

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6956416号
(P6956416)

(45) 発行日 令和3年11月2日(2021.11.2)

(24) 登録日 令和3年10月7日(2021.10.7)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/90	(2006.01)
C 12 N 15/85	(2006.01)
A 61 K 48/00	(2006.01)
A 61 K 35/17	(2015.01)
A 61 P 43/00	(2006.01)
C 12 N 15/90	15/90
C 12 N 15/85	15/85
A 61 K 48/00	48/00
A 61 K 35/17	35/17
A 61 P 43/00	43/00
A 61 P 43/00	105

請求項の数 12 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-524760 (P2018-524760)
(86) (22) 出願日	平成28年12月12日 (2016.12.12)
(65) 公表番号	特表2019-503653 (P2019-503653A)
(43) 公表日	平成31年2月14日 (2019.2.14)
(86) 國際出願番号	PCT/CN2016/109510
(87) 國際公開番号	W02017/101749
(87) 國際公開日	平成29年6月22日 (2017.6.22)
審査請求日	令和1年12月6日 (2019.12.6)
(31) 優先権主張番号	62/267,270
(32) 優先日	平成27年12月14日 (2015.12.14)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者	518162083 ゲノムフロンティア セラピューティクス , インコーポレイテッド 英國領ケイマン諸島 ケーワイ1-120 8 グランド ケイマン ピー. オー. ボ ックス 32052 ウエスト ベイ ロ ード 802 オレアンダー ウェイ ザ グランド パビリオン コマーシャル センター
(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスポゾン系、それを含むキット及びそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

外来DNA配列を細胞のゲノムに組み込むin vitro方法であって、

(i) トランスポゾン系であって、

配列番号1からなる核酸配列を有する第1の逆方向反復、

前記第1の逆方向反復の下流の外来DNA配列、及び、

前記外来DNA配列の下流の第2の逆方向反復、ここで当該第2の逆方向反復は配列番号2からなる核酸配列を有する、を含有する第1のベクターと、

配列番号4のアミノ酸配列を有するトランスポザーゼをコードする核酸に操作可能に連結したプロモーターを含有する第2のベクターと、

を含むトランスポゾン系を得ることと、

(ii) 前記外来DNA配列が前記細胞のゲノムに組み込まれるように、前記第1のベクター及び前記第2のベクターを前記細胞に導入することと、

を含み、

前記細胞がT細胞であり、

前記第1のベクターが細菌複製に必要とされる原核生物配列を欠くミニサークルDNAであり、前記トランスポザーゼが前記細胞中で発現され、前記第1のベクターからの前記外来DNA配列の切出し及び切り出された外来核酸の前記細胞のゲノムへの組込みを、細菌複製に必要とされる原核生物配列を含有する対応する第1のベクターから得られる転移有効性より高い転移有効性で触媒する、方法。

【請求項 2】

前記外来D N A配列が抗生物質耐性タンパク質、s i R N A、レポータータンパク質、サイトカイン、キナーゼ、抗原、抗原特異的受容体、サイトカイン受容体又は自殺ポリペプチドをコードする、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記第2のベクター中の前記プロモーターがサイトメガロウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、シミアンウイルス40プロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、ニワトリ-アクチンプロモーター、伸長因子1-プロモーター、ヒトH1プロモーター及びU6プロモーターからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 4】

導入工程の前に前記第1のベクターを線状化することを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記第1のベクター及び前記第2のベクターをリン酸カルシウム共沈、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、細胞スクリーニング、ソノポレーション、光学トランスフェクション、インペールフェクション、遺伝子銃、マグネットフェクション、ウイルス形質導入、又はデンドリマー、リポソーム若しくはカチオン性ポリマーによるトランスクエクションによって前記細胞に導入する、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

20

外来D N A配列を細胞のゲノムに組み込むためのキットであって、

容器と、

トランスポゾン系であって、

配列番号1からなる核酸配列を有する第1の逆方向反復、

前記第1の逆方向反復の下流の配列番号2からなる核酸配列を有する第2の逆方向反復、及び、

前記外来D N A配列を導入するための前記第1の逆方向反復と前記第2の逆方向反復との間のクローニング部位を含有する第1のベクターと、

配列番号4のアミノ酸配列を有するトランスポザーゼをコードする核酸に操作可能に連結したプロモーターを含有する第2のベクターと、

30

を含むトランスポゾン系と、

前記容器に付随し、前記トランスポゾン系の使用方法を示す取扱説明書と、
を含み、

前記細胞がT細胞であり、

前記第1のベクターが、細菌複製に必要とされる原核生物配列を欠くミニサークルD N Aであり、

前記トランスポザーゼが、前記第1のベクターからの前記外来D N A配列の切出し及び切り出された外来D N A配列の前記細胞のゲノムへの組込みを、細菌複製に必要とされる原核生物配列を含有する対応する第1のベクターから得られる転移有効性より高い転移有効性で触媒する、キット。

40

【請求項 7】

前記第2のベクター中の前記プロモーターがサイトメガロウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、シミアンウイルス40プロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、ニワトリ-アクチンプロモーター、伸長因子1-プロモーター、ヒトH1プロモーター及びU6プロモーターからなる群から選択される、請求項6に記載のキット。

【請求項 8】

前記第1のベクターが、前記第1の逆方向反復の下流かつ前記クローニング部位の上流に非原核生物プロモーターを更に含み、該非原核生物プロモーターがサイトメガロウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、シミアンウイルス40プロモーター

50

、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、ニワトリ - アクチンプロモーター、伸長因子 1 - プロモーター、ヒト H1 プロモーター及び U6 プロモーターからなる群から選択される、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 9】

前記第 1 のベクターが、前記外来 DNA 配列に操作可能に連結した非原核生物プロモーターを更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

前記非原核生物プロモーターがサイトメガロウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、シミアンウイルス 40 プロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、ニワトリ - アクチンプロモーター、伸長因子 1 - プロモーター、ヒト H1 プロモーター及び U6 プロモーターからなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記第 1 のベクターが、エンハンサー、サイレンサー又はインシュレーターを更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 12】

前記細胞は好ましくはヒト細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本開示は概して、対象の遺伝子を保有するように細胞を改変する系、キット及び方法、並びに治療を必要とする被験体を治療するための治療剤としての改変細胞の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

Piggly Bac (PB) トランスポゾンは、「カットアンドペースト」機構によりベクターと染色体との間で効率的に転移する可動遺伝因子である。PB トランスポザーゼは転移の際に、トランスポゾンベクターの両端に位置するトランスポゾン特異的逆方向末端反復配列 (ITR) を認識し、その内容を元の部位から移動させ、それらを T T A A 染色体部位に効率的に組み込む。PB トランスポゾン系の強力な活性により、PB ベクター中の 2 つの ITR 間の対象の遺伝子を容易に標的ゲノム内に動員することが可能となる。

30

【0003】

PB トランスポゾンの独自の特徴としては、(1) カーゴ (cargo) の制限がないこと (PB トランスポゾンが最大 100 キロベースの DNA フラグメントを標的細胞内に動員することができると報告されている)、(2) 転移プロセスが可逆的であること (挿入 PB ベクターを含有するゲノムを、PB トランスポザーゼのみを発現するベクターにより一時的にトランسفェクトし、トランスポゾンをゲノムから除去することができる)、及び (3) PB トランスポゾンの使用が特定の種に限定されないこと (T T A A 特異的 PB トランスポゾンは広範な種、例えば昆虫細胞及び哺乳動物細胞の遺伝子改変に極めて有用なトランスポゾンである) が挙げられる。さらに、PB トランスポゾンはウイルスベクターに比べて低い免疫原性を有する。

40

【0004】

免疫系はヒトの健康において重要な役割を果たす。免疫系の不全又は機能障害は、異常細胞及び侵入病原体を排除する身体の能力を低下させ、腫瘍及び感染に対する脆弱性を引き起こす。一方で、免疫系が過剰に活性であると、身体は自己組織を攻撃及び損傷し、結果として自己免疫疾患及び炎症が発症する。このため、免疫細胞の発現、機能又は相互作用を調節すること、例えば (i) 免疫細胞の遺伝子発現を上方調節若しくは下方調節するため、又は (ii) 免疫細胞の機能を強化若しくは抑制するために外来遺伝子を導入することで、免疫関連疾患を予防及び / 又は治療する潜在的手段がもたらされ得る。しかしながら、免疫細胞に外来遺伝子を恒常的に発現させることは困難であるため、細胞療法に

50

おけるそれらの使用は制限される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、関連技術分野では、外来D N A配列、例えば遺伝子を免疫細胞中で効率的かつ恒常に発現させることを可能にし、統いて免疫関連疾患及び/又は障害を予防又は治療するための細胞療法に使用することができる、改善された発現系及び方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

10

読者に基礎知識を与るために本開示の簡単な概要を以下に提示する。この概要は本開示の広範な概説ではなく、本発明の重要/決定的な要素を特定する又は本発明の範囲を定めるものではない。その唯一の目的は、この後に提示するより詳細な説明の序章として本明細書で開示される幾つかの概念を簡単に提示することである。

【0007】

外来D N A配列を細胞のゲノムに組み込む *in vitro* 方法を開示する。該方法は、(i)トランスポゾン系であって、(a)配列番号1からなる核酸配列を有する第1の逆方向反復、第1の逆方向反復の下流の外来D N A配列、及び配列番号2からなる核酸配列を有する、外来D N A配列の下流の第2の逆方向反復を含有する第1のベクター、並びに(b)配列番号4のアミノ酸配列を有するトランスポザーゼをコードする核酸に操作可能に連結したプロモーターを含有する第2のベクターを含むトランスポゾン系を得ることと、(ii)第1のベクター及び第2のベクターを細胞内に導入することによって行われる。外来D N A配列は、細胞内で発現され、第1のベクターからの外来D N A配列の切出し及び切り出された外来核酸の細胞のゲノムへの組込みを触媒するトランスポザーゼによって細胞のゲノムに組み込まれる。

20

【0008】

外来D N A配列を細胞のゲノムに組み込むためのキットも開示する。該キットは、(i)容器と、(ii)トランスポゾン系であって、(a)配列番号1からなる核酸配列を有する第1の逆方向反復、第1の逆方向反復の下流の配列番号2からなる核酸配列を有する第2の逆方向反復、及び外来D N A配列を導入するための第1の逆方向反復と第2の逆方向反復との間のクローニング部位を含有する第1のベクター、並びに(b)配列番号4のアミノ酸配列を有するトランスポザーゼをコードする核酸に操作可能に連結したプロモーターを含有する第2のベクターを含む、トランスポゾン系と、(iii)容器に付随し、トランスポゾン系の使用方法を示す取扱説明書とを含む。トランスポザーゼは、第1のベクターからの外来D N A配列の切出し及び切り出された外来D N A配列の細胞のゲノムへの組込みを触媒する。

30

【0009】

さらに、免疫関連疾患有する又は有する疑いがある被験体を治療する方法が本発明の範囲内である。該方法は、上記の *in vitro* 方法を好ましくは同様に上記のキットと共に用いて外来D N A配列を免疫細胞のゲノムに組み込み、改変免疫細胞を得ることと、有効量の改変免疫細胞を被験体に投与して、免疫関連疾患の症状を改善又は緩和することを含む。

40

【0010】

本開示の付随特徴及び利点の多くが、添付の図面に関連して検討される以下の詳細な説明を参照してより良好に理解される。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】酵素消化/ライゲーション法によって作製される指定のヘルパー・プラスミド及びD N Aドナー(環状型)を同時トランسفェクトしたH E K 2 9 3細胞のハイグロマイシン耐性コロニーの数を示すヒストグラムである。

50

【図1B】酵素消化 / ライゲーション法によって作製される指定のヘルパー・プラスミド及びDNAドナー（線状型）を同時トランスフェクトしたHEK293細胞のハイグロマイシン耐性コロニーの数を示すヒストグラムである。

【図1C】下記実施例1に従い市販のキットによって作製される指定のヘルパー・プラスミド及びDNAドナーを同時トランスフェクトしたHEK293細胞のハイグロマイシン耐性コロニーの数を示すヒストグラムである。

【図2A】酵素消化 / ライゲーション法によって作製される指定のヘルパー・プラスミド及びDNAドナーを同時トランスフェクトしたJurkat T細胞のハイグロマイシン耐性コロニーの数を示すヒストグラムである。

【図2B】下記実施例2に従い市販のキットによって作製される指定のヘルパー・プラスミド及びDNAドナーを同時トランスフェクトしたJurkat T細胞のハイグロマイシン耐性コロニーの数を示すヒストグラムである。

【図3】下記実施例3に従い初代ヒトT細胞に同時トランスフェクトした指定のDNAドナー及びヘルパー・プラスミドの転移有効性を示すヒストグラムである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

添付の図面に関連して下記に提示する詳細な説明は本実施例の説明を意図し、本実施例を構成又は利用し得る唯一の形態を表すことを意図するものではない。該説明は、実施例の機能及び実施例を構成し、実施する工程の順序を記載するものである。しかしながら、同じ又は同等の機能及び順序を異なる実施例によって達成することができる。

【0013】

1. 定義

便宜上、本明細書、実施例及び添付の特許請求の範囲に用いられる或る特定の用語をここにまとめる。本明細書において他に規定のない限り、本開示に用いられる科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解され、使用されるものと同じ意味を有するものとする。また、文脈上必要とされない限り、単数形の用語がその複数形を含み、複数形の用語がその単数形を含むことを理解されたい。特に、本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、数量を特定していない単数形（the singular forms "a" and "an"）は文脈上そうでないことが明らかに示されない限り、複数の指示対象を含む。また、本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、「少なくとも1つの」及び「1つ以上の」という用語は同じ意味を有し、1つ、2つ、3つ又はそれ以上を含む。

【0014】

本発明の広い範囲を説明する数値範囲及びパラメーターは近似値であるが、特定の実施例に記載される数値は可能な限り正確に報告される。しかしながら、いずれの数値もそれぞれの試験測定値に見られる標準偏差に必然的に起因する或る特定の誤差を本質的に有する。また、本明細書で使用される場合、「約」という用語は概して、所与の値又は範囲の10%、5%、1%又は0.5%内であることを意味する。代替的には、「約」という用語は、当業者が検討した場合に許容可能な平均値の標準誤差の範囲内であることを意味する。実施例（operating/working examples）以外において又は他に明白な指定のない限り、本明細書で開示される材料の量、時間、温度、操作条件、量の比率等のようなその数値範囲、量、値及びパーセンテージの全てが、いずれの場合にも「約」という用語によって修飾されると理解されるものとする。したがって、そうでないことが示されない限り、本開示及び添付の特許請求の範囲に記載される数値パラメーターは、必要に応じて変更され得る近似値である。少なくとも、各々の数値パラメーターは、少なくとも報告される有効数字を考慮して、通常の丸めの手法により解釈されるものとする。

【0015】

本明細書で使用される場合、「トランスポゾン」又は「転移因子」という用語は、ドナー・ポリヌクレオチド（例えば、ベクター）からの切出しによりゲノム内のその位置を変え、標的部位（例えば、細胞のゲノムDNA又は染色体外DNA）に組み込むことが可能なポリヌクレオチドを指す。トランスポゾンは、シス作用ヌクレオチド配列が隣接した核酸

10

20

30

40

50

配列を含むポリヌクレオチドであり、少なくとも1つのシス作用ヌクレオチド配列が核酸配列の5'に位置し、少なくとも1つのシス作用ヌクレオチド配列が核酸配列の3'に位置する。シス作用ヌクレオチド配列は、トランスポゾンの両端に少なくとも1つの逆方向反復(I R)を含み、これにトランスポザーゼ、好ましくは哺乳動物piggyBacファミリーのトランスポザーゼの成員が結合する。或る特定の好ましい実施形態では、トランスポゾンはガのmicro-piggyBacトランスポゾンである。

【0016】

本明細書で使用される場合、「トランスポザーゼ」という用語は、ドナーポリヌクレオチド、例えばミニサークル構築物からのトランスポゾンの切出し、及びその後の標的細胞のゲノムDNA又は染色体外DNAへのトランスポゾンの組込みを触媒するポリペプチドを指す。トランスポザーゼは逆方向反復配列に結合するのが好ましい。

10

【0017】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。このため、例えばペプチド、オリゴペプチド、タンパク質、抗体及び酵素という用語がポリペプチドの定義内に含まれる。「ポリペプチド」という用語はポリペプチドの翻訳後修飾、例えばグリコシル化(例えば、糖類の付加)、アセチル化、リン酸化等も含む。

【0018】

「ベクター」という用語は本明細書で使用される場合、それが連結した別の核酸分子を輸送することが可能な核酸分子を指す。ベクターの例としては、細菌、プラスミド、ファージ、コスミド、エピソーム、ウイルス及び挿入可能なDNAフラグメント、すなわち相同組換えにより宿主細胞ゲノムに挿入されることが可能なフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0019】

本明細書で使用される場合、「プラスミド」という用語は、外来DNAフラグメントを受け入れることが可能であり、原核細胞又は真核細胞内で複製することが可能な環状二本鎖DNAを指す。

【0020】

「ミニサークル」、「ミニサークルDNA」及び「ミニサークル核酸配列」という用語は同義であり、通例原核生物抗生物質耐性遺伝子及び原核生物複製起点等の複製に必要とされるプラスミド/ベクター骨格配列のいずれかを欠いている核酸配列を指すために用いられる。ミニサークルは、プラスミド中のリコンビナーゼ認識部位間の部位特異的分子内組換えによってin vivoで細菌プラスミドから生成することができ、細菌プラスミド骨格DNAを欠いているミニサークルDNAベクターが得られる。本開示の一実施形態によると、本ミニサークルは酵素消化/ライゲーション法によって作製される。本開示の別の実施形態によると、本ミニサークルは市販のキット、すなわちMinicircle DNA Productionキット(System Biosciences, CA, USA)によって作製される。

30

【0021】

本明細書で使用される場合、「導入する」という用語は、細胞又は生物へのポリヌクレオチド(例えば、ミニサークル核酸配列又は本トランスポゾン系のヘルパーべクター)の導入を指す。ポリヌクレオチドの核酸は、様々なタンパク質と会合しているか又はベクターに組み込まれた裸のDNA又はRNAの形態であり得る。「導入する」という用語は本明細書で使用される場合、可能な限り最も広い意味を伝え、例えばトランسفエクション法(物理的及び/又は化学的処理による真核細胞へのポリヌクレオチドの導入)、形質転換法(物理的及び/又は化学的処理による原核細胞へのポリヌクレオチドの導入)、ウイルス法/ウイルス形質導入法(ウイルス又はウイルスベクターによる真核細胞及び/又は原核細胞へのポリヌクレオチドの導入)、コンジュゲーション法(或る細胞から別の細胞への直接細胞間接觸又は細胞間の細胞質間橋によるポリヌクレオチドの導入)及び融合法(同型細胞融合及び異型細胞融合を含む2つの細胞の融合)による導入を包含することを

40

50

意図するものである。

【0022】

「改变する」という用語は本明細書で使用される場合、細胞における検出可能な変化を生じる細胞の任意の操作を指し、該操作としては、細胞と異種／同種のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドの挿入、並びに細胞に固有のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドの突然変異が挙げられるが、これらに限定されない。

【0023】

「転移」という用語は本明細書で使用される場合、多くの場合ゲノム内、又はゲノム間、DNA構築物（プラスミド、バクミド及びコスミド等）間若しくはゲノムとDNA構築物との間に生じる、ポリヌクレオチド（トランスポゾン）の或る位置からの移動又はコピー及び別の位置への挿入を伴う複雑な遺伝子再配列プロセスを指す。本開示の実施形態によると、転移はゲノムとDNA構築物との間に生じ、ポリヌクレオチド（例えば、本トランスポゾン系の発現カセット）が本トランスポゾン系のミニサークル核酸配列から宿主細胞（例えば、免疫細胞）のゲノムへと移入される。

10

【0024】

「転移有効性」という用語は本明細書で使用される場合、宿主細胞の集団における導入ポリヌクレオチドを含有する宿主細胞の数を指す。概して、転移有効性はレポーター遺伝子、例えば -galをコードするポリヌクレオチドを標的細胞の集団にトランスフェクトすることによって決定することができる。このため、トランスフェクション効率は、導入ポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子産物をアッセイすること、例えば -gal活性を有する細胞の数を測定することによって決定することができる。本開示の一実施形態によると、導入ポリペプチドはハイグロマイシン耐性遺伝子であり、したがって転移有効性はハイグロマイシンに耐性を示す細胞の数を測定することによって決定することができる。

20

【0025】

本明細書で使用される場合、「免疫細胞」という用語は、免疫応答において役割を果たす細胞を指す。免疫細胞は造血系起源であり、B細胞及びT細胞等のリンパ球；ナチュラルキラー細胞；単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球及び顆粒球等の骨髄細胞を含む。

30

【0026】

「免疫関連疾患」という用語は本明細書で使用される場合、免疫系が疾患の原因に関与するか、又は免疫系の適切な刺激若しくは阻害が疾患の治療及び／又は疾患からの保護をもたらし得る疾患及び／又は病態を指す。本発明によって治療可能な例示的な免疫関連疾患としては、腫瘍、感染性疾患、アレルギー、自己免疫疾患、移植片対宿主病又は炎症性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0027】

「被験体」という用語は、本発明の方法を用いて治療可能なヒト種を含む哺乳動物を指す。「被験体」という用語は一方の性が特に指定されない限り、雄性及び雌性の両方を指すことを意図するものである。

40

【0028】

2. 本発明の説明

概して、本開示は、対象の遺伝子（例えば、治療用タンパク質の遺伝子）を保有するように細胞を改变するための系、方法及び／又はキットに関する。改变細胞はこの場合、対象の遺伝子の産物によって治療可能な疾患及び／又は障害を患有患者を治療する治療剤として使用される。

【0029】

上述のように、外来DNA配列を細胞のゲノムに組み込む *in vitro* 方法が提供される。外来DNA配列は、抗生物質耐性タンパク質、sirNA、レポータータンパク質、サイトカイン、キナーゼ、抗原、抗原特異的受容体、サイトカイン受容体又は自殺ポリペプチドをコードすることができる。例えば、外来DNA配列は、腫瘍関連抗原に特異

50

的な受容体をコードすることができる。該方法によって改変されたT細胞は、腫瘍関連抗原を発現する腫瘍細胞を認識し、特異的に殺すことが可能である。別の例では、外来DNA配列はハイグロマイシン耐性タンパク質をコードするため、ハイグロマイシン耐性細胞株を樹立することができる。代替的には、外来DNA配列は任意の生物学的機能を有しなくてよく、それ自体を必須遺伝子に挿入し、それによりその機能を妨げることによって別の遺伝子の機能を妨げるために使用することができる。例えば、外来DNA配列はPD-1又はT細胞特異的受容体(TCR)遺伝子サイレンシングのためのアンチセンスRNAをコードし得る。

【0030】

上記の方法は、初めにトランスポゾン系を得ることによって行う。

10

【0031】

トランスポゾン系は、配列番号1からなる核酸配列を有する第1の逆方向反復、第1の逆方向反復の下流の外来DNA配列、及び、配列番号2からなる核酸配列を有する、外来DNA配列の下流の第2の逆方向反復を含有する第1のベクターを含む。第1のベクターは、外来DNA配列に操作可能に連結した非原核生物プロモーターを更に含み得る。非原核生物プロモーターは、例えばサイトメガロウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、シミアンウイルス40プロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、ニワトリ-アクチンプロモーター、伸長因子1-プロモーター、ヒトH1プロモーター及びU6プロモーターであり得る。例としては、第1のベクターはエンハンサー、サイレンサー又はインシュレーターを更に含む。

20

【0032】

特定の実施形態では、第1のベクターは、細菌複製に必要とされる原核生物配列を欠くミニサークルDNAである。ミニサークルDNAは、外来DNA配列を除いて500bp～1500bpの長さを有することができる。例えば、ミニサークルDNAは、外来DNA配列を除いて700bp～1200bp又は800bp～1000bpの長さを有することができる。

【0033】

概して、原核生物DNAは、宿主において免疫応答を引き出し、第1のベクターが保有する外来DNAの発現効果を減少させ得る免疫刺激抗原とみなされる。したがって、ミニサークルDNA中に原核生物配列を欠くことから、本トランスポゾン系は宿主細胞、例えば真核細胞における外来DNAの導入及び発現の点で、原核生物DNA配列を含む他のトランスポゾン/発現系と比較してより効率的である。さらに、上記のトランスポゾン系は、ミニサークルDNA中に原核生物DNA配列が存在しないために、典型的なトランスポゾン/発現系と比較してサイズがより小さい。

30

【0034】

トランスポゾン系はまた、第2のベクター、すなわちトランスポザーゼをコードする核酸に操作可能に連結したプロモーターを含有するヘルパープラスミドを含む。トランスポザーゼは、第1のベクター中の第1の逆方向反復及び第2の逆方向反復を認識し、それらに結合する。トランスポザーゼは、例えばThyPLGMH、mycPBase、TPLGMH又はHAhypBaseであり得る。特定の実施形態では、トランスポザーゼは配列番号3によってコードされる配列番号4のアミノ酸配列を有する。ヘルパーベクターは、Yaa-Jyuhn James Meir et. al. (A versatile, highly efficient, and potentially safer piggyBac transposon system for mammalian genome manipulations, FASEB, 2013: 27, 4429-4443)によって記載されるような当該技術分野で既知の方法に従って作製することができる。

40

【0035】

第2のベクター中のプロモーターは、サイトメガロウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、シミアンウイルス40プロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、ニワトリ-アクチンプロモーター、伸長因子1-プロモーター、ヒトH1プロモーター及びU6プロモーターから選択さ

50

れる。特定の実施形態では、プロモーターはサイトメガロウイルスプロモーターである。

【0036】

上記方法を行うために、第1のベクター及び第2のベクターを細胞に導入する。これはリン酸カルシウム共沈、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、細胞スクリーニング (cell squeezing) (細胞膜の軽い圧迫)、ソノポレーション (高強度超音波による細胞膜における細孔形成の誘導)、光学トランスフェクション (optical transfection) (高集束レーザーによる細胞膜における小さな穴の生成)、インペールフェクション (impalefection) (ナノファイバーの表面に結合したDNAの細胞への挿入)、遺伝子銃 (不活性固体のナノ粒子に接続したDNAの細胞核への「打込み」)、マグネットフェクション (磁力を用いた標的細胞へのDNAの送達)、ウイルス形質導入 (ウイルスを担体として使用した標的細胞へのDNAの送達)、又はデンドリマー、リポソーム若しくはカチオン性ポリマーによるトランスフェクションを含むが、これらに限定されない技法を用いて達成することができる。一例では、トランスポゾン系を非リポソーム化学的方法、すなわちFuGENE (商標) HDトランスフェクションにより細胞に導入する。別の例では、トランスポゾン系をヌクレオフェクションにより細胞に導入する。上記方法の特定の実施形態では、トランスポゾン系の第1のベクターを、例えば制限酵素を使用して線状化した後、細胞に導入する。

【0037】

第1のベクター及び第2のベクターを、2:1~1:1の範囲の重量比で細胞に導入する。一実施形態によると、外来DNAを上皮細胞に導入し、第1のベクター、例えばミニサークルDNAと第2のベクターとの重量比は2:1~1:1である。別の実施形態によると、外来DNAを不死化T細胞に導入し、ミニサークル核酸配列とヘルパーべクターとの重量比は約2:1~1:1である。更に別の実施形態では、外来DNAを初代T細胞に導入し、ミニサークル核酸配列とヘルパーべクターとの重量比は約2:1~1:1である。

【0038】

外来DNA配列を、第2のベクターによって細胞内で発現され、第1のベクターからの外来DNA配列の切出し及び切り出された外来DNAの細胞のゲノムへの組込みを触媒するトランスポザーゼにより細胞のゲノムに組み込む。

【0039】

上記の方法に使用される細胞は、免疫細胞であり得る。より具体的には、免疫細胞はT細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ又はマスト細胞であり得る。

【0040】

別の態様では、細胞は幹細胞である。幹細胞は、例えば骨髄、脂肪組織、末梢血、臍帯血又は歯髄に由来し得る。特定の方法では、細胞はヒト細胞である。

【0041】

上記の方法を実現するためには、外来DNA配列を細胞のゲノムに組み込むためのキットが提供される。キットは上記の本トランスポゾン系を含む容器と、容器に付随し、本トランスポゾン系の使用方法を示す取扱説明書とを含む。上述のように、本トランスポゾン系は第1のベクター及び第2のベクターを含む。

【0042】

第1のベクターは、配列番号1からなる核酸配列を有する第1の逆方向反復、第1の逆方向反復の下流の配列番号2からなる核酸配列を有する第2の逆方向反復、及び、外来DNA配列を導入するための第1の逆方向反復と第2の逆方向反復との間のクローニング部位を含有する。

【0043】

キット内の第1のベクターは、第1の逆方向反復の下流かつクローニング部位の上流の非原核生物プロモーターを更に含み得る。外来DNAは、非原核生物プロモーターが外来DNA配列に操作可能に連結するようにクローニング部位に挿入することができる。非原核生物プロモーターは、例えばサイトメガロウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルス

10

20

30

40

50

プロモーター、シミアンウイルス40プロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、ニワトリ-アクチンプロモーター、伸長因子1-プロモーター、ヒトH1プロモーター及びU6プロモーターであり得る。一例では、第1のベクターはエンハンサー、サイレンサー又はインシュレーターを更に含む。

【0044】

キットは第2のベクター、すなわちトランスポザーゼをコードする核酸に操作可能に連結したプロモーターを含有するヘルパープラスミドも含む。トランスポザーゼは、例えばThyPLGMH、mycPBase、TPLGMH又はHAhypBaseであり得る。特定の実施形態では、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。

【0045】

上記のin vitro方法に使用される第2のベクターのようなキット内の第2のベクターはサイトメガロウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、シミアンウイルス40プロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、ニワトリ-アクチンプロモーター、伸長因子1-プロモーター、ヒトH1プロモーター及びU6プロモーターから選択されるプロモーターを含有する。特定の実施形態では、プロモーターはサイトメガロウイルスプロモーターである。

【0046】

本明細書で使用される場合、「取扱説明書」は、使用者に本トランスポゾン系の使用方法を伝える又は教示するために使用することができるパンフレット、記録、図表又は任意の他の表現手段（例えばテープ、CD、VCD又はDVD）を含む。取扱説明書は容器に貼り付けることができるか、又は本トランスポゾン系を含む容器とは独立して包装される。

【0047】

本明細書に記載のキットは、トランスポゾン系を安定化する及び/又は細胞トランسفエクションを行うための緩衝溶液を更に含み得る。緩衝溶液は、例えばリン酸緩衝生理食塩水、トリス系生理食塩水、トリス-EDTA緩衝液、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸緩衝液又は(N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)緩衝液であり得る。

【0048】

上述のように、免疫関連疾患を有する又は有する疑いがある被験体を治療する方法が提供される。該方法は、上記のキットを用いて免疫関連疾患の治療に好適な遺伝子を保有するように細胞を改変することと、免疫関連疾患の治療にとって有効量の改変細胞を投与することとを含む。一例では、遺伝子は、急性リンパ芽球性白血病の治療のためのCAR-T細胞を改変するCD19に対するキメラ抗原受容体(CAR)である。

【0049】

免疫関連疾患を有する又は有する疑いがある被験体はヒト、マウス、ラット、ウサギ、サル及びブタを含む哺乳動物である。特定の実施形態では、被験体はヒトである。治療される被験体がヒトである場合、本方法の導入/移入免疫細胞は、被験体自身に由来するのが好ましい。代替的には、本方法の導入/移入免疫細胞はドナーに由来する。

【0050】

本開示の幾つかの実施形態によると、本方法は腫瘍又は感染性疾患等の免疫抑制疾患の治療に有用である。これらの実施形態では、本トランスポゾン系は、被験体における免疫応答が増強されるように免疫増強遺伝子を含み得る。

【0051】

本開示の他の実施形態によると、本方法は、過剰な(hyperactive)免疫応答に起因する疾患（例えば、自己免疫疾患）又は不適切な免疫応答に起因する疾患（例えばアレルギー、移植片対宿主病又は炎症性疾患）の治療に有用である。実施形態では、免疫抑制遺伝子を含む本トランスポゾン系は、被験体において免疫応答を阻害することが可能である。

【0052】

以下の実施例は、本発明の或る特定の態様を明瞭にし、当業者が本発明を実施するのを

10

20

30

40

50

助けるために提示される。これらの実施例は、本発明の範囲をいかなる形にも限定するのみならぬものではない。更なる詳述がなくとも、当業者は本明細書の記載に基づいて本発明を最大限に利用することができると考えられる。本明細書に引用される全ての刊行物は、その全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

【実施例】

【0053】

材料及び方法

細胞培養

ヒト胎児腎臓細胞株293 (HEK293)、ヒトJKT不死化Tリンパ球 (Jurkat T) 及び初代ヒトT細胞を本研究に使用した。HEK293細胞は10% FBS、2 mM L-グルタミン、1倍非必須アミノ酸、1倍ペニシリン/ストレプトマイシン及び1 mM ピルビン酸ナトリウムを含有するMEM培地中で培養した。Jurkat T細胞及び初代ヒトT細胞は2 mM L-グルタミン、10% FBS、1 mM ピルビン酸ナトリウム及び0.1 mM 非必須アミノ酸を含有するRPMI1640培地中で培養した。全ての細胞を37°C、5% CO₂で維持した。

【0054】

馴化培地の作製

Jurkat細胞を新鮮培地中、 2×10^6 / mLの密度で24時間培養した後、培養培地を回収し、濾過し、馴化培地として使用した。

【0055】

プラスミド及び/又は発現構築物の生成

pBS-カセット

SV40プロモーターによって駆動されるハイグロマイシン耐性遺伝子を含有するDNAフラグメントを、pCDNA3.1-hygromycin-LacZベクター (Invitrogen) から切り出した。XmnI及びSapI消化後に、DNAフラグメントをpBlueScript-*SK*IIのSmaI部位にクローニングし、pBS-hygromycinの構築を完了した。カナマイシン耐性遺伝子及びColE1複製起点を更に挿入するために、pZErO-2.1 (Invitrogen) のApollon-Af1IIフラグメントをpBS-hygromycinのEcoRV部位にクローニングし、pBS-カセットの構築を完了した。

【0056】

mini-piggycbac-long

pBS-カセットを制限酵素SmaI及びEcoRVで消化し、続いてpBSII-ITR1に由来するpXLBacIIPUbnlsgEGFPに消化フラグメントを挿入した。このようにして作製した構築物mini-piggycbac-longは、その5'末端及び3'末端にそれぞれ308 bp及び238 bpの末端反復 (TR) を有するものであった。

【0057】

線状型のmini-piggycbac-longは、mini-piggycbac-longをXmnIで消化することによって作製する。

【0058】

mini-piggycbac-short

mini-piggycbac-long構築物をPciI及びAclIで消化し、クレノウ (NE Biolabs) によってフィルインし (filled-in)、T4 DNAリガーゼ (NE Biolabs) によって自己ライゲートさせ、アンピシリン耐性遺伝子及びf1複製起点を含有しないmini-piggycbac-shortを作製した。

【0059】

線状型のmini-piggycbac-shortは、mini-piggycbac-shortをBglIで消化することによって作製する。

【0060】

micro-piggycbac-long

10

20

30

40

50

短い piggyBac 末端反復ドメイン (TRD) (すなわち、pXL-BacIIの746~808の3'LTR及び1426~1460の5'LTR) を以下の4対のプライマー；pB-11-KpnI (配列番号5)、pB-5-フォワード (配列番号6)、pB-6-リバース (配列番号7) 及びpB-12-SacI (配列番号8) からなるPCR混合物から得た。間にSwaI及びXhoI制限部位を有する67bpの5'TRD及び40bpの3'TRDの両方を含有する得られるアンプリコンを、KpnI及びSacI制限部位を介してpBS-SKIIにクローニングし、pPBendAATTを得た。上記のpBS-カセットから得られる発現カセットを、平滑末端XhoI部位を介してpPBendAATT中の短いpiggybac_k TRDの間に挿入し、micro-piggyBac_longを作製した。

10

【0061】

線状型のmicro-piggyBac_longは、micro-piggyBac_longをXmnIで消化することによって作製する。

【0062】

micro-piggyBac_short

micro-piggyBac_longをAcc65I及びAf1IIIで消化し、アンピシリン耐性遺伝子及びf1複製起点を除去した。残りのDNAフラグメントを平滑末端化し、続いて自己ライゲーションを行い、アンピシリン耐性遺伝子及びf1複製起点を含有しないmicro-piggyBac_shortの構築物を生成した。この構築物もミニサークルカセットと指定される。

20

【0063】

線状型のmicro-piggyBac_shortは、micro-piggyBac_shortをXmnIで消化することによって作製する。

【0064】

ミニサークル-microPB-カセット

代替的には、micro-piggyBac_short、すなわちミニサークルカセットは、MC-Easy circle Minicircle DNA Productionキットを用いて作製することができる。この方法では、micro-piggyBac_longをKpnI、SacI及びXmnIで消化し、micro-piggyBacの左(microL)及び右(microR)逆方向反復を含有するKpnI-SacIフラグメント(3993bp)を平滑末端化し、pMC.BESPX-MCS1のEcoRV部位に挿入して、pMC-microPB-カセットを作製した。ミニサークル-microPB-カセットは、pMC-microPB-カセットからMC-Easy circle Minicircle DNA Productionキットを用い、製造業者のプロトコルに従って作製した。このようにして作製したミニサークル-microPB-カセットは、アンピシリン耐性遺伝子及びf1複製起点を含有しないものであった。

30

【0065】

ヘルパープラスミド

ヘルパープラスミドpCMV-ThyPLGMH、pCMV-mycoPBaSe、pCMV-TPLGMH及びpCMV-HAhyPBaSeを、Yaa-Jyuhn James Meir et. al. (A versatile, highly efficient, and potentially safer piggyBac transposon system for mammalian genome manipulations, FASEB, 2013; 27, 4429-4443) によって記載されるプロトコルに従って構成した。この刊行物の内容全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

40

【0066】

転移アッセイ

HEK293細胞

トランスフェクションの18時間前に80%コンフルエンスの細胞を採取し、24ウェルプレートの個々のウェルに 1×10^5 細胞/ウェルの密度で播種した。各トランスフェ

50

クションについては、Fugene 6 (Roche, Florence, SC) を用いて合計 300 ng の DNA 混合物をトランスフェクトした。各 DNA 混合物は、合計 300 ng の DNA に対して 100 ng のヘルパー・プラスミド (すなわち、pCMV-ThyPLGMH、pCMV-myCPBase、pCMV-TPLGMH 又は pCMV-HAhyPBase)、様々な量の DNA ドナー (すなわち、mini-piggypbac_long、mini-piggypbac_short、micro-piggypbac_long、micro-piggypbac_short、pMC-microPB-カセット又はミニサークル-microPB-カセット；最小のドナーの量を 100 ng と設定した) 及び p cDNA 3.1 を含有するものであった。各トランスフェクション反応については、トランスフェクト細胞の 5 分の 1 を 100 mm プレートに移し、続いて 14 日間のハイグロマイシン選択を行った。クローンを計数するために、4% パラホルムアルデヒドを含有する PBS で細胞を 10 分間固定した後、0.2% メチレンブラーで 1 時間染色した。14 日間のハイグロマイシン選択の後、直径 0.5 mm のコロニーのみを計数した。 10

【0067】

Jurkat T 細胞

細胞をヌクレオフェクションの 24 時間前に 1×10^6 / mL で播種した。各ヌクレオフェクション反応については、合計 6 μ g の DNA を用いて 1×10^6 個の細胞にトランスフェクトした。各 DNA 混合物は、合計 6 μ g の DNA に対して 2.5 μ g のヘルパー・プラスミド (すなわち、pCMV-ThyPLGMH、pCMV-myCPBase、pCMV-TPLGMH 又は pCMV-HAhyPBase)、様々な量の DNA ドナー (すなわち、mini-piggypbac_long、mini-piggypbac_short、micro-piggypbac_long、micro-piggypbac_short、pMC-microPB-カセット又はミニサークル-microPB-カセット；最小のドナーの量を 2.0 μ g と設定した) 及び p cDNA 3.1 を含有するものであった。ヌクレオフェクションの 24 時間後に、1.2 mg のハイグロマイシンを含む上記の馴化培地 50 μ L 中 30 個の生細胞を、96 ウェルプレートの各ウェルに播種した。2、3 日おきに、細胞クラスターを乱すことなく同量の馴化培地を各ウェルに静かに添加した。各反応について、合計 10200 個の生細胞をハイグロマイシン選択に供した。転移活性を、各反応についての細胞クラスターの総数をハイグロマイシン選択の 6 日後又は 7 日後に光学顕微鏡下で計数することによって決定した。 30

【0068】

初代 T 細胞

ヌクレオフェクションの 1 日前に、ヒト初代細胞 (CD8⁺CD45RA⁺) を RPMI 完全培地で融解した。一晩の培養後に細胞を採取し、ヌクレオフェクションに供した。各ヌクレオフェクション反応については、合計 2.2 μ g の DNA を用いて、20 μ l のオールインワンヌクレオフェクション緩衝液 (GF1001, GenomeFrontier, Biosciences) 中 1×10^5 個の細胞にトランスフェクトした。各 DNA 混合物は、合計 2.2 μ g の量の DNA に対して 0.8 μ g のヘルパー・プラスミド (すなわち、pCMV-HAhyPBase 又は pCMV-ThyPLGMH)、様々な量のドナープラスミド (すなわち、mini-piggypbac_long、mini-piggypbac_short、micro-piggypbac_long 又は micro-piggypbac_short；最大のドナーの量を 1.4 μ g と設定した) 及び p cDNA 3.1 を含有するものであった。ヌクレオフェクションの 24 時間後に、各反応においてトランスフェクトした全細胞を、刺激物質 (stimuli) (IL-2 (50 μ g / mL) 及び PHA) 及びハイグロマイシン (1.0 mg / mL) を添加した 500 μ l の RPMI 1640 完全培地中で培養した。転移活性を、ハイグロマイシン選択の 22 日後の生存細胞の総数を計数することによって決定した。 40

【0069】

実施例 1 : HEK293 細胞における転移活性

本実施例では DNA ドナー及びヘルパー・プラスミドの転移活性を分析した。結果を図 1

10

20

30

40

50

A～図1Cに示す。

【0070】

図1Aに示されるように、どのDNAドナーを同時トランスフェクトするかに関わらず、pCMV-ThyPLGMHをトランスフェクトした細胞はpCDNA3.1、pCMV-TPLGMH又はpCMV-myCPBaseをトランスフェクトしたものと比較してより多くのハイグロマイシン耐性細胞を生じた。データから、ThyPLGMHが試験したトランスポザーゼの中で最も強い転移活性を示すことが示された。DNAドナーに関しては、試験した4つ全てのDNAドナー(すなわち、mini-piggypbac_1long、mini-piggypbac_short、micro-piggypbac_1long及びmicro-piggypbac_short)がHEK293細胞において同様の転移活性を示した(図1A)。驚くべきことに、DNAドナーを線状化形態でHEK293細胞にトランスフェクトした場合、micro-piggypbac(すなわち、micro-piggypbac_short又はmicro-piggypbac_long)の転移活性は、mini-piggypbac(すなわち、mini-piggypbac_short又はmini-piggypbac_long)よりも明らかに高く(図1B)、micro-piggypbac_shortが最も強い転移活性を示した。

【0071】

転移活性を、MC-Easy circle Minicircle DNA Productionキットにより作製したミニサークルを用いて更に検査した。図1Cに示すデータから、pCMV-ThyPLGMHを同時トランスフェクトした場合に、ミニサークル-microPB-カセットの活性がpMC-microPB-カセットよりも約2.7倍高いことが示された。

【0072】

まとめると、これらのデータから、転移活性が全長又はDNAドナーのTRDの増大と共に減少し、ThyPLGMHが試験した他のトランスポザーゼよりも高い転移活性を有することが示された。したがって、他のDNAドナー及びヘルパープラスミドと比較して、pCMV-ThyPLGMHとmicro-piggypbacミニサークル(すなわち、micro-piggypbac_short又はミニサークル-microPB-カセットのいずれか)との組合せは、HEK293細胞において最も高い転移有効性をもたらした。

【0073】

実施例2：Jurkat T細胞における転移活性

pCMV-ThyPLGMH及びmicro-piggypbacミニサークルの転移活性をJurkat T細胞において更に検査した。結果を図2A及び図2Bに示す。

【0074】

図2Aに示されるように、pCMV-ThyPLGMH及びmicro-piggypbac_shortを同時トランスフェクトした細胞から得られるハイグロマイシン耐性コロニーの数は、他のDNAドナー及びヘルパープラスミドを同時トランスフェクトした細胞よりも顕著に高かった。

【0075】

図1Cに示す研究結果と同様に、pCMV-ThyPLGMHとミニサークル-microPB-カセットとの組合せは、他のDNAドナー/ヘルパープラスミドの組合せと比較して最も高い転移有効性をもたらした(図2B)。

【0076】

実施例3：初代ヒトT細胞における転移活性

上記の細胞株、すなわちHEK293細胞及びJurkat T細胞に加えて、特定のDNAドナー及びヘルパープラスミドの転移活性を初代ヒトT細胞において更に分析した。

【0077】

図3に示されるように、ヒト初代T細胞における最良の転移活性が、単鎖型又は長鎖型

10

20

30

40

50

の*micro-piggyBac*、すなわち*micro-piggyBac_short*又は*micro-piggyBac_long*のいずれかと共にpCMV-ThyPLGMHをトランスフェクトした細胞において観察された。

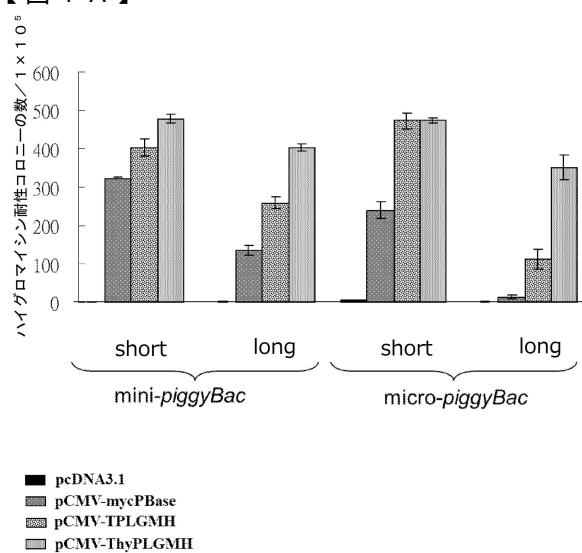
【0078】

結論として、本開示は外来遺伝子を細胞のゲノム、特に免疫細胞中に組み込むためのトランスポゾン系及び方法を提供する。他のDNAドナー及びヘルパープラスミドの組合せと比較して、pCMV-ThyPLGMH及び*micro-piggyBac*ミニサークル（酵素消化/ライゲーション法によって作製される（すなわち、*micro-piggyBac_short*）又はMC-Easy circle Minicircle DNA Productionキットによって作製される（すなわち、ミニサークル-microPB-カセット））又は*micro-piggyBac_long*の組合せは最も高い転移有効性をもたらし得る。したがって、本開示は、治療を必要とする被験体に治療用遺伝子を効率的に輸送することにより種々の疾患（例えば、免疫関連疾患）を治療する潜在的手段を提供する。

【0079】

上記の実施形態の説明はほんの一例として与えられ、様々な修正を当業者が加え得ることを理解されたい。上記の明細書、例及びデータは、本発明の例示的な実施形態の構造及び使用に関する完全な説明を提供する。本発明の種々の実施形態が、或る程度まで詳細に、又は1つ以上の個別の実施形態を参照しながら、これまで説明されてきたが、当業者は、本発明の趣旨又は範囲から逸脱することなく、開示された実施形態に数多くの変更を加えることができる。

【図1A】



【図1B】

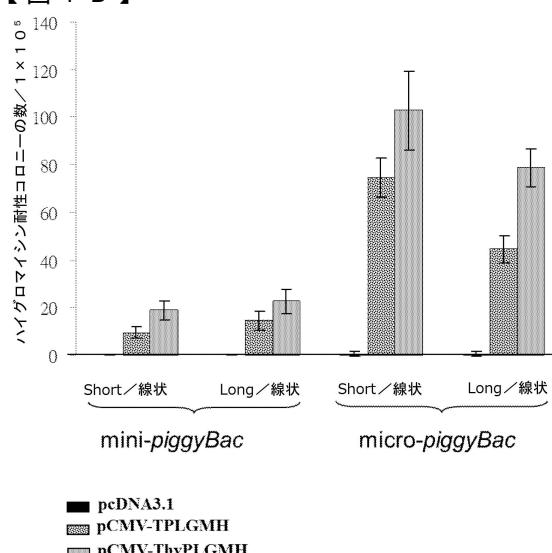
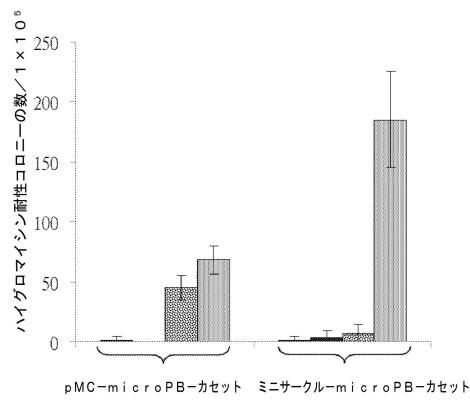


FIG. 1A

FIG. 1B

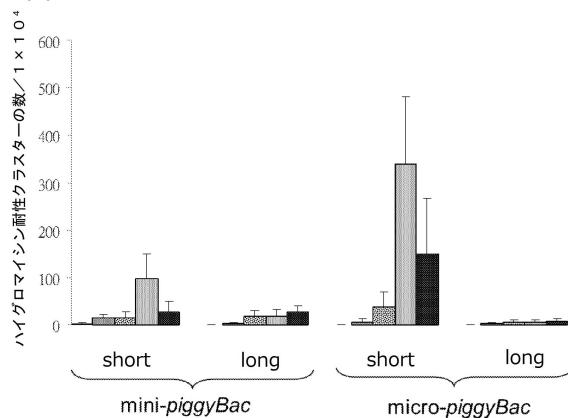
【図 1C】



■ pcDNA3.1
■ pCMV-mycPBase
■ pCMV-TPLGMH
■ pCMV-ThyPLGMH
■ pCMV-HAhypPBase

FIG. 1C

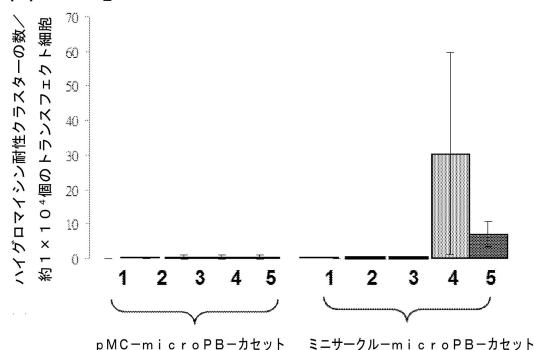
【図 2A】



■ pcDNA3.1
■ pCMV-mycPBase
■ pCMV-TPLGMH
■ pCMV-ThyPLGMH
■ pCMV-HAhypPBase

FIG. 2A

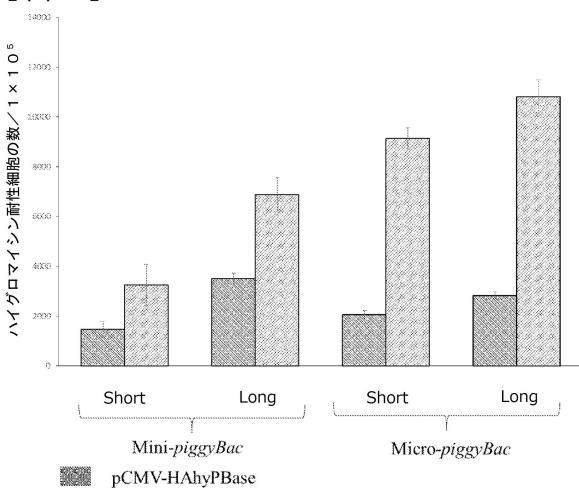
【図 2B】



■ pcDNA3.1
■ pCMV-mycPBase
■ pCMV-TPLGMH
■ pCMV-ThyPLGMH
■ pCMV-HAhypPBase

FIG. 2B

【図 3】



■ pCMV-HAhypPBase
■ pCMV-ThyPLGMH

FIG. 3

【配列表】

0006956416000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 12 N 9/12 (2006.01) C 12 N 9/12

(72)発明者 ウー サレイナ チュン - ユアン
台湾 11491 タイペイ シティ ネイフー ディストリクト ルイグワン ロード レーン
66 ナンバー 36 3エフ

審査官 中野 あい

(56)参考文献 特表2008-545375 (JP, A)
中国特許出願公開第102943092 (CN, A)
国際公開第2015/157386 (WO, A1)
米国特許出願公開第2009/0042297 (US, A1)
Meir YJ. et al., Genome-wide target profiling of piggyBac and Tol2 in HEK 293: pros and cons for gene discovery and gene therapy, *BMC Biotechnology*, 2011年, 11, 28
Meir YJ. et al., A versatile, highly efficient, and potentially safer piggyBac transposition system for mammalian genome manipulations, *The FASEB Journal*, 2013年, 27(11), 4429-4443
Nat Biotechnol. 2010 Dec (Epub 2010 Nov 21), vol. 28, no. 12, pp. 1287-1289 (online methods pp. 1-2)
Mol Ther. 2003 Sep, vol. 8, no. 3, pp. 495-500

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15/00-15/90
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq / UniProt