

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】令和5年12月18日(2023.12.18)

【国際公開番号】WO2021/102390  
 【公表番号】特表2023-502473(P2023-502473A)  
 【公表日】令和5年1月24日(2023.1.24)  
 【年通号数】公開公報(特許)2023-014  
 【出願番号】特願2022-529540(P2022-529540)  
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/09(2006.01)  
 C 1 2 N 15/11(2006.01)  
 C 1 2 N 15/52(2006.01)  
 C 1 2 N 5/10(2006.01)  
 C 1 2 N 9/00(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 0 0  
 C 1 2 N 15/11 Z Z N A  
 C 1 2 N 15/52 Z  
 C 1 2 N 5/10  
 C 1 2 N 9/00

20

【手続補正書】  
 【提出日】令和5年12月8日(2023.12.8)  
 【手続補正1】  
 【補正対象書類名】特許請求の範囲  
 【補正対象項目名】全文  
 【補正方法】変更

【補正の内容】  
 【特許請求の範囲】

30

【請求項1】

DNAを修飾するためのシステムであって、  
 a)表3A、3B若しくは3Cのアミノ酸配列又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むリコンビナーゼポリペプチド或いは前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸；及び

b)二本鎖挿入DNAであって、

(i)(a)の前記リコンビナーゼポリペプチドに結合するDNA認識配列であって、第1パラパンドローム配列及び第2パラパンドローム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約15~35又は20~30ヌクレオチドであり、且つ前記第1及び第2パラパンドローム配列は、一緒に、表2A、2B若しくは2Cの左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するか、又はそれに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20以下の配列改変(例えば、置換、挿入若しくは欠失)を有するヌクレオチド配列を含み、及び

40

前記DNA認識配列は、約2~20ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第1及び第2パラパンドローム配列間に位置する、DNA認識配列と、

(ii)異種目的配列と

50

を含む二本鎖挿入 DNA  
を含むシステム。

【請求項 2】

表 3 A、3 B 若しくは 3 C のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 若しくは 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含むリコンビナーゼポリペプチド或いは前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸を含む真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞）。

【請求項 3】

真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞）であって、

(i) DNA 認識配列であって、第 1 パラパリンドローム配列及び第 2 パラパリンドローム配列を含み、

各パラパリンドローム配列は、約 15 ~ 35 又は 20 ~ 30 ヌクレオチドであり、且つ前記第 1 及び第 2 パラパリンドローム配列は、一緒に、表 2 A、2 B 若しくは 2 C の左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパリンドローム領域或いは前記パラパリンドローム領域と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 若しくは 99% の同一性を有するか、又はそれに対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 若しくは 20 以下の配列改変（例えば、置換、挿入若しくは欠失）を有するヌクレオチド配列を含み、

前記 DNA 認識配列は、約 2 ~ 20 ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第 1 及び第 2 パラパリンドローム配列間に位置する、DNA 認識配列と、

(ii) 異種目的配列と

を含む真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞）。

【請求項 4】

(a) リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸、及び (b) 挿入 DNA を含む、真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞）のゲノムを修飾する方法における使用のための組合せ物であって、ここで、前記方法は、前記細胞を、

a) 前記リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸であって、前記リコンビナーゼポリペプチドは、表 3 A、3 B 若しくは 3 C のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 若しくは 99% の同一性を有する配列を含む、リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸；及び

b) 前記挿入 DNA であって、

(i) (a) の前記リコンビナーゼポリペプチドに結合する DNA 認識配列であって、第 1 パラパリンドローム配列及び第 2 パラパリンドローム配列を有し、各パラパリンドローム配列は、約 15 ~ 35 又は 20 ~ 30 ヌクレオチドであり、且つ前記第 1 及び第 2 パラパリンドローム配列は、一緒に、表 2 A、2 B 若しくは 2 C の左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパリンドローム領域或いは前記パラパリンドローム領域と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 若しくは 99% の同一性を有するか、又はそれに対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 若しくは 20 以下の配列改変（例えば、置換、挿入若しくは欠失）を有するヌクレオチド配列を含み、

前記 DNA 認識配列は、約 2 ~ 20 ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第 1 及び第 2 パラパリンドローム配列間に位置する、DNA 認識配列と、

(ii) 異種目的配列と

を含む挿入 DNA

と接触させるステップを含み、それにより前記真核生物細胞の前記ゲノムを修飾する、組合せ物。

## 【請求項 5】

( a ) リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸、及び ( b ) 挿入 DNA を含む、真核生物細胞 ( 例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞 ) のゲノムに異種目的配列を挿入する方法における使用のための組合せ物であって、ここで、前記方法は、前記細胞を、

a ) 前記リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸であって、前記リコンビナーゼポリペプチドは、表 3 A、3 B 若しくは 3 C のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有する配列を含むリコンビナーゼポリペプチド又は前記ポリペプチドをコードする核酸；及び

10

b ) 前記挿入 DNA であって、

( i ) ( a ) の前記リコンビナーゼポリペプチドに結合する DNA 認識配列であって、第 1 パラパンドローム配列及び第 2 パラパンドローム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約 15 ~ 35 又は 20 ~ 30 ヌクレオチドであり、且つ前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列は、一緒に、表 2 A、2 B 若しくは 2 C の左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有するか、又はそれに対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 若しくは 20 以下の配列改変 ( 例えば、置換、挿入若しくは欠失 ) を有するヌクレオチド配列を含み、

20

前記 DNA 認識配列は、約 2 ~ 20 ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列間に位置する、DNA 認識配列と、

( i i ) 異種目的配列と

を含む挿入 DNA

と接触させるステップを含み、それにより、例えば実施例 5 のアッセイで測定されて、例えば前記真核生物細胞の集団の少なくとも約 0.1 % ( 例えば、少なくとも約 0.1 %、0.5 %、1 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 % ) の頻度で前記真核生物細胞の前記ゲノムに前記異種目的配列を挿入する、組合せ物。

30

## 【請求項 6】

表 3 A、3 B 若しくは 3 C のアミノ酸又はそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有する配列を含む、単離されたリコンビナーゼポリペプチド。

## 【請求項 7】

表 3 A、3 B 若しくは 3 C のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むリコンビナーゼポリペプチドをコードする、単離された核酸。

## 【請求項 8】

単離された核酸 ( 例えば、DNA ) であって、

40

( i ) DNA 認識配列であって、第 1 パラパンドローム配列及び第 2 パラパンドローム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約 15 ~ 35 又は 20 ~ 30 ヌクレオチドであり、且つ前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列は、一緒に、表 2 A、2 B 若しくは 2 C の左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有するか、又はそれに対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 若しくは 20 以下の配列改変 ( 例えば、置換、挿入若しくは欠失 ) を有するヌクレオチド配列を含み、及び

前記 DNA 認識配列は、約 2 ~ 20 ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配

50

列は、前記第 1 及び第 2 パラパランドローム配列間に位置する、DNA 認識配列と、

( i i ) 異種目的配列と

を含む、単離された核酸（例えば、DNA）。

【請求項 9】

リコンビナーゼポリペプチドを作製する方法であって、

a) 表 3 A、3 B 若しくは 3 C のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 若しくは 99% の同一性を有する配列を含むリコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸を提供するステップ、及び

b) 前記リコンビナーゼポリペプチドの産生を可能にする条件下において、インビトロ又はエクスピボで真核生物細胞に前記核酸を導入するステップ

を含み、それにより前記リコンビナーゼポリペプチドを作製する、方法。

10

【請求項 10】

DNA 認識配列と異種配列とを含む挿入 DNA を作製する方法であって、

a) 核酸であって、

( i ) 表 3 A、3 B 若しくは 3 C のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 若しくは 99% の同一性を有する配列を含むリコンビナーゼポリペプチドに結合する DNA 認識配列であって、第 1 パラパランドローム配列及び第 2 パラパランドローム配列を有し、各パラパランドローム配列は、約 15 ~ 35 又は 20 ~ 30 ヌクレオチドであり、且つ前記第 1 及び第 2 パラパランドローム配列は、一緒に、表 2 A、2 B 若しくは 2 C の左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパランドローム領域或いは前記パラパランドローム領域と少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 若しくは 99% の同一性を有するか、又はそれに対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 若しくは 20 以下の配列改変（例えば、置換、挿入若しくは欠失）を有するヌクレオチド配列を含み、及び

20

前記 DNA 認識配列は、約 2 ~ 20 ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第 1 及び第 2 パラパランドローム配列間に位置する、DNA 認識配列と、

( i i ) 異種目的配列と

を含む核酸を提供するステップ、及び

b) 前記核酸の複製を可能にする条件下において、インビトロ又はエクスピボで細胞（例えば、本明細書に記載されるように、例えば真核生物細胞又は原核生物細胞）に前記核酸を導入するステップ

を含み、それにより前記挿入 DNA を作製する、方法。

30

【請求項 11】

( a ) 及び ( a ) が、個別の容器内にある、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 12】

( a ) 及び ( a ) が、混合されている、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 13】

前記第 1 及び第 2 パラパランドローム配列が、1 の非回文位置を含む、請求項 1 に記載のシステム、請求項 3 に記載の細胞、請求項 4 又は 5 に記載の組合せ物、請求項 10 に記載の方法、或いは請求項 8 に記載の核酸。

40

【請求項 14】

前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする前記核酸がウイルスベクター中にある、請求項 1 に記載のシステム、請求項 4 又は 5 に記載の組合せ物、請求項 9 に記載の方法、或いは請求項 7 に記載の核酸。

【請求項 15】

前記ウイルスベクターが、AAV ベクターを含む、請求項 14 に記載のシステム、組合せ物、方法、或いは核酸。

【請求項 16】

50

前記挿入DNAがウイルスベクター中にある、請求項1に記載のシステム、請求項4又は5に記載の組合せ物、或いは請求項10に記載の方法。

【請求項17】

前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする前記核酸がmRNAである、請求項1に記載のシステム、請求項4又は5に記載の組合せ物、請求項9に記載の方法、或いは請求項7に記載の核酸。

【請求項18】

前記異種目的配列が、少なくとも約0.1%の効率で前記細胞の前記ゲノムに挿入される、請求項4又は5に記載の組合せ物。

【請求項19】

前記細胞の集団において、前記異種目的配列が、前記細胞の前記ゲノム内の1~10の部位に挿入される、請求項4又は5に記載の組合せ物。

【請求項20】

前記細胞がヒト細胞である、請求項4又は5に記載の組合せ物。

【請求項21】

リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸を含む、真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞）のゲノムを修飾する方法における使用のための組成物であって、ここで、前記方法は、前記細胞を、

a) 前記リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸であって、前記リコンビナーゼポリペプチドは、表3A、3B若しくは3Cのアミノ酸配列又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有する配列を含む、リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸；及び

b) 挿入DNAであって、

(i) (a)の前記リコンビナーゼポリペプチドに結合するDNA認識配列であって、第1パラパンドローム配列及び第2パラパンドローム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約15~35又は20~30ヌクレオチドであり、且つ前記第1及び第2パラパンドローム配列は、一緒に、表2A、2B若しくは2Cの左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するか、又はそれに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20以下の配列改変（例えば、置換、挿入若しくは欠失）を有するヌクレオチド配列を含み、

前記DNA認識配列は、約2~20ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第1及び第2パラパンドローム配列間に位置する、DNA認識配列と、

(ii) 異種目的配列と

を含む挿入DNA

と接触させるステップを含み、それにより前記真核生物細胞の前記ゲノムを修飾する、組成物。

【請求項22】

挿入DNAを含む、真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞）のゲノムを修飾する方法における使用のための組成物であって、ここで、前記方法は、前記細胞を、

a) リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸であって、前記リコンビナーゼポリペプチドは、表3A、3B若しくは3Cのアミノ酸配列又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有する配列を含む、リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸；及び

b) 前記挿入DNAであって、

10

20

30

40

50

( i ) ( a ) の前記リコンビナーゼポリペプチドに結合する DNA 認識配列であって、第 1 パラパンドローム配列及び第 2 パラパンドローム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約 15 ~ 35 又は 20 ~ 30 ヌクレオチドであり、且つ前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列は、一緒に、表 2 A、2 B 若しくは 2 C の左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有するか、又はそれに対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 若しくは 20 以下の配列改変（例えば、置換、挿入若しくは欠失）を有するヌクレオチド配列を含み、

10

前記 DNA 認識配列は、約 2 ~ 20 ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列間に位置する、DNA 認識配列と、

( i i ) 異種目的配列と

を含む挿入 DNA

と接触させるステップを含み、それにより前記真核生物細胞の前記ゲノムを修飾する、組成物。

【請求項 23】

リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸を含む、真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞）のゲノムに異種目的配列を挿入する方法における使用のための組成物であって、ここで、前記方法は、前記細胞を

20

a ) 前記リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸であって、前記リコンビナーゼポリペプチドは、表 3 A、3 B 若しくは 3 C のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有する配列を含むリコンビナーゼポリペプチド又は前記ポリペプチドをコードする核酸；及び

b ) 挿入 DNA であって、

( i ) ( a ) の前記リコンビナーゼポリペプチドに結合する DNA 認識配列であって、第 1 パラパンドローム配列及び第 2 パラパンドローム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約 15 ~ 35 又は 20 ~ 30 ヌクレオチドであり、且つ前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列は、一緒に、表 2 A、2 B 若しくは 2 C の左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有するか、又はそれに対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 若しくは 20 以下の配列改変（例えば、置換、挿入若しくは欠失）を有するヌクレオチド配列を含み、

30

前記 DNA 認識配列は、約 2 ~ 20 ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列間に位置する、DNA 認識配列と、

( i i ) 異種目的配列と

を含む挿入 DNA

と接触させるステップを含み、それにより、例えば実施例 5 のアッセイで測定されて、例えば前記真核生物細胞の集団の少なくとも約 0.1 %（例えば、少なくとも約 0.1 %、0.5 %、1 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又は 100 %）の頻度で前記真核生物細胞の前記ゲノムに前記異種目的配列を挿入する、組成物。

40

【請求項 24】

挿入 DNA を含む、真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞）のゲノムに異種目的配列を挿入する方法における使用のための組成物であって、ここで、前記方法は、前記細胞を、

50

a) リコンビナーゼポリペプチド又は前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸であって、前記リコンビナーゼポリペプチドは、表3A、3B若しくは3Cのアミノ酸配列又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有する配列を含むリコンビナーゼポリペプチド又は前記ポリペプチドをコードする核酸；及び

b) 前記挿入DNAであって、

(i) (a)の前記リコンビナーゼポリペプチドに結合するDNA認識配列であって、第1パラパンドローム配列及び第2パラパンドローム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約15~35又は20~30ヌクレオチドであり、且つ前記第1及び第2パラパンドローム配列は、一緒に、表2A、2B若しくは2Cの左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するか、又はそれに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20以下の配列改変(例えば、置換、挿入若しくは欠失)を有するヌクレオチド配列を含み、

10

前記DNA認識配列は、約2~20ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第1及び第2パラパンドローム配列間に位置する、DNA認識配列と、

(ii) 異種目的配列と

を含む挿入DNA

20

と接触させるステップを含み、それにより、例えば実施例5のアッセイで測定されて、例えば前記真核生物細胞の集団の少なくとも約0.1%(例えば、少なくとも約0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%)の頻度で前記真核生物細胞の前記ゲノムに前記異種目的配列を挿入する、組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0266

【補正方法】変更

【補正の内容】

30

【0266】

パラパンドローム：本明細書で使用される場合、「パラパンドローム」という用語は、核酸配列の一方が、他方の核酸配列に対して回文であるか、或いは他方の核酸配列に対する回文と少なくとも30%(例えば、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%)、例えば少なくとも50%の配列同一性を有するか、又は他方の核酸配列に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20以下の配列ミスマッチを有するかのいずれかである、一对の核酸配列の特性を指す。「パラパンドローム配列」は、本明細書で使用される場合、互いに対してパラパンドロームである一对の核酸配列の少なくとも1つを指す。「パラパンドローム領域」は、本明細書で使用される場合、2つのパラパンドローム配列を含む核酸配列又はその部分を指す。いくつかの事例では、パラパンドローム領域は、核酸配列セグメント(例えば、コア配列を含む)とフランキングする2つのパラパンドローム配列を含む。

40

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

DNAを修飾するためのシステムであって、

a) 表3A、3B若しくは3Cのアミノ酸配列又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むリコンビナーゼポリペプチド或いは前記リコンビナーゼポリペ

50

チドをコードする核酸；及び

b) 二本鎖挿入DNAであって、

(i) (a)の前記リコンビナーゼポリペプチドに結合するDNA認識配列であって、第1パラパンドローム配列及び第2パラパンドローム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約15～35又は20～30ヌクレオチドであり、且つ前記第1及び第2パラパンドローム配列は、一緒に、表2A、2B若しくは2Cの左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するか、又はそれに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20以下の配列改変(例えば、置換、挿入若しくは欠失)を有するヌクレオチド配列を含み、及び

10

前記DNA認識配列は、約2～20ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第1及び第2パラパンドローム配列間に位置する、DNA認識配列と、

(ii) 異種目的配列と

を含む二本鎖挿入DNA

を含むシステム。

(項目2)

表3A、3B若しくは3Cのアミノ酸配列又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むリコンビナーゼポリペプチド或いは前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸を含む真核生物細胞(例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞)。

20

(項目3)

真核生物細胞(例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞)であって、

(i) DNA認識配列であって、第1パラパンドローム配列及び第2パラパンドローム配列を含み、

各パラパンドローム配列は、約15～35又は20～30ヌクレオチドであり、且つ前記第1及び第2パラパンドローム配列は、一緒に、表2A、2B若しくは2Cの左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するか、又はそれに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20以下の配列改変(例えば、置換、挿入若しくは欠失)を有するヌクレオチド配列を含み、

30

前記DNA認識配列は、約2～20ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第1及び第2パラパンドローム配列間に位置する、DNA認識配列と、

(ii) 異種目的配列と

を含む真核生物細胞(例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞)。

(項目4)

真核生物細胞(例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞)のゲノムを修飾する方法であって、前記細胞を、

40

a) 表3A、3B若しくは3Cのアミノ酸配列又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有する配列を含むリコンビナーゼポリペプチド或いは前記リコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸；及び

b) 挿入DNAであって、

(i) (a)の前記リコンビナーゼポリペプチドに結合するDNA認識配列であって、第1パラパンドローム配列及び第2パラパンドローム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約15～35又は20～30ヌクレオチドであり、且つ前記第1及び第2パラパンドローム配列は、一緒に、表2A、2B若しくは2Cの左側領域若しくは右側領

50

域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパリンドローム領域或いは前記パラパリンドローム領域と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するか、又はそれに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20以下の配列改変（例えば、置換、挿入若しくは欠失）を有するヌクレオチド配列を含み、

前記DNA認識配列は、約2～20ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第1及び第2パラパリンドローム配列間に位置する、DNA認識配列と、

(ii)異種目的配列と

を含む挿入DNA

と接触させるステップを含み、それにより前記真核生物細胞の前記ゲノムを修飾する、方法。

(項目5)

真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞）のゲノムに異種目的配列を挿入する方法であって、前記細胞を、

a)表3A、3B若しくは3Cのアミノ酸配列又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有する配列を含むリコンビナーゼポリペプチド或いは前記ポリペプチドをコードする核酸；及び

b)挿入DNAであって、

(i)(a)の前記リコンビナーゼポリペプチドに結合するDNA認識配列であって、第1パラパリンドローム配列及び第2パラパリンドローム配列を有し、各パラパリンドローム配列は、約15～35又は20～30ヌクレオチドであり、且つ前記第1及び第2パラパリンドローム配列は、一緒に、表2A、2B若しくは2Cの左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパリンドローム領域或いは前記パラパリンドローム領域と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するか、又はそれに対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20以下の配列改変（例えば、置換、挿入若しくは欠失）を有するヌクレオチド配列を含み、

前記DNA認識配列は、約2～20ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第1及び第2パラパリンドローム配列間に位置する、DNA認識配列と、

(ii)異種目的配列と

を含む挿入DNA

と接触させるステップを含み、それにより、例えば実施例5のアッセイで測定されて、例えば前記真核生物細胞の集団の少なくとも約0.1%（例えば、少なくとも約0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）の頻度で前記真核生物細胞の前記ゲノムに前記異種目的配列を挿入する、方法。

(項目6)

表3A、3B若しくは3Cのアミノ酸又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有する配列を含む、単離されたリコンビナーゼポリペプチド。

(項目7)

表3A、3B若しくは3Cのアミノ酸配列又はそれと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むリコンビナーゼポリペプチドをコードする、単離された核酸。

(項目8)

単離された核酸（例えば、DNA）であって、

(i)DNA認識配列であって、第1パラパリンドローム配列及び第2パラパリンド

10

20

30

40

50

ーム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約 15 ~ 35 又は 20 ~ 30 ヌクレオチドであり、且つ前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列は、一緒に、表 2 A、2 B 若しくは 2 C の左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有するか、又はそれに対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 若しくは 20 以下の配列改変（例えば、置換、挿入若しくは欠失）を有するヌクレオチド配列を含み、及び

前記 DNA 認識配列は、約 2 ~ 20 ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列間に位置する、DNA 認識配列と、

( i i ) 異種目的配列と

を含む、単離された核酸（例えば、DNA）。

( 項目 9 )

リコンビナーゼポリペプチドを作製する方法であって、

a ) 表 3 A、3 B 若しくは 3 C のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有する配列を含むリコンビナーゼポリペプチドをコードする核酸を提供するステップ、及び

b ) 前記リコンビナーゼポリペプチドの産生を可能にする条件下において、真核生物細胞に前記核酸を導入するステップ

を含み、それにより前記リコンビナーゼポリペプチドを作製する、方法。

( 項目 10 )

DNA 認識配列と異種配列とを含む挿入 DNA を作製する方法であって、

a ) 核酸であって、

( i ) 表 3 A、3 B 若しくは 3 C のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有する配列を含むリコンビナーゼポリペプチドに結合する DNA 認識配列であって、第 1 パラパンドローム配列及び第 2 パラパンドローム配列を有し、各パラパンドローム配列は、約 15 ~ 35 又は 20 ~ 30 ヌクレオチドであり、且つ前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列は、一緒に、表 2 A、2 B 若しくは 2 C の左側領域若しくは右側領域列のヌクレオチド配列内に存在するパラパンドローム領域或いは前記パラパンドローム領域と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 若しくは 99 % の同一性を有するか、又はそれに対して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 若しくは 20 以下の配列改変（例えば、置換、挿入若しくは欠失）を有するヌクレオチド配列を含み、及び

前記 DNA 認識配列は、約 2 ~ 20 ヌクレオチドのコア配列をさらに含み、前記コア配列は、前記第 1 及び第 2 パラパンドローム配列間に位置する、DNA 認識配列と、

( i i ) 異種目的配列と

を含む核酸を提供するステップ、及び

b ) 前記核酸の複製を可能にする条件下において、細胞（例えば、本明細書に記載されるように、例えば真核生物細胞又は原核生物細胞）に前記核酸を導入するステップを含み、それにより前記挿入 DNA を作製する、方法。

10

20

30

40

50