態では、Casヌクレアーゼは、配列番号28を有するShCas9または配列番号27を有するSpCas9のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有する。

【0200】

一部の実施形態では、Casヌクレアーゼは、配列番号28を有するShCas9である。一部の実施形態では、Casヌクレアーゼは、配列番号27を有するSpCas9である。

【0201】

一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、Cas9ヌクレアーゼのバリエーションまたは機能的フラグメントである。Cas9バリエーションは、典型的に、前記Cas9の野生型アミノ酸配列と比較して1つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、Cas9バリエーションは、ヒト化されたCas9(hCas9)またはその機能的なフラグメントである。本明細書中使用される場合、用語「ヒト化されたCas9」または「hCas9」は、ヒト細胞での発現のため最適化されたCas9タンパク質配列を指す。一部の実施形態では、hCas9は、配列番号33のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、hCas9は、配列番号33からなるアミノ酸配列を有する。

30

40

50

【表 5】

配列番号 33

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG
 ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF
 HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDK
 ADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLFEE
 NPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPG EKKNGLFGNLIALSLGL
 TPNFKSNFDLAEDA KLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS
 DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKY
 KEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED
 LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDNREKIEKILTRIP
 YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNF
 DKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK
 AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDR FNASLGTYHD
 LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL KTYAHLFDDKV
 MKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDF LKSDGFANRNF MQL
 IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVDE
 LVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKR IEEGIKELGSQI
 LKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVP
 QSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK NYWRQLLNAKL
 ITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNT
 KYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHA HDAYLN
 AVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSE QEIGKATAKYFFY
 SNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSM
 PQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD PKKYGGFDSPT
 VAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGY
 KEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFL
 YLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADAN
 LDKVLSAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRY
 TSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD

10

20

30

40

【0202】

一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、CasXである。一部の実施形態では、CasXは、配列番号34のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、CasXは、配列番号34からなるアミノ酸配列を有する。

【表 6】

配列番号 34

MAPKKKRKVSMQEIKRINKIRRLVKDSNTKKAGKTGPMKTLLVRVMTPLR
 ERLNLRKKPENIPQPISNTSRANLNKLLTDYTEMKKAILHVYWEFQKDPVGL
 MSRVAQPAPKNIDQRKLIPVKDGNERLTSSGFACSQCCQPLYVYKLEQVNDKG
 KPHTNYFGRCNVSEHERLILLSPHKPEANDELVTYSLGKFGQRALDFYSIHVTR
 ESNHPVKPLEQIGGNSCASGPVGKALSDACMGAVASFLTQYQDIILEHQKVIKK
 NEKRLANLKDIASANGLAFPKITLPPQPHTKEGIEAYNNVVAQIVIWVNLNLWQ
 KLIKGRDEAKPLQRLKGFPSFPLVERQANEVDWWDWMCNVKKLINEKKEDGK
 VFWQNLAGYKRQEALLPYLSSEEDRKKGKKFARYQFGDLLLHLEKKHGEDWG
 KVYDEAWERIDKKVEGLSKHIKLEEERRSEDAQSKAALTDWLRKASFVIEGL
 KEADKDEFRCCELKLQKWYGDRLRGKPF AIEAENSILDISGFSKQYNCAFIWQK
 DGVKKLNLYLIINYFKGGKLRFKKIKPEAF EANRFYTVINKKS GEIVPMEVNFN
 FDDPNLIILPLAFGKRQGREFIWNDLLSLETGSLKLANGRVIEKTLYNRRTRQDE
 PALFVALT FERREVLDSSNIKPMNLIGIDRGENIPAVIALTDPEGCPLSRFKDSL
 NPTHILRIGESYKEKQRTIQAAKEVEQRRAGGYSRKYASKAKNLADDMVRNTA
 RDLLYYAVTQDAMLIFENLSRGFGRQGKRTFMAERQYTRMEDWLTAKLAYEG
 LPSKTYLSKTLAQYTSKTC SNCGFTITSADYDRVLEKLKKTATGWM TTINGKE
 LKVEGQITYYNNRYKRQNVVKDLSVELDRLSEESVNNDISSWTKGRSGEALSLL
 KKRFSHRPVQEKFVCLNCGFETHADEQAALNIARSWLFLRSQEYKKYQTNKTT
 GNTDKRA FVETWQS FYRKKLKEVWKPAVTS

10

20

30

【0203】

一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、**d e a d C a s 9**タンパク質（**d C a s 9**）である。一部の実施形態では、**d C a s 9**は、配列番号35のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、**d C a s 9**は、配列番号35からなるアミノ酸配列を有する。

40

50

【表 7】

配列番号 35

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD
 SGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFHRLVESFLVE
 EDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHMI
 KFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
 SKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDT
 YDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKR
 YDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKP
 ILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPL
 KDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGAS
 AQSFIERMNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFL
 SGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT
 HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVM
 KQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDS
 LTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH
 KPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGSGILKEHPVENTQLQN
 EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS

10

20

【0204】

一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、**TnpB**（トランスポゾン **Ps i Tn554** 由来のトランスポザーゼ **B**）である。一部の
 実施形態では、**TnpB** は、配列番号 36 のアミノ酸配列と少なくとも 80 %、85 %、9
 0 %、95 %、99 %、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有
 する。一部の実施形態では、**TnpB** は、配列番号 36 からなるアミノ酸配列を有する。

30

【表 8】

配列番号 36

MIRNKAFVVRLYPNAAQTELINRTLGSARFVYNHFLARRIAAYKESGKGLTYG
 QTSSSELTLLKQAEETSWLSEVDKFALQNSLKNLETAYKNFFRTVKQSGKKVGF
 PRFRKKRTGESYRTQFTNNNIQIGEGRLKLPKLGWVKTKGQQDIQGKILNVT
 VRRIHGHEHYEASVLCEVEIPYLPAAPKFAAGVDVGKDFAIVTDGVRFKHEQNPK
 YYRSTLKRLRKAQQTLSRRKKGSARYGKAKTKLARIHKRIVNKRQDFLHKLT
 TSLVREYEIIGTEHLKPDNMRKNRRLALSISDAGWGEFIRQLEYKAAWYGR
 LSVKVSPYFPSSQLCHDCGFKNPEVKNLAVRTWTCPCNCGETHDRDENAALNIR
 REALVAAGISDTLNAHGGYVRPASAGNGLRSENHATLVV

40

【0205】

一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、**C**

50

a s 1 2 fである。一部の実施形態では、C a s 1 2 fタンパク質は、細菌 A c i d i b a c i l l u s s u l f u r o x i d a n s に由来する (A s C a s 1 2 f)。一部の実施形態では、C a s 1 2 fは、配列番号 3 7 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、C a s 1 2 fは、配列番号 3 7 からなるアミノ酸配列を有する。

【表 9】

配列番号 37

MIKVYRYEIVKPLDLDWKEFGTILRQLQQETRFALNKATQLAWEWGMGFSSDY
KDNHGEYPKSKDILGYTNVHGYAYHTIKTKAYRLNSGNLSQTIKTRATDRFKAY
QKEILRGDMSIPSYKRDIPLDLIKENISVNRMNHGDYIASLSLLSNPAKQEMNV
KRRKISVIIIVRGAGKTIMDRILSGEYQVSASQIIHDDRKNKWYLNISYDFEPQTR
VLDL NKIMGIDLGVAVAVYMAFQHTPARYKLEGGEIENFRRQVESRRISMLRQ
GKYAGGARGGGHGRDKRIKPIEQLRDKIANFRD TTNHRYSRYIVDMAIKEGCGTI
QMEDLTNIRDIGSRFLQNWYYDLQQKIIYKAE EAGIKVIKIDPQYTSQRCSEC
GNIDSGNRIGQAIFKCRACGYE ANADYNAARNIAIPNIDKIIAESIK

10

20

【0206】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドは、トランスポザーゼまたはそのフラグメントと、本明細書中上述されるヌクレアーゼとを含む融合タンパク質である。

【0207】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 2 と少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有する。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むかまたはからなる。

30

40

50

【表 10】

配列番号2

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD
SGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVE
EDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMI
KFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL
SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDT
YDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKR
YDEHHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKP
ILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPF
KDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGAS
AQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFL
SGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT
YHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVM
KQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDS
LTFKEDIQKAQVSGQGDLSHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH
KPNIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELGSGILKEHPVENTQLQN
EKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSD
KNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL
DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSD
FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVR
KMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW
DKGRDFATVRKVLSPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD
PKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDF
LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLD
KVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEV
L DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGSGSETPGTSESATPESGSSLDDEHILSALLQ
SDDELVGEDSDSEVSDHVSEDDVQSDTEEAFIDEVHEVQPTSSGSEILDEQNVIE
QPGSSLASNRILTLPQRTIRGKNKHCWSTSKPTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMC
RNIYDPLLCFKLFFTDIIEIVKWTNAEISLKRRESMTSATFRDTNEDEIYAFFG
ILVMTAVRKDNHMSTDDLFDRLSLMVYVSVMSRDRFDFLIRCLRMDDKSIRPT

10

20

30

40

LRENDVFTPVRKIWDLFIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRVYIPNKPS
KYGIKILMMCDSGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR
NITCDNWFTSIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVASNAREIPEVLKNSRSRPVGTSMFC
FDGPLTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEEDASINESTGKPQMVMYYNQTKGGVDT
LNQMCSVMTCSRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSKGEKVQSRKK
FMRNLYMGLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPKEVPGTSDDSTEPPVMKK
RTYCTYCPSKIRRKASASCKKCKKVICREHNIDMCQSCFSRADPKKKRKVRS

10

【0208】

一実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、アプタマー結合タンパク質である。

【0209】

一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、MS2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)、PP7コートタンパク質(PCP)、λN22ペプチド、およびCOMを含むかまたはからなる群から選択されるアプタマー結合タンパク質である。

20

【0210】

一部の実施形態では、少なくとも1つのさらなるポリペプチドまたはタンパク質は、MS2バクテリオファージコートタンパク質(MCP)である。一部の実施形態では、MCPは、配列番号39のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【表11】

配列番号 39

MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISSNSRSQAYKVTCVSRQSS
AQKRKYTIKVEVPKVATQTVGGVELPVAAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELVK
AMQGLLKDGNIPIPSAIAANSIY

30

【0211】

MCPは、MS2RNAテトラループ結合配列(または「MS2アプタマー」)に結合することが可能である。一部の実施形態では、MS2アプタマーは、配列番号40のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【表12】

配列番号 40

ggggccacuagggacaggauguuuuagagcuaggccaacaugagggaucacccaugucugcagggccuagc
aaguuaaaaaaaggcuaguccguuaucaacuuggccaacaugagggaucacccaugucugcagggccaagu
ggcaccgagucggugcuuuuuu

40

【0212】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、MCPを介して、少なくとも1つのMS2アプタマーを含むガイドRNA(gRNA)分子と共有結合または非共有結合により相互作用するかまたは相互作用することが可能である。

50

【0213】

よって、本発明の方法は、少なくとも1つのアプタマーに融合したガイドRNA（gRNA）と細胞集団を接触させることをさらに含み得る。

【0214】

一部の実施形態では、アプタマーは、テトラループを含むRNA配列である。用語「テトラループ」は、4塩基のヘアピンループモチーフを指す。この用語は、本明細書において用語「ステムループ」または「ヘアピンループ」と互換可能に使用される。

【0215】

一部の実施形態では、アプタマーは、MS2RNAテトラループ配列（またはMS2アプタマー）である。一部の実施形態では、MS2アプタマーは、配列番号40のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有する核酸配列を有する。一部の実施形態では、アプタマーは、配列番号40を有する核酸配列を含むかまたはからなる。

【0216】

一部の実施形態では、gRNAは、本明細書中上述されるRNA誘導型ヌクレアーゼ、たとえばCasタンパク質またはCasタンパク質を含む融合タンパク質と複合体を形成することが可能である。一部の実施形態では、gRNA分子は、RNA誘導型ヌクレアーゼと、少なくとも1つのMS2アプタマーを介して、共有結合または非共有結合により相互作用するかまたは相互作用することが可能である。

【0217】

一部の実施形態では、gRNAは、細胞、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくはヒト細胞のゲノムの特異的な配列または領域に本明細書中上述されるRNA誘導型ヌクレアーゼを標的化することが可能である。一部の実施形態では、gRNAにより標的化される特異的な配列は、Casタンパク質に特異的なプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）に隣接している。

【0218】

一部の実施形態では、gRNAにより標的化される特異的な配列は、細胞のゲノムの中のセーフ・ハーバー座の中にあり得る。「セーフ・ハーバー座」は、組み込まれた物質を、内因性遺伝子の構造または機能を乱すことなく適切に発現させることができる細胞のゲノムの領域を指す。セーフ・ハーバー座は、限定するものではないが、AAVS1（PPP1R12Cのイントロン1）、HPR1、HI1、hRosa26、albumin、およびF領域を含む。セーフ・ハーバー座は、広範囲に発現される遺伝子および／または組織（たとえば筋肉）特異的発現を伴う遺伝子のエクソンもしくはイントロンであり得る。セーフ・ハーバー座は、PPP1R12Cのエクソン1、イントロン1もしくはエクソン2；HPR1のエクソン1、イントロン1、もしくはエクソン2；hRosa26のエクソン1、イントロン1、もしくはエクソン2；またはalbumin遺伝子のイントロン1からなる群から選択され得る。セーフ・ハーバー座はまた、内因性遺伝子を欠いており、ゲノムの構造または機能を乱すことなく挿入された導入遺伝子の発現を可能にするオープンクロマチンを伴うゲノムの領域を含み得る。

【0219】

一部の実施形態では、gRNAは、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。

【0220】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドは、タンパク質の形態で細胞に送達される。

【0221】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドは、前記トランスポザーゼまたはそのフラグメントをコードする核酸の形態で細胞に送達される。核酸は、リボ核酸（RNA）またはデオキシリボ核酸（DNA）であり得る。

【0222】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、RNA分子である。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、メッセンジャーRNA (mRNA) 分子である。

【0223】

あるいは、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、DNA分子であり得る。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、相補DNA (cDNA) である。一部の実施形態では、DNA分子は、たとえばプラスミドなどの、ベクターの中に含まれ得る。

10

【0224】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、直鎖状または環状である。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、二本鎖または一本鎖である。

【0225】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、トランスフェクションまたは形質転換により細胞集団に送達される。

20

【0226】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、トランスフェクションにより細胞集団に送達される。トランスフェクション技術の例として、限定するものではないが、リポフェクション、エレクトロポレーション、超音波処理、ナノ粒子、マイクロインジェクション、ならび非組み込みウイルスベクター感染および組み込みウイルスベクター感染を含むウイルスベクター感染が挙げられる。

【0227】

一部の実施形態では、トランスフェクションは、リポフェクションにより行われる。リポフェクションを行う手段は、当該分野で公知であり、たとえばリポフェクタミン (lipofectamine) (商標) などのリポフェクション試薬を使用することを含む。一部の実施形態では、トランスフェクションは、エレクトロポレーションにより行われる。一部の実施形態では、トランスフェクションは、超音波処理により行われる。一部の実施形態では、トランスフェクションは、ナノ粒子 (たとえばポリマーナノ粒子、たとえば JetPEI) により行われる。一部の実施形態では、トランスフェクションは、マイクロインジェクションにより行われる。一部の実施形態では、トランスフェクションは、ウイルスベクター感染により行われる。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、組み込みまたは非組み込み、好ましくは非組み込みである。非組み込みウイルスベクターの非限定的な例として、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、ポックスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクターなどが挙げられる。

30

40

【0228】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、形質転換により細胞集団に送達される。形質転換技術の例として、限定するものではないが、組み込みウイルスベクター、組み込みプラスミド、酵素、またはゲノム編集法を含むかまたはからなる群から選択される組み込みベクターの使用が挙げられる。一部の実施形態では、形質転換は、組み込みウイルスベクターまたは改変された組み込みウイルスを使用することを含む。

【0229】

一部の実施形態では、組み込みウイルスベクターまたは改変された組み込みウイルスは、ウイルスのレトロウイルス科、アデノウイルス科、フラビウイルス科、ヘルペスウイル

50

ス科、ヘパドナウイルス科、パピローマウイルス科、ポリオーマウイルス科、パルボウイルス科、アレナウイルス科、ボルナウイルス科、ブニヤウイルス科、フィロウイルス科、およびパラミクソウイルス科を含むかまたはからなる群から選択される、好ましくはウイルスのレトロウイルス科、アデノウイルス科、およびフラビウイルス科を含むかまたはからなる群から選択される、組み込みウイルスまたはそのバリエーションもしくは変異体である。一部の実施形態では、組み込みウイルスベクターは、レトロウイルス科に属する。一部の実施形態では、組み込みウイルスベクターは、レンチウイルスまたは改変されたレンチウイルスである。

【0230】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と共に細胞集団に送達される。一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸および少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、同じベクターで送達される。あるいは、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸および少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子は、個別のベクターで同時に送達される。

10

【0231】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子より前に、たとえば少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の1、2、3、4、5、10、30、60分間、2、3、4、5、6、12、24、36、48、60、72時間、4、5、6、7日、またはそれ以上の日数より前に、細胞集団に送達される。

20

【0232】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の1～72時間前に細胞集団に送達される。

【0233】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の2時間～72時間、3時間～72時間、4時間～72時間、5時間～72時間、6時間～72時間、7時間～72時間、8時間～72時間、9時間～72時間、10時間～72時間、11時間～72時間、12時間～72時間、24時間～72時間、36時間～72時間、48時間～72時間前に細胞集団に送達される。

30

【0234】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の1時間～60時間、1時間～48時間、1時間～36時間、1時間～24時間、1時間～12時間、1時間～11時間、1時間～10時間、1時間～9時間、1時間～8時間、1時間～7時間、1時間～6時間、1時間～5時間、1時間～4時間、1時間～3時間、1時間～2時間前に、細胞集団に送達される。

40

【0235】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子の1時間～12時間、2時間～8時間、3時間～6時間前に細胞集団に送達される。

【0236】

一部の実施形態では、トランスポザーゼまたはそのフラグメントを含むタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核

50

酸分子の約 4 時間前に細胞集団に送達される。

【0237】

一部の実施形態では、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同物質をコードする核酸は、少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物に含まれている。

【0238】

本明細書中使用される場合、用語「薬学的に許容される賦形剤」は、動物、好ましくはヒト、または細胞の集団に投与される際に、有害反応、アレルギー反応、または他の望ましくない反応をもたらさない賦形剤を指す。これは、あらゆる全ての溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。許容される賦形剤は、任意の種類の非毒性の固体、半固体、または液体のフィラー、希釈剤、カプセル化材料、または製剤化助剤を指す。ヒトへの投与では、調製物は、EMA または FDA 局の生物製剤の基準により要求される無菌性、発熱性、全般的な安全性、および純度を満たさなければならない。

【0239】

一部の実施形態では、許容される賦形剤は、溶媒、希釈剤、担体、分散媒体、コーティング剤、抗細菌剤、抗真菌剤、等張剤、吸収遅延剤、およびそれらのいずれかの組み合わせを含むかまたはからなる群において選択される。賦形剤は、本方法のタンパク質、ポリペプチド、または核酸と適合可能であるという意味で「許容」されなければならない、かつ、個体または細胞の集団へ投与した後には有害であってはならない。典型的に、賦形剤は、個体、好ましくはヒト個体、または細胞の集団へ投与する際に有害な反応、アレルギー反応、または他の望ましくない反応をもたらさない。

【0240】

治療上の使用で許容される賦形剤は、当該分野で周知であり、たとえば Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro ed. 1985) に記載されている。適切な賦形剤の選択は、意図される投与経路および標準的な実務に即してなされ得る。

【0241】

一部の実施形態では、細胞集団は、真核細胞または原核細胞の集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、真核細胞集団である。一部の実施形態では、細胞集団は、原核細胞集団である。

【0242】

一部の実施形態では、細胞集団は、ドナーから単離されている。本明細書中使用される場合、「ドナー」は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを指す。ドナーは、細胞集団が単離される際に生存していても死亡していてもよく、好ましくは生存している。一部の実施形態では、細胞集団は、ドナーの少なくとも 1 つの臓器または組織から、任意選択でドナーの 1 超の臓器または組織から、単離されている。一部の実施形態では、細胞集団は、均一（すなわちこれは単一の種類の細胞を含む）であるかまたは不均一（すなわちこれは 1 超の種類の細胞を含む）であり、好ましくは均一である。

【0243】

一部の実施形態では、細胞集団は、in vitro で培養される。一部の実施形態では、細胞集団は、初代細胞培養物に含まれている。

【0244】

一部の実施形態では、細胞集団は、不死化細胞株由来である。

【0245】

一部の実施形態では、本方法は、in vitro で行われる。一部の実施形態では、細胞集団は、in vitro で培養された細胞の集団である。

【0246】

in vitro で細胞を培養するための方法は、当該分野で周知であり、規定の実務

10

20

30

40

50

である。典型的に、細胞は、制御された雰囲気（たとえば 37℃、5%のCO₂）で維持され、適切な培養培地（たとえばダルベッコ変法イーグル培地）で維持されている。

【0247】

一部の実施形態では、細胞集団は、2時間～72時間、3時間～72時間、4時間～72時間、5時間～72時間、6時間～72時間、7時間～72時間、8時間～72時間、9時間～72時間、10時間～72時間、11時間～72時間、12時間～72時間、24時間～72時間、36時間～72時間、48時間～72時間培養される。一部の実施形態では、細胞集団は、1時間～60時間、1時間～48時間、1時間～36時間、1時間～24時間、1時間～12時間、1時間～11時間、1時間～10時間、1時間～9時間、1時間～8時間、1時間～7時間、1時間～6時間、1時間～5時間、1時間～4時間、1時間～3時間、1時間～2時間培養される。

10

【0248】

一実施形態では、細胞集団は、非分裂性であるか、非複製性であるか、最終分化型であるか、または休止状態の細胞集団である。用語「非分裂性細胞」は、「非複製性細胞集団」、「最終分化型」および「休止状態の細胞集団」は、本明細書において互換可能に使用される。

【0249】

本明細書中使用される場合、「非分裂性細胞」、「非複製性細胞」、または「休止状態の」細胞は、細胞が細胞周期外のままであるが、分裂能を保持している、言い換えると細胞が可逆的な増殖停止の状態にあることを意味する。休止状態は、独自に、接触阻害、化学的または薬理学的作用剤、シグナル伝達タンパク質、ホルモン、阻害剤などによるか、または増殖因子などのシグナルの欠如もしくは1つ以上の細胞種との接触により、誘導され得る。一部の実施形態では、細胞集団は、培養培地における1つ以上の増殖阻害剤の存在下で休止状態である。一部の実施形態では、1つ以上の増殖阻害剤は、化学的作用剤、薬理学的作用剤、シグナル伝達タンパク質、ホルモン、および増殖因子、および阻害剤を含むかまたはからなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞集団は、培養培地における1つ以上の増殖を刺激する作用剤の非存在下で休止状態である。一部の実施形態では、1つ以上の増殖を刺激する作用剤は、化学的作用剤、薬理学的作用剤、シグナル伝達タンパク質、ホルモン、増殖因子、アミノ酸、糖、脂質、および脂肪酸を含む群から選択される。本明細書中使用される場合、「最終分化型」細胞は、細胞が、細胞周期外のままであり、分裂能を喪失しており、すなわち細胞が不可逆的な増殖の停止の状態にあることを意味する。

20

30

【0250】

一部の実施形態では、非分裂性または休止状態の細胞集団は、コンフルエントな細胞培養物である（すなわち休止状態が、接触阻害により誘導される）。

【0251】

一部の実施形態では、非分裂性または休止状態の細胞集団は、培養物において複製しない少なくとも1つの細胞種からなる。

【0252】

一部の実施形態では、非分裂性または休止状態の細胞集団は、老化している。

40

【0253】

一部の実施形態では、非分裂性または高分化型細胞集団は、細胞分裂能を完全に喪失している少なくとも1つの細胞種からなる。

【0254】

一部の実施形態では、細胞集団は、能動的に分裂していない。

【0255】

別の実施形態では、細胞集団は、能動的に分裂、複製、または増殖している。一部の実施形態では、分裂している細胞集団は、対数期の細胞培養物である。

【0256】

一部の実施形態では、本方法は、*ex vivo*で行われる。

50

【0257】

一部の実施形態では、本方法は、*in vivo*で行われる。一部の実施形態では、本方法は、動物の対象、好ましくは哺乳動物の対象において *in vivo*で行われる。特定の実施形態では、本方法は、ヒト対象において *in vivo*で行われる。一部の実施形態では、細胞集団は、生体の組織または臓器に含まれている。一部の実施形態では、生体は動物である。一部の実施形態では、生体は哺乳動物である。一部の実施形態では、生体はヒトである。

【0258】

さらに本発明は、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸の少なくとも1つのコピー、および／または少なくとも1つの目的の導入遺伝子の少なくとも1つのコピーを含む細胞または細胞集団に関する。一部の実施形態では、細胞または細胞集団は、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸の両方の少なくとも1つのコピーと、少なくとも1つの目的の導入遺伝子の少なくとも1つのコピーとを含む。

10

【0259】

一部の実施形態では、トランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同物質をコードする核酸、少なくとも1つの目的の導入遺伝子、および細胞または細胞集団は、本明細書中上記に開示される特性をさらに含む。

【0260】

本発明はさらに、それを必要とする対象の遺伝性疾患を処置する方法であって、前記対象に、

20

本明細書中上述される少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子と、

本明細中上述されるトランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸とを投与するステップを含む、方法に関する。

【0261】

本発明はまた、それを必要とする対象の遺伝性疾患の処置に使用するための、本明細書中上述される少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子、および本明細中上述されるトランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸に関する。

30

【0262】

本発明はまた、それを必要とする対象の遺伝性疾患を処置するための医薬の製造のための、本明細書中上述される少なくとも1つの目的の導入遺伝子をコードする核酸分子、および本明細中上述されるトランスポザーゼもしくはそのフラグメントを含むタンパク質もしくはポリペプチド、または同分子をコードする核酸の使用に関する。

【0263】

一部の実施形態では、目的の導入遺伝子は、対象の遺伝性疾患の原因である遺伝子欠損 (gene detect) を補う。

【0264】

一部の実施形態では、本方法は、本明細書中上述される少なくとも1つのアプタマーに融合したガイドRNA (gRNA) を対象に投与するステップをさらに含む。

40

【0265】

一部の実施形態では、本方法は、それを必要とする対象に少なくとも1つのさらなる治療剤を投与するステップを含み得る。一部の実施形態では、少なくとも1つの治療剤は、遺伝性疾患を処置するためのものである。

【0266】

一部の実施形態では、遺伝性疾患は、少なくとも1つの遺伝子が対象のゲノムで変異していることにより、少なくとも1つの遺伝子によりコードされるタンパク質が、機能障害を有するかまたは機能していないか、または細胞性タンパク質のクオリティコントロール

50

(たとえばプロテアソーム)により分解されるか、または産生されないこと；言い換えると少なくとも1つの遺伝子の機能が、完全ではないが少なくとも部分的に喪失していることを特徴とする。

【0267】

遺伝性疾患の非限定的な例として、鎌状赤血球貧血、嚢胞性線維症、ハンチントン病、先天性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ファブリー病、マルファン症候群、地中海貧血症、シスチン症、家族性高コレステロール血症、ヘモクロマトーシスなどが挙げられる。

【0268】

一部の実施形態では、目的の導入遺伝子は、変異した少なくとも1つの遺伝子の機能を、部分的にまたは完全に、好ましくは完全に回復させる。一部の実施形態では、目的の導入遺伝子は、変異した少なくとも1つの遺伝子と同じタンパク質をコードする。一部の実施形態では、目的の導入遺伝子は、変異した少なくとも1つの遺伝子をコードしているタンパク質とは異なるタンパク質をコードするが、これは類似または同一の生物学的機能を有する。

【図面の簡単な説明】

【0269】

【図1】図1は、(hyPB単独またはCas9ヌクレアーゼと融合した)トランスポザーゼでエレクトロポレーションした胚性幹細胞H9におけるGFP発現トランスポゾンおよびトランスポザーゼの生存率およびトランスフェクション効率を示す写真のセットである。BF：明視野；GFP：緑色蛍光タンパク質。

【図2】図2は、hyPBを発現するかまたは発現しないHepG2における赤色蛍光タンパク質(RFP)レポーターの転写効率を示すヒストグラムである。

【図3】図3は、hyPBを発現するかまたは発現しないHuH7細胞におけるRFPレポーターの転写効率を示すヒストグラムである。

【図4】図4および5は、hyPBを発現するかまたは発現しないHuH7細胞におけるGFPレポーターの経時的な(図4では6h、9h、および12h；図5では8h、10h、12h、14h、および16hでの)転写効率を示すグラフである。

【図5】図4および5は、hyPBを発現するかまたは発現しないHuH7細胞におけるGFPレポーターの経時的な(図4では6h、9h、および12h；図5では8h、10h、12h、14h、および16hでの)転写効率を示すグラフである。

【図6】図6は、触媒作用を有しないhyPBを発現するかまたは発現しないHuH7細胞におけるGFPレポーターの転写効率を示すヒストグラムである。

【図7】図7は、Cas9ヌクレアーゼおよびSB100トランスポザーゼまたはN57トランスポザーゼのいずれかを含む融合タンパク質を発現するHuH7細胞におけるGFPレポーターの転写効率を示すヒストグラムである。

【図8】図8A～8Bは、GFP DNAトランスポゾンが、1つの末端逆位配列(ITR)(図8A)または2つのITR(図8B)を含む、hyPBを発現するかまたは発現しないHuH7細胞におけるGFPレポーターの転写効率を比較するヒストグラムのセットである。

【図9】図9は、hyPB mRNAまたは触媒作用を有しないhyPBのmRNAのいずれかの注射から1日後または4週間後の、マウスにおけるin vivoでのルシフェラーゼレポーターの転写効率を示す写真のセットである。

【図10】図10は、ポリマーナノ粒子ベクター(jetPEI)を使用した、hyPB DNAをトランスフェクトしたかまたはトランスフェクトしていないマウスにおける、注射から1日後または1週間後の、in vivoでのルシフェラーゼレポーターの転写効率を示す写真のセットである。

【図11】図11は、hyPBをトランスフェクトしたかまたはトランスフェクトしていないマウスにおける、注射から1日後のin vivoでのルシフェラーゼレポーターの転写効率を示す写真のセットであり、DNAペイロード(ルシフェラーゼレポーター)お

10

20

30

40

50

よび h y P B m R N A は、同じベクター（脂質ナノ粒子）を使用して共トランスフェクトされている。

【図 1 2】図 1 2 は、h y P B をトランスフェクトした非分裂性 N I H - 3 T 3 細胞が、h y P B を発現しない細胞と比較して D N A トランスポゾンの取り込みおよび発現に関してより高い能力を示すことを示すヒストグラムである。結果を、平均値 $\pm$ s . e . m として表す、 $n = 4$ 。

【図 1 3】図 1 3 A ~ 1 3 B は、トランスフェクション後 2 0 時間間隔で測定された、複製 N I H / 3 T 3 細胞（図 1 3 A）および非分裂性 N I H / 3 T 3 細胞（図 1 3 B）における核 D N A 転移を示すグラフのセットである。結果を、平均値 $\pm$ s . e . m として表す、 $n = 2$ 。統計的有意性を、 p 値 $< 0 . 0 0 1$ では ***、および p 値 $< 0 . 0 0 5$ では ** として表す。

【図 1 4】図 1 4 は、h y P B をトランスフェクトした培養物における非分裂性初代マウス肝細胞が、h y P B を発現しない細胞と比較して D N A ルシフェラーゼをコードするトランスポゾンの取り込みおよび発現に関してより高い能力を有することを示すヒストグラムである。

【0 2 7 0】

実施例

本発明を、さらに以下の実施例により示す。

【0 2 7 1】

実施例 1: トランスポザーゼにより駆動される核局在化

材料および方法

H 9 幹細胞のエレクトロポレーション

胚性幹細胞 H 9 を、単独または $1 \mu g$ の h y P B m R N A もしくは $1 . 5 \mu g$ の F i C A T m R N A および $1 . 7 5 \mu g$ の A A V S 1 座を標的とする s g R N A と併せた $1 . 8 \mu g$ のミニサークル G F P トランスポゾンでエレクトロポレーションした（C R G c e l l a n d t i s s u e f a c i l i t y）。細胞を、蛍光顕微鏡において明視野を使用してイメージングし、生存率および G F P シグナルの % を推定した。

【0 2 7 2】

H e p G 2 細胞のリポフェクション

0 日目: 4 0 0 k 個の細胞 / ウェルを、p 6 ウェルプレートに播種した。

【0 2 7 3】

1 日目: $1 . 2 5 \mu g$ の h y P B プラスミドまたは p u c 1 9 モックプラスミドのいずれかに、製造社のプロトコルに従ってリポフェクタミン 3 0 0 0 をトランスフェクトした。細胞を、O p t i m e m + トランスフェクションミックスと共に 2 時間維持し、次に、完全培地を添加した（ダルベッコ変法イーグル培地 1 0 % のウシ胎仔血清、2 m M のグルタミン、および 1 0 0 U のペニシリン / 0 . 1 m g / m l のストレプトマイシン）。

【0 2 7 4】

2 日目: トランスフェクトした細胞を採取し、1 5 0 k 個の細胞 / ウェルで p 1 2 ウェルプレートに播種した。

【0 2 7 5】

3 日目: 細胞に、 $0 . 7 5 \mu g$ の R F P D N A トランスポゾンおよび $0 . 2 5 \mu g$ の D N A を充填した p u c 1 9 を、製造社のプロトコルに従ってリポフェクタミン 3 0 0 0 を用いてトランスフェクトした。細胞を、O p t i m e m + トランスフェクションミックスと共に 2 時間維持し、次に、完全培地を添加した。

【0 2 7 6】

4 日目: 4 日目のトランスフェクションから 2 4 時間後に、蛍光を測定した。

【0 2 7 7】

あるいは、細胞に、1 日目に、h y P B の代わりに C a s 9 _ S B 1 0 0 プラスミドおよび C a s 9 _ N 5 7 プラスミドをトランスフェクトした。3 日目に、細胞に、S B 1 0 0 I T R を含む G F P トランスポゾンおよび T C R 1 g R N A プラスミドをトランス

10

20

30

40

50

フェクトした。

【0278】

Hu h 7 細胞のリポフェクション

400,000個の細胞を、p6ウェルでのトランスフェクションの24時間前に播種した。トランスフェクションを、1.8μgのトランスポゾンDNAおよび1.95μgのhyPBまたは類似の大きさのモックmRNAを使用して、製造社の指示に従ってリポフェクタミン3000を用いて行った。細胞を、OptiMem+トランスフェクションミックスと共に2時間維持し、次に、完全培地を添加した。トランスフェクション後、細胞を、3時間ごとまたは14時間ごとに採取し、蛍光をフローサイトメトリーにより測定した。

10

【0279】

あるいは、細胞に、1日目に、hyPBの代わりにCas9__SB100プラスミドおよびCas9__N57プラスミドをトランスフェクトした。3日目に、細胞に、SB100 ITRを含むGFPトランスポゾンおよびTCR1 gRNAプラスミドをトランスフェクトした。

【0280】

In vivoでのハイドロダイナミック注射

合計10~10.2μgの核酸を、6~7週齢のマウスに注射した(3.2μgのMCールシフェラーゼトランスポゾン、1.42μgのhyPB/hyPB__dead mRNA)。核酸を、PBSで希釈し、動物の体重の7%(mL)を、後眼窩全身注射を介して7秒未満で注射した。

20

【0281】

JetPEIのin vivoでのトランスフェクション

異なる送達方法でのDNAペイロードおよびhyPB:35.6μgのMCールシフェラーゼDNAトランスポゾンを、in vivoでJetPEIをN/P比7にて製造社の指示に従って使用して、5週齢のマウスに静脈内注射した。2.5μgのhyPB mRNAで充填したLNPを、4時間後に静脈内注射した。LNPの製造は、Benchtop Nanossembler (Precision Nanosystems)を使用して行った。

【0282】

同じ送達方法でのDNAペイロードおよびhyPB:15μgのMCールシフェラーゼDNAトランスポゾンを充填したLNPを、2.5μgのhyPBを充填したLNPと共にまたはこれを伴わずに、5週齢のマウスに静脈内注射した。LNPの製造は、Benchtop Nanossembler (Precision Nanosystems)を使用して行った。

30

【0283】

脂質の比率は、50%のDlin MC3、10%のDSPC ヘルパー脂質、38.5%のコレステロール、1.5%のPEG-2000であり、NP比は6である。ナノ粒子の大きさは、100~130nmであり、カプセル化効率は90%超であった。

【0284】

全身のイメージング

ルシフェラーゼ発現の全身のイメージングを、IVIS spectrumイメージングシステム(Caliper Life Sciences)を用いて、FiCAT gRNA トランスポゾンまたはトランスポゾン対照の投与後の異なる時点で行った。製造社の指示に従ってDールシフェリンカリウム塩(Gold Biotechnology)の腹腔内注射から5分後に、画像を撮影した。FiCAT:Cas9 hyPB融合物

40

【0285】

結果

トランスポザーゼ(hyPBまたはFiCAT、FiCATは、Cas9 hyPB融合タンパク質である)でエレクトロポレーションした胚性幹細胞H9は、GFPシグナル

50

を示し（図1）、これは、GFPトランスポゾンDNAが核に入り、これが翻訳かつ転写されていることを意味する。hyPBまたはFICATを伴わないGFPトランスポゾンDNAのエピソームシグナルは低く（20%の効率）、hyPBは、より強いGFPシグナルをもたらす（70%のトランスフェクション効率）。

【0286】

hyPBを既に発現しているHepG2肝細胞株は、hyPBを発現しない細胞よりも良好なRFP DNAトランスポゾンのインターナリゼーションを示す（図2）。またこの結果は、HuH7肝細胞株でも得られた（図3）。さらに、hyPB mRNAをトランスフェクトしたHuH7細胞は、モックmRNAをトランスフェクトした細胞と比較して高いDNAトランスポゾンの取り込みおよび発現に関する能力を示す（図4および5）

10

。
【0287】

hyPBの触媒作用を有しないmRNAをトランスフェクトしたHuH7肝細胞株は、モックmRNAをトランスフェクトした細胞と比較して高いDNAトランスポゾンの核への取り込みおよび発現に関する能力を示す（図6）。

【0288】

興味深いことに、hyPBを伴わない細胞と比較して、hyPBトランスポザーゼによるトランスポゾンの核への取り込み能が高いことを示す上記の結果を、SB100およびN57のような他のトランスポザーゼに一般化することができる（図7）。

【0289】

次に、DNAペイロードに関するITRの必要条件を試験した。hyPBを既に発現しているHuH肝細胞株は、hyPBを発現しない細胞（Puc19プラスミドDNAを既にトランスフェクトした）よりも良好なGFP DNAトランスポゾンのインターナリゼーションを示す（両者とも1つのITRまたは2つのITRを有するGFPトランスポゾンを用いる）（図8A～8B）。このデータは、hyPBが、1つのITRのみが存在する場合であっても、ペイロードDNAの核へのインターナリゼーションを促進する（よってhyPB分子がそのペイロードに結合し得る）ことを実証する。

20

【0290】

hyPBがトランスフェクションを改善する能力を、さらに*in vivo*の条件で試験した（図9）。hyPBトランスポザーゼは、その触媒活性が損なわれている場合であっても（dead-hyPB）、DNAペイロードのインターナリゼーションおよび発現において利点を示す。3匹のマウスのうち1匹は、単独のペイロードのハイドロダイナミック注射から24時間後にルシフェラーゼ発現を示し、これは、hyPBまたは触媒作用を有しないhyPBと共注射した場合は2/3または3/3のマウスに増加する。

30

【0291】

hyPBトランスポザーゼは、ペイロードDNAおよびhyPB mRNAが異なる送達方法を使用して投与される際に、DNAペイロードのインターナリゼーションおよび発現において利点を示す（図10）。DNAを注射した場合、50%のマウスは、24時間後にルシフェラーゼシグナルを示し、LNPを使用してhyPBを共注射した際には100%のマウスがシグナルを示す。

40

【0292】

hyPBトランスポザーゼは、ペイロードDNAおよびhyPB mRNAが同じ送達方法を使用して投与される場合、DNAペイロードのインターナリゼーションおよび発現において利点を示す（図11）。DNA単独を注射した場合、マウスはルシフェラーゼシグナルを示さないが、いずれの場合も、LNPを使用してhyPBを共投与するとシグナルは回復する。この結果は、hyPBが、DNAの核内へのインターナリゼーションに役立ち、よってこれが発現され得ることを示す。

【0293】

実施例2：非分裂性細胞における核局在化

材料および方法

50

N I H / 3 T 3 培養

N I H / 3 T 3 (A T C C) を、37℃の湿潤CO₂ (5%) インキュベーターにおいて、10または1%の熱失活したウシ胎仔血清、100 U / m l のペニシリン、および0.1 m g / m l のストレプトマイシンを補充したD M E M で培養した。

【0294】

休止状態N I H - 3 T 3 細胞に関する用量依存的効果のアッセイ

60,000個のN I H - 3 T 3 細胞を播種し、コンフルエンスに達した後48時間、1%のF B S を補充したD M E M でこれらを培養することにより、老化を誘導した。次に、細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションは、製造社のプロトコルに従ってリポフェクタミン3000と共に、単独（エピソーム性）または指定の量のh y P B - w t もしくは触媒作用を有しないh y P B (d e a d - h y P B) と組み合わせた0.2 μ g のトランスポゾンD N A を使用して行った。細胞を、トランスフェクションミックスを含むO p t i m e m と共に一晩インキュベートし、次に完全培地を添加した。D M E M 添加から1時間後に、細胞をトリプシン処理し、G F P 発現を、フローサイトメトリーにより評価した。（平均値±S E M として表す、n = 4）。

10

【0295】

分裂性N I H - 3 T 3 細胞および（a d）非分裂性N I H - 3 T 3 細胞におけるトランスフェクションの比較

複製中の細胞において、60,000個の細胞を、トランスフェクションの前日に播種した。非分裂性3 T 3 では、コンフルエンスに達した後48時間、1%のF B S を補充したD M E M でこれらを培養することにより、老化を誘導した。次に、細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションは、製造社のプロトコルに従ってリポフェクタミン3000と共に、単独（エピソーム性）または0.25 μ g のh y P B - w t もしくは触媒作用を有しないh y P B (d e a d - h y P B) と組み合わせた0.25 μ g のトランスポゾンD N A を使用して行い、フローサイトメトリーでのG F P 評価のため3時間の間隔でトリプシン処理した。

20

【0296】

グループ間の差異を、二元配置分散分析（A N O V A）検定を使用して統計的有意性に関して分析した。

【0297】

30

初代培養肝細胞の単離

肝臓を、肝臓灌流バッファー（H B S S K C l 0.4 g . L⁻¹、グルコース1 g . L⁻¹、N a H C O₃ 2.1 g . L⁻¹、E D T A 0.2 g . L⁻¹）を使用して灌流し、次に、肝臓消化バッファー（D M E M - G l u t a M A X 1 g . L⁻¹ グルコース、H E P E S 15 m M p H 7.4、ペニシリン / ストレプトマイシン 1%、5 m g / マウスのコラゲナーゼ I V (C 5 1 3 8 S i g m a)）を使用して消化した。切除後、肝臓を、プレーティング培地（M 1 9 9、牛ウシ胎仔血清 10%、ペニシリン / ストレプトマイシン 1%、ピルビン酸ナトリウム 1%、L - グルタミン 1%、1 n M のインスリン、1 m M のデキサメタゾン、2 m g . m l⁻¹ のウシ血清アルブミン（B S A））中で氷上に載置した。組織を、鉗子を使用してホモジナイズし、次に、播種用培地でろ過した。次に細胞を播種用培地において3回洗浄し、その後、播種用培地においてコラーゲンをコーティングしたプレート（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）上に播種した。翌朝に培地を交換し、細胞を48時間インキュベートした後トランスフェクションを行った。

40

【0298】

初代培養肝細胞の培養、およびトランスフェクション

初代培養肝細胞を、野生型の8週齢のマウスから単離し、ウェルあたり75,000個の細胞を播種した。48時間培養した後、細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションは、製造社のプロトコルに従ってリポフェクタミン3000と共に、単独（エピソーム性）または0.25 μ g のh y P B - w t もしくは触媒作用を有しないh y P B (d

50

dead-hyPB)と組み合わせた0.2μgのトランスポゾンDNAを使用して行った。細胞を、トランスフェクションミックスを含むOptiMemと共に5時間インキュベートし、次に完全培地を添加した。トランスフェクションから24時間後に、細胞をPBSで1回洗浄し、適切なバッファーで溶解した。ルシフェラーゼ活性を、ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega, Madison, WI, USA)を使用してトランスフェクションから24時間後に定量化し、これは二連で行った。データを、トランスフェクトしていない肝細胞のルシフェラーゼの値に対する倍数変化として示し、任意単位(AU)で表す。

【0299】

グループ間の差異を、一元または二元配置分散分析(ANOVA)検定を使用して統計的有意性に関して分析した。適用可能な場合は、ペアワイズ比較を、両側のスチューデントt検定で分析した。結果を、平均値±s.e.m.として表す。

10

【0300】

結果

DNAトランスポゾンの核移入におけるPiggyBacトランスポザーゼなどのDNAトランスポザーゼの役割をさらに裏付けるために、非分裂性細胞において実験を行った。

【0301】

2つの異なるモデルを選択した：図12および図13A～13Bでは、NIH/3T3線維芽細胞株は老化誘導性であり、図14では、培養中に複製しない、マウスから単離された初代培養肝細胞を利用して、非分裂性(休止状態)細胞におけるPiggyBac(hyPB)DNAの核転移活性を試験した。

20

【0302】

漸増量のPiggyBacトランスポザーゼ(hyPB)を試験して、その用量依存的効果を調べ；さらに、触媒作用を有しないバージョンのトランスポザーゼ(dead-hyPB)を、トランスポザーゼの挿入活性がないDNA転移活性単独の対照として添加した。図12は、DNAトランスポゾンの取り込みおよび発現(GFP)が、最低用量であっても、hyPBまたはdead-hyPBを発現する細胞において増大していることを示す。

【0303】

さらに、能動的分裂性NIH/3T3細胞および非分裂性NIH/3T3細胞の細胞質内へ送達されるDNAペイロードの形質導入および発現の効率の対照比較を行い、これらペイロードの核局在化におけるトランスポザーゼタンパク質の役割を裏付けた(図13A～13B)。図13Bは、トランスポザーゼを用いない条件と比較して、hyPBまたはdead-hyPBを発現する非分裂性NIH-3T3細胞における有意に高いGFPペイロードの発現効率を示す。

30

【0304】

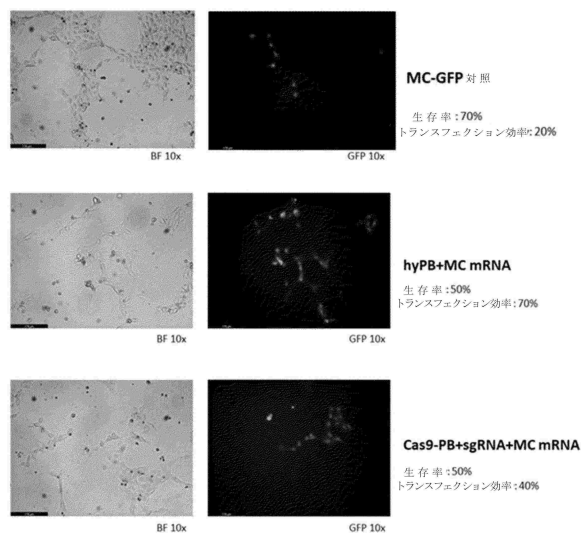
初代培養肝細胞を用いた結果はまた、この結論を裏付け、PiggyBacトランスポザーゼの存在が、触媒作用的に活性(hyPB)であるかまたは不活性(dead-hyPB)であるかに関わらず、その核輸送が改善された結果、トランスポゾンの発現を増大させることを示す(図14)。

40

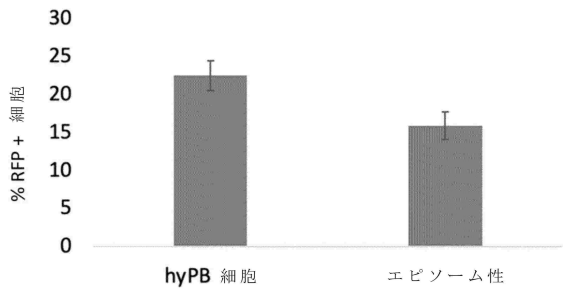
【0305】

まとめると、これら結果は、DNAトランスポザーゼが、それらの挿入活性とは無関係に、特に非分裂性細胞においてDNAトランスポゾンの核移入を増大させることを実証する。

【図面】
【図 1】

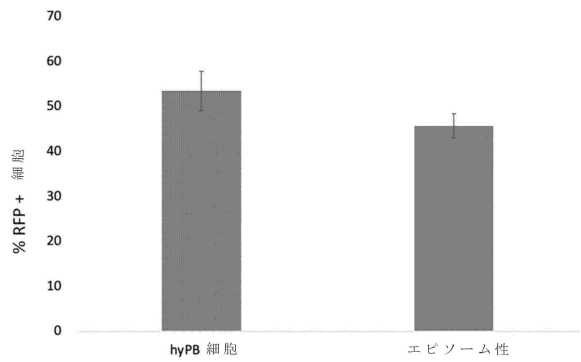


【図 2】

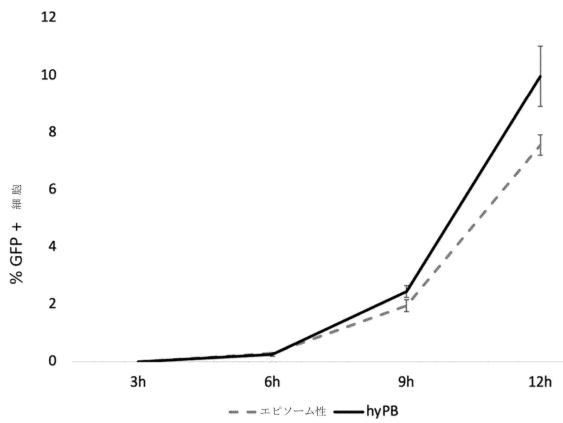


10

【図 3】



【図 4】



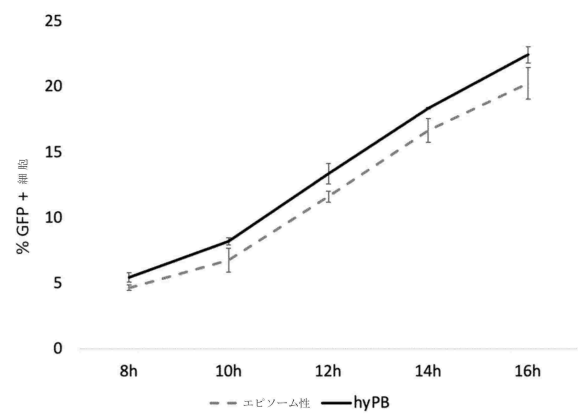
20

30

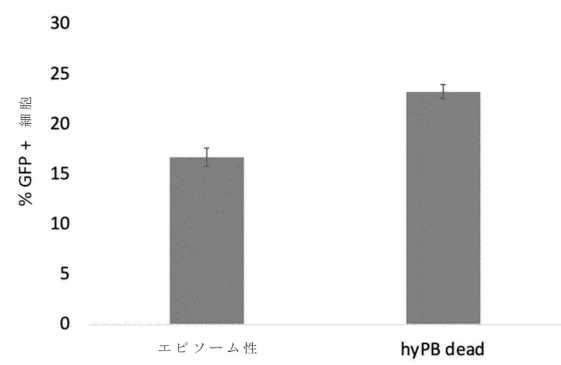
40

50

【図 5】

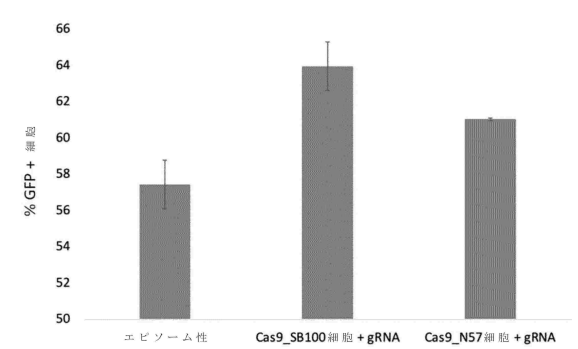


【図 6】

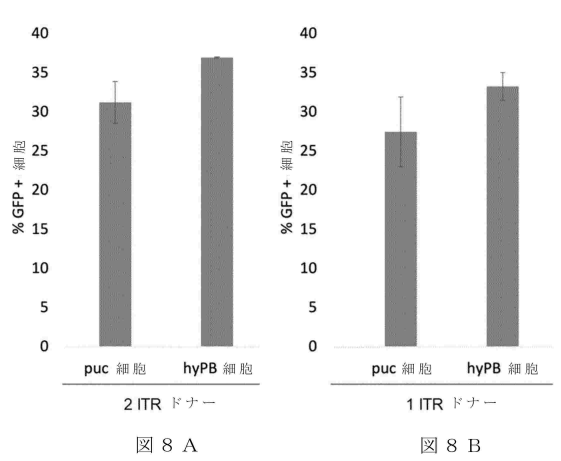


10

【図 7】



【図 8】



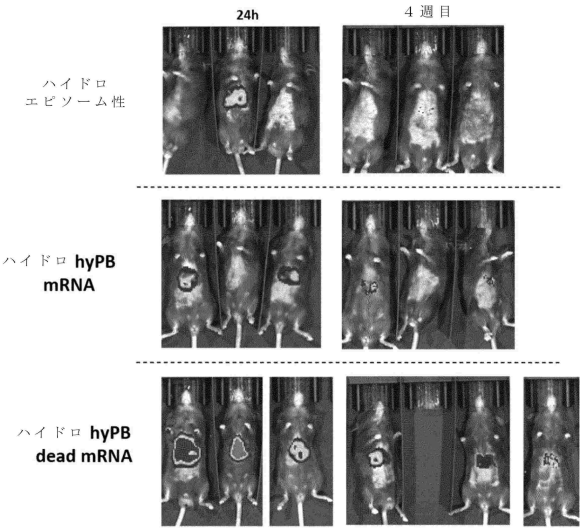
20

30

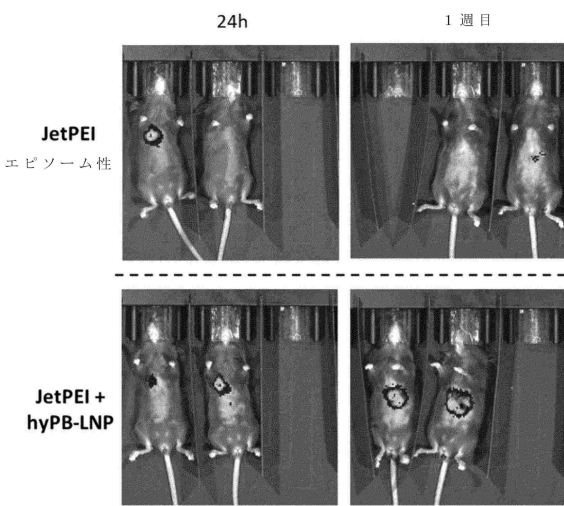
40

50

【図 9】

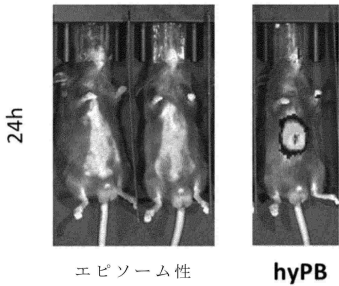


【図 10】

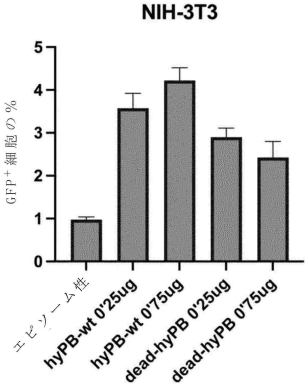


10

【図 11】



【図 12】



20

30

40

50

【図 1 3】

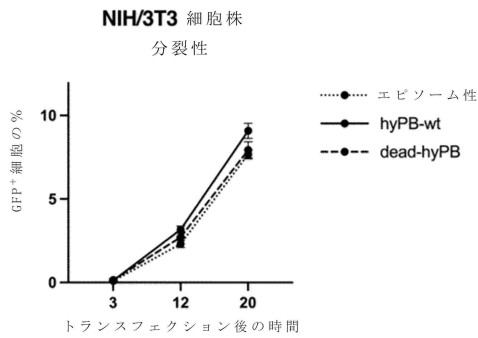


図 1 3 A

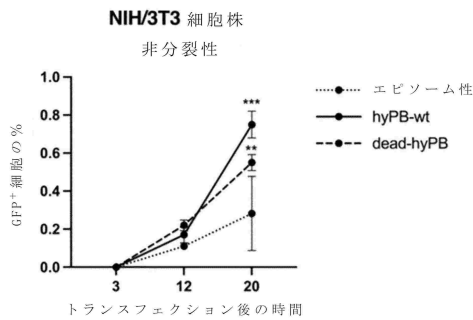
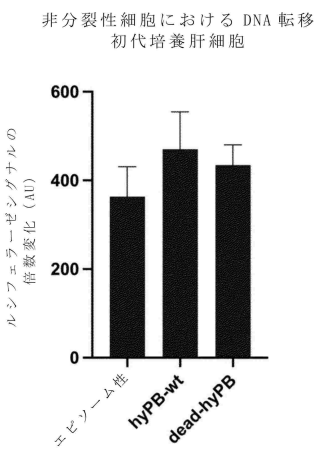


図 1 3 B

【図 1 4】



10

20

【配列表】

202551863800001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N9/22 C12N15/62 C12N15/85
ADD.

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)
C12N

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2022/129438 A1 (UNIV POMPEU FABRA [ES]) 23 June 2022 (2022-06-23)	1, 14
Y,P	see claims, MCP-XTEN80-NLS-SV40 NLS fusion protein, SEQ 110. Claim 18 The query sequence SEQ ID NO:3 has 99.66 % identity (99.66 % similarity) over 594 positions in a common overlap (range (q:s): 1-594:1-594) with subject GSP:BLJ46484 (length: 594) from WO2022129438-A1 published on 2022-06-23. ----- -/--	1-15

☒ 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

"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

24 July 2023

Date of mailing of the international search report

31/07/2023

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vix, Olivier

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062736

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/216625 A1 (INTEGRATED DNA TECH INC [US]) 28 October 2021 (2021-10-28) The query sequence SEQ ID NO:2 has 98.92 % identity (99.13 % similarity) over 1385 positions in a common overlap (range (q:s): 1-1385:1-1385) with subject GSP:BKD89177 (length: 1654) from WO2021216625-A1 published on 2021-10-28. -----	1-15
Y	WO 2021/248023 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]) 9 December 2021 (2021-12-09) The query sequence SEQ ID NO:39 has 100.00 % identity (100.00 % similarity) over 130 positions in a common overlap (range (q:s): 1-130:1-130) with subject GSP:BKK22816 (length: 235) from WO2021248023-A2 published on 2021-12-09. -----	1-15
X	US 2019/153440 A1 (KANTARDZHIEVA ALBENA [US] ET AL) 23 May 2019 (2019-05-23) see claims -----	14 1-15
Y	WO 2020/243085 A1 (UNIV COLUMBIA [US]) 3 December 2020 (2020-12-03) the whole document -----	1-15
X	KEITH JAMES H ET AL: "Analysis of the piggyBac transposase reveals a functional nuclear targeting signal in the 94 c-terminal residues", BMC MOLECULAR BIOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 9, no. 1, 11 August 2008 (2008-08-11) , page 72, XP021042424, ISSN: 1471-2199, DOI: 10.1186/1471-2199-9-72 the whole document -----	1 1-15
Y	BRIAN E HEW ET AL: "RNA-guided piggyBac transposition in human cells", SYNTHETIC BIOLOGY, vol. 4, no. 1, 2 July 2019 (2019-07-02), page ysz018, XP055737951, DOI: 10.1093/synbio/ysz018 see abstract, pages 2-5 and fig. 1-2 ----- -/--	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062736

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHAO SHUANG ET AL: "PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene encoding", TRANSLATIONAL LUNG CANCER RESEARCH, vol. 5, no. 1, 1 February 2016 (2016-02-01), pages 120-125, XP055923508, Hong Kong ISSN: 2218-6751, DOI: 10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.05 the whole document -----	1-15
A	WO 2022/012758 A1 (PROBIOGEN AG [DE]) 20 January 2022 (2022-01-20) the whole document -----	1-15
A	WO 2008/027384 A1 (UNIV HAWAII [US]; MOISYADI STEFAN [US] ET AL.) 6 March 2008 (2008-03-06) see claims -----	1-15
A	WO 2020/127332 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]) 25 June 2020 (2020-06-25) see claims -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/062736

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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/062736

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2022129438 A1	23-06-2022	AU 2021403660 A1 CA 3202403 A1 WO 2022129438 A1	06-07-2023 23-06-2022 23-06-2022
WO 2021216625 A1	28-10-2021	CA 3180807 A1 CN 115968301 A EP 4138919 A1 US 2023049003 A1 WO 2021216625 A1	28-10-2021 14-04-2023 01-03-2023 16-02-2023 28-10-2021
WO 2021248023 A2	09-12-2021	AU 2021282659 A1 BR 112022024747 A2 CA 3184882 A1 CN 116057180 A EP 4162054 A2 GB 2612466 A IL 298605 A JP 2023529844 A KR 20230021081 A US 2023212323 A1 WO 2021248023 A2	05-01-2023 07-03-2023 09-12-2021 02-05-2023 12-04-2023 03-05-2023 01-01-2023 12-07-2023 13-02-2023 06-07-2023 09-12-2021
US 2019153440 A1	23-05-2019	AU 2018372763 A1 CA 3082450 A1 CN 111727251 A EP 3714055 A1 JP 2021503945 A MA 50877 A US 2019153440 A1 US 2019153441 A1 US 2020332288 A1 WO 2019102381 A1	28-05-2020 31-05-2019 29-09-2020 30-09-2020 15-02-2021 30-09-2020 23-05-2019 23-05-2019 22-10-2020 31-05-2019
WO 2020243085 A1	03-12-2020	US 2022243184 A1 WO 2020243085 A1	04-08-2022 03-12-2020
WO 2022012758 A1	20-01-2022	AU 2020458769 A1 CA 3173696 A1 EP 4182341 A1 KR 20230038425 A WO 2022012758 A1	09-02-2023 20-01-2022 24-05-2023 20-03-2023 20-01-2022
WO 2008027384 A1	06-03-2008	US 2011047635 A1 WO 2008027384 A1	24-02-2011 06-03-2008
WO 2020127332 A1	25-06-2020	EP 3898967 A1 US 2022025406 A1 WO 2020127332 A1	27-10-2021 27-01-2022 25-06-2020

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/55	(2006.01)	C 1 2 N	15/55	
C 1 2 N	9/22	(2006.01)	C 1 2 N	9/22	
C 1 2 N	15/33	(2006.01)	C 1 2 N	15/33	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	15/90	(2006.01)	C 1 2 N	15/90	1 0 0 Z
A 6 1 K	38/45	(2006.01)	A 6 1 K	38/45	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	47/64	
			A 6 1 K	31/7105	

,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,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,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,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,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
H,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

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100208580

弁理士 三好 玲奈

(74)代理人 100227329

弁理士 延原 愛

(72)発明者 サンチェス・メヒアス ガルシア, アベンシア

スペイン国, 0 8 0 0 3 バルセロナ, 8 8, カレ デル ドクター・アイグエダー, バルセロナ
バイオメディカル リサーチ パーク, インテグラ セラピューティクス内

(72)発明者 グエル カルゴル, マルク

スペイン国, 0 8 0 0 2 バルセロナ, カーラー デ ラ メルセ 1 2, ユニバーシタット ポンペウ
ファブラ内

(72)発明者 パラーレス マスミジャ, マリア

スペイン国, 0 8 0 0 2 バルセロナ, カーラー デ ラ メルセ 1 2, ユニバーシタット ポンペウ
ファブラ内

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 BB01 CA24 CA44

4C076 AA95 CC41 EE59 FF70

4C084 AA02 AA13 BA44 CA04 DC25 MA02 NA14 ZC751 ZC752

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 NA14 ZC41 ZC75