

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7275054号

(P7275054)

(45)発行日 令和5年5月17日(2023.5.17)

(24)登録日 令和5年5月9日(2023.5.9)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 Z N A

C 1 2 N 5/078(2010.01)

C 1 2 N 5/078

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

請求項の数 23 (全52頁)

(21)出願番号 特願2019-569305(P2019-569305)

(86)(22)出願日 平成30年6月15日(2018.6.15)

(65)公表番号 特表2020-524998(P2020-524998
A)

(43)公表日 令和2年8月27日(2020.8.27)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/037919

(87)国際公開番号 WO2018/232356

(87)国際公開日 平成30年12月20日(2018.12.20)

審査請求日 令和3年6月15日(2021.6.15)

(31)優先権主張番号 62/520,117

(32)優先日 平成29年6月15日(2017.6.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/552,180

(32)優先日 平成29年8月30日(2017.8.30)

最終頁に続く

(73)特許権者 506115514

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ

ィ オブ カリフォルニア

The Regents of the U

niversity of Califo

rnia

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9

4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フ

ランクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2

番 フロア

(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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 標的化された非ウイルスDNA挿入

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、初代ヒトT細胞のゲノムを編集するインビトロまたはエクスピボ方法：

(a) Cas9リボ核タンパク質複合体(RNP)-DNA鋳型複合体を提供する工程であって、該RNP-DNA鋳型複合体が、

(i) RNPがCas9ヌクレアーゼドメインおよびガイドRNAを含み、該ガイドRNAが細胞のゲノムの標的領域に特異的にハイブリダイズし、該Cas9ヌクレアーゼドメインが該標的領域を切断して該細胞の該ゲノム中に挿入部位を生じさせる、該RNPと；

(ii) 二本鎖または一本鎖のDNA鋳型であって、該DNA鋳型のサイズが約200ヌクレオチドよりも大きく、該DNA鋳型の5'および3'末端が、該挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、DNA鋳型と

を含み、該複合体におけるRNP：DNA鋳型のモル比が約3:1～約100:1である、工程；
ならびに

(b) 該RNP-DNA鋳型複合体を細胞に導入する工程であって、該RNP-DNA鋳型複合体と該細胞とが、該RNP-DNA鋳型複合体を該細胞に導入する前に混合される、工程。

【請求項 2】

RNP-DNA鋳型複合体が、RNPをDNA鋳型とともに約20～25 の温度で約1分未満～約30分の間インキュベートすることによって形成される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

(a) DNA鋳型が直鎖状DNA鋳型である、

10

20

(b) DNA鋳型が一本鎖DNA鋳型、任意で純粋な一本鎖DNA鋳型である、または
 (c) (i) DNA鋳型が細胞のゲノムに非ウイルス的に挿入されるか、もしくは(ii) DNA鋳型がウイルスベクターの非存在下で細胞のゲノムに挿入される、
 請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

(a) RNPがCas9ヌクレアーゼを含む、または

(b) RNPがCas9ニッカースを含む、

請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

RNP-DNA鋳型複合体が少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項6】

(a) 少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体が構造的に異なるガイドRNAを含み、任意で、構造的に異なるRNP複合体それぞれがCas9ニッカースを含み、構造的に異なるガイドRNAが標的領域の反対の鎖にハイブリダイズする、または

(b) 少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体が構造的に異なるCas9ヌクレアーゼドメインを含む、

請求項5記載の方法。

【請求項7】

前記導入する工程がエレクトロポレーションを含む、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項8】

(a) RNP：DNA鋳型のモル比が約5：1～約15：1である、

(b) RNP：DNA鋳型のモル比が約5：1～約10：1である、または

(c) RNP：DNA鋳型のモル比が約8：1～約12：1である、

請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

(a) DNA鋳型のサイズが約1kbよりも大きい、

(b) DNA鋳型が約2.5pM～約25pMの濃度である、および/または

(c) DNA鋳型の量が約1μg～約10μgである、

請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項10】

RNP：DNA鋳型のモル比が約8：1～約12：1である、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

RNP-DNA鋳型複合体が約 1×10^5 個～約 2×10^6 個の細胞に導入される、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

DNA鋳型のサイズが約1kbよりも大きい、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

40

(a) T細胞が、制御性T細胞、エフェクターT細胞、もしくはナイーブT細胞であり、任意で、制御性T細胞、エフェクターT細胞、もしくはナイーブT細胞が、CD4⁺T細胞である、

(b) T細胞がCD8⁺T細胞である、または

(c) T細胞がCD4⁺CD8⁺T細胞である、

請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

DNA鋳型のサイズが、約5kbより大きい、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

以下の工程を含む、初代ヒトT細胞を編集するインビトロまたはエクスピボ方法：

50

(a) リボ核タンパク質複合体 (RNP) -DNA鋳型複合体を提供する工程であって、該RNPがヌクレアーゼドメインおよびガイドRNAを含み、該DNA鋳型が約200ヌクレオチド以上であり、該DNA鋳型の5'および3'末端が、初代免疫細胞のゲノム中の挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含み、ここで、該複合体におけるRNP：DNA鋳型のモル比が約3：1～約100：1である、工程；

(b) 該RNP-DNA鋳型複合体を初代免疫細胞に非ウイルス的に導入する工程であって、該ガイドRNAが初代免疫細胞のゲノムの標的領域に特異的にハイブリダイズし、該ヌクレアーゼドメインが該標的領域を切断して該初代免疫細胞のゲノム中に挿入部位を生じさせる、工程；ならびに

(c) 該初代免疫細胞のゲノム中の挿入部位にDNA鋳型を挿入することにより、該初代免疫細胞を編集する工程。

10

【請求項 16】

非ウイルス的に導入する工程がエレクトロポレーションを含む、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

RNP-DNA鋳型複合体は、RNPをDNA鋳型とともに約20 ～ 約25 の温度で約1分未満～約30分の間インキュベートすることによって形成される、請求項15または16記載の方法。

【請求項 18】

(a) 前記RNPはCas9ヌクレアーゼを含む；または

(b) 前記RNPはCas9ニッカーゼを含む、

請求項15～17のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 19】

RNP：DNA鋳型のモル比が約8：1～約12：1である、請求項15～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項 20】

(a) DNA鋳型は約2.5pM～約25pMの濃度である；および/または

(b) DNA鋳型の量は約1μg～約10μgである；

請求項15～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項 21】

(a) T細胞が制御性T細胞、エフェクターT細胞またはナイーブT細胞であり、ここで任意で、制御性T細胞、エフェクターT細胞またはナイーブT細胞はCD4⁺T細胞である；

(b) T細胞はCD8⁺T細胞である；または

(c) T細胞はCD4⁺CD8⁺T細胞である、

請求項15～20のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 22】

DNA鋳型のサイズが約1kbよりも大きい、請求項15～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項 23】

DNA鋳型のサイズが約5kbよりも大きい、請求項15～21のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

従来の関連出願

本出願は、いずれも全体として参照により本明細書に組み入れられる、2017年6月15日に出願された米国特許仮出願第62/520,117号および2017年8月30日に出願された米国特許仮出願第62/522,180号の恩典を主張する。

【0002】

連邦政府資金援助を受けた研究開発の下で成された発明に対する権利に関する声明

本発明は、国立衛生研究所によって付与された助成金P50 GM082250号の下、政府支援を受けて成されたものである。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

50

【0003】

発明の背景

Cas9-gRNA複合体(RNP)を細胞中にエレクトロポレーションすることによって細胞のゲノム中の標的化部位に小さな変異(インデル)を導入する能力が開発された。しかし、これらの変異はランダムであり、非相同末端結合によって導入されるため、これらに変更によってタンパク質がフレームからロックアウトされることがある(Schumann et al. PNAS 112(33): 10437-10442 (2015))。化学合成によって作製された小さなssDNAオリゴヌクレオチド(ssODN)をエレクトロポレーションすることによって所定のDNA配列をゲノム中の指定された標的部位に導入するための他の方法が開発されている。これは、NHEJよりも非効率的であるが、最終的な配列が決定されることを許す相同組換え修復(HDRと呼ばれる)により、非常に少量の外因性DNA(通常は約1塩基対(bp)~約30塩基対(bp))の組込みを可能にする。しかし、これらのオリゴヌクレオチドのサイズは、化学合成することができるDNAの長さ(<約200bp)に限定され、その大きな部分が相同アームによって占められるため、多くの用途の場合、限られた組込みのサイズのせいで、この方法は役に立つことができない。サイズ制限に加えて、細胞中への裸のDNA、特に約200bpよりも大きい裸のDNAのエレクトロポレーションが、多くの場合、本来そなわっている細胞防御機構の活性化のせいで、大規模な細胞死を招くことが十分に立証されている(Cornu et al. Nat. Med. 23: 415-423 (2017); Hornung and Latz, Nature Reviews Immunology 10: 123-130 (2010); Zhao et al., Mol. Ther. 13(1): 151-159 (2006))。大きなドナー核酸配列を細胞に送達するために非組込み性ウイルスベクター、たとえばインテグラーゼ欠損型レンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが使用されてきたが、これらのベクターはウイルス感染を必要とし、オフターゲット作用を生じさせる。したがって、細胞のゲノム中への大きなヌクレオチド配列の標的化挿入のための組成物および方法が必要とされる。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、細胞のゲノムを編集するための組成物および方法に関する。本発明者らは、大きなヌクレオチド配列、たとえば約200ヌクレオチドよりも大きい長さの配列を細胞のゲノム中の標的化領域に挿入することができることを見いだした。いくつかの方法において、オフターゲット作用を減らしながら、および/または細胞生存率の損失を減らしながら、約200ヌクレオチドよりも大きい長さの配列の組込みが起こる。

【0005】

いくつかの態様において、本発明は、(a) Cas9リボ核タンパク質複合体(RNP)-DNA鋳型複合体を提供する工程であって、該RNP-DNA鋳型複合体が(i) RNPがCas9ヌクレアーゼドメインおよびガイドRNAを含み、該ガイドRNAが細胞のゲノムの標的領域に特異的にハイブリダイズし、該Cas9ヌクレアーゼドメインが標的領域を切断して細胞のゲノム中に挿入部位を生じさせる、該RNPと；(ii) 二本鎖または一本鎖のDNA鋳型であって、該DNA鋳型のサイズが約200ヌクレオチドよりも大きく、該DNA鋳型の5'および3'末端が、該挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、DNA鋳型とを含み、該複合体におけるRNP:DNA鋳型のモル比が約3:1~約100:1である、工程；ならびに(b) 該RNP-DNA鋳型複合体を細胞に導入する工程を含む、細胞のゲノムを編集する方法を提供する。

【0006】

いくつかの態様において、DNA鋳型は直鎖状DNA鋳型である。いくつかの例において、DNA鋳型は一本鎖DNA鋳型である。特定の態様において、一本鎖DNA鋳型は純粋な一本鎖DNA鋳型である。

【0007】

いくつかの態様において、RNP-DNA鋳型複合体は、RNPをDNA鋳型とともに約20~25の温度で約1分~約30分の間インキュベートすることによって形成される。いくつかの態様において、RNP-DNA鋳型複合体と細胞とは、RNP-DNA鋳型複合体を細胞に導入する

前に混合される。

【0008】

いくつかの態様において、RNPはCas9ヌクレアーゼを含む。いくつかの態様において、RNPはCas9ニッカーゼを含む。いくつかの態様において、RNP-DNA鋳型複合体は少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体を含む。いくつかの態様において、少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体は構造的に異なるCas9ヌクレアーゼドメインを含む。いくつかの態様において、少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体は構造的に異なるガイドRNAを含む。いくつかの態様において、少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体が構造的に異なるガイドRNAを含む場合、構造的に異なるRNP複合体それぞれはCas9ニッカーゼを含み、構造的に異なるガイドRNAは標的領域の反対の鎖にハイブリダイズする。

10

【0009】

いくつかの態様において、RNP-DNA鋳型複合体を細胞に導入する工程はエレクトロポレーションを含む。いくつかの態様において、RNP：DNA鋳型のモル比は約5：1～約15：1である。いくつかの態様において、RNP：DNA鋳型のモル比は約5：1～約10：1である。いくつかの態様において、RNP：DNA鋳型のモル比は約8：1～約12：1である。いくつかの態様において、DNA鋳型は約2.5pM～約25pMの濃度である。いくつかの態様において、DNA鋳型のサイズは約1kbよりも大きい。いくつかの態様において、DNA鋳型の量は約1μg～約10μgである。

【0010】

いくつかの態様において、RNP-DNA鋳型複合体は約 1×10^5 個～約 2×10^6 個の細胞に導入される。いくつかの態様において、細胞は初代造血細胞または初代造血幹細胞である。いくつかの態様において、初代造血細胞は免疫細胞である。いくつかの態様において、免疫細胞はT細胞である。いくつかの態様において、T細胞は制御性T細胞、エフェクターT細胞またはナイーブT細胞である。いくつかの態様において、T細胞はCD8⁺T細胞である。いくつかの態様において、T細胞はCD4⁺CD8⁺T細胞である。

20

[本発明1001]

(a) Cas9リボ核タンパク質複合体(RNP)-DNA鋳型複合体を提供する工程であって、該RNP-DNA鋳型複合体が、

(i) RNPがCas9ヌクレアーゼドメインおよびガイドRNAを含み、該ガイドRNAが細胞のゲノムの標的領域に特異的にハイブリダイズし、該Cas9ヌクレアーゼドメインが該標的領域を切断して該細胞の該ゲノム中に挿入部位を生じさせる、該RNPと；

30

(ii) 二本鎖または一本鎖のDNA鋳型であって、該DNA鋳型のサイズが約200ヌクレオチドよりも大きく、該DNA鋳型の5'および3'末端が、該挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、DNA鋳型と

を含み、該複合体におけるRNP：DNA鋳型のモル比が約3:1～約100:1である、工程；
ならびに

(b) 該RNP-DNA鋳型複合体を細胞に導入する工程
を含む、細胞のゲノムを編集する方法。

[本発明1002]

RNP-DNA鋳型複合体が、RNPをDNA鋳型とともに約20～25℃の温度で約1分未満～約30分の間インキュベートすることによって形成される、本発明1001の方法。

40

[本発明1003]

DNA鋳型が直鎖状DNA鋳型である、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

DNA鋳型が一本鎖DNA鋳型である、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

DNA鋳型が純粋な一本鎖DNA鋳型である、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1006]

RNP-DNA鋳型複合体と細胞とが、該RNP-DNA鋳型複合体を該細胞に導入する前に混合される、本発明1001～1005のいずれかの方法。

50

[本発明1007]

RNPがCas9ヌクレアーゼを含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

RNPがCas9ニッカーゼを含む、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1009]

RNP-DNA鋳型複合体が少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体を含む、本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体が構造的に異なるガイドRNAを含む、本発明1009の方法。

10

[本発明1011]

構造的に異なるRNP複合体それぞれがCas9ニッカーゼを含み、構造的に異なるガイドRNAが標的領域の反対の鎖にハイブリダイズする、本発明1010の方法。

[本発明1012]

少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体が構造的に異なるCas9ヌクレアーゼドメインを含む、本発明1009の方法。

[本発明1013]

前記導入する工程がエレクトロポレーションを含む、本発明1001～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

RNP：DNA鋳型のモル比が約5：1～約15：1である、本発明1001～1013のいずれかの方法。

20

[本発明1015]

RNP：DNA鋳型のモル比が約5：1～約10：1である、本発明1001～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

RNP：DNA鋳型のモル比が約8：1～約12：1である、本発明1001～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

DNA鋳型のサイズが約1kbよりも大きい、本発明1001～1016のいずれかの方法。

30

[本発明1018]

DNA鋳型が約2.5pM～約25pMの濃度である、本発明1001～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

DNA鋳型の量が約1μg～約10μgである、本発明1001～1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

細胞が初代造血細胞または初代造血幹細胞である、本発明1001～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

RNP-DNA鋳型複合体が約 1×10^5 個～約 2×10^6 個の細胞に導入される、本発明1001～1020のいずれかの方法。

40

[本発明1022]

細胞が初代造血細胞である、本発明1001～1021のいずれかの方法。

[本発明1023]

初代造血細胞が免疫細胞である、本発明1022の方法。

[本発明1024]

免疫細胞がT細胞である、本発明1023の方法。

[本発明1025]

T細胞が制御性T細胞、エフェクターT細胞またはナイーブT細胞である、本発明1024の方法。

[本発明1026]

50

制御性T細胞、エフェクターT細胞またはナイーブT細胞がCD4⁺T細胞である、本発明1025の方法。

[本発明1027]

T細胞がCD8⁺T細胞である、本発明1024の方法。

[本発明1028]

T細胞がCD4⁺CD8⁺T細胞である、本発明1024の方法。

【図面の簡単な説明】

【0011】

本出願は以下の図面を含む。図面は、組成物および方法の特定の態様および/または特徴を例示し、組成物および方法の任意の説明を補足するためのものである。図面は、そう

10

ではない。

【0012】

(図1)細胞中の実施可能な編集効率を達成するために必要な高濃度の裸のDNAのエレクトロポレーション後の低い細胞生存率を示す。

(図2)エレクトロポレーション時、細胞を付加する前の室温で短時間のインキュベーションによるDNA鑄型(プラスミド)とRNPとの複合化が、一定量の長いプラスミドdsDNAをエレクトロポレーションしたとき通常に見られる生存率損失を減らすことを示す。

(図3)エレクトロポレーション時、細胞を付加する前の室温で短時間のインキュベーションによるDNA鑄型(直鎖状二本鎖DNA(dsDNA)鑄型)とRNPとの複合化が、長い直鎖状二本鎖DNAをエレクトロポレーションしたとき通常に見られる生存率損失を減らすことを示す。

20

(図4)約10:1のRNP:DNA鑄型の例示的なモル比が、エレクトロポレーション後、組込みの効率および生存率の両方を維持することを示す。

(図5)約10:1のRNP:DNA鑄型の例示的なモル比が、生存率損失の作用と効率の作用とのバランスをとり、陽性細胞組込み数を最大化することを示す。

(図6)約10:1のRNP:DNA鑄型の例示的なモル比が、約750塩基対よりも大きいサイズの大きな鑄型の高効率挿入を可能にすることを示す。

(図7)長いDNA鑄型の挿入がなおも一定量のオフターゲット組込みを生じさせることがあることを示す。

30

(図8)長い一本鎖DNA(ssDNA)鑄型をドナーとして使用することによってオフターゲット組込みを減らすことができることを示す。

(図9)2つのgRNAおよびCas9ニッカーゼ(D10A)を使用して、オフターゲットdsDNA切断を防ぐ、本明細書に開示される非ウイルス組込みを挿入することができることを示す。

(図10)図10A~Fは、CRISPR/Cas9 RNPの同時エレクトロポレーションがdsDNA誘導生存率損失を減らすことを示す。(A)初代ヒトT細胞中にエレクトロポレーションされた直鎖状dsDNA鑄型(相同組換え修復鑄型、長さ約1350bp、RAB11AへGFP融合物を標的化、図11A)は、鑄型量の増加とともに顕著な生存率損失を生じさせる。同量のdsDNA鑄型とRNP 100pmolとのエレクトロポレーションは驚くことに生存率を高めた。(B)プラスミドおよび直鎖状dsDNA鑄型の両方で、RNPの付加がエレクトロポレーション後の生存率を高めた。注目すべきことに、短いssDNAオリゴドナーヌクレオチド(ssODN)では生存率の損失は見られなかった。(C)生存率の増大を見るためには、RNPがDNAと同時に並行的に送達されなければならない。2人のドナーからのT細胞を、それぞれ、間に8時間の休憩をはさみながら二回エレクトロポレーションした。間隔が密な二回のエレクトロポレーションは高い程度の細胞死を生じさせたが、RNPと直鎖状dsDNA鑄型とを別々に送達することができた。しかし、最初にDNAを受け、次にRNPを受けた細胞と比べ、DNA鑄型を後でエレクトロポレーションしたとき、最初のRNPエレクトロポレーションは生存率を高めなかった。(D~F)RNPとDNAとを同時に並行的に導入しなければならないと仮定して、本発明者らは、エレクトロポレーション前のさらなる同時プレインキュベ

40

50

ンが生存率をさらに高めるかどうかをアッセイした。ブレインキューベーション時間を増しても（0から15分）生存率の差は見られなかったが、驚くことに、RNPと細胞とをはじめに混合し、エレクトロポレーションの直前にDNA鋳型を加えたとき（RNP + 細胞； + HDR T）、生存率が高まった（E）。しかし、細胞を加える前にRNPとDNA HDR鋳型とを混合したウェルにおいては（RNP + HDR T； + 細胞）、どれほど長くRNPおよびDNA鋳型をブレインキューベートしようと、HDRの割合（GFP+細胞）に急激な増加が見られた。エレクトロポレーションの2日後に生存率を計測し、4日目にGFP発現を計測した。グラフ（B、D、F）は2人の健常人ドナーからのデータを示す。

（図11）図11A～Fは、効率的な大きな非ウイルス遺伝子標的化の開発を示す。（A）細胞培養および刺激条件、RNPおよびDNA鋳型配合ならびに96ウェル高スループットエレクトロポレーションによるエレクトロポレーション条件の効果の系統的分析が、細胞生存率（培養物中の生細胞の総数）およびHDR効率（GFP陽性細胞の%）の両方の速やかな最適化を可能にした。（B）ハウスキーピング遺伝子RAB11AのN末端に相同な領域を両側に有するGFP配列をコードする長い（1350bp）直鎖状dsDNA鋳型の概略図（原寸に比例しない）。RAB11AのN末端でdsDNA切断が誘導されると、相同組換え修復（HDR）によってGFP配列を継ぎ目なく導入して、内因的に標識されたRAB11A-GFP融合タンパク質を生成することができる。（C）T細胞受容体（TCR）刺激とサイトカインとの様々な組み合わせを使用して初代ヒトT細胞を2日間培養したのち、RAB11A標的化RNPおよびHDR鋳型のエレクトロポレーションを実施し、次いで、エレクトロポレーション後5日間、様々な培養条件で培養した。（D）ここで試験したRNPおよびHDR鋳型濃度のうち、中間の試薬濃度でRAB11Aへの最適なGFP挿入が達成された。さらなる試験（図16）が最適濃度をRNP 50pmolおよびdsDNA HDR T 4 μgへと絞り込んだ。（E）エレクトロポレーションパルス条件のアレイ化試験が、概して、より高いHDR効率を生じさせる条件が生存率を低下させることを示した。EH115が、十分な生存率を維持しながらもHDRを最適化するものとして選択された。（F）C～Dで最適化されたパラメータを使用して、初代ヒトCD4⁺およびCD8⁺T細胞中の非ウイルス標的化によって内因性RAB11A遺伝子へのGFPの高効率挿入を達成した。エレクトロポレーションの3日後（E）または5日後（C、DおよびF）に生存率および効率をアッセイした。個々の点は個々の血液ドナー（CおよびD）または2人の個々のドナーにおける平均 + 標準偏差（E）を表す。緑のハイライトは、非ウイルス遺伝子標的化プロトコルのために最終的に選択された条件を示す。

（図12）図12A～Bは、非ウイルス遺伝子標的化が初代ヒトT細胞における速やかかつ効率的な遺伝子操作を可能にすることを示す。（A）非ウイルス遺伝子標的化の時系列図。ゲノム編集試薬（gRNAと相同組換え修復鋳型）の任意の新規な組み合わせをデザインし、供給業者に注文し、アセンブルするために約1週間が必要である。エレクトロポレーションの2日前、血液または様々な他の供給源から単離した初代ヒトT細胞（図15）を刺激する。dsDNA HDR鋳型をPCRによって容易に作製したのち、SPRI精製を実施して、エレクトロポレーションに適した高濃縮産物を達成することができる。エレクトロポレーション当日、RNPに複合化したgRNAと、HDR鋳型と、回収し、刺激したT細胞とを混合し、エレクトロポレーションした（約1時間半を要するプロセス）。エレクトロポレーション後、操作されたT細胞をさらに2週間、容易に増殖させることができる。（B）生存率とは、実際のエレクトロポレーションを除くすべてのプロトコル工程を受けた同等な集団（エレクトロポレーションなしのコントロール）に対する生細胞の割合を指すために使用される。別段の記載がない限り、エレクトロポレーション後の生細胞の減少が2日後に来るものと経験的に決定し、すべての生存率計測値をその時点で記録した。語「効率」は、「ノックインされた」外因性配列（たとえばGFP）を発現する、培養物中の生細胞の割合を指すために使用される。最後に、効率に絶対細胞数を掛けることにより、所望の組込みに陽性の細胞の総数を算出した。効率を最大化した方法論的変更は、多くの場合、陽性細胞の総数にとって常に最適とはいえず、陽性細胞の総数を最大化した方法論的変更は、多くの場合、効率にとって常に最適とはいえなかった。

（図13）図13A～Dは、非ウイルス遺伝子標的化のための初代ヒトT細胞刺激の最適

10

20

30

40

50

化を示す。(A) エレクトロポレーション前の2日間、代替のエレクトロポレーション前刺激条件を適用した。CD3/CD28ビーズ結合刺激が、IL-2とIL-7とIL-15とのサイトカイン刺激カクテルとともに、プレート結合抗体刺激よりも高い生存率、編集速度および陽性細胞総数を達成した。(B) 代替のビーズ：細胞比が、エレクトロポレーション前のビーズの除去とともに、最適な1:1比を示した。(C) 非ビーズベースのCD3/CD28/CD2刺激は、最適比でCD3/CD28ビーズよりも低い編集効率を生じさせた。(D) 市販のXVivo15培地が、RPMIと比べ、類似した生存率であるがより高い編集効率を達成した。興味深いことに、無血清Immunocult培地もまた、ヒト初代CD3+T細胞の高効率編集を可能にした。エレクトロポレーションの4日後、GFP挿入(dsDNA RAB11A-GFP HDRT)の効率および全GFP+細胞の絶対計数を実施した。条件ごとに2つのドットが、2人の健常人血液ドナーから得られた値を表す。

10

(図14) 図14A~Dは、エレクトロポレーション後の初代ヒトT細胞処理の最適化を示す。(A) 刺激後2日目または3日目の健常人ドナーからのCD3+T細胞のエレクトロポレーションが効率的な標的化GFP組込みを達成した。DNA鋳型が二回のエレクトロポレーションに含まれたとき、両日での二重エレクトロポレーションは、効率をわずかに高めながら、生存率を急激に低下させた(図10)。(B) エレクトロポレーション後のさらなるCD3/CD28刺激は増殖能力を低下させた。(C) エレクトロポレーション後の高用量のIL-2は効率および生存率の両方を改善した。さらなるIL-7およびIL-15の付加は、エレクトロポレーション前刺激中(図13)とは違って、編集の改善に寄与しなかった。(D) (エレクトロポレーション)後の培養密度は挿入効率に対してわずかな影響しか有しない。エレクトロポレーションの4日後、GFP挿入(dsDNA RAB11A-GFP HDRT)の効率および全GFP+細胞の絶対計数を実施した。条件ごとに2つのドットが、2人の健常人血液ドナーから得られた値を表す。

20

(図15) 図15A~Bは、複数の供給源から単離された新鮮および凍結T細胞における効率的な非ウイルス遺伝子標的化を示す。(A) 2人の健常人ドナーからの新鮮および凍結T細胞の両方にdsDNA RAB11A-GFP HDR鋳型を挿入した。両条件において高い割合のGFP挿入が見られ、細胞の凍結を要する研究または臨床プロトコルへの非ウイルス遺伝子標的化の適応性を実証した。(B) 同様に、全血、血漿アフエーシス残渣および白血球アフエーシスから単離された初代ヒトCD3+T細胞においても高効率のGFP標的化組込みが見られた。

30

(図16) 図16A~Bは、非ウイルス遺伝子標的化のためのRNPおよびHDR鋳型配合の最適化を示す。(A) 3人のドナーの間で、増加する量のdsDNA HDR鋳型(RAB11A-GFP)のエレクトロポレーションは効率を高めながら細胞生存率を徐々に低下させるが、試験された中間濃度のHDR鋳型およびRNPの両方は最大のGFP+細胞総数を与えるという一貫した傾向が現れた。(B) 3人のさらなるドナーにおけるさらなる標的化最適化シリーズが、HDR鋳型4 µgを50 pmolのRNPと同時に並行的にエレクトロポレーションする最適な配合を出した。エレクトロポレーションの4日後、GFP挿入の効率および全GFP+細胞の絶対計数を実施した。グラフ(B)の複数のドットはテクニカルレプリケートを表す。

(図17) 図17A~Cは、大きな非ウイルスHDR鋳型の送達のためのエレクトロポレーションパラメータの最適化を示す。(A) ここに示される生データは図11Eにまとめられている。Lonza 4D Nucleofectorにおけるエレクトロポレーション条件の系統的变化。最終的に選択されたパルスコードEH115が、エレクトロポレーションバッファLonza P3を使用するとき一貫してもっとも効率的なコードであった。陽性細胞総数に最適化されていた他の代替コード、たとえばEO-148。(B) また、エレクトロポレーション条件のサブセットの確認試験が、OMEMバッファ中のパルスコードEO-155を適度な効率であるが高い陽性細胞総数との組み合わせとして特定した。(C) 24 µLの合計量(RNP+HDRT+細胞)のエレクトロポレーションが、細胞生存率に対して大きな寄与を成し、高い効率を維持した。24 µLを超えるエレクトロポレーション量は一般にエレクトロポレーションの失敗を招く。エレクトロポレーションの4日後、dsDNA RAB11A-GFP挿入(A、C)またはdsDNA BATF-GFP挿入(B)の効率および全GFP+細胞の絶対計数を実施した。

40

50

(図18) 図18A~Dは、初代ヒトT細胞における非ウイルス遺伝子標的化の多様な用途を示す。(A) 初代ヒトT細胞中の複数の内因性遺伝子において非ウイルスHDR鋳型および対応するRNPを使用してGFP融合構築物で高効率ゲノム標的化を達成することができた。(B) 表記HDR鋳型のエレクトロポレーションの7日後の生きた初代ヒトT細胞の共焦点顕微鏡検査が、融合タンパク質標的化の特異性を確認した。各画像中のスケールバーは5 μ mである。(C) バルクヒト初代T細胞中のRAB11AおよびCD4遺伝子へのGFP融合構築物の非ウイルス標的化。RAB11A融合物はCD4+およびCD8+細胞の両方においてGFP陽性であったが、CD4+融合物はCD4+T細胞においてのみ陽性であった(代表的なフローサイトメトリーが上、定量化が下)。(D) 初代ヒトT細胞を操作して、内因性転写因子BATFに融合したGFPを発現させた。エレクトロポレーションの11日後、核を単離し、CUT&RUN法を実施した。抗GFPまたは抗BATF抗体を使用してGFP-BATFおよび全BATFクロマチン相互作用部位を特定した。エレクトロポレーションの4日後、生存率および効率をアッセイするためのフローサイトメトリーを実施した(A、C、D)。表示されるデータは少なくとも2人の異なるドナーを表す。

10

(図19) 図19A~Bは、標的遺伝子座の間での再現可能な非ウイルス遺伝子標的化を示す。(A) 6人の健康人ドナーからの初代CD3+CD8+T細胞中への、5つの異なるGFP鋳型の1つと対応するRNPとのエレクトロポレーションの4日後、鋳型およびドナー両方の間でGFP発現が認められた。5つの遺伝子座それぞれに関し、ドナー間でのGFP陽性細胞内のGFP発現レベルの一貫性に注目すること(TUBA1BおよびACTBでは比較的高く、RAB11AおよびFBLタグでは比較的低い)。(B) (A)におけるGFP挿入の割合のグラフ概要。

20

(図20) 図20A~Bは、健康人ドナーのコホートにおける再現可能な非ウイルス遺伝子標的化を示す。(A) 12人の健康人ドナーのコホートから得られた細胞中での非ウイルス遺伝子標的化のために開発された最適化条件を使用して、一定のdsDNA RAB11A-GFP HDR鋳型およびRNPをエレクトロポレーションした。個々のドナーの間にはGFP挿入割合の有意な可変性が見られたが、すべてがロバストなGFP組込みを達成した(CD8+T細胞中の範囲22%~57%)。エレクトロポレーションなしのコントロールと比べ、CXCR4を標的化するオフターゲットRNPとともにdsDNA RAB11A-GFP HDR鋳型をエレクトロポレーションされた細胞中でいくつかのGFP発現が見られた。(B) (A)におけるGFP挿入割合のグラフ概要。12人の健康人ドナーコホートの間で、CD3+CD4+T細胞(平均35.2%)と比べ、CD3+CD8+T細胞中でわずかに高い割合(平均42.0%)のGFP発現が認められた。

30

(図21) クロマチン占有率の分析のための転写因子BATFの内因性タグ化を示す。GFP-BATF融合HDR鋳型をエレクトロポレーションされた初代ヒトT細胞集団から得られたCUT&RUNデータの抗BATF、抗GFPおよび抗体なしのヒートマップ(非タグ化細胞はエレクトロポレーションされなかった)。試料ごとのアラインされたCUT&RUN結合プロファイル为非タグ化細胞中でBATF CUT&RUNピーク上でセンタリングし、非タグ化細胞中でBATFピーク強度によって順序付けした。

(図22) 図22A~Eは、コンビナトリアル非ウイルス遺伝子標的化を示す。(A) 初代ヒトT細胞中にRAB11A-GFPおよび/またはRAB11A-mCherry融合物を形成するためのHDR鋳型の同時エレクトロポレーション。両鋳型が同時並行的に導入される場合、二対立遺伝子ターゲティングと合致する、二重GFP+mCherry+細胞の別個の集団が見いだされた。(B) 四分区間中の個々の細胞についての潜在的遺伝子型が2つのフルオロフォアの発現によって決定されている。二対立遺伝子組込みの実測レベルは、少なくとも1つの組込みを取得する細胞中、偶然によって期待されるレベル(図23)よりも高い。個々の点は、HDR鋳型の量(3~6 μ g)と同じく、蛍光タンパク質をコードする遺伝子の組み合わせを変更した(GFP+mCherry、GFP+BFP、mCherry+BFP)ところのレプリケートを表す。

40

(C~D) 同じ初代ヒトT細胞中の2つの別々のゲノム遺伝子座におけるHDR鋳型の多重化組込み。各鋳型2 μ g(1エレクトロポレーションあたり合計4 μ g)を25pmolの各RNP(合計50pmol)とともにエレクトロポレーションした。1つの部位における組込みに陽性の細胞(たとえばGFP+)は、第一の組込みを欠く細胞よりも、第二の部位に組込みを有する

50

(たとえばmCherry+でもある)可能性がずっと高かった。(E)3つの異なるゲノム遺伝子座への大きな挿入の同時非ウイルス遺伝子標的化。各鑄型1.5 µg (合計4.5 µg)を20 pmolの各対応するRNP (合計60 pmol)とともにエレクトロポレーションした。二部位多重化と同様に、1つの組込みに陽性の細胞(Q-II中でmCherry+、Q-III中でGFP+)は、(Q-I)を有しないものと比べ、第二の組込みを有する(BFP+)可能性がさらに高かった。2つの組込みに陽性の細胞(GFP+かつmCherry+、Q-IV)は、第三の遺伝子の組込みを有する(BFP+)可能性がさらに高い。以下は、フルオロフォアに対してシングル、ダブルおよびトリプルポジティブである細胞の棒グラフ定量である。エレクトロポレーションの4日後にすべての蛍光読み出しを実施した。表示されるデータは、パネルE(1人のドナー)を除き、少なくとも2人の異なるドナーを表す。

10

(図23)図23A~Gは、同じ遺伝子座への複数の蛍光タンパク質の挿入による二対立遺伝子HDR組込みのモデリングおよび分析を示す。(A)2つの蛍光タンパク質が同じ遺伝子座に挿入されるときに可能な細胞表現型。(B)これらの表現型集団のうち2つの表現型は容易にわかる。任意の機能的挿入を有しない細胞(左下四分区間、遺伝子型A)はNA/NA遺伝子型を有するはずである(この場合、NAは、WT対立遺伝子およびNHEJ編集対立遺伝子を含む、HDRを有しない対立遺伝子を示す)。二重蛍光細胞(右上四分区間、遺伝子型E)は各鑄型の1つのコピーを獲得したはずであり(常染色体標的遺伝子座と、オフターゲット組込みがないことを仮定して)、GFP/RFPの遺伝子型を有するであろう。2つのシングルポジティブ集団は、HDR挿入に関してヘテロ接合性である細胞(遺伝子型BおよびC)または同じ蛍光鑄型の2つのコピーに関してホモ接合性である細胞(遺伝子型DおよびF)の間で混合される。(C)二対立遺伝子HDR組込みを有する細胞の全割合は遺伝子型D、EおよびFの合計でなければならない。遺伝子型Eを有する(二重フルオロ陽性)細胞の割合は表現型から容易に明らかであるが、遺伝子型DおよびFを有する細胞の割合はそうではない。簡単な確率モデルの適用が、単一フルオロ陽性表現型中の複数の遺伝子型のデコンボリューション、ひいてはHDRに関してホモ接合性である細胞の真の割合の推定を可能にする。(D)RAB11A遺伝子座に挿入された多様なフルオロフォア置換の間で適用された二対立遺伝子HDR分析。(E~F)二重蛍光二対立遺伝子組込みが標的遺伝子座の間で見られた。挿入を有する細胞の全割合は各標的部位の効率とともに変化したが、ホモ接合性細胞の、偶然による割合期待値に対する割合実測値における濃縮倍率は遺伝子座の間で一貫していた。(G)同じ遺伝子座中へのHDRによる3つの異なるフルオロフォアの試行された組込み。最大2つの標的化挿入が可能であるため(その遺伝子座の2つの対立遺伝子で;二倍体ゲノムと仮定)、3つの遺伝子座すべてに陽性(トリプルポジティブ)の細胞は認められるはずがない。事実、2つのフルオロフォアの様々な置換に陽性(ダブルポジティブ)である細胞だけでなく、多数の単一フルオロフォア組込み(シングルポジティブ)が認められるが、ダブルポジティブ細胞と比べ、トリプルポジティブ細胞の数には30倍の減少がある。エレクトロポレーションの4日後、蛍光タンパク質発現のすべてのフローサイトメトリー分析を実施した。表示されるものは、1人(E、F)または2人(D、G)の健常人ドナーからの複数のテクニカルレプリケートを表す。棒グラフは平均+標準偏差を示す。

20

30

(図24)図24A~Bは、1つの遺伝子座におけるHDR組込みの獲得がさらなる遺伝子座におけるHDRの公算を高めることを示す多重化組込みを示す。(A)6つのdsDNA HDR鑄型のセット(RAB11A、CD4およびCLTAを標的化;各部位がGFPまたはRFPを有する)からの2つのHDR鑄型置換を、健常人ドナーから単離されたCD3+T細胞中にエレクトロポレーションした。表記2つのHDR鑄型とそれら2つのそれぞれのオンターゲットRNPとのエレクトロポレーションの4日後、各鑄型に陽性の細胞の割合を、他方の鑄型に陽性または陰性である細胞をゲーティングした場合に分析した。多様な鑄型組み合わせの間で二鑄型多重化が可能であっただけでなく、一方の鑄型に陽性の細胞(鑄型1+細胞)のゲーティングが、第一の鑄型に陰性である細胞(鑄型1-細胞、黒)と比べ、第二の鑄型に陽性である可能性がより高い、濃縮された細胞集団を生み出した。二重多重化実験のために、各鑄型2 µgを30 pmolの各関連するRNPとともにエレクトロポレーションした。(B)さらなる鑄型のエレクトロポレーションが、多様なHDR鑄型組み合わせを使用する三部位多重化

40

50

を可能にする。第三の鑄型に陽性の細胞は、シングルポジティブ細胞と比べたとき他の鑄型両方に陽性の細胞をゲーティングすることにより、さらに濃縮することができる。表示されるデータは、2人の健常人ドナーからの複数のテクニカルレプリケートからの平均 + 標準偏差である。

(図25) 図25A~Fは、D10AニッカーゼおよびssDNA HDR鑄型がオフターゲット組込みを減らすことを示す。(A) Cas9 RNPとRAB11A-GFP dsDNA HDR鑄型との組み合わせを初代ヒトT細胞中にエレクトロポレーションした。dsDNA鑄型が、単独で、またはヒトゲノム中の配列にマッチしないスクランブルされたgRNAを含むRNPとともに、少量であるが検出可能な量のGFP発現を生じさせ、これは、dsDNA鑄型を、標的化RAB11A-GFP組込み部位とは異なる部位を標的化するgRNAとともにエレクトロポレーションしたとき、顕著に増加していた(「オフターゲットRNP」はCXCR4エキソン1を標的化する)。(B) RAB11A-GFP dsDNA HDR鑄型をオフターゲットRNPとともにエレクトロポレーションしたとき、異なるドナーからの細胞中に一貫してオフターゲット組込みが存在しており、dsDNA HDR鑄型を単独でエレクトロポレーションしたとき、より少ないオフターゲット組込みが起こった。(C) 単一のオフターゲットCXCR4 gRNAを使用したとき、Cas9ヌクレアーゼ変異体D10A(ニッカーゼ)および不活性dCas9がオフターゲット組込みを有意に減らしたが、D10Aニッカーゼ(PAM-Out配向のgRNAの「オンターゲット」対とともに)は、RAB11A dsDNA HDR鑄型の効率的なオンターゲット組込みを招いた。(D) ssDNA HDR鑄型のエレクトロポレーションは、ヌクレアーゼが加えられない場合および誘導されたオフターゲットdsDNA切断(オフターゲットgRNA + Cas9)の場合の両方で、オフターゲット組込みを検出限界(鑄型がエレクトロポレーションされないレベルに匹敵する)まで減らした。(E~F) RAB11A部位におけるGFP融合物の組込みの場合、D10AニッカーゼとssDNA HDR鑄型の使用は、Cas9とdsDNA鑄型の場合に比べ、オンターゲットHDRを減らしたが(オンターゲットgRNAとのGFP組込み)、オフターゲット組込みを検出不可能なレベルにまで強力に減らした。エレクトロポレーションの4日後、すべての蛍光読み出しを実施した。表示されるデータは、少なくとも2人の異なるドナー(AおよびE)または2人の異なるドナーの平均 + 標準偏差(C、DおよびF)を表す。

(図26) 図26A~Dは、複数のHDR鑄型の間でのオフターゲット組込みイベントの蛍光推定および定量を示す。(A) 標的遺伝子座のN末端におけるHDR媒介挿入の図(原寸に比例しない)。相同アームが、インサート(この場合、GFPタグ)が挿入される正確な配列を指定して、外因性配列の無傷の組込みを可能にする。GFP融合タンパク質が創製されるとき、このオンターゲット組込みの結果として、組込み部位に隣接するRNP切断に依存してGFP蛍光が見られる。(B) 自然発生的dsDNA切断部における、またはおそらくは、誘発された二本鎖切断部におけるランダムな組込み、たとえばRNPのオフターゲット切断部位におけるランダムな組込みを通して、オフターゲット部位における相同非依存性修復機構を介して二本鎖DNAを組み込むことができる。この効果は、HDRを実施する能力を欠く老化細胞型中の所望の誘導されたdsDNA切断部(HITI)におけるdsDNA配列の標的化組込みを可能にするために利用することができるが、重要なことに、dsDNA鑄型全体が、任意の潜在的相同アームを含め、組み込まれる。相同アームがプロモータ配列(たとえばN末端融合物タグのための)を含む場合、これらのオフターゲット組込みは、所望の正しいHDR挿入なしでも、挿入された配列の観測可能な発現を駆動することができる。(C) バーは、表記成分をエレクトロポレーションされたヒトCD3+T細胞からの実測のGFP+割合を表す。蛍光タンパク質発現のためのフローサイトメトリーを使用して、機能的オフターゲット組込みを速やかに評価することができる。鑄型のみをエレクトロポレーションしたときの検出限界を超える蛍光細胞の割合の増加は、おそらくは、自然発生的dsDNA切断部におけるランダムな組込みを表す。あらゆるオフターゲット組込みが蛍光タンパク質発現を生じさせるわけではないが、異なる鑄型間の機能的オフターゲット発現の相対差をアッセイすることができる。CXCR4を標的化するRNPの包含は、おそらくはHITIタイプの挿入イベントを介して、観測されたオフターゲット相同性非依存性組込みを劇的に増加させる。最大の増加(このドナーにおいては1%から>30%まで)は、正しいRNPのエレ

10

20

30

40

50

クトロポレーションおよびHDR媒介挿入を通して起こる。(D) 5つの鑄型の間でのオンターゲットGFP発現(右カラム)と機能的オフターゲット組込み(中間カラム)との比較。2つの生物学的ドナー(ドット)の平均発現(バー)がグラフ化されている。

(図27) 図27A~Bは、HDR鑄型とgRNAマトリックスとの間でGFP発現を示す。(A) dsDNA HDR鑄型およびそれらの対応するgRNAのマトリックスを、CXCR4 gRNAとで、およびRNPなしコントロールとでエレクトロポレーションしてから7日後、健康人ドナーからのCD3+CD4+初代ヒトT細胞中のGFP発現を分析した。dsDNA鑄型で予想されたように、すべての組み合わせに関してオフターゲット組込みが見られたが、すべてのgRNAおよびHDR鑄型に関し、オンターゲット条件において最高のGFP発現が見られた。(B) (A)のフローサイトメトリーデータのヒートマップ概要。1つのHDR鑄型、核内因子FBL中へのC末端GFP融合物タグが、すべてのgRNAに関して一貫して高いオフターゲット発現を示した。

10

(図28) 図28A~Dは、Cas9ニッカーゼを使用する、初代ヒトT細胞中の効率的なHDRを示す。(A) RAB11Aの第一エキソンを含むゲノム遺伝子座の図。1つのガイドRNA(gRNA 1)を有するspCas9をdsDNA HDR鑄型とともに使用して、GFPをRAB11Aとともに開始コドン直後でフレームに組込むことが、効率的なGFP発現を生じさせる(図11F)。2つのgRNAを有するCas9ニッカーゼ(D10A変異体)の使用は、オフターゲット切断の可能性を減らすことができた。(B~C) RAB11A N末端遺伝子座におけるGFP挿入効率に関して一連の単独gRNAおよび二種gRNA組み合わせを試験した。予想どおり、ヌクレアーゼ不活性型Cas9(dCas9)を使用したとき、認めうるほどのレベルのGFP挿入を示したgRNAはなかった。Cas9を使用したとき、挿入部位に隣接する複数の単独gRNA切断はGFP組込みを示したが、gRNA1ほど効率的なものはなかった。D10Aニッカーゼは、単独ガイドでは、GFP組込みをほとんどないし全く示さなかったが、複数の二種ガイド組み合わせでは、効率的なGFP組込みを示した。2つのPAM配列が互いから離れる向き(PAM-Out)にあるgRNA組み合わせでのみ、GFP組込みが見られた。(D) おそらくは、D10Aニッカーゼが、dsDNA切断を誘導するために、密接に結合する2つのgRNAを有しなければならない必要性による、オフターゲットgRNA(CXCR4を標的化する)をエレクトロポレーションしたときの低めのレベルの機能的オフターゲット組込みを実証する(図25C)に提示された生データ。すべての表示(B~D)中のドットは、標識された2人の健康人ドナーにおけるテクニカルレプリケートを表す。

20

30

(図29) 図29A~Hは、2つの機能喪失型IL2RA変異を有する対象における低下したTreg頻度および欠陥のあるTreg抑制能力を示す。(A) 健康人ドナーならびに機能喪失型IL2RA変異を有するIL2RAヘテロ接合体(c.530 Het 1、c.800 Het 1~3)および複合ヘテロ接合体の子供(Comp. Het 1~3)を含むすべての家族構成員からのCD3+CD4+T細胞をフローサイトメトリーによって分析して、CD25hiCD127lo Tregの存在を評価した。(B) 健康人ドナーおよび単一hetにおいて、CD4+FoxP3+T細胞は主にCD25hiCD127loである。複合ヘテロ接合体においては、CD127loCD4+FoxP3+集団が存在するが、IL2RAを発現しない。(C) 2つの別々の部位で実施された臨床表現型決定が、複合ヘテロ接合体がCD127loFoxP3+細胞の正常な頻度を有することを確認する。(D) pStat5発現によって計測すると、IL-2による刺激ののち、複合ヘテロ接合体3におけるIL2RA表面発現の欠如が異常な下流シグナル伝達につながったが、IL-7またはIL-15による刺激ののち、異常な下流シグナル伝達につながらなかった。(E) CD25欠損複合ヘテロ接合体からCD25hi Tregを選別する能力の欠如のため、表面マーカーCD127loCD45RO+TIGIT+を使用してCD3+CD4+T細胞からFoxP3+細胞を濃縮するための代替ゲーティング戦略を確立した。表記のゲーティングされた集団からの細胞内FoxP3染色が示されている。(F) これらのCD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+潜在的「Treg」は、FoxP3に関して非常に濃縮されており、健康人ドナーからのCFSE標識刺激レスポンドT細胞(Tresp)とともに培養されると、いくらかの抑制能力を示したが、複合ヘテロ接合体からのCD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+は抑制能力を示さなかった。刺激されたTresp集団(実線カーブ)、非刺激Tresp(破線カーブ)。(G) 複合ヘテロ接合体中のCD25変異の修正はなおも個

40

50

々に他の変異を残して、細胞を単一ヘテロ接合体として残す。そのような潜在的修正がいくらかのレベルの機能抑制を生じさせることを確認するために、c.530およびc.800単一ヘテロ接合体家族構成員からCD4+CD25hiCD127lo Tregを単離し、それらの抑制能力を(F)におけるようにアッセイした。(H) 健常人ドナー、CD25欠損複合ヘテロ接合体(F)およびCD25+/-c.530またはc.800ヘテロ接合体(G)からの細胞におけるTreg抑制能力のドットプロット概要。複合ヘテロ接合体からのCD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+「Treg」は抑制能力を示さなかったが、単一ヘテロ接合体家族構成員からの通常のCD4+CD25hiCD127lo Tregは、複合hetと比べて顕著な臨床表現型の欠如と合致するように、いくらかの抑制能力を示した。

(図30) 図30A~Eは、初代ヒトT細胞中の非ウイルス遺伝子標的化によって修正される一遺伝子性自己免疫変異を示す。(A) 家族中の3人の同腹個体(sibling)が2つの異なるIL2RA(高親和性IL-2受容体CD25をコードする)変異を有する(c.530A>GがIL2RAエキソン4中に終止コドンを作成し;c.800delAが、ほぼ100アミノ酸のランオンを生じさせるフレームシフト変異をIL2RAエキソン8中に創製する)。(B) これら3人の複合ヘテロ接合体同腹個体は、初代T細胞上のIL2RAの大きく減少した(ただし完全に非存在ではない)細胞表面発現を示す。正しいIL2RA配列を含む(標的化PAM配列中のサイレント変異とともに)Cas9 RNPおよびdsDNA HDR鋳型のエレクトロポレーションによるc.530変異の非ウイルス遺伝子標的化は、エレクトロポレーションの2日後、各複合ヘテロ接合体同腹個体からのT細胞の一部におけるIL2RA細胞表面発現のレスキューに成功した。(C) 非ウイルス遺伝子標的化の7日後、標的化されたT細胞は、IL-2刺激により、非標的化コントロールと比べて増大したStat5のリン酸化レベルを示した。(D) c.530変異を修正するための非ウイルス遺伝子標的化の9日後、3人の複合ヘテロ接合体ドナーからのIL2RA+T細胞は、非標的化細胞または健常人ドナー細胞と比べて増大したレベルのFoxP3+細胞を含む。(E) 最適化された治療試薬セット(D10AニッカーゼとssDNA HDR鋳型)を使用すると、c.530変異の非ウイルス遺伝子標的化および修正が可能であり、効率的である。エレクトロポレーション(再刺激の2日後)後の9日間のエクスピボ増殖のち、IL2RA表面発現に関して1人の複合ヘテロ接合体ドナーからのT細胞を染色した。

(図31) 図31A~Dは、IL2RAにおける複合ヘテロ接合体変異の特定および修正CRISPR-Cas9ゲノム標的化試薬のデザインを示す。(A) 単一遺伝子型の糖尿病に關与することが知られる40を超える遺伝子のインハウス標的化次世代シーケンシングマルチ遺伝子パネルを使用する発端者の初期遺伝子検査は陰性であった。発端者および両親の3人におけるその後のエクソームシーケンシングがIL2RA遺伝子中の2つの原因変異を明らかにした。母親は、IL2RAのエキソン4
(SEQ ID NO: 1) (AGACAAGGTRGACCCAGCC)

中に1つのヘテロ接合体変異(c.530G>A)を有して、未成熟終止コドンを生じさせていた。(B) 父親は、IL2RAのエキソン8
(SEQ ID NO: 2) (ACAGGAGGARRRKWRRARAA)

中に1つのヘテロ接合体変異(c.800delA)を有して、95アミノ酸の長さのランオンを生じさせるフレームシフト変異を生じさせていた。サンガーシーケンシングが、発端者が両方の変異に関して複合ヘテロ接合体であることを確認した。(C) 2つの特定されたIL2RA変異のおおよその位置を注釈したIL2RAタンパク質の線図。SD1、スシドメイン1; SD2、スシドメイン2; TM、膜貫通; C、細胞質。(D) 指定された変異を含むゲノム配列(c.530G>A対立遺伝子の場合には
(SEQ ID NO: 3) (CAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTAGACCC)

およびc.800delA対立遺伝子の場合には
SEQ ID NO: 4 (GACTTTGTACACCACTACAGGAGGAGAGTA)

10

20

30

40

50

）を使用して、2つのIL2RA変異を修正するためのCRISPR-Cas9ゲノム標的化試薬をデザインした。gRNAを、各変異の部位に隣接するところ、c.530変異の場合には8bp離れたところ、c.800変異の場合には7bp離れたところで切れるようにデザインした。各変異に関し、HDR鋳型（c.530変異の場合には（SEQ ID NO: 5）（ACAAGATGGACCC）

および

c.800の場合には

（SEQ ID NO: 6）（AGGAGAAAGAGTA

10

）を、修正された配列および各ガイドRNAのためのPAM配列（「NGG」）を破壊するための縮重塩基中のサイレント変異を含め、デザインした。c.530（CAAAATGACCCACGGGAAGACAAGATGGACCC）（SEQ ID NO: 7）

およびc.800

（SEQ ID NO: 8）（GACTTTGTTACACCACTACAGGAGAAAGAGTA）

のための修正された対立遺伝子 + サイレントPAM破壊配列が示されている。c.530変異部位（hg38 ch10:6021526-6021557）およびc.800変異部位（hg38 ch10:6012886-6012917）のための表示されたゲノム領域（原寸に比例しない）。ssODN HDR鋳型（60bpの相同アームを有するssDNA）および大きなdsDNAまたはssDNA HDR鋳型（表示するように、約300bpの相同アームを有する）の両方を使用した。

20

（図32）図32A～Cは、IL2RA c.530A>G機能喪失型変異のHDR媒介修正を示す。（A）IL2RAのC末端のc.800delA変異を標的化するgRNAとは違って、c.530A>G変異（内部エキソン中に終止コドンを生じさせる）を標的化するgRNAは、CD3+T細胞中へのRNPのみ（青）のエレクトロポレーションの2日後、健康人ドナーおよび単一ヘテロ接合体（c.800 Het 2および3）中でIL2RAの実質的な（約90%の）ノックダウンを生じさせる。また、おそらくはいくらか少量のタンパク質がc.800delA対立遺伝子から表面発現することができるため、ノックダウンはまた、非常に小さなIL2RA+の割合から出発して、3つの複合ヘテロ接合体すべてにおいても認められた。この減少したCD25発現は、ssODN HDR鋳型の包含によって部分的にレスキューされることができ、また、大きなdsDNA HDR鋳型を使用すると、さらに実質的にレスキューされることができる。両鋳型タイプは、修正された配列、gRNAのPAM配列を除去するためのサイレント変異および60bp（ssODN）または約300bp（大きなdsDNA）相同アームを含んでいた（図32）。修正のためのc.800delA変異の標的化とは違って、複合ヘテロ接合体からのT細胞中のCD25表面発現は、HDR鋳型が含まれる場合にのみ見られる。3つの複合ヘテロ接合体すべてにおいて、dsDNA HDR鋳型は、より大きなCD25+細胞の割合を出じさせた。（B）HDR媒介変異修正を受けている複合ヘテロ接合体患者からのCD3+T細胞中へのエレクトロポレーションの7日後の、エレクトロポレーションなしまたはRNPのみのコントロールと比べて増大した、IL-2刺激（200U/mL）に応答したpStat5シグナル伝達。（C）同様に、複合ヘテロ接合体患者において、HDR修正条件でのエレクトロポレーションの9日後、増大した割合のCD25+FoxP3+細胞が見られた。複合ヘテロ接合体3におけるHDR修正のためにc.530変異を標的化したとき、おそらくは患者の疾患または患者の免疫抑制薬投与計画との関連で変化した細胞状態のせいで、より低い割合の修正が見られた。実施例に記載された最適化非ウイルスゲノム標的化プロトコルにしたがってエレクトロポレーションを実施した。ssODNエレクトロポレーションの場合、H₂O 1 μL中100 pmolをエレクトロポレーションした。

30

40

（図33）図33A～Cは、IL2RA c.800delAフレームシフト機能喪失型変異の非HDR媒介修正を示す。（A）最小量のIL2RAを表面に発現する3つの複合ヘテロ接合体を含む、2つの機能喪失型IL2RA変異を有する家族のすべての子供におけるCD3+T細胞中のCD25表面発現のヒストグラム（エレクトロポレーションなし、グレー）。2つの変異の1つ、す

50

なわち、正常な終止コドンを通過するランオンを生じさせるIL2RA (c.800delA) の最終エキソン中の1塩基対欠失の部位に対するgRNAを含むRNPのエレクトロポレーションの2日後、健常人ドナーおよび単一het (c.800 Het 2および3) からのCD3+T細胞はCD25-細胞のわずかな増加を示す (RNPのみ、青)。低いノックアウトは、おそらく、小さなインデルが表面タンパク質発現の比較的顕著でない損失を生じさせ得るタンパク質のC末端を標的化するgRNAのせいである。驚くことに、RNPのみは、3つの複合ヘテロ接合体すべての中の編集されたT細胞のほぼ50%においてCD25表面発現を生じさせた。RNPのみの場合と比べたときのCD25修正を有する細胞の割合の増加は、変異修正を有するssODN HDR鋳型配列の包含によって (RNP + ssODN、紫) 達成することができ、より長いdsDNA HDR鋳型を使用して変異を修正したとき (RNP + dsDNA HDRT、緑) さらに増すことができた (図32)。(B) エレクトロポレーション後7日間の増殖ののち、編集されたCD3+T細胞中の高用量IL-2刺激 (200U/mL) に応答したPhospho pStat5シグナル伝達。増大した数のpStat5+細胞がCD25表面発現の増加と相関した (A)。(C) エレクトロポレーション後9日間の増殖ののち、細胞内FoxP3染色が、エレクトロポレーションなしのコントロールと比べて劇的に増大した、CD3+T細胞中のCD25+FoxP3+細胞の割合 (同様に培養された、健常人ドナー中に見られるCD25+FoxP3+細胞の割合に近い) を明らかにする。最適化非ウイルスゲノム標的化プロトコル (実施例) にしたがってエレクトロポレーションを実施した。ssODNエレクトロポレーションの場合、H₂O 1 μ L中100pmolをエレクトロポレーションした。

10

(図34) 図34A~Bは、免疫抑制薬を投与されている複合ヘテロ接合体IL2RA機能喪失型患者における減少したHDR能力および変化した臨床表現型を示す。(A) 表記患者からのCD3+T細胞中への陽性HDRコントロールRAB11A-GFP dsDNA HDR鋳型のエレクトロポレーションの6日後のGFP発現のフローサイトメトリー分析は、3人の複合ヘテロ接合体における、その人たちの2人のc.800ヘテロ接合体同腹個体と比べて低いGFP発現を明らかにした。同様に編集された12人の健常人ドナーのコホートと比べ (図20)、c.800ヘテロ接合体ならびに複合het 1および2は、健常人ドナーの間で認められた一般的範囲内であったが、複合het 3は、分析されたどの健常人ドナーよりも低いGFP発現を示した。注目すべきことに、複合het 3において、c.530変異におけるHDR媒介修正是他2つの複合hetよりも実質的に低かったが (図31A)、c.800delA標的化RNPのみのエレクトロポレーション後のCD25表面発現は類似していた。HDR媒介修復とは違って、c.800delAにおけるNHEJ媒介フレームシフト修正是、複合het 3が採血およびT細胞単離時に有効な免疫抑制薬服用中であった唯一の複合ヘテロ接合体患者であることと合致するように、細胞増殖を必要とし得ない。(B) 患者の疾患との関連で変化した細胞状態もまた、HDR率の低下に寄与することができた。フローサイトメトリーによって計測された、各表記患者から単離された非編集CD4+T細胞中のTIGITおよびCTLA4発現レベル。変化した活性化状態と合致するように、複合het 3からの細胞は異なる表現型を示し、健常人ドナー、ヘテロ接合体家族構成員および他2人の複合ヘテロ接合同腹個体と比べてTIGITおよびCTLA4発現が増している。

20

30

(図35) 図35A~Bは、長いssDNA HDR鋳型を作製するための複数の方法を示す。(A) エレクトロポレーションに十分に大量の長い一本鎖DNA配列を作製することができるならば、オンターゲット効率を過度に損なうことなくオフターゲット組込みを減らすことができる。1つの方法は、増幅前にPCRプライマに容易に加えられる5'リン酸化によって標識されている、PCR産物の1つの鎖を特異的に分解する二工程選択的エキソヌクレアーゼ消化を含む。(B) また、連続的なインビトロ転写 (IVT) および逆転写 (RT) 反応に基づく第二のssDNA作製法を適用した。付加された短いT7プロモータを有するPCR産物が、ssRNA産物を作製するためのIVT鋳型として働く。RTプライマのアニールングおよび逆転写ののち、RNA/DNAハイブリッドが形成し、これを、水酸化ナトリウム中でのインキュベーション (RNA鎖を選択的に分解する) により、長いssDNA鋳型へと容易に転換することができる。(C) エレクトロポレーションの2日後、ssDNA鋳型だけでエレクトロポレーションされたCD3+T細胞中の生存率は、dsDNA鋳型だけでエレクトロポレーション

40

50

されたCD3+T細胞中の生存率よりも高かった（図11）。（D）ssDNA RAB11A-GFP HD R鑄型は、dsDNA鑄型に類似する高効率のGFP組込みを示し、より高い鑄型モル量では、おそらくは増大した生存率（C）およびより少ないDNA鑄型1モルあたり質量のおかげで、高効率組込みを維持した。個々の点は少なくとも2人の健常人ドナー（C、D）を表す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

定義

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される単数形冠詞「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に別段の指示をしない限り、複数の指示対象を含む。

【0014】

語「核酸」および「ヌクレオチド」とは、一本鎖または二本鎖形態にあるデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）およびそれらのポリマーをいう。別段の制限がない限り、この語は、参照核酸と類似した結合性を有し、天然のヌクレオチドに類似したやり方で代謝される、天然のヌクレオチドの既知の類似物を含む核酸を包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列はまた、保存的に修飾されたその変異体（たとえば縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNPおよび相補的配列ならびに明示的に示される配列を暗に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの第三位が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成され得る（Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); および Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)）。語「核酸」は、遺伝子、cDNAおよび遺伝子によってコードされたmRNAと互換可能に使用される。

【0015】

語「遺伝子」とは、ポリペプチド鎖を作製またはコードする際に関与するDNAのセグメントをいうことができる。遺伝子は、コード領域の前および後の領域（リーダおよびトレイラ）ならびに個々のコードセグメント（エキソン）の間の介在配列（イントロン）を含み得る。または、語「遺伝子」は、非翻訳RNA、たとえばrRNA、tRNA、ガイドRNA（たとえばスモールガイドRNA）またはマイクロRNAを作製またはコードする際に関与するDNAのセグメントをいうこともできる。

【0016】

「治療すること」とは、疾患、状態または障害の治療または改善または予防の成功の任意の徴候を指し、任意の客観的または自覚的パラメータ、たとえば軽減；寛解；症状の減少または疾患状態を患者にとってより許容可能にすること；変性または衰退の速度の低下；または変性の最終点をより非衰弱性にすることを含む。症状の治療または改善は、医師による診察の結果を含む、客観的または自覚的パラメータに基づくことができる。したがって、語「治療すること」は、本明細書に記載される疾患、状態または障害と関連する症状または状態の発症を防ぐ、もしくは遅らせる、緩和する、または阻止する、もしくは抑制するための、本発明の化合物または薬剤の投与を含む。語「治療効果」とは、対象における疾患、疾患の症状または疾患の副作用の軽減、除去または予防をいう。本発明の方法を使用する「治療すること」または「治療」は、本明細書に記載される疾患、状態または障害と関連する疾患または障害のリスクが高いといえるが、まだ症状を経験または提示していない対象において症状の発症を防ぐこと、疾患または障害の症状を抑制すること（その発症を遅らせる、または抑止すること）、疾患の症状または副作用の軽減を提供すること（緩和治療を含む）、および疾患の症状を軽減すること（退縮を生じさせること）を含む。治療は、予防的であることもできるし（疾患の発症を防ぐ、もしくは遅らせるため、またはその臨床または亜臨床症状の発現を防ぐため）、疾患または状態の発現後の症状の治療的抑制または緩和であることもできる。本明細書において使用される語「治療」は、防止的（たとえば予防的）、治癒的または緩和的治療を含む。

【0017】

「プロモータ」は、核酸の転写を指示する1つまたは複数の核酸制御配列と定義される

10

20

30

40

50

。本明細書において使用されるプロモータは、転写開始部位に近い必要な核酸配列、たとえばポリメラーゼIIタイププロモータの場合、TATAエレメントを含む。プロモータはまた、任意選択で、転写開始部位から数千塩基対のところに位置することができる遠位のエンハンサまたはリプレッサエレメントを含む。

【0018】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書において、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換可能に使用される。本明細書において使用されるこれらの語は、アミノ酸残基が共有ペプチド結合によって連結されている、完全長タンパク質を含む、任意の長さのアミノ酸鎖を包含する。

【0019】

本明細書において使用される語「相補的」または「相補性」とは、ヌクレオチドまたは核酸の間の特定の塩基対合をいう。相補的ヌクレオチドは概してAとT（またはAとU）およびGとCである。

【0020】

本明細書を通して使用される「対象」とは個体を意味する。たとえば、対象は、哺乳動物、たとえば霊長類、より具体的にはヒトである。非ヒト霊長類もまた対象である。語「対象」は、飼いならされた動物、たとえばネコ、イヌなど、家畜（たとえばウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）および実験動物（たとえばフェレット、チンチラ、マウス、ウサギ、ラット、アレチネズミ、モルモットなど）を含む。したがって、獣医学的使用および医学的使用および製剤化が本明細書において考慮される。この語は、特定の年齢または性別を示さない。したがって、成体または新生対象が、雌雄を問わず、包含され则认为られる。本明細書において使用される「患者」または「対象」は、互換可能に使用され得、疾患または障害を病む対象を指すことができる。

【0021】

「CRISPR/Cas」系とは、外来性核酸に対する防御のための広範なクラスの細菌系をいう。CRISPR/Cas系は、広範囲の真正細菌目および古細菌目生物中に見られる。CRISPR/Cas系は、タイプI、IIおよびIIIサブタイプを含む。野生型タイプII CRISPR/Cas系は、ガイドおよび活性化RNAと複合化したRNA媒介ヌクレアーゼCas9を利用して外来性核酸を認識し、切断する。ガイドRNAおよび活性化RNAの両方の活性を有するガイドRNAもまた、当技術分野において公知である。いくつかの場合において、このような二重活性ガイドRNAはスモールガイドRNA（sgRNA）と呼ばれる。

【0022】

Cas9ホモログは、以下の分類群：アクチノバクテリア（Actinobacteria）、アクウィフェクス門（Aquificae）、バクテロイデス門（Bacteroidetes）-緑色硫黄細菌門（Chlorobi）、クラミジア（Chlamydiae）-ベルコミクロビウム門（Verrucomicrobia）、緑色非硫黄細菌門（Chloroflexi）、シアノバクテリア（Cyanobacteria）、ファーミキューテス（Firmicutes）、プロテオバクテリア（Proteobacteria）、スピロヘータ（Spirochaetes）およびテルモトガ門（Thermotogae）の細菌をはじめとする多種多様な真正細菌中に見られる。例示的なCas9タンパク質は化膿レンサ球菌Cas9タンパク質である。さらなるCas9タンパク質およびそれらのホモログが、たとえばChylinski, et al., RNA Biol. 2013 May 1; 10(5):726-737; Nat. Rev. Microbiol. 2011 June; 9(6):467-477; Hou, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Sep 24; 110(39):15644-9; Sampson et al., Nature. 2013 May 9; 497(7448):254-7; およびJinek, et al., Science. 2012 Aug 17; 337(6096):816-21に記載されている。Cas9ヌクレアーゼドメインは、宿主細胞中の効率的な活性または高められた安定性のために最適化されることができる。

【0023】

本明細書において使用される語「Cas9」とは、RNA媒介ヌクレアーゼ（たとえば細菌または古細菌起源の、あるいはそれらに由来する）をいう。例示的なRNA媒介ヌクレアーゼは、前記Cas9タンパク質およびそれらのホモログを含み、CPF1（たとえば、Zetsche et al., Cell, Volume 163, Issue 3, p759-771, 22 October 2015を参照）を含むが、

10

20

30

40

50

これに限定されない。同様に、本明細書において使用される語「Cas9リボ核タンパク質」複合体などは、Cas9タンパク質とcrRNA（たとえばガイドRNAまたはスモールガイドRNA）との複合体、Cas9タンパク質とトランス活性化crRNA（tracrRNA）との複合体、Cas9タンパク質とスモールガイドRNAとの複合体またはそれらの組み合わせ（たとえば、Cas9タンパク質、tracrRNAおよびcrRNAガイドRNAを含む複合体）をいう。

【0024】

本明細書において細胞のゲノムの編集に関して使用される語句「編集」とは、標的ゲノム領域においてゲノムの配列の構造的変化を誘導することをいう。たとえば、編集は、ヌクレオチド配列を細胞のゲノムに挿入する形態をとることができる。ヌクレオチド配列はポリペプチドまたはその断片をコードすることができる。そのような編集は、標的ゲノム領域内に二本鎖切断を誘導する、または互いに反対の鎖上、標的ゲノム領域の両側にある一対の一本鎖ニックを誘導することによって実施することができる。標的ゲノム領域で、または標的ゲノム領域内で一本鎖または二本鎖切断を誘導する方法は、Cas9ヌクレアーゼドメインまたはその誘導体および標的ゲノム領域に向けられたガイドRNAまたはガイドRNAの対の使用を含む。

【0025】

本明細書においてRNP-DNA鋳型複合体の導入に関して使用される語句「導入する」とは、細胞の外側から細胞の内側へのRNP-DNA鋳型複合体の移動をいう。いくつかの場合において、導入とは、細胞の外側から細胞の核内へのRNP-DNA鋳型複合体の移動をいう。エレクトロポレーション、ナノワイヤまたはナノチューブとの接触、受容体媒介内部移行、細胞透過性ペプチドを介する移動、リポソーム媒介移動などをはじめとする、そのような移動の様々な方法が考えられる。

【0026】

本明細書において使用される語句「異種」とは、通常、自然には見られないことをいう。語「異種配列」とは、通常、自然には所与の細胞中に見られない配列をいう。そのようなものとして、異種ヌクレオチドまたはタンパク質配列は、（a）その宿主細胞にとって外来性（すなわち、細胞に対して外因性）であるもの；（b）宿主細胞中に自然に見られる（すなわち内因性である）が、細胞中に不自然な量で（すなわち、宿主細胞中に自然に見られるよりも多い、または少ない量で）存在するもの；または（c）宿主細胞中に自然に見られるが、その本来の遺伝子座の外に位置するものであり得る。

【0027】

本明細書において初代細胞または初代幹細胞に関して使用される語句「初代」とは、細胞が形質転換も不死化もされていないことをいう。そのような初代細胞は、限られた回数だけ培養、二次培養または継代培養される（たとえば0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20回、培養される）ことができる。いくつかの場合において、初代細胞はインビトロ培養条件に適応される。いくつかの場合において、初代細胞は、生物、系、臓器または組織から単離され、任意選択で選別され、培養または二次培養なしで直接利用される。いくつかの場合において、初代細胞は、刺激される、活性化される、または分化させられる。たとえば、初代T細胞は、CD3、CD28アゴニスト、IL-2、IFN- またはそれらの組み合わせとの接触（たとえば、それらの存在下での培養）によって活性化することができる。

【0028】

本明細書において使用される語句「造血幹細胞」とは、血液細胞を生み出すことができるタイプの幹細胞をいう。造血幹細胞は、骨髄系もしくはリンパ球系またはそれらの組み合わせの細胞を生み出すことができる。造血幹細胞は主に骨髄中に見られるが、末梢血またはその一部から単離することもできる。様々な細胞表面マーカを使用して、造血幹細胞を識別、選別または精製することができる。いくつかの場合において、造血幹細胞はc-kit⁺およびlin⁻と特定される。いくつかの場合において、ヒト造血幹細胞は、CD34⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{lo/-}、C-kit/CD117⁺、lin⁻と特定される。いくつかの場合において、ヒト造血幹細胞は、CD34⁻、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{lo/-}、C-kit/CD117⁺、I

10

20

30

40

50

lin⁻と特定される。いくつかの場合において、ヒト造血幹細胞は、CD133⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{lo/-}、C-kit/CD117⁺、lin⁻と特定される。いくつかの場合において、マウス造血幹細胞は、CD34^{lo/-}、SCA-1⁺、Thy1^{+/lo}、CD38⁺、C-kit⁺、lin⁻と特定される。いくつかの場合において、造血幹細胞はCD150⁺CD48⁻CD244⁻である。

【0029】

本明細書において使用される語句「造血細胞」とは、造血幹細胞に由来する細胞をいう。造血細胞は、生物、系、臓器または組織（たとえば血液またはその一部）からの単離によって取得または提供され得る。または、造血幹細胞を単離し、その幹細胞を分化させることによって造血細胞を取得または提供することもできる。造血細胞は、さらなる細胞型へと分化する能力が限られる細胞を含む。そのような造血細胞としては、多能性前駆細胞、系統拘束性前駆細胞、骨髄系共通前駆細胞、顆粒球マクロファージ前駆細胞または巨核球・赤血球系前駆細胞があるが、これらに限定されない。造血細胞としては、リンパ球系および骨髄系の細胞、たとえばリンパ球、赤血球、顆粒球、単球および血小板がある。いくつかの態様において、造血細胞は、免疫細胞、たとえばT細胞、B細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞または樹状細胞である。いくつかの態様において、細胞は先天性免疫細胞である。

【0030】

本明細書において使用される語句「T細胞」とは、T細胞受容体分子を発現するリンパ系細胞をいう。T細胞としては、ナイーブT細胞、刺激T細胞、初代T細胞（たとえば未培養）、培養T細胞、不死化T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、それらの組み合わせまたはそれらの部分集団があるが、これらに限定されない。T細胞は、CD4⁺、CD8⁺またはCD4⁺およびCD8⁺であることができる。T細胞は、ヘルパー細胞、たとえばタイプTh1、Th2、Th3、Th9、Th17またはTFHのヘルパー細胞であることができる。T細胞は細胞傷害性T細胞であることができる。制御性T細胞はFOXP3⁺またはFOXP3⁻であることができる。T細胞はアルファ/ベータT細胞またはガンマ/デルタT細胞であることができる。いくつかの場合において、T細胞はCD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}制御性T細胞である。いくつかの場合において、T細胞は、Tr1、Th3、CD8⁺CD28⁻、Treg17およびQa-1拘束性T細胞またはそれらの組み合わせもしくは部分集団からなる群より選択される制御性T細胞である。いくつかの場合において、T細胞はFOXP3⁺T細胞である。いくつかの場合において、T細胞はCD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}エフェクターT細胞である。いくつかの場合において、T細胞はCD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RA^{hi}CD45RO⁻ナイーブT細胞である。

【0031】

T細胞は、遺伝子操作された組換えT細胞であることができる。いくつかの場合において、組換えT細胞は、組換え（たとえば変異または異種）T細胞受容体またはキメラ抗原受容体（CAR）を有する。たとえば、T細胞受容体は、抗原特異性を変えるために、T細胞受容体の相補性決定領域中に1つまたは複数の変異を有することができる。もう1つの例として、T細胞受容体は、シグナル伝達を増減させるために、変異させる（たとえばエンドドメイン内で）ことができる。さらに別の例として、T細胞受容体は異種T細胞受容体で置換されることができる。さらに別の例として、T細胞受容体は、異なる受容体ドメインを有するポリペプチド、たとえば抗体または抗体断片で置換されることができる。いくつかの場合において、T細胞受容体は、標的化ドメイン（たとえば抗体断片）、膜貫通ドメインおよび細胞内またはエンドドメインドメインを含むキメラ受容体である。エンドドメインは、ロバストなT細胞活性化および抗原活性を提供するために、1つまたは複数のシグナル伝達ドメインおよび/またはアダプタドメインを含むことができる。

【0032】

本明細書において使用される語「非相同末端結合」またはNHEJとは、DNA鎖の切断端またはニック端が、相同鋳型核酸を要することなく直接連結される細胞プロセスをいう。NHEJは、修復部位において1つまたは複数のヌクレオチドの付加、欠失、置換またはそれらの組み合わせを生じさせることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 3 】

本明細書において使用される語「相同組換え修復（HDR）」とは、DNA鎖の切断端またはニック端が相同鋳型核酸からの重合によって修復される細胞プロセスをいう。したがって、元の配列は鋳型の配列で置換される。相同鋳型核酸は、ゲノム中の他のどこかにある相同配列（姉妹染色分体、相同染色体または同じもしくは異なる染色体上の反復領域）によって提供されることができる。または、外因性鋳型核酸を導入して、標的部位にある配列の特定のHDR誘導変化を得ることもできる。このようにして、特定の変異を切断部位に導入することができる。

【 0 0 3 4 】

本明細書において使用される一本鎖DNA鋳型または二本鎖DNA鋳型とは、HDRのための鋳型として細胞が使用することができるDNAオリゴヌクレオチドをいう。概して、一本鎖DNA鋳型または二本鎖DNA鋳型は、標的部位に対して少なくとも1つの相同性領域を有する。いくつかの場合において、一本鎖DNA鋳型または二本鎖DNA鋳型は、標的切断部位に挿入される異種配列を含む領域の両側にある2つの相同領域を有する。

10

【 0 0 3 5 】

発明の詳細な説明

以下の説明が本組成物および方法の様々な局面および態様を記載する。特定の態様が組成物および方法の範囲を画定する意図はない。むしろ、態様は、開示される組成物および方法の範囲に少なくとも含まれる様々な組成物および方法の非限定的な例を提供するだけである。この説明は当業者の観点から読まれるべきである。したがって、当業者に周知の情報は必ずしも含まれていない。

20

【 0 0 3 6 】

本明細書に提供されるものは、細胞のゲノムを編集するための組成物および方法である。本発明者らは、驚くことに、ウイルスベクターの非存在下、大きなヌクレオチド配列、たとえば約200ヌクレオチドまたは塩基対よりも大きい長さのヌクレオチド配列を細胞のゲノムに挿入することができることを見いだした。いくつかの態様において、ウイルスベクターの非存在下、約200ヌクレオチドまたは塩基対よりも大きい長さのヌクレオチド配列を初代免疫細胞のゲノムに挿入することができる。

【 0 0 3 7 】

大きな核酸、たとえば200ヌクレオチドよりも大きいサイズの核酸の、細胞中への組込みは、低い組込み効率、オフターゲット作用および/または細胞生存率の損失によって制限されることがある。本明細書に記載されるものは、ヌクレオチド配列、たとえば約200ヌクレオチドよりも大きいサイズのヌクレオチド配列の、細胞のゲノム中への組込みを達成するための方法および組成物である。いくつかの方法において、組込みの効率が高まる、オフターゲット作用が減る、および/または細胞生存率の損失が減る。

30

【 0 0 3 8 】

方法

細胞のゲノムを編集するための方法は、(a) Cas9リボ核タンパク質複合体(RNP)-DNA鋳型複合体を提供する工程であって、該RNP-DNA鋳型複合体が(i) RNPがCas9ヌクレアーゼドメインおよびガイドRNAを含み、該ガイドRNAが細胞のゲノムの標的領域に特異的にハイブリダイズし、該Cas9ヌクレアーゼドメインが標的領域を切断して細胞のゲノム中に挿入部位を生じさせる、該RNPと；(ii) 二本鎖または一本鎖のDNA鋳型であって、該DNA鋳型のサイズが約200ヌクレオチドよりも大きく、該DNA鋳型の5'および3'末端が、該挿入部位に隣接するゲノム配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、DNA鋳型とを含み、該複合体におけるRNP：DNA鋳型のモル比が約3：1～約100：1である、工程；ならびに(b) 該RNP-DNA鋳型複合体を細胞に導入する工程を含むことができる。

40

【 0 0 3 9 】

いくつかの態様において、本明細書に記載される方法は、少なくとも約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、99%の、またはより高いRNP-DNA鋳型複合体の

50

送達効率を提供する。いくつかの場合において、効率は、RNP-DNA鋳型を細胞に導入したのち生存可能である細胞に関して決定される。いくつかの場合において、効率は、RNP-DNA鋳型が導入される細胞の総数（生存可能または非生存可能）に関して決定される。

【 0 0 4 0 】

もう1つの例として、送達効率は、細胞集団中のゲノム編集された細胞の数を定量する（導入工程ののち得られた全細胞または全生存可能細胞と比べて）ことによって決定することができる。ゲノム編集を定量するための様々な方法を利用することができる。これらの方法としては、ミスマッチ特異的ヌクレアーゼ、たとえばT7エンドヌクレアーゼIの使用；1つまたは複数の標的遺伝子座のシーケンシング（たとえば、クローン化標的遺伝子座増幅断片のサンガーシーケンシングによる）；および高スループットディープシーケンシングがあるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 4 1 】

いくつかの態様において、細胞生存率の損失は、裸のDNAを細胞に導入した後またはウイルスベクターを使用してDNAを細胞に導入した後の細胞生存率の損失と比べて減少する。減少は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%またはそれらの割合の間の任意の割合の減少であることができる。いくつかの態様において、組込みのオフターゲット作用は、裸のDNAを細胞に導入した後またはウイルスベクターを使用してDNAを細胞に導入した後のオフターゲット組込みと比べて減少する。減少は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%またはそれらの割合の間の任意の割合の減少であることができる。

20

【 0 0 4 2 】

いくつかの場合において、本明細書に記載される方法は、RNP-DNA鋳型が導入された細胞の高い生存率を提供する。いくつかの場合において、RNP-DNA鋳型が導入された細胞の生存率は、少なくとも約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、99%またはより高い率である。いくつかの場合において、RNP-DNA鋳型が導入された細胞の生存率は、約20%～約99%、約30%～約90%、約35%～約85%または90%以上、約40%～約85%または90%以上、約50%～約85%または90%以上、約50%～約85%または90%以上、約60%～約85%または90%以上、または約70%～約85%または90%以上である。

30

【 0 0 4 3 】

本明細書に提供される方法において、RNP：DNA鋳型のモル比は約3：1～約100：1であることができる。たとえば、モル比は約5：1～10：1、約5：1～約15：1、5：1～約20：1；5：1～約25：1；約8：1～約12：1；約8：1～約15：1、約8：1～約20：1または約8：1～約25：1であることができる。

【 0 0 4 4 】

いくつかの態様において、DNA鋳型は約2.5pM～約25pMの濃度である。たとえば、DNA鋳型の濃度は、約2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25pMまたはそれらの濃度の間の任意の濃度であることができる。いくつかの態様において、DNA鋳型のサイズまたは長さは、約200bp、250bp、300bp、350bp、400bp、450bp、500bp、550bp、600bp、650bp、700bp、750bp、800bp、850bp、900bp、1kb、1.1kb、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2.0kb、2.1kb、2.2kb、2.3kb、2.4kb、2.5kb、2.6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb、3.8kb、3.9kb、4.0kb、4.1kb、4.2kb、4.3kb、4.4kb、4.5kb、4.6kb、4.7kb、4.8kb、4.9kb、5.0kbまたはこれらのサイズの間の任意のDNA鋳型サイズよりも大きい。たとえば、DNA鋳型のサイズは、約200bp～約500bp、約200bp～約750bp、約200bp～約1kb、約200bp～約1.5kb、約200bp～約2.0kb、約200bp～約2.5kb、約200bp～約3.0kb

40

50

、約200bp～約3.5kb、約200bp～約4.0kb、約200bp～約4.5kb、約200bp～約5.0kbであることができる。いくつかの態様において、DNA鋳型の量は約1μg～約10μgである。たとえば、DNA鋳型の量は、約1μg～約2μg、約1μg～約3μg、約1μg～約4μg、約1μg～約5μg、約1μg～約6μg、約1μg～約7μg、約1μg～約8μg、約1μg～約9μg、約1μg～約10μgであることができる。いくつかの態様において、DNA鋳型の量は、約2μg～約3μg、約2μg～約4μg、約2μg～約5μg、約2μg～約6μg、約2μg～約7μg、約2μg～約8μg、約2μg～約9μgまたは2μg～約10μgである。いくつかの態様において、DNA鋳型の量は、約3μg～約4μg、約3μg～約5μg、約3μg～約6μg、約3μg～約7μg、約3μg～約8μg、約3μg～約9μgまたは約3μg～約10μgである。いくつかの態様において、DNA鋳型の量は、約4μg～約5μg、約4μg～約6μg、約4μg～約7μg、約4μg～約8μg、約4μg～約9μgまたは約4μg～約10μgである。いくつかの態様において、DNA鋳型の量は、約5μg～約6μg、約5μg～約7μg、約5μg～約8μg、約5μg～約9μgまたは約5μg～約10μgである。いくつかの態様において、DNA鋳型の量は、約6μg～約7μg、約6μg～約8μg、約6μg～約9μgまたは約6μg～約10μgである。いくつかの態様において、DNA鋳型の量は、約7μg～約8μg、約7μg～約9μgまたは約7μg～約10μgである。いくつかの態様において、DNA鋳型の量は、約8μg～約9μgまたは約8μg～約10μgである。いくつかの態様において、DNA鋳型の量は約9μg～約10μgである。いくつかの場合において、DNA鋳型のサイズは、裸のDNAとして致死性であるのに十分な大きさかつ十分な量である。いくつかの態様において、DNA鋳型は異種タンパク質またはその断片をコードする。いくつかの態様において、DNA鋳型は、細胞のゲノムへの挿入後の異種タンパク質またはその断片の発現を制御するための制御配列、たとえば、プロモータ配列および/またはエンハンサ配列を含む。

【0045】

いくつかの場合において、DNA鋳型は直鎖状DNA鋳型である。いくつかの場合において、DNA鋳型は一本鎖DNA鋳型である。いくつかの場合において、一本鎖DNA鋳型は純粋な一本鎖DNA鋳型である。本明細書において使用される「純粋な一本鎖DNA」とは、DNAの他方または反対の鎖を実質的に欠く一本鎖DNAを意味する。「実質的に欠く」とは、純粋な一本鎖DNAが、DNAの一方の鎖を他方の鎖よりも少なくとも100倍多く欠くことをいう。

【0046】

いくつかの場合において、RNP-DNA鋳型複合体は、RNPをDNA鋳型とともに約20～約25℃の温度で約1分未満～約30分の間インキュベートすることによって形成される。たとえば、RNPをDNA鋳型とともに、約20℃、21℃、22℃、23℃、24℃または25℃の温度で約5秒、10秒、15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40秒、45秒、50秒、55秒、1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分、11分、12分、13分、14分、15分、16分、17分、18分、19分、20分、21分、22分、23分、24分、25分、26分、27分、28分、29分もしくは30分またはそれらの時間の間の任意の時間、インキュベートすることができる。もう1つの例において、RNPをDNA鋳型とともに、約20℃～約25℃の温度で約1分未満～約1分、約1分未満～約5分、約1分未満～約10分、約5分～10分、約5分～15分、約10～約15分、約10分～約20分または約10分～約30分の間、インキュベートすることができる。いくつかの態様において、RNP-DNA鋳型複合体と細胞とは、RNP-DNA鋳型複合体を細胞に導入する前に混合される。

【0047】

いくつかの態様において、RNP-DNA鋳型複合体を導入する工程はエレクトロポレーションを含む。RNP-DNA鋳型複合体を導入するために細胞をエレクトロポレーションするための方法、組成物および装置は、本明細書における実施例に記載されているものを含むことができる。RNP-DNA鋳型複合体を導入するために細胞をエレクトロポレーションするためのさらなる、または代替の方法、組成物および装置は、WO/2006/001614またはKim, J.A. et al. Biosens. Bioelectron. 23, 1353-1360 (2008)に記載されているものを含むことができる。RNP-DNA鋳型複合体を導入するために細胞をエレクトロポレー

ションするためのさらなる、または代替の方法、組成物および装置は、米国特許出願公開第2006/0094095号；第2005/0064596号；または第2006/0087522号に記載されているものを含むことができる。RNP-DNA鋳型複合体を導入するために細胞をエレクトロポレーションするためのさらなる、または代替の方法、組成物および装置は、Li, L.H. et al. *Cancer Res. Treat.* 1, 341-350 (2002)；米国特許第6,773,669号；第7,186,559号；第7,771,984号；第7,991,559号；第6,485,961号；第7,029,916号；ならびに米国特許出願公開第2014/0017213号；および第2012/0088842号に記載されているものを含むことができる。RNP-DNA鋳型複合体を導入するために細胞をエレクトロポレーションするためのさらなる、または代替の方法、組成物および装置は、Geng, T. et al., *J. Control Release* 144, 91-100 (2010)；およびWang, J., et al. *Lab. Chip* 10, 2057-2061 (2010)に記載されているものを含むことができる。

10

【0048】

いくつかの態様において、Cas9タンパク質は活性エンドヌクレアーゼ形態にあることができ、ガイドRNAとの複合体の一部またはDNA鋳型との複合体の一部として標的核酸に結合したとき、二本鎖切断が標的核酸に導入されるようになっている。二本鎖切断は、ランダム変異を導入するためにNHEJによって修復することもできるし、特異的な変異を導入するためにHDRによって修復することもできる。様々なCas9ヌクレアーゼを、本明細書に記載される方法に利用することができる。たとえば、ガイドRNAによって標的化される領域のすぐ3'にNGGプロトスペーサ隣接モチーフ(PAM)を必要とするCas9ヌクレアーゼを利用することができる。そのようなCas9ヌクレアーゼは、NGG配列を含むゲノムの任意の領域に標的化することができる。もう1つの例として、直交性PAMモチーフを必要とするCas9タンパク質を利用して、隣接NGG PAM配列を有しない配列を標的化することができる。直交性PAM配列特異性を有する例示的なCas9タンパク質としては、CFP1、*Nature Methods* 10, 1116-1121 (2013)に記載されているもの、およびZetsche et al., *Cell*, Volume 163, Issue 3, p759-771, 22 October 2015に記載されているものがあるが、これらに限定されない。

20

【0049】

いくつかの場合において、Cas9タンパク質はニッカーゼであり、ガイドRNAとの複合体の一部として標的核酸に結合したとき、一本鎖切断またはニックが標的核酸に導入されるようになっている。構造的に異なるガイドRNAにそれぞれ結合した一対のCas9ニッカーゼが、標的ゲノム領域の2つの近位部位を標的化することができ、したがって、一対の近位一本鎖切断部を標的ゲノム領域に導入することができる。オフターゲット作用が単一のニックを生じさせる可能性が高く、それが概して塩基除去修復機構による損傷なしに修復されるため、ニッカーゼ対は特異性の増強を提供することができる。例示的なCas9ニッカーゼとしては、D10AまたはH840A変異を有するCas9ヌクレアーゼがある。

30

【0050】

いくつかの態様において、RNPはCas9ヌクレアーゼを含む。いくつかの態様において、RNPはCas9ニッカーゼを含む。いくつかの態様において、RNP-DNA鋳型複合体は少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体を含む。いくつかの態様において、少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体は構造的に異なるCas9ヌクレアーゼドメインを含む。いくつかの態様において、少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体は構造的に異なるガイドRNAを含む。いくつかの態様において、少なくとも2つの構造的に異なるRNP複合体が構造的に異なるガイドRNAを含む場合、構造的に異なるRNP複合体それぞれはCas9ニッカーゼを含み、構造的に異なるガイドRNAは標的領域の反対の鎖にハイブリダイズする。

40

【0051】

いくつかの場合において、構造的に異なるリボ核タンパク質複合体を含む複数のRNP-DNA鋳型が細胞に導入される。たとえば、Cas9タンパク質は、複数(たとえば2、3、4、5またはより多い、たとえば2~10、5~100、20~100)の構造的に異なるガイドRNAとで複合化されて、複数の構造的に異なる標的ゲノム領域におけるDNA鋳型の挿入を標的化することができる。

50

【 0 0 5 2 】

本明細書に提供される方法および組成物において、細胞としては、真核細胞、原核細胞、動物細胞、植物細胞、真菌細胞などがあるが、これらに限定されない。任意選択で、細胞は哺乳動物細胞、たとえばヒト細胞である。細胞はインビトロ、エクスピボまたはインビボ細胞であることができる。細胞はまた、初代細胞、生殖細胞、幹細胞または前駆細胞であることができる。前駆細胞は、たとえば多能性幹細胞または造血幹細胞であることができる。いくつかの態様において、細胞は初代造血細胞または初代造血幹細胞である。いくつかの態様において、初代造血細胞は免疫細胞である。いくつかの態様において、免疫細胞はT細胞である。いくつかの態様において、T細胞は、制御性T細胞、エフェクターT細胞またはナイーブT細胞である。いくつかの態様において、T細胞はCD4⁺T細胞である。いくつかの態様において、T細胞はCD8⁺T細胞である。いくつかの態様において、T細胞はCD4⁺CD8⁺T細胞である。いくつかの態様において、T細胞はCD4⁻CD8⁻T細胞である。また、本明細書に記載される方法のいずれかによって改変された細胞のいずれかの集団が提供される。いくつかの態様において、方法はさらに、改変された細胞の集団を増殖させる工程を含む。

10

【 0 0 5 3 】

いくつかの場合において、細胞は、対象から取り出され、本明細書に記載される方法のいずれかを使用して改変され、患者に投与される。他の場合において、本明細書に記載される構築物のいずれかがインビボで患者に送達される。たとえば、米国特許第9737604号およびZhang et al. "Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR /Cas9 for tumor therapy," NPG Asia Materials Volume 9, page e441 (2017)を参照すること。

20

【 0 0 5 4 】

いくつかの態様において、RNP-DNA鋳型複合体は約 1×10^5 個～約 2×10^6 個の細胞に導入される。たとえば、RNP-DNA鋳型複合体は、約 1×10^5 個～約 5×10^5 個の細胞、約 1×10^5 個～約 1×10^6 個、 1×10^5 個～約 1.5×10^6 個、 1×10^5 個～約 2×10^6 個、約 1×10^6 個～約 1.5×10^6 個の細胞または約 1×10^6 個～約 2×10^6 個の細胞に導入することができる。

【 0 0 5 5 】

いくつかの場合において、本明細書に記載される方法および組成物は、キメラ抗原受容体T細胞(CAR T細胞)などの組換えT細胞の生成、改変、使用または制御に使用することができる。そのようなCAR T細胞は、対象における癌、感染症または自己免疫疾患を治療または予防するために使用することができる。たとえば、いくつかの態様において、異種タンパク質(たとえばキメラ抗原受容体(CAR))を発現させるために、1つまたは複数の遺伝子産物がT細胞に挿入またはノックインされる。

30

【 0 0 5 6 】

組成物

同じく本明細書に提供されるものは、複数の細胞であって、その少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%またはより多くのゲノムが異種DNA鋳型の標的化挿入を含み、DNA鋳型が少なくとも約200bpのサイズである、複数の細胞である。いくつかの態様において、複数の細胞は初代造血細胞または初代造血幹細胞を含む。いくつかの態様において、初代造血細胞は免疫細胞である。いくつかの態様において、免疫細胞はT細胞である。いくつかの態様において、T細胞は制御性T細胞、エフェクターT細胞またはナイーブT細胞である。いくつかの態様において、T細胞はCD8⁺T細胞である。いくつかの態様において、T細胞はCD4⁺CD8⁺T細胞である。

40

【 0 0 5 7 】

開示されるものは、開示される方法および組成物のために使用することができる、開示される方法および組成物とともに使用することができる、開示される方法および組成物の調製に使用することができる、または開示される方法および組成物の産物である、材料、組成物および成分である。これらおよび他の材料が本明細書に開示され、これらの材料の

50

組み合わせ、サブセット、相互作用、群などが開示されるとき、これらの化合物の各様々な個々のおよび集合的な組み合わせおよび置換の具体的言及が明示的に開示されていないとしても、それぞれは本明細書において具体的に考慮され、記載されているということが理解されよう。たとえば、ある方法が開示され、考察され、方法におけるものを含め、1つまたは複数の分子に対して加えることができる多数の改変が考察されているならば、別段の指示がない限り、方法のあらゆる組み合わせおよび置換ならびに可能である改変が具体的に考慮されている。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせが同じく具体的に考慮され、開示されている。この概念は、開示される組成物を使用する方法の工程をはじめとする本開示のすべての局面に当てはまる。したがって、実施することができる多様なさらなる工程があるならば、それらのさらなる工程それぞれが、開示される方法の任意の特定の工程または方法工程の組み合わせで実施されることができ、およびそのような各組み合わせまたは組み合わせのサブセットが具体的に考慮されており、開示されているとみなされるべきであることが理解されよう。

10

【0058】

本明細書において引用される刊行物およびそれらが引用されるところの資料は、全体として参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

【実施例】

【0059】

以下の実施例は、例示としてのみ提供され、限定として提供されない。当業者は、本質的に同じ、または類似の結果が得られるように変更または改変することができる多様な重要性の低いパラメータを容易に認識するであろう。

20

【0060】

実施例 I

実施例 I に提供されるデータは、以下のプロトコルに概説するようにして生成された。

臨床プロトコル / ドナーの同意を確立した

SepMate を製造者のプロトコルとともに使用して PBMC の単離を実施した。

EasySep を製造者のプロトコルとともに使用して バルク T 細胞の単離を実施した。

Banbanker 培地を製造者のプロトコルとともに使用して凍結を実施した。

1 mL あたり細胞 2000 万個

解凍

30

解凍した細胞の上に Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1 mL を加えたのち、それらを培地中で合わせ、洗浄した。

刺激の前、細胞を一晩だけ培地中に静置した。

【0061】

初代 T 細胞培養

培地

RPMI + 10% FBS

XVivo15 + 5% FBS ; または

Immunocult (無血清)

無血清環境における細胞培養に有用

40

刺激

1 : 1 CD3/CD28 磁気 Dynabead

0.25 : 1 から 2 : 1 までの比を使用することができる

エレクトロポレーション前の磁気ビーズ除去が効率を改善することができる

サイトカイン

エレクトロポレーション前

200 U/mL の IL-2 (必須)

5 ng/mL の IL-7 (非必須)

5 ng/mL の IL-15 (非必須)

エレクトロポレーション後

50

500U/mLのIL-2（必須）

培養密度

エレクトロポレーション前

培養培地1mLあたり細胞 1×10^6 個

通常、1mLを24ウェルプレート、30mLをT75フラスコ、または70mLをT175フラスコに入れる

エレクトロポレーション後

0日目 - 0.25×10^6 個のエレクトロポレーションされた細胞を、培地200 μ L中、96ウェル丸底プレートの1ウェルに入れる

2日目 - 新鮮な培地100 μ Lを上からウェルに加える（エレクトロポレーション後サイトカインは3 \times 濃度）

4日目 - 48ウェルプレート中の培地500 μ L中に新鮮なサイトカインとともに移してさらに増殖させたのち、2～3日ごとに分割して、そのたび新鮮なサイトカインを加えながら、培養物1mLあたり約 1×10^6 個を維持する

【0062】

RNP作製

160 μ M crRNAを160 μ M tracrRNAと1：1で混合する

分注したストックを - 80 で貯蔵する

凍結乾燥させたRNAを150mM MgClとともにTris-HCL（7.4pH）中に再懸濁させる

crRNAおよびtracrRNAをDharmaconまたはIDTから購入し、それぞれの製造者からのtracrRNAを常にそのcrRNAとともに使用する

37 で30分間インキュベートする

80 μ M gRNAを作製する

80 μ M gRNAを40 μ M Cas9と1：1で混合する

Cas9析出物が溶解するまで側面を軽くたたきながらチューブ混合する

37 で15分間インキュベートする

20 μ M RNPを作製する

RNPは、すぐに使用することもできるし、短期間なら使用するまで4 で貯蔵することもできるし、 - 80 で長期間貯蔵し、解凍後に使用することもできる

【0063】

相同組換え修復鋳型（HDRT）作製

構築

PCR産物およびGeneBlocks（IDT）からGibson Assembliesを使用してHDRT配列を構築して、5'および3'相同アームならびに所望のインサートを含む最終的なHDRTをさらなる増殖のためにクローニングベクターに入れた

作製

高アウトプットPCR増幅（Kapa Hotstartポリメラーゼ）によって直鎖状dsDNA HDRT配列を作製した

PCRアンプリコンをSPRI精製し、PCR反応入力100 μ LあたりH₂O 4 μ Lの最終量まで濃縮した

HDRTの濃度をナノドロップによって1：20希釈度で分析した

ゲル電気泳動によって純度をアッセイした

【0064】

初代T細胞エレクトロポレーション

エレクトロポレーションパラメータ

細胞数 - 1,000,000（少なくとも200,000または多くは2,000,000でもうまく働く）

細胞量 - 20 μ L（この量は約10 μ Lと約20 μ Lとの間で変化することができる）

細胞を90Gで10分間スピニングし、吸引し、エレクトロポレーションバッファ中に再懸濁させ、その直後にエレクトロポレーションする

エレクトロポレーションバッファ P3

P2およびOMEMをはじめとする代替バッファでもうまく働くが、最適パルスコードが異なる

バッファP2はより高い生存率およびより低い効率を生み出すが、陽性細胞の総数は同程度である

最適なパルスコード (EO155) を有するOMEMバッファは、最適なパルスコードを有するP3と類似の生存率および効率を生み出す

RNP量 - 約0.5 μ L (50 pmol)

少なくとも1 μ L (20 pmol)、多くは5 μ L (100 pmol) でもうまく働く

最適なRNP量はHDRTの量とともに変化するが、約10 : 1のRNP : HDRTの例示的モル比がうまく働く。

HDRT量 - 約1 μ L

量は約0.5 μ Lと約2 μ Lとの間で変化することができる。

HDRT合計量 - 約5 pmol

より少量およびより多量が可能であるが、効率が異なる

合計エレクトロポレーション量 - 約24 μ L

パルスコード - EH115

他にも多くのパルスコードが可能であるが、EH115がもっとも効率的であることがわかった

【0065】

エレクトロポレーションプロトコル

まず、HDRTを、96ウェルエレクトロポレーションプレートのウェルに対応する96ウェルポリプロピレンV底プレートのウェル中に分注した

次いで、表記RNPを同様に96ウェルポリプロピレンV底プレートに加えた

HDRTおよびRNPをいっしょに室温で5分間インキュベートした

30秒の短さでは効果に差は出ない

細胞を加える前にHDRTとRNPとをいっしょにインキュベートすることが重要である

最後に、細胞をエレクトロポレーションバッファ中に再懸濁させ、細胞20 μ Lを96ウェルポリプロピレンV底プレートの各ウェルに加え、上下に三回ピペット操作することによってウェル中にすでにあるHDRTおよびRNPと混合した

エレクトロポレーションのために、細胞 + RNP + HDRTの混合物24 μ Lを各ウェルから96ウェルエレクトロポレーションプレートの対応するウェルの中に移した

エレクトロポレーション後の処理

エレクトロポレーションの直後、予備加温した培地80 μ Lをエレクトロポレーションプレートの各ウェルに加えた

プレートをインキュベータ中37 °Cで15分間インキュベートした

エレクトロポレーション後のインキュベーションなしの場合、わずかに効率が低かった。効率を損失することなく約15分～約60分間のインキュベーションが可能である。

細胞を上記密度でエレクトロポレーションプレートから培養プレートに移した

一般に、エレクトロポレーションプレートを、培地およびサイトカインを事前に充填した4つの同一の96ウェル丸底プレートに分割した。

【0066】

結果

たとえばPCRを使用して、大きな挿入サイズ (> 1 kb) を可能にする直鎖状dsDNA構築物を作製することにより、より長いDNA構築物を作製することが有用であろう。これは高いスループットで実施することができるが、DNAの導入は非常に毒性であり、多大な細胞死を招くため、本発明まで、これは不可能であった。図1に示すように、実施可能な編集効率を達成するために必要な裸のDNAの濃度では、細胞生存率が非常に低いため、この方法は実施不可能である。

【0067】

10

20

30

40

50

長いDNA鋳型をRNPと複合化することが細胞生存率をレスキューする

本発明者らは、大量の細胞死を生じさせる量の長いdsDNA（プラスミドまたは直鎖状dsDNA）をエレクトロポレーションするとき、DNAをRNPと複合化してRNP-DNA鋳型複合体を形成すること（エレクトロポレーション時の細胞付加の前、室温で短時間のインキュベーションにより）が生存率損失を減らすということを見いだした。これは、プラスミド鋳型（図2）および直鎖状dsDNA鋳型（図3）に当てはまった。エレクトロポレーションされるDNAの量が増すと、生存率を維持するためにRNPの量も同じく増した（図3）。

【0068】

生存率および組込み効率のためのCas9とDNA鋳型との比

約10：1のRNP：DNA鋳型のモル比が、エレクトロポレーション後の組込み効率と生存率の両方を維持した（図4）。しかし、3：1～約100：1の範囲の比もまた、うまく働いた。約10：1のRNP：DNA鋳型の比の使用が、生存率の損失および効率の作用のバランスをとり、最大数の陽性細胞の組込みを達成した（図5）。この比はまた、大きな鋳型（>750bp）の高効率挿入を可能にした（図6）。

【0069】

dsDNA鋳型は、ssDNA鋳型を使用して減らされるいくつかのオフターゲット組込みを有する

長いDNA鋳型の挿入は、ドナー鋳型としてAAVを使用する場合に見られるオフターゲット組込みに類似する、少量のオフターゲット組込み（図7）を生じさせることができる。しかし、本明細書に提供される方法のいくつかは、ドナーとして長いssDNA鋳型を使用し、それがオフターゲット組込みの減少を生じさせる（図8）。

【0070】

Cas9ニッカーゼの使用がオフターゲットdsDNA切断を防ぐ

オフターゲット組込み以外のもう1つの問題が、Cas9によって導入されるオフターゲットdsDNA切断（NHEJによって変異として修復することができる）である。本明細書に示すように、本明細書に開示される高効率の非ウイルス組込みは、2つのgRNAおよびCas9ニッカーゼ（D10A）を使用して挿入することができ（図9）、それがオフターゲットdsDNA切断を防ぐ。

【0071】

実施例II

遺伝子標的化のためのヒト初代T細胞の単離

健康人ドナーから、新鮮な全血試料、Trima Apheresis（Blood Centers of the Pacific）後の白血球除去チャンバからの残渣または白血球アフェレーシス産物（StemCell）から初代ヒトT細胞を単離した。全血試料から、SepMateチューブ（STEMCELL、製造者の指示どおり）を使用するFicoll遠心処理により、末梢血単核細胞（PBMC）を単離した。すべての細胞供給源からのPBMCから、EasySep Human T Cell Isolation Kit（STEMCELL、製造者の指示どおり）を使用する磁気ネガティブセレクションにより、T細胞を単離した。別段の記載がない限り、単離したT細胞を刺激し、直接（新鮮）使用した。凍結細胞を使用した場合、事前に単離し、Bambanker凍結培地（Bulldog Bio）中で製造者の指示どおりに凍結させておいたT細胞を解凍し、刺激のない培地中で1日培養し、次いで、新鮮単離試料に関して記載したように刺激し、処理した。新鮮な健康人血液ドナーは、UCSF Committee on Human Research（CHR）によって承認されたプロトコルの下で同意を示した人たちであった。遺伝子編集のための患者試料は、Yale Internal Review Board（IRB）によって承認されたプロトコルの下で得たものであった。

【0072】

初代T細胞培養

別段の記載がない限り、バルクT細胞を、5%ウシ胎児血清、50 mM 2-メルカプトエタノールおよび10mM N-アセチルL-シスチンを含むXVivo15培地（STEMCELL）中で培養した。添加物を含まない無血清培地（ImmunoCult XF T細胞増殖培地、STEMCELL）およびRPMI + 10% FBSを表記実験において使用した（図15）。単離直後、T細胞を、抗ヒ

10

20

30

40

50

トCD3/CD28磁気ダイナビーズ (ThermoFisher) (ビーズ：細胞の濃度比1：1) および200U/mLのIL-2 (UCSF Pharmacy) と5ng/mLのIL-7 (ThermoFisher) と5ng/mLのIL-15 (Life Tech) とのサイトカインカクテルで2日間刺激した。エレクトロポレーションののち、T細胞を500U/mLのIL-2を含む培地中で培養した。培養の間じゅう、T細胞を培地1mLあたり約100万個の細胞密度に維持した。エレクトロポレーション後2～3日ごとに、さらなる培地をさらなる新鮮なIL-2とともに加えて最終濃度を500U/mLにし、必要に応じて細胞をより大きな培養器に移して細胞100万個/mLの密度を維持した。

【0073】

RNP作製

以前に記載されているように(7、16)、二成分gRNAをCas9にアニーリングすることによってRNPを作製した。簡潔にいうと、crRNAおよびtracrRNAを化学合成し (Dharmacon、IDT)、組換えCas9-NLS、D10A-NLSまたはdCas9-NLSを組換え作製し、精製した (QB3 Macrolab)。凍結乾燥RNAを、150mM KClを含むTris-HCl (7.4pH) 中に160μMの濃度で再懸濁させ、アリコートとして-80℃で貯蔵した。crRNAおよびtracrRNAアリコートを解凍し、容量比1：1で混合し、37℃で30分間インキュベートして80μM gRNA溶液を形成した。次いで、20mM HEPES-KOH (pH7.5)、150mM KCl、10%グリセロール、1mM DTT中に40μMで貯蔵された組換えCas9および変異体を80μM gRNAと容量比1：1で (gRNA：Cas9のモル比2：1) 37℃で15分間混合して20μMのRNPを形成した。概して、複合化後すぐにRNPをエレクトロポレーションした。

【0074】

dsDNA HDRT作製

PCR産物から二本鎖DNA HDRT配列を作製した。配列確認および将来の増殖のために Gibson Assembliesを使用して、相同アーム (一般にはIDTからgBlockとして合成) および所望のインサート (たとえばGFP) からなるHDR鑄型配列をクローニングベクター中に配置して新規なHDR配列を構築した。これらのプラスミドを、高アウトプットPCR増幅 (Kapa Hotstartポリメラーゼ) のための鑄型として使用した。PCRアンプリコン (dsDNA HDRT) をSPRI精製し (1.0×)、PCR反応投入量100μLあたりH₂O 3μLの最終量に溶出させた。ナノドロップによって1：20希釈度でHDRTの濃度を分析した。1.0%アガロースゲル中のゲル電気泳動により、増幅したHDRTのサイズを確認した。

【0075】

エキソヌクレアーゼ消化によるssDNA HDRT作製

HDRドナーとして長いssDNAを作製するために、関心対象のDNAを、1つの通常の非修飾PCRプライマおよび第二のリン酸化PCRプライマを使用するPCRによって増幅した。リン酸化プライマを使用して増幅されるDNA鎖が、この方法を使用して分解される鎖になる。これが、それぞれのリン酸化PCRプライマを使用して一本鎖センスまたは一本鎖アンチセンスDNAを調製することを可能にする。関心対象のssDNA鎖を作製するために、PCR産物のリン酸化鎖を、2つの酵素Strandase Mix AおよびStrandase Mix Bを用いる、それぞれ37℃で5分間 (1kbあたり) の後続の処理によって分解した。80℃で5分間インキュベートすることにより、酵素を不活性化した。得られたssDNA HDR鑄型をSPRI精製し (1.0×)、H₂O中に溶出させた。Guide-it (商標) Long ssDNA Production System (Takara Bio USA, Inc. #632644) のより詳細なプロトコルは、製造者のウェブサイトで見ることができる。

【0076】

逆合成によるssDNA HDRT作製

(28) に記載されているように、RNA中間体の逆転写のち、得られたRNA：DNAハイブリッド産物中のRNA鎖の加水分解によってssDNAドナーを合成した。簡潔にいうと、まず、所望のHDRドナーをT7プロモータの下流にクローニングし、T7-HDRドナー配列をPCRによって増幅した。RNAを、HiScribe T7 RNAポリメラーゼ (New England Biolabs) を使用するインビトロ転写によって合成し、TGIRT-III (InGex) を使用して逆転写した。逆転写後、NaOHおよびEDTAをそれぞれ0.2Mおよび0.1Mまで加え、RNA加水分解

10

20

30

40

50

を95℃で10分間実施した。反応をHClでクエンチし、最終的なssDNA産物を、Ampure XP磁気ビーズ(Beckman Coulter)を使用して精製し、無菌RNアーゼフリーのH₂O中に溶出させた。キャピラリー電気泳動(Bioanalyzer、Agilent)によってssDNAの品質を分析した。

【0077】

初代T細胞エレクトロポレーション

初期T細胞刺激の2日後、RNPおよびHDR鑄型をエレクトロポレーションした。T細胞を培養容器から回収し、磁石上に細胞を2分間置くことによって磁気CD3/CD28ダイナビーズを除去した。エレクトロポレーションの直前に、ビーズ除去した細胞を90gで10分間遠心処理し、吸引し、LonzaエレクトロポレーションバッファP3中に細胞100万個あたりバッファ20μLで再懸濁させた。最適な編集のために、Lonza 4D 96ウェルエレクトロポレーションシステムをパルスコードEH115で使用して、1ウェルあたり100万個のT細胞をエレクトロポレーションした。1ウェルあたり細胞200,000個から200万個までの代替細胞濃度はより低い効率を示した。表記のように代替エレクトロポレーションバッファを使用した。最適なパルス設定は異なった(OMEMバッファの場合はEO155)。別段の指示がない限り、RNP 2.5μL(合計50pmol)を2μg/μLのHDR鑄型2μL(HDR鑄型合計4μg)とともにエレクトロポレーションした。

【0078】

細胞、RNPおよびHDRTの付加順序が重要であると思われた(図10)。96ウェル実験の場合、まず、HDRTを96ウェルポリプロピレンV底プレートのウェル中に分注した。次いで、RNPをHDRTに加え、室温で少なくとも30秒間いっしょにインキュベートした。最後に、エレクトロポレーションバッファ中に再懸濁させた細胞を加え、ピペット操作によってHDRTおよびRNPと手早く混合し、合計量24μL(細胞+RNP+HDRT)を96ウェルエレクトロポレーションキュベットプレート中に移した。エレクトロポレーションの直後、予備加温した培地(サイトカインを含まない)80μLを各ウェルに加え、細胞を、エレクトロポレーションキュベット中に残したまま、細胞培養インキュベータ中、37℃で15分間静置した。15分後、細胞を最終培養容器に移した。

【0079】

フローサイトメトリー

Attune NxT Accoustic Focusing Cytometer(ThermoFisher)上でフローサイトメトリー分析を実施した。CD3-APC-eFluor 780(SK7、eBiosciences)、CD4-PerCP(SK3、Tonbo)、CD8-PE-Cy7(SK1、BD)、IL2RA/CD25-APC(BC96、Tonbo)の場合の表面染色。pStat5(Y694)-PacBlue(クローン47、BD)を使用して細胞内リン酸化染色を実施した。FoxP3-AF488(206D、Biolegend)を使用してFoxP3の細胞内サイトカイン染色を実施した。

【0080】

共焦点顕微鏡検査

生きたT細胞の懸濁液10μlを3×1インチ顕微鏡スライド上にドロップキャストし、その上に25mm²カバーガラスを配置することにより、試料を調製した。直立型Nikon A1rレーザ走査型共焦点顕微鏡上で画像化を実施した。488nm OBISレーザ(Coherent)によって励起を達成した。長作動距離(LWD)60×Plan Apo 1.20 NA水浸対物レンズを、NIS-Elementsソフトウェアによって達成されたさらなるデジタルズームとともに使用した。「Galvano」ミラー設定下、2×ライン平均化有効状態で画像を取得し、TIFFとしてエクスポートしてFIJI(ImageJ、NIH)で解析した。

【0081】

CUT&RUN

エレクトロポレーションの11日後および抗CD3/抗CD28ビーズによる再刺激の4日後(非タグ化細胞はエレクトロポレーションしなかった)、エピトープタグ化初代ヒトT細胞に対してCUT&RUNを実施した。エレクトロポレーションされた細胞の約20%および10%が、それぞれドナー1およびドナー2試料中でフローサイトメトリーによって決定された

GFP-BATF発現を示した。(18)に記載されているように、抗GFP(ab290)、抗BATF(sc-100974)およびウサギ抗マウス(ab46540)抗体を使用してCUT&RUNを実施した。簡潔にいうと、細胞600万個(GFP-BATF含有細胞での抗GFP CUT&RUNの場合は細胞3,000万個)を捕集し、洗浄した。核を単離し、一次抗体(GFPまたはBATF)とともに回転させながら4で2時間インキュベートした。BATF CUT&RUN試料をウサギ抗マウス抗体とともにさらに1時間インキュベートした。次に、核をプロテインA-マイクロコッカスヌクレアーゼ(Henikoffラボからご提供いただいた)とともに4で1時間インキュベートした。核を0に平衡させ、MNアーゼ消化を30分間進行させた。可溶化クロマチンCUT&RUN断片を単離し、精製した。ペアエンドシーケンシングライブラリを調製し、Illumina Nextseqマシン上で実施し、Skene and Henikoff, "An efficient targeted nucle 10
ase strategy for high resolution mapping of DNA binding sites," Elife 6 (2017) doi: 10.7554/eLife.21856に記載されているようにシーケンシングデータを処理した。ピークコールおよびヒートマップ作製のために、セントロメアにマッピングするリードを除外した。

【0082】

TLAシーケンシングおよび分析

前記¹⁶のように、TLAシーケンシングをCergentisによって実施した。同じく前記¹⁶のように、組込み部位および導入遺伝子融合のデータ分析をCergentisによって実施した。TLAシーケンシングは、GFP融合物を組み込むためにそれぞれRAB11A遺伝子座をdsDNA 20
またはssDNA HDR鋳型で編集された2人の健常人ドナーにおいて実施した。プライマダイマーまたはプライマバイアスの証拠を示す(すなわち、実測リードの99%超が単一のプライマセットから来た)シーケンシングリードを除外した。

【0083】

インビトロTreg抑制アッセイ

EasySep Human CD4+T細胞濃縮キット(STEMCELL Technologies)を使用してCD4+T細胞を濃縮した。IL2RA欠損対象およびHDからのCD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+Treg濃縮細胞ならびにCD25+/-個体からのCD3+CD4+CD25hiCD127lo Tregをフローサイトメトリーによって選別した。CD3+CD4+CD25-CD127+レスポンダT細胞(Tresp)を5μMのCellTrace CFSE(Invitrogen)で標識した。抗CD2、抗CD3および抗CD28(Treg Suppression Inspector; Miltenyi Biotec)が負荷されたビーズの存在下、ビーズ1:細胞1の比でTregおよびHD Trespを1:1の比で共培養した。3.5~4.5 30
日目に、共培養物をCFSE希釈に関してFACSによって分析した。以下の式を使用して%抑制を計算する: $1 - (\text{Tregを用いた場合の\%増殖} / \text{Tregなしで刺激されたTrespの\%増殖})$ 。

【0084】

修正されたTregの選別およびTSDR分析

健常人コントロールおよびIL2RA複合ヘテロ接合変異(D6)の患者からのエキスビボ増殖させたTregおよびTEフェクタ細胞を解凍し、染色した。CD25およびCD62Lマーカの発現に基づいて生細胞を選別し、直接、プロテイナーゼKが補充されたZymoResearch M-Digestion Buffer(2x)(cat# D5021-9)に入れた。ライセートを65で2時間より長くインキュベートしたのち、凍結させた。試料の重亜硫酸塩変換およびパイロシーケンシングをEpigenDx(アッセイID ADS783-FS2)によって実施して、ATGから-2330~-2263に及ぶFOXP3遺伝子のイントロン1の9つのCpG部位のメチル化状態を調べた。 40

【0085】

ヘテロ接合/ホモ接合組込み予測モデル

異なる蛍光タンパク質を同じ部位に組み込む2つのHDR鋳型が細胞に導入される(エレクトロポレーションされる)ならば、蛍光表現型のみから、1つの常染色体ゲノム遺伝子座に二対立遺伝子挿入(2つの潜在的対立遺伝子)を有する細胞の割合の推定を実施することができる。簡単な確率モデルには2つの仮定しか要らない。

仮定1: 標的遺伝子座以外の部位には、蛍光表現型に寄与するオフターゲット組込みは

10

20

30

40

50

ない。

仮定2：特定の第二の蛍光タンパク質（すなわちRFP）の組込みは、どの蛍光タンパク質が細胞の他方の対立遺伝子に組み込まれたかに依存しない（すなわち、第一の対立遺伝子におけるGFPまたはRFP組込みは、第二の対立遺伝子にRFP組込みを有する可能性が等しく高い）。

【0086】

図26A～Cにおける標識ののち、4つの異なる表現型集団の割合がわかる：

- % GFP⁻RFP⁻
- % GFP⁺RFP⁻
- % GFP⁻RFP⁺
- % GFP⁺RFP⁺

10

【0087】

これらから、ただちに2つの遺伝子型がわかる：

- 1) 遺伝子型A = NA/NA = % GFP⁻RFP⁻
- 2) 遺伝子型E = GFP/RFP = % GFP⁺RFP⁺

【0088】

残る4つの遺伝子型を合わせると、残る2つの単一フルオロ陽性表現型がわかる：

- 3) 遺伝子型B + 遺伝子型D = GFP/NA + GFP/GFP = % GFP⁺RFP⁻
- 4) 遺伝子型C + 遺伝子型F = RFP/NA + RFP/RFP = % GFP⁻RFP⁺

【0089】

また、RFP⁺細胞がGFP⁺でもある確率およびGFP⁺細胞がRFP⁺でもある確率が表現型からわかる：

- 5) RFP⁺であるとしてGFP⁺でもある確率 = $P(\text{GFP} \mid \text{RFP}) = (\% \text{ GFP}^+ \text{RFP}^+) / (\% \text{ RFP}^+ + \% \text{ GFP}^+ \text{RFP}^+)$
- 6) GFP⁺であるとしてRFP⁺でもある確率 = $P(\text{RFP} \mid \text{GFP}) = (\% \text{ GFP}^+ \text{RFP}^+) / (\% \text{ GFP}^+ + \% \text{ GFP}^+ \text{RFP}^+)$

20

【0090】

仮定2にしたがって、細胞がその第二の対立遺伝子においてGFP組込みを受ける確率が、第一の組込みがGFPであったのかRFPであったのかとは無関係であるならば、シングルポジティブ遺伝子型の間の関係を決定することができる（図26）：

- 7) $D = P(\text{GFP} \mid \text{RFP}) * B$
- 8) $F = P(\text{RFP} \mid \text{GFP}) * C$

【0091】

式7および8を式3および4にそれぞれ挿入し、簡約すると、既知の表現型によって残りの遺伝子型を解くことができる。

- 9) $B = \% \text{ GFP}^+ \text{RFP}^- / (1 + (\% \text{ GFP}^+ \text{RFP}^+) / (\% \text{ RFP}^+ + \% \text{ GFP}^+ \text{RFP}^+))$
- 10) $C = \% \text{ GFP}^- \text{RFP}^+ / (1 + (\% \text{ GFP}^+ \text{RFP}^+) / (\% \text{ GFP}^+ + \% \text{ GFP}^+ \text{RFP}^+))$
- 11) $D = \% \text{ GFP}^+ \text{RFP}^- - B$
- 12) $F = \% \text{ GFP}^- \text{RFP}^+ - C$

【0092】

既知の遺伝子型から、単一对立遺伝子または二対立遺伝子挿入を有する細胞の実測%値および他の統計値を容易に計算することができる。

ヘテロ接合細胞の実測%値 = $B + C$
 ホモ接合細胞の実測%値 = $D + E + F$
 少なくとも1つの挿入を有する細胞の実測%値 = $B + C + D + E + F = 1 - A = 1 - \% \text{ GFP}^- \text{RFP}^-$

GFPを有する対立遺伝子の実測%値 = $(B + E + 2D) / 2$

RFPを有する対立遺伝子の実測%値 = $(C + E + 2F) / 2$

挿入を有する対立遺伝子の実測%値 = $\% \text{ 対立遺伝子}_{\text{GFP}} + \% \text{ 対立遺伝子}_{\text{RFP}}$

【0093】

30

40

50

HDR対立遺伝子がランダムに分布している（本質的にハーディー・ワインベルグ平衡）ならば、少なくとも1つの挿入（HDR）を有する細胞の実測%値からホモ接合細胞の期待%値を計算することができる：

p = HDR対立遺伝子（GFPまたはRFP）

q = 非HDR対立遺伝子（NA）

X = 少なくとも1つのHDRを有すると認められた細胞の%

$$13) p + q = 1$$

$$14) p^2 + 2 \cdot p \cdot q + q^2 = 1$$

【0094】

HDR（GFPまたはRFP）対立遺伝子を有する任意の細胞は表現型（この場合、GFP+またはRFP+）を示すため：

$$15) X = p^2 + 2 \cdot p \cdot q$$

【0095】

X を式14に代入し、簡約すると：

$$16) q = (1 - X)^{1/2}$$

$$17) p = 1 - q$$

$$18) p = 1 - (1 - X)^{1/2}$$

p^2 は、HDR鋳型挿入が標的対立遺伝子の間でランダムであるならばHDR組込みの場合にホモ接合性である細胞の期待%値を出す：

$$19) p^2 = 2 - 2(1 - X)^{1/2} - X$$

【0096】

X は既知であるため、ホモ接合細胞の期待%値は、少なくとも1つのHDRを有する細胞の実測合計%値から直接計算することができ、その後、2つの別々のフルオロフォアの組込みによって提供される情報を考慮しながら計算されるホモ接合細胞の実測%値とで比較することができる。

【0097】

自己免疫/免疫調節不全を有する家族の病歴

発端者は白人の乳児であり、15週齢で嘔吐、ぐずりおよび頻呼吸を提したのち、重度の糖尿病性ケトアシドーシスおよび920mg/dLの血清血糖値を明らかにする医学的評価に至った。診断の1週後、GAD65、IA-2およびインスリン自己抗体の検査は陰性であった。しかし、5～7月齢で、3つの異なる検査室における反復抗体検査がIA-2およびインスリン自己抗体に関する陽性結果を示し、それらの検査室の2つで非常に高レベルのGAD65抗体を示したとき [Mayo Laboratoriesで42.8nmol/L (<0.02)、Barbara Davis Centerで896IU/mL (0.0～5.0)]、自己免疫性糖尿病が確認された。甲状腺機能不全およびセリアック病の検査は陰性であったが、少し低いIgA値が部分的なIgA欠乏を示唆した。Cペプチド検査は、7月齢で摂食後90分で計測したときの血清血糖値202mg/dLを含め（その時点ではプロインスリンもまた検出不可能であった）、繰り返し完全に検出不可能であった。初期DKAを静脈内インスリンで治療したのち、まず、退院するとともに皮下インスリン（グラルギンおよびリスプロ）を毎日複数回注射しはじめ、その後、インスリンポンプに移行するとともに継続的なグルコースモニタリングを実施した。乳児は、0.8～0.9単位/kg/日の範囲の高いインスリンの補充量（7月齢で48%基礎）を一貫して必要とした。この乳児は、妊娠37週に反復帝王切開で生まれ、出生時体重は3.629kg（75パーセントイル）であり、合併症はなく、発育進行に関する心配はなく、他の点で特に顕著な病歴はなかった。両親は異なる白人の祖先を有し、近親婚ではなかった。

【0098】

家族構成員の臨床情報が表1に提供されている。さらなる詳細な情報は以下のとおりである：

1. 母親（37）：

a. 子供の頃に肺炎 ウイルス性と説明される

b. 子供の頃に耳の感染症を抗生物質で治療

10

20

30

40

50

- c. 歯の問題（おそらくは抗生物質関連）
- d. 父が30代でインスリン依存性糖尿病を発症した。父はWBCが低く、頭皮に貨幣状湿疹を有していた。
- e. 母がループスであった
2. 父親（44）
- a. モロッコ系
- b. 特に医学的問題なし
- c. 考えられる懸念として、一般的なウイルス感染に対する反応時間が長いかもしれない。
3. 罹患した子供（14）
- a. 免疫性血小板減少性紫斑病：（+抗血小板抗体） 10
- b. 好中球減少症（抗好中球抗体）
- c. 自己免疫性溶血性貧血（DAT+、すなわち直接クームス+）
- d. 頭皮の貨幣状湿疹
- e. 過形成性骨髄：CD4/CD8比が逆転（0.36）。
- f. 口内炎
- g. 耳の感染症をチューブで治療
- h. 子供のころの下痢
- i. 46XX 既知の染色体異常なし
- j. 末梢血のフローサイトメトリー：CD45+細胞の82.7%がCD3+であり、5.9%がCD19+である。CD19+CD5+細胞は欠損B細胞である。CD45+細胞の43.6%がCD8+であり、CD4/CD8比が逆転している（0.6）。TCR(アルファベータ)+CD3+CD4-CD8-Tリンパ球の相対的増加がある（TCRアルファベータ+CD3+細胞26%、CD45+白血球5%）。 20
- k. プレドニゾン（20mg）、IgG-pro-IgA、フロナーゼ鼻スプレーならびに局所ステロイドおよびSymbicortを含む免疫抑制薬で治療されたことがある。また、Neupogenでも治療。
4. 罹患した子供
- a. 3+糖尿病自己抗体（抗GAD、MIAA、ICA、陰性ZnT8およびICA512/IA-2）正常OGTT
- b. 1歳で耳の感染症をチューブで治療
- c. 冬期の湿疹 30
5. 罹患していない娘（15）
- a. アレルギー、それ以外は健康
6. 罹患した息子（4）
- a. 冬期に湿疹
- b. HSV試験で陽性
- c. 生後1年以内にインスリン依存性糖尿病、発症時のCペプチド<0.1、診断後1年で抗GAD抗体+（>30（nl<1U/ml））、ただし診断時は陰性、診断後1年でICA512抗体+（1.3（nl<1.0））、ただし診断時は陰性
7. 罹患していない娘（9）
- a. 喘息 40

【0099】

IL2RA変異を特定するための遺伝子検査

単一遺伝子型の糖尿病に関与することが知られる40を超える遺伝子のインハウス標的化次世代シーケンシングマルチ遺伝子パネルを使用した発端者の初期遺伝子検査は陰性であった。発端者と両親の3人におけるその後のエキソームシーケンシングが、IL2RA遺伝子における原因的な複合ヘテロ接合変異を明らかにした。2人の同腹個体は1つの変異しか有しないが、両方の変異を有する他2人には自己免疫の証拠がある：兄は、高血糖の非存在下で糖尿病自己抗体陽性であることがわかり（4または5歳時）、姉は、11歳で自己免疫介在性汎血球減少症と診断されていた。3人の複合ヘテロ接合子においてCD25発現は顕著に減少していた。

【0100】

IL2RA患者の臨床表現型決定

CD25欠損の子供たちは、T細胞上のIL2-RA細胞表面発現をほぼ完全に失い、したがって、血中に検出可能なCD3+CD4+CD25hiCD127lo Tregを実質的に有しないが、ヘテロ接合IL2RA変異を保有する親族はTreg上のCD25発現の低下を示す(図34)。しかし、CD25欠損対象におけるCD3+CD4+CD127loFOXP3+T細胞の頻度は、HDおよびCD25+/-個体における頻度に類似し、それにより、IL2-Ra機能の非存在下でTregが発生し得ることを示唆する(図34)。本発明者らは、CD25発現なしでTregを単離するための戦略を使用して、CD25欠損対象からのCD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+Treg濃縮細胞が、HD対応物と比べ、レスポンダT細胞(Tresp)の増殖を抑制する能力の欠如を示すことを見いだした(図34)。対照的に、単一のヘテロ接合IL2RA変異を有する親族からのTregは、最適には及ばない能力ではあるが、Tresp増殖を抑制することができた(図34)。したがって、これらの患者からのFOXP3+T細胞の表面上の機能的IL2-Ra発現を修正することは、エクスピボ遺伝子治療を開発するための貴重な手法となり得る。

10

【0101】

結果

ヒトT細胞を血液から精製し、エクスピボで操作し、次いで自家移植によって血液循環に戻すことができる。癌および感染症を治療するために操作されたT細胞が開発されている(Fesnak et al. "Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy," Nat. Rev. Cancer 16, 566-581 (2016); およびEsensten et al. "Engineering Therapeutic T Cells: From Synthetic Biology to Clinical Trials," Annu. Rev. Pathol. 12, 305-330 (2017))。

20

【0102】

これらの細胞ベースの治療は、たとえば特定の抗原を認識し、攻撃する能力を高めるために、T細胞を遺伝的に再プログラムする能力に依存する(Roybal et al. "Synthetic Immunology: Hacking Immune Cells to Expand Their Therapeutic Capabilities," Annu. Rev. Immunol. 35, 229-253 (2017))。自己免疫疾患および臓器移植のために、炎症を抑制するようにデザインされた改変制御性T細胞(Treg)を含む細胞ベースの治療法が開発されている(Bluestone et al. "Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells," Sci. Transl. Med. 7, 315ra189 (2015))。

30

【0103】

初代ヒトT細胞のゲノムを改変するために様々な手法が使用されてきた。レンチウイルスベクターを使用して長いDNA配列(複数キロベース)を挿入することができるが、組み込み部位は非標的化部位である(Verhoeyen et al. in Methods in Molecular Biology (2009), pp. 97-114)。レンチウイルスは、キメラ抗原受容体(CAR)などの遺伝子構築物を導入するための主要な手段であった(Kalos et al., "T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia" Sci. Transl. Med. 3, 95ra73 (2011))。特定の内因性遺伝子をノックアウトするために、Cas9、TALENまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)などの配列特異的ヌクレアーゼをT細胞中にエレクトロポレーションして(Schumann et al., "Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins," Proceedings of the National Academy of Sciences. 112, 10437-10442 (2015); およびPerez et al. "Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases," Nat. Biotechnol. 26, 808-816 (2008))、非相同末端結合(NHEJ)を通して非ランダムな一連の挿入および欠失変異を生じさせる二本鎖切断を生成することができる(van Overbeek et al., "DNA Repair Profiling Reveals Nonrandom Outcomes at Cas9-Mediated Breaks," Mol. Cell. 63, 633-646 (2016))。特定のヌクレアーゼ切断部位の両側にある配列と相同性を有する小さな(<200bp)化学合成されたssDNAオリゴ(ssODN)の同時送達、相同組換え修復によって短いDNA配列を改変するために使用されている(Schumann et al.

40

50

(2015))。

【0104】

はるかに長いDNA配列の標的化組込みがより多様な用途を可能にするであろう。これは最近、配列特異的ヌクレアーゼの電ポレーションののち、HDR鑄型を含むインテグラゼ欠損型アデノ随伴ベクター (AAV) の感染によって達成された (Sather et al., "Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAV donor template," *Sci. Transl. Med.* 7, 307ra156 (2015)); およびHubbard et al. "Targeted gene editing restores regulated CD40L function in X-linked hyper-IgM syndrome." *Blood* 127, 2513-2522 (2016))。この電ポレーション・感染手法は、新規な治療用T細胞操作戦略を可能にしたが (Eyquem et al., "Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection," *Nature* 543, 113-117 (2017))、オフターゲット組込みを生じさせ、潜在的に望ましくないウイルス感染を必要とし、ウイルス作製における難題のせいでスループットが限られる。

10

【0105】

高効率の非ウイルスゲノム標的化の方法を開発するために、細胞培養条件、Cas9 RNP およびHDR鑄型の濃度ならびに電ポレーションパラメータを試験した。細胞生存率への影響を抑えつつ、高濃度のCas9 RNPおよび長いDNA鑄型 (>1Kb) を初代ヒトT細胞中の複数の遺伝子座の中に同時送達することができる条件を特定した。

【0106】

20

非ウイルス標的化を使用して、Treg機能不全および一遺伝子性自己免疫疾患を生じさせる病原性変異を修正することができる。本明細書には、2人の子供が早期発症型自己免疫疾患を発症し、3人目が1型糖尿病 (T1D) の非常に高いリスクを示唆する自己抗体を有し、エキソームシーケンシングを通してIL2RAにおける原因的機能喪失型変異が特定された家族を記載する。IL2RAは、制御性T細胞機能および免疫恒常性にとって極めて重要である。本明細書に提供される非ウイルスCRISPRゲノム標的化法により、IL2RAの細胞表面発現を機能的な下流シグナル伝達とともに回復させる効率的な変異修正が達成された。初代ヒト免疫細胞における非ウイルスゲノム標的化は、患者からの細胞中の変異の機能的な研究および修正を可能にする。改善された遺伝子標的化 (非ウイルス鑄型、高い効率および特異性ならびに長い標的化構築物) と組み合わせられた細胞療法は、自己免疫疾患ならびに免疫不全症、感染症、臓器移植および癌免疫療法の治療に大きな期待を抱かせる。

30

【0107】

非ウイルスヒトT細胞ゲノム標的化の開発

ヒトT細胞におけるゲノム標的化の主な制限は、DNA送達細胞死を招くことであった (Cornu et al., "Refining strategies to translate genome editing to the clinic," *Nat. Med.* 23, 415-423 (2017))。短い一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) HDR鑄型の導入はT細胞の生存率の有意な損失を生じさせなかったが、より大きな直鎖状dsDNA鑄型は広範な毒性をもたらした (Y. Zhao et al., "High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using RNA Electroporation," *Mol. Ther.* 13, 151-159 (2006); およびHornung et al. "Intracellular DNA recognition," *Immunity* 110, 123-130 (2010))。

40

【0108】

本明細書に示すように、長い (>1kb) 直鎖状dsDNA鑄型は、CRISPR-Cas9リボ核タンパク質 (Cas9 RNP) と同時電ポレーションされたとき、より低い毒性を示した (図10)。これは、Cas9 RNPと長いdsDNAとの適切な混合物の同時送達が、HDRを可能にし、細胞生存率を保持するということを示唆した。

【0109】

初代ヒトT細胞において非ウイルスゲノム標的化を最適化した。標的組込みの効率、細胞生存率および組込み陽性細胞の総数に関してプロトコルを調節した (図11Aおよび12)。Cas9 RNPを、ハウスキーピング遺伝子RAB11AにN末端GFP融合物を導入するように

50

デザインされたdsDNA HDR鋳型とともにエレクトロポレーションした(図11B)。エレクトロポレーションの3~5日後に実施された高スループットフローサイトメトリーを使用して組込みおよび細胞生存率をモニタした。まず、エレクトロポレーションの前後で遺伝子標的化の割合を著しく高めた刺激およびサイトカイン治療を特定した(図11Cならびに図13および14)。これらの条件は、多様な供給源から単離された新鮮または凍結初代T細胞における効率的な標的化を可能にした(図15)。Cas9 RNPとHDR鋳型との様々な濃度比を、これらの十分に刺激されたT細胞中の様々な量で試験し(図11Dおよび図16)、効率的な遺伝子標的化を可能にする適切な濃度を特定した。最後に、高レベルの細胞生存率を保持しながらも遺伝子標的化を最大化するためのエレクトロポレーション条件(図11Eおよび図17)を試験した。非ウイルス遺伝子標的化は、初代ヒトCD4+およびCD8+T細胞の両方における細胞の50%超において内因性RAB11Aハウスキーピング遺伝子へのGFP融合物の導入を達成することができた(図11F)。

【0110】

高速コンビナトリアル遺伝子標的化用途

本明細書に提供される方法の、ゲノム部位およびヒト血液ドナーにわたる非ウイルス遺伝子標的化用途の簡単さおよび速度(図18および図12)。相同フランキング配列を有するGFP融合物をコードする構築物をゲノムの隅々の多様な部位に効率的かつ再現可能に標的化した(図18Aおよび図19)。これらの標的化GFP融合物が多様な細胞下構造を標識した(Leonetti et al. "A scalable strategy for high-throughput GFP tagging of endogenous human proteins," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 113, E3501-8 (2016))。共焦点顕微鏡検査が、多様な遺伝子を標的化することによって作製される融合タンパク質の特異性を確認し、また、GFPによって内因性遺伝子を標的化することが、生きたヒトT細胞中のタンパク質局在化の画像化を可能にするということを実証した(図18B)。多数の健康人ドナーのコホートからの細胞において、多様な遺伝子への標的化GFPの組込みが、初代ヒトT細胞において再現性が高いことを証明した(図19および20)。さらに、内因的にコードされたCD4表面受容体をGFPでタグ化することにより、標的化された組込みの特異性およびタグ化された遺伝子の細胞型特異的発現パターンを確認した。特にタグ化されたCD4+T細胞においてはCD4とGFP発現との間に直線関係が認められたが、CD8+T細胞(図18C)においては認められなかった。総合すると、これらの発見は、非ウイルスゲノム標的化を使用して、ゲノム中の標的化部位に大きなDNA配列を挿入することにより、内因性遺伝子を改変することができることを立証する。

【0111】

融合タグは、内因性タンパク質の画像化を可能にただけでなく、特定のタンパク質の生化学的標的化にも使用することができた。たとえば、ChIP-Seqおよびより最近ではCUT&RUN(Skene and Henikoff, "An efficient targeted nuclease strategy for high resolution mapping of DNA binding sites," Elife 6(2017), doi: 0.7554/eLife.21856.)が、転写因子結合部位をマッピングするために広く使用されている。しかし、これらのアッセイは、多くの場合、有効かつ特異的な抗体の利用可能性によって制限される。原理証明として、BATF(極めて重要なTF)をコードする内因性遺伝子がGFP融合物を生成するように標的化されている初代T細胞において、抗GFP抗体を使用してCUT&RUNを実施した。抗GFP CUT&RUNで特定された結合部位は、抗BATF抗体で特定された部位と密接にマッチした(図18Dおよび図21)。

【0112】

同じ遺伝子の2つの対立遺伝子を2つの異なるフルオロフォアで標的化すると、二対立遺伝子改変を有する細胞を定量化し、濃縮する方法を提供することになるであろう。RAB11A遺伝子の同じ部位を標的化する2つの異なる蛍光タンパク質(図22Aおよび図23)を導入すると、細胞の>5%が二対立遺伝子組込みに成功したことが示された。重要なことに、一部の細胞は両方の対立遺伝子上でGFPまたはmCherryのいずれかを受けたであろうため、両方の蛍光タンパク質を発現する細胞の数は、二対立遺伝子組込みを有する細胞の割合を実際よりも小さく見積もっている。同じ蛍光タンパク質のホモ接合組込みを考慮する

10

20

30

40

50

ためのモデルを構築した（図22B、図23）。このモデルは、約10%までの細胞においてRAB11A遺伝子中に二対立遺伝子組込みがあったと推定する。これは、1つのRAB11A組込みを有する細胞が第二の標的化組込みも受けた可能性がより高いことを示唆し、この効果は3つのゲノム遺伝子座にかけて認められた（図23）。RAB11A遺伝子座を標的化する3つの蛍光タグの同時送達、これらの実験におけるオフターゲット組込みの低い割合と合致するように、3つのフルオロフォアすべてを発現する細胞の非常に低い割合を実証した（図23G）。要約すると、同じ遺伝子座を標的化するために複数の非ウイルス構築物を使用すると、ヒトT細胞中の二対立遺伝子ゲノム編集の特定が可能である。

【0113】

ゲノム部位のコンビナトリアルセットの多重編集は、拡大した研究および治療用途を提供するであろう。複数の非ウイルスHDR鋳型を複数のRNPと同時送達すると、1つよりも多い改変された遺伝子座を有する初代細胞を生成することができるかどうかを試験した。多重化遺伝子標的化が可能であるだけでなく（図22C）、1つの改変を有する細胞をゲーティングすることによって2つの改変を有する細胞が濃縮されるということがわかった（図22Dおよび図24）（Agudelo et al., "Marker-free coselection for CRISPR-driven genome editing in human cells," *Nat. Methods*. 14, 615-620 (2017)）。また、三重遺伝子標的化が達成され、2つの標的化挿入を有する細胞をゲーティングすることにより、第三の改変を有する細胞を有意に濃縮することができた（図22Eおよび図24）。全体として、非ウイルス遺伝子標的化を使用して、多様な研究および治療用途に使用することができる初代T細胞の複雑な遺伝子改変を可能にすることができる。

【0114】

D10AニッカーゼおよびssDNA HDR鋳型がオフターゲット組込みを減らす

特に治療用途の場合、HDR鋳型を使用する主な懸念の1つがオフターゲット組込みの可能性である。これは、インテグラーゼ欠損型AAVがドナー鋳型として使用された場合にも認められている（Dever et al., "CRISPR/Cas9 γ -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells," *Nature* 539, 384-389 (2016)）。非ウイルス遺伝子標的化のために直鎖状dsDNA鋳型を使用する機能的オフターゲット組込みの同様の証拠がここで見いだされた。二本鎖DNA鋳型は、自然発生的dsDNA切断の部位（Murnane et al. "Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells," *Nucleic Acids Res.* 18, 2733-2738 (1990)）ならびにCas9などの標的化ヌクレアーゼによって誘導される特定のdsDNA切断部にHDR非依存的やり方で組み込むことができる（相同非依存性標的化組込みと呼ばれる効果）（Auer et al. "Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair," *Genome Res.* 24, 142-153 (2014)；およびSuzuki et al. "In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration," *Nature* 540, 144-149 (2016)）。内因性RAB11Aプロモータ配列をその5'相同アーム内に含むN末端GFP-RAB11A融合構築物を使用する、意図されない非相同組込みを探した。この構築物は、オフターゲット組込み部位でGFP発現を駆動することができる（図25Aおよび図26）。機能的オフターゲット組込みが、異なる生物学的ドナーからの細胞中に存在し（図25B）、様々な標的配列およびHDR鋳型を用いる実験において見られるということがわかった（図26および27）。治療用途向けの細胞においては、組み込まれた配列が正しい内因性制御下にとどまること、およびオフターゲット部位が破壊されないことを保証するため、オフターゲット組込みは最小限にされなければならない。

【0115】

オフターゲットCas9切断によって生じるオフターゲット組込みを減らすために、D10A Cas9ニッカーゼ変異体を使用して非ウイルス遺伝子標的化を実施した。この変異体は、2つのgRNAが結合し、近接状態で切れて二本鎖切断を形成し、それによってオフターゲットdsDNA切断の数を減らすことを必要とする（Miyaoka et al., "Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing," *Sci. Rep.* 6 (2016), doi:10.1038/srep23549；Vriend et al., "Di

stinct genetic control of homologous recombination repair of Cas9-induced double-strand breaks, nicks and paired nicks, "Nucleic Acids Res. 44, 5204-5217 (2016); およびBothmer et al., "Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus," Nat. Commun. 8, 13905 (2017))。一連のgRNAの組み合わせをGFP組込みのためのRAB11A遺伝子座において試験すると、D10Aニッカーゼ使用をしたとき(図28)、GFPの効率的な導入を示す一組の「PAM-Out」ガイドが見いだされた。予想どおり、D10Aを単一のオフターゲットガイドとともに使用すると、ヌクレアーゼ不適格dCas9を使用した場合(図25C)に見られるレベルに等しい、Cas9と比較して顕著に減少した機能的オフターゲット組込みが示された。

10

【0116】

D10Aニッカーゼを使用した場合でも、dsDNA HDR鑄型は依然として、おそらく自然発生的dsDNA切断部で、まれではあるが観測可能なオフターゲット組込み(Cas9ヌクレアーゼなしで認められる割合に匹敵しうる)を生じさせた(図25AおよびC)。dsDNA HDR鑄型を、二本鎖切断部で非特異的に組み込むことができない長いssDNA HDR鑄型で置換することにより、残りのオフターゲット組込みを排除することができると推論した(Quadros et al., "Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins," Genome Biol. 18, 92 (2017); およびLeonetti et al. <http://www.biorxiv.org/content/early/2017/08/21/178905>)。

20

【0117】

この仮説を検証するため、エレクトロポレーションに必要な多量の長いssDNAを作製する2つの方法によってssDNA HDR鑄型を作製した(図35)。ssDNA HDR鑄型は、効率的なオンターゲット組込みを維持しながらも、機能的オフターゲット組込みを約100倍減らした(図25D)。ssDNA鑄型とともにD10A Cas9ニッカーゼを使用することが可能であった。これらの実験において、オンターゲット組込み率は低下したが、非特異的組込みは、鑄型なしで見られるバックグラウンドレベルまで減少した(図25EおよびF)。潜在的なオフターゲット活性が懸念される部位の場合、D10A Cas9ニッカーゼおよびssDNA HDR鑄型を用いて、オフターゲット誘導二本鎖切断および自然発生的切断からそれぞれ生じる組込みの割合を減らすことができ、この方法を、患者T細胞の治療的改変にとって魅力的な方法にし得る。

30

【0118】

非ウイルス遺伝子標的化による治療的変異修正

患者からのT細胞中で単一遺伝子性免疫調節不全を生じさせる変異を修正するための非ウイルス遺伝子標的化の適用を探索した。CD25とも知られるIL-2アルファ受容体(IL2RA)をコードする遺伝子中の劣性機能喪失型変異によって生じる自己免疫疾患を有する単一遺伝子性原発性免疫調節不全を有する家族を特定した(Sharfe et al. "Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 3168-3171 (1997); Caudy et al. "CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes," J. Allergy Clin. Immunol. 119, 482-487 (2007); およびGoudy et al., "Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity," Clin. Immunol. 146, 248-261 (2013))。IL2RAは、Tregおよび免疫恒常性に不可欠であり(Sakaguchi et al. "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases," J. Immunol. 155, 1151-1164 (1995); およびRudensky et al. "Regulatory T cells and Foxp3," Immunol. Rev. 241, 260-268 (2011))、2つの機能喪失型変異を有する複合ヘテロ接合体である家族の子供は多面発現性の自己免疫症状発現を

40

50

示す（表1）。1人は新生児発症1型糖尿病（T1D）を病み、もう1人は小児期に難治性の自己免疫性血球減少症を発症した。3人のIL2RA欠損家族構成員すべてが病的な血清自己抗体を示した。IL2RA欠損の子供たちは、IL2RA細胞表面発現をほぼ完全に失い、したがって、血中にCD3+CD4+CD25hiCD127lo Tregは実質的に検出されないが、ヘテロ接合IL2RA変異を有する親族はTreg上のIL2RA発現の低下を示す（図30）。しかし、IL2RA欠損対象におけるCD3+CD4+CD127loFOXP3+T細胞の頻度は、健康人ドナー（HD）およびヘテロ接合性家族構成員における頻度と類似し、Treg様細胞はIL2RA変異にかかわらず発生し、持続することを示唆する。CD25発現なしでTregを単離する戦略を使用して、CD25欠損対象からのCD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+Treg濃縮細胞が、HD対応物と比べ、レスポングT細胞（Tresp）の増殖を抑制する能力の欠如を示すということがわかった（図29）。対照的に、単一のヘテロ接合性IL2RA変異を有する親族からのTregは、最適には及ばない能力ではあるが、Tresp増殖を抑制することができた（図29）。したがって、これらの患者からのFOXP3+T細胞の表面上の機能的IL2RA発現を修正することが、エクスピボ遺伝子治療を開発するための貴重な手法となり得る。

【0119】

【表1】

患者	性別	IL2RA 変異状態	自己免疫 疾患表現型	病歴	自己抗体
c.530A>G (母親)	F	c.530A>G / WT	なし	幼児耳感染症	なし
c.800delA (父親)	M	c.800delA / WT	なし	問題なし	なし
c.800delA (母親)	F	c.800delA / WT	なし	アレルギー	なし
c.800delA (父親)	F	c.800delA / WT	なし	問題なし	なし
Comp Het 1	M	c.530A>G / c.800delA	1型糖尿病	生後1年目にインスリン 依存性糖尿病	抗GAD,ICA512
Comp Het 2	M	c.530A>G / c.800delA	糖尿病自己抗体	耳の感染症；湿疹	抗GAD,ICA512,ICA
Comp Het 3	F	c.530A>G / c.800delA	免疫性血小板減少性 紫斑病；自己免疫性 好中球減少症	耳の感染症；溶血性貧血； 貨幣状湿疹；過形成性骨髄 (CD4/CD8比が逆転)；口内炎	抗血小板

【0120】

全エキソームシーケンシングが、IL2RA欠損の子供がIL2RA中に複合ヘテロ接合変異を抱えていることを明らかにした（図30Aおよび図31）。c.530A>Gにおける1つの変異が未熟な終止コドンを作成する。細胞培養およびエレクトロポレーションの方法論の改善が、約120bpの化学合成されたssDNA HDR鋳型を使用して変異を効率的に修正することを可能にした（図32）。より長いdsDNA鋳型を使用すると、割合はさらに高くなった（図30Bならびに図32および33）。修正された患者由来のT細胞はその表面にIL2RAを発現した。修正は3人の同腹個体すべてにおいて成功したが、複合het 3において低いIL2RA発現率が見られ、それは、その患者の疾患と関連する変化した細胞状態またはその患者が免疫抑制薬で治療された唯一の同腹個体であったという事実によるといえる（表1および図34）。第二の変異c.800delAは、最終IL2RAエキソンのリーディングフレーム中にフレームシフトを生じさせて、最終エキソンにコードされた遺伝子の一部分の誤読および正常な終止コドンを過ぎるランオン翻訳を生じさせる。このフレームシフトは、HDR鋳型なしでも改善することができる（図33）。この部位において、Cas9 RNPのみによって生じるゲノム切断は、おそらくは挿入／欠失変異によって正しいフレームを復元することによってIL2RAの生産的な細胞表面発現を生じさせるのに十分であった（図33）。まとめると、これらのデータは、HDR鋳型依存性および非HDR鋳型依存性の修復機構を用いて患者T細胞中の異なる変異をどのように修正できるかを示す。

【0121】

単一遺伝子性Treg欠損を有するこの家族の患者のための1つの考えられる治療戦略は、エクスピボT細胞遺伝子修正およびそれに続く修正自家Tregの輸注であろう。標的化された修正によって作製されたTreg細胞は、造血幹細胞移植の潜在的なリスクのいくらかを抑制することができるであろう。IL2RA変異の1つを修正することが生産的なシグナル伝達につながるかどうか、また、FOXP3+Tregの有意な部分において修正が発生するかどうか

を試験した。c.530A>G変異の修正ののち、細胞は、高親和性IL-2受容体であるIL2RAを通して機能的にシグナル伝達することができた。IL-2治療に応答して、改変された細胞は、生産的なシグナル伝達の証であるSTAT5リン酸化の増加を示した（図31Cならびに図33および34）。加えて、フローサイトメトリーが、IL2RA補正細胞の一部が、Tregの決定的な転写因子であるFOXP3を発現することを確認した（図30Dならびに図32および33）。

【0122】

IL2RAをコードする内因性遺伝子は、スーパーエンハンサーを構成する複数のシス調節エレメントによる厳密な制御下にある（Farh et al., "Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants," *Nature* 518, 337-343 (2015) ; およびSimeonov et al. "Discovery of Stimulation-Responsive Immune Enhancers with Unbiased CRISPR Activation," *Nature* 549 (7670): 111-115 (2017)）。したがって、IL2RAの治療的修正は、その内因性ゲノム遺伝子座中の遺伝子の特異的修復に依存する可能性が高い。Cas9およびdsDNAを用いるGFP挿入が、dsDNAの非特異的組込みの可能性があることを示したと仮定して、本発明者らは、D10A Cas9ニッカーゼおよび長いssDNA鋳型を使用してc.530A>G患者変異を特異的に修復した。これらの試薬を使用すると、患者からのT細胞の約20%において変異体遺伝子の特異的かつ選択的に修正することができた（図30E）。

【0123】

非ウイルス遺伝子標的化は、初代ヒトT細胞のゲノム全体を通しての画定された配列の効率的な挿入を可能にする。これらの挿入は、単一塩基対変異の導入または修正から、内因性遺伝子座における大きな機能的配列およびタグの組込みにまで及ぶことができ、ゲノム全体を通しての多重化組込みが可能である。操作されたT細胞の治療用途の場合、D10A Cas9ニッカーゼおよびssDNA HDR鋳型を使用することにより、オフターゲット組込みを有意に減らすことができる。本明細書に提供される方法および結果は、操作されたT細胞療法の開発の加速および遺伝性疾患の治療を可能にする。

10

20

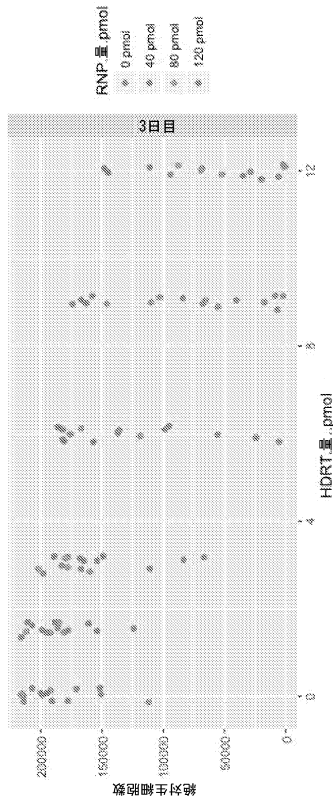
30

40

50

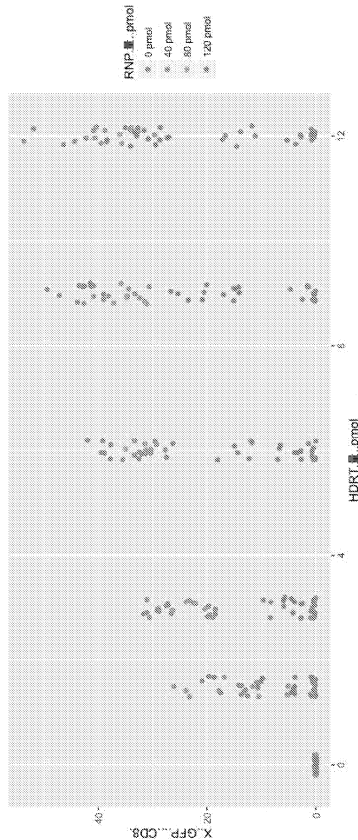
RNP + dsDNA が細胞生存率をレスキューする

【図 3】



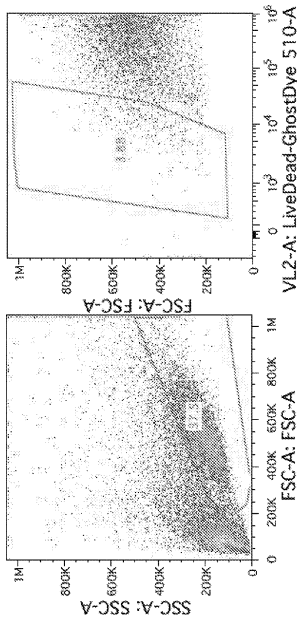
Cas9とDNA鋸型との比

【図 4】

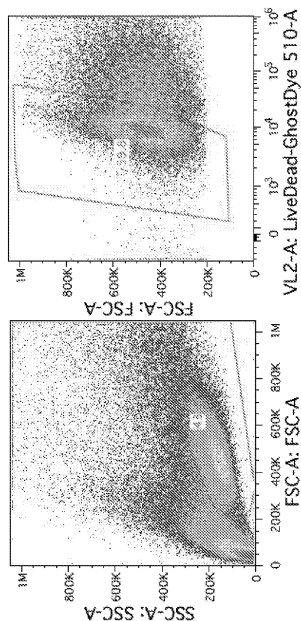


プラスミドのみ

【図 1】

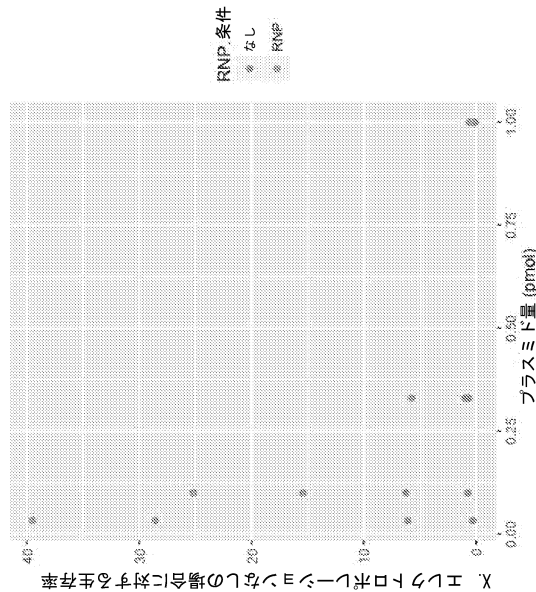


プラスミド + RNP



RNP + プラスミドが細胞生存率をレスキューする

【図 2】



50

40

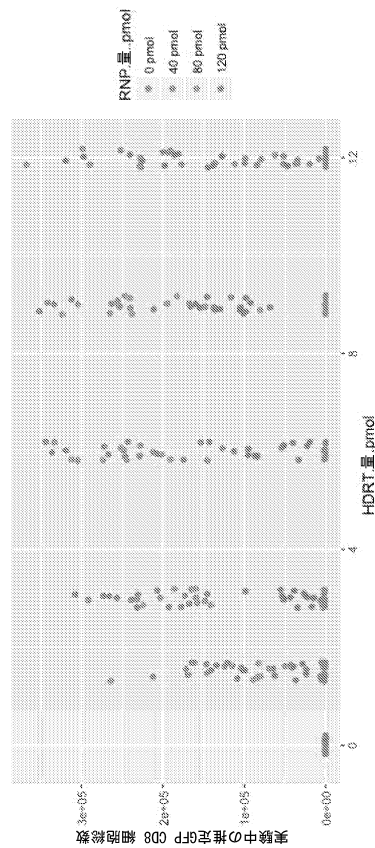
30

20

10

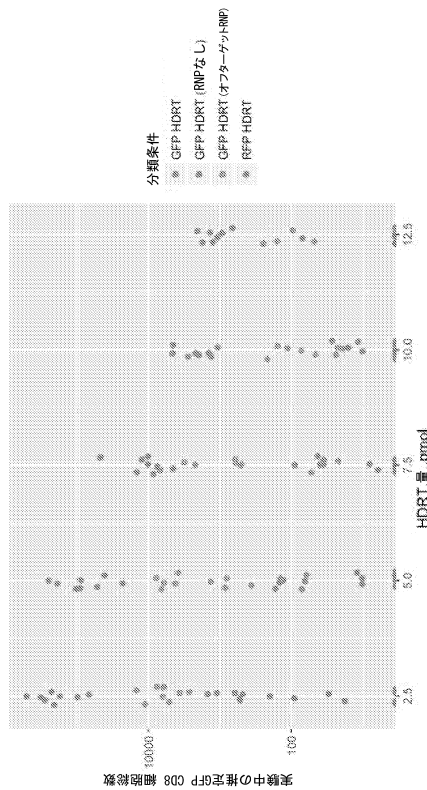
モル比が生存率損失と効率のバランスをとる

【図 5】



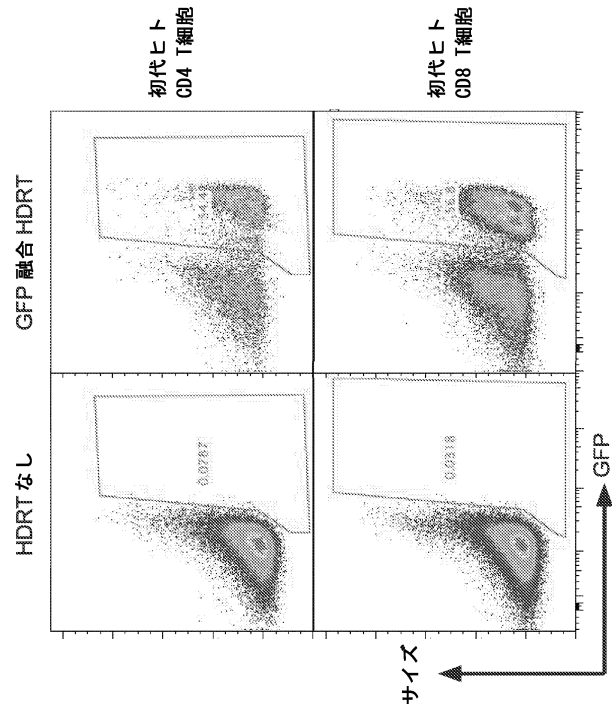
【図 7】

しかし、dsDNA鑄型が少量のオフターゲット組込みを生じさせる

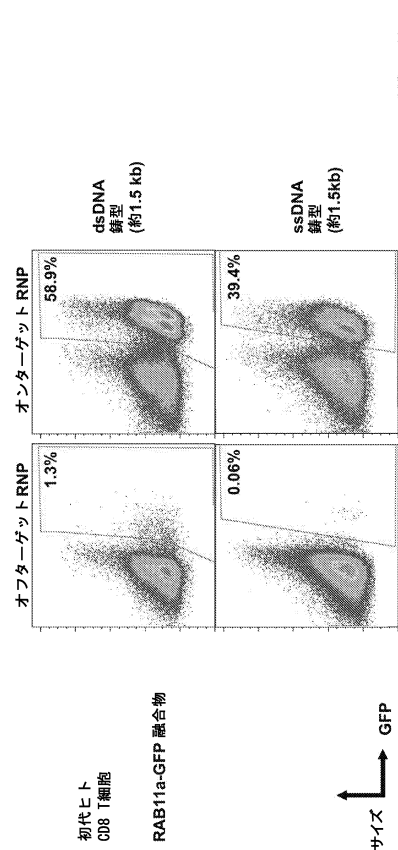


長いssDNAを使用するオフターゲット組込みの減少

【図 6】

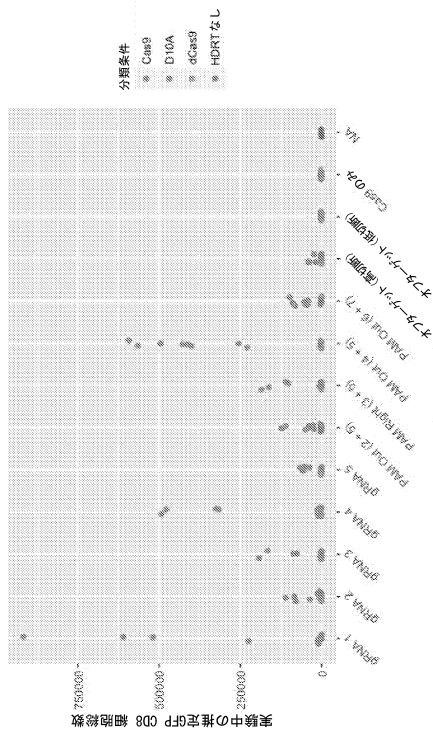


【図 8】

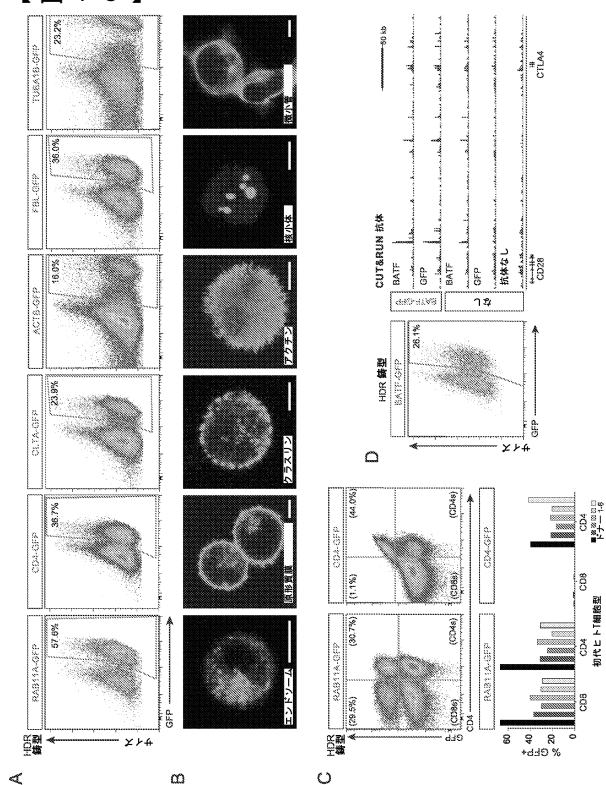
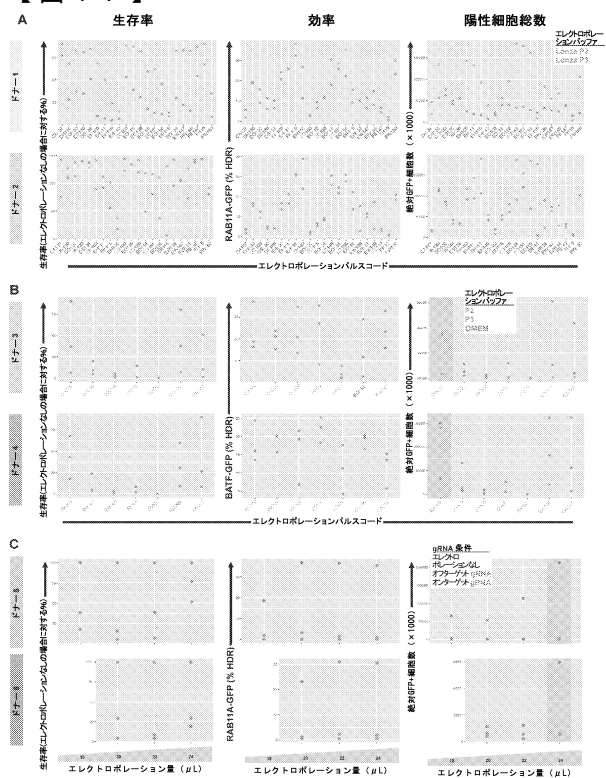


【図 9】

Cas9ニッカーがオフターゲットds切断を防ぎ、
なおも高効率挿入を可能にする



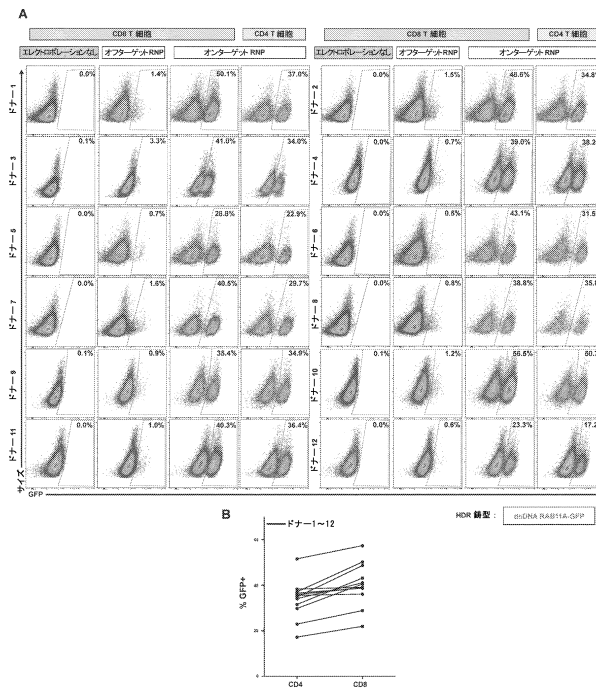
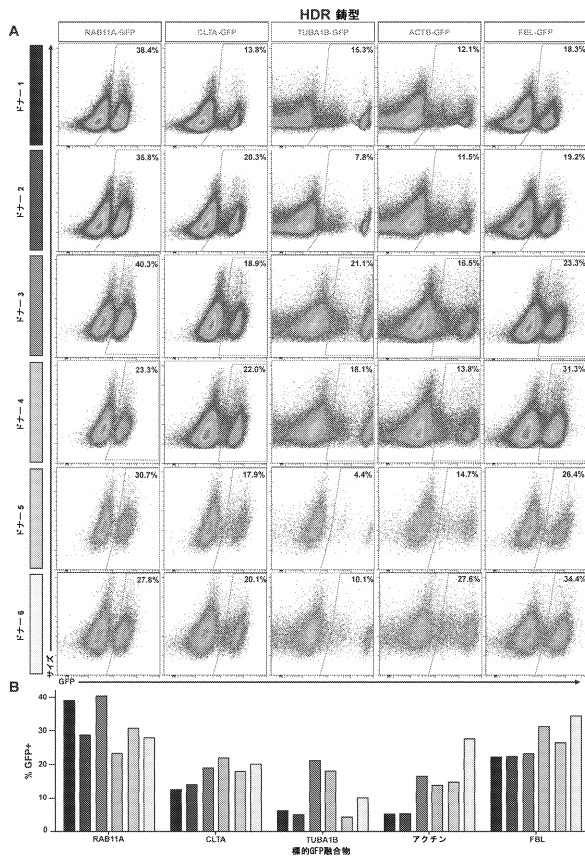
【 図 1 8 】



10

20

【 図 2 0 】

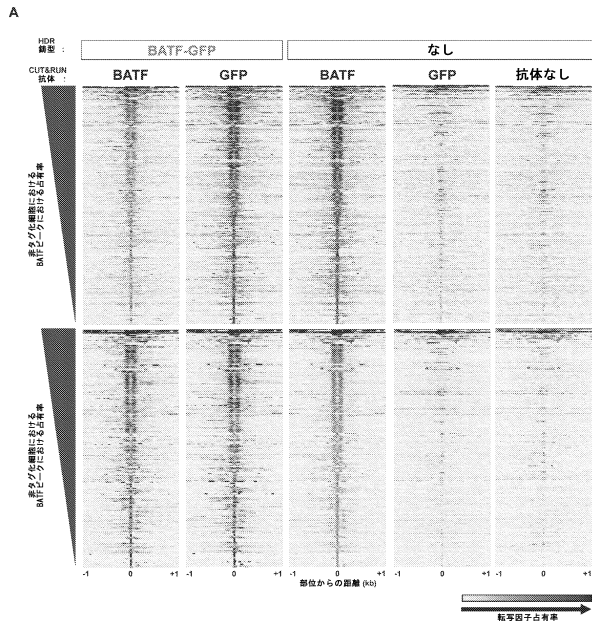


30

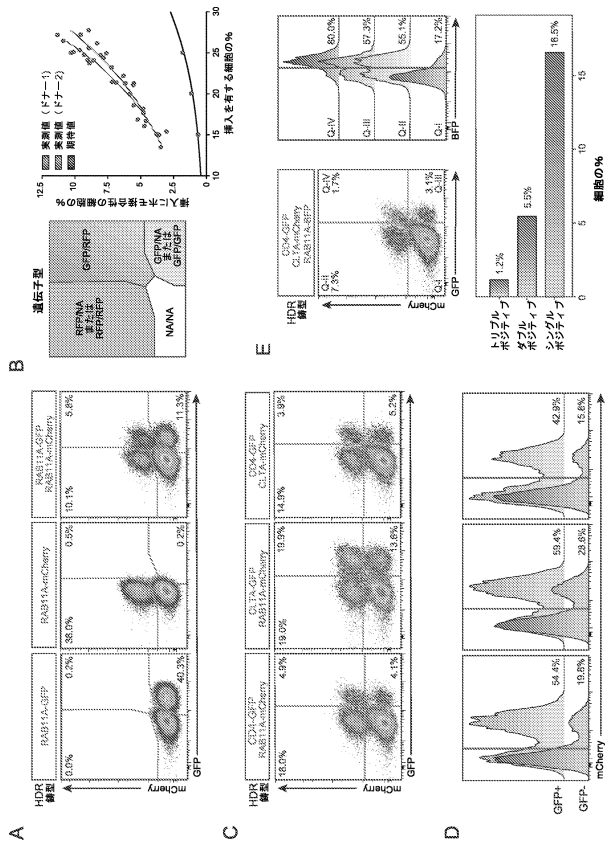
40

50

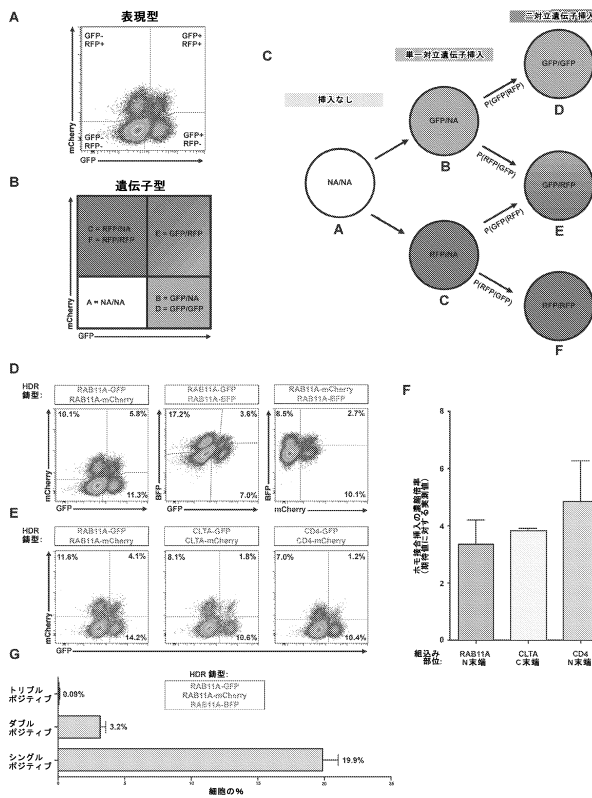
【 図 2 1 】



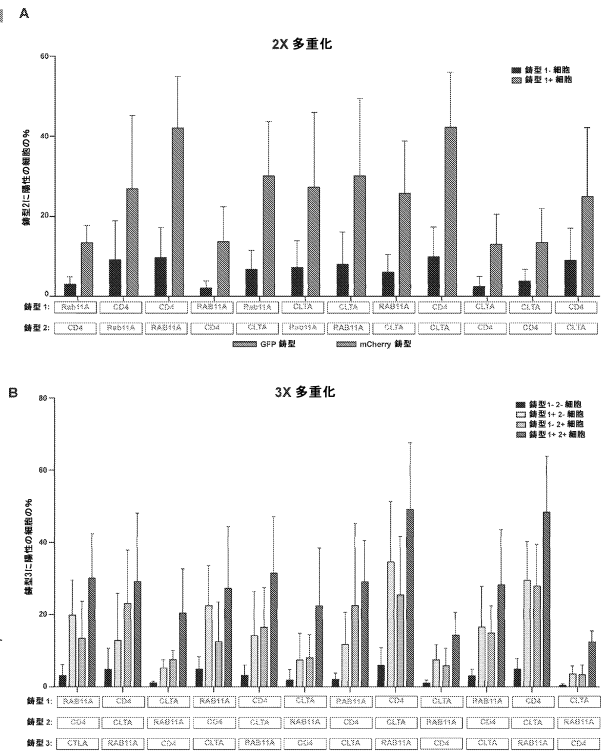
【 図 2 2 】



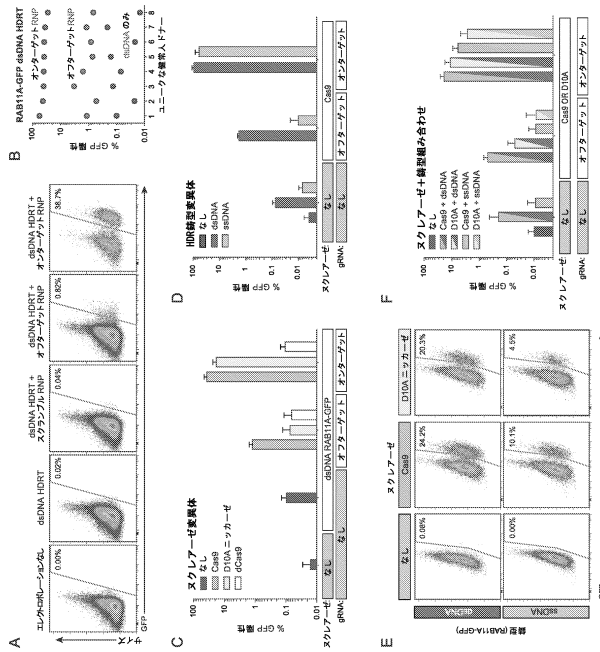
【 図 2 3 】



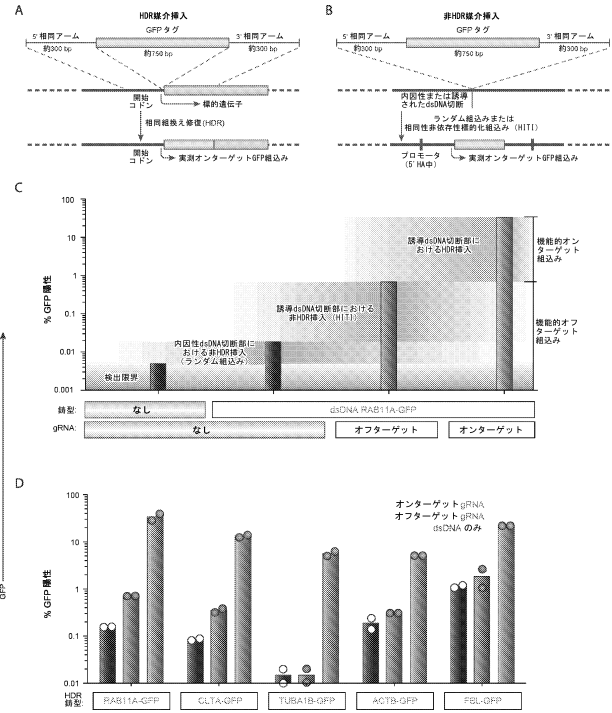
【 図 2 4 】



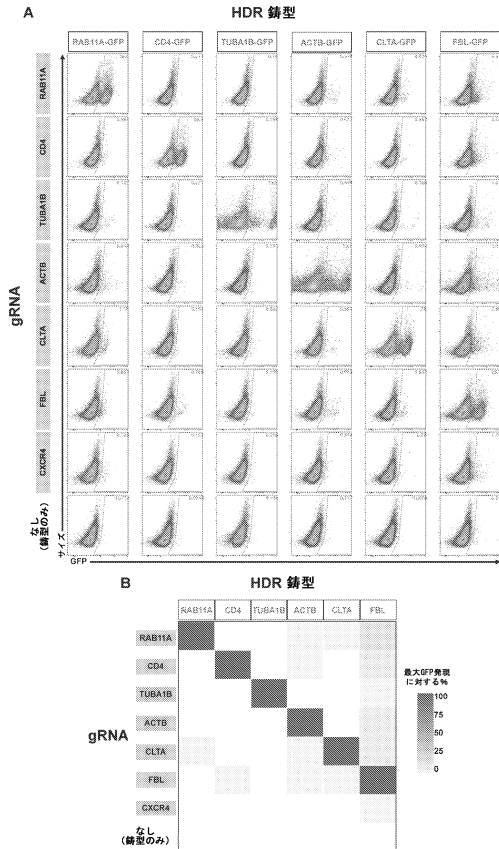
【図 25】



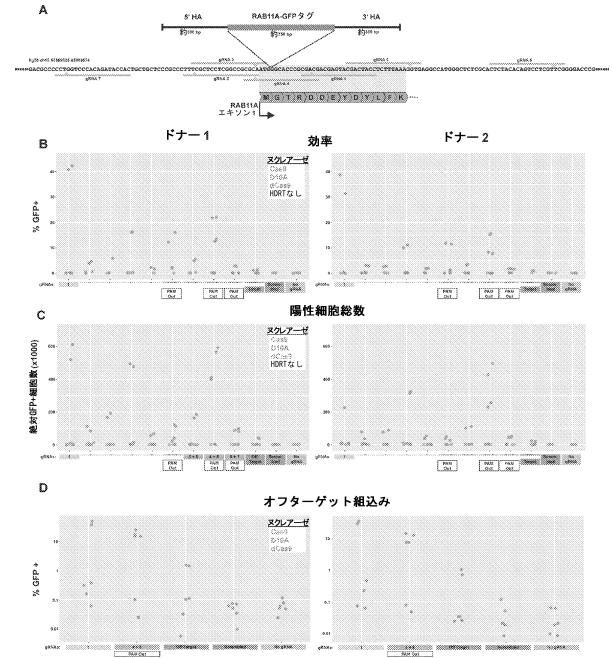
【図 26】



【図 27】



【図 28】



10

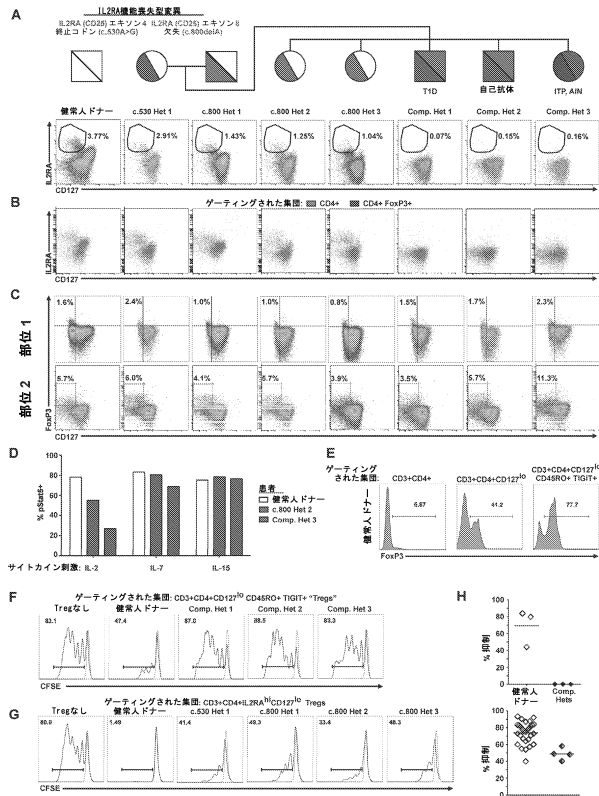
20

30

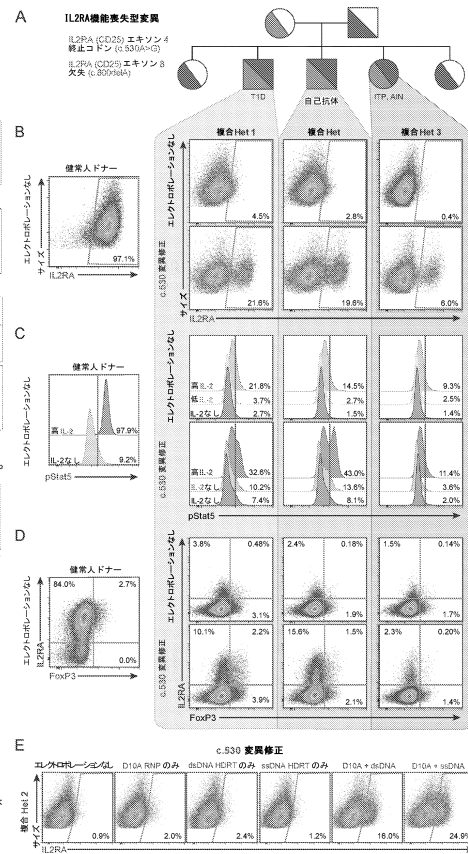
40

50

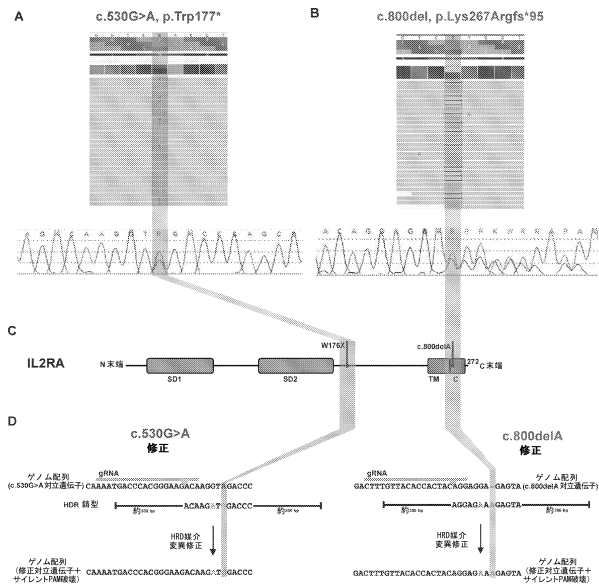
【図 29】



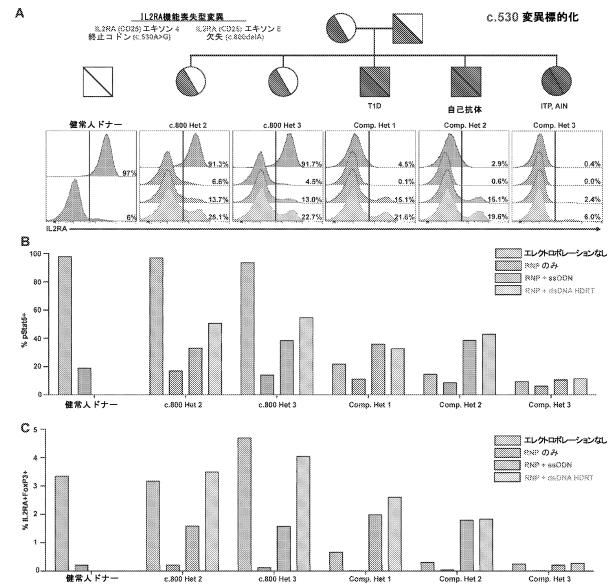
【図 30】



【図 31】



【図 32】



10

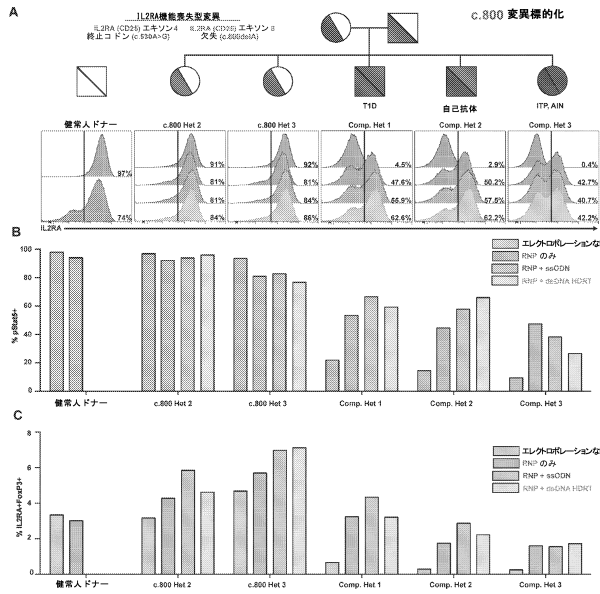
20

30

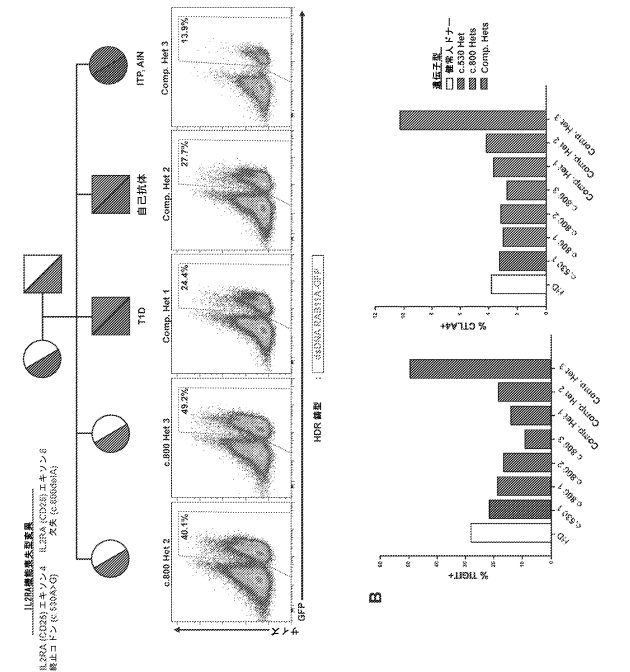
40

50

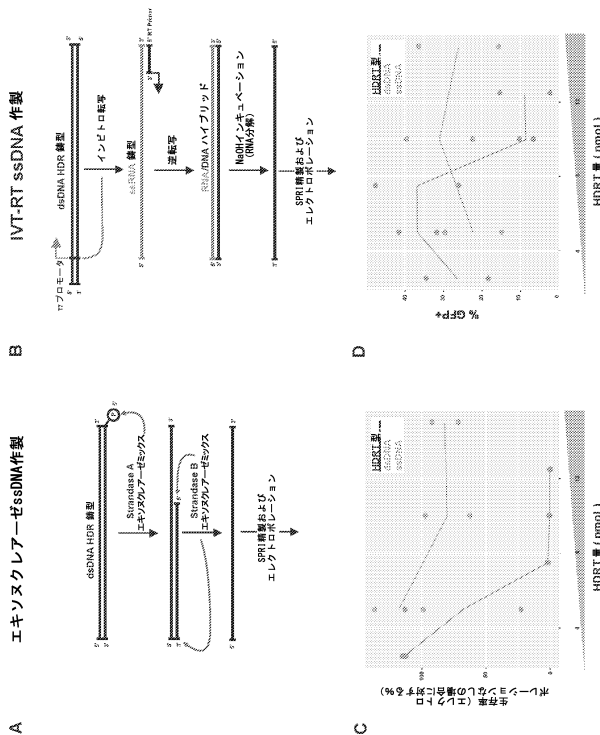
【図 3 3】



【図 3 4】



【図 3 5】



【配列表】

0007275054000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(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 ロス セオドア リー

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 6 0 7 - 5 2 0 0 オークランド フランクリン ストリート 1 1 1 1 トウエルフス フロア ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア内

(72)発明者 マーソン アレクサンダー

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 6 0 7 - 5 2 0 0 オークランド フランクリン ストリート 1 1 1 1 トウエルフス フロア ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア内

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 2 0 5 6 8 0 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 2 3 5 7 8 (W O , A 1)

J.Biotechnol.(2016.11)Vol.241, p.136-146

Nature, 2018年07月11日, Vol.559, p.405-409

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

C 0 7 K

C 1 2 Q

MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / CAPLUS / REGISTRY (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)