

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7441840号
(P7441840)

(45)発行日 令和6年3月1日(2024.3.1)

(24)登録日 令和6年2月21日(2024.2.21)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/071(2010.01)	C 1 2 N 5/071

請求項の数 21 (全89頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-532224(P2021-532224)
(86)(22)出願日	令和1年12月9日(2019.12.9)
(65)公表番号	特表2022-512332(P2022-512332 A)
(43)公表日	令和4年2月3日(2022.2.3)
(86)国際出願番号	PCT/US2019/065129
(87)国際公開番号	WO2020/123327
(87)国際公開日	令和2年6月18日(2020.6.18)
審査請求日	令和4年10月24日(2022.10.24)
(31)優先権主張番号	62/777,325
(32)優先日	平成30年12月10日(2018.12.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31)優先権主張番号	62/925,516
(32)優先日	令和1年10月24日(2019.10.24)

最終頁に続く

(73)特許権者	500049716 アムジェン・インコーポレーテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 3 2 0 , サウザンド オークス , ワン アムジェン センター ドライブ
(74)代理人	110001173 弁理士法人川口国際特許事務所
(72)発明者	アグラワル , ニーラジ・ジェイ アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0 - 1 7 9 9、サウザンド・オークス、エム/エス・2 8 - 5 - エイ、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、アムジェン・インコーポレーテッド、ロー・デパートメント・パテント・オペレーションズ気付

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変異した P I G G Y B A C トランスポザーゼ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンによるアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンによるアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンによるアミノ酸置換のうち少なくとも 1 つを含む、p i g g y B a c トランスポザーゼ。

【請求項 2】

配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンによるアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンによるアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンによるアミノ酸置換のうち少なくとも 2 つを含む、請求項 1 に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼ。

【請求項 3】

配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンによる置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンによる置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンによる置換を含む、請求項 1 に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼ。

【請求項 4】

改変された前記 p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸によりトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価が、野生型 p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸によりトランスフェクトされた細胞又は p i g g y B a c トランスポザーゼなしの細胞によって発現される同じ目的のタンパク質の力

価と比較して改善される、請求項 1 に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼ。

【請求項 5】

目的の組換えタンパク質が、抗原結合タンパク質である、請求項 4 に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼ。

【請求項 6】

配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、又は配列番号 16 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼ。

【請求項 7】

請求項 1 又は 6 に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子。

10

【請求項 8】

配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、又は配列番号 18 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼ。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 10】

請求項 7 に記載の核酸分子を含むベクターであって、p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも 1 つの目的のタンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸配列をさらに含む、ベクター。

20

【請求項 11】

請求項 7 に記載の核酸分子によりトランスフェクトされた細胞。

【請求項 12】

請求項 9 に記載のベクターによりトランスフェクトされた細胞。

【請求項 13】

細胞が、宿主細胞である、請求項 11 又は 12 に記載の細胞。

【請求項 14】

細胞が、CHO 細胞である、請求項 11 又は 12 に記載の細胞。

【請求項 15】

細胞が、免疫細胞である、請求項 11 又は 12 に記載の細胞。

30

【請求項 16】

請求項 7 に記載の改変された核酸分子を含むベクター、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも 1 つの目的のタンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸分子を含むベクターによりコトランスフェクトされた細胞。

【請求項 17】

請求項 7 に記載の改変された核酸分子を含み、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも 1 つの目的のタンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸分子を含むベクターによりトランスフェクトされた細胞。

40

【請求項 18】

p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸によりトランスフェクトされた細胞によって発現される目的のタンパク質の力価が、野生型 p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸によりトランスフェクトされた細胞又は p i g g y B a c トランスポザーゼなしの細胞によって発現される同じ目的のタンパク質の力価と比較して改善される、請求項 11、12、16 又は 17 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 19】

宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価を改善するための方法であって、

請求項 7 に記載の改変された核酸分子、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なく

50

とも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する前記目的のタンパク質をコードする核酸配列を含むベクターにより宿主細胞をコトランスフェクトすることと；

前記細胞を培養して前記目的の組換えタンパク質を発現させることとを含み、

piggyBacトランスポザーゼをコードする改変された核酸分子によりトランスフェクトされた前記宿主細胞によって発現される前記目的の組換えタンパク質の力価が、野生型piggyBacトランスポザーゼをコードする核酸によりトランスフェクトされた宿主細胞又はpiggyBacトランスポザーゼなしの宿主細胞によって発現される前記目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善される、方法。

【請求項20】

宿主細胞が、piggyBacトランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含む第1のベクター、並びにpiggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む第2のベクターによりトランスフェクトされる、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

宿主細胞が、piggyBacトランスポザーゼをコードする改変された核酸分子、並びにpiggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む単一のベクターでトランスフェクトされる、請求項19に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年12月10日に出願の米国仮特許出願第62/777,325号及び2019年10月24日に出願の米国仮特許出願第62/925,516号の利益を主張するものであり、これらは本明細書に完全に記載されているかのように全体として及びあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、細胞の安定性を高めるように改変されたpiggyBacトランスポザーゼ並びに他の用途の中でも、細胞の安定的なトランスフェクト、細胞株の開発、ゲノム修飾、及び組換えタンパク質の力価の改善のための改変されたpiggyBacトランスポザーゼの使用に関する。

【0003】

配列表

本出願には、開示の別の部分として、コンピュータ可読形式のシーケンスリスト（ファイル名：A-2320-WO-PCT_Sequence.txt、2019年11月5日作成、サイズ64KB）が含まれており、参照によりその全体が組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

幅広い用途があるため、生物学的製剤は、治療及び診断などの様々な用途で世界中で使用されている。現在では、承認された生物学的製剤の約51%は哺乳類細胞を使用して製造されており、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞が主な細胞ファクトリーである（Zhou and Kantardjef, *Mammalian cell cultures for biologics manufacturing*, Springer, Heidelberg, New York, 2014）。その結果、バイオ医薬品業界は急速なパラダイムシフトを経験している。市場投入までのスピード及びコスト効率が、これまで以上に重要になっている。バイオ医薬品の高い研究開発コスト及び長い開発リードタイムにより、薬剤開発、更に重要なことに製造における遅延及び非効率性を排除することが不可欠になっている。同時に、製品パイプラインの複雑さ及び多様性が増している現在、バイオ医薬品企業は、ドナー細胞に由来する個別化された治療法から、年間数グ

10

20

30

40

50

ラムから数百キログラムの範囲の量の生物学的薬剤の生産に至るまで、様々な需要に対応できるインフラストラクチャを必要としている。

【0005】

そのようなものであるから、宿主細胞からの組換えタンパク質の産生を増加させ、発現の長期安定性を改善する必要がある。この目的を達成する1つの方法は、細胞発現系によって発現されるタンパク質の力価を改善することである。本明細書に記載の発明は、宿主細胞で発現するpiggyBactransposaseの安定性の向上に寄与する変異を提供する。このような変異で改変された核酸配列によってコードされるpiggyBactransposaseは、野生型piggyBactransposaseを含むか又はpiggyBactransposaseを含まない細胞で発現される組換えタンパク質の力価と比較して、改変されたpiggyBactransposaseを含む細胞で発現される組換えタンパク質の力価の改善をもたらすことが見出された。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】Zhou and Kantardjef, Mammalian cell cultures for biologics manufacturing, Springer, Heidelberg, New York, 2014

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

20

【0007】

一態様では、本発明は、配列番号2の147位、176位、221位、247位、429位、533位、及び573位の1つ以上でのアミノ酸置換を含む、piggyBactransposaseを提供する。一実施形態では、piggyBactransposaseは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換を含む。一実施形態では、piggyBactransposaseは、配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。一実施形態では、piggyBactransposaseは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、並びに/又は配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、piggyBactransposaseは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも1つを含む。関連実施形態では、piggyBactransposaseは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも2つを含む。別の関連実施形態では、piggyBactransposaseは、配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとの置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとの置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとの置換を含む。一実施形態では、piggyBactransposaseは、本明細書に記載の改変されたpiggyBactransposaseでトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価を有し、これは、野生型piggyBactransposaseで、又はpiggyBactransposaseなしでトランスフェクトされた細胞によって発現される同じ目的のタンパク質の力価と比較して改善される。一実施形態では、目的の組換えタンパク質は、抗原結合タンパク質である。

30

40

【0008】

一態様では、本発明は、宿主細胞の安定性を高めるように改変されたpiggyBactransposaseであって、piggyBactransposaseは、配列番号2の147

50

位、176位、221位、247位、429位、533位、及び573位の1つ以上でのアミノ酸置換を含む、piggyBactransposaseを提供する。

【0009】

別の態様では、本発明は、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号4、配列番号6、又は配列番号8のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10又は12のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号4のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号6のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号14のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号16のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。

10

【0010】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のpiggyBactransposaseをコードする改変された核酸分子を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、又は配列番号18の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3、配列番号5、又は配列番号7の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11、配列番号13、又は配列番号15の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9又は配列番号11の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17又は配列番号18の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号5の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号7の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号13の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号15の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号18の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。

20

30

40

【0011】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のpiggyBactransposaseをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。一実施形態では、ベクターは、本明細書に記載のpiggyBactransposaseをコードする核酸分子を含み、piggyBactransposonの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を更に含む。一実施形態では、ベクターは、1つ以上の目的のタンパク質をコードする1つ以上の核酸配列を含む。

50

【0012】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるベクターでトランスフェクトされた細胞を提供する。一実施形態では、細胞は、配列番号17又は18の核酸配列によりコードされるpiggyBacトランスポザアーゼでトランスフェクトされる。一実施形態では、細胞は、宿主細胞である。一実施形態では、細胞は、CHO細胞である。一実施形態では、細胞は、免疫細胞である。

【0013】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のpiggyBacトランスポザアーゼをコードする改変された核酸分子、並びにpiggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸分子を含むベクターでコトランスフェクトされた細胞を提供する。別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のpiggyBacトランスポザアーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクター、並びにpiggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸分子を含むベクターでコトランスフェクトされた細胞を提供する。別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のpiggyBacトランスポザアーゼをコードする改変された核酸分子を含み、並びにまたpiggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸分子を含むベクターでコトランスフェクトされた細胞を提供する。

【0014】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の細胞であって、改変されたpiggyBacトランスポザアーゼでトランスフェクトされた細胞によって発現される目的のタンパク質の力価が、野生型piggyBacトランスポザアーゼで、又はpiggyBacトランスポザアーゼなしでトランスフェクトされた細胞によって発現される同じ目的のタンパク質の力価と比較して改善される、細胞を提供する。一実施形態では、細胞によって発現される目的の組換えタンパク質が提供される。関連実施形態では、目的の組換えタンパク質を含む医薬組成物が提供される。

【0015】

別の態様では、本発明は、宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価を改善するための方法であって、宿主細胞の安定性を高めるようにpiggyBacトランスポザアーゼをコードする核酸分子を改変することと；piggyBacトランスポザアーゼをコードする改変された核酸分子、並びにpiggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含むベクターで宿主細胞をコトランスフェクトすることと；細胞を培養して目的の組換えタンパク質を発現させることと、を含み、改変されたpiggyBacトランスポザアーゼでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価が、野生型piggyBacトランスポザアーゼで、又はpiggyBacトランスポザアーゼなしでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善される、方法を提供する。一実施形態では、宿主細胞は、piggyBacトランスポザアーゼをコードする改変された核酸分子を含む第1のベクター、並びにpiggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む第2のベクターでトランスフェクトされる。一実施形態では、宿主細胞は、piggyBacトランスポザアーゼをコードする改変された核酸分子、並びにpiggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む単一のベクターでトランスフェクトされる。

【0016】

別の態様では、本発明は、組換えタンパク質を発現する哺乳動物細胞培養において組換えタンパク質産生を増加させるための方法であって、宿主細胞の安定性を高めるように改

10

20

30

40

50

変えられた p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸分子、及び p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターでコトランスフェクトされている宿主細胞を使用して、バイオリアクターで細胞培養を確立することと；目的の組換えタンパク質を発現することと、を含み、改変された p i g g y B a c トランスポザーゼでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価が、野生型 p i g g y B a c トランスポザーゼで、又は p i g g y B a c トランスポザーゼなしでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善される、方法を提供する。一実施形態では、宿主細胞は、宿主細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸分子を含むベクター、及び p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターでコトランスフェクトされている。一実施形態では、宿主細胞は、 p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む単一のベクターでトランスフェクトされる。

10

【 0 0 1 7 】

別の態様では、本発明は、単離され、精製された目的の組換えタンパク質を生成するための方法であって、目的の組換えタンパク質を発現する宿主細胞を用いてバイオリアクターで細胞培養を確立することであって、細胞株は、宿主細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含むベクターでコトランスフェクトされている、ことと、細胞を培養して目的の組換えタンパク質を発現させることと、目的の組換えタンパク質を収集することと、目的の組換えタンパク質を 1 つ以上の単位操作により処理することと、単離され、精製された目的の組換えタンパク質を得ることと、を含む、方法を提供する。一実施形態では、細胞株は、宿主細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列を含むベクター、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含むベクターでコトランスフェクトされている。一実施形態では、宿主細胞は、 p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む単一のベクターでトランスフェクトされる。一実施形態では、少なくとも 1 つの単位操作は、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、マルチモーダルクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、及びヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーから選択される捕捉クロマトグラフィー工程である。関連では、少なくとも 1 つの単位操作は、イオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、マルチモーダルクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、及びヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーから選択されるポリッシュクロマトグラフィー工程である。一実施形態では、少なくとも 1 つの単位操作は、ウイルス不活性化、ウイルス濾過、深層濾過、及び U F / D F から選択される。一実施形態では、改変された p i g g y B a c トランスポザーゼでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価は、野生型 p i g g y B a c トランスポザーゼで、又は p i g g y B a c トランスポザーゼなしでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善される。一実施形態では、単離され、精製された目的の組換えタンパク質が提供される。関連実施形態では、目的の単離されたタンパク質を含む医薬組成物が提供される。

20

30

40

【 0 0 1 8 】

50

一態様では、本発明は、宿主細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列を含むベクター；並びに少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列が挿入される p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントを含むベクターを含む細胞をトランスフェクトするためのキットを提供する。

【0019】

一態様では、本発明は、非ウイルス性の遺伝子改変細胞を生成する方法であって、(a)細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクターを確立することと、(b)ドナー又は対象から自然免疫細胞を単離することと、(c)ベクター及び細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列で細胞をトランスフェクトすることと、(d)細胞培養によって細胞を非ウイルス性の遺伝子改変細胞のより大きな集団に拡大することと、を含む方法を提供する。一実施形態では、細胞は、p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクター、並びに細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列を含むベクターでトランスフェクトされる。一実施形態では、細胞は、p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクター、並びに細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列でトランスフェクトされる。

【0020】

一態様では、本発明は、非ウイルス性の遺伝子改変細胞を対象を治療する方法であって、(a) p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクターを確立することと、(b)対象又はドナーから自然免疫細胞を単離することと、(c)ベクター及び細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列で細胞をトランスフェクトすることと、(d)細胞培養によって細胞を遺伝子改変細胞のより大きな集団に拡大することと、(e)細胞培養物からトランスフォームされた細胞を単離し、遺伝子改変細胞を含む細胞集団を得ることと、(f)非ウイルス性の遺伝子改変細胞を対象に再導入することと、を含む方法を提供する。一実施形態では、細胞は、p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクター、並びに細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列を含むベクターでトランスフェクトされる。一実施形態では、細胞は、p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクター、並びに細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列でトランスフェクトされる。一実施形態では、自然免疫細胞は、単核細胞である。一実施形態では、自然免疫細胞は、T細胞である。一実施形態では、少なくとも1つの目的のタンパク質は、抗原受容体、T細胞受容体、又はキメラ抗原受容体である。一実施形態では、細胞はまた、自殺遺伝子、誘導性オン若しくはアクセルレータスイッチ、又はその両方をコードする核酸分子でトランスフェクトされる。一実施形態では、非ウイルス性の遺伝子改変細胞、細胞集団、又は細胞培養物である。一実施形態では、遺伝子改変細胞又は細胞集団を含む製剤である。別の実施形態では、それを必要とするドナー又は対象の疾患又は障害を治療又は予防する方法であって、ドナー又は対象に、遺伝子改変細胞又は細胞集団の有効量を投与することを含む、方法である。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】予測二次構造。棒は予測されたヘリックス領域を示し、矢印は予測されたシート領域を示す。

【図2】モノクローナル抗体AB1及びAB2のWT piggy Bactransposase又はpiggy Bactransposaseなしの対照と比較して、改変されたpiggy Bactransposase細胞株の力価は、改善するか又は同等である。

【図3】融合タンパク質を発現する細胞株のWT piggy Bactransposase又はpiggy Bactransposaseなしの対照と比較して、改変されたpiggy Bactransposase細胞株の力価は、改善した。

10

【図4】二重特異性T細胞エンゲージャー分子のWT piggy Bactransposase又はpiggy Bactransposaseなしの対照と比較して、改変されたpiggy Bactransposase細胞株の力価は、同等である。

【図5】piggy bactransposase二重変異体「ILT」又は三重変異体「LLT」transposaseでトランスフェクトされたプールは、MSX処理を受けなかったtransposaseプール(0 μM MSX)と比較して発現の増加を示した。transposaseが添加されていないプール(none)では、MSXの添加によって発現は増加しなかった。BiTE(登録商標)HeteroFc、IgGscFV、及びmAbを試験した。MSXはトランスフェクション時(25)又は初期DNA transposaseトランスフェクトプールの回復後(0~25)に添加された。

20

【図6】図6A及び図6B エレクトロポレーション系又は脂質系法を用いてトランスフェクトされたpiggy Bactransposase二重変異体「ILT」DNA又はmRNAに関連するプール発現レベル。6A) : DNA transposaseとmRNA transposaseとを比較するエレクトロポレーション系トランスフェクション法。mRNA transposaseの増加により、発現が改善された。1) 0 μgのtransposase、20 μgのmAb DNA; 2) 二重変異体「ILT」DNA: 20 μgのmAb DNA、5 μgのtransposase、比4:1; 3) 二重変異体「ILT」mRNA 20 μgのmAb DNA、5 μgのtransposase、比4:1; 4) 二重変異体「ILT」mRNA 20 μgのmAb DNA、10 μgのtransposase、比2:1; 5) 二重変異体「ILT」mRNA 20 μgのmAb DNA、20 μgのtransposase、比1:1; 11) 二重変異体「ILT」mRNA 14 μgのmAb DNA、100 μgのtransposase、比7:1; 12) 二重変異体「ILT」mRNA 28 μgのmAb DNA、200 μgのtransposase、比7:1。6B) : DNA transposaseとmRNA transposaseとを比較する脂質系トランスフェクション法。mRNA transposaseの増加により、発現が改善された。Piggy Bactransposase二重変異体「ILT」DNA 2 μgのmAb DNA、0.5 μgのtransposase、比4:1; 2 μgのmAb DNA、2 μgのtransposase、比1:1; 4 μgのmAb DNA、4 μgのtransposase、比1:1; Piggy Bactransposase二重変異体「ILT」mRNA 2 μgのmAb DNA、0.5 μgのtransposase、比4:1; 2 μgのmAb DNA、2 μgのtransposase、比1:1; 4 μgのmAb DNA、4 μgのtransposase、比1:1。

30

40

【図7】エレクトロポレーションからのトランスフェクトされたプールにおける発現レベル。二重変異transposase「ILT」DNA及び両方のmRNAのトランスフェクション。合成mRNA(PBsyn mRNA)及びmRNA(PB mRNA)のトランスフェクトされたプールは、DNA(PB DNA) transposaseプールと同様の力価及びtransposaseなしの対照プールよりも高い力価を示した。下矢印は最小である。上矢印は最大である。白抜きの棒グラフは中央値である。

【図8】図8A及びB: トランスフェクトされた細胞株プールにおけるDNA及びmRNAのゲノム及び転写レベルでの挿入。8A) 二重変異体「ILT」、DNA transposaseでトランスフェクトされた全てのプール細胞株はゲノムレベルで挿入されていたが、

50

mRNAでトランスフェクトされたものはゲノムレベルで挿入されていなかった。約1.7 kbのバンドは、細胞株のゲノムにトランスポザーゼが存在することを示している。レーン1 ラダー。レーン2~4 piggyBacトランスポザーゼ二重変異体「ILT」DNA。レーン5 トランスフェクションなし。レーン6~11 piggyBacトランスポザーゼ二重変異体「ILT」mRNA。レーン12 プラスミドDNA対照。8B) RNAレベルでの転写を確認するためのRT-PCRアッセイのゲル画像。二重変異体「ILT」、DNAトランスポザーゼでトランスフェクトされた全てのプール細胞株はRNAレベルで転写されていたが、mRNAでトランスフェクトされたものはRNAレベルで転写されていなかった。約1.7 kbのバンドは、トランスポザーゼ転写物が存在することを示している。レーン1 ラダー。レーン2~3 piggyBacトランスポザーゼ二重変異体「ILT」mRNA。レーン4 piggyBacトランスポザーゼ二重変異体「ILT」DNA。レーン5 プラスミドDNA対照。

【図9】プールのコピー数は少なく、トランスポザーゼが挿入されていないクローンが含まれていた。

【図10】非ウイルス性遺伝子導入及びpiggyBacトランスポザーゼを使用して生成されたTCR-T細胞は、*in vitro*で強力な機能を示す。(A) T細胞は、二重変異体であるILTを使用してTCRを発現するようにうまく改変される。(B) 標的細胞溶解及び(C) 抗原提示細胞との5日間の共培養後のpiggyBac改変TCR-T細胞の増殖。

【発明を実施するための形態】

【0022】

DNAトランスポゾン又は転移因子は、宿主ゲノム内のある場所から別の場所に移動できる遺伝子である。転移因子は、典型的には、2つのクラスに分けられ、クラス1はレトロトランスポゾンで表され、クラス2には「カットアンドペースト」DNAトランスポゾンが含まれる。

【0023】

クラス2 DNAトランスポゾンは、2つのコンポーネントによって特徴付けられ、トランスポゾンは、2つの末端逆位反復に隣接するDNAセグメントを含み、トランスポザーゼは、トランスポゾンの動員を触媒する。トランスポザーゼは、逆位反復を結合し、末端の逆位反復に隣接するDNAセグメントを切り出し(カット)、セグメントを新しい位置に再挿入する(ペーストする)ことによって機能する。

【0024】

piggyBacトランスポゾンはクラス2トランスポゾンであり、もともとはイラクサギンウワバ(*Trichoplusia ni*) (キャベツのヤガ科幼虫)から単離されたが、哺乳類細胞で活発に転置することが示され、アクセス可能なクロマチン構造が好ましい(Liet al., *Molecular and Cellular Biology* 33(7): 1317-1330, 2013; Yoshida et al., *Scientific Reports Article number 43613* (2017))。外因性DNAをゲノムに導入し、安定した導入遺伝子発現を促進する能力により、piggyBacトランスポゾン系は、哺乳類細胞の改変に有用なツールであり、哺乳類細胞の安定したトランスフェクションを促進し、哺乳類細胞の安定した高生産性ポリクローナル培養物を生成するのに使用され、トランスフェクトされた細胞の不均一な集団から組換えタンパク質を迅速に生産し、オープンクロマチンの領域及び活発に転写された領域に一般的に関連付けられている認識モチーフのため、細胞株開発のためのクローンを開発している(米国特許出願公開第2010/0311116号明細書; Ding et al., *Cell* 122(3): 473-483, 2005; Wu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(4): 15008-13, 2006; Matasci et al., *Biotechnology & Bioengineering* 108(9): 2141-50, 2011; Matasci et al., *BMC Proceedings* 5(SUPPL. 8) p. 34, 2011; Balas

10

20

30

40

50

ubramanian et al., J. Biotechnology 200:61-9, 2015; Balasubramanian et al., Biotechnology Progress 32(5):1308-1317, 2016; Balasubramanian et al., Biotechnology & Bioengineering 113(6):1234-43, 2016; Ahmadi et al., PLoS ONE 12(6):e0179902, 2017; Rajendra et al., Biotechnology Progress 33(2):534-540, 2017; 及び Rajendra et al., Biotechnology Progress 33(6):1436-1448, 2017)。

【0025】

ディスプレイライブラリアプローチを使用した切り出し頻度を増加させるためのトランスポザーゼへの改変並びに / 又は他の種からの相同体との配列比較の実施及び高活性トランスポザーゼの生成を通じて、モル基準で piggy Bac 効率を改善するための努力がなされてきた (例えば、米国特許第 8,399,643 号明細書; 同第 9,670,503 号明細書; 同第 9,783,790 号明細書; 同第 9,546,382 号明細書; 及び Yusa et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(4):1531-36, 2011 を参照されたい)。

【0026】

piggy Bac トランスポザーゼの構造についてはあまり知られていない。piggy Bac トランスポザーゼアミノ酸配列の分析により、それがほとんど ヘリックスタンパク質であることが示された。細胞に導入された piggy Bac トランスポザーゼの安定性を改善する試みにおいて、変異は ヘリックス及び推定上の N-結合型グリコシル化部位 (すなわち、NXS/tモチーフ) 内で行われ、本明細書に記載されるように力価を増加させることが見出された。単一の変異又は変異の組み合わせを含む piggy Bac トランスポザーゼの改変されたバージョンは、piggy Bac トランスポゾンの少なくとも 5' 及び 3' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質と共に細胞にトランスフェクトされ、イラクサギンウワバ (Trichoplusia ni) 由来の野生型の変異していない piggy Bac トランスポザーゼ (配列番号 2) でトランスフェクトされた同様の細胞及び piggy Bac トランスポザーゼを含有しない細胞と比較して、目的のタンパク質の発現について評価された。安定性を高めるように改変された核酸配列によってコードされる piggy Bac トランスポザーゼは、野生型 piggy Bac トランスポザーゼを含む細胞で、又は piggy Bac トランスポザーゼを含まない細胞で発現される組換えタンパク質の力価と比較して、改変された piggy Bac トランスポザーゼを含む細胞で発現された組換えタンパク質の力価が改善されることを見出された。

【0027】

本明細書で使用する場合、用語「piggy Bac トランスポゾン」又は「piggy Bac 転移因子」は、ドナーポリヌクレオチド (例えば、ベクター) から切り出され、標的部位、例えば、細胞のゲノム又は染色体外 DNA に挿入され得るポリヌクレオチド配列を指す。例えば、イラクサギンウワバ (Trichoplusia ni) 由来の piggy Bac 転移因子は長さが 2472 bp であり、短い逆位反復を有し、これには、5'13-bp 末端反復と 5'19-bp 内部反復との間に 3-bp のスペーサー及び 3'13-bp 末端反復と 3'19-bp 内部反復との間に 31-bp のスペーサーを有する非対称末端反復構造、並びに機能的トランスポザーゼをコードする単一の 2.1-kp のオープンリーディングフレームが含まれる。(Li et al., Mol. Genet. Genomics (2001) 266:190-198; Cary et al., Virology (1989) 172:156-169)。

【0028】

本明細書で使用する場合、piggy Bac トランスポゾンの 5' 及び 3' 逆位反復エレメントは、標的 TTA A 部位、末端反復スペーサー、及び piggy Bac トランスポゾンの内部反復を含む 5' 及び 3' セグメントを指し、イラクサギンウワバ (T. ni) の場

10

20

30

40

50

合、これには、標的TTAA部位、間に3 - bpスペーサーを有する5'13 - bp末端反復と5'19 - bp内部反復、及び間に31 - bpスペーサーを有する3'13 - bp内部反復と3'19 - bp内部反復が含まれる。

【0029】

本明細書で使用する場合、用語「piggyBactransposase」は、ドナーポリヌクレオチド（例えば、ベクター）からのpiggyBactransposonの切り出し及びその後の標的細胞のゲノム又は染色体外DNAへのpiggyBactransposonの挿入を触媒するポリペプチドを指す。piggyBactransposaseは、カットアンドペーストメカニズムを利用して、挿入時に複製され、挿入後に正確に切り出されるTTAA標的部位に挿入し、ドナー部位をその前transposon状態に戻す。（Elick et al., *Genetica* 98:33-41, 1996. Fraser et al., *Insect Mol. Biol.* 5:141-151, 1996. Wang and Fraser, *Insect Mol. Biol.* 1:109-116, 1993）。piggyBactransposaseは、ポリペプチドとして存在し得る。或いは、piggyBactransposaseは、piggyBactransposaseをコードするコード配列を含む核酸分子として存在し得る。本発明のいくつかの実施形態では、piggyBactransposaseが、改変されたpiggyBactransposaseをコードする改変された核酸分子として存在する場合、改変された核酸分子は、piggyBactransposonを含む同じベクター上に、すなわちシスに存在し得る。本発明のその他の実施形態では、改変された核酸分子は、transposonから分離する第2のベクター上に、即ちトランスに存在し得る。本明細書に記載の改変されたpiggyBactransposaseは、改変されたpiggyBactransposaseを含む細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価が、野生型piggyBactransposaseを含むか、又はpiggyBactransposaseを含まない細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善されるという点で特有である。

【0030】

用語「ポリペプチド」又は「タンパク質」は、全体を通して互換的に用いられ、ペプチド結合によって互いに連結される2つ以上のアミノ酸残基を含む分子を指す。ポリペプチド及びタンパク質はまた、天然配列のアミノ酸残基からの1つ以上の欠失、挿入、及び/又は置換を有する高分子も含み、即ち、天然に存在する非組換え細胞によって産生されるポリペプチド又はタンパク質、或いは、改変された細胞又は組換え細胞によって産生され、天然タンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基からの1つ以上の欠失、挿入、及び/又は置換を有する分子を含む。ポリペプチド及びタンパク質はまた、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及びポリマーの化学的アナログであるアミノ酸ポリマーも含む。ポリペプチド及びタンパク質はまた、グリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基の -カルボキシル化、ヒドロキシル化、及びADP - リボシル化を含むが、これらに限定されない修飾も含む。

【0031】

本明細書に記載のpiggyBactransposaseは、野生型イラクサギンウワバ（*Trichoplusia ni*）（キャベツのヤガ科幼虫）piggyBactransposase（配列番号2）と比較して、アミノ酸残基の1つ以上の挿入、欠失、若しくは置換、又はそれらの任意の組み合わせ、並びにアミノ酸残基の挿入、欠失、又は置換以外の修飾を有するポリペプチドを含むことが意図される。本明細書で使用する場合、「～位の1つ以上でのアミノ酸置換」は、言及された位置の1、2、3、4、5、6、又は7箇所での置換を意味する。いくつかの実施形態では、「～位の1つ以上でのアミノ酸置換」は、言及された位置の1、2、3、4、5、又は6箇所での置換を意味する。いくつかの実施形態では、「～位の1つ以上でのアミノ酸置換」は、言及された位置の1、2、3、4、又は5箇所での置換を意味する。いくつかの実施形態では、「～位の1つ以上でのアミノ酸置換」は、言及された位置の1、2、3、又は4箇所での置換を意味する。いくつかの実施形態では、「～位の1つ以上でのアミノ酸置換」は、言及された位置の1、2、又

10

20

30

40

50

は3箇所での置換を意味する。いくつかの実施形態では、「～位の1つ以上でのアミノ酸置換」は、言及された位置の1又は2箇所での置換を意味する。

【0032】

本発明は、配列番号2の147位、176位、221位、247位、429位、533位、及び573位の1つ以上でのアミノ酸置換を含む、p i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。一実施形態では、トランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換を含む。一実施形態では、トランスポザーゼは、配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。一実施形態では、トランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、並びに/又は配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、トランスポザーゼは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも1つを含む。関連実施形態では、トランスポザーゼは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも2つを含む。別の関連実施形態では、トランスポザーゼは、配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとの置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとの置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとの置換を含む。一実施形態では、改変されたp i g g y B a cトランスポザーゼでトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価は、野生型p i g g y B a cトランスポザーゼで、又はp i g g y B a cトランスポザーゼなしでトランスフェクトされた細胞によって発現される同じ目的のタンパク質の力価と比較して改善される。

【0033】

本発明は、また、宿主細胞の安定性を高めるように改変されたp i g g y B a cトランスポザーゼであって、p i g g y B a cトランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、247位、429位、533位、及び573位の1つ以上でのアミノ酸置換を含む、p i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号4、配列番号6、又は配列番号8のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10又は12のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号4のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号6のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号14のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号16のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。

【0034】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1:野生型及び変異したpiggyBacトランスポザーゼのアミノ酸配列

配列番号	ID	配列
2	WT	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SEIVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDLDF DRSLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMMCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGTS MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPMVMYYNQ TKGGVDTLT QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF
4	I147L	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SELVKW

10

20

30

40

【 0 0 3 5 】

50

【表 2】

		TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMACD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGTG MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPKQMVYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF	10
6	I247L	MGSSLDDEHILSALLQSDDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVEIQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVVSALNIVRSQRPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SEIVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMACD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT	20
			30
			40

【 0 0 3 6 】

【表 5】

		TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMACD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGTG MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNITNIPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF	10
14	LIT (I247L I147 S533T)	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVEIQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SELVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL DRSLSMVYVSVMSRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKIWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILMACD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT	20
			30
			40

【 0 0 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 6】

		SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGT MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFM RNLYMSLTSSFM RKRLEAPTLKRYLRDNITN ILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF	10
16	LLS (I247L I147L S533)	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDT EEAFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKN KHCWST SKSTRRSRV SALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEII SELVKW TNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDN HMSTDDL F DRSLSMVYVSVMSRDRDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFT PVRKLWDL FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIK ILM MCD SGTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCR NITCDNWFT SIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGT MFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPMVMYYNQ TKGGVDTLD QMCSVMTC SRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSK GEKVQSRK KFM RNLYMSLTSSFM RKRLEAPTLKRYLRDNISN ILPNEVPG TSDDSTEE PVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQ SCF	20 30 40

【 0 0 4 0 】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」、又は「改変された核酸分子」は、全体を通して互換的に用いられ、一本鎖及び二本鎖核酸の両方を含み、ゲノムDNA、RNA、mRNA、cDNA、若しくは合成起源、又は自然界に通常見られる配列とは関連しないそれらのいくつかの組み合わせを含む。用語「単離されたポリヌクレオチド」、「単離された核酸分子」、又は「単離されて改変された核酸分子」は、具体的には、合成起源の配列又は通常は自然界に見られない配列を指す。特定の配列を含む単離された核酸分子は、その特定の配列に加えて、最大で10若しくは更に最大で20に及ぶ数の他のタンパク質若しくはその一部をコードする配列を含み得、又は記載の核酸配列のコード領域の発現を制

御する調節配列を作動可能に連結して含み得、及びノ又はベクター配列を含み得る。核酸分子を含むヌクレオチドは、リボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチド又はいずれかの型のヌクレオチドの改変形態であり得る。改変には、プロモウリジン及びイノシン誘導体などの塩基改変、2'、3'-ジデオキシリボースなどのリボース改変、並びにホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニコチオエート (phosphoroanilothioate)、ホスホロアニラデート (phosphoraniladate) 及びホスホロアミデート (phosphoroamidate) などのヌクレオチド間結合の改変が含まれる。

【0041】

本明細書で使用する場合、用語「単離された」は、(i) 通常、それと共に見出される少なくともいくつかの他のタンパク質若しくはポリヌクレオチドを含まないか、(ii) 例えば同一種等の同一源に由来する他のタンパク質若しくはポリヌクレオチドを実質的に含まないか、(iii) 天然ではそれに結合しているポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖質若しくは他の物質の少なくとも約50パーセントから分離されているか、(iv) 天然ではそれに結合していないポリペプチド若しくはポリヌクレオチドと(共有結合的若しくは非共有結合的な相互作用によって) 操作可能に結合しているか、又は(v) 天然には生じないことを意味する。

10

【0042】

一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の piggy Bactranspozase をコードする改変された核酸分子を提供する。本発明は、また、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、又は配列番号18の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3、配列番号5、又は配列番号7の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11、配列番号13、又は配列番号15の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9又は配列番号11の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17又は配列番号18の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号5の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号7の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号13の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号15の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号18の核酸配列によりコードされる piggy Bactranspozase を提供する。

20

30

40

【0043】

【表 7】

表2. 野生型及び変異したpiggyBactトランスポザーゼの核酸配列

配列番号	ID	核酸配列
1	WT	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT

10

20

【 0 0 4 4 】

30

40

50

【表 8】

		<p>GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG ATCGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTCACCCCGTGCGGAAG ATCTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA</p>
--	--	---

10

20

30

40

【 0 0 4 5 】

50

【表 9】

		CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAG CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC	10
		ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA	20
3	1147L	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA	30
			40

【 0 0 4 6 】

【表 1 0】

	<p>CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG CTGGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGC GCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG ATCTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG</p>
--	--

10

20

30

40

【 0 0 4 7】

50

【表 1 1】

	<p>ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCCCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA AAGAGACTGGAAGCCCCACCCTGAAGAGATACCTGCGG GACAACATCAG CAACATCCTGCCAACGAAGTGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGTGATGAAGAAGAGGACCTACTGCACCTACTGTCC CAGCAAGATC</p>
--	--

10

20

30

40

【 0 0 4 8 】

50

【表 1 2】

		AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCTGCAAGAAATGCAAAAAA GTGATCTGCCG GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
5	I247L	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG ATCGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGTGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTCAACCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC

10

20

30

40

【 0 0 4 9】

【表 1 3】

	<p>TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT TCAGAATGTA CATCCCAACAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGCCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGATGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC ATGGCCCTGCTGTACGGCATGATCAATATCGCCTGCATCA ACAGCTTCAT CATCTACAGCCACAACGTGTCCAGCAAGGGCGAGAAGGT GCAGAGCCGGA AGAAATTCATGCGGAACCTGTACATGAGCCTGACCTCCAG CTTCATGAGA</p>	
--	--	--

10

20

30

40

【 0 0 5 0 】

50

【表 1 5】

		<p>TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTCACCCCGTGCGGAAG ATCTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT TCAGAATGTA CATCCCAACAAGCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC</p>
--	--	--

10

20

30

40

【 0 0 5 2】

50

【表 1 7】

	GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT TCAGAATGTA CATCCCCAACAAAGCCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG	
--	---	--

10

20

30

40

【 0 0 5 4 】

50

【表 2 0】

		GTGATCTGCCG GGAGCACAACATCGACATGTGCCAGAGCTGTTTCTAGC
13	LIT (I147L I247 S533T)	ATGGGCTCTAGCCTGGACGACGAGCACATCCTGAGCGCCC TGCTGCAG AGCGACGACGAACTGGTGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG ATCAGCGACCA CGTGTCCGAGGACGACGTGCAGTCCGACACCGAGGAAGC CTTCATCGACG AGGTGCACGAAGTGCAGCCTACCAGCAGCGGCTCCGAGAT CCTGGACGAG CAGAACGTGATCGAGCAGCCTGGCAGCTCCCTGGCCAGCA ACAGAATCCT GACCCTGCCCCAGAGAACCATCAGAGGCAAGAACAAGCA CTGCTGGTCCA CCTCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGTGTCCGCCCTGAA CATCGTGCGG AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAATGTGCAGAAACATCTAC GACCCCTGCT GTGCTTCAAGCTGTTCTTCACCGACGAGATCATCAGCGAG CTGGTGAAGT GGACCAACGCCGAGATCAGCCTGAAGAGGCGGGAGAGCA TGACCGGCGCC ACCTTCAGAGACACCAACGAGGACGAGATCTACGCCTTCT TCGGCATCCT GGTGATGACCGCCGTGAGAAAGGACAACCACATGAGCAC CGACGACCTGT TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCCCTGCGGGAGAACGACGTGTTACCCCCGTGCGGAAG ATCTGGGACC

10

20

30

40

【 0 0 5 7】

50

【表 2 3】

	TCGACAGATCCCTGAGCATGGTGTACGTGTCCGTGATGAG CAGAGACAGA TTCGACTTCCTGATCAGATGCCTGAGAATGGACGACAAGA GCATCAGACC CACCTGCGGGAGAACGACGTGTTCACCCCGTGCGGAAG CTGTGGGACC TGTTTCATCCACCAGTGCATCCAGAACTACACCCCTGGCGC CCACCTGACC ATCGATGAGCAGCTGCTGGGCTTCAGAGGCAGATGCCCT TCAGAATGTA CATCCCAACAAGCCAGCAAGTACGGCATCAAGATCCTG ATGATGTGCG ACAGCGGCACCAAGTACATGATCAACGGCATGCCCTACCT GGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGTGCCCTGGGCGAGTACTACGTGA AAGAACTGAG CAAGCCTGTGCATGGCAGCTGCAGGAACATCACCTGCGAC AACTGGTTCA CCAGCATCCCCCTGGCCAAGAACCTGCTGCAGGAACCCTA CAAGCTGACC ATCGTGGGCACCGTGCGGAGCAACAAGCGGGAGATCCCA GAGGTGCTGAA GAACAGCAGATCCAGACCTGTGGGAACAAGCATGTTCTGC TTCGACGGCC CCCTGACCCTGGTGTCTACAAGCCCAAGCCCGCCAAGAT GGTGTACCTG CTGTCCAGCTGCGACGAGGACGCCAGCATCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGATGGTGTACTACAACCAGACCAAGGGCGGCGTG GACACCCTGG ACCAGATGTGCAGCGTGATGACCTGCAGCAGAAAGACCA ACAGATGGCCC	
--	---	--

10

20

30

40

【 0 0 6 0 】

50

【表 2 5】

		CACCCUGCGGGAGAACGACGUGUUCACCCCGUGCGGAA GCUGUGGGACC UGUUCAUCCACCAGUGCAUCCAGAACUACACCCCUGGCG CCCACCUGACC AUCGAUGAGCAGCUGCUGGGCUUCAGAGGCAGAUGCCCC UUCAGAAUGUA CAUCCCAACAAGCCCAGCAAGUACGGCAUCAAGAUCU GAUGAUGUGCG ACAGCGGCACCAAGUACAUGAUCAACGGCAUGCCCUACC UGGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGUGCCCCUGGGCGAGUACUACGUG AAAGAACUGAG CAAGCCUGUGCAUUGGCAGCUGCAGGAACAUCACCUGCGA CAACUGGUUCA CCAGCAUCCCCUGGCCAAGAACCUGCUGCAGGAACCCU ACAAGCUGACC AUCGUGGGCACCGUGCGGAGCAACAAGCGGGAGAUSCCA GAGGUGCUGAA GAACAGCAGAUCCAGACCUGUGGGAACAAGCAUGUUCUG CUUCGACGGCC CCCUGACCCUGGUGUCCUACAAGCCCAAGCCCGCCAAGA UGGUGUACCUG CUGUCCAGCUGCGACGAGGACGCCAGCAUCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGAUGGUGAUGUACUACAACCAGACCAAGGGCGGCGU GGACACCCUGG ACCAGAUGGCAGCGUGAUGACCUGCAGCAGAAAGACCA ACAGAUGGCC AUGGCCUUGCUGUACGGCAUGAUCAAUAUCGCCUGCAUC AACAGCUUCAU CAUCUACAGCCACAACGUGUCCAGCAAGGGCGAGAAGGU GCAGAGCCGGA AGAAAUUC AUGCGGAACCUGUACAUGAGCCUGACCUCA GCUUCAUGAGA AAGAGACUGGAAGCCCCACCCUGAAGAGAUACCUGCGG GACAACAUCAC CAACAUCCUGCCCAACGAAGUGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGUGAUGAAGAAGAGGACCUACUGCACCUACUGUC CCAGCAAGAUC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCUGCAAGAAAUGCAAAA AGUGAUCUGCCG GGAGACAACAUCGACAUGUGCCAGAGCUGUUUCUAGC	10
		AUGGGUCUAGCCUGGACGACGAGCACAUCCUGAGCGCC CUGCUGCAG AGCGACGACGAACUGGUGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG AUCAGCGACCA CGUGUCCGAGGACGACGUGCAGUCCGACACCGAGGAAGC CUUCAUCGACG AGGUGCACGAAGUGCAGCCUACCAGCAGCGGCUCCGAGA	20
18	LLT (I147L I247L S533T) RNA	AUGGGUCUAGCCUGGACGACGAGCACAUCCUGAGCGCC CUGCUGCAG AGCGACGACGAACUGGUGGGCGAGGACAGCGACAGCGAG AUCAGCGACCA CGUGUCCGAGGACGACGUGCAGUCCGACACCGAGGAAGC CUUCAUCGACG AGGUGCACGAAGUGCAGCCUACCAGCAGCGGCUCCGAGA	30
			40

【 0 0 6 2】

【表 2 6】

	UCCUGGACGAG CAGAACGUGAUCGAGCAGCCUGGCAGCUCCCUGGCCAGC AACAGAAUCCU GACCCUGCCCCAGAGAACCAUCAGAGGCAAGAACAAGCA CUGCUGGUCCA CCUCCAAGAGCACCAGGCGGAGCAGAGUGUCCGCCUGA ACAUCGUGCGG AGCCAGAGGGGCCCCACCAGAAUGUGCAGAAACAUCUAC GACCCCCUGCU GUGCUUCAAGCUGUUCUUCACCGACGAGAUAUCAGCGA GCUGGUGAAGU GGACCAACGCCGAGAUCAGCCUGAAGAGGCGGGAGAGCA UGACCGGCGCC ACCUUCAGAGACACCAACGAGGACGAGAUCUACGCCUUC UUCGGCAUCCU GGUGAUGACCGCCGUGAGAAAGGACAACCACAUGAGCAC CGACGACCUGU UCGACAGAUCCCUGAGCAUGGUGUACGUGUCCGUGAUGA GCAGAGACAGA UUCGACUUCCUGAUCAGAUGCCUGAGAAUGGACGACAAG AGCAUCAGACC CACCCUGCGGGAGAACGACGUGUUCACCCCGUGCGGAA GCUGUGGGGACC UGUUCAUCCACCAGUGCAUCCAGAACUACACCCUGGCG CCCACCUGACC AUCGAUGAGCAGCUGCUGGGCUUCAGAGGCAGAUGCCCC UUCAGAAUGUA CAUCCCCAACAAGCCCAGCAAGUACGGCAUCAAGAUCU GAUGAUGUGCG ACAGCGGCACCAAGUACAUGAUAACGGCAUGCCCUACC UGGGCAGAGGC ACCCAGACAAACGGCGUGCCCCUGGGCGAGUACUACGUG AAAGAACUGAG CAAGCCUGUGCAUGGCAGCUGCAGGAACAUCACCUGCGA CAACUGGUUCA CCAGCAUCCCCUGGCCAAGAACCUGCUGCAGGAACCCU ACAAGCUGACC AUCGUGGGCACCGUGCGGAGCAACAAGCGGGAGAUCCA GAGGUGCUGAA GAACAGCAGAUCCAGACCUGUGGGAACAAGCAUGUUCUG CUUCGACGGCC CCCUGACCCUGGUGUCCUACAAGCCCAAGCCCGCCAAGA UGGUGUACCU CUGUCCAGCUGCGACGAGGACGCCAGCAUCAACGAGAGC ACCGGCAAGCC CCAGAUGGUGAUGUACUACAACCAGACCAAGGGCGGGCGU GGACACCCUGG ACCAGAUGUGCAGCGUGAUGACCUGCAGCAGAAAGACCA ACAGAUGGCC AUGGCCUGCUGUACGGCAUGAUCAAUAUCGCCUGCAUC	
--	---	--

10

20

30

40

【 0 0 6 3】

50

【表 27】

	AACAGCUUCAU CAUCUACAGCCACAACGUGUCCAGCAAGGGCGAGAAGGU GCAGAGCCGGA AGAAAUUCAUGCGGAACCUUGUACAUGAGCCUGACCUCCA GCUUCAUGAGA AAGAGACUGGAAGCCCCACCCUGAAGAGAUACCUUGCGG GACAACAUCAC CAACAUCCUGCCCAACGAAGUGCCAGGAACAAGCGACGA CAGCACCGAGG AACCCGUGAUGAAGAAGAGGACCUACUGCACCUACUGUC CCAGCAAGAUC AGAAGAAAGGCCAACGCCAGCUGCAAGAAAUGCAAAAA AGUGAUCUGCCG GGAGCACAACAUCGACAUGUGCCAGAGCUGUUUCUAGC
--	--

10

【0064】

目的のポリペプチド及びタンパク質は、タンパク質ベースの治療を含む科学的又は商業的関心の対象であってもよい。目的のタンパク質は、とりわけ、分泌タンパク質、非分泌タンパク質、細胞内タンパク質、又は膜結合型タンパク質を含む。目的のポリペプチド及びタンパク質は、細胞培養法を用いる組換え動物細胞株によって産生することができ、「組換えタンパク質」と称されてもよい。発現したタンパク質は、細胞内で産生されてもよいか、又はそれを回収及び/又は収集することができる培養媒体中に分泌されてもよい。用語「単離されたタンパク質」又は「単離された組換えタンパク質」は、その治療的、診断的、予防的、研究又は他の使用を妨げるタンパク質若しくはポリペプチド又は他の汚染物質から精製される、目的のポリペプチド又はタンパク質を指す。目的のタンパク質は、標的、特に以下に列挙し、それらから誘導される標的、それらに関連する標的、及びそれらの改変を含む標的に結合することによって治療効果を発揮するタンパク質を含む。

20

【0065】

目的のタンパク質は、「抗原結合タンパク質」を含む。抗原結合タンパク質は、それが結合する別の分子（抗原）に対して親和性を有する抗原結合領域又は抗原結合部分を含むタンパク質又はポリペプチドを指す。抗原結合タンパク質は、抗体、ペプチボディ、抗体断片、抗体誘導體、抗体アナログ、融合タンパク質（単鎖可変断片（s c F v）及び二重鎖（二価）s c F vを含む）、ムテイン、及びX m a b sを包含する。また、二重特異性T細胞エンゲージャー（B i T E（登録商標））、半減期延長などの延長を有する二重特異性T細胞エンゲージャー、例えば、H L E B i T E、H e t e r o I g B I T E、及びその他のもの、キメラ抗原受容体（C A R、C A R T）、及びT細胞受容体（T C R）も含まれる。

30

【0066】

s c F vは、一体に連結された抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域を有する単鎖抗体断片である。米国特許第7,741,465号明細書及び同第6,319,494号明細書並びにE s h h a r, e t a l., C a n c e r I m m u n o l . I m m u n o t h e r a p y (1 9 9 7) 4 5 : 1 3 1 - 1 3 6を参照されたい。s c F vは、標的抗原と特異的に相互作用する親抗体の能力を保持している。

40

【0067】

用語「抗体」は、任意のアイソタイプ又はサブクラスのグリコシル化及び非グリコシル化免疫グロブリンの両方、又は特異的結合についてインタクトな抗体と競合するその抗原結合領域への言及を含む。特に指定のない限り、抗体は、ヒト、ヒト化、キメラ、多特異性、モノクローナル、ポリクローン、ヘテロI g G、二重特異性、及びそれらのオリゴマー又は抗原結合断片を含む。抗体は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、又はI g G 4型を含む。また、F a b、F a b'、F (a b') 2、F v、ダイアボディ、F d、d A b、マキシボディ、一本鎖抗体分子、単ドメインV_HH、相補性決定領域（C D R）断片、s

50

c F v、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ等の抗原結合断片又は領域を有するタンパク質、及び標的ポリペプチドへの特異的抗原結合を付与するのに十分である免疫グロブリンの少なくとも一部を含むポリペプチドも含まれる。

【0068】

また、ヒトに投与した場合に著しく有害な免疫応答を生じない、ヒト、ヒト化、及びヒト及びヒト化抗体等の他の抗原結合タンパク質も含まれる。

【0069】

また、非共有結合、共有結合、又は共有結合と非共有結合の両方によって化学的に修飾されるタンパク質等の修飾タンパク質も含まれる。また、細胞改変システムによってなされてもよい1つ以上の翻訳後修飾か、又は酵素及び/若しくは化学的方法によって生体外に導入されるか又は他の方法で導入される修飾を更に含むタンパク質も含まれる。

10

【0070】

目的のタンパク質はまた、例えば、例えば、ロイシンジッパー、コイルドコイル、免疫グロブリンのFc部分等のような多量体化ドメインを含む組換え融合タンパク質を含んでもよい。また、分化抗原のアミノ酸配列の全て又は一部を含むタンパク質(CDタンパク質と呼ばれる)又はそれらのリガンド或いはこれらのいずれかに略類似するタンパク質も含まれる。

【0071】

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)等のコロニー刺激因子を含んでもよい。このようなG-CSF剤には、Neupogen(登録商標)(フィルグラスチム)及びNeulasta(登録商標)(ペグフィルグラスチム)が含まれるが、これらに限定されない。また、Epogen(登録商標)(エポエチンアルファ)、Aranesp(登録商標)(ダルベポエチンアルファ)、Dynepo(登録商標)(エポエチンデルタ)、Mirceracel(登録商標)(メトキシポリエチレングリコール-エポエチンベータ)、Hematide(登録商標)、MRK-2578、INS-22、Retacrit(登録商標)(エポエチンゼータ)、Neorecormon(登録商標)(エポエチンベータ)、Silapo(登録商標)(エポエチンゼータ)、Binocrit(登録商標)(エポエチンアルファ)、エポエチンアルファHexal、Abseamed(登録商標)(エポエチンアルファ)、Ratiosip(登録商標)(エポエチンシータ)、Eporatio(登録商標)(エポエチンシータ)、Biopoin(登録商標)(エポエチンシータ)、エポエチンアルファ、エポエチンベータ、エポエチンゼータ、エポエチンシータ、及びエポエチンデルタ、エポエチンオメガ、エポエチンイオタ、組織プラスミノゲン活性化因子、GLP-1受容体アゴニスト、並びに、それらの分子若しくはバリエーション又はそれらのアナログ及び前記のいずれかのバイオシミラーも含むが、これらに限定されない。

20

30

【0072】

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、1つ以上のCDタンパク質、HER受容体ファミリータンパク質、細胞接着分子、成長因子、神経成長因子、線維芽細胞増殖因子、トランスフォーム成長因子(TGF)、インスリン様成長因子、骨誘導性因子、インスリン及びインスリン関連タンパク質、凝固及び凝固関連タンパク質、コロニー刺激因子(CSF)、他の血液及び血清タンパク質血液型抗原;受容体、受容体関連タンパク質、成長ホルモン、成長ホルモン受容体、T細胞受容体;神経栄養因子、ニューロトロフィン、リラキシン、インターフェロン、インターロイキン、ウイルス抗原、リポタンパク質、インテグリン、リウマチ因子、免疫毒素、表面膜タンパク質、輸送タンパク質、ホーミング受容体、アドレシン、調節タンパク質、及びイムノアドヘシンに特異的に結合するタンパク質を含んでもよい。

40

【0073】

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、単独で又は任意の組み合わせで、以下のうちの1つ以上に結合し得る:CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、

50

CD70、CD123、CD133、CD138、CD171、CD174を含むがこれらに限定されないCDタンパク質、例えばHER2、HER3、HER4を含むHER受容体ファミリータンパク質、EGF受容体であるEGFRvIII、細胞接着分子、例えばLFA-1、Mol、p150、95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、v/3インテグリン、例えば、血管内皮成長因子(「VEGF」)を含むがこれらに限定されない成長因子、VEGFR2、成長ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、成長ホルモン放出因子、副甲状腺ホルモン、ミューラー抑制物質、ヒトマクロファージ炎症性タンパク質(MIP-1)、エリスロポエチン(EPO)、NGF等の神経成長因子、血小板由来成長因子(PDGF)、例えばaFGF及びbFGFを含む線維芽細胞成長因子、上皮成長因子(EGF)、クリプト、数ある中でも、TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4、又はTGF-5を含むTGF-及びTGF-を含むトランスフォーム成長因子(TGF)、インスリン様成長因子-I及び-II(IGF-I及びIGF-II)、des(1-3)-IGF-I(脳内IGF-I)、及び骨形成促進因子、インスリン、インスリンA鎖、インスリンB鎖、プロインスリン、及びインスリン様成長因子結合タンパク質を含むがこれらに限定されないインスリン及びインスリン関連タンパク質、数ある中でも、第VIIII因子、組織因子、フォンウィルブランド因子等の凝固及び凝固関連タンパク質、プロテインC、-1-アンチトリプシン、ウロキナーゼ及び組織プラスミノゲンアクチベーター(「t-PA」)等のプラスミノゲンアクチベーター、ボンバジン、トロンピン、トロンボポエチン、トロンボポエチン受容体、数ある中でも、M-CSF、GM-CSF、及びG-CSFを含むコロニー刺激因子(CSF)、アルブミン、IgE、及び血液型抗原を含むがこれらに限定されない他の血液及び血清タンパク質、例えば、flk2/flt3受容体、肥満(OB)受容体、成長ホルモン受容体、及びT細胞受容体を含む受容体及び受容体関連タンパク質、骨由来神経栄養因子(BDNF)及びニューロトロフィン-3、-4、-5、又は-6(NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6)を含むがこれらに限定されない神経栄養因子；リラキシンA鎖、リラキシンB鎖、及びプロレラキシン、例えば、インターフェロン-、-、及び-を含むインターフェロン、インターロイキン(IL)、例えば、IL-1~IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-23、IL-12/IL-23、IL-2Ra、IL1-R1、IL-6受容体、IL-4受容体及び/又はIL-13から受容体であるIL-13RA2、又はIL-17受容体であるIL-1RAP、エイズエンベロープウイルス抗原、リポタンパク質、カルシトニン、グルカゴン、心房性ナトリウム利尿因子、肺サーファクタント、腫瘍壊死因子-及び-を含むがこれらに限定されないウイルス抗原、エンケファリナーゼ、BCMA、IgKappa、ROR-1、ERBB2、メソセリン、RANTES(regulated on activation normal T-cell expressed and secreted)、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、Dnase、FR-、インヒピン、及びアクチピン、インテグリン、プロテインA又はD、リウマチ因子、免疫毒素、骨形成タンパク質(BMP)、スーパーオキシドディスムターゼ、表面膜タンパク質、崩壊促進因子(DAF)、AIDSエンベロープ、輸送タンパク質、ホーミング受容体、MIC(MIC-a、MIC-B)、ULBP 1-6、EPCAM、アドレシン、制御タンパク質、イムノアドヘシン、抗原結合タンパク質、ソマトロピン、CTGF、CTLA4、エオタキシン-1、MUC1、CEA、c-MET、クローディン-18、GPC-3、EPHA2、FPA、LMP1、MG7、NY-ESO-1、PSCA、ガングリオシドGD2、グラングリオシドGM2、BAFF、OPGL(RANKL)、ミオスタチン、Dickkopf-1(DKK-1)、Ang2、NGF、IGF-1受容体、肝細胞増殖因子(HGF)、TRAIL-R2、c-Kit、B7RP-1、PSMA、NKG2D-1、プログラムされた細胞死タンパク質1及びリガンド、PD1及びPD-L1、マンノース受容体/hCG、C型肝炎ウイルス、メソセリンdsFv[PE38コンジュゲート、レジオネラニューモフィラ(illy)、IFNガンマ、インターフェロンガンマ誘導タンパク質10(IP10)、IFNAR、TALL-1、胸腺間質性リン

10

20

30

40

50

パル新生因子 (T S L P)、プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシシ 9 型 (P C S K 9)、幹細胞因子、 F l t - 3、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (C G R P)、O X 4 0 L、 4 7、血小板特異的 (血小板糖タンパク I i b / I I I b (P A C - 1)、トランスフォーミング成長因子 (T F G)、透明帯精子結合タンパク質 3 (Z P - 3)、T W E A K、血小板由来成長因子受容体 (P D G F R)、スクレロスチン、及び前記のいずれかの生物活性断片又はバリエーション。

【 0 0 7 4 】

別の実施形態では、目的のタンパク質は、アブシキシマブ、アダリムマブ、アデカツムマブ、アフリベルセプト、アレムツズマブ、アリロクマブ、アナキンラ、アタシセプト、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ビオスズマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、プロダルマブ、カンツズマブメルタンシン、カナキヌマブ、セツキシマブ、セルトリズマブペゴル、コナツムマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、エクリズマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エブラツズマブ、エタネルセプト、エボロクマブ、ガリキシマブ、ガニツムマブ、ゲムツズマブ、ゴリムマブ、イブリツモマブチウキセタン、インフリキシマブ、イピリムマブ、レルデリムマブ、ルミリキシマブ、イクセキズマブ (l x d k i z u m a b)、マバツズマブ、モテサニブニリン酸、ムロモナブ - C D 3、ナタリズマブ、ネシリチド、ニモツズマブ、ニボルマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、オプレルベキン、パリビズマブ、パニツムマブ、ペムプロリズマブ、ペニツムマブ、パキセリズマブ、ラニビズマブ、リロツムマブ、リツキシマブ、ロミプロスチム、ロモソズマブ、サルグラモスチム、トシリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、ウステキヌマブ、ベドリズマブ、ビジリズマブ、ボロシキシマブ、ザノリムマブ、ザルツムマブ、及び前述のいずれかのバイオシミラーを含む。

【 0 0 7 5 】

本発明による目的のタンパク質は、前述の全てを包含し、上記抗体のいずれかの相補性決定領域 (C D R) の 1、2、3、4、5、又は 6 を含む抗体を更に含む。また、目的のタンパク質の基準アミノ酸配列に対して 7 0 % 以上、特に 8 0 % 以上、より特に 9 0 % 以上、更により特に 9 5 % 以上、特に 9 7 % 以上、より特に 9 8 % 以上、更により特に 9 9 % 以上のアミノ酸配列が同一である領域を備えるバリエーションも含まれる。この点に関する同一性は、種々の周知であり且つ容易に利用可能なアミノ酸配列分析ソフトウェアを用いて特定することができる。好ましいソフトウェアには、スミス - ウォーターマンアルゴリズムを実装するものが含まれ、配列の検索及び整列の問題に対する満足な解決策と考えられる。特に速度が重要な考慮事項である場合には、他のアルゴリズムも採用してもよい。この点に関して用いることができる DNA、RNA、及びポリペプチドの整列及びホモロジーマッピングのために一般に用いられるプログラムには、F A S T A、T F A S T A、B L A S T N、B L A S T P、B L A S T X、T B L A S T N、P R O S R C H、B L A Z E、及び M P S R C H が含まれ、後者は、M a s P a r によって作製された超並列プロセッサ上で実行するためのスミス - ウォーターマンアルゴリズムの実装である。

【 0 0 7 6 】

目的のタンパク質には、キメラ抗原受容体 (C A R 又は C A R - T) 及び T 細胞受容体 (T C R) などの遺伝子操作された受容体、並びにその標的抗原と相互作用する抗原結合分子を含む他のタンパク質も含まれ得る。C A R は、標的化された抗原 (細胞表面抗原などの) と相互作用する抗原結合分子を組み込むことにより、抗原に結合するように改変することができる。C A R は、典型的には、1 つ以上の共刺激 (「シグナル伝達」) ドメイン及び 1 つ以上の活性化ドメインと協力して抗原結合ドメイン (s c F v 等) を取り込む。

【 0 0 7 7 】

好ましくは、抗原結合分子は、その抗体断片、更には好ましくは 1 つ以上の単鎖抗体断片 (「 s c F v 」) である。s c F v は、他の C A R 成分と共に単鎖の一部として発現されるように改変され得るため、キメラ抗原受容体での使用に好ましい。K r a u s e e t a l . , J . E x p . M e d . , 1 8 8 (4) : 6 1 9 - 6 2 6 , 1 9 9 8 ; F i n n e y e t a l . , J o u r n a l o f I m m u n o l o g y , 1 6 1 : 2 7 9 1 - 2

10

20

30

40

50

797, 1998を参照されたい。

【0078】

キメラ抗原受容体は、その効能を高めるために、1つ以上の共刺激（シグナル伝達）ドメインを組み込む。米国特許第7,741,465号明細書及び同第6,319,494号明細書並びにKrause, et al.及びFinney, et al.（上記）、Song et al., Blood 119:696-706(2012); Kalos et al., Sci Transl. Med. 3:95(2011); Porter et al., N. Engl. J. Med. 365:725-33(2011)及びGross et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56:59-83(2016)を参照されたい。好適な共刺激ドメインは、供給源の中でもとりわけ、CD28、CD28T、OX40、4-1BB/CD137、CD2、CD3（アルファ、ベータ、デルタ、イプシロン、ガンマ、ゼータ）、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD27、CD30、CD33、CD37、CD40、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1、CD11a/CD18）、CD247、CD276（B7-H3）、LIGHT（腫瘍壊死因子スーパーファミリメンバー14; TNFSF14）、NKG2C、Igアルファ（CD79a）、DAP-10、Fcガンマ受容体、MHCクラスI分子、TNF、TNFR、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子、BTLA、Tollリガンド受容体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANSCENDANT/ANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、LAT、41-BB、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83リガンド又はこれらの断片若しくは組み合わせから誘導され得る。共刺激ドメインは、細胞外部分、膜貫通部分及び細胞内部分の1つ以上を含み得る。

【0079】

CARには、1つ以上の活性化ドメインも含まれる。CD3 zetaは、天然T細胞上のT細胞受容体の一エレメントであり、CARにおいて重要な細胞内活性化エレメントであることが証明されている。

【0080】

CARは、膜貫通型タンパク質であり、細胞外ドメインを含み、典型的には、目的の抗原を認識して結合することができる抗原結合タンパク質を含み、「ヒンジ」領域も含む。加えて、膜貫通ドメイン及び細胞内（細胞質）ドメインがある。

【0081】

細胞外ドメインは、シグナル伝達のために、及び抗原に対するリンパ球の効率的な応答のために有益である。本明細書に記載の任意のタンパク質又はそれらの任意の組み合わせから。細胞外ドメインは、合成の供給源又は天然の供給源、例えば、本明細書に記載のタンパク質などのいずれかに由来し得る。細胞外ドメインは、ヒンジ部分を含むことが多い。これは、「スペーサー」領域と呼ばれる場合がある細胞外ドメインの一部である。ヒンジは、本明細書に記載のタンパク質、特に上記の共刺激タンパク質並びに免疫グロブリン

10

20

30

40

50

ン (I g) 配列又は他の好適な分子から誘導され、標的細胞からの所望の特定の距離を達成し得る。

【 0 0 8 2 】

膜貫通ドメインは、C A R の細胞内ドメインに融合され得る。これは、C A R の細胞内ドメインにも同様に融合され得る。膜貫通ドメインは、合成の供給源又は天然の供給源、例えば、本明細書に記載のタンパク質、特に上記の共刺激タンパク質などのいずれかに由来し得る。

【 0 0 8 3 】

細胞内 (細胞質) ドメインは、膜貫通ドメインに融合してもよく、免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも 1 つの活性化を提供することができる。T 細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性又はサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。細胞内ドメインは、本明細書に記載のタンパク質から、特に C D 3 から誘導され得る。

10

【 0 0 8 4 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、宿主細胞、免疫細胞、組成物等を製造するために様々な既知の技法を利用することができる。

【 0 0 8 5 】

上記の核酸分子を少なくとも 1 つ含む、プラスミド、発現ベクター、転写カセット、又は発現カセットの形態の発現系及びコンストラクト、並びにそのような発現系又はコンストラクトを含む宿主細胞も本明細書で提供される。本明細書で使用する場合、「ベクター」は、タンパク質コード情報を宿主細胞に、並びに / 又は宿主細胞内の特定の場所及び / 若しくは区画に、伝達並びに / 又は輸送するために使用するのに適した任意の分子又は実体 (例えば、核酸、プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ウイルスカプシド、ビリオン、ネイキッド D N A、複合体化 D N A など) を意味する。ベクターには、ウイルス及び非ウイルスベクター、非エピソーム哺乳動物ベクターが含まれ得る。ベクターは、発現ベクター、例えば、組換え発現ベクター及びクローニングベクターと呼ばれることが多い。ベクターを宿主細胞に導入してベクター自体の複製を可能にし、それによってその中に含有されるポリヌクレオチドのコピーを増幅させることができる。クローニングベクターは、複製起点、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列及び選択可能なマーカーが一般的に挙げられるが、これらに限定されない配列成分を含有し得る。これらのエレメントは、当業者により必要に応じて選択され得る。

20

30

【 0 0 8 6 】

ベクターは、宿主細胞のトランスフォーメーションに有用であり、そこに作動可能に連結された 1 つ以上の異種性コード領域の発現を (宿主細胞と協働して) 誘導及び / 又は制御する核酸配列を含む。発現構築物は、限定はされないが、転写、翻訳に影響するか、又はそれを制御し、イントロンが存在するのであれば、そこに作動可能に連結されたコード領域の R N A スプライシングに影響する配列を含み得る。「作動可能に連結される」は、この用語が適用される構成要素が、それがその固有機能を実施することが可能になる関係にあることを意味する。例えば、タンパク質コード配列に「作動可能に連結される」ベクター中の制御配列、例えばプロモーターは、制御配列の正常な活性がタンパク質コード配列の転写をもたらす、コードされたタンパク質の組換え発現をもたらすように配置される。

40

【 0 0 8 7 】

ベクターは、用いられる特定の宿主細胞において機能性となるように選択され得る (すなわち、ベクターは、宿主の細胞機構と適合し、遺伝子の増幅及び / 又は発現を可能にし得る) 。いくつかの実施形態では、ジヒドロ葉酸還元酵素などのタンパク質レポーターを使用するタンパク質間相互作用検出法を使用するベクターが使用される (例えば、米国特許第 6 , 2 7 0 , 9 6 4 号明細書を参照) 。好適な発現ベクターは、当該技術分野において既知であり、また市販されている。

【 0 0 8 8 】

典型的には、宿主細胞のいずれかにおいて使用されるベクターは、プラスミドを維持す

50

るための配列と、外因性ヌクレオチド配列のクローニング及び発現のための配列とを含むであろう。このような配列は、典型的には、以下のヌクレオチド配列のうちの1つ以上を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写及び翻訳制御配列、転写終結配列、ドナー及びアクセプタープライス部位を含む完全イントロン配列、グリコシル化又は収量を改善するための様々なプレ配列又はプロ配列、ポリペプチド分泌のための天然又は異種のシグナル配列（リーダー配列又はシグナルペプチド）、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、内部リボソーム進入部位（IRES）配列、発現増強配列エレメント（EASE）、3個に分割されたリーダー（TPA）及びアデノウイルス2に由来するVA遺伝子RNA、発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを挿入するためのポリリンカー領域、並びに選択マーカエレメント。ベクターは、市販のベクターなどの出発ベクターから構築しても良く、更なるエレメントを個別に得て、ベクターに結合させてもよい。成分の各々の取得に使用される方法は、当業者によく知られている。

10

【0089】

ベクター成分は、同種（すなわち宿主細胞と同じ種及び/又は株由来）、異種（すなわち宿主細胞種又は株以外の種由来）、ハイブリッド（すなわち2つ以上の供給源由来のフランキング配列の組み合わせ）、合成又は天然であり得る。ベクターにおいて有用な成分の配列は、マッピング及び/又は制限エンドヌクレアーゼによって以前に同定されたものなど、当該技術分野で周知の方法によって得ることができる。加えて、それらは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、及び/又は好適なプローブでゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。

20

【0090】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、シャイン・ダルガノ配列（原核生物）又はコザック配列（真核生物）によって特徴付けられる。このエレメントは、典型的には、プロモーターの3'及び発現されるポリペプチドのコード配列の5'に位置する。

【0091】

複製起点は、宿主細胞内のベクターの増幅に役立つ。それらは、市販の原核生物ベクターの一部として含まれてもよく、また、既知の配列に基づいて化学的に合成され、ベクターに連結されてもよい。様々なウイルス起源（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、又はHPV若しくはBPVなどのパピローマウイルス）は、哺乳類細胞でベクターをクローニングするのに有用である。

30

【0092】

哺乳類宿主細胞発現ベクターのための転写及び翻訳制御配列は、ウイルスゲノムから切り出すことができる。一般に使用されるプロモーター及びエンハンサー配列は、ポリオーマウイルス、アデノウイルス2、シミアンウイルス40（SV40）、及びヒトサイトメガロウイルス（CMV）から誘導される。例えば、前初期遺伝子1のヒトCMVプロモーター/エンハンサーを使用することができる。例えば、Patterson et al. (1994), Applied Microbiol. Biotechnol. 40: 691-98を参照されたい。SV40ウイルスゲノム、例えば、SV40起点、初期及び後期プロモーター、エンハンサー、プライス、並びにポリアデニル化部位から誘導されるDNA配列は、哺乳類宿主細胞における構造遺伝子配列の発現のための他の遺伝エレメントを提供するために使用することができる。ウイルス初期及び後期プロモーターは、いずれもウイルスの複製起点もまた含有し得る断片としてウイルスゲノムから簡単に取得できるため、特に有用である（Fiers et al. (1978), Nature 273: 113; Kaufman (1990), Meth. in Enzymol. 185: 487-511)。HindIII部位からSV40ウイルス複製部位の起点に位置するBglI部位に向かって伸びるおよそ250bpの配列が含まれていれば、より小さな又はより大きなSV40断片も使用することができる。

40

【0093】

50

転写終結配列は、典型的には、ポリペプチドをコードする領域の末端に対して3'側に位置し、転写の終結に役立つ。通常、原核細胞における転写終結配列は、G-Cに富む断片とそれに続くポリT配列である。この配列は、ライブラリーから容易にクローニングされるか、又は更にベクターの一部として商業的に購入される一方、当業者に既知の核酸合成のための方法を使用しても容易に合成することもできる。

【0094】

選択マーカー遺伝子は、選択培養培地中で増殖させた宿主細胞の生存及び増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は、(a)原核宿主細胞に、抗生物質又は他の毒素、例えばアンピシリン、テトラサイクリン又はカナマイシンに対する耐性を付与するか；(b)細胞の栄養要求性欠損を補完するか；又は(c)複合培地又は限定培地から利用できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。特異的選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子である。有利には、ネオマイシン耐性遺伝子は、原核宿主細胞及び真核宿主細胞の両方でも選択に使用され得る。

10

【0095】

他の選択遺伝子を用いて、発現する遺伝子を増幅し得る。増幅は、増殖又は細胞生存に重要なタンパク質の産生に必要とされる遺伝子が組換え細胞の累代の染色体内でタンデムに繰り返されるプロセスである。哺乳動物細胞に好適な選択マーカーの例としては、グルタミンシンターゼ(GS)/メチオニンスルホキシイミン(MSX)系、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)及びプロモーターレスチミジンキナーゼ遺伝子が挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体を、この形質転換体のみがベクター中に存在する選択可能な遺伝子によって生存するように特異的に適合されている選択圧下に置く。培地中の選択薬剤濃度を連続的に増加させる条件下でトランスフォームされた細胞を培養することによって選択圧力をかけ、それによって選択可能遺伝子と、目的のタンパク質をコードするDNAの両方が増幅される。その結果、増幅されたDNAから多量の目的のポリペプチドが合成される。

20

【0096】

真核宿主細胞発現系においてグリコシル化が望まれる場合など、場合により、グリコシル化又は収量を改善するために様々なプレ配列又はプロ配列を操作し得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を改変するか、又はプロ配列を付加することができ、これもグリコシル化に影響し得る。最終的なタンパク質産物は、発現に伴って完全には除去されずに残存し得た1つ以上の追加のアミノ酸を(成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して)-1の位置に有し得る。例えば、最終タンパク質産物は、アミノ末端に結合した、ペプチダーゼ切断部位に見出される1個又は2個のアミノ酸残基を有し得る。或いは、酵素による切断部位をいくつか使用すると、成熟ポリペプチド内のそのような領域を酵素が切断するのであれば、結果的に所望のポリペプチドが僅かに切り詰められた形態で生じ得る。

30

【0097】

発現及びクローニングは、典型的には、宿主生物によって認識され、目的のタンパク質をコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含むであろう。プロモーターは、構造遺伝子(一般に、約100~1000bp以内)の開始コドンの上流(すなわち5'側)に位置し、構造遺伝子の転写を制御する非転写配列である。通常、プロモーターは、2つのクラス:誘導性プロモーター及び構成的プロモーターの一方に分類される。誘導性プロモーターは、栄養素の有無又は温度の変化などの培養条件の何らかの変化に応じて、その制御下でDNAからの転写レベルの増加を開始する。一方、構成的プロモーターは、それらが作動可能に連結されている遺伝子を均一に、すなわち遺伝子発現に対する制御をほとんど又は全く行わずに転写する。種々の潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターがよく知られている。

40

【0098】

酵母宿主と共に使用するのに好適なプロモーターも当該技術分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞と共

50

に使用するのに好適なプロモーターはよく知られており、以下に限定されるものではないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス2型など）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びシミアンウイルス40（SV40）などのウイルスのゲノムから得られるものが含まれる。他の好適な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター、例えば熱ショックプロモーター及びアクチンプロモーターが挙げられる。

【0099】

目的となり得るさらなるプロモーターとしては、SV40初期プロモーター（Benoit and Chambon, 1981, Nature 290:304-310）；CMVプロモーター（Thornsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 81:659-663）；ラウス羅白肉腫ウイルスの3'側の長い末端反復に含まれるプロモーター（Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797）；ヘルパステリジンキナーゼプロモーター（Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445）；グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）；メタロチオニン遺伝子由来のプロモーター及び調節配列（Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42）；及びベータ-ラクタマーゼプロモーターなどの原核生物プロモーター（Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731）；又はtacプロモーター（DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25）が挙げられるが、これらに限定されない。組織特異性を示し、トランスジェニック動物で利用されている以下の動物転写制御領域も対象とする：膵腺房細胞において活性であるエラストラーゼI遺伝子制御領域（Swift et al., 1984, Cell 38:639-646；Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409；MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515）；膵細胞において活性であるインスリン遺伝子制御領域（Hanan, 1985, Nature 315:115-122）；リンパ細胞において活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658；Adames et al., 1985, Nature 318:533-538；Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444）；精巣、乳房、リンパ球及び肥満細胞において活性であるマウス乳房腫瘍ウイルス制御領域（Leder et al., 1986, Cell 45:485-495）；肝臓において活性であるアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276）；肝臓において活性であるアルファ-フェト-タンパク質遺伝子制御領域（Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648；Hammer et al., 1987, Science 253:53-58）；肝臓において活性である1-アンチトリプシン遺伝子制御領域（Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171）；骨髄細胞において活性であるグロビン遺伝子制御領域（Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340；Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94）；脳におけるオリゴデンドロサイト細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712）；骨格筋において活性であるミオシン軽鎖2遺伝子制御領域（Sani, 1985, Nature 314:283-286）；及び視床下部において活性である性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域（Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378）。

【0100】

高等真核生物による転写を増加させるために、エンハンサー配列をベクターに挿入して

もよい。エンハンサーは、プロモーターに作用して転写を増加させる、通常、約10～300bp長のDNAのシス作用性エレメントである。エンハンサーは、方向及び位置に比較的依存せず、転写単位に対して5'及び3'の両方の位置に見出されている。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が知られている(例えば、グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェット-タンパク質、及びインスリン)。しかし、典型的には、ウイルス由来のエンハンサーが使用される。当該技術分野で知られているSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、ベクターにおいてコード配列の5'側又は3'側のいずれに位置してもよいが、典型的には、プロモーターからの5'側の部位に位置する。

10

【0101】

細胞外への目的のタンパク質の分泌を促進するために、適切な天然又は異種性のシグナル配列(リーダー配列又はシグナルペプチド)をコードする配列を発現ベクターに組み込むことができる。シグナルペプチド又はリーダーの選択は、目的のタンパク質を産生する宿主細胞の型に依存し、天然のシグナル配列を異種性のシグナル配列と交換することができる。哺乳類の宿主細胞で機能するシグナルペプチドの例としては、以下のものが挙げられる: 米国特許第4,965,195号明細書に記載されているインターロイキン-7についてのシグナル配列; Cosman et al., 1984, Nature 312: 768に記載されているインターロイキン-2受容体についてのシグナル配列; 欧州特許第0367566号明細書に記載されているインターロイキン-4受容体シグナルペプチド; 米国特許第4,968,607号明細書に記載されているI型インターロイキン-1受容体シグナルペプチド; 欧州特許第0460846号明細書に記載されているII型インターロイキン-1受容体シグナルペプチド。

20

【0102】

哺乳動物発現ベクターからの異種遺伝子の発現を改善することが示されている更なる制御配列には、CHO細胞(Morris et al., in Animal Cell Technology, pp. 529-534 (1997); 米国特許第6,312,951 B1号明細書、同第6,027,915号明細書、及び同第6,309,841 B1号明細書)及び3個に分割されたリーダー(TPL)に由来する発現増強配列エレメント(EASE)、並びにアデノウイルス2に由来するVA遺伝子RNA(Gingeras et al. (1982), J. Biol. Chem. 257: 13475-13491)などのエレメントが含まれる。ウイルス起源の内部リボソーム進入部位(IRES)配列により、ジストロン性mRNAを効率的に翻訳することができる(Ohand Sarnow (1993), Current Opinion in Genetics and Development 3: 295-300; Ramesh et al. (1996), Nucleic Acids Research 24: 2697-2700)。

30

【0103】

一実施形態では、本発明は、本明細書に記載のpiggyBactランスポザーゼをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。一実施形態では、ベクターは、少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの外因性核酸分子配列の挿入部位を含むpiggyBactランスポゾンを含み、更に含む。一実施形態では、複数の目的のタンパク質は、外因性核酸分子によって発現される。一実施形態では、ベクターには、目的の複数のタンパク質をコードするバイシストロン又はマルチシストロン構築物が含まれる。一実施形態では、ランスポゾンは、piggyBactランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントを含む。一実施形態では、本明細書に記載のpiggyBactランスポザーゼをコードする改変された核酸分子が提供される。一実施形態では、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、又は配列番号18の核酸配列によりコードされるpiggyBactランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号3、配列番号5、又は

40

50

配列番号7の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11、配列番号13、又は配列番号15の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9又は配列番号11の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17又は配列番号18の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号5の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号7の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号13の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号15の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号18の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

【0104】

一実施形態では、配列番号2の147位、176位、221位、247位、429位、533位、及び573位の1つ以上でのアミノ酸置換を含む、p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、並びに/又は配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも1つを含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも2つを含む。別の関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとの置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとの置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとの置換を含む。一実施形態では、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号4、配列番号6、又は配列番号8のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10又は12のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号4のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号6のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10のアミノ酸配列を有する p

10

20

30

40

50

i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

【 0 1 0 5 】

一実施形態では、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼを含む単一のベクター、及び少なくとも 1 つの目的のタンパク質をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸配列の挿入部位を含むトランスポゾンを含む細胞にトランスフェクトしてもよい。一実施形態では、本発明は、 p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも 1 つの目的のタンパク質をコードする少なくとも 1 つの核酸分子を更に含む本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸分子を提供する。一実施形態では、複数の目的のタンパク質は、外因性核酸分子によって発現される。一実施形態では、ベクターには、目的の複数のタンパク質をコードするパイシストロン又はマルチシストロン構築物が含まれる。

10

【 0 1 0 6 】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクター、及び少なくとも 1 つの目的のタンパク質をコードする 1 つ以上の外因性核酸分子の挿入部位を含む p i g g y B a c トランスポゾンを含む第 2 のベクターを提供し、その 2 つのベクターは、細胞にコトランスフェクトすることができる。関連実施形態では、トランスポゾンは、 p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントを含む。一実施形態では、複数の目的のタンパク質は、外因性核酸分子によって発現される。一実施形態では、ベクターには、目的の複数のタンパク質をコードするパイシストロン又はマルチシストロン構築物が含まれる。

20

【 0 1 0 7 】

構築後、1 つ以上のベクターを増幅及び/又はポリペプチド発現に好適な細胞に挿入してもよい。選択された細胞への発現ベクターのトランスフォーメーションは、トランスフェクション、感染、リン酸カルシウムによる共沈、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、D E A E - デキストラン媒介型遺伝子導入、カチオン性脂質媒介導入、リポソーム媒介トランスフェクション、微粒子銃、受容体 - 媒介遺伝子導入、ポリリジン、ヒストン、キトサン、及びペプチドによって媒介される導入を含む周知の方法によって行ってもよい。選択される方法は、部分的に、使用される宿主細胞の型に応じることになる。これらの方法及び他の好適な方法は、当業者に周知であり、マニュアル及びその他の技術出版物、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) に記載されている。

30

【 0 1 0 8 】

本明細書で使用する場合、用語「トランスフォーメーション」は、細胞の遺伝的特徴の変化を指し、細胞が新しい DNA 又は RNA を含有するように組換えられている場合、細胞は、トランスフォームされている。例えば、トランスフェクション、トランスダクション又は他の技法を介して新しい遺伝物質を導入することにより、細胞がその天然状態から遺伝子組換えされている場合、細胞は、トランスフォームされている。トランスフェクション又はトランスダクションに続いて、トランスフォームしている DNA は、細胞の染色体に物理的に組み込むことによって細胞の DNA と再結合することができるか、又はエピソームエレメントとして複製することなく一時的に維持されることができるか、又はプラスミドとして独立して複製することができる。トランスフォームしている DNA が細胞の分裂と共に複製する場合、細胞は、「安定してトランスフォーム」されていると見なされる。

40

50

【0109】

本明細書で使用する場合、用語「トランスフェクション」は外来性又は外因性DNAの細胞による取り込みを指す。多くのトランスフェクションの技法が当技術分野で周知であり、又本明細書で開示されている。例えば、Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (上述); Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu et al., 1981, *Gene* 13:197を参照されたい。

【0110】

本明細書で使用する場合、用語「トランスダクション」は、それによってウイルスベクターを介して外来性DNAを細胞に導入するプロセスを指す。Jones et al., (1998). *Genetics: principles and analysis*. Boston: Jones & Bartlett Publを参照されたい。

【0111】

「細胞 (Cell)」又は「細胞 (Cells)」には、任意の原核細胞又は真核細胞が含まれる。細胞は、ex vivo、in vitro、又はin vivoのいずれかで、分離しているか、又は組織若しくは臓器などの高次構造の一部として存在し得る。細胞には、「宿主細胞」が含まれ、「細胞株」とも称され、これらは、商業的又は科学的に目的のポリペプチドを発現するように遺伝子操作されている。宿主細胞は、一般的には時間が制限されずに培養で維持され得る初代培養から生じる系統に由来する。宿主細胞の遺伝子操作には、宿主細胞に所望の組換えポリペプチドを発現させるように、細胞を組換えポリヌクレオチド分子でトランスフェクト、トランスフォーム、若しくはトランスダクトすること、及び/又は別の方法で改変すること(例えば、相同組換え及び遺伝子活性化、又は組換え細胞と非組換え細胞との融合によって)を含む。目的のポリペプチドを発現するように細胞及び/又は細胞株を遺伝子操作するための方法及びベクターは当業者によく知られており、例えば、種々の技術が、*Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1990、及び四半期ごとにアップデート)中の*Current Protocols*, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989)、Kaufman, R. J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15 - 69に説明されている。

【0112】

宿主細胞は、任意の原核細胞(例えば、E. コリ (E. coli)) 又は真核細胞(例えば、酵母細胞、昆虫細胞、若しくは動物細胞(例えば、CHO細胞)) であり得る。ベクターDNAは、従来のトランスフォーメーション手法又はトランスフェクション手法によって原核細胞又は真核細胞に導入することができる。原核生物の宿主細胞としては、グラム陰性又はグラム陽性微生物などの真正細菌、例えば腸内細菌科 (Enterobacteriaceae)、例えばエシェリキア属 (Escherichia)、例えば大腸菌 (E. coli)、エンテロバクター属 (Enterobacter)、エルウィニア属 (Erwinia)、クレブシエラ属 (Klebsiella)、プロテウス属 (Proteus)、サルモネラ属 (Salmonella)、例えばサルモネラ・ティフィムリウム (Salmonella typhimurium)、セラチア属 (Serratia)、例えばセラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens) 及びシゲラ属 (Shigella) 並びにバチルス属 (Bacillus)、例えばB. ズブチリス (B. subtilis)、B. リケニフォルミス (B. licheniformis)、シュードモナス属 (Pseudomonas) 及びストレプトミセス属 (Streptomyces) が挙げられる。サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae)、即ち一般的なパン酵母は、下等真核生物宿主微

10

20

30

40

50

生物の中で最も一般的に使用される。しかしながら、ピチア属 (*Pichia*)、例えば *P. pastoris*、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クロイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)；カンジダ属 (*Candida*)；トリコデルマ・レシア (*Trichoderma reesia*)；ニューロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*)；シュヴァンニオミセス属 (*Schwanniomyces*)、例えばシュヴァンニオミセス・オシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*)；並びに糸状菌、例えばニューロスポラ属 (*Neurospora*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、トリポクラジウム属 (*Tolytocladium*) 及びアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 宿主、例えばアスペルギルス・ニドゥランス (*Aspergillus nidulans*) 及びアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などのいくつかの他の属、種及び株が一般に利用可能であり、本明細書において有用である。

【0113】

動物細胞株は、その前駆細胞が多細胞動物に由来する細胞に由来する。動物細胞株の一種は哺乳動物細胞株である。培養での増殖に適した多種多様な哺乳動物細胞株が、American Type Culture Collection (Manassas, Va.) 及び販売業者から入手可能である。業界で一般的に使用されている細胞株の例としては、SV40 (COS-7、ATCC CRL 1651) によってトランスフォームされたサル腎臓 CV1 株；ヒト胚腎臓株 (懸濁培養液中の増殖用としてサブクロニングされた 293 又は 293 細胞 (Graham et al., *J. Gen Virol.* 36: 59, 1977)；ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10)；マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251, 1980)；サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587)；ヒト頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL 34)；バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞癌細胞 (Hep G2、HB 8065)；マウス乳癌 (MMT 060562、ATCC CCL51)；TRI細胞 (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68, 1982)；MRC 5 細胞又は FS4 細胞；哺乳動物骨髄腫細胞、及び多くの他の細胞株、並びにチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞が挙げられる。CHO 細胞は、複雑な組換えタンパク質を産生するために広く使用されている。ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) - 欠失変異細胞株 (Urlaub et al. (1980), *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4216-4220)、DXB11、及び DG-44 は、効率的な DHFR の選択可能で増幅可能な遺伝子発現系により、これらの細胞での高レベルの組換えタンパク質発現が可能になるため、望ましい CHO 宿主細胞株である (Kaufman R. J. (1990), *Meth Enzymol* 185: 537-566)。また、グルタミン合成酵素 (GS) 系メチオニンスルホキシミン (MSX) 選択を利用した、グルタミン合成酵素 (GS) ノックアウト CHOK1SV 細胞株も含まれる。CHOK1 細胞 (ATCC CCL61) も含まれる。更に、これらの細胞は接着性又は懸濁培養物として操作しやすく、比較的良好な遺伝的安定性を示す。CHO 細胞及びそれらで組換え発現したタンパク質は広範に特徴付けられており、規制当局による臨床商業生産での使用が認められている。

【0114】

細胞には、また、単核細胞、末梢血単核細胞、骨髄由来単核細胞、臍帯血由来単核細胞、リンパ球、単球、樹状細胞、マクロファージ、T細胞、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、CD28⁺細胞、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、CD45RA⁺細胞、CD45RO⁺細胞、ナチュラルキラー細胞、造血幹細胞、多能性胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、又はこれらの組み合わせを含み得る。特に、細胞は、遺伝子改変及び細胞をドナー又は対象に

再導入する目的で、ドナー又は対象から収集され得る。

【0115】

一実施形態では、本明細書に記載の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼでトランスフェクトされた細胞が提供される。一実施形態では、本発明は、配列番号17又は18の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼでトランスフェクトされた細胞を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の *piggylact* トランスポザゼをコードする改変された核酸分子を含むベクターでトランスフェクトされた細胞を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の *piggylact* トランスポザゼをコードする改変された核酸分子、及び *piggylact* トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターでトランスフェクトされた細胞を提供する。別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の *piggylact* トランスポザゼをコードする改変された核酸分子を含むベクター、並びに *piggylact* トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターでトランスフェクトされた細胞を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の *piggylact* トランスポザゼをコードする改変された核酸分子、並びに *piggylact* トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターでトランスフェクトされた細胞を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の *piggylact* トランスポザゼをコードする改変された核酸分子、並びに *piggylact* トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターでトランスフェクトされた細胞を提供する。関連実施形態では、細胞は、細胞株である。関連実施形態では、細胞は、宿主細胞である。関連実施形態では、細胞は、CHO細胞である。関連実施形態では、細胞は、免疫細胞である。関連実施形態では、改変された *piggylact* トランスポザゼでトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価は、野生型 *piggylact* トランスポザゼで、又は *piggylact* トランスポザゼなしでトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善される。一実施形態では、本明細書に記載の *piggylact* トランスポザゼをコードする改変された核酸分子が提供される。一実施形態では、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、又は配列番号18の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号3、配列番号5、又は配列番号7の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11、配列番号13、又は配列番号15の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9又は配列番号11の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17又は配列番号18の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号5の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号7の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号13の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号15の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号18の核酸配列によりコードされる *piggylact* トランスポザゼを提供する。

【0116】

一実施形態では、配列番号2の147位、176位、221位、247位、429位、533位、及び573位の1つ以上でのアミノ酸置換を含む、*piggylact* トランス

ポザーゼが提供される。関連実施形態では、p i g g y B a cトランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a cトランスポザーゼは、配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a cトランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、並びに/又は配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a cトランスポザーゼは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも1つを含む。関連実施形態では、p i g g y B a cトランスポザーゼは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも2つを含む。別の関連実施形態では、p i g g y B a cトランスポザーゼは、配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとの置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとの置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとの置換を含む。一実施形態では、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号4、配列番号6、又は配列番号8のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10又は12のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号4のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号6のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号14のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号16のアミノ酸配列を有するp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。

【0117】

一実施形態では、本発明は、細胞の安定性を高めるようにp i g g y B a cトランスポザーゼをコードする核酸分子を改変することと、改変されたp i g g y B a cトランスポザーゼをコードする改変された核酸分子、並びにp i g g y B a cトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターで細胞をトランスフェクトすることと、を提供し、ここで、改変されたp i g g y B a cトランスポザーゼでトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価が、野生型p i g g y B a cトランスポザーゼで、又はp i g g y B a cトランスポザーゼなしでトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善される。一実施形態では、本明細書に記載のp i g g y B a cトランスポザーゼをコードする改変された核酸分子が提供される。一実施形態では、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、又は配列番号18の核酸配列によりコードされるp i g g y B a cトランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号3、配列番号5、又は配列番号7の核酸配列によりコードされるp i g g y B a cトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11、配列番号13、又は配列

10

20

30

40

50

番号15の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9又は配列番号11の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17又は配列番号18の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号5の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号7の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号13の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号15の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号18の核酸配列によりコードされるpiggyBactransposaseを提供する。

10

【0118】

一実施形態では、配列番号2の147位、176位、221位、247位、429位、533位、及び573位の1つ以上でのアミノ酸置換を含む、piggyBactransposaseが提供される。関連実施形態では、piggyBactransposaseは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、piggyBactransposaseは、配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、piggyBactransposaseは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンのアミノ酸置換、並びに/又は配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、piggyBactransposaseは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも1つを含む。関連実施形態では、piggyBactransposaseは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも2つを含む。別の関連実施形態では、piggyBactransposaseは、配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンの置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンの置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとの置換を含む。一実施形態では、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号4、配列番号6、又は配列番号8のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10又は12のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号4のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号6のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10のアミノ酸配列を有するpiggyBactransposaseを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12の

20

30

40

50

アミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 14 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 16 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

【0119】

一実施形態では、本発明は、細胞の安定性を高めるように p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸分子を改変することと、改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクター、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5' 及び 3' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターで細胞をコトランスフェクトすることと、を提供し、ここで、改変された p i g g y B a c トランスポザーゼでトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価が、野生型 p i g g y B a c トランスポザーゼで、又は p i g g y B a c トランスポザーゼなしでトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善される。

10

【0120】

また、適切な条件下で培養された場合、目的のタンパク質を発現する、目的のタンパク質をコードする核酸を含むベクターでトランスフェクトされた宿主細胞も提供される。発現されたタンパク質は、続いて、培養培地（宿主細胞がそれを培地中に分泌する場合）から、又は直接、それを産生する宿主細胞（それが分泌されない場合）から、回収され得る。適切な宿主細胞の選択は、所望する発現レベル、活性（グリコシル化又はリン酸化など）のために所望されるか又は必要であるポリペプチドの改変及び生物学的に活性な分子へのフォールディングの容易さなどの種々の因子によるであろう。

20

【0121】

一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクターでトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクターであって、p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5' 及び 3' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を更に含むベクターでトランスフェクトされた細胞を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクター、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5' 及び 3' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターでコトランスフェクトされた細胞によって発現される目的の組換えタンパク質を提供する。

30

【0122】

一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクターでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質を含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクターであって、p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5' 及び 3' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を更に含むベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクター、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5' 及び 3' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターでコトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質を含む医薬組成物を提供する。

40

【0123】

「培養する」又は「培養」は、多細胞生物又は組織の外部での細胞の増殖及び繁殖を意味する。哺乳動物細胞に好適な培養条件は、当該技術分野において知られている。細胞培

50

養培地及び組織培養培地は、互換的に使用され、*in vitro*での細胞培養中の宿主細胞の増殖に好適な培地を指す。典型的には、細胞培養培地は、バッファー、塩、エネルギー供給源、アミノ酸、ビタミン、及び微量主要成分を含有する。培養中の適切な宿主細胞の増殖をサポートすることができる任意の培地を使用することができる。特定の培養宿主細胞における細胞増殖、細胞生存率、及び/又は組換えタンパク質産生を最大化するために他の成分を更に補充することができる細胞培養培地は、市販されており、RPMI-1640培地、RPMI-1641培地、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、最小必須培地イーグル、F-12K培地、ハムF12培地、イスコフ改変ダルベッコ培地、マッコイ5A培地、ライボピツル-15培地、及び無血清培地、例えばEX-CELL(商標)300シリーズなどが挙げられ、とりわけ、American Type Culture Collection又はSABC Biosciences、並びに他の販売業者から入手できる。細胞培養培地は、無血清、無タンパク質、無成長因子、及び/又は無ペプトンの培地であり得る。細胞培養はまた、栄養素の添加によって強化され、通常の推奨濃度よりも高く使用される場合がある。

10

【0124】

例えば、ある段階(例えば、増殖段階又は増殖期)から別の段階(例えば、産生段階又は産生期)への移行を容易にするため、及び/又は細胞培養中の条件を最適化するために(例えば、灌流培養中に提供される濃縮培地)、培養の期間中に様々な培地配合物を使用することができる。増殖培地配合物を使用して、細胞増殖を促進し、タンパク質発現を最小限に抑えることができる。産生培地配合物を使用して、目的のタンパク質の産生及び細胞の維持を促進し、新しい細胞の増殖を最小限に抑えることができる。細胞培養の産生段階の過程で消費される、典型的には栄養素及びアミノ酸などのより濃縮された成分を含む培地であるフィード培地を使用して、活性培養、特にフェドバッチ、半灌流、又は灌流モードで操作される培養を補充及び維持することができる。このような濃縮フィード培地は、細胞培養培地の成分の大部分を、例えば、その通常の量の約5x、6x、7x、8x、9x、10x、12x、14x、16x、20x、30x、50x、100x、200x、400x、600x、800x、又は更には約1000xで含有し得る。

20

【0125】

増殖段階は、産生段階よりも高い温度で起こり得る。例えば、増殖段階は、約35 ~ 約38 の第1温度で起こり得、産生段階は、約29 ~ 約37、任意選択的には約30 ~ 約36、又は約30 ~ 約34 の第2温度で起こり得る。例えば、カフェイン、ブチレート、及びヘキサメチレンビスアセトアミド(HMBA)などのタンパク質産生の化学的誘導物質を、温度シフトと同時に、温度シフトの前及び/若しくは後に、又は温度シフトの代わりに添加することができる。誘導物質を温度シフト後に添加する場合は、温度シフト後1時間~5日まで、任意選択的には温度シフト後1日~2日まで添加することができる。

30

【0126】

宿主細胞は、懸濁液中で又は付着した形態で、固体基材に付着して、培養され得る。細胞培養は、流動床バイオリアクター、中空糸バイオリアクター、ローラーボトル、振盪フラスコ、又は攪拌タンクバイオリアクターで、マイクロキャリアの有無にかかわらず確立することができる。

40

【0127】

細胞培養は、バッチ、フェドバッチ、連続、半連続、又は灌流モードで操作することができる。CHO細胞などの哺乳類細胞は、バイオリアクターで100mL未満から1000mL未満の小規模、2,000リットルを超える容量のより中規模、及び20,000リットルを超える可能性のある大規模で培養することができる。タンパク質治療薬の臨床及び/又は商業規模のバイオマニュファクチャリングなどの中規模及び大規模の細胞培養は、細胞が所望のタンパク質を産生する間、数週間及び更には数ヶ月間維持することができる。

【0128】

50

次いで、得られた発現組換えタンパク質を細胞培養培地から回収することができる。浮遊細胞からタンパク質を収集するための方法は、当該技術分野で既知であり、酸沈殿、凝集などの加速沈降、重力を使用した分離、遠心分離、音波分離、限外濾過膜、マイクロ濾過膜、タンジェント流濾過膜、代替タンジェント流濾過膜、深層濾過膜、及び砂濾過膜 (alluvial filter) を使用した膜濾過を含む濾過が挙げられるが、これらに限定されない。原核生物によって発現される組換えタンパク質は、当該技術分野で既知のレドックスフォールディングプロセスを組み込んだプロセスによって、細胞質内の封入体から回収される。

【0129】

次いで、1つ以上の単位操作を使用して、残りの細胞培養培地、細胞抽出物、望ましくない成分、宿主細胞タンパク質、不適切に発現されたタンパク質などの任意の不純物を取り除いて、回収したタンパク質を精製、又は部分的に精製することができる。用語「単位操作」は、目的の組換えタンパク質を精製するプロセスの一部として実行される機能工程を指す。例えば、単位操作としては、目的の組換えタンパク質の捕捉、精製、ポリッシュ、ウイルス不活化、ウイルス濾過、濃縮、及び/又は配合などの工程が挙げられ得るが、これらに限定されない。単位操作は、捕捉及びウイルス不活化工程など、単一の目的又は複数の目的を達成するように設計することができる。単位操作には、処理工程間の工程の保持又は保存も含まれ得る。

10

【0130】

捕捉単位操作としては、目的の組換えタンパク質に結合する薬剤を含有する樹脂及び/又は膜を利用する捕捉クロマトグラフィー、例えば、親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)、固定化金属親和性クロマトグラフィー (IMAC) などを挙げてもよい。このような物質は、当該技術分野で既知であり、又、市販されている。例えば、親和性クロマトグラフィーは、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、プロテインL-結合など、抗体又は抗体断片結合の捕捉メカニズムを利用することができる。目的の組換えタンパク質は、ポリヒスチジンタグでタグ付けされ、その後、イミダゾール又はエピトープ (FLAG (登録商標) など) を使用してIMACから精製され、その後、そのようなエピトープに向けられた特異抗体を使用して精製することができる。

20

【0131】

ウイルス汚染物質を不活化、低減、及び/又は排除することを含む単位操作は、環境及び/又は濾過を操作するプロセスを含んでもよい。ウイルスの不活化を達成するための1つの方法は、ウイルスの不活化を達成するための、低pH (例えば、 $pH < 4$) 又は温度又は化学組成などの他の溶液条件でのインキュベーションである。低pHのウイルス不活化の後、ウイルス不活化溶液を次の単位操作の必要条件により適合したpHに再調整する中和単位操作を行うことができる。また、深層濾過などの濾過を行って、任意の生じる濁り及び沈殿物を除去することもできる。ウイルス濾過は、旭化成 (Plavona (登録商標)) 及びEDMミリポア (VPro (登録商標)) から入手可能なものなどのマイクロ濾過膜又はナノ濾過膜を使用して実施することができる。

30

【0132】

ポリッシュ単位操作では、目的のタンパク質を精製し、DNA、宿主細胞タンパク質などの汚染物質や不純物を除去；生成物固有の不純物、バリエーション生成物及び凝集体、ウイルス吸着などを除去するために、様々なクロマトグラフィー法を利用してもよい。ポリッシュクロマトグラフィー単位操作では、「フロースルーモード」(ここで、目的のタンパク質は溶離液に含まれ、汚染物質及び不純物はクロマトグラフィー媒体に結合している) 又は「結合及び溶出モード」(ここで、目的のタンパク質はクロマトグラフィー媒体に結合し、汚染物質及び不純物がクロマトグラフィー媒体を通過した後、又はクロマトグラフィー媒体から洗い流された後に溶出する) のいずれかで使用できる薬剤を含む樹脂及び/又は膜を使用する。このようなクロマトグラフィー法の例としては、いくつか例をあげると、アニオン交換クロマトグラフィー (AEX) 及びカチオン交換クロマトグラフィー (

40

50

C E X) などのイオン交換クロマトグラフィー (I E X) ; 疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) ; 混合モード又はマルチモーダルクロマトグラフィー (M M) 、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー (H A) ; 逆相クロマトグラフィー及びゲル濾過が挙げられる。

【 0 1 3 3 】

原薬のバルク貯蔵のための所望の製剤緩衝液への目的のタンパク質の生成物濃度及びバッファー交換は、限外濾過及びダイアフィルトレーションによって達成することができる。

【 0 1 3 4 】

重要な属性及び性能パラメーターを測定して、製造中の各工程の性能に関する決定をより適切に通知することができる。これらの重要な属性及びパラメーターは、リアルタイム、ほぼリアルタイム、及び / 又は事後に監視することができる。消費される培地成分 (グルコースなど) 、蓄積する代謝副産物 (ラクテートやアンモニアなど) のレベル、並びに溶存酸素含有量などの細胞の維持及び生存に関連するものなどのキーとなる重要なパラメーターが測定され得る。特定の生産性、生細胞密度、p H、浸透圧、外観、色、凝集、収率、及び力価などの重要な属性は、プロセス中及びプロセス後に監視され得る。監視及び測定は、既知の技術及び市販の機器を使用して行うことができる。

【 0 1 3 5 】

力価は、当該技術分野で既知の方法を使用して測定することができる。例えば、力価は、プロテイン A がカラム支持体に固定化されている親和性クロマトグラフィーを使用した逆相 H P L C 分析によって測定することができる。中性 p H では、抗体分子は F c 領域を介してプロテイン A に結合し、宿主細胞タンパク質、条件培地成分、及びバッファーは、フロースルーのカラムから溶出される。捕捉された抗体は酸性 p H で溶出され、280 nm での UV 吸光度によって検出される。検量線は、線形回帰分析を使用して、ユニバーサル抗体標準及び対応するピーク面積から導き出すことができる。次いで、試験サンプル中の抗体の濃度が、検量線並びにユニバーサル抗体標準及び試験された抗体からの減衰係数の比から計算される。

【 0 1 3 6 】

他の方法としては、E L I S A ; H T R F (H o m o g e n e o u s T i m e R e s o l v e d F l u o r e s c e n c e) (C i s b i o U S , B e d f o r d , M A) ; 及び the Berkley Lights Beacon platform (E m e r y v i l l e , C A) が挙げられるが、これに限定されない。

【 0 1 3 7 】

また、p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクターでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質を含む医薬組成物が提供される。このような医薬組成物は、1 つ以上の薬学的又は生理学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤と組み合わせて、目的のタンパク質又は目的のタンパク質を発現する細胞、例えば、C A R 及び T C R を発現する免疫細胞を含む。このような組成物は、中性緩衝化生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水などといった緩衝液 ; グルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン、マンニトールなどの炭水化物 ; タンパク質 ; ポリペプチド又はグリシンなどのアミノ酸 ; 抗酸化剤 ; E D T A 又はグルタチオンなどのキレート剤 ; アジュバント (例えば、水酸化アルミニウム) ; 及び保存剤を含み得る。

【 0 1 3 8 】

医薬組成物 (溶液、懸濁液など) は、注射用水、生理食塩水溶液、好ましくは生理学的生理食塩水、リンゲル溶液、等張塩化ナトリウムなどの無菌希釈剤、溶媒又は懸濁媒としての役割を果たし得る合成モノグリセリド又はジグリセリドなどの固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の溶媒 ; ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤 ; アスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤 ; エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤 ; 酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝液及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの浸透圧を調整するための剤の 1 つ以上を

10

20

30

40

50

含み得る。非経口製剤は、ガラス又はプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器又は複数回投与バイアルに封入することができる。

【0139】

一実施形態では、本発明は、宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価を改善するための方法であって、宿主細胞の安定性を高めるように *piggypact* トランスポザーゼをコードする核酸分子を改変することと；*piggypact* トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子、並びに *piggypact* トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含むベクターで宿主細胞をコトランスフェクトすることと；細胞を培養して目的の組換えタンパク質を発現させることと、を含み、改変された *piggypact* トランスポザーゼでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価が、野生型 *piggypact* トランスポザーゼで、又は *piggypact* トランスポザーゼなしでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善される、方法を提供する。関連実施形態では、宿主細胞は、*piggypact* トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含む第1のベクター、並びに *piggypact* トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む第2のベクターでトランスフェクトされる。関連実施形態では、宿主細胞は、*piggypact* トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子、並びに *piggypact* トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む単一のベクターでトランスフェクトされる。一実施形態では、本明細書に記載の *piggypact* トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子が提供される。一実施形態では、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、又は配列番号18の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号3、配列番号5、又は配列番号7の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11、配列番号13、又は配列番号15の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9又は配列番号11の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17又は配列番号18の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号5の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号7の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号13の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号15の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号18の核酸配列によりコードされる *piggypact* トランスポザーゼを提供する。

【0140】

一実施形態では、配列番号2の147位、176位、221位、247位、429位、533位、及び573位の1つ以上でのアミノ酸置換を含む、*piggypact* トランスポザーゼが提供される。関連実施形態では、*piggypact* トランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、*piggypact* トランスポザーゼは、配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニン

とのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、並びにノ又は配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも1つを含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも2つを含む。別の関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとの置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとの置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとの置換を含む。一実施形態では、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号4、配列番号6、又は配列番号8のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10又は12のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号4のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号6のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号14のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号16のアミノ酸配列を有するp i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

【0141】

一実施形態では、本発明は、組換えタンパク質を発現する哺乳動物細胞培養において組換えタンパク質産生を増加させるための方法であって、宿主細胞の安定性を高めるように改変された核酸分子、及びp i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸分子を含むベクターでコトランスフェクトされている宿主細胞を使用して、バイオリアクターで細胞培養を確立することと；目的の組換えタンパク質を発現することと、を含み、改変されたp i g g y B a c トランスポザーゼでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価が、野生型p i g g y B a c トランスポザーゼで、又はp i g g y B a c トランスポザーゼなしでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善される、方法を提供する。関連実施形態では、宿主細胞は、p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含む第1のベクター、並びにp i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む第2のベクターでトランスフェクトされる。関連実施形態では、宿主細胞は、p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子、並びにp i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む単一のベクターでトランスフェクトされる。一実施形態では、本明細書に記載のp i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子が提供される。一実施形態では、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番

号 15、配列番号 17、又は配列番号 18 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号 3、配列番号 5、又は配列番号 7 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 11、配列番号 13、又は配列番号 15 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 9 又は配列番号 11 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 17 又は配列番号 18 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 3 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 5 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 7 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 9 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 11 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 13 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 15 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 17 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 18 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

10

20

【 0 1 4 2 】

一実施形態では、配列番号 2 の 1 4 7 位、1 7 6 位、2 2 1 位、2 4 7 位、4 2 9 位、5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのアミノ酸置換を含む、p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位、1 7 6 位、2 2 1 位、及び 2 4 7 位の 1 つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 4 2 9 位、5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位、1 7 6 位、2 2 1 位、及び 2 4 7 位の 1 つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、並びに / 又は配列番号 2 の 4 2 9 位、5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも 1 つを含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも 2 つを含む。別の関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。一実施形態では、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、又は配列番号 16 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号 4、配列番号 6、又は配列番号 8 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 12、配列番号 14、又は配列番号 16 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 10 又は 12 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トラ

30

40

50

ンスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 14 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 16 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

【 0 1 4 3 】

一実施形態では、本発明は、単離され、精製された目的の組換えタンパク質を生成するための方法であって、目的の組換えタンパク質を発現する宿主細胞を用いてバイオリアクターで細胞培養を確立することであって、細胞株は、宿主細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含むベクターでコトランスフェクトされている、ことと、細胞を培養して目的の組換えタンパク質を発現させることと、目的の組換えタンパク質を収集することと、目的の組換えタンパク質を 1 つ以上の単位操作により処理することと、単離され、精製された目的の組換えタンパク質を得ることと、を含む、方法を提供する。関連実施形態では、宿主細胞は、 p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含む第 1 のベクター、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む第 2 のベクターでトランスフェクトされる。関連実施形態では、宿主細胞は、 p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも 5 ' 及び 3 ' の逆位反復エレメントに隣接する目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む単一のベクターでトランスフェクトされる。関連実施形態では、少なくとも 1 つの単位操作は、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、マルチモーダルクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、及びヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーから選択される捕捉クロマトグラフィー工程である。別の実施形態では、少なくとも 1 つの単位操作は、イオン交換クロマトグラフィー、アニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー、マルチモーダルクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、及びヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーから選択されるポリッシュクロマトグラフィー工程である。別の実施形態では、少なくとも 1 つの単位操作は、ウイルス不活性化、ウイルス濾過、深層濾過、及び U F / D F から選択される。関連実施形態では、改変された p i g g y B a c トランスポザーゼでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価は、野生型 p i g g y B a c トランスポザーゼで、又は p i g g y B a c トランスポザーゼなしでトランスフェクトされた宿主細胞によって発現される目的の組換えタンパク質の力価と比較して改善される。別の実施形態では、方法により生成される単離され、精製された目的の組換えタンパク質が提供される。別の実施形態では、目的の単離されたタンパク質を含む医薬組成物が提供される。一実施形態では、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子が提供される。一実施形態では、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、又は配列番号 18 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号 3、配列番号 5、又は配列番号 7 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 11、配列番号 13、又は配列番号 15 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 9 又は配列番号 11 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 17 又は配列番号 18 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本

10

20

30

40

50

発明は、配列番号 3 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 5 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 7 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 9 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 1 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 3 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 5 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 7 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 8 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

10

【 0 1 4 4 】

一実施形態では、配列番号 2 の 1 4 7 位、1 7 6 位、2 2 1 位、2 4 7 位、4 2 9 位、5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのアミノ酸置換を含む、p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位、1 7 6 位、2 2 1 位、及び 2 4 7 位の 1 つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 4 2 9 位、5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位、1 7 6 位、2 2 1 位、及び 2 4 7 位の 1 つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、並びに / 又は配列番号 2 の 4 2 9 位、5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも 1 つを含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも 2 つを含む。別の関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとの置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとの置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとの置換を含む。一実施形態では、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、又は配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号 4、配列番号 6、又は配列番号 8 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 2、配列番号 1 4、又は配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 0 又は 1 2 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

20

30

40

【 0 1 4 5 】

50

一実施形態では、本発明は、宿主細胞の安定性を高めるように改変された p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする核酸配列を含むベクター；並びに目的のタンパク質をコードする核酸配列が挿入される p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも最小の逆位反復エレメントを含むベクターを含む細胞をトランスフェクトするためのキットを提供する。一実施形態では、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子が提供される。一実施形態では、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、又は配列番号 18 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号 3、配列番号 5、又は配列番号 7 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 11、配列番号 13、又は配列番号 15 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 9 又は配列番号 11 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 17 又は配列番号 18 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 3 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 5 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 7 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 9 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 11 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 13 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 15 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 17 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 18 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

【 0 1 4 6 】

一実施形態では、配列番号 2 の 1 4 7 位、1 7 6 位、2 2 1 位、2 4 7 位、4 2 9 位、5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのアミノ酸置換を含む、p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位、1 7 6 位、2 2 1 位、及び 2 4 7 位の 1 つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 4 2 9 位、5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位、1 7 6 位、2 2 1 位、及び 2 4 7 位の 1 つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、並びに / 又は配列番号 2 の 4 2 9 位、5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも 1 つを含む。関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも 2 つを含む。別の関連実施形態では、p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとの置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとの置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとの置換を含む。一実施形態では、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、又は配列番号 16 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。別の態様では

10

20

30

40

50

、本発明は、配列番号 4、配列番号 6、又は配列番号 8 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 2、配列番号 1 4、又は配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 0 又は 1 2 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

10

【0147】

本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼは遺伝子導入；細胞株生成；細胞の遺伝子改変、ゲノム改変の生成など、遺伝子工学に関連する用途；生殖細胞系列又は体細胞変異誘発での使用；遺伝子導入を媒介する際の使用；遺伝子の特徴評価；遺伝子機能の決定；癌遺伝子スクリーニング；遺伝子治療；多能性幹細胞の生成；及び非ヒトトランスジェニック動物のための p i g g y B a c トランスポゾン系の一部として使用することができる（例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 2 0 9 4 2 6 号明細書；同第 2 0 1 0 / 0 3 1 1 1 1 6 号明細書；Vanden Driessche et al., Blood 114 (8): 1461 - 1468, 2009; Yusa K, et al., Nat. Methods. 6 (5): 363 - 369, 2009; Wilson et al., Mol. Ther. 15 (1): 139 - 145, 2007; Landrette et al., PLoS ONE 6 (10): 1 - 12, 2011; Nakanishi et al., Molecular Therapy 18 (4): 707 - 714, 2010; Zhao et al., Transl Lung Cancer Res., 5 (1): 120 - 125, 2016; Wilson et al., Molecular Therapy 15 (1): 139 - 145, 2007を参照されたい)。

20

30

【0148】

本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼは、ゲノム編集に使用することができる。本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼは、一次細胞型又は幹細胞への挿入のための効率的な非ウイルス性導入を提供するという点で有益である p i g g y B a c トランスポゾン/トランスポザーゼ系の一部として使用することができる。本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼを使用して、キメラ抗原受容体 (CAR)、T細胞受容体 (TCR) の鎖及び鎖をコードする遺伝子、並びにサイトカイン、チェックポイント阻害剤、及びその他のタンパク質などのタンパク質をコードする他の遺伝子の非ウイルス性導入を可能にして細胞を改変することができる。複数の遺伝子は、単一の遺伝子構築物で導入することができる。ウイルストランスダクションに優る利点は、より大きな遺伝子カーゴに対応できることであり、トランスポザーゼは非ウイルストランスフェクションの挿入効率を高める。また、このような系と、その他の非ウイルスゲノム編集技術、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、クラスター化された規則的に間隔が空いた短い回文構造の繰り返し (clustered regularly interspaced short palindromic repeats -) (CRISPR -) 関連タンパク質 9 (Cas9)、PhiC3 フェーズインテグラーゼなどのインテグラーゼ、転写活性化様エフェクター (TALES)、配列特異的リコンビナーゼ、及び眠れる森の美女 (Sleeping Beauty) などのその他のトランスポゾン/トランスポザーゼ系との組み合わせを使用して、多種多様な細胞のトランスダクションを可能にすることができる (米

40

50

国特許出願公開第2015/0031132号明細書；国際公開第2018/098671号パンフレット；Ivics et al., Cell 91(4):501-510, 1997；Boch et al., Science 326(5959):1509-1512, 2009；Christian et al. Genetics 186(2):757-761, 2010；Wilber et al., Stem Cells Int；Vol:2011:Article number 717069, 2011；Yusa et al., Nature 478, 20 October, 391-396, 2011；Silva et al., Curr Gene Ther 11(1):11-27, 2011；Cong et al., Science 339(6121):819-823, 2013；Mali et al., Science 339(6121):823-826, 2013. Li et al., Molecular Therapy: Nucleic Acids Vol. 8 September, 64-76, 2017；及び Ishida et al., www.nature/Scientific Reports 8, Article Number 310, 2018)。

【0149】

本明細書に記載の piggyBac 転スポザーゼを、piggyBac 転スポゾン系の一部として使用して、CAR、TCR、及び/又はその他のタンパク質をコードする遺伝子構築物で、安定的且つ非ウイルス的に細胞をトランスフェクトすることができる。自然T細胞は、(i)患者(対象)又はドナーから取り出され、(ii)本明細書に記載の piggyBac 転スポザーゼを含む piggyBac 転スポゾン/転スポザーゼ系を使用して遺伝子操作して、1つ以上のキメラ抗原受容体、T細胞受容体、及び/又は目的の少なくとも1つの抗原に結合する他のタンパク質を発現させ、(iii)細胞培養によって改変されたT細胞のより大きな集団に拡大され、(iv)患者に再導入されることができる。改変T細胞が患者に再導入された後、これらは、抗原を発現している細胞に対する免疫応答を媒介する。例えば、米国特許第7,741,465号明細書及び同第6,319,494号明細書；米国特許出願公開第2017/0355957号明細書；Nakazawa et al., J. Immunotherapy 32(8):826-836; 2009；Nakazawa et al., Molecular Therapy 19(12):2133-2143, 2011；Eshhar et al. Cancer Immunol Immunotherapy (1997) 45:131-136；Finney et al., Journal of Immunology, 161:2791-2797, 1998；Krause et al., J. Exp. Med., 188(4):619-626, 1998を参照されたい；この免疫応答としては、T細胞によるIL-2及び他のサイトカインの分泌、抗原を認識するT細胞のクローン増殖及びT細胞が媒介する特異的な標的陽性細胞の殺傷が挙げられる。Hombach et al., Journal of Immun., 167:6123-6131(2001)を参照されたい。

【0150】

免疫細胞は対象から得てもよい。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、T細胞を含む。T細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来組織、腹水、胸水、脾臓組織及び腫瘍を含む多くの供給源から入手することができる。特定の実施形態では、T細胞は、FICOLL(商標)分離などの当業者に既知の任意の数の技法を用いて、対象から採取した血液の単位から入手することができる。細胞は、好ましくは、アフエレーシスによって個人の循環血液から入手され得る。アフエレーシス産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球及び血小板を含有する。特定の実施形態では、アフエレーシスによって採取された細胞は、洗浄して血漿分画を取り除き、その後の処理のために適当な緩衝液又は培地に入れられ得る。細胞は、PBSで洗浄され得る。理解されるように、半自動化フロースルー遠心機、例えばCobe(商標)2991細胞処理機、Baxter Cytomate(商標)などを使用することなどによって洗浄工程が用いられ得る。洗浄後、細胞

10

20

30

40

50

は、様々な生体適合性緩衝液又は緩衝液を含むか若しくは含まない他の生理食塩水溶液に再懸濁され得る。特定の実施形態では、アフエーシス試料の望ましくない成分を取り除き得る。

【0151】

特定の実施形態では、T細胞は、赤血球を溶解し、例えばPERCOLL（商標）勾配を介した遠心分離を用いて単球を枯渇させることによってPBMCから単離される。CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺及びCD45RO⁺T細胞などのT細胞の特定の亜集団を、当技術分野で既知の正又は負の選択技法によって更に単離することができる。例えば、負の選択によるT細胞集団の富化は、負に選択される細胞に固有の表面マーカーに向けられた抗体の組み合わせによって達成することができる。本明細書で使用するための1つの方法は、負に選択される細胞上に存在する細胞表面マーカーに向けられたモノクローナル抗体のカクテルを使用する負の磁気免疫付着又はフローサイトメトリーによる細胞の選別及び/又は選択である。例えば、負の選択によってCD4⁺細胞を富化するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的にはCD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、及びCD8に対する抗体を含む。フローサイトメトリー及び細胞選別は、本発明で使用するための目的の細胞集団を単離するためにも使用され得る。

10

【0152】

PBMCは、本明細書に記載される方法を用いた遺伝子構築物（CAR又はTCRなど）による遺伝子組換えに直接使用され得る。特定の実施形態では、PBMCを単離した後、Tリンパ球を更に単離することができ、細胞傷害性Tリンパ球及びヘルパーTリンパ球の両方を遺伝子組換え及び/又は増殖前又は後のいずれかでナイーブ、メモリー及びエフェクターのT細胞亜集団に選別することができる。

20

【0153】

いくつかの実施形態では、CD8⁺細胞のナイーブ、セントラルメモリー及びエフェクターの型のそれぞれに関連する細胞表面抗原を特定することにより、CD8⁺細胞は、これらの細胞に更に選別される。いくつかの実施形態では、セントラルメモリーT細胞の表現型マーカーの発現は、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3及びCD127を含み、グランザイムBに対して陰性である。いくつかの実施形態では、セントラルメモリーT細胞は、CD45RO⁺、CD62L⁺、CD8⁺T細胞である。いくつかの実施形態では、エフェクターT細胞は、CD62L、CCR7、CD28及びCD127に対して陰性であり、グランザイムB及びパーフォリンに対して陽性である。特定の実施形態では、CD4⁺T細胞は、亜集団に更に選別される。例えば、CD4⁺Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を特定することにより、ナイーブ、セントラルメモリー及びエフェクター細胞に選別することができる。

30

【0154】

T細胞などの免疫細胞は、1つ以上のCARをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む1つ以上のベクター及びpiggyBactransposon/トランスポザゼ系の一部として本明細書に記載のpiggyBactransposon/トランスポザゼを使用して単離後に遺伝子改変することができる。非ウイルス性の遺伝子改変細胞は、本明細書に記載のpiggyBactransposon/トランスポザゼをコードする改変された核酸分子、並びにpiggyBactransposonの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つのCAR、TCR、及び/又はその他の目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクターで細胞をトランスフェクトすることにより得ることができる。遺伝子改変免疫細胞は、また、本明細書に記載のpiggyBactransposon/トランスポザゼをコードする改変された核酸分子を含む第1のベクター、並びにpiggyBactransposonの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つのCAR、TCR、及び/又はその他の目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含む第2のベクターで免疫細胞をコトランスフェクトすることにより得ることができる。任意の好適な当該技術分野において既知の方法を使用して、例えば、エレクトロポレーション又はヌクレオフェクションなどにより、ベクターを宿主細胞に導入することができる。更

40

50

なる実施形態では、免疫エフェクター細胞のドナー集団を遺伝子改変するのに様々な発現ベクターの混合物を使用することができ、ここで、各ベクターは、異なるCAR、TCR、又はその他の目的のタンパク質をコードする。得られるトランスフォームされた免疫エフェクター細胞は、改変細胞の混合集団を形成し、改変細胞の一部は、2つ以上の異なるCAR、TCR、及び/又はその他の目的のタンパク質を発現する。

【0155】

また、有害事象を最小限に抑えるために、アポトーシスの活性化に有利に働く、又は細胞増殖を阻害する機能的活性毒性生成物をもたらす酵素についてコードすることにより、プロドラッグ投与時に改変細胞の選択的排除を可能にする自殺遺伝子も含まれる。誘導性「オン」又は「アクセルレータ」スイッチが含まれもよい。好適な技術には、細胞がCAR又はTCR構築物でトランスフェクトされる前、後、又は同時に、誘導性カスパーゼ-9（米国特許出願公開第2011/0286980号明細書）又はチミジンキナーゼの使用が含まれる。自殺遺伝子及び/又は「オン」スイッチを導入する追加の方法としては、TALENS、ジンクフィンガー、RNAi、siRNA、shRNA、アンチセンス技法、及び当該技術分野で既知の他の技法が挙げられる。

10

【0156】

免疫細胞は、遺伝子改変される前に、*in vitro*で活性化及び拡大（又は前駆細胞の場合は分化）され得る。T細胞を活性化及び増殖させる方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、米国特許第6,905,874号明細書、同第6,867,041号明細書、同第6,797,514号明細書、及び国際公開第2012/079000号パンフレットに記載されている。一般に、こうした方法としては、IL-2などの適切なサイトカインを含む培養培地中において、PBM C又は単離されたT細胞と、ビーズ又は他の表面に概ね付着させた抗CD3及び抗CD28抗体などの刺激剤及び共刺激剤とを接触させることが挙げられる。同じビーズに付着させた抗CD3及び抗CD28抗体は、「代理」抗原提示細胞（APC）としての役割を果たす。1つの例は、ヒトT細胞の生理学的活性化に対するCD3/CD28活性化剤/刺激剤システムであるDyna beads（登録商標）システムである。

20

【0157】

他の実施形態では、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,040,177号明細書及び同第5,827,642号明細書並びに国際公開第2012129514号パンフレットに記載されるものなどの方法を使用し、フィーダー細胞並びに適切な抗体及びサイトカインによってT細胞は、活性化及び刺激されて増殖し得る。

30

【0158】

PBM Cは、NK細胞、NKT細胞、又は造血幹細胞などの他の細胞傷害性リンパ球を更に含むことができる。本明細書で開示されるキメラ受容体のコード配列を運ぶ発現ベクターをヒトドナーのT細胞、NK細胞又はNKT細胞、単核細胞、又は造血幹細胞の集団に導入することができる。

【0159】

CAR又はTCRを発現する細胞を、ヒト対象において使用するために保存及び/又は調製するために凍結保存するために、標準の手順が用いられる。これは、解凍時に細胞が生存可能なままであるように免疫細胞を凍結保存することを伴う。CARを発現する免疫細胞の画分を、当該技術分野で既知の方法によって凍結保存し、悪性腫瘍を患う患者の将来の治療のための、こうした細胞の永続的な供給源を提供することができる。必要に応じて、凍結保存したトランスフォームされた免疫細胞を解凍し、成長させ、更に多くのこうした細胞に増殖させることができる。

40

【0160】

本明細書で使用する場合、「凍結保存する」とは、（典型的には）77ケルビン又は-196などの氷点下温度に冷却することによる細胞の保存を指す。氷点下温度では、低温での凍結又は室温への加温による損傷から保存された細胞を保護するために凍結保護剤を用いることが多い。凍結保護剤及び最適な冷却速度により、細胞損傷に対する保護が可

50

能であり、当該技術分野において既知である。凍結保護剤としては、ジメチルスルホキシド(DMSO)(Lovell & Bishop, Nature, (1959); 183:1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, (1961); 190:1204-1205)、グリセロール、ポリビニルピロリジン(Rinfret, Ann. N. Y. Acad. Sci. (1960); 85:576)及びポリエチレングリコール(Sloviter & Ravdin, Nature, (1962); 196:48)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0161】

次いで、細胞は、対象への再導入のために配合される。細胞は、最初にこれらの培養培地からこれらを採用し、続いて洗浄し、治療有効量での投与に好適な培地及び容器システム(「薬学的に許容可能な」キャリア)中で細胞を濃縮することによって配合される。好適な注入媒体は、任意の等張媒体配合物、典型的には生理食塩水、Normosol(商標)R(Abbott)又はPlasma-Lyte(商標)A(Baxter)であり得るが、5%デキストロス水溶液又は乳酸リンゲル液を利用することもできる。注入媒体にヒト血清アルブミンを補充し得る。

10

【0162】

組成物における細胞の所望の治療量は、一般的には少なくとも2個の細胞(例えば、少なくとも1個のCD8⁺セントラルメモリーT細胞及び少なくとも1個のCD4⁺ヘルパーT細胞のサブセット)であるか、又はより典型的には10²個超の細胞及び最大10⁶個、最大10⁸若しくは10⁹個までの細胞であり、また10¹⁰個超の細胞であり得る。細胞の数は、組成物が意図される所望の用途及びそれに含まれる細胞の種類に依存する。細胞は、治療を受ける患者に対して自己、同種異系又は異種であり得る。

20

【0163】

CAR、TCR及び/又はその他の目的のタンパク質の発現細胞集団は、単独で投与され得るか、又は希釈剤及び/又はIL-2、若しくは他のサイトカイン、若しくは細胞集団などの他の成分と組み合わせた医薬組成物として投与され得る。

【0164】

病態、疾患、又は障害を治療するために改変された細胞を使用するための方法が提供される。このような病態、疾患、又は障害には、癌、腫瘍、固形腫瘍、血液学的疾患、白血病、リンパ腫、ウイルス感染、炎症性疾患若しくは障害、及び/又は自己免疫疾患若しくは障害が含まれる。いくつかの実施形態では、本発明は、本出願の有効量の改変免疫細胞を対象に投与することを含む、対象中でT細胞が媒介する免疫応答を生成することに関する。いくつかの実施形態では、T細胞が媒介する免疫応答は、1個又は複数の標的細胞に向けられる。いくつかの実施形態では、改変された免疫細胞は、1つ以上のキメラ抗原受容体(CAR)、T細胞受容体(TCR)、及び/又はその他の目的のタンパク質を発現する遺伝子構築物を含む。いくつかの実施形態では、標的細胞は、腫瘍細胞である。いくつかの態様では、本発明は、悪性腫瘍を治療又は予防する方法を含み、上記方法は、それを必要とする対象に、本明細書で説明される有効量の少なくとも1つの単離抗原結合分子を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本発明は、悪性腫瘍を治療又は予防するための方法を含み、上記方法は、それを必要とする対象に、有効量の少なくとも1つの免疫細胞を投与することを含む、ここで、免疫細胞は、本明細書に記載される少なくとも1つのキメラ抗原受容体、T細胞受容体及び/又は単離抗原結合分子をコードする遺伝子構築物を含む。いくつかの態様では、本発明は、炎症及び/又は自己免疫障害を治療又は予防するための方法を含む。本発明はまた、移植された組織/臓器上のミスマッチなHLA分子に対するそのような細胞療法などの移植手順を支持する方法を提供する。いくつかの実施形態では、標的細胞は、膵島である。

30

40

【0165】

一実施形態では、本発明は、非ウイルス性の遺伝子改変細胞を生成する方法であって、(a) piggy Bactransposonの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含

50

むベクターを確立することと、(b)ドナー又は対象から自然免疫細胞を単離することと、(b) piggyBacトランスポザーゼをコードする改変された核酸分子で、及び piggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクターで細胞をコトランスフェクトすることと、(c)細胞培養によって細胞を非ウイルス性の遺伝子改変細胞のより大きな集団に拡大することと、を含む方法を提供する。一実施形態では、細胞は、piggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクター、並びに細胞の安定性を高めるように改変された piggyBacトランスポザーゼをコードする核酸配列を含むベクターでトランスフェクトされる。一実施形態では、本明細書に記載の piggyBacトランスポザーゼをコードする改変された核酸分子が提供される。一実施形態では、細胞は、piggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクター、並びに細胞の安定性を高めるように改変された piggyBacトランスポザーゼをコードする核酸配列でトランスフェクトされる。一実施形態では、本明細書に記載の piggyBacトランスポザーゼをコードする改変された核酸分子が提供される。一実施形態では、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、又は配列番号18の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号3、配列番号5、又は配列番号7の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11、配列番号13、又は配列番号15の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9又は配列番号11の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17又は配列番号18の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号5の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号7の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号13の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号15の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号18の核酸配列によりコードされる piggyBacトランスポザーゼを提供する。

【0166】

一実施形態では、配列番号2の147位、176位、221位、247位、429位、533位、及び573位の1つ以上でのアミノ酸置換を含む、piggyBacトランスポザーゼが提供される。関連実施形態では、piggyBacトランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、piggyBacトランスポザーゼは、配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、piggyBacトランスポザーゼは、配列番号2の147位、176位、221位、及び247位の1つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、並びに/又は配列番号2の429位、533位、及び573位の1つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、piggyBacトランスポザーゼは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイ

10

20

30

40

50

シンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも1つを含む。関連実施形態では、piggy Bactransポザーゼは、以下の配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも2つを含む。別の関連実施形態では、piggy Bactransポザーゼは、配列番号2の147位でのイソロイシンのロイシンとの置換、配列番号2の247位でのイソロイシンのロイシンとの置換、及び配列番号2の533位でのセリンのトレオニンとの置換を含む。一実施形態では、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号4、配列番号6、又は配列番号8のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12、配列番号14、又は配列番号16のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10又は12のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号4のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号6のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号10のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号12のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号14のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号16のアミノ酸配列を有するpiggy Bactransポザーゼを提供する。

【0167】

一実施形態では、本明細書は、非ウイルス性の遺伝子改変細胞を対象を治療する方法であって、(a)細胞の安定性を高めるようにpiggy Bactransポザーゼをコードする核酸分子を改変してベクターに挿入することと、(b)対象又はドナーから自然免疫細胞を単離することと、(c) piggy Bactransポザーゼをコードする改変された核酸分子で、及びpiggy Bactransポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクターで細胞をコトランスフェクトすることと、(d)細胞培養によって細胞を遺伝子改変細胞のより大きな集団に拡大することと、(e)細胞培養物からトランスフェクトされた細胞を単離し、遺伝子改変細胞を含む細胞集団を得ることと、(f)非ウイルス性の遺伝子改変細胞を対象に再導入することと、を含む方法を提供する。一実施形態では、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、又は配列番号18の核酸配列によりコードされるpiggy Bactransポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号3、配列番号5、又は配列番号7の核酸配列によりコードされるpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号11、配列番号13、又は配列番号15の核酸配列によりコードされるpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9又は配列番号11の核酸配列によりコードされるpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号17又は配列番号18の核酸配列によりコードされるpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号3の核酸配列によりコードされるpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号5の核酸配列によりコードされるpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号7の核酸配列によりコードされるpiggy Bactransポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号9の核酸配列によりコードされるpiggy Bactransポザーゼを提供する。

ｃトランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 11 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 13 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 15 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 17 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 18 の核酸配列によりコードされる p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

【 0 1 6 8 】

一実施形態では、配列番号 2 の 1 4 7 位、 1 7 6 位、 2 2 1 位、 2 4 7 位、 4 2 9 位、 5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのアミノ酸置換を含む、 p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。関連実施形態では、 p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位、 1 7 6 位、 2 2 1 位、及び 2 4 7 位の 1 つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、 p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 4 2 9 位、 5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、 p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位、 1 7 6 位、 2 2 1 位、及び 2 4 7 位の 1 つ以上でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、並びに / 又は配列番号 2 の 4 2 9 位、 5 3 3 位、及び 5 7 3 位の 1 つ以上でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換を含む。関連実施形態では、 p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも 1 つを含む。関連実施形態では、 p i g g y B a c トランスポザーゼは、以下の配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとのアミノ酸置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとのアミノ酸置換のうち少なくとも 2 つを含む。別の関連実施形態では、 p i g g y B a c トランスポザーゼは、配列番号 2 の 1 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとの置換、配列番号 2 の 2 4 7 位でのイソロイシンのロイシンとの置換、及び配列番号 2 の 5 3 3 位でのセリンのトレオニンとの置換を含む。一実施形態では、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、又は配列番号 16 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼが提供される。別の態様では、本発明は、配列番号 4、配列番号 6、又は配列番号 8 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 12、配列番号 14、又は配列番号 16 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 10 又は 12 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 14 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号 16 のアミノ酸配列を有する p i g g y B a c トランスポザーゼを提供する。

【 0 1 6 9 】

関連実施形態では、自然免疫細胞は、単核細胞である。関連実施形態では、自然免疫細胞は、 T 細胞である。別の実施形態では、目的のタンパク質は、抗原受容体、 T 細胞受容体、又はキメラ抗原受容体である。別の実施形態では、細胞はまた、自殺遺伝子、誘導性オン若しくはアクセルレータスイッチ、又はその両方をコードする核酸分子でトランスフ

10

20

30

40

50

エクトされる。一実施形態では、本明細書に記載の p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子が提供される。

【0170】

一実施形態では、自然免疫細胞は、p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子を含むベクター、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクターでトランスフェクトされる。

【0171】

一実施形態では、自然免疫細胞は、p i g g y B a c トランスポザーゼをコードする改変された核酸分子、並びに p i g g y B a c トランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントに隣接する少なくとも1つの目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を含む単一のベクターでトランスフェクトされる。

【0172】

一実施形態では、ベクターには、複数の目的のタンパク質をコードするバイシストロン又はマルチシストロン構築物が含まれる。

【0173】

本発明は、また、本明細書に記載の方法に従って作成された非ウイルス性の遺伝子改変細胞、細胞集団、又は細胞培養物を提供する。また、本明細書に記載の方法に従って作成された遺伝子改変細胞又は細胞集団を含む製剤が提供される。

【0174】

また、それを必要とするドナー又は対象の疾患又は障害を治療又は予防する方法であって、ドナー又は対象に、本明細書に記載の方法により作成された遺伝子改変細胞又は細胞集団の有効量を投与することを含む、方法が提供される。別の実施形態では、明細書に記載の方法に従って作成された単離され、精製された目的のタンパク質を含む医薬組成物が提供される。

【0175】

本出願で使用される用語は当該技術分野では標準的であるが、特定の用語の定義は、特許請求の範囲の意味の明確さ及び明確さを保証するために本明細書で提供される。単位、接頭辞、及び記号は、S Iで受け入れられる形式で示される場合がある。本明細書に記載の数値範囲は、範囲を定義する数を含み、定義された範囲内の各整数を含み、それを支持する。別段の記載がない限り、本明細書に記載の方法及び手法は、一般に、当技術分野においてよく知られる通常の方法に従って実施され、こうした方法及び手法は、本明細書を通して引用及び議論される様々な一般の参考文献及び特定性の高い参考文献に記載されるものである。例えば、Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) 及び Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992)、及び Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) を参照されたい。特許、特許出願、論文、書籍及び学術論文が挙げられるが、これらに限定されない、本出願で引用される全ての文献又は文献の一部は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。本発明の一態様又は実施形態に記載されているものは、本発明の他の態様及び/又は実施形態と組み合わせることができる。

【0176】

本発明は、本発明の個々の態様の単一の例示として意図される本明細書に記載の特定の実施形態によって範囲が限定されるべきではなく、機能的に同等の方法及び構成要素が本発明の範囲内にある。実際に、本明細書に示されているもの及び記載されているものに加え、本発明の様々な変更が、前出の説明並びに添付図面から当業者には明らかとなる。

このような変更は添付する特許請求の範囲内にあることを意図している。

【実施例】

【0177】

実施例1 変異の同定及び試験

*piggyBac*トランスポザゼ及びその他の関連トランスポザゼの構造は、まだ知られていない。野生型イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) *piggyBac*トランスポザゼ (配列番号2) の二次構造モチーフを、DSCと呼ばれる *in silico*法を使用して予測した (King, RD et al., *Protein Sci.* 5 (11): 2298 - 2310, 1996)。図1を参照されたい。*piggyBac*トランスポザゼは主にヘリックスタンパク質であることが見出された。トランスポザゼの全体的な安定性を改善し、トランスポザゼの発現にプラスの影響を与える可能性のあるヘリックスを安定化させる可能性のある変異を考案した。I147、I176、I221、I247を、*piggyBac*トランスポザゼのヘリックスの安定性を改善するために変異する可能性のある残基として特定した。

10

【0178】

トランスポザゼ配列の推定上のN-結合型グリコシル化部位 (すなわち、NXS/Tモチーフ) を特定した。一般に、NXTモチーフはNXSモチーフと比較してより完全なグリコシル化を受けるため、NXSモチーフからNXTモチーフへの変異は、*piggyBac*の全体的なグリコシル化を改善する可能性があり、これにより、トランスポザゼの安定性が改善される可能性があるとして仮定した。以下のN427ES、N531IS、及びN571ASのN-結合型グリコシル化部位におけるSerからThrへの変異が考案された。N531IS部位は疎水性ストレッチで存在するため、グリコシル化が改善されると最大の安定性が向上する可能性がある。*piggyBac*トランスポザゼがグリコシル化されているかどうか、又はそれが活性化に必要なかどうかは現時点では不明である。

20

【0179】

野生型 *piggyBac*トランスポザゼをコードする核酸配列及び単一、二重、又は三重の変異をコードする核酸配列を有する7つのトランスポザゼを含む合計8つのプラスミドを生成した (表3を参照)。クローン化されたトランスポザゼプラスミドは、変異した配列を除いて同じDNAコドンを共有していた。トランスポザゼプラスミドを細胞株にトランスフォームし、コロニーを拾い上げ、スケールアップし、配列を確認した。

30

【0180】

40

50

【表 28】

表 3

配列番号		変異
DNA	タンパク質	
1	2	WT イラクサギンウワバ (<i>Trichoplusia ni</i>) piggyBacトランスポザーゼ
3	4	I147L イソロイシンからロイシン
5	6	I247L イソロイシンからロイシン
7	8	S533T セリンからトレオニン
9	10	LLT (I247L I147L S533T)
11	12	ILT (I247L I147L S533T)
13	14	LIT (I247L I147L S533T)
15	16	LLS (I247L I147L S533)

10

20

【0181】

4つの目的のタンパク質である、2つのモノクローナル抗体（AB1及びAB2）、1つの融合タンパク質、及び1つの二重特異性T細胞エンゲージャーを試験した。目的のタンパク質をコードする各遺伝子は、piggyBacトランスポゾンの少なくとも5'及び3'の逆位反復エレメントを含む別々のプラスミドにクローン化された。これらの4つのプラスミドをスケールアップして、配列を確認した。

【0182】

環状変異トランスポザーゼプラスミドを、4つのタンパク質のうちの1つをコードする遺伝子を含む環状プラスミドの1つと一緒に、エレクトロポレーションを使用してグルタミン合成酵素ノックアウトCHO細胞にコトランスフェクトした。トランスポザーゼの目的のタンパク質プラスミドとの比は1:4であった。細胞は、グルタミンを含まない選択培地に変更する前に、36及び5%CO₂で3日間グルタミンを補充した培地で回復させた。細胞は、90%を超える生存率に回復するまで、36及び5%CO₂の選択培地で3~4日ごとに継代された。

30

【0183】

安定な細胞株からの発現タンパク質の発現を評価するために、24個のディープウェルプレートでフェドバッチ生産を行った。培養物をグルタミンを含まない基本生産培地に1×10⁶細胞/mLで播種し、3、6、及び8日目に追加の栄養素を供給した。培養物を10日目に回収し、力価について上清を分析した。

40

【0184】

力価は、プロテインAを20µgの目標負荷でカラム支持体に固定化した親和性UPLCクロマトグラフィーによって測定した。中性pHでは、試験サンプル中のタンパク質はFc領域を介してプロテインAに結合し、宿主細胞タンパク質、条件培地成分、及びバッファは、フローズルーのカラムから溶出された。捕捉されたタンパク質を、酸性pH1.91XDPBSで溶出し、280nmでのUV吸光度によって検出した。検量線は、線形回帰分析を使用して、ユニバーサル抗体標準及び対応するピーク面積から導き出した。次いで、試験サンプル中のタンパク質の濃度を、検量線並びにユニバーサル抗体標準及

50

び試験サンプルからの減衰係数の比から計算した。

【0185】

変異したトランスポザゼの使用は、WTトランスポザゼ又は試験されたモノクローナル抗体及び融合タンパク質のトランスポザゼを欠く対照に対して改善されたか、又は同様の力価を示した。二重特異性T細胞エンゲージャーは、一般に、モノクローナル抗体よりも力価が低く、この系で同様に使用した場合、一般的に高レベルで発現しなかった。この特定の分子では、発現のボトルネックが転写又は遺伝子挿入部位ではなく、タンパク質分泌のボトルネックに関連している可能性がある。その他の二重特異性T細胞エンゲージャーは、発現に同じ課題がない場合は異なる結果が得られる可能性があるため、二重特異性T細胞エンゲージャー分子による足場を使用すると、力価が向上する可能性がある。

10

【0186】

実施例2 MSXを添加したGS KO宿主細胞における二重及び三重トランスポザゼ変異体の発現

グルタミン合成酵素ノックアウトCHO細胞(GSKO細胞)を、エレクトロポレーション(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を使用して、目的の遺伝子を含有する環状プラスミド並びにイラクサギンウワバ(Trichoplusia ni) piggyBacトランスポゾンの5'及び3'の逆位反復エレメントを全て組み合わせて、1)二重変異体、「ILT」、DNA piggyBacトランスポザゼ(ITR、配列番号11)、2)三重変異体、「LLT」、DNA piggyBacトランスポザゼ(LLT、配列番号9)、及び3) piggyBacトランスポザゼ無し(none)をコードする環状プラスミドでトランスフェクトした。目的の3つの遺伝子である、二重特異性T細胞エンゲージャーヘテロFc、IgG-scFv、及びモノクローナル抗体(mAb)を試験した。

20

【0187】

メチオニンスルホキシイミン(MSX)(EDM Millipore, Burlington, MA) 25 µMを、トランスフェクションの3日後(25)、初期プールが90%を超える生存率に回復した後(0-25)に添加するか、又は全く添加しなかった(0)。グルタミン合成酵素の阻害剤であるメチオニンスルホキシイミン(MSX)の添加は、GSKO CHO細胞株における目的の遺伝子の発現を増加させるために使用される。

【0188】

MSXで処理した細胞が回復したら、24個のディープウェルプレート又はスピントューブで小規模なフェドバッチ生産を行い、安定した細胞株からの発現タンパク質の発現を評価した。培養物をグルタミンを含まない基本生産培地に 1×10^6 細胞/mLで播種し、3、6、及び8日目に追加の栄養素を供給した。培養物を10日目に回収し、実施例1で記載されたように、力価について上清を分析した。

30

【0189】

変異体トランスポザゼ(ILT又はLLT)でトランスフェクトされたそれらのプールは、MSX処理を受けなかったトランスポザゼプール(0 µM MSX)と比較して発現の増加を示した。トランスポザゼが添加されていないプール(none)では、MSXの添加によって発現は増加しなかった。

40

【0190】

トランスポゾンは、ゲノム内の活発な転写領域であるオープンクロマチンを標的とするトランスフェクションの半標的メカニズムを付与する。トランスポゾンがトランスポザゼと組み合わせて挿入されると、トランスポゾンの5'及び3'逆位反復エレメント間の完全なベクター配列が挿入される。トランスポザゼなしでトランスポゾンをトランスフェクトすると、染色体にランダムに挿入され、その結果、トランスポゾンの5'及び3'逆位反復エレメント間の完全なベクター配列が活性部位に挿入されない可能性がある。加えて、トランスポザゼがないと、完全な挿入が保証されず、目的の遺伝子と選択マーカー(この場合はグルタミン合成酵素)の間が切断されるという結果をもたらす可能性があるため、MSXは目的の遺伝子の発現に影響を与えない。

50

【0191】

試験されたベクター系のコンテキストにおいて、改変されたトランスポザーゼは、トランスポザーゼのない対照と比較して、MSXの追加の有無にかかわらずいずれも発現を増加させるという追加の利点を有する。(図5)。piggyBacからのコピー数の増加も、MSXでの選択の改善に寄与する可能性がある。

【0192】

実施例3 DNA又はmRNAのpiggyBacトランスポザーゼによるトランスフェクション。

目的の遺伝子の挿入に使用されるトランスポザーゼは、DNA又はmRNAベースのいずれかであり得る。DNA転写トランスポザーゼの使用に関する1つの懸念は、トランスフェクトされた細胞株でトランスポザーゼの活発な転写/翻訳をもたらす可能性のあるゲノムにトランスポザーゼ遺伝子が挿入される可能性があることである。これは、場合により、可能な潜在トランスポザーゼ認識部位でのトランスポザーゼ活性のために、ゲノム不安定性につながる可能性がある。代替方法は、mRNAがゲノムに挿入されないため、トランスフェクションにmRNAを使用することである。

10

【0193】

野生型塩基を使用した未修飾のmRNA転写産物、並びに疑似U及び5-メチル-Cキップの25%置換を有する修飾合成mRNA転写産物を、二重変異体である「ILT」、及び三重変異体である「LLT」、piggyBacトランスポザーゼについて調製した。

20

【0194】

トランスフェクションからのmRNA翻訳トランスポザーゼを評価するために2セットの実験を行った。第1の実験では、piggyBacトランスポザーゼ二重変異体(ILT、配列番号17)及び三重変異体(LLT、配列番号18)についてのmRNA転写物を試験した。第2の実験では、mRNA転写物に加えて、疑似U及び5-メチル-Cキップの25%置換を有する二重変異体「ILT」の合成mRNA転写物を試験した。

【0195】

イラクサギンウワバ(Trichoplusia ni) piggyBacトランスポゾンの5'及び3'の逆位反復エレメント並びにモノクローナル抗体をコードする遺伝子を含む環状プラスミドと共に、mRNA及び合成mRNA転写物を、エレクトロポレーション又は脂質系トランスフェクション法のいずれかを使用して、GSKO細胞株にトランスフェクトした。

30

【0196】

エレクトロポレーションでは、等重量の線形化トランスポザーゼ及びトランスポゾンベクターDNAを、キュベット内の培地に懸濁した 2×10^7 個の細胞に添加した。DNA細胞混合物をBio-Radエレクトロポレーター(Bio-Rad Laboratories)を使用してエレクトロポレートした。次いで、エレクトロポレートした細胞を温かい増殖培地に添加し、37及び5%CO₂で3日間インキュベートした後、細胞を選択培地に再懸濁して安定したプールを確立した。脂質トランスフェクションの場合、使用した試薬はリポフェクタミンLTX(Gibco/ThermoFisher, Waltham, MA)であった。トランスフェクションの前日、細胞を1e6細胞/mLで播種し、懸濁液中で振盪した。トランスフェクションの日に、細胞を6ウェルプレートのトランスフェクション培地に播種した。Mab DNA/トランスポザーゼ/リポフェクタミンLTX複合体を調製し、インキュベートした。次いで、複合体を細胞に添加し、5~8時間インキュベートした。インキュベーション後、増殖培地を添加し、細胞を2~3日間回復させた。スティッキングがあった場合はトリプシンを使用して細胞を除去し、細胞を遠心分離し、選択培地に再懸濁して安定したプールを確立した。

40

【0197】

mRNAトランスフェクションを、トランスポザーゼをコードする対応するDNAでトランスフェクトされたGSKO細胞株である対照条件と比較した。二重変異体(ILT、

50

配列番号 11) 又は三重変異体 (LLT、配列番号 9) をコードする DNA を含む環状プラスミドを、モノクローナル抗体を含むイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) piggyBac トランスポゾンの 5' 及び 3' の逆位反復エレメントを含む環状プラスミドと共に、mRNA と同じ条件下でトランスフェクトした。

【0198】

mRNA 及び DNA トランスポザーゼの量、目的の遺伝子、目的の遺伝子 DNA 又は RNA とトランスポザーゼの比、並びにトランスフェクトされた細胞の数を変化させて、最適な条件について試験した (表 4)。

【0199】

【表 29】

10

表 4 エレクトロポレーション及びリポフェクションのための条件

トランスポザーゼ	Mab DNA (µg)	トランスポザーゼ DNA 又は mRNA (µg)	Mab 対 トランスポザーゼの比
実施例 1 エレクトロポレーション 2e7 の宿主細胞			
DNA 対照	20	5	4:1
None	20	0	
mRNA	20	5	4:1
mRNA	20	10	2:1
mRNA	20	20	1:1
mRNA	14	100	1:7
mRNA	28	200	1:7
実施例 2 リポフェクタミン LXT 1.2e6 の宿主細胞			
DNA 対照	2	0.5	4:1
DNA 対照	2	2	1:1
DNA 対照	4	4	1:1
mRNA	2	0.5	4:1
mRNA	2	2	1:1
mRNA	4	4	1:1
実施例 3 エレクトロポレーション 2e7 の宿主細胞			
DNA 対照	30	15	2:1
mRNA	30	15	2:1
合成 mRNA	30	15	2:1

20

30

40

【0200】

トランスフェクトされた細胞は、グルタミンを含まない選択培地に変更する前に、36 及び 5% CO₂ で 3 日間グルタミンを補充した培地で回復させた。これらは、90% を超える生存率に回復するまで、36 及び 5% CO₂ の選択培地で 3 ~ 4 日ごとに継代さ

50

れ、実施例 1 に記載されるように力価について評価した。

【0201】

mRNA によるトランスフェクションは、エレクトロポレーション系又は脂質系トランスフェクション法のいずれかを使用して、piggyBac トランスポザージ二重変異体「ILT」の DNA を使用したトランスフェクションと同等の発現レベルを達成した。図 6 は、エレクトロポレーション又は脂質系の方法を使用して、二重変異体「ILT」、トランスポザージ DNA 又は mRNA でトランスフェクトされた細胞からのモノクローナル抗体の発現レベルを示す。図 6 A は、エレクトロポレーションを使用したトランスフェクションからの結果を示す。発現は、mRNA の量が増加するにつれて、DNA 対照と比較して改善された。三重変異体「LLT」は同様の結果を示したが、データは示されていない。図 6 B は、脂質系法を使用したトランスフェクションからの結果を示す。モノクローナル抗体の発現レベルは、DNA 対照よりも優れているか、少なくとも同等であった。

10

【0202】

mRNA の合成バージョンからの結果は、エレクトロポレーションを使用して mRNA と比較した。どちらのバージョンも、トランスポザージでトランスフェクトされていない対照 (-) よりも高い発現を示した。

【0203】

図 7 は、エレクトロポレーションからの二重変異トランスポザージ「ILT」DNA 及び両方の mRNA トランスフェクトプールの発現に関連するモノクローナル抗体の発現レベルを示す。合成 mRNA 及び mRNA のトランスフェクトプールは、DNA 系トランスポザージプールと同様の力価及びトランスポザージなしの対照プールよりも高い力価を示した。

20

【0204】

ゲノム DNA レベルでのトランスポザージ遺伝子挿入の分析。

ゲノム DNA レベルでの piggyBac トランスポザージ二重変異体「ILT」及び三重変異体「LLT」遺伝子の挿入についても分析した。トランスポザージヌクレオチド配列の 5' 及び 3' 末端へのオリゴプライマーを使用して、約 1.7 kb の断片を増幅し、トランスポザージが存在するかどうかを確認した。ゲノム DNA は、血液及び細胞培養 DNA MaxiKit (Qiagen, Valencia, CA) を使用して、mRNA 又は DNA のいずれかでトランスフェクトされた回収細胞株から 1×10^7 細胞で収集された細胞ペレットから抽出した。プラスミド DNA は陽性対照として含まれた。NanoDrop 分光光度計 (ThermoFisher, Waltham, MA) を使用して、260/280 吸光度比により、ゲノム DNA を定量し、品質を確認した (1.8 以上が良好な品質であった)。PCR 増幅は、ProFlex PCR システム (Life Technologies, Carlsburg, CA) で New England Biolabs (Ipswich, MA) の Q5 High Fidelity ポリメラーゼを使用して実施した。反応は、視覚化のためにアガロースゲル上で実施した。

30

【0205】

cDNA レベルでのトランスポザージ遺伝子挿入の分析

転写レベルでの piggyBac トランスポザージ二重変異体「ILT」遺伝子の挿入についても分析した。上記のオリゴプライマーを再び使用して、約 1.7 kb の断片を増幅し、トランスポザージ転写物が細胞内に存在するかどうかを確認した。RNeasy ミニキット (Qiagen) を使用して、mRNA 又は DNA トランスポザージのいずれかを添加してトランスフェクトされた回収細胞株から 1×10^7 細胞で収集された細胞ペレットから mRNA を抽出した。プラスミド DNA は対照として含まれた。NanoDrop 分光光度計を使用して、260/280 吸光度比により、mRNA を定量し、品質を確認した。トランスポザージは、製造者の推奨に従って、ProFlex PCR システム (Life Technologies) で cDNA 合成とそれに続く標的配列 (すなわちトランスポザージ) の増幅を行う Platinum Taq High Fidelity DNA ポリメラーゼ (ThermoFisher) を備えた SuperScript I

40

50

IIワン工程RT-PCRシステムを使用して転写レベルで確認された。反応は、視覚化のためにアガロースゲル上で実施した。

【0206】

DNA及びmRNAトランスフェクト細胞株プールを、ゲノム及び転写レベルの両方で挿入について確認した(図8)。約1.7kbのバンドの存在は、細胞株のゲノムにトランスポザーゼが存在することを示した(図8A)。二重変異体「ILT」、DNAトランスポザーゼでトランスフェクトされた全てのプール細胞株は転写レベルで挿入されていたが、mRNAでトランスフェクトされたものはゲノム又は転写レベルで挿入されていなかった(図8B)。

【0207】

コピー数についてのddPCRアッセイ

コピー数を評価するために、DNeasy血液及び組織キット(Qiagen)を使用して、各クローン及びプールについて 5×10^6 の細胞からゲノムDNAを抽出した。デジタル液滴PCRは、製造者の推奨に従って、ddPCR Supermix for Probes (dUTPなし)キット(Bio-Rad)を使用して実施した。各反応には、1ユニットのHindIII、10ngの鑄型DNA、加えて900nmのフォワード及びリバースプライマー、並びに標的の二重変異体「ILT」コード配列及び内因性CHO参照遺伝子Gcgに向けて設計された250nmの蛍光プローブが含まれていた。AutoDGシステム(Bio-Rad)を使用して液滴を生成し、ProFlex PCRシステム(Life Technologies)で、95で10分間のサーマルサイクリング条件、続いて94で30秒間、60で1分間、次いで98で10分間、の40サイクルでPCR増幅を行った。液滴はQX200液滴リーダーシステム(Bio-Rad)で読み取られ、コピー数データ分析を、Quantasoftソフトウェア(Bio-Rad)を使用して実施した。

【0208】

プール内の全てのクローンにトランスポザーゼが挿入されているかどうかを判断するために、DNAトランスポザーゼでトランスフェクトされたプールを単一細胞でクローン化し、ゲノムDNA(gDNA)レベルでの挿入を確認した。プール及びクローンはまた、ddPCRを使用してトランスポザーゼのコピー数について評価した。

【0209】

プールのコピー数は少なく、トランスポザーゼが挿入されていないクローンが含まれていた。上記のように、PCR系の方法を使用してクローンをスクリーニングすることにより、トランスポザーゼが挿入されていないクローンを同定した。トランスポザーゼが挿入されていないクローンがプール集団に存在した(図9)。

【0210】

実施例4 piggyBacトランスポザーゼを使用したTCR-T細胞の生成

二重変異したpiggyBacトランスポザーゼ「ILT」を使用して、初代T細胞をうまく改変してT細胞受容体(TCR)を発現させた(図10A)。PiggyBac生成TCR-T細胞は、標的の強力な死滅及び抗原特異的増殖を示した(図10B及び10C)。

【0211】

末梢血単核細胞(PBMC)は、Ficoll-Paque(GE Healthcare, Chicago, IL)分離によって健康なドナーのロイコパック(Leukopak)から最初に単離され、その後、EasySepヒトT細胞単離キット(Stemcell Technologies, Vancouver, Canada)を使用してPBMCから単離された。次いで、T細胞を活性化し、活性化の2日後に、TCR-IRE5-EGFPをコードする遺伝子を含むpiggyBacトランスポゾンの5'及び3'の逆位末端反復エレメントを含むプラスミド及び二重変異体「ILT」トランスポザーゼ(配列番号18)をコードするmRNAで、4-Dヌクレオフェクター(Nucleofector)システム(Lonza, Greenwood, SC)を使用して、T細胞を、

10

20

30

40

50

コエレクトロポレートした。細胞には2～3日ごとにIL2サイトカインを補充した。

【0212】

TCR挿入の決定

活性化後7日目に、TCRを認識するデキストラマー抗体(Immudex, Copenhagen, Denmark)、並びにCD3、CD4、及びCD8フルオロフォア結合抗体(Biolegend, San Diego, CA)で細胞を表面染色することにより、T細胞のTCR発現及び細胞表現型を評価した。BD LSR II フローサイトメーターで実行することにより、サンプルの発現について分析した。

【0213】

機能アッセイ

活性化後9～14日目に機能アッセイのためにT細胞をカウントして収集した。

【0214】

細胞溶解及び増殖アッセイ

1E5 CellTrace Violet(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) - 染色T細胞を、96ウェルU底プレート内の150µL培地で5e4の標的細胞と5日間共培養した。CellTrace Violet希釈液によって評価された標的細胞溶解及びT細胞増殖は、BD LSRFortessa フローサイトメーター(Liberty Lake, WA)でサンプルを実行することによって定量化した。

10

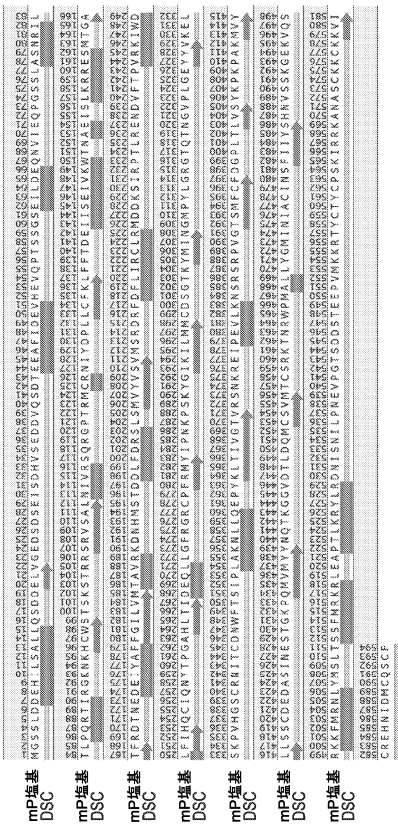
20

30

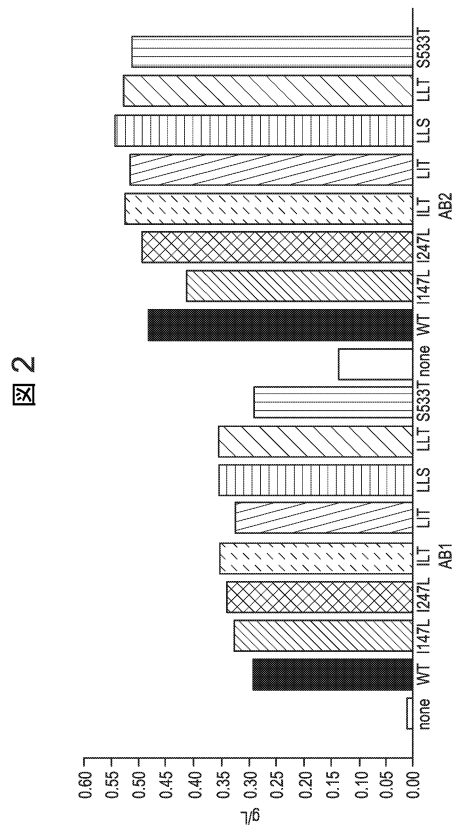
40

50

【 図 面 】
【 図 1 】



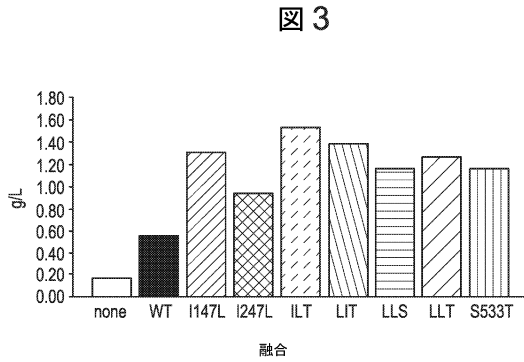
【 図 2 】



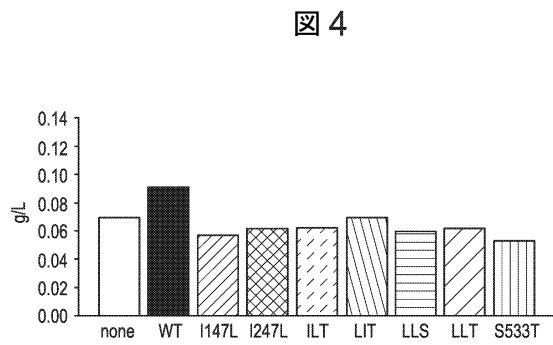
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

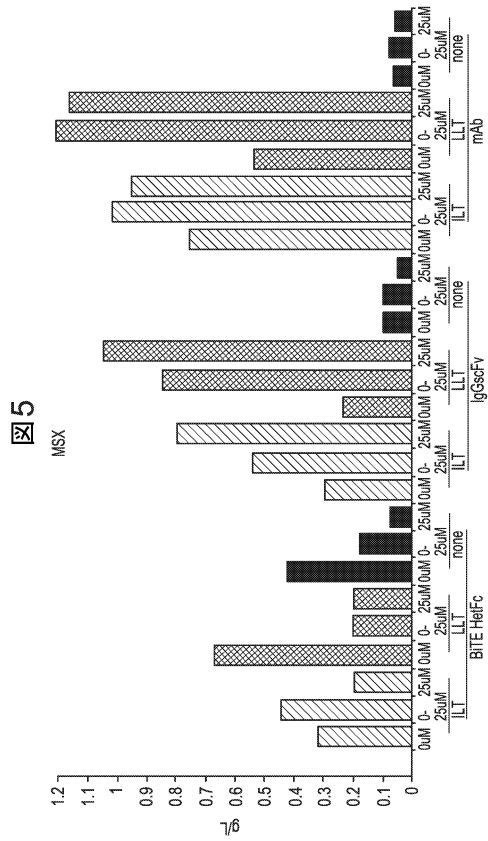


30

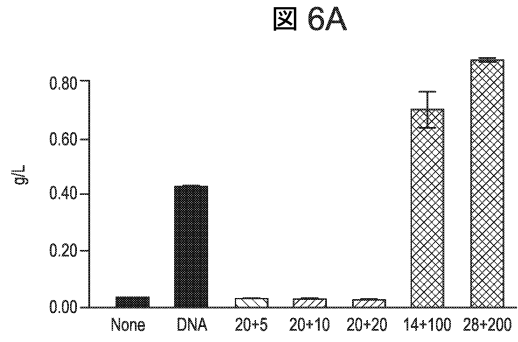
40

50

【 図 5 】

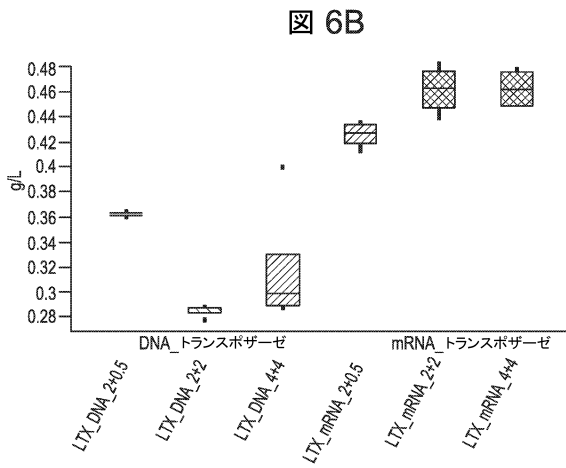


【 図 6 A 】

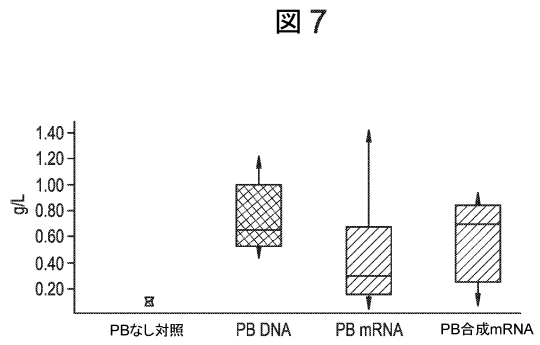


10

【 図 6 B 】



【 図 7 】



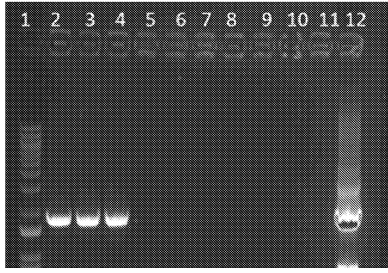
30

40

50

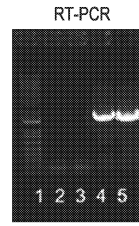
【 図 8 A 】

図8A



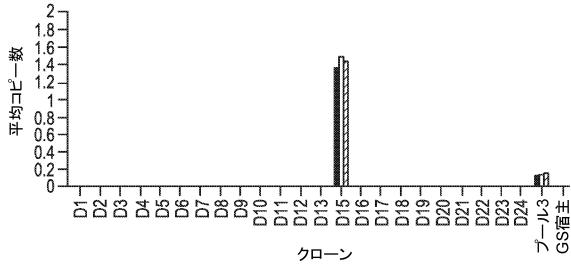
【 図 8 B 】

図8B



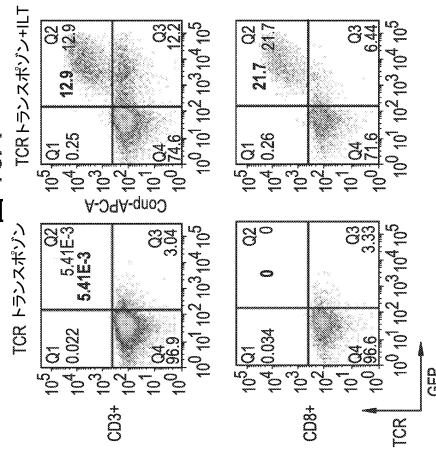
【 図 9 】

図 9



【 図 10 A 】

図 10A



10

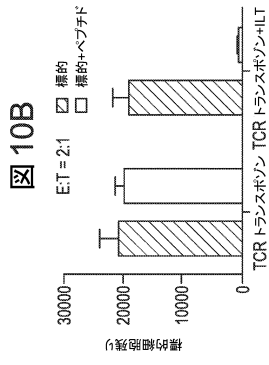
20

30

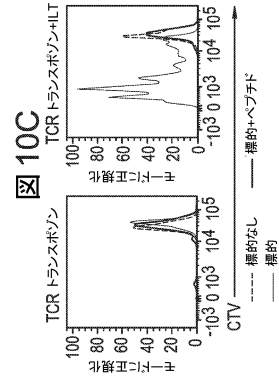
40

50

【図 10 B】



【図 10 C】



【配列表】

[0007441840000001.app](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/078(2010.01)	C 1 2 N	5/078	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10	Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 P	21/00 (2006.01)	C 1 2 P	21/00	C

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者

ダリス, クリスティン・エム

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0 - 1 7 9 9、サウザンド・オークス、エム/エス・2 8 - 5 - エイ、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、アムジェン・インコーポレーテッド、ロー・デパートメント - パテント・オペレーションズ気付

(72)発明者

スティーブンス, ジェニット・エル

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0 - 1 7 9 9、サウザンド・オークス、エム/エス・2 8 - 5 - エイ、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、アムジェン・インコーポレーテッド、ロー・デパートメント - パテント・オペレーションズ気付

(72)発明者

レ, フォン・ティ・ゴック

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0 - 1 7 9 9、サウザンド・オークス、エム/エス・2 8 - 5 - エイ、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、アムジェン・インコーポレーテッド、ロー・デパートメント - パテント・オペレーションズ気付

(72)発明者

タラバン, ノエリア・ブランコ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0 - 1 7 9 9、サウザンド・オークス、エム/エス・2 8 - 5 - エイ、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、アムジェン・インコーポレーテッド、ロー・デパートメント - パテント・オペレーションズ気付

審査官 長谷川 強

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 3 / 0 1 2 8 2 4 (W O , A 2)

(58)調査した分野

(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 5 4

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 5 / 0 7 1

C 1 2 N 5 / 0 7 8

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 9 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C 1 2 P 2 1 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q