

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6885876号
(P6885876)

(45) 発行日 令和3年6月16日 (2021.6.16)

(24) 登録日 令和3年5月17日 (2021.5.17)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 15/87 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 13/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/87 Z N A Z

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 13/00

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 10 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-554057 (P2017-554057)
 (86) (22) 出願日 平成28年4月13日 (2016.4.13)
 (65) 公表番号 特表2018-512162 (P2018-512162A)
 (43) 公表日 平成30年5月17日 (2018.5.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/027253
 (87) 国際公開番号 W02016/168275
 (87) 国際公開日 平成28年10月20日 (2016.10.20)
 審査請求日 平成31年4月11日 (2019.4.11)
 (31) 優先権主張番号 62/146,618
 (32) 優先日 平成27年4月13日 (2015.4.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 505311928
 マックスサイト インコーポレーティッド
 アメリカ合衆国 メリーランド州 ゲイザ
 ーズバーグ ファーストフィールド ロー
 ド 22 スイート 110
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲノムDNAを改変するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、T細胞またはNK細胞における標的ゲノムDNA領域の部位特異的な配列
 改変のための方法、ただし、ヒト体内で行われる方法を除く：

該T細胞またはNK細胞を抗CD3抗体および抗CD28抗体を含む活性化組成物と接触させる工
 程；および

該細胞に、非ウイルス性トランスフェクション組成物を、該細胞を該活性化組成物と接
 触させた後24時間から48時間の期間に、トランスフェクトする工程であって、

該細胞のトランスフェクションが、エレクトロポレーションまたはフローエレクトロポ
 レーションデバイスを用いるフローエレクトロポレーションを含み、

該トランスフェクション組成物が、(a) ドナーDNAまたはプラスミドと (b) 1つまたは
 複数のRNAにコードされているDNA消化剤とを含み、

該ドナーDNAまたはプラスミドが、

(i) 該標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と；

(ii) 配列改変領域と

を含み；かつ

ゲノムDNA配列が、該標的ゲノムDNA領域において特異的に改変される、工程。

【請求項 2】

前記DNA消化剤がCas9を含み、前記トランスフェクション組成物が(c) ガイドRNAをさら
 に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記ドナーDNAまたはプラスミドが導入遺伝子を含む、またはオリゴもしくは一本鎖オリゴである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記トランスフェクション組成物中の前記ドナーDNAまたはプラスミドの濃度が10～500 µg/mLである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

標的ゲノムDNA配列が疾患関連遺伝子を含む、ならびに / または
前記ドナーDNAもしくはプラスミドが疾患関連遺伝子を含む、ならびに / または
前記ドナーDNAもしくはプラスミドがキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸配列を含む、ならびに / または
前記ドナーDNAもしくはプラスミドがキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸配列を含み、かつ、前記ドナーDNAもしくはプラスミドの配列改変領域がCARをコードする核酸配列を含む、
請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ドナーDNAまたはプラスミドが、少なくとも10個の核酸、少なくとも20個の核酸、または少なくとも30個の核酸の相同配列を含む相同領域を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記DNA配列改変が、1つまたは複数の終止コドンであり、
前記配列改変によって、前記ゲノム配列の1塩基対または複数の塩基対が変化する、
前記配列改変によって、前記ゲノム配列の1塩基対または複数の塩基対が付加される、
前記配列改変によって、前記ゲノム配列の1塩基対または複数の塩基対が欠失する、または
前記DNA配列改変が、導入遺伝子の部位特異的な標的組込みである、
請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

(i) 前記DNA配列改変を有するクローン細胞を作製するために、および / または
(ii) 大規模製造のために、および / または
(iii) 1 L超の容積でまたは3 Lもしくはそれ以上の容積で、
単離および選択されたクローン細胞を増殖させる工程をさらに含む、
請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞を前記配列改変についてスクリーニングする工程をさらに含む、および / または
トランスフェクトされた細胞を凍結させる工程をさらに含む、および / または
以前に凍結させたトランスフェクトされた細胞を増殖させる工程をさらに含む、
請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

以下の工程を含む、標的ゲノムDNA配列のゲノムDNA配列改変を含む安定なT細胞またはNK細胞株を作製するための方法、ただし、ヒト体内で行われる方法を除く：

該細胞を抗CD3抗体および抗CD28抗体を含む活性化組成物と接触させる工程；
該細胞に、非ウイルス性トランスフェクション組成物を、該細胞を該活性化組成物と接触させた後24時間から48時間の期間に、トランスフェクトする工程であって、
該細胞のトランスフェクションが、エレクトロポレーションまたはフローエレクトロポレーションデバイスを用いるフローエレクトロポレーションを含み、
該トランスフェクション組成物が、(a) ドナーDNAと (b) DNA消化剤とを含み、
該ドナーDNAが、
(i) 標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と；

(ii) 配列改変領域と
を含む、工程；

トランスフェクトされた細胞を、該標的ゲノムDNA領域における該ゲノムDNA配列改変についてスクリーニングする工程；

クローン細胞を得るために、スクリーニングしたトランスフェクトされた細胞を限界希釈により単離する工程；および

該ゲノムDNA配列改変を含む安定な細胞株を作製するために、単離したトランスフェクトされた細胞を増殖させる工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

1. 発明の分野

本発明は、概して、バイオテクノロジーの分野に関する。より詳しくは、本発明は、ゲノムDNAを改変するための新規の方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

2. 関連技術の説明

標的ゲノム改変は、疾患を処置するための非常に大きな可能性を有する。標的部位でのDNAの改変または部位特異的な導入遺伝子組込みは、より有効な遺伝子治療アプローチを提供しうる。しかし、現在のゲノム工学アプローチは、非常に低い修復または編集の効率を提供し、有害なまたは望ましくないDNA配列および成果を持ち込む可能性を有する。

20

【0003】

遺伝子治療への現在の治療アプローチは、遺伝子移入のためにウイルスベクターの使用を採用する。しかし、ウイルスベクターを伴う遺伝子治療方法は、宿主免疫原性を引き起こす可能性がある、ヒト宿主中へのウイルス配列の導入という不利な点を有する。遺伝子治療のための非ウイルス方法は存在するが、それらの臨床の場での使用は、その低い効率、毒性、または特異性の欠如のいずれかのために妨げられている。

【0004】

ゲノム工学のためのより効率的なアプローチはまた、エキスビボでの治療における進歩も提供することになる。なぜなら、患者から細胞を単離し、変異を修正するかまたは部位特異的に導入遺伝子を組み込むようにゲノムを改変し、患者自身の細胞を戻して移植して、治療効果を達成することができるからである。現在の方法は、これらの結果を達成するには、あまりにも非効率的であるかまたは毒性であるかのいずれかである。効率的であり、非毒性であり、かつ安定である部位指定ゲノムDNA改変を可能にする技術について、当分野で必要性がある。

30

【発明の概要】

【0005】

組成物および方法は、内因性標的ゲノムDNA配列の配列改変に関する。特定の局面は、以下の工程を含む、細胞における標的ゲノムDNA領域の部位特異的な配列改変のための方法に関する：該細胞を活性化組成物と接触させる工程；該細胞に、(a) ドナーDNAと (b) DNA消化剤とを含むトランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程。ドナーDNAは、2つの領域を含む。一方の領域は、標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域であり、他方の領域は、配列改変領域である。上記の方法において、ゲノムDNA配列は、標的ゲノムDNA領域において特異的に改変される。

40

【0006】

「配列改変」という用語は、DNA配列に対する変化であり、内因性ゲノムDNA配列へのまたは内因性ゲノムDNA配列の付加、変化、または欠失を含むことができる。付加の観点からいえば、配列改変は、標的ゲノム部位中への導入遺伝子の組込みであってもよい。例えば、標的ゲノム配列について、ドナーDNAは、標的ゲノム配列に相補的、同一、または相同である配列と、配列改変領域とを含む。配列改変領域は、典型的には、相同な末端の間

50

に位置づけられる。配列改変は、標的ゲノム配列に相補的ではなく、標的ゲノム配列の変更を含む。

【 0 0 0 7 】

本明細書に記載するドナーDNAは、標的ゲノムDNA配列に相同、同一、または相補的である配列と、標的ゲノムDNA配列の配列改変とを含む。

【 0 0 0 8 】

本明細書において使用する「相補的」という用語は、ヌクレオチド間のワトソン-クリック塩基対形成を指し、具体的には、2つの水素結合によりアデニン残基に連結されたチミン残基またはウラシル残基で、および3つの水素結合により連結されたシトシン残基およびグアニン残基で互いに水素結合されたヌクレオチドを指す。一般的に、核酸は、特定された第2のヌクレオチド配列に対してある「相補性パーセント」を有するとして記載されるヌクレオチド配列を含む。例えば、ヌクレオチド配列は、特定された第2のヌクレオチド配列に対して80%、90%、または100%の相補性を有し得、これは、配列の10個のヌクレオチドのうち8個、10個のヌクレオチドのうち9個、または10個のヌクレオチドのうち10個が、特定された第2のヌクレオチド配列に相補的であることを示す。例えば、ヌクレオチド配列3'-TCGA-5'は、ヌクレオチド配列5'-AGCT-3'に100%相補的である。さらに、ヌクレオチド配列3'-TCGA-は、ヌクレオチド配列5'-TTAGCTGG-3'の領域に100%相補的である。2つの相補的なヌクレオチド配列はセンス鎖とアンチセンス鎖とを含むことが、当業者により認識されるであろう。

【 0 0 0 9 】

「相同性」または「同一性」または「類似性」とは、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。「相同領域」という用語は、標的ゲノムDNA配列とある程度の相同性を有するドナーDNA上の領域を指す。相同性は、比較の目的で整理され得る各々の配列中の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列中の位置が、同じ塩基またはアミノ酸により占められている場合、分子はその位置で相同である。配列間の相同性の程度は、それらの配列によって共有される一致した位置または相同な位置の数の関数である。「無関係」または「非相同」である配列は、本発明の配列のうちの1つと40%未満の同一性を共有するが、好ましくは25%未満の同一性を共有する。

【 0 0 1 0 】

ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）は、別の配列に対してある特定のパーセンテージ（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%）の「配列同一性」または「相同性」を有し、これは、整理させた場合、そのパーセンテージの塩基（またはアミノ酸）が、2つの配列を比較した際に同じであることを意味する。このアラインメントおよび相同性パーセントまたは配列同一性パーセントは、当技術分野において公知のソフトウェアプログラム、例えば、Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biologyに記載されているものを用いて決定することができる。

【 0 0 1 1 】

「トランスフェクトする」という用語は、生物活性物質、例えば、核酸、タンパク質、酵素、または小分子を細胞中に導入するための方法を指す。核酸は、プラスミドもしくはオリゴマーとして送達されるDNA、および/またはRNA、またはそれらの組み合わせであってもよい。

【 0 0 1 2 】

「エレクトロポレーション」という用語は、外部から印加される電場が細胞に適用されるトランスフェクション方法を指す。特定の態様において、使用されるエレクトロポレーション方法は、静的エレクトロポレーションである。

【 0 0 1 3 】

特定の態様において、使用されるトランスフェクション方法は、エレクトロポレーションである。さらなる態様において、使用されるエレクトロポレーション方法は、フローエレクトロポレーションである。フローエレクトロポレーションは、プロセスを指し、流体

チャンバーまたは流体流路が、該流体チャンバーまたは流体流路の側面に沿って配置された電極で構成されており、該流体チャンバー流体流路内の生物学的粒子をエレクトロポレーションに適している電場に供するように形成されている、該流体チャンバーまたは流体流路で構成される装置中へ、細胞および負荷分子の懸濁液を移すこと；および、エレクトロポレーションされた細胞懸濁液を装置の外に移すことを含む。この方法は、大規模容積の細胞のために特に有効である。静的エレクトロポレーションは、対照的に、流体にかかる移動電気および対向電極間の距離に関連付けられる制約のため、一セットの限定された容積の細胞のエレクトロポレーションを含む。

【0014】

特定の局面において、細胞中へ発現構築物をトランスフェクトすることは、フローチャンバー内の電場中に細胞の懸濁液を流すことを含み、電場は、フローチャンバーを少なくとも部分的に画定する反対の電荷を有することができる電極 (oppositely chargeable electrode) に対向することにより、生成され、フローチャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約10 未満である。他の特定の局面において、細胞をトランスフェクトすることは、エレクトロポレーションする細胞の懸濁液を含むためのチャンバーを備えるフローエレクトロポレーションデバイスを用いることを含み；チャンバーは、反対の電荷を有することができる電極に対向することより、少なくとも部分的に画定され；チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約10 未満である。

【0015】

特定の局面において、細胞中へ発現構築物をトランスフェクトすることは、チャンバー中の電場に細胞の懸濁液をエレクトロポレーションまたは曝露することを含み、電場は、チャンバーを少なくとも部分的に画定する、反対の電荷を有することができる電極に対向することにより生成され、チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約10 未満である。他の特定の局面において、細胞にトランスフェクトすることは、エレクトロポレーションする細胞の懸濁液を含むためのチャンバーを備えるエレクトロポレーションデバイスを用いることを含み；チャンバーは、反対の電荷を有することができる電極に対向することより、少なくとも部分的に画定され；チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約10 未満である。

【0016】

特定の局面において、チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約0.1 から1ワット当たり10 である。例えば、チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、もしくは10 またはこの中から派生する任意の熱抵抗であり得る。

【0017】

対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに少なくとも1mm、少なくとも2mm、少なくとも3mmの間隔、またはこの中から派生する任意の距離もしくは範囲の間隔において配置されていてもよい。開示する態様のいずれかにおいて、チャンバーは、約1対100 cmの、緩衝液と接触している合わせた電極面積対電極間距離の比率を有してもよい。例えば、比率は、約1対1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100cmまたはこの中から派生する任意の値もしくは範囲であり得る。特定の局面において、チャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極面積対電極間距離の比率を有し、対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに少なくとも1mmの間隔において配置されている。他の局面において、チャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極面積対電極間距離の比率を有し、対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに少なくとも3mmの間隔において配置されている。

10

20

30

40

50

よりさらなる局面において、チャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極面積対電極間距離の比率を有し、対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに約3mm～約2cmの間隔をおいて配置されている。例えば、対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに約3、4、5、6、7、8、9、もしくは10mmの間隔またはこの中から派生する任意の距離の間隔をおいて配置されていてもよい、あるいは、対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2.0cmの間隔またはこの中から派生する任意の距離の間隔をおいて配置されていてもよい。これらの態様の一部の局面において、エレクトロポレーションされた細胞は、それにより、実質的に熱分解されない。

【0018】

開示する態様のいずれかにおいて、チャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極面積対電極間距離の比率を有してもよい。例えば、比率は、約1対1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100cm、またはこの中から派生する任意の値もしくは範囲であり得る。特定の局面において、チャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極面積対電極間距離の比率を有し、対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに少なくとも1mmの間隔をおいて配置されている。他の局面において、チャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極面積対電極間距離の比率を有し、対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに少なくとも3mmの間隔をおいて配置されている。よりさらなる局面において、チャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極面積対電極間距離の比率を有し、対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに約3mm～約2cmの間隔をおいて配置されている。例えば、対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに約3、4、5、6、7、8、9、もしくは10mmの間隔またはこの中から派生する任意の距離の間隔をおいて配置されていてもよい、あるいは、対向し反対の電荷を有することができる電極は、互いに約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2.0cmの間隔またはこの中から派生する任意の距離の間隔をおいて配置されていてもよい。これらの態様の一部の局面において、エレクトロポレーションされた細胞は、それにより、実質的に熱分解されない。

【0019】

開示された態様のいずれにおいても、デバイスは、熱を放散するために冷却エレメントを備え得る。例えば、冷却エレメントは、熱電冷却エレメントを含んでもよい。別の例として、冷却エレメントは、電極と接触して流れる冷却流体を含むことができる。さらに別の例として、冷却エレメントは、電極に動作可能に関連付けられたヒートシンクを含んでもよい。チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約3 未満であり得る。一部の態様において、チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約0.5 ～1ワット当たり4 であるか、または、チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約1 ～1ワット当たり3 である。例えば、チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、もしくは4.0 またはこの中から派生する任意の値であり得る。

【0020】

エレクトロポレーションにより細胞にトランスフェクトする工程を含む特定の方法において、該方法は、0.5kV/cm超の強度を有する電場に細胞の懸濁液を曝露する工程を含む。例えば、電場は、約3.5kV/cm超の強度を有してもよい。特定の局面において、電場は、約0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、もしくは3.5kV/cmよりもまたはこの中から派生する任意の値よりも大きな強度を有する。

10

20

30

40

50

【0021】

一部の態様において、細胞にトランスフェクトすることは、フローエレクトロポレーションデバイスを用いることを含み、該フローエレクトロポレーションデバイスが、フローチャンネルを画定している壁であって、該フローチャンネルが、エレクトロポレーションゾーンを有し、エレクトロポレーションされる細胞の懸濁液の連続流を受け入れるようにつつ該連続流を一時的に収容するように構成されている、壁；フローチャンネルと流体連通しており、それにより入口フローポータルを介してフローチャンネル中に懸濁液を導入することができる、入口フローポータル；フローチャンネルと流体連通しており、それにより出口フローポータルを介してフローチャンネルから懸濁液を取り出すことができる、出口フローポータルを備え、壁が、フローチャンネルの第1の壁の実質的な部分を形成する第1の電極と、第1の壁の反対側にあるフローチャンネルの第2の壁の実質的な部分を形成する第2の電極とを含むエレクトロポレーションゾーン内でフローチャンネルを画定しており、第1の電極および第2の電極が、電気エネルギーの供給源と電気通信している状態で置かれた場合に、それらの電極間に、懸濁液が流れることができる電場を形成するようになっており、かつ、フローチャンネルの熱抵抗が1ワット当たり約10 未満である。

10

【0022】

特定のそのような態様において、第1の電極および第2の電極または反対の電荷を有することができる電極は、互いに少なくとも1mmの間隔をおいて配置されている。さらに、チャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極表面对電極間距離の比率を有し得る。特定の態様において、チャンバーは、約1対1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100cmまたはこの中から派生する任意の値または範囲の、緩衝液と接触している合わせた電極表面对電極間距離の比率を有し得る。特定の態様において、本明細書に記載するエレクトロポレーション法によってエレクトロポレーションされた細胞は、それにより実質的に熱分解されない。本明細書に記載する特定の局面において、チャンバーはフローチャンバーである。

20

【0023】

一部の局面において、エレクトロポレーションデバイスは、エレクトロポレーションされる細胞の懸濁液を収容するためのチャンバーを備え；チャンバーは、反対の電荷を有することができる電極を対向させることにより少なくとも部分的に画定されており；かつチャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極表面对電極間距離の比率を有し得る。特定の局面において、比率は約1対70cmである。他の特定の局面において、比率は約1対50cmである。例えば、比率は、約1対1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100cmまたはこの中から派生する任意の値であり得る。本明細書に記載する特定の局面において、チャンバーはフローチャンバーである。

30

40

【0024】

一部の態様において、フローエレクトロポレーションデバイスは、エレクトロポレーションされる細胞の懸濁液の連続流を受け入れるようにつつ該連続流を一時的に収容するように構成されたフローチャンネルを画定している壁；フローチャンネルと流体連通しており、それにより入口フローポータルを介してフローチャンネル中に懸濁液を導入することができる、入口フローポータル；フローチャンネルと流体連通しており、それにより出口フローポータルを介してフローチャンネルから懸濁液を取り出すことができる、出口フローポータル

50

を備え、壁が、フローチャネルの第1の壁の少なくとも一部分を形成する第1の電極と、第1の壁の反対側にあるフローチャネルの第2の壁の少なくとも一部分を形成する第2の電極とを備えるフローチャネルを画定しており、第1の電極および第2の電極が、電気エネルギーの供給源と電気通信している状態で置かれた場合に、それらの電極間に、懸濁液が流ることができる電場を形成するようになっており、かつ、フローチャネルの熱抵抗が1ワット当たり約10 未満である。特定の局面において、フローチャネルの熱抵抗は、1ワット当たり約0.1 から1ワット当たり10 である。例えば、フローチャネルの熱抵抗は、1ワット当たり約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、もしくは10

またはこの中から派生する任意の熱抵抗であり得る。第1および第2の電極は、互いに少なくとも1mm、少なくとも2mm、少なくとも3mmの間隔、またはこの中から派生する任意の距離または範囲で間隔をおいて配置されていてもよい。開示された態様のいずれかにおいて、フローチャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極表面对電極間距離の比率を有し得る。例えば、比率は、約1対1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100cmまたはこの中から派生する任意の値または範囲であり得る。特定の局面において、フローチャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極表面对電極間距離の比率を有し、第1および第2の電極は、互いに少なくとも1mmの間隔をおいて配置されている。他の局面では、フローチャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極表面对電極間距離の比率を有し、第1および第2の電極は、互いに少なくとも3mmの間隔をおいて配置されている。さらなる局面では、フローチャンバーは、約1対100cmの、緩衝液と接触している合わせた電極表面对電極間距離の比率を有し、第1および第2の電極は、互いに少なくとも約3mmから約2cmの間隔をおいて配置されている。例えば、第1および第2の電極は、互いに約3、4、5、6、7、8、9、もしくは10mmまたはこの中から派生する任意の距離の間隔をおいて配置されていてもよい、あるいは、第1および第2の電極は、互いに約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、もしくは2.0cmまたはこの中から派生する任意の距離の間隔をおいて配置されていてもよい。これらの態様の一部の局面において、フローチャネルにおいてエレクトロポレーションされた細胞は、それにより実質的に熱分解されない。

【0025】

特定の開示される方法およびデバイスにおいて、チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約0.1 から1ワット当たり約4 である。一部の局面において、チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約1.5 から1ワット当たり約2.5 である。例えば、チャンバーの熱抵抗は、1ワット当たり約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、もしくは4.0 である。またはこの中から派生する任意の抵抗であり得る。

【0026】

特定の開示される方法およびデバイスにおいて、フローエレクトロポレーションデバイスは、粒子を含む懸濁液の連続流を受け入れるようにつ該連続流を一時的に収容するように構成されたフローチャネルを画定している壁；フローチャネルと流体連通しており、それにより入口フローポータルを介してフローチャネル中に懸濁液を導入することができる、入口フローポータル；フローチャネルと流体連通しており、それにより出口フローポータルを介してフローチャネルから懸濁液を取り出すことができる、出口フローポータルを備え、壁が、フローチャネルの第1の壁を形成する第1の電極プレートと、第1の壁の反対側にあるフローチャネルの第2の壁を形成する第2の電極プレートとを備えるフローチャネルを画定しており；電極の領域が懸濁液と接触しており、かつ、フローチャネルの熱抵

抗が1ワット当たり約4 未満になるように電極間距離が選定され；対になった電極が、電氣的エネルギーの供給源と電気通信している状態で置かれており、それにより電場が電極間に形成され；それにより、フローチャネルを介して流れる粒子の懸濁液が、電極間に形成される電場に供されることができる。特定の局面において、フローチャネルを画定している電極プレートは、ガスケットをさらに含み、ガスケットが、非導電性材料から形成され、かつ、間隔をおいた関係で電極プレートを維持するように第1の電極プレートと第2の電極プレートの間に配置されており、ガスケットは、その中でフローチャネルの対向する側壁を形成する内部チャネルを画定している。ガスケットは、例えば、第1および第2の電極プレートの各々とシールを形成し得る。一部の態様において、デバイスは、複数のフローチャネルを備え、ガスケットは、複数のチャネルの各々の対向する側壁を形成する複数のチャネルを含む。一部の局面において、入口フローポータルおよび出口フローポータル的一方が穴を含み、穴が、一方の電極プレートに形成され、かつフローチャネルと流体連通している。入口フローポータルおよび出口フローポータルの他方は、穴を含み得て、穴が、一方の電極プレートに形成され、かつフローチャネルと流体連通している。特定の局面において、入口フローポータルおよび出口フローポータルは穴を含み、穴が、他方の電極プレートに形成され、かつフローチャネルと流体連通している。開示される態様のいずれかにおいて、デバイスは、熱を放散させるためのフローチャネルに動作可能に結合された冷却エレメントをさらに備え得る。例えば、冷却エレメントは、熱電冷却エレメントを含み得る。別の例として、冷却エレメントは、電極と接触して流れる冷却液を含み得る。さらに別の例として、冷却エレメントは、電極に動作可能に結合されたヒートシンクを備え得る。フローチャネルの熱抵抗は、1ワット当たり約3 未満であり得る。一部の態様において、フローチャネルの熱抵抗は、1ワット当たり約0.5 ~1ワット当たり4 であるか、またはフローチャネルの熱抵抗は、1ワット当たり約1 ~1ワット当たり3 である。例えば、フローチャネルの熱抵抗は、1ワット当たり約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、もしくは4.0 またはこの中から派生する任意の値であり得る。

【0027】

特定の開示される方法およびデバイスにおいて、第1の電極は、細長い導電性構造を備え得るが、第2の電極は管状の導電性構造を備え；電極は、管状の第2の電極が、第1の電極に対して間隔をおいた関係で第1の電極を取り囲むように、同心円状に配列されており；フローチャネルは、第1の電極と第2の電極の間に画定された環状空間内に配置されている。電極は、フローチャネルを画定している壁の少なくとも一部分を形成し得る。一部の態様において、第1および第2の電極を維持するための同心円環状スペーサーが、間隔をおいた同心円状の関係で存在する。特定の局面において、デバイスは、第2の同様のデバイスと直列または並列に配列されている。

【0028】

フローエレクトロポレーションにより細胞にトランスフェクトする工程を含む特定の方法において、フローチャネルは、1ワット当たり約10 未満の熱抵抗を有する。フローエレクトロポレーションにより細胞にトランスフェクトする工程を含む一部の方法において、方法は、エレクトロポレーションされる細胞の懸濁液を、フローチャネルを通じて流す工程、および、フローチャネルを通じて流している間、懸濁液を電場に曝露する工程を含み、電場は0.5kV/cm超の強度を有する。例えば、電場は、約3.5kV/cm超の強度を有し得る。特定の局面において、電場は、約0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、もしくは3.5kV/cm超の強度またはこの中から派生する任意の値の強度を有する。

【0029】

フローエレクトロポレーションデバイスについて開示する態様において、フローエレクトロポレーションについて記載されているパラメータおよびパラメータの範囲が、本明細書に記載する方法で使用される静的エレクトロポレーションデバイスにも適用可能であることが特に企図されている。具体的な態様において、フローエレクトロポレーションが使

10

20

30

40

50

用され、静的エレクトロポレーションまたは非フローエレクトロポレーションが除外される。さらなる具体的な態様において、静的エレクトロポレーションが使用され、フローエレクトロポレーションは除外される。

【0030】

本明細書に記載する方法はまた、化学物質ベースのトランスフェクション方法および非化学物質ベースのトランスフェクション方法などの、当技術分野において公知の他のトランスフェクション方法の使用も包含する。化学物質ベースのトランスフェクション方法は、例えば、リン酸カルシウム、デンドリマー、リポフェクション、および、DEAE-デキストランまたはポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーを含む。非化学的方法は、細胞スクイーミング、ソノポレーション、光学的トランスフェクション、インパレフェクション (impalefection)、および流体力学的送達を含む。遺伝子銃、マグネトフェクション (すなわち、磁石補助トランスフェクション)、および粒子衝撃の使用などの粒子ベースの方法もまた含まれる。

10

【0031】

本明細書に記載する方法は、細胞活性化工程を採用する。一部の態様において、この細胞活性化工程は、細胞のトランスフェクションの前である。一部の態様において、細胞は、該細胞を活性化組成物と接触させた後7日未満の期間にトランスフェクトされる。一部の態様において、細胞は、該細胞を活性化組成物と接触させた後3日未満の期間にトランスフェクトされる。一部の態様において、細胞は、該細胞を活性化組成物と接触させた後2日またはそれ未満の期間にトランスフェクトされる。一部の態様において、細胞は、該細胞を活性化組成物と接触させた2日後にトランスフェクトされる。一部の態様において、細胞は、該細胞を活性化組成物と接触させた後14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、または3日未満の期間にトランスフェクトされる。一部の態様において、細胞は、該細胞を活性化組成物と接触させた後10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1日の期間にトランスフェクトされる。

20

【0032】

一部の態様において、DNA消化剤は、TALEN、トランスポザラーゼ、インテグラーゼ、およびヌクレアーゼより選択される。一部の態様において、DNA消化剤は、1つまたは複数のRNA上にコードされている。一部の態様において、DNA消化剤はヌクレアーゼである。一部の態様において、DNA消化剤はCas9である。一部の態様において、トランスフェクション組成物は、CRISPR RNAをさらに含む。一部の態様において、トランスフェクション組成物は、ガイドRNAをさらに含む。一部の態様において、ヌクレアーゼは部位特異的ヌクレアーゼである。

30

【0033】

一部の態様において、ドナーDNAはプラスミドである。一部の態様において、ドナーDNAはオリゴである。一部の態様において、ドナーDNAは一本鎖オリゴである。トランスフェクション組成物中のドナーDNAの濃度は、約10～約1000 $\mu\text{g/mL}$ 、または約10～約900、800、700、600、500、400、300、200、100、もしくは50 $\mu\text{g/mL}$ 、またはこの中から派生する任意の範囲であり得る。

【0034】

開示する方法のいずれも、単一細胞コロニーを得るために、トランスフェクトされた細胞の限界希釈を用いる工程を含み得る。本明細書において使用する場合、「限界希釈」という用語は、各々の培養物中の単一細胞を獲得する目的で、細胞培養物を有意に希釈するプロセスを指す。そのような単離された単一細胞が再生成される場合、結果として得られた培養物は、元々の細胞のクローンだけを含む。例えば、マルチウェルプレートは、単一の細胞培養物またはコロニーを得るために使用され得る。例えば、限界希釈を患者細胞由来iPS研究のため (例えば、鎌状赤血球患者の修復のため) に用いてもよい。限界希釈アプローチを用いるiPS細胞は、修正ヘモグロビン発現細胞に改変され、単離され、かつ患者への投与のために増殖させることができる。

40

【0035】

50

開示する方法のいずれにおいても、特定のゲノムDNA配列改変を有するクローン細胞を作製するために、単離および選択されたクローン細胞を増殖させることを含む工程を用いてもよい。

【0036】

単離されたクローン細胞の増殖を含む開示する方法において、増殖は、大規模製造のためであり得る。例えば、細胞は1L超の容積で増殖させてもよい、または、細胞は3L超の容積で増殖させてもよい。特定の局面において、細胞は、1.0、1.5、2.0、2.5、もしくは3.0L超の容積またはこの中から派生する任意の値の容積で増殖させる。

【0037】

開示する方法のいずれにおいても、トランスフェクトされかつ選択またはスクリーニングされた細胞を凍結させることを含む、さらなる工程を使用してもよい。以前に凍結させた、トランスフェクトされかつ選択/スクリーニングされた細胞を増殖させる、いっそうさらなる工程も使用してもよい。

10

【0038】

開示する方法において、細胞培養物は、培養する細胞の種類に基づき当業者により容易に選択される、当業者に公知の任意の追加成分を含んでもよい。例えば、細胞は、酪酸ナトリウム中または同等の塩中で培養してもよい。一部の態様において、細胞は、無血清培地中で培養する。

【0039】

開示する方法において、ゲノムDNA配列改変を有するクローン細胞を作製するために、単離されかつ選択またはスクリーニングされたクローン細胞を増殖させることを含む、さらなる工程を使用してもよい。

20

【0040】

さらなる局面は、以下の工程を含む、標的ゲノムDNA配列のゲノムDNA配列改変を含む安定な細胞株を作製するための方法に関する：細胞を活性化組成物と接触させる工程；(a) ドナーDNAと(b) DNA消化剤とを含むトランスフェクション組成物を該細胞にトランスフェクトする工程であって、該ドナーDNAが、(i) 標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と(ii) 配列改変領域とを含む、工程；および、標的ゲノムDNA領域における該ゲノムDNA配列改変について、トランスフェクトされた細胞をスクリーニングする工程；クローン細胞を得るために、スクリーニングしたトランスフェクトされた細胞を限界希釈により単離する工程；該ゲノムDNA配列改変を含む安定な細胞株を作製するために、単離したトランスフェクトされた細胞を増殖させる工程。

30

【0041】

本開示はまた、本明細書に記載する方法により作製した、細胞株またはトランスフェクトされた細胞を提供する。

【0042】

さらなる局面は、本明細書に記載する方法により作製した細胞株またはトランスフェクトされた細胞の有効量を投与する工程により、疾患または状態を有する対象または疾患または状態を有することが疑われる対象を処置する方法に関する。

【0043】

別の局面は、本明細書に記載する方法により作製された細胞株またはトランスフェクトされた細胞の有効量を投与する工程を含む、臨床研究方法に関する。

40

【0044】

本明細書に記載する態様は、除外されてもよいことが具体的に企図されている。さらに、範囲が記載されている場合、特定の範囲が除外されてもよいことが企図されている。さらなる局面は、以下の工程を含む、それを必要とする対象においてがんを処置する方法に関する：細胞を活性化組成物と接触させる工程；該細胞に、(a) ドナーDNAと(b) DNA消化剤とを含むトランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程であって、該ドナーDNAが、(i) 標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と(ii) キメラ抗原受容体(CAR)とを含み、かつゲノムDNA配列が、該CARを組み込むように該標的ゲノムDNA

50

領域において特異的に改変される、工程；および、該細胞を患者に投与する工程。一部の態様において、トランスフェクション組成物は非ウイルス性である。

【0045】

一部の態様において、細胞は自己由来である。一部の態様において、細胞はT細胞またはNK細胞である。あるいは、細胞は、本願を通して定義されるような宿主細胞であってもよい。一部の態様において、がんはB細胞悪性腫瘍である。一部の態様において、がんは白血病である。一部の態様において、がんは急性リンパ芽球性白血病である。一部の態様において、細胞は、患者の血液から単離される。一部の態様において、細胞は、遺伝的に適合したドナーから単離される。一部の態様において、細胞はドナー細胞である。一部の態様において、細胞は、アフェレーシスにより単離される。一部の態様において、方法は、細胞を患者から単離する工程をさらに含む。

10

【0046】

さらなる局面は、以下の工程を含む、細胞における標的ゲノムDNA領域の部位特異的な配列改変のための方法に関する：該細胞を活性化組成物と接触させる工程；該細胞に、(a) ドナーDNAと(b) DNA消化剤とを含む非ウイルス性トランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程であって、該ドナーDNAが、(i) 該標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と(ii) 配列改変領域とを含み、かつゲノムDNA配列が、該標的ゲノムDNA領域において特異的に改変される、工程。一部の態様において、細胞は免疫細胞である。一部の態様において、免疫細胞はT細胞である。一部の態様において、T細胞は初代T細胞である。一部の態様において、活性化組成物は、抗CD3抗体および抗CD28抗体を含む。一部の態様において、細胞のトランスフェクションは、細胞のフローエレクトロポレーションを含む。

20

【0047】

1つまたは複数の組成物の使用は、本明細書に記載する方法に基づいて採用されてもよい。1つまたは複数の組成物の使用は、本明細書に記載する方法に従う処置のための薬剤の調製において採用されてもよい。他の態様が、本願を通して議論される。本発明の1つの局面に関して議論される任意の態様は、本発明の他の局面に同様に適用され、その逆も同じである。実施例部分における態様は、本明細書に記載する技術の全ての局面に適用可能な態様であるように理解される。

【0048】

ここで本明細書において使用する場合、「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1つまたは複数を意味し得る。本明細書中で特許請求の範囲において使用する場合、「含む」という単語と併せて使用される際に、「1つの(a)」または「1つの(an)」という単語は、1つまたは2つ以上を意味し得る。

30

【0049】

本開示の方法は、列挙される要素または工程を含むように本明細書に記載されるが、列挙される要素または工程からなることもできる。方法が、列挙される要素または工程からなる場合、方法は、列挙されていない要素または工程を除外する。本開示の方法はまた、列挙される要素または工程「から本質的になる」こともできる。方法が、列挙される要素または工程「から本質的になる」場合、方法は、組成物の性質を変化させる要素もしくはは活性成分、または方法の成果を変更する工程を除外する。

40

【0050】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、明らかに代替だけを指すように示さない場合、または代替が相互に排他的ではない場合、「および/または」を意味するように使用されるが、開示は、代替および「および/または」を指す定義を支持する。本明細書において使用する場合、「別の」は、少なくとも第2またはそれ以上を意味し得る。

【0051】

本願を通して、「約」という用語は、値がデバイスの誤差の固有の変動を含むことを示すよう使用され、方法は、値、または試験対象間に存在する変動を決定するために用いら

50

れる。

【 0 0 5 2 】

[本発明1001]

以下の工程を含む、細胞における標的ゲノムDNA領域の部位特異的な配列改変のための方法：

該細胞を活性化組成物と接触させる工程；

該細胞に、(a)ドナーDNAと(b)DNA消化剤とを含む非ウイルス性トランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程であって、

該ドナーDNAが、

(i) 該標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と；

(ii) 配列改変領域と

を含み；かつ

ゲノムDNA配列が、該標的ゲノムDNA領域において特異的に改変される、工程。

[本発明1002]

前記細胞が免疫細胞である、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記免疫細胞がT細胞である、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記T細胞が初代T細胞である、本発明1003の方法。

[本発明1005]

前記活性化組成物が抗CD3抗体および抗CD28抗体を含む、本発明1004の方法。

[本発明1006]

前記細胞のトランスフェクションが、該細胞のフローエレクトロポレーションを含む、本発明1005の方法。

[本発明1007]

以下の工程を含む、細胞における標的ゲノムDNA領域の部位特異的な配列改変のための方法：

該細胞を活性化組成物と接触させる工程；

該細胞に、(a)ドナーDNAと(b)DNA消化剤とを含むトランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程であって、

該ドナーDNAが、

(i) 該標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と；

(ii) 配列改変領域と

を含み；かつ

ゲノムDNA配列が、該標的ゲノムDNA領域において特異的に改変される、工程。

[本発明1008]

前記細胞のトランスフェクションが、該細胞のエレクトロポレーションを含む、本発明1007の方法。

[本発明1009]

前記エレクトロポレーションが、フローエレクトロポレーションデバイスを用いるフローエレクトロポレーションである、本発明1008の方法。

[本発明1010]

前記細胞が、該細胞を前記活性化組成物と接触させた後7日未満の期間にトランスフェクトされる、本発明1007～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記細胞が、該細胞を前記活性化組成物と接触させた後3日未満の期間にトランスフェクトされる、本発明1010の方法。

[本発明1012]

前記細胞が、該細胞を前記活性化組成物と接触させた後2日またはそれ未満の期間にトランスフェクトされる、本発明1011の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1013]

前記細胞が、該細胞を前記活性化組成物と接触させた2日後にトランスフェクトされる、本発明1012の方法。

[本発明1014]

前記DNA消化剤が、TALEN、トランスポザーゼ、インテグラーゼ、およびヌクレアーゼより選択される、本発明1007～1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

前記DNA消化剤が、1つまたは複数のRNA上にコードされている、本発明1007～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

前記DNA消化剤がヌクレアーゼである、本発明1007～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

前記DNA消化剤がCas9である、本発明1016の方法。

[本発明1018]

前記トランスフェクション組成物がガイドRNAをさらに含む、本発明1007～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

前記ヌクレアーゼが部位特異的ヌクレアーゼである、本発明1016の方法。

[本発明1020]

前記ドナーDNAがプラスミドである、本発明1007～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

前記ドナーDNAが導入遺伝子を含む、本発明1007～1019のいずれかの方法。

[本発明1022]

前記ドナーDNAがオリゴである、本発明1007～1019のいずれかの方法。

[本発明1023]

前記ドナーDNAが一本鎖オリゴである、本発明1007～1019のいずれかの方法。

[本発明1024]

前記トランスフェクション組成物中の前記ドナーDNAの濃度が約10～約500 $\mu\text{g/mL}$ である、本発明1007～1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

前記細胞が哺乳動物細胞である、本発明1007～1024のいずれかの方法。

[本発明1026]

前記細胞がヒト細胞である、本発明1025の方法。

[本発明1027]

前記細胞が線維芽細胞である、本発明1025の方法。

[本発明1028]

前記哺乳動物細胞が末梢血リンパ球である、本発明1025の方法。

[本発明1029]

前記哺乳動物細胞が初代T細胞である、本発明1025の方法。

[本発明1030]

前記細胞がナチュラルキラー（NK）細胞である、本発明1025の方法。

[本発明1031]

前記活性化組成物が、抗CD3抗体および抗CD28抗体を含む、本発明1029または1030の方法。

[本発明1032]

前記哺乳動物細胞が幹細胞である、本発明1025の方法。

[本発明1033]

前記幹細胞が造血幹細胞である、本発明1032の方法。

[本発明1034]

前記細胞が間葉系幹細胞である、本発明1032の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1035]

前記哺乳動物細胞が初代細胞である、本発明1025の方法。

[本発明1036]

標的ゲノムDNA配列が疾患関連遺伝子を含む、本発明1007～1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

前記ドナーDNAが疾患関連遺伝子を含む、本発明1007～1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

前記ドナーDNAがキメラ抗原受容体（CAR）を含む、本発明1007～1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

前記ドナーDNAの配列改変領域がCARを含む、本発明1038の方法。

[本発明1040]

前記ドナーDNAが、核酸少なくとも10個の相同配列を含む相同領域を含む、本発明1007～1036のいずれかの方法。

[本発明1041]

前記ドナーDNAが、核酸少なくとも20個の相同配列を含む相同領域を含む、本発明1040の方法。

[本発明1042]

前記ドナーDNAが、核酸少なくとも30個の相同配列を含む相同領域を含む、本発明1041の方法。

[本発明1043]

前記配列改変の効率が0.2%超である、本発明1007～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

前記配列改変の効率が1%超である、本発明1043の方法。

[本発明1045]

前記配列改変の効率が5%超である、本発明1044の方法。

[本発明1046]

トランスフェクション後の細胞生存率が少なくとも30%である、本発明1007～1045のいずれかの方法。

[本発明1047]

前記トランスフェクション後の細胞生存率が少なくとも40%である、本発明1046の方法。

[本発明1048]

前記トランスフェクション後の細胞生存率が少なくとも50%である、本発明1047の方法。

[本発明1049]

前記DNA配列改変が、1つまたは複数の終止コドンである、本発明1007～1048のいずれかの方法。

[本発明1050]

前記配列改変によって、前記ゲノム配列の1塩基対または複数の塩基対が変化する、本発明1007～1048のいずれかの方法。

[本発明1051]

前記配列改変によって、前記ゲノム配列の1塩基対または複数の塩基対が付加される、本発明1007～1048のいずれかの方法。

[本発明1052]

前記配列改変によって、前記ゲノム配列の1塩基対または複数の塩基対が欠失する、本発明1007～1048のいずれかの方法。

[本発明1053]

前記DNA配列改変が、導入遺伝子の部位特異的な標的組込みである、本発明1007～1048のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

[本発明1054]

前記トランスフェクション組成物が、異なる相補配列を有する2つまたはそれ以上のドナーDNAを含む、本発明1007～1053のいずれかの方法。

[本発明1055]

前記トランスフェクション組成物が、2つまたはそれ以上のDNA消化剤を含む、本発明1054の方法。

[本発明1056]

前記トランスフェクション組成物が、2つまたはそれ以上の部位特異的DNA消化剤を含み、該DNA消化剤が、異なるゲノム部位を標的とする、本発明1055の方法。

[本発明1057]

前記DNA配列改変を有するクローン細胞を作製するために、単離および選択されたクローン細胞を増殖させる工程をさらに含む、本発明1007～1056のいずれかの方法。

[本発明1058]

細胞を大規模製造のために増殖させる、本発明1057の方法。

[本発明1059]

細胞を1 L超の容積で増殖させる、本発明1057または1058の方法。

[本発明1060]

細胞を3 Lまたはそれ以上の容積で増殖させる、本発明1059の方法。

[本発明1061]

前記細胞が無血清培地中で培養される、本発明1007～1060のいずれかの方法。

[本発明1062]

前記細胞を前記配列改変についてスクリーニングする工程をさらに含む、本発明1007～1061のいずれかの方法。

[本発明1063]

トランスフェクトされた細胞を凍結させる工程をさらに含む、本発明1007～1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

以前に凍結させたトランスフェクトされた細胞を増殖させる工程をさらに含む、本発明1007～1063のいずれかの方法。

[本発明1065]

以下の工程を含む、標的ゲノムDNA配列のゲノムDNA配列改変を含む安定な細胞株を作製するための方法：

細胞を活性化組成物と接触させる工程；

該細胞に、(a) ドナーDNAと(b) DNA消化剤とを含むトランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程であって、

該ドナーDNAが、

(i) 標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と；

(ii) 配列改変領域と

を含む、工程；および

トランスフェクトされた細胞を、該標的ゲノムDNA領域における該ゲノムDNA配列改変についてスクリーニングする工程；

クローン細胞を得るために、スクリーニングしたトランスフェクトされた細胞を限界希釈により単離する工程；

該ゲノムDNA配列改変を含む安定な細胞株を作製するために、単離したトランスフェクトされた細胞を増殖させる工程。

[本発明1066]

本発明1065の方法により作製された細胞株。

[本発明1067]

本発明1007～1065のいずれかの方法を用いて作製された、トランスフェクトされた細胞。

10

20

30

40

50

[本発明1068]

本発明1067のトランスフェクトされた細胞または本発明1066の細胞株の有効量を投与する工程により、疾患もしくは状態を有する対象または疾患もしくは状態を有することが疑われる対象を処置する方法。

[本発明1069]

本発明1067のトランスフェクトされた細胞または本発明1066の細胞株の有効量を投与する工程を含む、臨床研究方法。

[本発明1070]

以下の工程を含む、それを必要とする対象においてがんを処置する方法：

細胞を活性化組成物と接触させる工程；

該細胞に、(a)ドナーDNAと(b)DNA消化剤とを含むトランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程であって、

該ドナーDNAが、

(i)標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と；

(ii)キメラ抗原受容体(CAR)と

を含み；かつ

ゲノムDNA配列が、該CARを組み込むように該標的ゲノムDNA領域において特異的に改変される、工程；および

該細胞を患者に投与する工程。

[本発明1071]

前記トランスフェクション組成物が非ウイルス性である、本発明1070の方法。

[本発明1072]

前記細胞が自己由来である、本発明1070または1071の方法。

[本発明1073]

前記細胞がT細胞またはNK細胞である、本発明1070または1072の方法。

[本発明1074]

前記がんが、白血病、B細胞悪性腫瘍、または急性リンパ芽球性白血病である、本発明1070～1073のいずれかの方法。

[本発明1075]

前記細胞が、前記患者の血液から単離される、本発明1070～1074のいずれかの方法。

[本発明1076]

前記細胞がアフエレーシスにより単離される、本発明1075の方法。

[本発明1077]

細胞を前記患者から単離する工程をさらに含む、本発明1070～1076のいずれかの方法。

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになると考えられる。しかし、本詳細な説明から本発明の精神および範囲内での種々の変更および改変が当業者には明らかになるため、詳細な説明および具体的な実施例が、本発明の好ましい態様を示しているが、例示としてのみ提供されることを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0053】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の局面をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書に提示される具体的な態様の詳細な説明と一緒にこれらの図面の1つまたは複数を参照することにより良く理解され得る。

【図1】mRNA-CRISPR(gRNA/Cas9 AAVS1)およびプラスミドGFP DNAによるK562におけるGFPの標的組込み。図1は、エレクトロポレーションによるプラスミドGFP DNA(DNA-CRISPR)、またはプラスミドGFP DNAおよびAAVS1部位中への組込みを標的とするgRNA/Cas9 CRISPR複合体(DNA+CRISPR)のトランスフェクション(または対照のエレクトロポレーションなし(-EP))の1、5、および12日後の、GFPを発現する細胞のパーセンテージ(R2)を示す。図1に示すとおり、DNA+CRISPRをトランスフェクトされた細胞の37%が、トランスフェクションの12日後にGFPの発現を維持しており、一方で、DNA-CRISPRをトランスフェク

10

20

30

40

50

トされた細胞の0.8%のみが、トランスフェクションの12日後にGFPの発現を維持していた。

【図2】エレクトロポレーションの前に10日間増殖させたT細胞のDNAプラスミド誘導性の有意な細胞毒性。図2は、非トランスフェクト対照細胞（-EP）、または、エレクトロポレーションによりプラスミドGFP DNA、mRNA-GFP、もしくはCas9/gRNAをトランスフェクトされた細胞の生存率（図2A）、増殖（図2B）、およびGFP発現（図2C）を示す。図2は、プラスミドDNAのトランスフェクションが、増殖させたT細胞において細胞毒性を誘導することを実証する。

【図3】活性化後に増殖させたT細胞のトランスフェクションウインドウ。T細胞を、DYNA BEADS（登録商標）Human T-Activator CD3/CD28（Life Technologiesから商業的に入手可能）により活性化し、次に、活性化後1日目、2日目、または3日目のいずれかに、エレクトロポレーションによりプラスミドDNAをトランスフェクトした。図3は、活性化後1日目（図3A）、2日目（図3B）、および3日目（図3C）にトランスフェクトされた細胞の生存率を示す。

【図4】活性化後に増殖させたT細胞のトランスフェクションウインドウ。T細胞を、DYNA BEADS（登録商標）Human T-Activator CD3/CD28により活性化し、次に、活性化後1日目、2日目、または3日目のいずれかに、エレクトロポレーションによりプラスミドDNAをトランスフェクトした。図4は、活性化後1日目（図4A）、2日目（図4B）、および3日目（図4C）のトランスフェクション後の、GFPを発現する細胞のパーセンテージを示す。

【図5】T細胞を、DYNABEADS（登録商標）Human T-Activator CD3/CD28により活性化し、次に、活性化後1日目、2日目、または3日目のいずれかに、エレクトロポレーションによりプラスミドDNAをトランスフェクトした。図5は、活性化後1日目（図5A）、2日目（図5B）、および3日目（図5C）にトランスフェクトされた細胞の平均蛍光強度（MFI）を示す。

【図6A】活性化後に増殖させたT細胞のトランスフェクションウインドウ。T細胞を、DYNABEADS（登録商標）Human T-Activator CD3/CD28により活性化し、次に、活性化後1日目に、エレクトロポレーションによりプラスミドDNAをトランスフェクトした。図6Aは、活性化後1日目のトランスフェクション後の細胞の増殖を示す（結果は、3回の独立したトランスフェクション実験、および1回のプラスミドDNAを伴わない対照実験由来である）。

【図6B】活性化後に増殖させたT細胞のトランスフェクションウインドウ。T細胞を、DYNABEADS（登録商標）Human T-Activator CD3/CD28により活性化し、次に、活性化後2日目に、エレクトロポレーションによりプラスミドDNAをトランスフェクトした。図6Bは、活性化後2日目のトランスフェクション後の細胞の増殖を示す（結果は、3回の独立したトランスフェクション実験、および1回のプラスミドDNAを伴わない対照実験由来である）。

【図6C】活性化後に増殖させたT細胞のトランスフェクションウインドウ。T細胞を、DYNABEADS（登録商標）Human T-Activator CD3/CD28により活性化し、次に、活性化後3日目に、エレクトロポレーションによりプラスミドDNAをトランスフェクトした。図6Cは、3日目のトランスフェクション後の細胞の増殖を示す（結果は、3回の独立したトランスフェクション実験、および1回のプラスミドDNAを伴わない対照実験由来である）。

【図7】mRNA-CRISPR（gRNA/Cas9 AAVS1）およびプラスミドGFP DNAによる増殖させたT細胞におけるGFPの標的組込み。増殖させたT細胞を、以前に記載した方法に従って活性化し、活性化の2日後にエレクトロポレーションした。図7は、エレクトロポレーションによるプラスミドGFP DNA（DNA-CRISPR）、またはプラスミドGFP DNAおよびAAVS1部位中への組込みを標的とするgRNA/Cas9 CRISPR複合体（DNA+CRISPR）のトランスフェクション（または対照のエレクトロポレーションなし（-EP））の1、4、および11日後の、GFPを発現する細胞のパーセンテージ（R2）を示す。図7に示すとおり、DNA+CRISPRをトランスフェクトされた細胞の4%が、トランスフェクションの11日後にGFPの発現を維持しており、一方で、DNA-CRISPRをトランスフェクトされた細胞の0.3%のみが、トランスフェクションの11日後にGFPの発現を維持していた。

【図8】mRNA-CRISPR（gRNA/Cas9 AAVS1）およびプラスミドGFP DNAによる増殖させたT細胞におけるGFPの標的組込み。増殖させたT細胞を、以前に記載した方法に従って活性化

10

20

30

40

50

し、活性化の2日後にエレクトロポレーションした。図8は、エレクトロポレーションによるプラスミドGFP DNA (DNA-CRISPR)、またはプラスミドGFP DNAおよびAAVS1部位中への組込みを標的とするgRNA/Cas9 CRISPR複合体 (DNA+CRISPR) のトランスフェクション (または対照のエレクトロポレーションなし (-EP)) の6日後の、GFPを発現する細胞のパーセンテージ (R2) を示す。図8に示すとおり、DNA+CRISPRをトランスフェクトされた細胞の2.3%が、トランスフェクションの6日後にGFPの発現を維持しており、一方で、DNA-CRISPRをトランスフェクトされた細胞の0%が、トランスフェクションの6日後にGFPの発現を維持していた。

【図9 A】 AAVS1部位を標的とするmRNA-CRISPR (gRNA/Cas9) およびGFPプラスミドDNA (ドナーDNA) による増殖させたT細胞におけるGFPの標的組込み。細胞を、以前に記載したとおり活性化し、活性化後1、2、3、および4日目にトランスフェクトした。50、100、または200 μ g/mlのGFPプラスミドDNAを、示すとおりこれらの実験に使用した。増殖を、活性化後3、6、10、および14日目にトランスフェクトされた細胞について測定した。組み込まれたイベントの相対数は、GFP陽性細胞のパーセンテージを掛けた細胞数として算出した。

【図9 B】 AAVS1部位を標的とするmRNA-CRISPR (gRNA/Cas9) およびGFPプラスミドDNA (ドナーDNA) による増殖させたT細胞におけるGFPの標的組込み。細胞を、以前に記載したとおり活性化し、活性化後1、2、3、および4日目にトランスフェクトした。50、100、または200 μ g/mlのGFPプラスミドDNAを、示すとおりこれらの実験に使用した。GFP発現細胞のパーセンテージを、活性化後3、6、10、および14日目にトランスフェクトされた細胞について測定した。組み込まれたイベントの相対数は、GFP陽性細胞のパーセンテージを掛けた細胞数として算出した。

【図9 C】 AAVS1部位を標的とするmRNA-CRISPR (gRNA/Cas9) およびGFPプラスミドDNA (ドナーDNA) による増殖させたT細胞におけるGFPの標的組込み。細胞を、以前に記載したとおり活性化し、活性化後1、2、3、および4日目にトランスフェクトした。50、100、または200 μ g/mlのGFPプラスミドDNAを、示すとおりこれらの実験に使用した。組み込まれたイベントの相対数を、活性化後3、6、10、および14日目にトランスフェクトされた細胞について測定した。組み込まれたイベントの相対数は、GFP陽性細胞のパーセンテージを掛けた細胞数として算出した。

【図9 D】 AAVS1部位を標的とするmRNA-CRISPR (gRNA/Cas9) およびGFPプラスミドDNA (ドナーDNA) による増殖させたT細胞におけるGFPの標的組込み。細胞を、以前に記載したとおり活性化し、活性化後1、2、3、および4日目にトランスフェクトした。50、100、または200 μ g/mlのGFPプラスミドDNAを、示すとおりこれらの実験に使用した。細胞生存率を、活性化後3、6、10、および14日目にトランスフェクトされた細胞について測定した。組み込まれたイベントの相対数は、GFP陽性細胞のパーセンテージを掛けた細胞数として算出した。

【図10】 配列改変領域 (大文字および網掛けなし) および相同領域 (小文字および網掛けあり) を有する例示的なドナーDNAオリゴ。図10Aは、標的ゲノムDNA中への付加として終止コドンが挿入されている例を示す。図10Bは、標的ゲノムDNAにおいて単一塩基が変化している例を示す。

【図11】 標的導入遺伝子組込みの例。ドナーDNAが、2000 bpの導入遺伝子Xの配列改変領域、ならびに、小文字および網掛けありの配列として図示される相同領域を有する二本鎖プラスミド (単純にするために配列のうちの一鎖のみを図示する) である例を図示する。プラスミドはまた、マーカー、複製起点などのような追加のプラスミド配列を含んでもよい。

【図12】 mRNA-CRISPRおよびドナープラスミドDNAによるヒト初代線維芽細胞のAAVS1部位におけるPGK-eGFP-PolyAの標的組込み (選択なし)。PGK-eGFP-PolyAをmRNA-CRISPRシステムを伴って (+Cas9/gRNA) または伴わずに (-Cas9/gRNA) トランスフェクトされたヒト初代線維芽細胞のFACS解析を示す。この図に示すとおり、ドナープラスミドDNAおよびCRISPRシステムをトランスフェクトされた細胞のみが、トランスフェクション後15日を超

10

20

30

40

50

えて、安定なGFP発現を示した（4列目の第1プロットと第2プロットとをトランスフェクションの23日後のGFPの発現について、および4列目の第3プロットと第4のプロットとをトランスフェクションの26日後のGFPの発現について比較されたい）。

【図13】 mRNA-CRISPRおよびドナープラスミドDNAによるK562のAAVS1部位におけるSA-2A-eGFP-PolyAの標的組込み（選択なし）。ドナープラスミドDNA（SA-2A-eGFP-PolyA）を、K562細胞のAAVS1部位への組込みを標的とするCRISPRシステム（+）または（-）でトランスフェクトされた細胞の生存率（図13A）、GFP発現（図13B）、および平均蛍光強度（図13C）の解析を示す。ドナーDNAおよびCRISPRシステムをトランスフェクトされた細胞のみが、トランスフェクション後の長期間に、安定なGFP発現および平均蛍光強度を示した。

【図14】 mRNA-CRISPRおよびドナープラスミドDNAによるK562のAAVS1部位におけるPGK-eGFP-PolyAの標的組込み（選択なし）。PGK-eGFP-PolyAをmRNA-CRISPRシステムを伴って（+CRISPR、第2列および第4列）または伴わずに（-CRISPR、第1列および第3列）トランスフェクトされたK562細胞のFACS解析を示す。FACS解析を、トランスフェクション後1、5、6、11、14、19、23、および29日目に細胞に対して行った。この図に示すとおり、ドナープラスミドDNAおよびCRISPRシステムをトランスフェクトされた細胞のみが、トランスフェクション後6日または11日を超えて、安定なGFP発現を示した。

【図15】 mRNA-CRISPRおよびドナープラスミドDNAによる増殖させたT細胞のAAVS1部位におけるPGK-eGFP-PolyAの標的組込み（無選択；活性化後2日目にEP、100ug/ml プラスミドDNA）。PGK-eGFP-PolyAをmRNA-CRISPRシステムを伴って（+CRISPR、第2列および第4列）または伴わずに（-CRISPR、第1列および第3列）トランスフェクトされた、増殖させたヒトT細胞のFACS解析を示す。（以前に記載したとおりの）細胞の活性化の2日後に、細胞にエレクトロポレーションして、FACS解析を、トランスフェクション後1、4、6、7、9、10、12、および14日目に細胞に対して行った。この図に示すとおり、ドナープラスミドDNAおよびCRISPRシステムをトランスフェクトされた細胞のみが、トランスフェクション後4日または6日を超えて、安定なGFP発現を示した。

【図16】 mRNA-CRISPRおよびドナープラスミドDNAによるK562のAAVS1部位におけるPGK-CAR-aCD19BBz-PolyAの標的組込み（選択なし）。PGK-CAR-aCD19BBz-PolyAを、導入遺伝子をAAVS1部位に標的化するmRNA-CRISPRシステムを伴って（+CRISPR）または伴わずに（-CRISPR）トランスフェクトされたK562細胞のFACS解析を示す。FACS解析を、トランスフェクション後1および8日目に細胞に対して行った。この図に示すとおり、ドナープラスミドDNAおよびCRISPRシステムをトランスフェクトされた細胞のみが、トランスフェクション後8日目に、有意な量のGFP発現（44%）を示した。

【発明を実施するための形態】

【0054】

例示的な態様の説明

組成物および方法は、内因性標的ゲノムDNA配列の配列改変に関する。特定の局面は、以下の工程を含む、細胞における標的ゲノムDNA領域の部位特異的な配列改変のための方法に関する：該細胞を活性化組成物と接触させる工程；該細胞に、（a）ドナーDNAと（b）DNA消化剤とを含むトランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程。ドナーDNAは、2つの領域を含む。一方の領域は、標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域であり、他方の領域は、配列改変領域である。上記の方法において、ゲノムDNA配列は、標的ゲノムDNA領域において特異的に改変される。

【0055】

本出願人は、細胞トランスフェクションの前に活性化工程を追加することが、伝統的なゲノム工学アプローチにおけるプラスミドDNAの送達に関連付けられる毒性を克服したことを見出した。この方法の1つの追加的な利点は、導入遺伝子配列の無作為組込みがないことである。標的配列の無作為組込みは、組込み部位を制御することができないために望ましくない効果を引き起こし得る。これらの望ましくない効果は、宿主遺伝子の不活性化、導入遺伝子のサイレンシングまたは妥当な発現の欠如、および導入遺伝子の組込み部位を決定するための大規模なスクリーニング法の必要を含む。この方法は、プラスミドDN

Aに対して毒性を示す細胞のための独自の遺伝子治療アプローチとして使用できることが企図されている。そのような細胞は、初代細胞、幹細胞、初代T細胞、造血前駆細胞、および、当技術分野において公知であり、トランスフェクトすることが難しい細胞として本明細書に記載する他の細胞を含む。

【0056】

核酸

B. ドナーDNA

態様は、細胞にドナーDNAとDNA消化剤とを含む組成物をトランスフェクトすることによる、標的ゲノムDNA配列の配列改変に関する。

【0057】

「内因性ゲノムDNA」という用語は、細胞の染色体DNAを指す。「標的ゲノムDNA配列」という用語は、DNA配列改変が向けられている内因性ゲノムDNA部位を指す。DNA配列改変は、標的ゲノムDNA配列の1つまたは複数の塩基を1つの特定の部位または複数の特定の部位で変化させる改変であり得る。変化は、標的ゲノムDNA配列の1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、またはそれ以上の塩基対を、異なる1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、またはそれ以上の塩基対に変化させることを含み得る。欠失は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、75、100、150、200、300、400、または500塩基対の欠失であり得る。付加は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、またはそれ以上の塩基対の付加であり得る。配列改変が複数の様式で標的ゲノムDNAを変更する場合、配列改変は、変化および欠失、変化および付加などとして分類されてもよい。一態様において、配列改変は、終止コドンである。さらなる態様において、DNA配列改変は、1つまたは複数の終止コドンである。さらなる態様において、DNA配列改変は、1、2、3、4、5、または10個の終止コドンである。配列改変が終止コドンである場合、遺伝子編集の効率および/または信頼性が増大され得る。

【0058】

配列改変が導入遺伝子の組込みである場合、導入遺伝子は、典型的な遺伝子配列の長さ、または遺伝子のコード領域の典型的な長さであってもよい。一部の態様において、配列改変領域における導入遺伝子は、100～10000個の核酸長である。さらなる態様において、導入遺伝子は、500～5000個の核酸長である。一部の態様において、導入遺伝子は、1000～3000個または1000～5000個の核酸長である。

【0059】

DNA配列改変はまた、導入遺伝子の部位特異的な組込みであってもよい。導入遺伝子という用語は、遺伝子工学により宿主ゲノム中へ移入される遺伝子または遺伝物質を指す。導入遺伝子は、宿主において変異または欠損している治療用遺伝子の発現であってもよい。導入遺伝子はまた、トランスフェクトされた細胞のインピボまたはインピトロでの追跡を可能にする、GFPなどのマーカーまたは細胞表面マーカーを含んでもよい。

【0060】

ドナーDNAは、プラスミドDNA、直線化DNA断片、またはオリゴであってもよい。プラスミドDNAとは、環状のDNA片を指す。プラスミドは、1つまたは複数の導入遺伝子を含んでもよい。例えば、プラスミドは、内因性ゲノムDNAにおいて部位特異的に切断を生じさせるDNA消化剤、および、切断点でまたは切断点近くでゲノムDNA中に組み込まれる導入遺伝子をコードしてもよい。

【0061】

「オリゴ」または「オリゴヌクレオチド」という用語は、デオキシリボ核酸（DNA）、および適切な場合にはリボ核酸（RNA）などの、ポリヌクレオチドを指す。この用語はまた、等価物、誘導体、バリエーション、および、ヌクレオチド類似体から作製されたRNAまたはDNAのいずれかの類似体として、ならびに、記載する態様に適用可能な場合、一本鎖（センスまたはアンチセンス）および二本鎖のポリヌクレオチドを含むようにも理解されるべきである。デオキシリボヌクレオチドは、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシン、およびデオキシチミジンを含む。明確にするために、本明細書におい

てDNAまたはRNAであることができる核酸のヌクレオチドに言及する場合、「アデノシン」、「シチジン」、「グアノシン」、および「チミジン」という用語を使用する。核酸がRNAである場合、ウラシル塩基を有するヌクレオチドはウリジンであることが理解される。一部の態様において、オリゴという用語は、150塩基またはそれ未満を有する核酸を定義するように使用される。一部の態様において、オリゴという用語は、100もしくは50もしくは25塩基またはそれ未満を有する核酸を定義するように使用される。

【0062】

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドまたはそれらの類似体のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができ、公知または未知の任意の機能を果たし得る。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、ESTまたはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの、修飾ヌクレオチドを含むことができる。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリヌクレオチドの組み立て前または後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断することができる。ポリヌクレオチドはさらに、例えば標識成分とのコンジュゲーションにより、重合後に修飾することができる。この用語はまた、二本鎖分子および一本鎖分子の両方を指す。特に指定されないかまたは必要でない限り、ポリヌクレオチドである本発明の任意の態様は、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが公知であるかまたは予測される2つの相補的な一本鎖形態の各々との両方を包含する。

【0063】

生物学的に等価のポリヌクレオチドは、指定された相同性パーセントを有し、かつ、同じまたは類似の生物学的活性を有するポリペプチドをコードするものである。

【0064】

特定の態様において、ドナーDNAの相同領域は、100%相同である。さらなる態様において、ドナーDNAの相同領域は、85、90、95、または99%相同である。

【0065】

特定の態様において、ドナーDNAは、標的ゲノムDNA配列に相同である少なくとも約10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、100、200、300、400、500、600、700、800、1000、1200、1400、または1600個（またはこの中から派生する任意の範囲）の核酸の配列を含む。一部の態様において、ドナーDNAは、ゲノムDNA配列と同一である、核酸少なくとも約20個の配列を含む。この文脈において、「同一配列」という用語は、ゲノムDNAの配列に正確に一致する配列を指す。同一配列は、DNA配列改変の5'末端にある領域中およびDNA配列改変の3'末端にある領域中に存在し得る。例示的な例として、ドナーDNAが核酸少なくとも20個の相同配列を含む場合、ドナーDNAは、例えば、配列改変の各々の側に、核酸10個の相同配列を含み得る。同様に、核酸10個の相同配列を含むドナーDNAは、例えば、配列改変の各々の側に、核酸5個の相補配列を含み得る。一部の態様において、相同領域は、標的ゲノム配列に相同である1600個の核酸を含む。一部の態様において、ドナーDNAは、配列改変領域の5'末端に核酸800個の相同領域、配列改変領域の3'末端に核酸800個の相同領域を含む。

【0066】

ドナーDNAが一本鎖DNAオリゴである場合、それは、約10、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、もしくは600個の核酸長から約50、75、100、125、もしくは150個の核酸長、またはそれらの任意の派生する範囲であり得る。特定の態様において、オリゴは、20個より多い核酸、または21、22、23、24、25、30、もしくは40個より多い核酸である。具体的な態様において、オリゴは、

約30～150個の核酸、約25～約150個の核酸、約25～約150個の核酸、約25～約100個の核酸、または約40～約100個の核酸である。

【0067】

トランスフェクション法の最中のドナーDNAの濃度は、トランスフェクション組成物および/またはトランスフェクション試料容器におけるドナーDNAの最終濃度であり得る。ドナーDNA濃度は、約10、20、30、50、75、100、150、200、250、300 $\mu\text{g/mL}$ から約350、400、500、1000、1500、2000、3000、4000、もしくは5000 $\mu\text{g/mL}$ 、またはこの中から派生する任意の範囲であり得る。特定の態様において、ドナーDNAの濃度は、少なくとも30 $\mu\text{g/mL}$ である。さらなる態様において、ドナーDNAの濃度は、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、または200 $\mu\text{g/mL}$ である。

10

【0068】

C. DNA消化剤

本発明は、ドナーDNAとDNA消化剤とをトランスフェクションにより細胞にトランスフェクトすることによって、標的ゲノムDNA配列を改変するための方法を提供する。「DNA消化剤」という用語は、核酸のヌクレオチドサブユニット間の結合（すなわち、ホスホジエステル結合）を切断することが可能な作用物質を指す。具体的な態様において、DNA消化剤は、RNA上にコードされている。他の態様において、DNA消化剤は、タンパク質、酵素、または酵素活性を有する小分子模倣体である。一部の態様において、DNA消化剤は、DNA上にコードされている。具体的な態様において、DNA消化剤は、DNAプラスミド上にコードされている。一部の態様において、DNA消化剤とドナーDNAとは、同じプラスミド上にコードされている。

20

【0069】

一態様において、DNA消化剤はトランスポザーゼである。例えば、脊椎動物の染色体中に、正確に定義されたDNA配列を導入するために設計された合成DNAトランスポゾン（例えば、「スリーピングビューティー（Sleeping Beauty）」トランスポゾンシステム）を使用することができる。スリーピングビューティートランスポゾンシステムは、スリーピングビューティー（SB）トランスポザーゼと、脊椎動物のゲノム中へのDNAの特定の配列を挿入するように設計されたトランスポゾンとで構成されている。DNAトランスポゾンは、単純なカットアンドペースト様式で、1つのDNA部位から別のDNA部位に転位する。転位は、定義されたDNAセグメントが、1つのDNA分子から切り出されかつ同じまたは異なるDNA分子中またはゲノム中の別の部位に移動する、正確なプロセスである。

30

【0070】

全ての他のTc1/マリナー型トランスポザーゼがそうであるとおり、SBトランスポザーゼは、レシピエントDNA配列中のTAジヌクレオチド塩基対にトランスポゾンを挿入する。挿入部位は、同じDNA分子中または別のDNA分子（または染色体）中の他の場所であり得る。ヒトを含む哺乳類のゲノムにおいて、約2億個のTA部位がある。TAの挿入部位は、トランスポゾン組込みのプロセスにおいて重複される。このTA配列の重複は、転位の顕著な特徴であり、一部の実験における機構を確認するために使用される。トランスポザーゼは、トランスポゾン内にコードされることができ、または、トランスポザーゼは、別の供給源によって供給されることができ、その場合、トランスポゾンは非自律性エレメントになる。非自律性トランスポゾンは、挿入後に独立して切除および再挿入し続けることができないため、遺伝子ツールとして最も有用である。ヒトゲノムおよび他の哺乳動物のゲノムにおいて同定されたDNAトランスポゾンの全ては、それらがトランスポザーゼ遺伝子を含んでいるとしても、遺伝子が、非機能的であり、かつ、トランスポゾンを動員することができるトランスポザーゼを生成することができないため、非自律的である。

40

【0071】

さらなる態様において、DNA消化剤はインテグラーゼである。例えば、phiC31インテグラーゼは、バクテリオファージphiC31のゲノム内にコードされた配列特異的リコンビナーゼである。phiC31インテグラーゼは、一方がファージにおいて見出されかつ他方が細菌宿

50

主において見出された付着部位 (att) と呼ばれる34塩基対の2つの配列間の組換えを媒介する。このセリンインテグラーゼは、哺乳動物細胞を含む多くの異なる細胞型において効率的に機能することが示されている。phiC31インテグラーゼの存在において、attB含有ドナープラスミドは、天然attP部位に対する配列類似性を有する部位 (偽attP部位と呼ばれる) での組換えを介して標的ゲノム中に一方向で組み込まれる。phiC31インテグラーゼは、任意のサイズのプラスミドを単一コピーとして組み込むことができ、かつ補因子を必要としない。組み込まれた導入遺伝子は、安定的に発現され、かつ遺伝性である。

【0072】

具体的な態様において、DNA消化剤はヌクレアーゼである。ヌクレアーゼは、核酸を加水分解する酵素である。ヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼとして分類してもよい。エンドヌクレアーゼは、DNAまたはRNA分子の内部において核酸間の結合の加水分解を触媒する酵素群のうちのいずれかである。エキソヌクレアーゼは、DNA鎖またはRNA鎖の末端からの単一ヌクレオチドの加水分解を触媒する酵素群のいずれかである。ヌクレアーゼはまた、それらがDNAまたはRNAを特異的に消化するかどうかに基づいて分類してもよい。DNAの加水分解を特異的に触媒するヌクレアーゼは、デオキシリボヌクレアーゼまたはDNAアーゼと呼ばれてもよいが、その一方で、RNAの加水分解を特異的に触媒するヌクレアーゼは、リボヌクレアーゼまたはRNAアーゼと呼ばれてもよい。一部のヌクレアーゼは、一本鎖または二本鎖のいずれかの核酸配列に特異的である。一部の酵素は、エキソヌクレアーゼ特性およびエンドヌクレアーゼ特性の両方を有する。また、一部の酵素は、DNA配列およびRNA配列の両方を消化することができる。「ヌクレアーゼ」という用語は、核酸配列を加水分解する任意の酵素を一般的に指すように本明細書中で使用される。

【0073】

最適な反応条件は、異なるヌクレアーゼ間で変動する。考慮すべき因子は、温度、pH、酵素補因子、塩組成、イオン強度、および安定剤を含む。商業的に入手可能なヌクレアーゼの供給業者 (例えば、Promega Corp.; New England Biolabs, Inc.) は、各々の酵素についての最適条件に関する情報を提供する。また、大半のヌクレアーゼは、インキュベーションの温度で測定された場合、pH7.2~pH8.5の間で使用される。また、大半のヌクレアーゼは、37 °Cで最大活性を示すが; しかし、一部の酵素は、最適な活性のために、より高いまたはより低い温度を必要とする (例えば、Taq I、65 °C; Sma I、25 °C)。高いDNA濃度は酵素活性を低下させることができ、かつ、薄すぎるDNA濃度は酵素の K_m を下回りまた酵素活性に影響を及ぼすことができるため、DNA濃度もまた因子であることができる。

【0074】

ヌクレアーゼの非制限的な例は、DNAアーゼI、ベンゾナーゼ、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼIII、マングベーンヌクレアーゼ、ヌクレアーゼBAL31、RNAアーゼI、S1ヌクレアーゼ、ラムダエキソヌクレアーゼ、RecJ、およびT7エキソヌクレアーゼを含む。DNAアーゼIは、DNAを非特異的に切断し、5'リン酸化末端および3'ヒドロキシル化末端を有するジヌクレオチド生成物、トリヌクレオチド生成物、およびオリゴヌクレオチド生成物を放出するエンドヌクレアーゼである。DNAアーゼIは、一本鎖および二本鎖DNA、クロマチン、およびRNA:DNAハイブリッドに作用する。エキソヌクレアーゼIは、3'から5'方向での一本鎖DNAからのヌクレオチドの除去を触媒する。エキソヌクレアーゼIIIは、二重鎖DNAの3'ヒドロキシル末端からのモノヌクレオチドの段階的除去を触媒する。エキソヌクレアーゼIIIはまた、二重鎖DNA中のニックにおいて作用して、一本鎖ギャップを生成する。一本鎖DNAは、エキソヌクレアーゼIIIに対して耐性である。マングベーンヌクレアーゼは、DNAの末端から一本鎖伸長部分を分解する。マングベーンヌクレアーゼはまた、RNAエンドヌクレアーゼである。ヌクレアーゼBAL31は、二重鎖DNAの3'および5'末端の両方を分解する。ヌクレアーゼBAL31はまた、ニック、ギャップ、ならびに二本鎖DNAおよびRNAの一本鎖領域で切断する、高度に特異的な一本鎖エンドヌクレアーゼである。RNAアーゼIは、全てのRNAジヌクレオチドで切断する一本鎖特異的RNAエンドヌクレアーゼである。S1ヌクレアーゼは、一本鎖DNAおよびRNAをヌクレオチド鎖分解により分解し、5'ホスホリル末端

生成物をもたらす。二本鎖核酸（DNA：DNA、DNA：RNA、またはRNA：RNA）は、酵素の極めて高い濃度を用いる場合を除き、S1ヌクレアーゼ分解に対して耐性である。ラムダエキソヌクレアーゼは、二重鎖DNAからの5'モノヌクレオチドの除去を触媒する。その好ましい基質は、5'リン酸化二本鎖DNAであるが、ラムダエキソヌクレアーゼも、大きく低下した速度で一本鎖および非リン酸化基質を分解する。ラムダエキソヌクレアーゼは、ニックまたはギャップではDNA消化を開始することができない、RecJは、5'から3'方向でのDNAからのデオキシヌクレオチドリン酸の除去を触媒する一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼである。T7エキソヌクレアーゼは、二重鎖DNAからの5'モノヌクレオチドの除去を触媒する。T7エキソヌクレアーゼは、5'末端からのヌクレオチド除去、または二本鎖DNAのギャップおよびニックにおけるヌクレオチド除去を触媒する。

10

【 0 0 7 5 】

制限エンドヌクレアーゼは、本発明の方法に関連して使用し得るヌクレアーゼの別の例である。制限エンドヌクレアーゼの非限定的な例およびそれらの認識配列を、表1において提供する。

【 0 0 7 6 】

（表1）制限エンドヌクレアーゼについての認識配列

酵素	認識配列	SEQ ID NO:	酵素	認識配列	SEQ ID NO:
AatII	GACGTC		<u>Fnu4H I</u>	GCNGC	
<u>Acc65 I</u>	GGTACC		<u>Fok I</u>	GGATG	
<u>Acc I</u>	GTMKAC		<u>Fse I</u>	GGCCGGCC	

20

酵素	認識配列	SEQ ID NO:	酵素	認識配列	SEQ ID NO:
<u>Aci I</u>	CCGC		<u>Fsp I</u>	TGCGCA	
<u>Acl I</u>	AACGTT		<u>Hae II</u>	RGCGCY	
<u>Afe I</u>	AGCGCT		<u>Hae III</u>	GGCC	
<u>Afl II</u>	CTTAAG		<u>Hga I</u>	GACGC	
<u>Afl III</u>	ACRYGT		<u>Hha I</u>	GCGC	
<u>Age I</u>	ACCGGT		<u>Hinc II</u>	GTYRAC	
<u>Ahd I</u>	GACNNNNNGTC	1	<u>Hind III</u>	AAGCTT	
<u>Alu I</u>	AGCT		<u>Hinf I</u>	GANTC	
<u>Alw I</u>	GGATC		<u>HinPI I</u>	GCGC	
<u>AlwNI</u>	CAGNNNCTG		<u>Hpa I</u>	GTTAAC	
<u>Apa I</u>	GGGCCC		<u>Hpa II</u>	CCGG	
<u>ApaLI</u>	GTGCAC		<u>Hph I</u>	GGTGA	
<u>Apo I</u>	RAATTY		<u>Kas I</u>	GGCGCC	
<u>Asc I</u>	GGCGCGCC		<u>Kpn I</u>	GGTACC	
<u>Ase I</u>	ATTAAT		<u>Mbo I</u>	GATC	
<u>Ava I</u>	CYCGRG		<u>Mbo II</u>	GAAGA	
<u>Ava II</u>	GGWCC		<u>Mfe I</u>	CAATTG	
<u>Avr II</u>	CCTAGG		<u>Mlu I</u>	ACGCGT	
<u>Bae I</u>	NACNNNNGTAPyCN	2	<u>Mly I</u>	GAGTCNNNNN	11
<u>BamHI</u>	GGATCC		<u>Mnl I</u>	CCTC	
<u>Ban I</u>	GGYRCC		<u>Msc I</u>	TGGCCA	
<u>Ban II</u>	GRGCYC		<u>Mse I</u>	TTAA	
<u>Bbs I</u>	GAAGAC		<u>Msl I</u>	CAYNNNNRTG	12
<u>Bbv I</u>	GCAGC		<u>MspA1 I</u>	CMGCKG	
<u>BbvCI</u>	CCTCAGC		<u>Msp I</u>	CCGG	
<u>Bcg I</u>	CGANNNNNNTGC	3	<u>Mwo I</u>	GCNNNNNNNGC	13
<u>BciV I</u>	GTATCC		<u>Nae I</u>	GCCGGC	
<u>Bcl I</u>	TGATCA		<u>Nar I</u>	GGCGCC	
<u>Bfa I</u>	CTAG		<u>Nci I</u>	CCSGG	
<u>Bgl I</u>	GCCNNNNNGGC	4	<u>Nco I</u>	CCATGG	
<u>Bgl II</u>	AGATCT		<u>Nde I</u>	CATATG	
<u>Blp I</u>	GCTNAGC		<u>NgoMI V</u>	GCCGGC	
<u>Bmr I</u>	ACTGGG		<u>Nhe I</u>	GCTAGC	
<u>Bpm I</u>	CTGGAG		<u>Nla III</u>	CATG	
<u>BsaA I</u>	YACGTR		<u>Nla IV</u>	GGNNCC	
<u>BsaB I</u>	GATNNNNATC	5	<u>Not I</u>	GCGGCCGC	
<u>BsaHI</u>	GRCGYC		<u>Nru I</u>	TCGCGA	
<u>Bsa I</u>	GGTCTC		<u>Nsi I</u>	ATGCAT	
<u>BsaJ I</u>	CCNNGG		<u>Nsp I</u>	RCATGY	
<u>BsaW I</u>	WCCGGW		<u>Pac I</u>	TTAATTAA	
<u>BseR I</u>	GAGGAG		<u>PaeR7 I</u>	CTCGAG	
<u>Bsg I</u>	GTGCAG		<u>Pci I</u>	ACATGT	
<u>BsiE I</u>	CGRYCG		<u>PfiF I</u>	GACNNNGTC	
<u>BsiHKA I</u>	GWGCWC		<u>PfiM I</u>	CCANNNNNNTGG	14
<u>BsiW I</u>	CGTACG		<u>PleI</u>	GAGTC	
<u>Bsl I</u>	CCNNNNNNNNGG	6	<u>Pme I</u>	GTTTAAAC	
<u>BsmA I</u>	GTCTC		<u>Pml I</u>	CACGTG	
<u>BsmB I</u>	CGTCTC		<u>PpuM I</u>	RGGWCCY	
<u>BsmF I</u>	GGGAC		<u>PshA I</u>	GACNNNGTC	15
<u>Bsm I</u>	GAATGC		<u>Psi I</u>	TTATAA	
<u>BsoB I</u>	CYCGRG		<u>PspG I</u>	CCWGG	
<u>Bsp1286 I</u>	GDGCHC		<u>PspOM I</u>	GGGCCC	
<u>BspD I</u>	ATCGAT		<u>Pst I</u>	CTGCAG	
<u>BspE I</u>	TCCGGA		<u>Pvu I</u>	CGATCG	
<u>BspH I</u>	TCATGA		<u>Pvu II</u>	CAGCTG	
<u>BspM I</u>	ACCTGC		<u>Rsa I</u>	GTAC	

10

20

30

40

酵素	認識配列	SEQ ID NO:	酵素	認識配列	SEQ ID NO:
<u>BsrB I</u>	CCGCTC		Rsr II	CGGWCCG	
<u>BsrD I</u>	GCAATG		Sac I	GAGCTC	
<u>BsrF I</u>	RCCGGY		Sac II	CCGCGG	
<u>BsrG I</u>	TGTACA		Sal I	GTCGAC	
<u>Bsr I</u>	ACTGG		Sap I	GCTCTTC	
<u>BssH II</u>	GCGCGC		Sau3A I	GATC	
<u>BssK I</u>	CCNGG		<u>Sau96 I</u>	GGNCC	
<u>Bst4C I</u>	ACNGT		<u>Sbf I</u>	CCTGCAGG	
<u>BssS I</u>	CACGAG		<u>Sca I</u>	AGTACT	
<u>BstAP I</u>	GCANNNNTGC	7	<u>ScrF I</u>	CCNGG	
<u>BstB I</u>	TTCGAA		<u>SexA I</u>	ACCWGGT	
<u>BstE II</u>	GGTNACC		<u>SfaN I</u>	GCATC	
<u>BstF5 I</u>	GGATGNN		<u>Sfc I</u>	CTRYAG	
<u>BstN I</u>	CCWGG		<u>Sfi I</u>	GGCCNNNNNGGCC	16
<u>BstU I</u>	CGCG		Sfo I	GGCGCC	
<u>BstX I</u>	CCANNNNNNTGG	8	SgrA I	CRCCGGYG	
<u>BstY I</u>	RGATCY		Sma I	CCCGGG	
<u>BstZ17 I</u>	GTATAC		Sml I	CTYRAG	
<u>Bsu36 I</u>	CCTNAGG		SnaB I	TACGTA	
<u>Btg I</u>	CCPuPyGG		Spe I	ACTAGT	
<u>Btr I</u>	CACGTG		Sph I	GCATGC	
<u>Cac8 I</u>	GCNNGC		Ssp I	AATATT	
<u>Cla I</u>	ATCGAT		Stu I	AGGCCT	
<u>Dde I</u>	CTNAG		Sty I	CCWWGG	
<u>Dpn I</u>	GATC		Swa I	ATTTAAAT	
<u>Dpn II</u>	GATC		Taq I	TCGA	
<u>Dra I</u>	TTTAAA		Tfi I	GAWTC	
<u>Dra III</u>	CACNNNGTG		Tli I	CTCGAG	
<u>Drd I</u>	GACNNNNNNGTC	9	Tse I	GCWGC	
<u>Eae I</u>	YGGCCR		Tsp45 I	GTSAC	
<u>Eag I</u>	CGGCCG		Tsp509 I	AATT	
<u>Ear I</u>	CTCTTC		TspR I	CAGTG	
<u>Eci I</u>	GGCGGA		Tth111 I	GACNNNGTC	
<u>EcoN I</u>	CCTNNNNNAGG	10	Xba I	TCTAGA	
<u>EcoO109 I</u>	RGGNCCY		Xcm I	CCANNNNNNNNTGG	17
<u>EcoR I</u>	GAATTC		Xho I	CTCGAG	
<u>EcoR V</u>	GATATC		Xma I	CCCGGG	
<u>Fau I</u>	CCCGCNNNN		Xmn I	GAANNNTTC	18

RはAまたはGであり、KはGまたはTであり、SはGまたはCであり、YはCまたはTであり、MはAまたはCであり、WはAまたはTであり、BはAではなく（C、G、またはTであり）、HはGではなく（A、C、またはTであり）、DはCではなく（A、G、またはTであり）、VはTではなく（A、C、またはGであり）、かつNは任意のヌクレオチドである。

【0077】

当業者は、標的ゲノム配列とドナーDNAとの特徴に依存し、適切なヌクレアーゼを選択することができる。一態様において、ヌクレアーゼは、部位特異的なヌクレアーゼである。関連する態様において、ヌクレアーゼは、少なくとも8、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも14、少なくとも16、少なくとも18、少なくとも20、または少なくとも25塩基対の認識配列を有する。

【0078】

一態様において、部位特異的なヌクレアーゼは、Casヌクレアーゼである。関連する態様において、CasヌクレアーゼはCas9である。さらなる態様において、ヌクレアーゼはcas9であり、かつ組成物はガイドRNAをさらに含む。本明細書に記載する方法および組成物と共に使用することができる配列特異的なヌクレアーゼ系の別の例は、Cas9/CRISPR系（Wiedenheft, B. et al. Nature 482, 331-338 (2012); Jinek, M. et al. Science 337, 816

-821 (2012) ; Mali, P. et al. Science 339, 823-826 (2013) ; Cong, L. et al. Science 339, 819-823 (2013)) を含む。Cas9/CRISPR (Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeats) 系では、標的DNAのRNAガイドDNA結合および配列特異的切断が用いられる。ガイドRNA/Cas9の組み合わせは、ヌクレアーゼに部位特異性を付与する。ガイドRNA (gRNA) は、ゲノムPAM (プロトスペーサー隣接モチーフ) 部位 (NNG) および定常RNA足場領域の上流の標的ゲノムDNA配列に相補的である約20個のヌクレオチドを含む。Cas (CRISPR関連) 9タンパク質は、gRNAおよび標的DNAに結合し、それに対してgRNAが結合し、PAM部位の上流の定義された場所において二本鎖切断を導入する。Cas9は、HNHおよびRuvCエンドヌクレアーゼに相同な2つの独立したヌクレアーゼドメインを保有し、2つのドメインのいずれかを変異させることにより、Cas9タンパク質は、一本鎖切断を導入するニックーゼに変換されることができる (Cong, L. et al. Science 339, 819-823 (2013))。具体的には、本発明の方法および組成物は、Cas9の一本鎖または二本鎖誘発バージョンと共に、ならびに、他の細菌Cas9様システムなどの他のRNA誘導DNAヌクレアーゼと共に使用することができることが企図されている。本明細書に記載する方法および組成物の配列特異的ヌクレアーゼは、遺伝子操作すること、キメラであること、または生物から単離することができる。配列特異的ヌクレアーゼは、mRNAなどの、配列特異的ヌクレアーゼをコードするRNAの形態で細胞に導入することができる。

【 0 0 7 9 】

一態様において、DNA消化剤は、ジンクフィンガーヌクレアーゼなどの部位特異的なヌクレアーゼである。ジンクフィンガーヌクレアーゼは一般的に、DNA結合ドメイン (すなわち、ジンクフィンガー) および切断ドメイン (すなわち、ヌクレアーゼ) を含む。ジンクフィンガー結合ドメインは、選択した任意の核酸配列を認識し、それに結合するように遺伝子操作してもよい。例えば、Beerli et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:135-141 ; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340 ; Isalan et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19:656-660 ; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637 ; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416 ; Zhang et al. (2000) J. Biol. Chem. 275(43):33850-33860 ; Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:702-708 ; およびSantiago et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:5809-5814を参照のこと。遺伝子操作されたジンクフィンガー結合ドメインは、天然のジンクフィンガータンパク質と比較して、新規な結合特異性を有し得る。遺伝子操作方法は、合理的な設計、および種々の型の選択を含むが、これらに限定されない。合理的設計は、例えば、各々のダブルット、トリプレット、またはクアドラプレットヌクレオチド配列が、特定のトリプレットまたはクアドラプレット配列に結合するジンクフィンガーの1つまたは複数のアミノ酸配列に関連付けられる、ダブルット、トリプレット、および/またはクアドラプレットヌクレオチド配列と個々のジンクフィンガーアミノ酸配列とを含むデータベースを使用することを含む。例えば、米国特許第6,453,242号および同第6,534,261号を参照のこと。それらの開示は、それらの全体において、参照により本明細書中に組み入れられる。1つの例として、米国特許第6,453,242号において記載するアルゴリズムを使用し、予め選択された配列を標的にするためのジンクフィンガー結合ドメインを設計してもよい。

【 0 0 8 0 】

代替の方法、例えば、非縮退認識コード表を使用する合理的設計も、特定の配列を標的にするためのジンクフィンガー結合ドメインを設計するために使用してもよい (Sera et al. (2002) Biochemistry 41 :7074-7081) 。DNA配列における潜在的な標的部位を同定し、ジンクフィンガー結合ドメインを設計するための公的に入手可能なウェブベースのツールを、<http://www.zincfingertools.org>および<http://bindr.gdcb.iastate.edu/ZiFiT/>でそれぞれ見出すことができる (Mandell et al. (2006) Nuc. Acid Res. 34:W516-W523 ; Sander et al. (2007) Nuc. Acid Res. 35:W599-W605) 。

【 0 0 8 1 】

ジンクフィンガー結合ドメインは、約3個のヌクレオチド長から約21個のヌクレオチド長、好ましくは約9個のヌクレオチド長から約18個のヌクレオチド長の範囲のDNA配列を認

識するようにまたは該DNA配列に結合するように設計され得る。一般的に、ジンクフィンガー結合ドメインは、少なくとも3つのジンクフィンガー認識領域（すなわち、ジンクフィンガー）を含む。一態様において、ジンクフィンガー結合ドメインは、4つのジンクフィンガー認識領域を含み得る。別の態様において、ジンクフィンガー結合ドメインは、5つのジンクフィンガー認識領域を含み得る。さらに別の態様において、ジンクフィンガー結合ドメインは、6つのジンクフィンガー認識領域を含み得る。ジンクフィンガー結合ドメインは、任意の適切な標的DNA配列に結合するように設計され得る。例えば、米国特許第6,607,882号、同第6,534,261号、および同第6,453,242号を参照のこと。それらの開示は、それらの全体において、参照により本明細書中に組み入れられる。

【0082】

10

ジンクフィンガー認識領域を選択する例示的な方法は、ファージディスプレイおよびツールハイブリッドシステムを含み得、米国特許第5,789,538号；同第5,925,523号；同第6,007,988号；同第6,013,453号；同第6,410,248号；同第6,140,466号；同第6,200,759号；および同第6,242,568号；ならびにWO 98/37186;WO 98/53057;WO 00/27878;WO 01/88197およびGB 2,338,237に開示されており、その全体において、参照により本明細書中に組み入れられる。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインについての結合特異性の増強が、例えば、WO 02/077227に記載されている。

【0083】

ジンクフィンガー結合ドメイン、ならびに融合タンパク質（および、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド）の設計および構築のための方法が当業者に公知であり、米国特許出願公開第20050064474号および同第20060188987号に詳細に記載されており、各々が、その全体において参照により本明細書中に組み入れられる。ジンクフィンガー認識領域および/またはマルチフィンガージンクフィンガータンパク質は、例えば、5個またはそれ以上の長さのアミノ酸のリンカーを含む、適切なリンカー配列を使用して一緒に連結されてもよい。6個またはそれ以上の長さのアミノ酸のリンカー配列の非限定的な例について、米国特許第6,479,626号；同第6,903,185号；および同第7,153,949号を参照のこと。それらの開示は、それらの全体において、参照により本明細書中に組み入れられる。本明細書に記載するジンクフィンガー結合ドメインは、タンパク質の個々のジンクフィンガー間に適切なリンカーの組み合わせを含んでもよい。

20

【0084】

30

一部の態様において、ジンクフィンガーヌクレアーゼはさらに、核局在化シグナルまたは配列（NLS）を含んでもよい。NLSは、染色体中の標的配列に二本鎖切断を導入するために、核中へのジンクフィンガーヌクレアーゼタンパク質の標的化を促進するアミノ酸配列である。核局在化シグナルは、当技術分野において公知である。例えば、Makkerh et al. (1996) *Current Biology* 6:1025-1027を参照のこと。

【0085】

ジンクフィンガーヌクレアーゼはまた、切断ドメインを含む。ジンクフィンガーヌクレアーゼの切断ドメイン部分は、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得てもよい。切断ドメインが由来し得るエンドヌクレアーゼの非限定的な例は、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼを含むが、これらに限定されない。例えば、2002-2003 Catalog, New England Biolabs, Beverly, Mass.; および Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388またはwww.neb.com.を参照のこと。DNAを切断するさらなる酵素が公知である（例えば、S1ヌクレアーゼ；マングベーンヌクレアーゼ；腭臓DNアーゼI；ミクロコッカスヌクレアーゼ；酵母H0エンドヌクレアーゼ）。また、Linn et al. (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993を参照のこと。これらの酵素（またはその機能的断片）の1つまたは複数、切断ドメインの供給源として使用してもよい。

40

【0086】

切断ドメインはまた、上に記載するとおり、切断活性のために二量体化を必要とする酵素またはその一部に由来し得る。2つのジンクフィンガーヌクレアーゼは、各々のヌクレ

50

アーゼが、活性酵素二量体の単量体を含むため、切断のために必要とされ得る。あるいは、単一のジンクフィンガーヌクレアーゼは、活性酵素二量体を作製するために、両方のモノマーを含んでもよい。本明細書において使用する場合、「活性酵素二量体」は、核酸分子を切断することが可能な二量体酵素である。2つの切断単量体は、同じエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来してもよいが、または、各々のモノマーは、異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来してもよい。

【0087】

2つの切断モノマーは活性酵素二量体を形成するために使用される場合、2つのジンクフィンガーヌクレアーゼの認識部位は、それぞれの認識部位への2つのジンクフィンガーヌクレアーゼの結合により、切断モノマーが二量体化などにより活性酵素二量体を形成することが可能になる互い対して空間的な方向に切断モノマーが置かれるように、配置されることが好ましい。その結果、認識部位の近位端部は、約5～約18個のヌクレオチドにより分離され得る。例えば、近位端部は、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18個のヌクレオチドにより分離され得る。しかし、任意の整数（例えば、約2～約50個のヌクレオチド対またはそれ以上）のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、2つの認識部位間に介在してもよいことが理解されるであろう。例えば本明細書に詳細に記載されるものなどの、亜鉛フィンガーヌクレアーゼの認識部位の近位端部は、6個のヌクレオチドにより分離され得る。一般的には、切断の部位は認識部位間に位置する。

【0088】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は多くの種に存在し、DNAへの配列特異的結合（認識部位での）、および結合の部位でのまたは結合の部位の近くでのDNA切断が可能である。特定の制限酵素（例えばIIS型）が、認識部位から除去された部位でDNAを切断し、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを有する。例えば、IIS型酵素FokIは、一方の鎖上のその認識部位から9ヌクレオチドにおいておよび他方の鎖上のその認識部位から13ヌクレオチドにおいて、DNAの二本鎖切断を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号；同第5,436,150号および同第5,487,994号；ならびにLi et al.(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279；Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768；Kim et al.(1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :883-887；Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982を参照のこと。このよう、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、少なくとも1つのIIS型制限酵素由来の切断ドメインおよび1つまたは複数のジンクフィンガー結合ドメインを含んでもよく、それらは、遺伝子操作されてもまたはされなくてもよい。例示的なIIS型制限酵素が、例えば、国際公報WO 07/014,275に記載されており、その開示は、その全体において、参照により本明細書中に組み入れられる。追加の制限酵素も、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを含み、これらも、本開示により企図されている。例えば、Roberts et al.(2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420を参照のこと。

【0089】

別の態様において、標的酵素は、メガヌクレアーゼであり得る。メガヌクレアーゼは、大きな認識部位を特徴とするエンドデオキシリボヌクレアーゼあり、すなわち、認識部位は一般的に、約12塩基対～約40塩基対の範囲である。この要件の結果として、認識部位は一般的に、任意の所与のゲノム中で1回だけ見出される。天然のメガヌクレアーゼは、15～40塩基対の切断部位を認識し、通常では4つのファミリーに分類される：LAGLIDADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-Cystボックスファミリー、およびHNHファミリー。当業者に周知の技術を使用し、それらの認識配列を改変することにより、メガヌクレアーゼは、特定の染色体配列を標的にすることができる。

【0090】

さらなる態様において、標的エンドヌクレアーゼは、転写活性化因子様エフェクター（TALE）ヌクレアーゼであり得る。TALEは、新たなDNA標的に結合するように容易に遺伝子操作することができる植物病原体キサントモナス（Xanthomonas）由来の転写因子である。TALEまたはその切断型は、TALEヌクレアーゼまたはTALENと呼ばれる標的エンドヌクレ

10

20

30

40

50

アーゼを作製するために、FokIなどのエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに連結してもよい。

【0091】

さらに別の態様において、標的エンドヌクレアーゼは、部位特異的なヌクレアーゼであり得る。特に、部位特異的なヌクレアーゼは、その認識配列がゲノム中で稀にしか見出されない「レアカッター」エンドヌクレアーゼであり得る。好ましくは、部位特異的なヌクレアーゼの認識配列は、ゲノム中で1回だけ見出される。

【0092】

さらに別の態様において、標的エンドヌクレアーゼは、人工的な標的DNA二本鎖切断誘導剤（また、人工的な制限DNAカッターと呼ばれる）であり得る。例えば、人工的な標的DNA二本鎖切断誘導剤は、DNAおよび標的切断部位に相補的である少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを切断する金属/キレート剤複合体を含んでもよい。従って、人工的な標的DNA二本鎖切断誘導剤は、いずれのタンパク質も含まない。金属/キレート剤複合体の金属は、セリウム、カドミウム、コバルト、クロム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、および亜鉛などであり得る。金属/キレート剤複合体のキレート剤は、EDTA、EGTA、BAPTAなどであり得る。好ましい態様においては、金属/キレート剤複合体は、Ce(IV)/EGTAであり得る。別の好ましい態様においては、人工的な標的DNA二本鎖切断誘導剤は、Ce(IV)/EGTAの複合体および偽相補的（pseudo-complementary）ペプチド核酸（PNA）の2つの鎖を含み得る（Katada et al., Current Gene Therapy, 2011, 11(1): 38-45）。

【0093】

さらなる態様において、ヌクレアーゼは、ホーミングヌクレアーゼであり得る。ホーミングエンドヌクレアーゼは、1-5'cel、I-CeuI、I-PspI、VI-Sce、I-SceTV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-Tev、およびI-7evIIIを含む。それらの認識配列は公知である。また、米国特許第5,420,032号；米国特許第6,833,252号；Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388；Oujon et al. (1989) Gene 82: 115-118；Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127；Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228；Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263: 163-180；Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353、およびNew England Biolabsカタログを参照のこと。

【0094】

特定の態様において、ヌクレアーゼは、遺伝子操作された（非天然）ホーミングエンドヌクレアーゼ（メガヌクレアーゼ）を含む。I-SceI、I-CeuI、VI-PspI、VI-Sce、I-SceIN、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII、およびI-7evIIIなどのホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼの認識配列が公知である。また、米国特許第5,420,032号；米国特許第6,833,252号；Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388；Oujon et al. (1989) Gene 82: 115-118；Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127；Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228；Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180；Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353およびNew England Biolabsカタログを参照のこと。また、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合特異性は、非天然標的部位に結合するように遺伝子操作することができる。例えば、Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905；Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962；Ashworth et al. (2006) Nature 441:656-659；Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66；米国特許公開第20070117128号を参照のこと。ホーミングエンドヌクレアーゼおよびメガヌクレアーゼのDNA結合ドメインは、ヌクレアーゼの関連において、全体として変化させてもよく（すなわち、ヌクレアーゼが、同族切断ドメインを含むようにする）、または異種切断ドメインに融合してもよい。

【0095】

一態様において、DNA消化剤は、オメガ、ジンクフィンガー、TALE、およびCRISPR/Cas9からなる群の部位特異的なヌクレアーゼであるか、またはそれらからなる群より選択され

る。

【0096】

D. マーカー

本発明の特定の態様において、ゲノムDNA配列改変を含む細胞、または本発明の組成物をトランスフェクトされた細胞は、組成物中にマーカーを含めることにより、インビトロまたはインビボで同定され得る。マーカーは、ドナーDNAと同じプラスミドDNA上もしくは直線化DNA上に存在し得るか、またはマーカーはDNAの別個の断片上に存在し得る。そのようなマーカーは、細胞に同定可能な変化を付与し、組成物をトランスフェクトされた細胞の簡単な同定を可能にする。一般的に、選択可能マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。陽性選択可能マーカーは、その中でのマーカーの存在によって、その選択が可能になるものであり、一方で、陰性選択可能マーカーは、その中でのその存在によって、その選択が妨げられるものである。陽性選択可能マーカーの例は、薬物耐性マーカーまたは抗生物質耐性遺伝子/マーカーである。

10

【0097】

通常、薬物選択可能マーカーの包含は、形質転換体のクローニングおよび識別を助力し、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、G418、フレオマイシン、ブラストサイジン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択可能マーカーである。条件の実施に基づいて形質転換体の同定を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、GFPなどのスクリーニング可能なマーカーを含み基礎が比率色分析である他の型のマーカーも企図されている。あるいは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (tk) またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) などのスクリーニング可能な酵素を用いてもよい。当業者にはまた、恐らくはFACS分析と併せて、免疫学的マーカーを使用する方法が公知である。選択可能マーカーおよびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例が、当業者に周知である。特定の態様において、マーカーは、蛍光マーカー、酵素マーカー、発光マーカー、光活性化マーカー、光変換 (photoconvertible) マーカー、または比率色マーカーである。蛍光マーカーは、例えば、GFP、およびYFP、RFPなどのようなバリエーション、ならびにDsRed、mPlum、mCherry、YPet、エメラルド、CyPet、T-サファイア、およびピーナスなどの他の蛍光タンパク質を含む。光活性化マーカーは、例えば、KFP、PA-mRFP、およびドロンプを含む。光変換マーカーは、例えば、mEosFP、KikGR、およびPS-CFP2を含む。発光タンパク質は、例えば、ネプチューン、FP595、およびフィアリジン (phialidin) を含む。スクリーニングマーカーの非限定的な例は含む。

20

30

【0098】

本発明において使用されるマーカーは、RNA上またはDNA上にコードされ得る。具体的な態様において、マーカーは、プラスミドDNA上にコードされている。一部の態様において、マーカーおよびドナーDNAは同じプラスミド上に存在する。

【0099】

特定の局面において、エレクトロポレーション後、エレクトロポレーションされた組成物を内部移行した細胞は、陰性選択により選択される。他の局面において、エレクトロポレーション後、エレクトロポレーションされた構築物を内部移行した細胞は、陽性選択により選択される。一部の局面において、選択は、耐性遺伝子を発現しなかったかまたはエレクトロポレーションの最中に選択耐性遺伝子を取り込まなかった細胞の生存性を危うくする選択物質の濃度に細胞を曝露することを含む。一部の局面において、選択は、選択物質の条件付き致死濃度に細胞を曝露することを含む。特定の局面において、選択物質または化合物は、抗生物質である。他の局面において、選択物質は、単独でまたは併用してのいずれかで、G418 (ジェネティシンおよびG418サルフェートとしても公知である)、ピューロマイシン、ゼオシン、ハイグロマイシン、フレオマイシン、またはブラストサイジンである。特定の局面において、選択物質の濃度は、0.1 µg/L ~ 0.5 µg/L、0.5 µg/L ~ 1 µg/L、1 µg/L ~ 2 µg/L、2 µg/L ~ 5 µg/L、5 µg/L ~ 10 µg/L、10 µg/L ~ 100 µg/L、100 µg/L ~ 500 µg/L、0.1 mg/L ~ 0.5 mg/L、0.5 mg/L ~ 1 mg/L、1 mg/L ~ 2 mg/L、2 mg/L ~ 5 mg/L、5 mg/L

40

50

～10mg/L、10mg/L～100mg/L、100mg/L～500mg/L、0.1g/L～0.5g/L、0.5g/L～1g/L、1g/L～2g/L、2g/L～5g/L、5g/L～10g/L、10g/L～100g/L、もしくは100g/L～500g/Lの範囲内またはこの中から派生する任意の範囲内である。特定の局面において、選択物質の濃度は(y)g/Lであり、「y」は、非限定的に、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、またはこの中から派生する任意の範囲を含む任意の値であることができる。一部の態様において、選択物質は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、もしくは10g/Lまたはこの中から派生する任意の範囲の条件付き致死濃度で培地中に存在する。

【0100】

特定の態様において、核酸セグメントの全長がかなり変動し得るように、核酸セグメントを、コード配列自体の長さとは無関係に、他の核酸配列、例えば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、多重クローニング部位、他のコードセグメントなどと組み合わせてもよい。

【0101】

E. ベクター

ドナーDNAなどのポリペプチドは、例えば、組成物中の核酸分子によりコードされ得る。特定の態様において、核酸分子は、核酸ベクターの形態であることができる。「ベクター」という用語を、異種核酸配列が複製および発現されることができる細胞中への導入のためにこの異種核酸配列を挿入することができる担体核酸分子を指すように使用する。核酸配列は、「異種」であることができ、それは、ベクターが導入される細胞または組み込まれた核酸に対して外来である状況で存在することを意味し、それは、細胞中または核酸中の配列に相同であるが、それが通常は見出されない宿主細胞内または核酸内のある位置にある、配列を含む。ベクターは、DNA、RNA、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス）、および人工染色体（例えばYAC）を含む。当業者は、十分に、標準的な組換え技術を介してベクターを構築するために十分に備えていると考えられる（例えば、Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1996、両方とも参照により本明細書に組み入れられる）。ベクターは、抗体を産生するために宿主細胞中で使用され得る。

【0102】

「発現ベクター」という用語は、転写されること、または、宿主細胞のゲノム中に安定して組み込まれ、その後、転写されることが可能である遺伝子産物の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含むベクターを指す。一部の場において、RNA分子は、次に、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。発現ベクターは、種々の「制御配列」を含むことができ、特定の宿主生物において動作可能に連結されたコード配列の転写および、恐らくは、翻訳に必要な核酸配列を指す。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能をも果たし、ならびに本明細書に記載する核酸配列を含み得る。マーカーを発現する発現ベクターが本発明において有用であり得ることが企図されている。他の態様において、マーカーはmRNA上にコードされておりかつ発現ベクター中には存在しない。

【0103】

「プロモーター」は制御配列である。プロモーターは、典型的には、転写の開始および速度が制御される核酸配列の領域である。それは、調節タンパク質および分子が、例えばRNAポリメラーゼおよび他の転写因子として結合し得る遺伝的エレメントを含み得る。「動作可能に位置づけられる」、「動作可能に連結される」、「制御下」、および「転写制

御下」という用語は、核酸配列の転写開始および発現を制御するためにその核酸配列に対して、正しい機能的な位置および/または向きにあることを意味する。プロモーターは、「エンハンサー」と共に使用され得るかまたは使用され得ないが、それは、核酸配列の転写活性化に含まれるシス作用性調節配列を指す。

【0104】

ペプチドまたはタンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現を制御するために使用される特定のプロモーターは、それが、標的細胞、好ましくは細菌細胞においてポリヌクレオチドを発現することが可能である限り、決定的でないと考えられる。ヒト細胞が標的化される場合、ヒト細胞において発現可能なプロモーターに隣接し、その制御下にポリヌクレオチドのコード領域を位置づけることが好ましい。一般的に言うと、そのようなプロモーターは、細菌、ヒト、またはウイルスのプロモーターのいずれかを含み得る。

10

【0105】

特定の開始シグナルもまた、コード配列の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは隣接配列を含む。ATG開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルが与えられる必要がある場合がある。当業者は容易にこれを決定し、必要なシグナルを与えることができると考えられる。

【0106】

ベクターは、ベクターを消化するための標準的な組換え技法と組み合わせていずれも使用することができる複数の制限酵素部位を含む核酸領域である多重クローニング部位(MCS)を含むことができる(参照により本明細書に組み入れられる、Carbonelli et al., 1999、Levenson et al., 1998, and Cocea, 1997を参照のこと。)

20

【0107】

大半の転写された真核生物RNA分子が、RNAスプライシングを受けて、一次転写物からイントロンを除去する。真核生物ゲノム配列を含むベクターは、タンパク質発現のための転写物の適切なプロセッシングを確実にするために、ドナーおよび/またはアクセプタースプライシング部位を必要とし得る(参照により本明細書に組み入れられる、Chandler et al., 1997を参照のこと。)

【0108】

ベクターまたは構築物は、一般的に、少なくとも1つの終結シグナルを含む。「終結シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写物の特異的終結に含まれるDNA配列で構成されている。このように、特定の態様において、RNA転写物の産生を終わらせる終結シグナルが検討される。ターミネーターは、望ましいメッセージレベルを達成するために、インピボで必要であり得る。真核生物系において、ターミネーター領域はまた、ポリアデニル化部位を曝露するように、新たな転写物の部位特異的な切断を可能にする特定のDNA配列を含み得る。これは、転写物の3'末端にひと続きの約200のA残基(ポリA)を加えるために、特殊化された内因性ポリメラーゼにシグナル伝達する。このポリAテールで修飾されたRNA分子は、より安定であると考えられ、より効率的に翻訳される。このように、真核細胞を含む他の態様において、そのターミネーターは、RNAの切断のためのシグナルを含むことが好ましく、ターミネータシグナルが、メッセージのポリアデニル化を促すことがより好ましい。

30

40

【0109】

発現、特に真核生物発現において、典型的には、転写物の適切なポリアデニル化をもたらすためのポリアデニル化シグナルを含む。

【0110】

宿主細胞中でベクターを増殖させるために、ベクターには、複製を開始する特定の核酸配列である、複製部位の1つまたは複数の起点(しばしば「ori」と呼ばれる)が含まれ得る。あるいは、宿主細胞が酵母である場合に、自己複製配列(ARS)を用いることができる。

【0111】

一部のベクターは、それが原核細胞および真核細胞の両方において複製および/または

50

発現されることを可能にする制御配列を用いてもよい。当業者は、上記の宿主細胞の全てをインキュベートし、それらを維持し、ベクターの複製を可能にするための条件をさらに理解すると考えられる。また、ベクターの大規模生成、ならびにベクターおよびその同族ポリペプチド、タンパク質、またはペプチドによりコードされた核酸の生成を可能にする技術および条件が理解されておりかつ公知である。

【0112】

特定の具体的な態様において、エレクトロポレーションにより細胞中にトランスフェクトされた組成物は、非ウイルス性である（すなわち、いずれのウイルス成分も含まない）。非ウイルス方法は、毒性を低下させること、および/または方法の安全性を向上させることが企図されている。RNAとして提供する小さな一本鎖DNAオリゴおよびDNA消化剤の使用の組み合わせは、ゲノムDNA配列改変の減少した細胞毒性および増大した効率という利点を提供することが企図されている。

10

【0113】

F. 核酸配列の修飾

本開示の文脈において、「非修飾ドナーDNA」という用語は、一般的にリボ核酸（RNA）またはデオキシリボ核酸（DNA）のオリゴマーまたはポリマーを指す。一部の態様において、核酸分子は、非修飾DNAを含む。この用語は、天然の核酸塩基、糖、および共有結合ヌクレオシド間連結で構成される、DNAを含む。「DNAアナログ」という用語は、オリゴヌクレオチドと類似の様式で機能する1つまたは複数の非天然部分を有するDNAを指す。そのような非天然のオリゴヌクレオチドは、望ましい特性、例えば、増強された細胞取り込み、他のオリゴヌクレオチドまたは核酸標的についての増強された親和性、およびヌクレアーゼの存在における増大した安定性のために、天然形態を上回って選択されることが多い。「オリゴヌクレオチド」という用語を、非修飾オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体を指すように使用することができる。

20

【0114】

核酸分子の具体例は、修飾、すなわち非天然ヌクレオシド間連結を含む、核酸分子を含む。そのような非天然ヌクレオシド間連結は、望ましい特性、例えば、増強された細胞取り込み、他のオリゴヌクレオチドまたは核酸標的についての増強された親和性、およびヌクレアーゼの存在における増大した安定性のために、天然形態を上回って選択されることが多い。具体的な態様において、修飾はメチル基を含む。

30

【0115】

核酸分子は、1つまたは複数の修飾ヌクレオシド間連結を有することができる。本明細書において定義するとおり、修飾ヌクレオシド間連結を有するオリゴヌクレオチドは、リン原子、および、リン原子を有さないヌクレオシド間連結を保持するヌクレオシド間連結を含む。本明細書の目的のために、および、当技術分野において時折参照されるとおり、そのヌクレオシド間骨格中にリン原子を有さない修飾オリゴヌクレオチドも、オリゴヌクレオシドであると考えることができる。

【0116】

核酸分子に対する修飾は、1つまたは両方の末端ヌクレオチドが修飾された修飾を含むことができる。

40

【0117】

1つの適切なリン含有修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。多数の他の修飾オリゴヌクレオチド骨格（ヌクレオシド間連結）が、当技術分野において公知であり、本態様の文脈において有用であり得る。

【0118】

リン含有ヌクレオシド間連結の調製を教示する代表的な米国特許は、米国特許第3,687,808号；同第4,469,863号；同第4,476,301号；同第5,023,243号；同第5,177,196号；同第5,188,897号；同第5,264,423号；同第5,276,019号；同第5,278,302号；同第5,286,717号；同第5,321,131号；同第5,399,676号；同第5,405,939号；同第5,453,496号；同第5,455,233号；同第5,466,677号；同第5,476,925号；同第5,519,126号；同第5,536,821号；同第5,5

50

41,306号；同第5,550,111号；同第5,563,253号；同第5,571,799号；同第5,587,361号；同第5,194,599号；同第5,565,555号；同第5,527,899号；同第5,721,218号；同第5,672,697号；同第5,625,050号；同第5,489,677号、および同第5,602,240号を含むが、これらに限定されない。それらの各々が、参照により本明細書中に組み入れられる。

【0119】

リン原子を中に含まない修飾DNA骨格（ヌクレオシド間連結）は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間連結、あるいは、1つまたは複数の短鎖ヘテロ原子または複素環ヌクレオシド間連結により形成されたヌクレオシド間連結を有する。これらは、アミド骨格を有するもの；ならびに、混合N、O、S、およびCH₂成分部分を有するものを含む他のものを含む。

10

【0120】

上記のリン非含有オリゴヌクレオチドの調製を教示する、代表的な米国特許は、米国特許第5,034,506号；同第5,166,315号；同第5,185,444号；同第5,214,134号；同第5,216,141号；同第5,235,033号；同第5,264,562号；同第5,264,564号；同第5,405,938号；同第5,434,257号；同第5,466,677号；同第5,470,967号；同第5,489,677号；同第5,541,307号；同第5,561,225号；同第5,596,086号；同第5,602,240号；同第5,610,289号；同第5,602,240号；同第5,608,046号；同第5,610,289号；同第5,618,704号；同第5,623,070号；同第5,663,312号；同第5,633,360号；同第5,677,437号；同第5,792,608号；同第5,646,269号、および同第5,677,439号を含むが、これらに限定されない。それらの各々が、参照により本明細書中に組み入れられる。

20

【0121】

DNA化合物はまた、模倣体を含むことができる。「模倣体」という用語は、それがDNAに適用される場合、フラノース環だけまたはフラノース環およびヌクレオチド間連結の両方が新規の基で置換されているDNA化合物を含むことが意図され、例えばモルホリノ環だけのフラノース環の置換はまた、当技術分野において糖サロゲートであるとも言われる。複素環塩基部分または修飾複素環塩基部分は、適切な標的核酸とのハイブリダイゼーションのために維持される。

【0122】

DNA模倣体は、化合物、例えばペプチド核酸（PNA）およびシクロヘキセニル核酸を含むことができる（CeNAとしても公知である。Wang et al., J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595-8602を参照のこと）。オリゴヌクレオチド模倣体の調製を教示する代表的な米国特許は、米国特許第5,539,082号；同第5,714,331号；および同第5,719,262号を含むが、これらに限定されない。それらの各々は、参照により本明細書中に組み入れられる。模倣体の別のクラスは、ホスホモノエステル核酸としても呼ばれ、骨格中にリン基を組み入れる。模倣体のこのクラスは、核酸の検出のためのプローブとして、および、分子生物学において使用するための補助剤として、遺伝子発現を阻害する領域（アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、センスオリゴヌクレオチド、および三重鎖形成オリゴヌクレオチド）において有用な物理的および生物学的および薬理学的な特性を有することが報告されている。フラノシル環がシクロブチル部分により置換されている別の模倣体が報告されている。

30

40

【0123】

核酸分子はまた、1つまたは複数の修飾または置換された糖部分を含むことができる。塩基部分は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。糖修飾は、オリゴマー化合物に、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性、または一部の他の有益な生物学的特性を付与することができる。

【0124】

代表的な修飾糖は、炭素環式糖または非環式糖、それらの2'、3'、または4'位の1つまたは複数の置換基を有する糖、糖の1つまたは複数の水素原子の代わりに置換基を有する糖、および糖中に任意の2つの他の原子間の連結を有する糖を含む。多数の糖修飾が、当

50

技術分野において公知であり、2'位で修飾された糖および糖の任意の2つの原子間の架橋を有する（糖が二環式であるような）糖が、本態様において特に有用である。この態様において有用な糖修飾の例は、以下より選択される糖置換基を含む化合物を含むが、これらに限定されない：OH；F；O-、S-、またはN-アルキル；または、アルキル、アルケニル、およびアルキニルが置換もしくは非置換のC1～C10アルキルもしくはC2～C10アルケニルおよびアルキニルであり得る、O-アルキル-O-アルキル。特に適切なものは、以下である：2-メトキシエトキシ（2'-O-メトキシエチル、2'-MOE、もしくは2'-OCH₂CH₂OCH₃としても公知である）、2'-O-メチル（2'-O-CH₃）、2'-フルオロ（2'-F）、または、4'炭素原子を2'炭素原子に連結する架橋基を有し例示的な架橋基が--CH₂--O--、--(CH₂)₂--O--、もしくは--CH₂--N(R₃)--Oを含みR₃がHもしくはC1-C12アルキルである二環式糖修飾ヌクレオシド。

10

【0125】

増大したヌクレアーゼ耐性および非常に高い結合親和性をヌクレオチドに付与する1つの修飾は、2'-MOE側鎖である（Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000）。2'-MOE置換の現下の利点の1つは、結合親和性における向上であり、その結合親和性は、O-メチル、O-プロピル、およびO-アミノプロピルなどの多くの同様の2'修飾よりも大きい。2'-MOE置換を有するオリゴヌクレオチドはまた、インビボでの使用のための有望な特色を有する、遺伝子発現のアンチセンス阻害物質であることが示されている（Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504；Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176；Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637；およびAltmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926）。

20

【0126】

2'-糖置換基は、アラビノ（上）位またはリボ（下）位であり得る。1つの2'-アラビノ修飾は2'-Fである。オリゴマー化合物上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上のまたは2'-5'連結オリゴヌクレオチド中の糖の3'位置、および5'末端ヌクレオチドの5'位置でも同様に修飾することができる。オリゴマー化合物はまた、ペントフラノシル糖の代わりに、シクロブチル部分などの糖模倣体を有してもよい。そのような修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許は、米国特許第4,981,957号；同第5,118,800号；同第5,319,080号；同第5,359,044号；同第5,393,878号；同第5,446,137号；同第5,466,786号；同第5,514,785号；同第5,519,134号；同第5,567,811号；同第5,576,427号；同第5,591,722号；同第5,597,909号；同第5,610,300号；同第5,627,053号；同第5,639,873号；同第5,646,265号；同第5,658,873号；同第5,670,633号；同第5,792,747号；および同第5,700,920号を含むが、これらに限定されない。それらの各々が、その全体において、参照により本明細書中に組み入れられる。

30

【0127】

代表的な糖置換基は、「キャップされた2'-オキシエトキシオリゴヌクレオチド（Capped 2'-Oxyethoxy Oligonucleotides）」と題する米国特許第6,172,209号に開示されており、その全体において、参照により本明細書中に組み入れられる。

【0128】

代表的な環状糖置換基は、「立体構造的に再編成されている、RNAを標的にするオリゴマー化合物（RNA Targeted 2'-Oligomeric compounds that are Conformationally Preorganized）」と題する米国特許第6,271,358号に開示されており、その全体において、参照により本明細書中に組み入れられる。

40

【0129】

代表的なグアニジノ置換基は、「機能付加されたオリゴマー（Functionalized Oligomers）」と題する米国特許第6,593,466号に開示されており、その全体において、参照により本明細書中に組み入れられる。

【0130】

代表的なアセトアミド置換基は、米国特許第6,147,200号に開示されており、その全体において、参照により本明細書中に組み入れられる。

50

【0131】

核酸分子はまた、天然または合成の非修飾核酸塩基と構造的に区別可能であり、さらに機能的に交換可能である、1つまたは複数の核酸塩基（しばしば、当技術分野において単純に「塩基」と言われる）修飾または置換を含むことができる。そのような核酸塩基修飾は、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性、または一部の他の有益な生物学的特性をオリゴマー化合物に付与することができる。本明細書において使用する場合、「非修飾」または「天然」核酸塩基は、プリン塩基のアデニン（A）およびグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基のチミン（T）、シトシン（C）、およびウラシル（U）を含む。本明細書において複素環塩基部分とも言われる修飾核酸塩基は、他の合成および天然核酸塩基、それらの多くの例、例えば、とりわけ、5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、7-デアザグアニン、および7-デアザアデニンを含む。

10

【0132】

複素環塩基部分は、プリンまたはピリミジン塩基が他の複素環、例えば、7-デアザ-アデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジン、および2-ピリドンで置換されたものを含むことができる。一部の核酸塩基は、米国特許第3,687,808号において開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990において開示されるもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613において開示されるもの、およびSanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993において開示されるものを含む。これらの核酸塩基のいくつかは、オリゴマー化合物の結合親和性を増大させるために特に有用である。これらは、2アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、ならびに5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6およびO-6置換プリンを含む。

20

【0133】

核酸分子の追加の修飾は、米国特許出願公開第2009/0221685号に開示されており、それは、参照により本明細書中に組み入れられる。また、本明細書に開示するのは、核酸分子への追加の適切なコンジュゲートである。

【0134】

II. 細胞培養

30

A. 宿主細胞

本明細書において使用するとおり、「細胞」、「細胞株」、および「細胞培養物」という用語は、互換的に使用してもよい。これらの用語の全てが、新たに単離した細胞、およびエキスポで培養された、活性化された、または増殖させた細胞の両方を含む。これらの用語の全てが、それらの子孫も含み、それらは、任意のおよび全てのその後の世代である。全ての子孫が、計画的なまたは偶発性の変異のため、同一でなくてもよいことが理解される。異種核酸配列を発現するという文脈において、「宿主細胞」は、原核細胞または真核細胞を指し、それは、ベクターを複製することまたはベクターによりコードされた異種遺伝子を発現することが可能である任意の形質転換生物を含む。宿主細胞は、ベクターまたはウイルスのためのレシピエントとして使用することができ、かつ使用されてきた。宿主細胞は、「トランスフェクト」または「形質転換」されてもよく、「トランスフェクト」または「形質転換」は、組換えタンパク質をコードする配列などの外因性核酸が、1つのプロセスによって宿主細胞中に移入または導入される、該プロセスを指す。形質転換細胞は、初代対象細胞およびその子孫を含む。

40

【0135】

特定の態様において、トランスフェクションは、任意の原核細胞または真核細胞で行うことができる。一部の局面において、エレクトロポレーションは、ヒト細胞のトランスフェクションを含む。他の局面において、エレクトロポレーションは、動物細胞のトランスフェクションを含む。特定の局面において、トランスフェクションは、細胞株またはハイブリッド細胞型のトランスフェクションを含む。一部の局面において、トランスフェクト

50

された1つの細胞または複数の細胞は、がん細胞、腫瘍細胞、または不死化細胞である。一部の例において、腫瘍細胞、がん細胞、不死化細胞、または細胞株が誘導され、他の例において、腫瘍細胞、がん細胞、不死化細胞、または細胞株は、それらのそれぞれの状態または条件に自然に入る。特定の局面において、細胞または細胞株は、A549、B細胞、B16、BHK-21、C2C12、C6、CaCo-2、CAP1、CAP-T、CHO、CHO2、CHO-DG44、CHO-K1、COS-1、Cos-7、CV-1、樹状細胞、DLD-1、胚性幹（ES）細胞またはその派生体、H1299、HEK、293、293T、293FT、HepG2、造血幹細胞、HOS、Huh-7、人工多能性幹（iPS）細胞またはその派生体、Jurkat、K562、L5278Y、LNCaP、MCF7、MDA-MB-231、MDCK、間葉細胞、Min-6、単球細胞、Neuro2a、NIH3T3、NIH3T3L1、K562、NK細胞、NS0、Panc-1、PC12、PC-3、末梢血細胞、形質細胞、初代線維芽細胞、RBL、Renca、RLE、SF21、SF9、SH-SY5Y、SK-MES-1、SK-N-SH、SL3、SW403、刺激惹起性多能性獲得（STAP）細胞もしくは派生体SW403、T細胞、THP-1、腫瘍細胞、U2OS、U937、末梢血リンパ球、増殖したT細胞、造血幹細胞、またはVero細胞であることができる。具体的な態様において、細胞は、末梢血リンパ球、増殖したT細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、幹細胞、造血幹細胞、または初代細胞である。具体的な態様において、細胞は、造血幹細胞である。さらなる具体的な態様において、細胞は、末梢血リンパ球である。

【0136】

特定の態様において、細胞は、トランスフェクトすることが困難であることが当技術分野において公知のものである。そのような細胞は、当技術分野において公知であり、例えば、初代細胞、昆虫細胞、SF9細胞、Jurkat細胞、CHO細胞、幹細胞、ゆっくり分裂する細胞、T細胞、および非分裂細胞を含む。一部の態様において、細胞はT細胞である。一部の態様において、細胞は初代細胞である。一部の態様において、細胞は幹細胞である。一部の態様において、細胞は、骨髄前駆細胞またはリンパ系前駆細胞を含む、造血幹細胞である。一部の態様において、細胞は間葉系幹細胞である。一部の態様において、細胞は卵細胞または精子細胞などの生殖細胞である。一部の態様において、細胞は受精胚である。一部の態様において、細胞はヒト受精胚である。

【0137】

一部の態様において、細胞は、細胞のクローン集団の増殖を可能にするために、限界希釈法に供されてもよい。限界希釈クローニングの方法は、当業者に周知である。そのような方法は、例えばハイブリドーマのために記載されているが、任意の細胞に適用することができる。そのような方法は、（Cloning hybridoma cells by limiting dilution, Journal of tissue culture methods, 1985, Volume 9, Issue 3, pp 175-177, by Joan C. Renner, Bruce L. Brown, and Roland M. Nardone）に記載されており、それは、参照により本明細書中に組み入れられる。

【0138】

一部の態様において、細胞は、トランスフェクション前またはトランスフェクション後に培養される。他の態様において、細胞は、トランスフェクション後の選択段階の最中に培養される。さらに他の態様において、細胞は、維持およびクローン選択ならびに初期増殖段階の最中に培養される。さらに他の態様において、細胞は、スクリーニング段階の最中に培養される。他の態様において、細胞は、大規模生成段階の最中に培養される。浮遊細胞および付着細胞を培養する方法は、当業者に周知である。一部の態様において、細胞は、商業的に入手可能な細胞培養容器および細胞培養培地を使用して浮遊培養される。一部の態様において使用し得る商業的に入手可能な培養容器の例は、ADME/TOXプレート、セルチャンバースライドおよびカバースリップ、細胞計数機器、細胞培養表面、Corning HYPERFlask細胞培養容器、コーティング済み培養容器、Nalgene Cryoware、培養チャンバー、培養ディッシュ、ガラス培養フラスコ、プラスチック培養フラスコ、3D培養フォーマット、培養マルチウェルプレート、培養プレートインサート、ガラス培養チューブ、プラスチック培養チューブ、スタックブル細胞培養容器、低酸素培養チャンバー、ペトリディッシュおよびフラスコキャリア、Quickfit培養容器、ローラーボトルを用いるスケールアップ細胞培養、スピナーフラスコ、3D細胞培養、または細胞培養バッグを含む。

【 0 1 3 9 】

他の態様において、培地は、当業者に周知の成分を使用して製剤化され得る。細胞を培養する製剤および方法が、以下の文献において詳細に記載されている：Short Protocols in Cell Biology J. Bonifacino, et al., ed., John Wiley & Sons, 2003, 826 pp ; Live Cell Imaging: A Laboratory Manual D. Spector & R. Goldman, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, 450 pp. ; Stem Cells Handbook S. Sell, ed., Humana Press, 2003, 528 pp. ; Animal Cell Culture: Essential Methods, John M. Davis, John Wiley & Sons, Mar 16, 2011 ; Basic Cell Culture Protocols, Cheryl D. Helgason, Cindy Miller, Humana Press, 2005 ; Human Cell Culture Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 806, Mitry, Ragai R. ; Hughes, Robin D. (Eds.), 3rd ed. 2012, XIV, 435 p. 89, Humana Press ; Cancer Cell Culture: Method and Protocols, Cheryl D. Helgason, Cindy Miller, Humana Press, 2005 ; Human Cell Culture Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 806, Mitry, Ragai R. ; Hughes, Robin D. (Eds.), 3rd ed. 2012, XIV, 435 p. 89, Humana Press ; Cancer Cell Culture: Method and Protocols, Simon P. Langdon, Springer, 2004 ; Molecular Cell Biology. 4th edition., Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al., New York: W. H. Freeman ; 2000., Section 6.2 Growth of Animal Cells in Culture。これらの全てが、参照により本明細書中に組み入れられる。

10

【 0 1 4 0 】

一部の態様において、スクリーニング段階および増殖段階の最中におよび/または大規模段階（流加培養（fed-batch）および比較とも言われる）の最中に、選択またはスクリーニングから生じる、増殖したエレクトロポレーションされた細胞は、改変ゲノムDNA配列を含み得る。

20

【 0 1 4 1 】

B. 活性化組成物

本明細書に記載する方法は、細胞のトランスフェクションの前に細胞を活性化組成物と接触させることに関する。細胞は、当技術分野において公知であり、かつ/または本明細書に記載する方法に従って活性化され得る。例えば、T細胞は、以下によって活性化され得る。

T細胞サブセット	Th1	Th1/Th2	Th1	Th17	Treg	Th2/Th9
T細胞を活性化するもの	抗 CD3/CD28; PMA; ペルバナダート	抗 CD3/CD28; PMA; ペルバナダート	IFN- α	IL6; IL-21	IL-2; IL-7; IL-15	IL-4

30

【 0 1 4 2 】

T細胞の活性化のためのキットはまた、商業的に入手可能である。例示的なキットは、抗ビオチン粒子（例えば、MACSiBeadまたはDYNABEADS（登録商標））、ならびにヒトCD2、CD3、およびCD28に対するビオチン化抗体を含む。ビオチン化抗体を負荷された抗ビオチン粒子は、抗原提示細胞を模倣し、PBMC由来の休止T細胞および精製されたT細胞を活性化するために使用される。T細胞増殖は、培養、および培養の14日目の再活性化によって達成される。

40

【 0 1 4 3 】

T細胞はまた、例えば、ConA、PHA、およびPWMなどのマイトジェンによっても活性化され得る。

【 0 1 4 4 】

III. 治療的適用および創薬適用

特定の態様において、本明細書に記載する方法により作製される細胞および細胞株は、ひとたびゲノムDNAを改変されると治療的效果を提供するものである。初代細胞は、本明

50

細書に記載する方法により単離、改変され得、処置される対象中への再導入のためにエクスピボで使用され得る。適切な初代細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）、末梢血リンパ球（PBL）、および非限定的なCD4+T細胞またはCD8+T細胞などの他の血液細胞のサブセットを含む。他の適切な初代細胞は、骨髄またはリンパ系前駆細胞などの前駆細胞を含む。適切な細胞はまた、例として胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、筋肉幹細胞、および皮膚幹細胞などの幹細胞を含む。例えば、iPSCは、関連する公知の遺伝子変異に苦しむ患者からエクスピボで誘導することができ、この変異は、本明細書に記載する方法を使用して、野生型対立遺伝子に改変することができる。改変iPSCは次に、ドーパミン作動性ニューロンに分化させて、患者に再移植されることができる。別のエクスピボ治療的適用において、造血幹細胞は、公知の遺伝子変異に苦しむ患者から単離することができ、それを、次に、遺伝子変異を修正するために改変することができる。HSCは次に、治療的効果のために患者に戻して投与されることができるか、または患者への投与前に、より成熟した造血細胞に培養物中で分化させることができる。

10

【0145】

一部の態様において、改変ゲノムDNA配列および/またはドナーDNAは、疾患関連遺伝子を含む。一部の態様において、配列改変領域は疾患関連遺伝子を含む。疾患関連遺伝子は、当技術分野において公知である。疾患関連遺伝子が、genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=full&no_limit=1で、ワールドワイドウェブ上に開示されたものであることが企図されている。遺伝子の完全なリスト、ならびにそれらの関連疾患は、その全体が参照により本明細書中に組み入れられる。

20

【0146】

1つの態様において、本方法は、造血幹細胞（血球始原細胞としても知られている）または骨髄前駆細胞中のゲノムDNAを改変する工程を含む。

【0147】

開示する方法が治療的に使用され得る別の例は、キメラ抗原受容体（CAR）の部位特異的な組込みである。「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、任意の特異性を免疫エフェクター細胞上に接ぐ、遺伝子操作された受容体を指す。これらの受容体は、モノクローナル抗体の特異性をT細胞上に接ぐために使用される。受容体は、異なる供給源由来の部分から構成されるため、キメラと呼ばれる。これらの分子の最も一般的な形態は、CD3- の膜貫通および細胞内ドメイン（endodomain）；CD28または41BBの細胞内ドメイン、またはそれらの組み合わせに融合した、モノクローナル抗体に由来する一本鎖可変断片（scFv）の融合物である。そのような分子は、scFvによるその標的の認識に応答したシグナルの伝達を結果としてもたらす。そのような構築物の例は、ハイブリドーマ14g2a（ジシアロガングリオシドGD2を認識する）に由来するscFvの融合物である、14g2a- である。T細胞がこの分子を発現する場合、それらは、GD2を発現する標的細胞（例えば、神経芽腫細胞）を認識して死滅させる。悪性B細胞を標的とするために、研究者は、B系列分子であるCD19に特異的なキメラ免疫受容体を用いて、T細胞の特異性を向け直した。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の可変部分を、scFvを形成するように可撓性リンカーにより融合させる。このscFvは、新生タンパク質を小胞体に、およびその後の表面発現に向かわせるためのシグナルペプチド（これは切断される）が前につく。可撓性スパーサーにより、scFvは、抗原結合ができるように様々な方向に向くことが可能になる。膜貫通ドメインは、細胞中に突き出して望ましいシグナルを伝達する元の分子のシグナル伝達細胞内ドメインに通常由来する、典型的な疎水性ヘリックスである。CARは、T細胞が腫瘍細胞上の特異的なタンパク質（抗原）を認識することを可能にするタンパク質である。CARは、任意の特異性を免疫エフェクター細胞上に接ぐ、遺伝子操作された受容体である。典型的には、これらの受容体は、モノクローナル抗体の特異性をT細胞上に接ぐために使用される。

30

40

【0148】

人工T細胞受容体は、養子細胞移入と呼ばれる技法を用いて、がんのための治療として研究されている。T細胞を患者から取り出して、がんの特定の形態に特異的な受容体を発現するように改変する。次にがん細胞を認識して死滅させることができるT細胞を、患者

50

に再導入する。患者以外のドナーを供給源とするT細胞の改変もまた、研究されている。

【0149】

これらの遺伝子操作されたCAR T細胞を、インビトロで増殖させてもよく、CAR T細胞の増殖させた集団を、次に、患者に注入することができる。注入後、T細胞は、患者の身体において増殖し、それらの遺伝子操作された受容体からの手引きで、その表面上に抗原を有するがん細胞を認識して死滅させる。現在の治療方法は、ウイルス感染によるCARの導入を伴う。しかし、治療方法においてウイルス感染を用いる場合、安全性の懸念が常に存在する。従って、本明細書に記載する方法は、遺伝子治療およびゲノム工学に対する非ウイルス性アプローチである。以前は、免疫細胞にプラスミドDNAをトランスフェクトすることは、そうすることが細胞の毒性をもたらすために可能ではなかった。本出願人らは、細胞トランスフェクションの前の活性化工程が、生存率の問題を克服し、高レベルの生存率を維持しながら長いDNA片（および/または高濃度）を細胞中にトランスフェクトするのを可能にしたことを見出した。本明細書に記載する方法を用いて、CARは、免疫細胞の特定の部位中に組み込まれることができる。一部の態様において、細胞は自己免疫細胞である。T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞におけるCARの長期発現を、白血病処置または特定の抗原に関連付けられる腫瘍の処置のために使用することができる。非選択または選択が、CARの部位特異的な組込みを有する細胞に対して使用され得る。選択アプローチのために、選択可能マーカーは、CARと同じ部位で組み込まれ、同じプラスミド上にあってもよく、または、選択可能マーカーは、別の部位特異的な位置で組み込まれてもよい。非選択アプローチのためには、CAR陽性細胞集団は、インビボでさらに刺激されて増殖することになり、一方で、CAR陰性細胞は、活性化が存在しないために自然に枯渇することになるように、抗原（腫瘍）の存在が自然の選択圧として働くことが企図されている。治療目的のT細胞またはNK細胞は、精製を伴うかまたは伴わないアフエーシスを通して得ることができる。細胞を次に、本開示の方法に記載するとおりに活性化し、トランスフェクトし、患者に注射して戻してもよい。図16に示すとおり、本明細書に記載するデータは、CARのK562細胞中への部位特異的な組込みの成功を実証する。

【0150】

開示する方法がいかに治療的に使用され得るかというさらなる例は、CFTR（嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子）機能の損失のために嚢胞性線維症を有する患者の上皮細胞におけるCFTR導入遺伝子の発現にある。嚢胞性線維症のための可能性のある治療法として、遺伝子治療が探索されている。理想的には、遺伝子治療が、正常コピーのCFTR遺伝子を罹患細胞中に置く。正常CFTR遺伝子の罹患上皮細胞中への移入は、有害反応または炎症応答を伴わずに、全ての標的細胞における機能的CFTRの産生を結果としてもたらすであろう。研究により、嚢胞性線維症の肺症状を妨げるために、CFTR遺伝子発現の正常量の5～10%のみが必要であることが示されている。リポソームおよびウイルスベクターなどの複数のアプローチが、動物モデルおよび臨床試験において、遺伝子移入について試験されている。しかし、どちらの方法も、相対的に非効率的な処置選択肢であることが見出された。主な理由は、非常に少しの細胞しかベクターを取り込んで遺伝子を発現せず、そのために処置が少しの効果しか有さないことである。機能的なCFTR導入遺伝子を、ドナーDNAのトランスフェクションの前に活性化されている上皮細胞または腸幹細胞類器官中に部位特異的に組み込めることが企図されている。細胞を次に、患者の気道中に移植することができ、そこで細胞は、CFTR遺伝子の正常機能を実現するであろう。

【0151】

さらなる例において、本明細書に記載する方法は、血友病を有する患者を処置するために使用することができる。血友病を有する患者は、血餅を誘導することができず、生命を脅かす場合がある外出血および内出血に苦しむ。部位特異的な標的ゲノム組込みを、ドナーDNAとして第VIII因子または第IX因子導入遺伝子を用いて実施することができる。初代肝臓、筋肉、もしくは血管細胞、または前駆肝臓、筋肉、もしくは血管細胞は、患者またはドナー宿主から単離されてもよい。細胞は次に、活性化することができ、細胞の活性化に続いて、組み込まれた第VIII因子または第IX因子の導入遺伝子発現のために、細胞が次

に患者中に移植されてもよい。

【0152】

さらなる例において、標的導入遺伝子組込みは、細胞株開発のために使用することができる。本出願人らは、本明細書に記載する方法を用いた細胞における導入遺伝子の発現が、導入遺伝子のほぼ40%の発現を結果としてもたらし、この方法の高い効率を示すことを、実施例において実証している。従って、本方法は、無作為組込みおよびコロニー選択の、伝統的な方法に取って代わり得る。本明細書に記載する方法は、治療的使用または前臨床使用のための種々のサイトカインまたは抗体を発現するために外部プロモーターを有する導入遺伝子を組み込むことによる、タンパク質分泌用の細胞株最適化に使用されてもよい。

10

【0153】

特定の局面において、本明細書に記載する方法は、エクスピボでの治療のための改善された方法に関する。細胞集団は、対象から単離されてもよく、細胞は次に、当技術分野において公知であり、かつ/または本明細書に記載する方法によって活性化されてもよく、細胞のゲノムDNAは、欠陥を修正するか、または標的遺伝子を部位特異的に組み込むようなやり方で改変されてもよい。細胞の集団は次に、治療的使用のために、対象中に移植されてもよい。特定の例において、単離された細胞の集団は、例えば、伝統的なトランスフェクションおよび/もしくはエレクトロポレーションの方法などの特定のインビトロ操作に対して感受性である細胞のサブセットを含み得るか、または、細胞のサブセットは、伝統的なトランスフェクションおよび/もしくはエレクトロポレーションの方法またはゲノムDNA操作に対して耐性であり得る。本明細書に記載する方法でのゲノムDNAの改変は、そのような集団における配列改変のより大きな効率を結果としてもたらずであろうことが企図されている。

20

【0154】

本開示の一局面は、以下の工程を含む、対象から単離された細胞における標的ゲノムDNA領域の部位特異的な配列改変のための方法に関する：細胞を対象から単離する工程；該細胞を活性化組成物で活性化する工程；該細胞に、(a) ドナーDNAと(b) DNA消化剤とを含むトランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程であって、該ドナーDNAが、(i) 該標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と(ii) 配列改変領域とを含み、かつゲノムDNA配列が、該標的ゲノムDNA領域において特異的に改変される、工程。

30

【0155】

加えて、本明細書において使用する方法により作製される細胞および細胞株は、薬物開発および/または逆遺伝学的研究のために有用であり得る。そのような細胞および動物は、特定の変異にまたはその配列改変に関連付けられる表現型を表し得、当該の変異または変異タンパク質のいずれかと特異的に相互作用するであろう薬物、または、罹患動物における疾患の処置に有用である薬物をスクリーニングするために使用され得る。これらの細胞株はまた、特定の変異の効果を研究するためのツールを提供することもできる。なぜなら、細胞株およびその対応する「改変」細胞株は、「遺伝的に同一である」対照に相当し、従って、疾患特異的な変異の修復、薬物のスクリーニングおよび発見、ならびに疾患機構研究のための強力なツールを提供するからである。この技術は、例えば、RNAiおよびshRNAなどの現在の遺伝子ノックダウン技法に対して科学的に優れた代替手段を提供できることがさらに企図されている。一例において、DNA配列改変は、発生機構もしくは疾患機構を研究するために、または治療的適用のために関心対象の遺伝子中に導入される終止コドンである。

40

【0156】

本開示の組成物は、インビボ、インビトロ、またはエクスピボの投与に使用され得る。例えば、本開示の組成物は、がんワクチンとして有用であり得る。

【0157】

本明細書において使用する場合、インビトロ投与という用語は、培養物中の細胞を含むがそれらに限定されない、対象から取り出したかまたは対象の外の細胞に対して実施され

50

る操作を指す。エキスピボ投与という用語は、インビトロで操作され、その後対象に投与される細胞を指す。インピボ投与という用語は、投与を含む、対象内で実施される全ての操作を含む。

【0158】

本開示の特定の局面において、組成物は、インビトロ、エキスピボ、またはインピボのいずれかで投与され得る。特定のインビトロの態様において、自己T細胞が、本開示の組成物とインキュベートされる。細胞は次に、インビトロ解析のために、あるいはエキスピボ投与のために使用することができる。

【0159】

本開示の方法の局面はまた、以下の工程を含む方法によって、対象にワクチン接種するため、および/または特定のがんを処置するための方法に関する：細胞を活性化組成物と接触させる工程；該細胞に、(a)ドナーDNAと(b)DNA消化剤とを含むトランスフェクション組成物をトランスフェクトする工程であって、該ドナーDNAが、(i)標的ゲノムDNA領域に相同な核酸配列を含む相同領域と(ii)キメラ抗原受容体(CAR)とを含み、かつゲノムDNA配列が、該CARを組み込むように該標的ゲノムDNA領域において特異的に改変される、工程；および、該細胞を患者に投与する工程。一部の態様において、免疫細胞は自己由来である。一部の態様において、免疫細胞は抗原と接触したことがある。一部の態様において、抗原は、対象のがん細胞により発現される抗原である。一部の態様において、抗原は無細胞である。「無細胞」という用語は、いずれの細胞成分も有さない組成物を指す。一部の態様において、抗原は、患者の腫瘍由来の抽出物である。一部の態様において、抗原はポリペプチドである。一部の態様において、抗原は、腫瘍細胞溶解物、アポトーシス腫瘍細胞、腫瘍関連抗原、および腫瘍由来のmRNAのうちの1つまたは複数を含む。

【0160】

一部の態様において、免疫細胞は抗原提示細胞である。抗原提示細胞の例は、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、および、T細胞刺激因子(例えば、B7または4-1 BBL)などを、例えば遺伝子移入により強制的に発現させている腫瘍細胞(偽抗原提示細胞)を含む。一部の態様において、抗原提示細胞は樹状細胞である。

【0161】

免疫細胞の投与の経路は、例えば、腫瘍内、皮内、皮下、静脈内、リンパ管内、および腹腔内投与であってもよい。一部の態様において、投与は、腫瘍内またはリンパ管内である。一部の態様において、免疫細胞は、がん組織またはリンパ節中に直接投与される。

【0162】

一部の態様において、免疫細胞はT細胞である。T細胞は、抗原または抗原提示細胞と接触したことがあるものであってもよい。例えば、APCは、それらを例えば、CD8陽性細胞傷害性Tリンパ球(CTL)またはCD4陽性ヘルパーT細胞に分化させるために、患者のがんに特異的な腫瘍抗原と共に培養されてもよい。このように確立されたT細胞が、がんを有する個体に投与されてもよい。

【0163】

ナイーブT細胞の起源は、特に限定されず、例えば、脊椎動物の末梢血に由来してもよい。使用されるナイーブT細胞は、PBMC画分から単離されたCD8陽性細胞またはCD4陽性細胞であってもよい。一部の態様において、ナイーブT細胞は、CTLを誘導する効率の観点からいえばPBMC画分から単離されずに他の細胞および成分と混合された、CD8陽性細胞またはCD4陽性細胞である。例えば、PBMC画分の細胞を、血清および腫瘍抗原を補給した培地中で培養した場合、PBMCは、樹状細胞前駆体に分化する。樹状細胞前駆体は次に、ペプチドに結合し、このペプチド/腫瘍抗原を提示する抗原提示細胞として樹状細胞に分化する。抗原提示細胞は、PBMC中のCD8陽性T細胞を刺激して、それらをCTLに分化させる。こうして、添加されたペプチドを認識することが可能なCTLを得ることができる。このように得られたCTLは、単離されて、そのままがんワクチンとして使用されてもよい。あるいは、それらは、がんワクチンとして使用される前に、IL-2などのインターロイキン、抗原提示細胞、および腫瘍抗原の存在下でさらに培養されてもよい。それらの投与の経路は、

特に限定されず、例は、皮内、皮下、静脈内、および腫瘍内投与を含む。

【0164】

IV. トランスフェクション

トランスフェクションは、核酸を細胞中に計画的に導入するプロセスである。特定の態様において、トランスフェクションは非ウイルス性であり、これは、プラスミドバックグラウンドにおいて使用される配列が非ウイルス性であり、DNAがウイルス機構を通して細胞に入らないことを示す。動物細胞のトランスフェクションは、典型的に、物質の取り込みを可能にする一過性の孔または「穴」を細胞膜に開けることを含む。トランスフェクションは、当技術分野において公知であり、かつ以下に記載する方法を用いて行うことができる。

10

【0165】

トランスフェクションの非化学的方法

2. エレクトロポレーション

特定の態様は、宿主細胞中への1つまたは複数の核酸分子の侵入を促進するための、エレクトロポレーションの使用を含む。

【0166】

本明細書において使用する場合、「エレクトロポレーション」または「エレクトロローディング」は、細胞中への核酸分子の進入を促進するための、細胞への電流または電場の印加を指す。当業者は、エレクトロポレーションの任意の方法および技術が、本発明により検討されることを理解すると考えられる。

20

【0167】

本発明の特定の態様において、米国特許第5,612,207号（参照により本明細書に具体的に組み入れられる）、米国特許第5,720,921号（参照により本明細書に具体的に組み入れられる）、米国特許第6,074,605号（参照により本明細書に具体的に組み入れられる）；米国特許第6,090,617号（参照により本明細書に具体的に組み入れられる）；米国特許第6,485,961号（参照により本明細書に具体的に組み入れられる）；米国特許第7,029,916号（参照により本明細書に具体的に組み入れられる）、米国特許第7,141,425号（参照により本明細書に具体的に組み入れられる）、米国特許第7,186,559号（参照により本明細書に具体的に組み入れられる）、米国特許第7,771,984号（参照により本明細書に具体的に組み入れられる）、および米国特許出願公開第2011/0065171号（参照により本明細書に具体的に組み入れられる）に記載されているとおりに、エレクトロローディングを行ってもよい。

30

【0168】

本発明の状況において使用され得るエレクトロローディングのための他の方法およびデバイスもまた、例えば、公開されたPCT出願番号WO 03/018751およびWO 2004/031353；米国特許出願第10/781,440号、同第10/080,272号、および同第10/675,592号；ならびに米国特許第6,773,669号、同第6,090,617号、同第6,617,154号において記載されており、それらの全てが、参照により組み入れられる。

【0169】

本発明の特定の態様において、2002年8月21日に出願された米国特許出願第10/225,446号に記載されているとおりに、エレクトロポレーションを行ってもよく、その開示全体が、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

40

【0170】

本発明のさらなる態様において、フローエレクトロポレーションが、MaxCyte STX（登録商標）、MaxCyte VLX（登録商標）、またはMaxCyte GT（登録商標）フローエレクトロポレーション機器を使用して実施される。具体的な態様において、静的エレクトロポレーションまたはフロ - エレクトロポレーションは、本開示全体を通して記載されるパラメータを用いて使用される。

【0171】

エレクトロポレーション、好ましくは、フローエレクトロポレーションにより細胞にト

50

ランスフェクトする特許請求される方法は、40%超、50%超、および60%、70%、80%、もしくは90%（またはこの中から派生する任意の範囲）超のトランスフェクション効率を達成することが可能である。トランスフェクション効率は、遺伝子産物を発現する細胞のパーセンテージまたは遺伝子により発現される産物の分泌レベルのいずれかにより測定することができる。細胞は、エレクトロポレーションプロセスの最中および後に高い生存率を維持する。生存率は、日常的に50%またはそれ以上を上回る。エレクトロポレーションした細胞の生存率は、開始のエレクトロポレーションされていない集団または対照構築物をトランスフェクトしたエレクトロポレーションされた集団の生存率の、最大でも、または少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、もしくは95%（またはこの中から派生する任意の範囲）であり得る。

10

【0172】

一部の態様において、本方法では、粒子の懸濁液の電気刺激のためのフローエレクトロポレーション装置が使用され、該装置は、1つまたは複数の入口フローポータルと、1つまたは複数の出口フローポータルと、1つまたは複数のフローチャネルとを有し、フローチャネルが、2つまたはそれ以上の壁から構成されており、フローチャネルが、入口フローポータルからの懸濁液中の粒子の連続流を受け入れかつ該連続流を一時的に収容するようにさらに構成されている、フローエレクトロポレーションセルアセンブリー；および、各電極が、フローチャネルの壁の少なくとも1つを形成するように、フローチャネルに対して配置されている対になった電極を備え、電極が、電気エネルギーの供給源と電気通信している状態に電極を置くことをさらに含み、それにより、チャンネルを介して流れる粒子の懸濁液が、電極間に形成される電場に供され得る。

20

【0173】

一部の態様において、本方法では、試料サイズの限界を克服するために、フローエレクトロポレーションが使用される。この方法を用いて、細胞懸濁液は、好ましくは使い捨てであるフローセル内に収容されている並列バー電極を通過させられる。

【0174】

さらなる態様において、本明細書に記載するフローエレクトロポレーション法または静的エレクトロポレーション法を用いて試料の熱分解を克服する。セルの異なる構成を、本方法において使用することができることを理解すべきである。このエレクトロポレーションの最中に、セルは、所定の特徴を有する電気パルスに供される。例えば、試料細胞を調製するための具体的な設定は、以下のとおりである：電圧、750V；パルス幅、650 μ 秒；パルス間の時間、100 μ 秒；バーストにおける2つの二相性パルス；バースト間の時間、12秒；流速、0.05mL/秒；目的の分子または分子を、次に、濃度および/または電気勾配に従って細胞中に拡散することができる。本発明は、場合により、細胞をある範囲の電場強度に供することが可能である。

30

【0175】

本フローエレクトロポレーション方法の別の利点は、細胞の大集団にトランスフェクトすることができる速さである。例えば、リンパ球の集団は、5時間未満、好ましくは4時間未満、最も好ましくは3時間未満で、最も好ましくは2時間未満で試料をエレクトロポレーションすることによるエレクトロポレーションによりトランスフェクトされることができる。エレクトロポレーションの時間は、試料が、フローエレクトロポレーションプロセスにより処理される時間である。特定の態様において、 $1E10$ 細胞は、フローエレクトロポレーションを使用して、30分またはそれ未満にトランスフェクトされる。さらなる態様において、 $2E11$ 細胞は、フローエレクトロポレーションを使用して、30分間、または60分間またはそれ未満でトランスフェクトされ得る。

40

【0176】

フローエレクトロポレーションのために、必要な流体および試料を有する容器中の溶液および細胞懸濁液にフローセルを付着させることによりプロセスを開始する。ポンプおよびピンチバルブの作動を制御するエレクトロポレーションシステムに、必要な命令を提供

50

することにより、プライミング溶液（生理食塩水）および細胞懸濁液が導入される。細胞が電極間の流路を通過する際、選定された電圧、持続時間、および周波数の電気パルスが適用される。産物および廃液は、指定された容器に回収される。

【0177】

使用者は、本発明のフローエレクトロポレーションシステムに所望の電圧および他のパラメータを入力する。上記のとおり、様々な設定が、場合により使用可能である。コンピュータが、タワーにおいて電子機器と通信し、所望の電圧までコンデンサバンクを充電する。適切なスイッチは次に、電圧が流路に送達されて電場を生成する前に、電圧を操作する（スイッチが、交互のパルスまたはパーストを提供して、電場への長期曝露によりもたらされる摩耗電極を最小限にする）。電圧は、オペレータにより本発明のフローエレクトロポレーションシステムに設定された持続時間および周波数のパラメータに従って送達される。本発明のフローエレクトロポレーションシステムをここで詳細に記載する。

【0178】

フローエレクトロポレーションプロセスは、例えば、容器中の溶液および細胞懸濁液と流体連通している（例えばチューブを介して）エレクトロポレーションチャンバーを置くことにより開始することができ、無菌または滅菌環境で行われることができる。細胞懸濁液および/または他の試薬が、1つまたは複数の、ポンプ、真空、バルブ、エレクトロポレーションチャンバー内の空気の圧力または容積を変化させる他の機械的デバイス、およびそれらの組み合わせを使用して、エレクトロポレーションチャンバーに導入してもよく、それによって、細胞懸濁液および/または他の試薬を、所望の時間に、所望の速度でエレクトロポレーションチャンバーに流入させることができる。細胞懸濁液および/または他の試薬の一部は、エレクトロポレーションチャンバー内に位置づけられる場合、所望の電圧、継続時間、および/または間隔の電気パルスを、細胞懸濁液および/または他の試薬に適用する。エレクトロポレーション後、処理された細胞懸濁液および/または他の試薬を、1つまたは複数の、ポンプ、真空、バルブ、エレクトロポレーションチャンバー内の排除量、圧力、もしくは容積を変化させる他の電氣的デバイス、機械的デバイス、空気圧デバイス、もしくはマイクロ流体デバイス、および、それらの組み合わせを使用して、エレクトロポレーションチャンバーから除去することができる。特定の態様において、重力または手動移行を使用して、エレクトロポレーションチャンバーの中または外に試料または処理試料を移すことができる。所望の場合、新たな細胞懸濁液および/または他の試薬を、エレクトロポレーションチャンバー中に導入することができる。エレクトロポレーションされた試料を、まだエレクトロポレーションされていない試料から別々に回収することができる。先行する一連の事象は、例えば、エレクトロポレーションチャンバーの中または外への流れに影響しかつ該流れを制御する電子回路（例えば、電気パルスを提供する）、ポンプ、真空、バルブ、それらの組み合わせ、および他の構成要素に結合されたコンピュータにより、時間的に調整することができる。一例として、エレクトロポレーションプロセスを、モニター上のグラフィックユーザインタフェースおよび/またはキーボードを介してオペレータによるといったコンピュータによって、実施することができる。適切なバルブの例は、ピンチバルブ、バタフライバルブ、および/またはボールバルブを含む。適切なポンプの例は、遠心ポンプまたは容積式ポンプを含む。

【0179】

一例として、フローエレクトロポレーションデバイスは、スパーサーにより分離された少なくとも2つの電極を備えることができ、スパーサーおよび少なくとも2つの電極が、チャンバーを画定している。一部の態様において、エレクトロポレーションチャンバーは、スパーサーを横断する少なくとも3つのポートをさらに備えることができ、第1のポートはチャンバー中への試料の流れのためのものであり、第2のポートは、チャンバーの外への処理された試料の流れのためのものであり、第3のポートは、チャンバーの中または外への非試料流体の流れのためのものである。一部の態様において、試料がチャンバー中に流入する際、非試料流体がチャンバーの外に流れ、処理試料がチャンバーの外に流れる際、非試料流体がチャンバー中に流れる。別の例として、フローエレクトロポレーションデバ

イスは、少なくとも2つの並列電極を含む上部および底部を有するエレクトロポレーションチャンバーを備えることができ、チャンバーは、2つの電極間に形成され、エレクトロポレーションチャンバーの底部において2つのチャンバーポートおよびエレクトロポレーションチャンバーの上部において2つのチャンバーポートを有する。そのようなデバイスは、チャンバーの底部における第1のチャンバーポートを介してエレクトロポレーションチャンバーと流体連通している少なくとも1つの試料容器をさらに備えることができ、エレクトロポレーションチャンバーは、チャンバーの上部における第2のチャンバーポートを介して試料容器と流体連通しており、第1の流体経路を形成することができる。さらに、少なくとも1つの産物容器が、チャンバーの底部における第3のチャンバーポートを介したエレクトロポレーションチャンバーと流体連通していることができ、エレクトロポレーションチャンバーは、チャンバーの底部における第4のチャンバーポートを介した産物容器と流体連通しており、第2の流体経路を形成することができる。一部の態様において、単一のポートエレクトロポレーションチャンバーが使用され得る。他の態様において、電極、スパーサー、ポート、および容器の種々の他の適切な組み合わせを使用することができる。エレクトロポレーションチャンバーは、約1~10mLの内部容積を含むことができる。しかし、他の態様において、エレクトロポレーションチャンバーは、より少ない内部容積（例えば、0.75mL、0.5mL、0.25mL、もしくはそれ未満）またはより大きな内部容積（例えば、15mL、20mL、25mL、もしくはそれを上回る）を含むことができる。一部の態様において、エレクトロポレーションチャンバーおよび関連する構成要素は、PVCバッグ、PVCチューブ、コネクタ、シリコンポンプチューブなどの使い捨てであることができる（例えば、医療グレードクラスVI材料）。

【0180】

任意の数（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上）の容器が、エレクトロポレーションチャンバーと流体連通していることができる。容器は、折り畳み可能な、拡張可能な、または固定容積の容器であり得る。例えば、第1の容器（例えば、試料供給源または試料容器）は、細胞懸濁液を含むことができ、エレクトロポレーションの最中に、細胞懸濁液中の細胞内に入る物質を含んでもまたは含まなくてもよい。物質が含まれない場合、この物質を含む第2の容器は、エレクトロポレーションチャンバー中へのまたはエレクトロポレーションチャンバーへの進入前にインラインで物質を混合することができるように含められることができる。追加の構成において、別の容器を取り付けてもよく、それは、廃棄される流体を保持することができる。1つまたは複数の追加の容器を、処理された試料または産物容器として使用することができる。処理された試料または産物容器は、エレクトロポレーションプロセスから作製された細胞または他の産物を保持する。さらに、1つまたは複数の追加の容器は、個別の容積または単位容積に試料を分離するために使用することができる種々の非試料流体または気体を含むことができる。非試料流体またはガス容器は、第3および/または第4のポートを介してエレクトロポレーションチャンバーと流体連通していることができる。非試料流体またはガス容器は、処理された試料容器中または試料容器中に組み込まれてもよく（例えば、非試料流体容器が、処理された試料容器または試料容器の一部を含むことができる）；従って、非試料流体または気体は、試料の処理の最中に、処理された試料容器から別の容器（それは、試料容器を含んでもよい）に移すことができる。非試料流体またはガス容器は、非試料流体または気体の圧縮がエレクトロポレーションに影響を与えない限り、チャンバー中に組み込まれてもよい。本発明のさらなる局面は、試料容器に連結され、チャンバーに試薬または他の試料を供給し得る他の容器を含んでもよい。

【0181】

さらなる態様において、エレクトロポレーションデバイスは、静的エレクトロポレーションであり、細胞の流れを含まないが、代わりに、単一チャンバーにおいて細胞の懸濁液を含む。そのようなデバイスを用いた場合、フローエレクトロポレーションのための記載するパラメータを使用して、熱分解を制限し、細胞の生存率を向上させ、配列改変の取り込みの効率を向上させ、トランスフェクション効率などを向上させ得る。そのようなパラ

10

20

30

40

50

メータは、例えば、本願を通して記載するフローエレクトロポレーションパラメータ、チャンパーの熱抵抗、電極の間隔、緩衝液と接触している合わせた電極面積と電極間距離の比率、および電場を含む。

【0182】

特定の局面において、エレクトロポレーションの最中の細胞の密度は、制御される変数である。エレクトロポレーションの最中の細胞の細胞密度は、細胞の型、所望のエレクトロポレーション効率、または結果として得られるエレクトロポレーションされた細胞の所望の生存率に非限定的に従って変動するかまたは変動され得る。特定の局面において、細胞密度は、エレクトロポレーションの間中一定である。他の局面において、細胞密度は、エレクトロポレーションプロセスの最中に変動される。特定の局面において、エレクトロポレーション前の細胞密度は、 1×10^4 個の細胞/mLから $(y) \times 10^4$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、または10であることができる。他の局面において、エレクトロポレーション前の細胞密度は、 1×10^5 個の細胞/mLから $(y) \times 10^5$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10（またはこの中から派生する任意の範囲）である。さらに他の局面において、エレクトロポレーション前の細胞密度は、 1×10^6 個の細胞/mLから $(y) \times 10^6$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、または10であることができる。特定の局面において、エレクトロポレーション前の細胞密度は、 1×10^7 個の細胞/mLから $(y) \times 10^7$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10またはこの中から派生する任意の範囲であることができる。さらに他の局面において、エレクトロポレーション前の細胞密度は、 1×10^7 個の細胞/mLから 1×10^8 個の細胞/mL、 1×10^8 個の細胞/mLから 1×10^9 個の細胞/mL、 1×10^9 個の細胞/mLから 1×10^{10} 個の細胞/mL、 1×10^{10} 個の細胞/mLから 1×10^{11} 個の細胞/mL、または 1×10^{11} 個の細胞/mLから 1×10^{12} 個の細胞/mLの範囲内にあり得る。特定の局面において、エレクトロポレーション前の細胞密度は $(y) \times 10^6$ であり得るが、 y は0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100のいずれかまたはこの中から派生する任意の範囲であることができる。特定の局面において、エレクトロポレーション前の細胞密度は $(y) \times 10^{10}$ であり得るが、 y は0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000のいずれか（またはこの中から派生する任意の範囲）であることができる。

【0183】

特定の局面において、エレクトロポレーションの最中の細胞の密度は、制御される変数である。エレクトロポレーションの最中の細胞の細胞密度は、細胞の型、所望のエレクトロポレーション効率、または結果として得られるエレクトロポレーションされた細胞の所望の生存率に非限定的に従って変動するかまたは変動され得る。特定の局面において、細胞密度は、エレクトロポレーションの間中一定である。他の局面において、細胞密度は、エレクトロポレーションプロセスの最中に変動される。特定の局面において、エレクトロポレーションの最中の細胞密度は、 1×10^4 個の細胞/mLから $(y) \times 10^4$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10（またはこの中から派生する任意の範囲）であることができる。他の局面において、エレクトロポレーションの最中の細胞密度は、 1×10^5 個の細胞/mLから $(y) \times 10^5$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10（またはこの中から派生する任意の範囲）である。さらに他の局面において、エレクトロポレーションの最中の細胞密度は、 1×10^6 個の細胞/mLから $(y) \times 10^6$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10（またはこの中から派生する任意の範囲）であることができる。特定の局面において、エレクトロポレーションの最中の細胞密度は、 1×10^7 個の細胞/mLから $(y) \times 10^7$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10（またはこの中から派生する任意の範囲）であることができる。さらに他の局面において、エレクトロポレーションの最中の細胞密度は、 1×10^7 個

の細胞/mLから 1×10^8 個の細胞/mL、 1×10^8 個の細胞/mLから 1×10^9 個の細胞/mL、 1×10^9 個の細胞/mLから 1×10^{10} 個の細胞/mL、 1×10^{10} 個の細胞/mLから 1×10^{11} 個の細胞/mL、または 1×10^{11} 個の細胞/mLから 1×10^{12} 個の細胞/mLの範囲内にあり得る。特定の局面において、エレクトロポレーションの最中の細胞密度は $(y) \times 10^6$ であり得るが、 y は0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100（またはこの中から派生する任意の範囲）のいずれかであり得る。特定の局面において、エレクトロポレーションの最中の細胞密度は $(y) \times 10^{10}$ であり得るが、 y は0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000（またはこの中から派生する任意の範囲）のいずれかであることができる。

【0184】

特定の局面において、エレクトロポレーション後の細胞密度は、 1×10^4 個の細胞/mLから $(y) \times 10^4$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10（またはこの中から派生する任意の範囲）であることができる。他の局面において、エレクトロポレーション後の細胞密度は、 1×10^5 個の細胞/mLから $(y) \times 10^5$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10（またはこの中から派生する任意の範囲）である。さらに他の局面において、エレクトロポレーション後の細胞密度は、 1×10^6 個の細胞/mLから $(y) \times 10^6$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10（またはこの中から派生する任意の範囲）であることができる。特定の局面において、エレクトロポレーション後の細胞密度は、 1×10^7 個の細胞/mLから $(y) \times 10^7$ の範囲内にあり得るが、 y は2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10（またはこの中から派生する任意の範囲）であることができる。さらに他の局面において、エレクトロポレーション後の細胞密度は、 1×10^7 個の細胞/mLから 1×10^8 個の細胞/mL、 1×10^8 個の細胞/mLから 1×10^9 個の細胞/mL、 1×10^9 個の細胞/mLから 1×10^{10} 個の細胞/mL、 1×10^{10} 個の細胞/mLから 1×10^{11} 個の細胞/mL、または 1×10^{11} 個の細胞/mLから 1×10^{12} 個の細胞/mLの範囲（またはこの中から派生する任意の範囲）中にあり得る。特定の局面において、エレクトロポレーション後の細胞密度は $(y) \times 10^6$ であり得るが、 y は0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100（またはこの中から派生する任意の範囲）のいずれかであることができる。特定の局面において、エレクトロポレーション後の細胞密度は $(y) \times 10^{10}$ であり得るが、 y は0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000（またはこの中から派生する任意の範囲）のいずれかであることができる。

【0185】

特定の態様において、エレクトロポレーションは、任意の原核細胞または真核細胞で行うことができる。一部の局面において、エレクトロポレーションは、ヒト細胞のエレクトロポレーションを含む。他の局面において、エレクトロポレーションは、動物細胞のエレクトロポレーションを含む。特定の局面において、エレクトロポレーションは、細胞株またはハイブリッド細胞型のエレクトロポレーションを含む。一部の局面において、エレクトロポレーションされる細胞は、がん細胞、腫瘍細胞、または不死化細胞である。一部の例において、腫瘍、がん、不死化細胞、または細胞株は、誘導され、他の例において、腫瘍、がん、不死化細胞、または細胞株は、それぞれの状態または条件に自然に入る。特定の局面において、エレクトロポレーションされる細胞または細胞株は、A549、B細胞、B16、BHK-21、C2C12、C6、CaCo-2、CAP/、CAP-T、CHO、CHO2、CHO-DG44、CHO-K1、CHO-DUXB1、COS-1、Cos-7、CV-1、樹状細胞、DLD-1、胚性幹（ES）細胞もしくは誘導体、H1299、HEK 293、293T、293FT、Hep G2、造血幹細胞、HOS、Huh-7、誘導性多能性幹（iPS）細胞も

しくはその誘導体、Jurkat、K562、L5278Y、LNCaP、MCF7、MDA-MB-231、MDCK、間葉細胞、Min-6、単球細胞、Neuro2a、NIH 3T3、NIH3T3L1、NK 細胞、NS0、Panc-1、PC12、PC-3、末梢血細胞、形質細胞、初代線維芽細胞、RBL、Renca、RLE、SF21、SF9、SH-SY5Y、SK-MES-1、SK-N-SH、SL3、SW403、刺激惹起性多能性獲得細胞（STAP）細胞もしくは誘導体、SW403、T細胞、THP-1、腫瘍細胞、U2OS、U937、またはVero細胞であることができる。

【 0 1 8 6 】

特定の態様において、細胞は、トランスフェクトすることが困難であることが当技術分野において公知である細胞である。そのような細胞は、当技術分野において公知であり、例えば、初代細胞、昆虫細胞、SF9細胞、Jurkat細胞、CHO細胞、幹細胞、ゆっくり分裂する細胞、および非分裂細胞を含む。

10

【 0 1 8 7 】

一部の態様において、細胞は、造血幹細胞または造血前駆細胞である。造血幹細胞および造血前駆細胞の有意な医学的可能性のために、胚性幹細胞からの造血前駆細胞の分化のための方法を改善することを試みる、実質的な研究が行われてきている。ヒト成体において、主として骨髄中に存在する造血幹細胞は、血液系の細胞の全てに分化する、活発に分裂する造血（CD34+）前駆細胞の不均一な集団を生じる。成体ヒトにおいて、造血前駆細胞は、増殖および分化し、毎日数千億個もの成熟血液細胞の生成を結果としてもたらす。造血前駆細胞はまた、臍帯血中にも存在する。インビトロで、ヒト胚性幹細胞を、造血前駆細胞に分化させてもよい。造血前駆細胞はまた、末梢血の試料から増殖させてもよいかまたは濃縮されてもよい。造血細胞は、ヒト起源、マウス起源、または任意の他の哺乳動物種であることができる。

20

【 0 1 8 8 】

一部の例において、特定数の細胞を、ある時間においてエレクトロポレーションすることができる。記載したプラットフォームの柔軟性、一貫性、および再現性を考慮すると、最大約 $(y) \times 10^4$ 、 $(y) \times 10^5$ 、 $(y) \times 10^6$ 、 $(y) \times 10^7$ 、 $(y) \times 10^8$ 、 $(y) \times 10^9$ 、 $(y) \times 10^{10}$ 、 $(y) \times 10^{11}$ 、 $(y) \times 10^{12}$ 、 $(y) \times 10^{13}$ 、 $(y) \times 10^{14}$ 、もしくは $(y) \times 10^{15}$ 個までの、または約 $(y) \times 10^4$ 、 $(y) \times 10^5$ 、 $(y) \times 10^6$ 、 $(y) \times 10^7$ 、 $(y) \times 10^8$ 、 $(y) \times 10^9$ 、 $(y) \times 10^{10}$ 、 $(y) \times 10^{11}$ 、 $(y) \times 10^{12}$ 、 $(y) \times 10^{13}$ 、 $(y) \times 10^{14}$ 、もしくは $(y) \times 10^{15}$ 個超（またはこの中から派生する任意の範囲）の細胞をエレクトロポレーションすることができ、 y は、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100秒（またはこの中から派生する任意の範囲）未満内で1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは9（またはこの中から派生する任意の範囲）のいずれかであることができる。他の例において、約 $(y) \times 10^4$ 、 $(y) \times 10^5$ 、 $(y) \times 10^6$ 、 $(y) \times 10^7$ 、 $(y) \times 10^8$ 、 $(y) \times 10^9$ 、 $(y) \times 10^{10}$ 、 $(y) \times 10^{11}$ 、 $(y) \times 10^{12}$ 、 $(y) \times 10^{13}$ 、 $(y) \times 10^{14}$ 、もしくは $(y) \times 10^{15}$ 個（またはこの中から派生する任意の範囲）までの、またはそれ以上の細胞をエレクトロポレーションすることができ、 y は、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、もしくは120分（またはこの中から派生する任意の範囲）未満内で1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは9（またはこの中から派生する任意の範囲）のいずれかであることができる。さらに他の局面において、約 $(y) \times 10^4$ 、 $(y) \times 10^5$ 、 $(y) \times 10^6$ 、 $(y) \times 10^7$ 、 $(y) \times 10^8$ 、 $(y) \times 10^9$ 、 $(y) \times 10^{10}$ 、 $(y) \times 10^{11}$ 、 $(y) \times 10^{12}$ 、 $(y) \times 10^{13}$ 、 $(y) \times 10^{14}$ 、もしくは $(y) \times 10^{15}$ 個（またはこの中から派生する任意の範囲）までの、またはそれ以上の細胞をエレクトロポレーションすることができ、 y は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、もしくは24時間（またはこの中から派生する任意の範囲）未満内で1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは9（またはこの中から派生する任意の範囲）のいずれかであることができる。

30

40

【 0 1 8 9 】

50

「 $(y) \times 10^e$ 」という式は、指数値 e 乗される10を掛けた、任意の数の値を取ることができる変数「 y 」を意味すると理解される。例えば、 y が2である $(y) \times 10^4$ は、 2×10^4 を意味すると理解され、 $2 \times 10,000$ と等価であり、20,000と等しい。 $(y) \times 10e4$ はまた、 $(y) \times 10e4$ または $(y) \times 10^4$ または $(y) \times 10^4$ として表されることができる。

【0190】

細胞または培地の容積は、エレクトロポレーションされた細胞の量、スクリーニングされた細胞の数、スクリーニングされた細胞の型、作製されたタンパク質の型、所望のタンパク質の量、細胞生存率、および所望の細胞濃度に関連する特定の細胞特徴に依存して変動し得る。方法および組成物において使用することができる容積の例は、0.1、0.2、0.3

、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000ml

、もしくは0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、100L（またはこの中から派生する任意の範囲）、およびこれらの中から派生する任意の範囲を含むが、これらに限定されない。そのような容積を保持しうる容器は、本明細書に記載する態様における使用について検討される。そのような容器は、細胞培養皿、ペトリ皿、フラスコ、バイオバッグ、バイオ容器、バイオリアクター、またはバットを含むが、これらに限定されない。10Lまたはそれ以上を上回って保持することが可能な容器などの大規模容積用の容器が特に検討される。特定の態様において、100Lまたはそれ以上の容積が使用される。

【0191】

本明細書に記載する方法による細胞のエレクトロポレーションは、増大した効率および/または減少した毒性の利益を提供することが具体的に企図されている。そのような測定は、ゲノムDNA配列改変を取り込んだ細胞の量を測定すること、マーカーを発現する細胞の量を測定すること、および/またはエレクトロポレーション後の細胞の生存率を測定することにより作製され得る。

【0192】

一部の態様において、配列改変の効率は、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、または50%超である。配列改変の効率は、配列改変を有する細胞の数を決定し、細胞の総数で除することにより測定することができる。ゲノムDNA配列改変の組込みは、当技術分野において公知の方法、例えば直接ゲノムDNA配列決定、差次的制限消化（配列改変によって、制限酵素部位が付加、除去、または変化される場合）、ゲル電

気泳動、キャピラリーアレイ電気泳動、MALDI-TOF MS、動的対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション、分子ビーコン、制限断片長多型、プライマー伸長、温度勾配ゲル電気泳動などにより決定することができる。

【0193】

他の態様において、エレクトロポレーション後の細胞生存率は、少なくとも20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、または85%である。細胞生存率は、当技術分野において公知の方法により測定することができる。例えば、細胞は、細胞計数装置により、エレクトロポレーション前後に計数することができる。他の態様において、アポトーシスを測定する。多量の核酸の導入によって、アポトーシスを誘導し得ると考えられる。本明細書に記載する方法は、当技術分野における他の方法よりも、少ないアポトーシスをもたすことが企図されている。特定の態様において、エレクトロポレーション後にアポトーシスを示す細胞の量は、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5%未満である。アポトーシスは、プログラム細胞死の特定のプロセスを指し、当技術分野において公知の方法により測定することができる。例えば、アポトーシスは、アネキシンVアッセイ法、活性化カスパーゼ3/7検出アッセイ法、およびVybrant（登録商標）アポトーシスアッセイ法（Life Technologies）により測定され得る。

10

【0194】

さらなる態様において、マーカーをコードする核酸を発現する細胞のパーセンテージは、約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、または90%超である。

20

【0195】

本開示の具体的な態様が、範囲または特定の値を含む場合、本明細書に記載するとおり、範囲および特定の値（すなわち、濃度、核酸の長さ、およびパーセンテージ）が、本発明の態様において除外し得ることが具体的に企図されている。本開示が、要素のリスト（例えば細胞型）を含む場合、本発明の態様は具体的に、リスト中の1つまたは複数の要素を除外し得ることも企図されている。

【0196】

3. 他の非化学的方法

細胞スクイー징は、細胞膜の穏やかなスクイー징により細胞中への分子の送達を可能にするトランスフェクション方法である。これは、細胞内送達のためのハイスループットの無ベクターマイクロ流体プラットフォームである。これは、外因性物質または電場に依拠しない。

30

【0197】

ソノポレーションは、細胞膜において孔形成を誘導するために高強度の超音波を使用する。この孔形成は、キャビテーション核の供給源である超音波造影剤の添加により増強されるため、近くの細胞膜と相互作用する気泡のキャビテーションに主に帰する。

【0198】

光学的トランスフェクションは、高集束レーザーを用いて、小さな（直径約1 μm の）穴が細胞の形質膜に一過性に生成される方法である。この技法においては、1回に1個の細胞が処理され、単一細胞解析に特に有用である。

40

【0199】

マウスおよびラットにおける、より程度は低いがいより大きい動物における流体力学的送達では、ほとんどの場合、トランスポゾンを含むプラスミド中のDNAを、血液における10秒未満での相対的に大きな容積の注入を含む流体力学的注射を用いて、肝臓に送達させることができ；DNAのほぼ全ては、この手順により肝臓において発現される。

【0200】

B. 化学物質ベースのトランスフェクション方法

化学物質ベースのトランスフェクションは、いくつかの種類に分けることができる：シクロデキストリン、ポリマー、リポソーム、またはナノ粒子（化学物質またはウイルスによる官能化を伴うかまたは伴わない）。

50

【0201】

最も安価な方法の1つは、リン酸カルシウムを使用する。リン酸イオンを含むHEPES緩衝生理食塩溶液（HeBS）を、トランスフェクトされるべきDNAを含む塩化カルシウム溶液と合わせる。2つを合わせると、正の電荷を有するカルシウムと負の電荷を有するリン酸との細かい沈殿物が形成し、トランスフェクトされるべきDNAをその表面上に結合することになる。沈殿物の懸濁液を次に、トランスフェクトされるべき細胞（通常は単層で成長した細胞培養物）に添加する。完全には理解されていないプロセスによって、細胞は、沈殿物のいくつか、およびそれと共にDNAを取り込む。

【0202】

他の方法は、DNAを結合してそれを細胞中に取り入れる、高度に分岐した有機化合物、いわゆる dendrimer を使用する。

10

【0203】

非常に効率的な方法は、トランスフェクトされるべきDNAのリポソーム、すなわち、ある点では細胞の構造に類似しており、実際に細胞膜と融合してDNAを細胞中に放出することができる、小さな膜で囲まれた物体における封入である。真核細胞については、細胞がより感受性であるため、カチオン性リポソーム（または混合物）を用いてトランスフェクションがより良好に達成される。

【0204】

別の方法は、DEAE-デキストランまたはポリエチレンジアミンなどのカチオン性ポリマーの使用である。負の電荷を有するDNAは、ポリカチオンに結合し、複合体が、エンドサイトーシスを介して細胞により取り込まれる。

20

【0205】

C. 粒子ベースの方法

トランスフェクションの直接アプローチは、DNAを不活性固体（一般的には金）のナノ粒子に連結させ、次に標的細胞の核中に直接「撃つ」遺伝子銃である。

【0206】

マグネトフェクション、つまり磁石補助トランスフェクションは、DNAを標的細胞中に送達するために磁力を使用するトランスフェクション方法である。核酸を最初に、磁気ナノ粒子と会合させる。次に、磁力の印加が、核酸粒子複合体を標的細胞の方へおよびその中へ動かし、そこで荷が放出される。

30

【0207】

インパレフェクションは、プラスミドDNAで官能化されているカーボンナノファイバーまたはシリコンナノワイヤーなどの、細長いナノ構造およびそのようなナノ構造のアレイによって、細胞を突き刺すことにより行われる。

【0208】

別の粒子ベースのトランスフェクションの方法は、粒子衝撃として公知である。核酸は、通常マイクロ発射物に接続され、高速で膜貫通により送達される。

【実施例】

【0209】

V. 実施例

40

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含まれる。以下に続く実施例において開示する技法は、本発明の実施において十分に機能することが本発明者により発見された技法を代表し、従って、その実施のための好ましい様式を構成すると考えることができるが、当業者により理解されるはずである。しかし、当業者は、本開示に照らして、多くの変更が、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、開示する具体的な態様においてなされ、依然として同様または類似の結果を得ることができることを理解するはずである。

【0210】

実施例1：特定のヌクレアーゼおよびプラスミドドナーDNAを使用したゲノムDNAにおける導入遺伝子の標的組込み

50

治療可能性のため、細胞ゲノムDNAにおける効率的な導入遺伝子の標的組込みについては高い需要がある。導入遺伝子の標的組込みは、治療可能性に加えて、タンパク質産生（例えば、抗体産生）への適用可能性を有する。導入遺伝子の標的組込みのために、導入遺伝子は、典型的には、初代細胞、幹細胞、造血細胞、または免疫細胞などの特定の細胞において毒性を有し得る、大きなDNA片またはプラスミド上で送達される。従って、治療上関連する導入遺伝子の標的組込みのために、方法は、治療上関連する細胞の標的ゲノムDNAにおいて高い組込み効率および特異性を提供しなければならない。

【0211】

造血細胞または免疫細胞などの細胞は、活性化のプロセスの最中にプラスミドDNAのトランスフェクションに対して異なる感受性を有し得ることが仮定された。増殖させた造血細胞が、プラスミドDNAトランスフェクションに対して増大した耐毒性および減少した毒性を示し得る、時間ウィンドウがあり得ることが企図された。

【0212】

この仮定を試験するために、標的組込みを、K562細胞およびヒトT細胞において実施した。ガイドRNA（gRNA）Cas9を使用した。gRNAテンプレートは、T7プロモーターとコンジュゲートされたプライマーでのPCR増幅により作製した。使用したプライマーは、SM285.AAVS1.g2.F: ttaatagcactcactataGGGGCCACTAGGGACAGGAT (SEQ ID NO:19)

および SM212.sgRNA.R: aaaagcaccgactcgggtgcc (SEQ ID NO:20)

であった。Cas9テンプレートは、Cas9プラスミドのエンドヌクレアーゼ直線化（XhoI 1）により得た。mRNAを次に、mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Kit（Ambionから商業的に入手可能）により作製した。使用したドナーDNAは、GFPを含むプラスミドDNAであった。

【0213】

A. K562中へのGFP導入遺伝子の標的組込み

図1は、エレクトロポレーションによるトランスフェクション後1、5、および12日目に、細胞の27%、32%、および37%においてGFPが発現していることを示す。期待されたとおり、エレクトロポレーションを受けていない細胞（-EP）においては有意なGFP発現が見られなかったが、標的組込みを付与するガイドRNAおよびCas9を含まなかったトランスフェクションにおいて、35%の細胞がGFPを発現した。しかし、この発現は一過性であり、5日および12日のその後の試験された時点では、そのような有意な量のGFP発現は見られなかった。CRISPRシステムをトランスフェクトされた細胞のみが、1日を過ぎた時点で有意なレベルのGFP発現を保持していた（図1）。これは、CRISPRシステムを用いてPGK-eGFP-PolyAプラスミドをK562細胞のAAVS1部位中に標的化した追加の実験において、さらに確認された。図14に示すとおり、標的組込み（+CRISPR）により、トランスフェクション後少なくとも29日目の時点でGFPの安定な発現が可能になる（図14、第2列および第4列）。

【0214】

トランスフェクトされたK562細胞を、生存率、発現、および平均蛍光強度について試験した（図13）。K562細胞中にトランスフェクトされたプラスミドは、細胞生存率においていかなる低下も示さなかった（図13A）。図13B～図13Cに示すとおり、CRISPRシステムをトランスフェクトされたK562細胞のみが、トランスフェクション後5日を超えて、有意な量のGFP発現を保持していた。導入遺伝子とCRISPRシステムとのコトランスフェクションにより、導入遺伝子の安定した部位特異的な組込みが可能になるため、これは期待される。導入遺伝子の発現は、選択圧なしでこれらの細胞において残る。

【0215】

要約すると、プラスミドDNAは、K562細胞の有意な細胞毒性を誘導せず、細胞の選択なしで効率的な標的組込みが見られた（30～40%）。

【0216】

B. 線維芽細胞中へのGFP導入遺伝子の標的組込み

GFP導入遺伝子（PGK-eGFP-PolyA）の標的組込みを、線維芽細胞中に組み込むことができるかどうかを試験するために、ヒト線維芽細胞にGFPプラスミドDNA（PGK-eGFP-PolyA）

10

20

30

40

50

を、CRISPRシステムを伴って (+Cas0/gRNA) または伴わずに (-Cas9/gRNA) エレクトロポレーションした。匹敵するレベルのGFP発現が、トランスフェクション後15日目まで2つの実験において見られたが、CRISPRシステムをトランスフェクトした細胞のみが、トランスフェクション後23および26日目に有意なGFP発現を保持していた (図12)。

【0217】

C. ヒトT細胞中へのGFP導入遺伝子の標的組込み

図2に示すとおり、ヒトT細胞は、プラスミドDNAのトランスフェクション後に低下した生存率 (図2A)、低下した増殖 (図2B)、および低下したGFP発現 (図2C) を示した。しかし、これらの負の効果は、mRNA-GFPをトランスフェクトされた細胞において克服され、プラスミドDNAが毒性の源であったことが示唆された。

【0218】

次に、細胞の活性化後の異なる時点でプラスミドDNAをトランスフェクトされた細胞が、細胞の生存率に影響を及ぼすかどうかを試験した。DYNABEADS (登録商標) Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologiesから商業的に入手可能) による活性化の1日後にエレクトロポレーションされたT細胞は、対照と比較して生存率の有意な低下を示さなかった (図3A)。活性化後2日目のトランスフェクションは、活性化後1日と比較して細胞生存率の減少を結果としてもたらした (図3B) が、細胞生存率は、各試験試料において依然として40%を超えていた。3日目には、細胞生存率のさらなる低下がある (図3C)。これらのデータにより、細胞の活性化は、プラスミドDNAトランスフェクションに関連付けられる毒性を低下させることが示される。同じ細胞を、GFP発現 (図4A~図4C) および平均蛍光強度 (MFI、図5A~図5C) について試験した際、最高レベルのGFP発現が、細胞が活性化の2日後にトランスフェクトされた場合に見られた (図4Bおよび図5B)。

【0219】

トランスフェクションウィンドウを、増殖させたT細胞においてさらに研究した。T細胞を、以前に記載したとおりに活性化し、活性化後1日目、2日目、または3日目のいずれかにエレクトロポレーションした。図6は、異なる時点でエレクトロポレーションされた細胞の増殖を示す。活性化後1日目にエレクトロポレーションされた細胞は、最も多い細胞増殖を示し (図6A)、活性化後3日目にエレクトロポレーションされた細胞は、最も少量の細胞増殖を示した。これらのデータは、トランスフェクションの前の細胞の活性化が、プラスミドDNAのより良好な耐容性を可能にすることを実証する。

【0220】

次に、導入遺伝子の標的組込みを、活性化後のT細胞のエレクトロポレーションにより実施できるかどうかを試験した。増殖させたT細胞を、以前に記載したとおりに活性化し、次に、活性化後2日目に、100 μ g/ml のGFPプラスミドDNAをエレクトロポレーションした。図7に示すとおり、エレクトロポレーションなしの対照 (-EP) は、低レベルのバックグラウンド蛍光を示した。AAVS1部位での部位特異的な組込みを可能にするCRISPRシステム (gRNA/Cas9) ではなくGFPプラスミドDNAをトランスフェクトされた細胞の3%が、トランスフェクションの1日後にGFP蛍光を示した。しかし、これらの細胞におけるGFPの発現は、一過性であり、トランスフェクション後4日目には2%に、トランスフェクション後11日目には0.3%に減少した。対照的に、CRISPRシステムを伴う細胞は、トランスフェクション後11日目にGFP発現を維持していた。これらの細胞の4、5、および4%が、それぞれ、トランスフェクション後1、4、および11日目にGFP発現を示した。この実験を繰り返し、結果により、GFPプラスミドDNAおよびCRISPR複合体をトランスフェクトされた細胞は、トランスフェクションの6日後にGFP発現を維持し (細胞の2.3%)、一方で、GFPプラスミドDNAのみをトランスフェクトされた細胞は、トランスフェクションの6日後にGFPを発現しなかったことが確認された (図8)。

【0221】

図9は、細胞の活性化の1、2、3、または4日後のいずれかにトランスフェクトされた細胞の結果を示す。図9Aは、CRISPRシステムを伴わない50、100、もしくは200 μ g/ml のプラスミドDNA、またはCRISPRシステムを伴う50、100、もしくは200 μ g/ml のプラスミドDNAの

いずれかをトランスフェクトされた細胞の増殖を示す。図9Aに示すとおり、細胞増殖は、細胞がトランスフェクション後3日目またはそれ以降にトランスフェクトされた場合に減退した。さらに、増殖は、DNA濃度に依存するようには見られなかった。図9Dは、細胞の生存率を示す。図9Dに示すとおり、細胞生存率もまた、細胞がトランスフェクション後3日目またはそれ以降にトランスフェクトされた場合に減退し、この生存率はDNA濃度に依存するようには考えられなかった。図9Bは、細胞が活性化の2日後にトランスフェクトされた場合に、最高パーセンテージのGFP発現細胞が得られたことを示す。図9Cは、細胞が活性化の2日後にトランスフェクトされた場合に、組み込まれたイベントの相対数（細胞数×GFP陽性細胞のパーセンテージとして算出される）が最高であったことを示す。

【0222】

10

これらの実験を、以前に記載したとおりに活性化され、活性化の2日後に100 µg/mLのプラスミドDNAおよび-CRISPR（図15、第1列および第3列）または+CRISPR（図15、第2列および第4列）をエレクトロポレーションされた、増殖させたT細胞のFACS解析によりさらに確認した。図15に示すとおり、CRISPRをトランスフェクトされた細胞のみが、4日または6日の時点を超えて、安定な導入遺伝子発現を示した。

【0223】

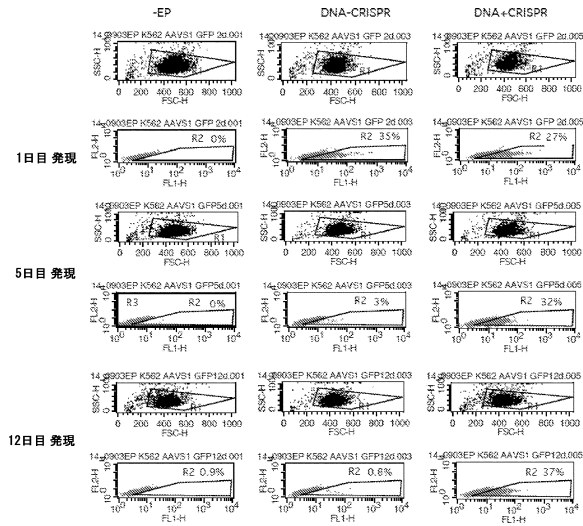
結論として、プラスミドDNAのトランスフェクションの前のT細胞の活性化は、これらの細胞におけるプラスミドDNAに関連付けられる毒性および効率損失を克服した。

【0224】

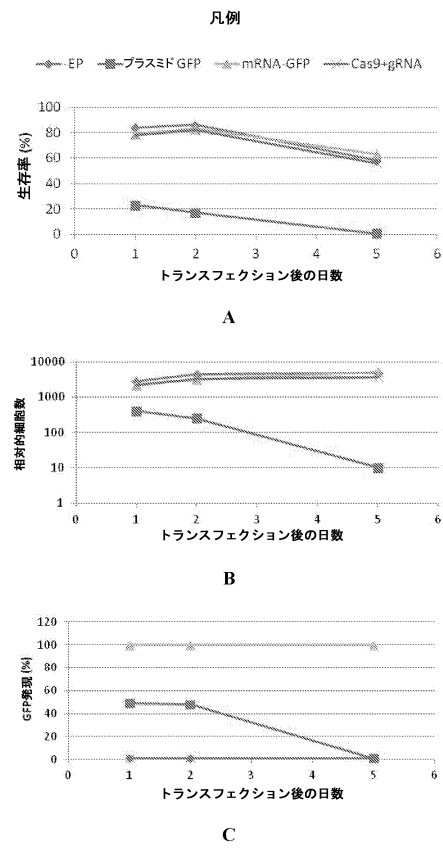
20

本明細書に開示および特許請求される方法の全てが、本開示に照らして、過度の実験を伴わずに構成および実行されることができる。本発明の組成物および方法を、好ましい態様に関して説明してきたが、バリエーションを、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載する方法および方法の工程または一連の工程に適用し得ることが当業者には明らかであると考えられる。より具体的には、化学的および生理学的の両方で関連する特定の作用物質を、本明細書に記載する作用物質の代わりに使用することができ、同じかまたは類似の結果が達成され得ることは明らかであると考えられる。当業者に明らかな全てのそのような類似の置換および改変が、添付の特許請求の範囲により規定される、本発明の精神内、範囲内、および概念内にあると見なされる。

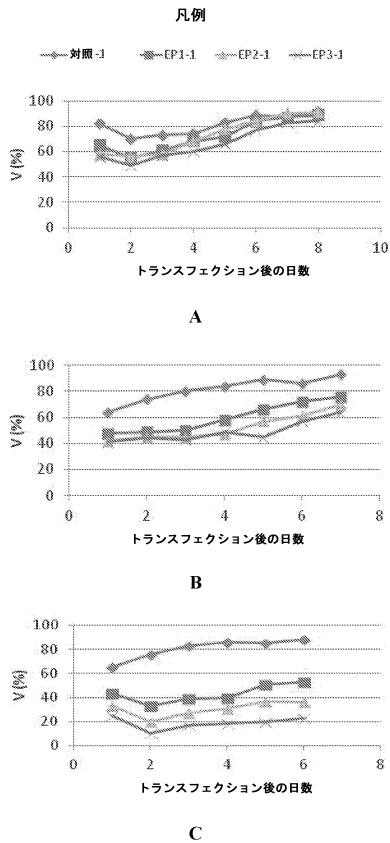
【図 1】



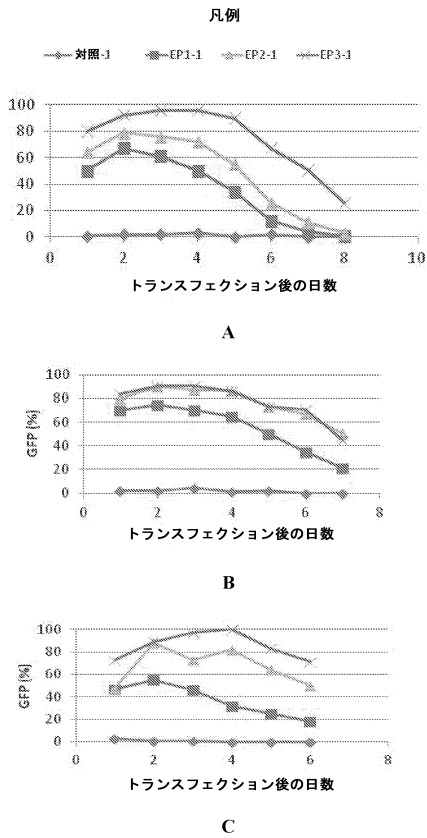
【図 2】



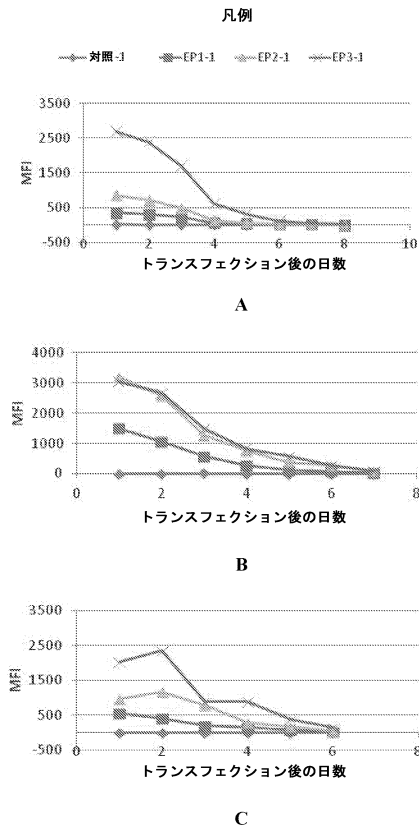
【図 3】



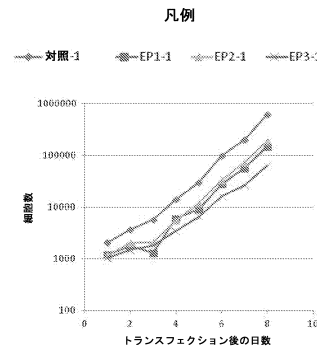
【図 4】



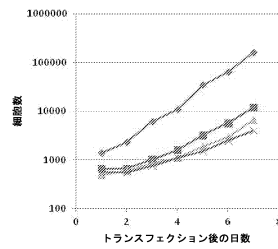
【図 5】



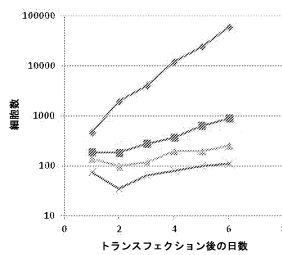
【図 6 A】



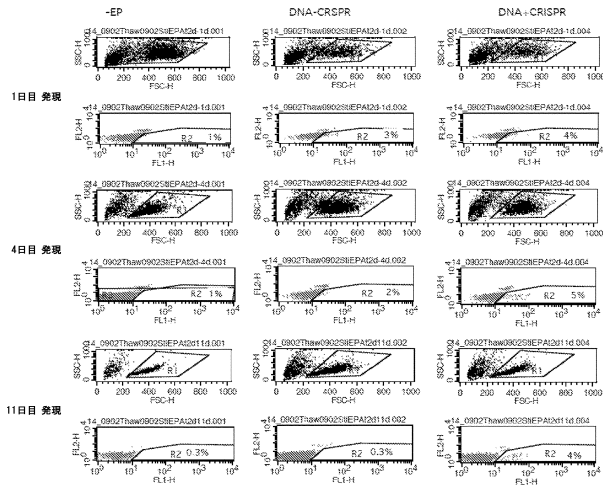
【図 6 B】



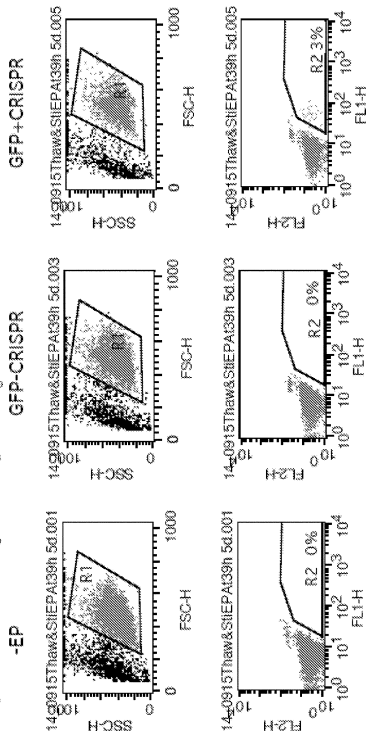
【図 6 C】



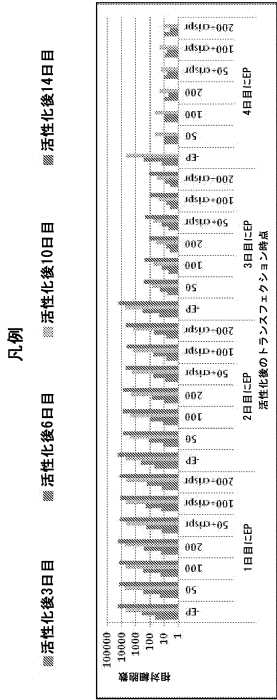
【図 7】



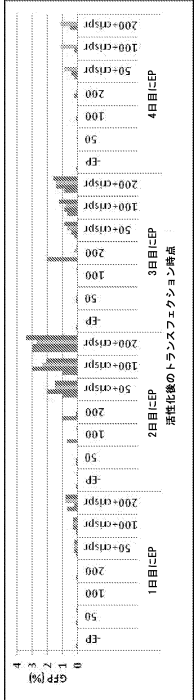
【図 8】



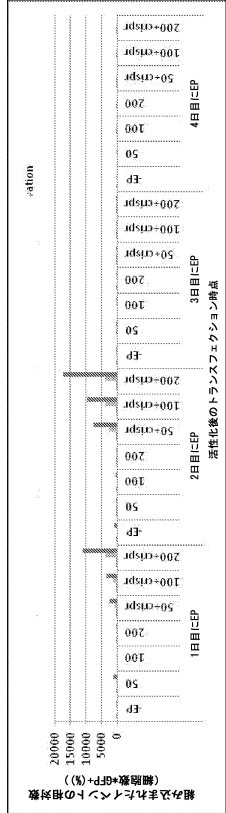
【図 9 A】



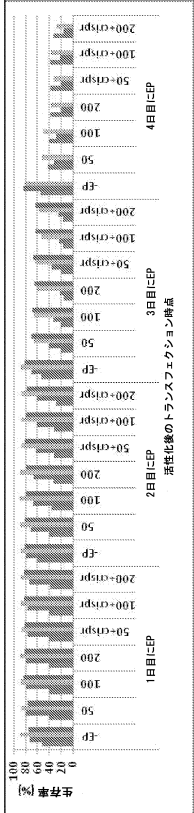
【図 9 B】



【図 9 C】



【図 9 D】



【 図 1 0 】

トナー-DNA:

atggtgcattctgactcctgTAGtggagaagctctgccgttact

標的ゲノムDNA:

atggtgcatctgactcctgtggagaagtctgccgttact

taccacgtagactgaggacacctcttcagacggcaatga

A

ドナー-DNA:

atggtgcatctgactcctgAggagaagtctgccgttact

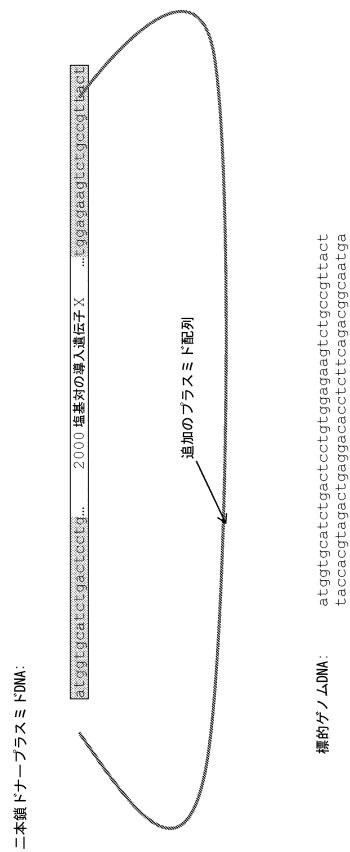
標的ゲノムDNA:

atggtgcatctgactcctgtggagaagtctgccgttact

taccacgtagactgaggacacctcttcagacggcaatga

B

【 図 1 1 】



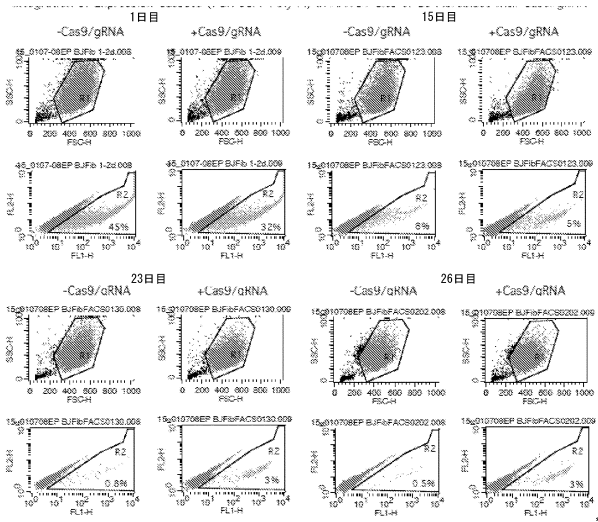
追加のプラスミド配列

標的ゲノムDNA: atggtgcatctgactcctgtggagaagtctgccgttact
taccacgtagactgaggacacctcttcagacggcaatga

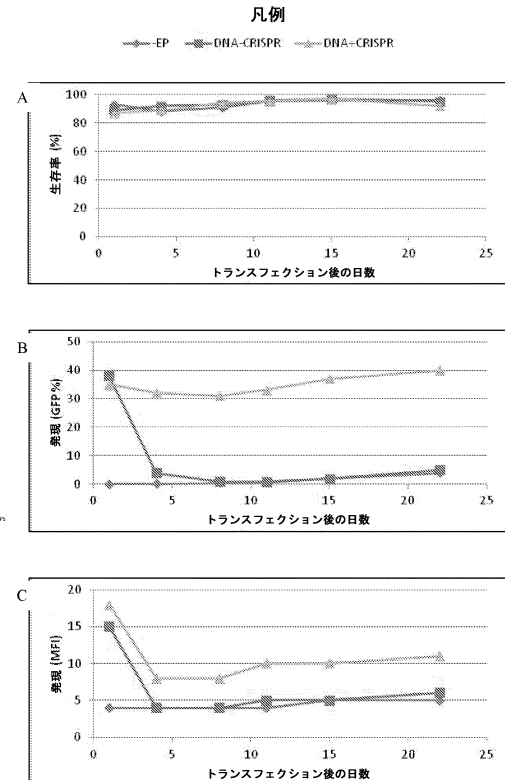
標的ゲノムDNA・

標的ゲノムDNA・

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



A

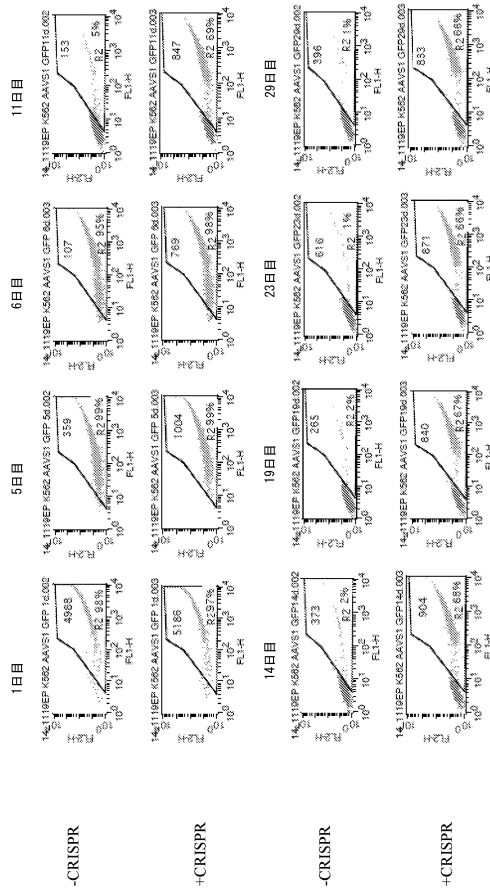
トランスフェクション後の日数	トランスフェクション前 [%]	トランスフェクション後 [%]
0	90	90
4	90	88
8	92	92
12	95	95
15	96	96
22	95	95

B

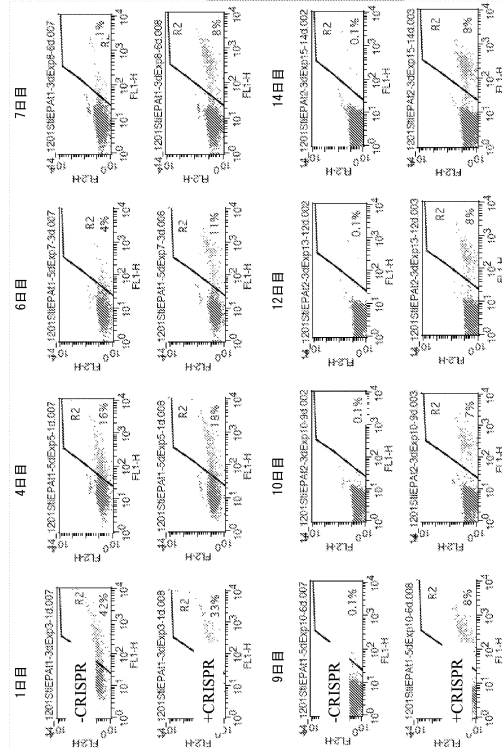
トランスフェクション後の日数	293T (発現 (GFP))	Hep2 (発現 (GFP))	HeLa (発現 (GFP))
0	0	38	38
2	0	32	5
4	0	32	5
6	0	32	1
8	0	32	1
10	0	33	1
12	0	33	1
14	0	36	2
16	0	37	2
18	0	38	4
20	0	39	5
22	0	40	6

トランスフェクション後の日数	対照 (MF)	CD45 (MF)	CD45+CD133 (MF)
0	4.0	15.0	18.0
3	4.0	4.0	8.0
7	4.0	4.0	7.5
11	4.5	4.5	10.0
15	4.5	5.0	10.0
22	5.0	6.0	11.0

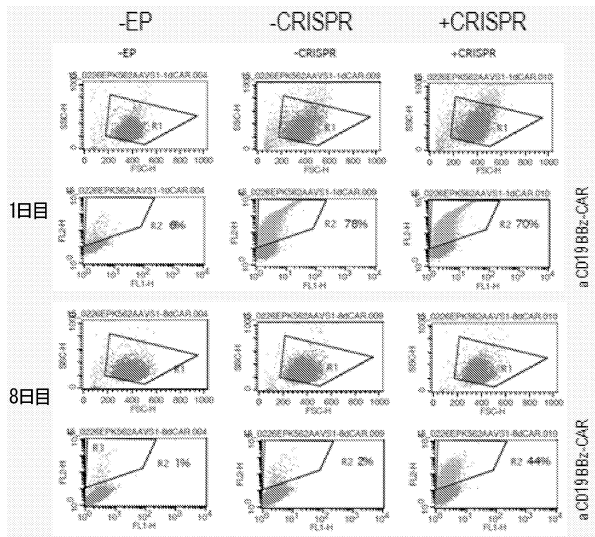
【図 14】



【図 15】



【図 16】



【配列表】

0006885876000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/0783

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 リ リンホン
アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州 ゲイザースバーグ ファーストフィールド ロード 2 2 スイート 2 5 0 マックスサイト インコーポレーティッド内

(72)発明者 ペシュワ マドハスダン
アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州 ゲイザースバーグ ファーストフィールド ロード 2 2 スイート 2 5 0 マックスサイト インコーポレーティッド内

審査官 西 賢二

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 1 9 1 1 2 8 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 5 9 1 7 3 (WO, A 2)
Genovese, P. et al., "Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells", Nature, 2 0 1 4 年, Vol. 510, pp. 235-240

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)