

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-531217
(P2024-531217A)

(43)公表日 令和6年8月29日(2024.8.29)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/10	2 0 0 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55		
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	
C 1 2 N	1/11 (2006.01)	C 1 2 N	1/11		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全89頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-508545(P2024-508545)	(71)出願人	521476126		
(86)(22)出願日	令和4年8月12日(2022.8.12)		エメンドバイオ・インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和6年4月9日(2024.4.9)		アメリカ合衆国、デラウェア州 1 9 8		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/074930		0 5、ウィルミントン、センター・ロー		
(87)国際公開番号	WO2023/019263		ド 1 0 1 3、スイート 4 0 3ービー		
(87)国際公開日	令和5年2月16日(2023.2.16)	(74)代理人	110003708		
(31)優先権主張番号	63/333,037		弁理士法人鈴榮特許総合事務所		
(32)優先日	令和4年4月20日(2022.4.20)	(72)発明者	イザール、リオル		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		イスラエル国、6 9 1 0 4 1 4 テルア		
(31)優先権主張番号	63/332,214	(72)発明者	ビブ、バルト・ストリート 8		
(32)優先日	令和4年4月18日(2022.4.18)		エマニュエル、ラフィ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	イスラエル国、7 2 3 6 7 1 0 ラムラ		
(31)優先権主張番号	63/232,571		、イスラエル・フレンケル 1 7		
	最終頁に続く	(72)発明者	ロッカー、リアット		
			イスラエル国、7 5 2 5 9 4 1 リシヨ		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 遺伝子改変高忠実度OMNIー50ヌクレアーゼバリエント

(57)【要約】
本発明は、とりわけ、ゲノム編集のための組成物及び方法を目的とする。具体的には、以下の位置の少なくとも1か所にアミノ酸置換を含む野生型OMNIー50タンパク質配列（配列番号1）を有する、天然に存在しないOMNIー50ヌクレアーゼバリエント：R 6 1、¥ 4 3 7、R 4 7 8、A 4 9 3、¥ 5 4 5、G 6 0 6、K 6 8 8、L 6 9 0、E 6 9 5、L 7 1 8、R 7 8 8、Q 8 0 3、L 8 0 5、L 8 4 4、V 9 8 1、K 9 6 5及びK 1 0 3 6。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の位置の少なくとも 1 か所にアミノ酸置換を含む野生型 OMNI-50 タンパク質配列（配列番号 1）を有する、天然に存在しない OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント：R 4 7 8、Y 5 4 5、R 6 1、Y 4 3 7、A 4 9 3、G 6 0 6、K 6 8 8、L 6 9 0、E 6 9 5、L 7 1 8、R 7 8 8、Q 8 0 3、L 8 0 5、L 8 4 4、V 9 8 1、K 9 6 5 及び K 1 0 3 6。

【請求項 2】

R 4 7 8 位及び／又は Y 5 4 5 位に、好ましくは R 4 7 8 位と Y 5 4 5 位の両者にアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

10

【請求項 3】

R 4 7 8 位及び Y 5 4 5 位の各々にアミノ酸置換を含む、請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 4】

前記 R 4 7 8 位のアミノ酸置換が、R 4 7 8 D、R 4 7 8 E、R 4 7 8 S、R 4 7 8 T、R 4 7 8 N、R 4 7 8 Q、R 4 7 8 G、R 4 7 8 P、R 4 7 8 C、R 4 7 8 A、R 4 7 8 V、R 4 7 8 I、R 4 7 8 L、R 4 7 8 M、R 4 7 8 F、R 4 7 8 Y 又は R 4 7 8 W のいずれか 1 つ、好ましくは、R 4 7 8 V、R 4 7 8 H、R 4 7 8 L、R 4 7 8 M、R 4 7 8 P、R 4 7 8 F、R 4 7 8 W、R 4 7 8 Y、R 4 7 8 S、R 4 7 8 C、R 4 7 8 T、R 4 7 8 N 又は R 4 7 8 Q のいずれか 1 つである、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

20

【請求項 5】

前記アミノ酸置換が R 4 7 8 位で、アルギニンを置換するアミノ酸が、負に荷電した R 基又は電荷のない R 基を有するアミノ酸である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 6】

前記アミノ酸置換が R 4 7 8 位で、アルギニンを置換するアミノ酸が、極性アミノ酸又は非極性アミノ酸である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 7】

前記アミノ酸置換が R 4 7 8 位で、アルギニンを置換するアミノ酸が非極性アミノ酸である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

30

【請求項 8】

前記 Y 5 4 5 位のアミノ酸置換が、Y 5 4 5 D、Y 5 4 5 E、Y 5 4 5 S、Y 5 4 5 T、Y 5 4 5 N、Y 5 4 5 Q、Y 5 4 5 G、Y 5 4 5 P、Y 5 4 5 C、Y 5 4 5 A、Y 5 4 5 V、Y 5 4 5 I、Y 5 4 5 L、Y 5 4 5 M、Y 5 4 5 F、Y 5 4 5 R、Y 5 4 5 K、Y 5 4 5 H 又は Y 5 4 5 W のいずれか 1 つ、好ましくは、Y 5 4 5 W、Y 5 4 5 F、Y 5 4 5 H、Y 5 4 5 V 又は Y 5 4 5 G のいずれか 1 つである、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 9】

前記アミノ酸置換が Y 5 4 5 位で、チロシンを置換するアミノ酸が、負に荷電した R 基又は正に荷電した R 基を有するアミノ酸である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

40

【請求項 10】

前記アミノ酸置換が Y 5 4 5 位で、チロシンを置換するアミノ酸が非極性アミノ酸である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 11】

前記アミノ酸置換が Y 5 4 5 位で、チロシンを置換するアミノ酸が、フェニル環を欠くか又はフェニルアラニンである、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

50

【請求項 12】

前記アミノ酸置換が、R 4 7 8 I 及び Y 5 4 5 H である、請求項 1 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 13】

前記アミノ酸置換が、R 4 7 8 I、Y 5 4 5 H、Q 8 0 3 V、L 8 0 5 I、R 6 1 A、Y 4 3 7 W、R 7 8 8 K、L 8 4 4 N、V 9 8 1 M、G 6 0 6 P、L 6 9 0 V、E 6 9 5 Q、R 4 7 8 T、A 4 9 3 G、K 6 8 8 E、L 7 1 8 C、K 9 6 5 V 及び K 1 0 3 6 V のいずれか 1 つである、請求項 1 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント：。

【請求項 14】

R 4 7 8 位、Y 5 4 5 位、Q 8 0 3 位及び L 8 0 5 位の各々のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 15】

前記アミノ酸置換が、R 4 7 8 I、Y 5 4 5 H、Q 8 0 3 V 及び L 8 0 5 I である、請求項 14 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 16】

R 6 1 位、Y 4 3 7 位、R 7 8 8 位、L 8 4 4 位及び V 9 8 1 位の各々のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 17】

前記アミノ酸置換が、R 6 1 A、Y 4 3 7 W、R 7 8 8 K、L 8 4 4 N 及び V 9 8 1 M である、請求項 16 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 18】

G 6 0 6 位、L 6 9 0 位及び E 6 9 5 位の各々のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 19】

前記アミノ酸置換が、G 6 0 6 P、L 6 9 0 V 及び E 6 9 5 Q である、請求項 18 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 20】

R 4 7 8 位、A 4 9 3 位、K 6 8 8 位、L 7 1 8 位、K 9 6 5 位及び K 1 0 3 6 位の各々のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 21】

前記アミノ酸置換が、R 4 7 8 T、A 4 9 3 G、K 6 8 8 E、L 7 1 8 C、K 9 6 5 V 及び K 1 0 3 6 V である、請求項 20 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 22】

Q 8 0 3 位のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 23】

前記アミノ酸置換が Q 8 0 3 V である、請求項 22 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 24】

Y 5 4 5 位のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 25】

前記アミノ酸置換が Y 5 4 5 H である、請求項 24 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 26】

L 8 0 5 位のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 27】

前記アミノ酸置換が L 8 0 5 I である、請求項 26 に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエント。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

R 4 7 8 位、Y 5 4 5 位及び Q 8 0 3 位の各々のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 29】

前記アミノ酸置換が、R 4 7 8 I、Y 5 4 5 H 及び Q 8 0 3 V である、請求項 28 に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 30】

R 4 7 8 位、Y 5 4 5 位及び L 8 0 5 位の各々のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 31】

前記アミノ酸置換が、R 4 7 8 I、Y 5 4 5 H 及び L 8 0 5 I である、請求項 30 に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 32】

R 4 7 8 位、Q 8 0 3 位及び L 8 0 5 位の各々のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 33】

前記アミノ酸置換が、R 4 7 8 I、Q 8 0 3 V 及び L 8 0 5 I である、請求項 32 に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 34】

Y 5 4 5 位、Q 8 0 3 位及び L 8 0 5 位の各々のアミノ酸置換を含む、請求項 1 に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 35】

前記アミノ酸置換が、R 4 7 8 I、Y 5 4 5 H 及び L 8 0 5 I である、請求項 34 に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 36】

配列番号 2 ～ 5、63 ～ 70 及び 89 ～ 97 からなる群より選択される配列番号で示されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 37】

野生型 OMNI-50タンパク質配列（配列番号 1）に対して少なくとも 80% 配列同一性を有する、請求項 1 ～ 36 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 38】

核移行配列（NLS）を更に含む、請求項 1 ～ 37 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 39】

前記バリエントが、ガイド RNA 分子と複合体を形成した野生型 OMNI-50ヌクレアーゼと比較して、バリエントを DNA 標的部位に向けるガイド RNA 分子と複合体を形成した場合に、前記 DNA 標的部位に対する特異性が増加した、請求項 1 ～ 38 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエント。

【請求項 40】

DNA 標的部位を標的とするガイド RNA 分子と複合体を形成した請求項 1 ～ 39 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエントを含む CRISPR 系であって、野生型 OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質及び前記ガイド RNA 分子を含む野生型 CRISPR 系と比較して、オフターゲット編集活性が減少した、CRISPR 系。

【請求項 41】

請求項 1 ～ 39 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエントを含む活性 CRISPR 系と DNA 標的部位を接触させることを含む、オフターゲット編集活性が減少した、遺伝子編集方法。

【請求項 42】

前記活性 CRISPR 系が、野生型 OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質を含む野生

10

20

30

40

50

型 C R I S P R 系と比較して、オフターゲット編集活性が減少している、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記遺伝子編集が、真核細胞又は原核細胞中で行われる、請求項 4 1 又は 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記真核細胞が、植物細胞又は哺乳動物細胞である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記哺乳動物細胞がヒト細胞である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記 DNA 標的部位が、遺伝子の病原性アレル内又はその近傍に位置する、請求項 4 1 ～ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記 DNA 標的部位が、E L A N E、C X C R 4、E M X、R y R 2、K N C Q 1、K C N H 2、S C N 5 a、G B A 1、G B A 2、ロドプシン、G U C Y 2 D、I M P D H 1、F G A、B E S T 1、P R P H 2、K R T 5、K R T 1 4、A p o A 1、S T A T 3、S T A T 1、A D A 2、R P S 1 9、S B D S、G A T A 2、R P E 6 5、L D L R、A N G P T L 3、B 2 M、T R A C、T C F 4、T G F B i、P A X 6、C 3、L R R K 2、S A R M 1、S A M D 9、S A M D 9 L、H A V C R 2、C D 3 E、A P L P 2、C I S H、T I G I T、T N N T 2、T N N、M Y H 7 及び H L A - E からなる群より選択される遺伝子内に位置する、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

DNA 標的が、外因性ドナー分子によって修復される、請求項 4 1 ～ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記オフターゲット編集活性が、少なくとも 2 分の 1、10 分の 1、10² 分の 1、10³ 分の 1、10⁴ 分の 1、10⁵ 分の 1 又は 10⁶ 分の 1 まで減少した、請求項 4 1 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 0】

請求項 4 1 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法により得られる改変細胞。

【請求項 5 1】

前記細胞が、生着が可能である、請求項 5 0 に記載の改変細胞。

【請求項 5 2】

前記細胞が、生着後に子孫細胞を生じさせることが可能である、請求項 5 0 又は 5 1 のいずれか 1 項に記載の改変細胞。

【請求項 5 3】

前記細胞が、自家生着後に子孫細胞を生じさせることが可能である、請求項 5 0 ～ 5 2 のいずれか 1 項に記載の改変細胞。

【請求項 5 4】

前記細胞が、生着の少なくとも 12 月間又は少なくとも 24 月間後に子孫細胞を生じさせることが可能である、請求項 5 0 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の改変細胞。

【請求項 5 5】

前記細胞が、造血幹細胞、前駆細胞、C D 3 4 + 造血幹細胞、骨髓細胞及び末梢単核細胞からなる群より選択される、請求項 5 0 ～ 5 4 のいずれか 1 項に記載の改変細胞。

【請求項 5 6】

請求項 5 0 ～ 5 5 のいずれか 1 項に記載の改変細胞及び薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 5 7】

前記細胞を薬学的に許容される担体と混合することを含む、請求項 5 6 に記載の組成物を製造する in vitro 又は ex vivo 方法。

10

20

30

40

50

【請求項 58】

請求項 1～39 のいずれか 1 項に記載の OMNI-50 ヌクレアーゼバリエントをコードするポリヌクレオチド分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2022年4月20日出願の米国仮特許出願第63/333,037号、2022年4月18日出願の同第63/332,214号、及び2021年8月12日出願の同第63/232 571号の優先権を主張し、それぞれの内容は参照によりこの明細書に組み入れられる。

【0002】

この出願全体を通して、括弧内で参照するものをはじめ、さまざまな刊行物を参照する。この出願で言及する全ての刊行物は、本発明が属する分野及び本発明が利用できる分野における特徴を追加するために、その全体が、参照によりこの明細書に組み入れられる。

【0003】

配列表に対する参照

本出願は、2022年8月12日に提出したXMLファイルに含まれる、MS-Windows（登録商標）とのオペレーティングシステム互換性を有するIBM-PC形式で2022年8月12日に作成された、サイズが288キロバイトのファイル「220812_91722-A-PCT_Sequence_Listing_AWG.xml」中のヌクレオチド配列を、本出願の一部として、参照により組み入れる。

【背景技術】

【0004】

標的化ゲノム改変は、病原性の遺伝的変化の作用を逆転させるために使用できる強力なツールであり、したがって、ヒト遺伝子疾患に対する新規療法を提供する可能性がある。遺伝子改変ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、及び最も直近ではCRISPR/CasのようなRNAをガイドとするDNAエンドヌクレアーゼをはじめとする現在のゲノム操作ツールは、ゲノム中に配列特異的DNA切断を生成する。ゲノム配列の改変は、次の工程で起こり、新たに形成されたDNA切断部に応答して生じられる細胞のDNA修復メカニズムの活性の結果である。これらのメカニズムは、例えば、（1）切断部の2つの端部が迅速であるが不正確でもある様式で一緒にライゲーションされる古典的非相同末端結合（NHEJ）（すなわち、小さな挿入又は欠失の形態で切断部位におけるDNAの変異を高頻度に生じる）又は（2）正確な様式で切断部位の周囲のDNAを置きかえるために無傷の相同性DNAドナーが用いられる相同組換え修復（HDR）を含んでよい。最初のDNA損傷誘導因子の最小限のオフターゲット活性が、効率的で安全なゲノム編集のために必要とされる。

【発明の概要】

【0005】

変化及び改善された標的特異性を有する遺伝子改変クラスター化規則的配置短回文反復（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats）（CRISPR）／CRISPR関連OMNI-50 ヌクレアーゼ、並びにゲノム操作、ゲノム外操作、ゲノム標的化、ゲノム編集及びin vitro診断におけるそれらの使用を、この明細書で開示する。

【0006】

いくつかの態様では、野生型OMNI-50 ヌクレアーゼと比較して、特異性が増加したOMNI-50 ヌクレアーゼバリエント及び改良したバリエントを用いる方法を提供する。有利には、遺伝子改変バリエントのOMNI-50 ヌクレアーゼがCRISPRエンドヌクレアーゼ系で活性の場合、CRISPRエンドヌクレアーゼ系は、野生型OMNI-50 ヌクレアーゼが活性である野生型CRISPRエンドヌクレアーゼ系と比較して、オフターゲット編集活性が減少し、オンターゲット編集活性が維持されている。例えば、遺伝子改変バリエントのOMNI-50 ヌクレアーゼは、改善されたアレル特異的識別性

10

20

30

40

50

、例えば、標的のアレル中のみに存在し、標的ではないアレル中には存在しないヘテロ接合SNPを含有する標的領域における特異的結合性及び活性を示してもよい。

【0007】

いくつかの態様では、野生型OMNI-50ニッカーゼと比較して、特異性が増加したOMNI-50ニッカーゼのバリエーションを提供する。いくつかの態様では、野生型OMNI-50の触媒活性のないヌクレアーゼと比較して、特異性が増加したOMNI-50の触媒活性のないヌクレアーゼのバリエーションを提供する。例えば、本願のOMNI-50ヌクレアーゼバリエーションのいずれか1つの触媒部位は、バリエーションがニッカーゼ活性を有し、それにより、一本鎖DNA切断を行うことが可能となるように改変されてもよい。あるいは、本願のOMNI-50ヌクレアーゼバリエーションのいずれか1つの触媒部位は、バリエーションがヌクレアーゼ活性を有さず、すなわち、触媒活性のないヌクレアーゼとなるように改変されてもよい。

10

【0008】

本発明のいくつかの態様では、野生型OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質（配列番号1）のアミノ酸配列に対して少なくとも80%同一である配列を含むOMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションを提供する。

【0009】

本発明のいくつかの態様では、以下の位置：R61、Y437、R478、A493、Y545、G606、K688、L690、E695、L718、R788、Q803、L805、L844、K965、V981及びK1036の少なくとも1か所においてアミノ酸置換を含む野生型OMNI-50タンパク質配列（配列番号1）を有する天然に存在しないOMNI-50ヌクレアーゼバリエーションを提供する。

20

【0010】

本発明のいくつかの態様では、DNA標的部位を標的とするガイドRNA分子と複合体を形成した本明細書中に開示されるOMNI-50ヌクレアーゼバリエーションのいずれか1つを含むCRISPR系であって、野生型OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質及びガイドRNA分子を含む野生型CRISPR系と比較して、オフターゲット編集活性が減少したCRISPR系を提供する。

【0011】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、野生型OMNI-50ヌクレアーゼ（配列番号1）と比較して、OMNI-50バリエーションを標的部位に向けるガイドRNAと複合体を形成した場合に、標的部位に対する特異性が増加する。

30

【0012】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、下記の表の第1列においてCRISPRヌクレアーゼに関して提供される位置のアミノ酸置換により作製される不活性化型RuvCドメインを有するニッカーゼである。いくつかの態様では、ニッカーゼは、以下の位置：R61、Y437、R478、A493、Y545、G606、K688、L690、E695、L718、R788、Q803、L805、L844、K965、V981及びK1036の少なくとも1か所にアミノ酸置換を更に含む。

【0013】

40

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、下記の表の第2列においてCRISPRヌクレアーゼに関して提供される位置のアミノ酸置換により作製される不活性化型HNHドメインを有するニッカーゼである。いくつかの態様では、ニッカーゼは、以下の位置：R61、Y437、R478、A493、Y545、G606、K688、L690、E695、L718、R788、Q803、L805、L844、K965、V981及びK1036の少なくとも1か所にアミノ酸置換を更に含む。

【0014】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、下記の表の第3列においてCRISPRヌクレアーゼに関して提供される位置の置換により作製される不活性化型RuvCドメイン及び不活性化型HNHドメインを有する触媒活性のないヌクレアー

50

ぜである。いくつかの態様では、触媒活性のないヌクレアーゼは、以下の位置：R 6 1、Y 4 3 7、R 4 7 8、A 4 9 3、Y 5 4 5、G 6 0 6、K 6 8 8、L 6 9 0、E 6 9 5、L 7 1 8、R 7 8 8、Q 8 0 3、L 8 0 5、L 8 4 4、K 9 6 5、V 9 8 1 及び K 1 0 3 6 の少なくとも 1 か所にアミノ酸置換を含む。

【0015】

【表 1】

表 OMNI-50ヌクレアーゼが作用する位置

不活化RuvCドメインを有するニッカーゼ	不活化HNHドメインを有するニッカーゼ	不活化RuvC及びHNHドメインを有する触媒活性のないヌクレアーゼ
D12又はE785又はH1008又はD1011	D875*又はH876又はN899	(D12又はE785又はH1008又はD1011)及び(D875*又はH876又はN899)

10

【0016】

この表は、不活性化型 R U V C ドメインを有するニッカーゼを生成するために置換される対象である代替的な位置、不活性化型 H N H ドメインを有するニッカーゼを生成するために置換される対象である代替的な位置、並びに不活性化型 R U V C 及び H N H ドメインを有する触媒活性のないヌクレアーゼを生成するために置換される対象である代替的な位置を列挙する。いずれかの他のアミノ酸の置換が、アスパラギン酸（D）からグルタミン酸（E）への置換又はグルタミン酸（E）からアスパラギン酸（D）への置換以外のいずれかの置換が不活性化をもたらすことを示す星印が後に続く場合を除いて、第 1 ～ 3 列において示されるアミノ酸位置のそれぞれに関して許容可能である。

20

【0017】

しかし、本文全体を通して、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションとは、これらのバリエーションのいずれかが、ニッカーゼ活性（すなわち、二本鎖切断とは対照的に一本鎖 D N A 切断を生成するヌクレアーゼ）を有するか又はヌクレアーゼ活性を有さない（すなわち、触媒的に不活性化ヌクレアーゼ）ように改変されてもよいことを意味する。

【0018】

したがって、s g R N A によりプログラムされた様式で D N A に特異的に結合するその能力をそれでも保持しながら、そのヌクレアーゼ活性を改変又は無効にするために、点変異をこの明細書に記載のバリエーションに導入できる。これらのバリエーションのいずれか 1 つは、ガイド R N A 分子を介して、所望の D N A 標的配列を特異的に標的とすることができる。バリエーション-ガイド複合体はまた、複合体に結合した分子を標的部位に運搬する。つまり、この開示は、そのようなバリエーション及び D N A 改変ドメイン（例、デアミナーゼ、ヌクレアーゼ、ニッカーゼ、リコンビナーゼ、メチルトランスフェラーゼ、メチラーゼ、アセチラーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、転写活性化因子、又は転写抑制因子ドメイン）を含む融合タンパク質、並びに、疾患に関連するゲノム（例、ヒト対象のゲノム）中の変異を修正し、又はゲノム（例、ヒトゲノム）に変異を生じさせて、遺伝子の発現を減少若しくは防止する融合タンパク質の使用も予定している。

30

40

【0019】

いくつかの態様では、本願のバリエーションを、酵素活性を有するタンパク質と融合させてもよい。いくつかの態様では、酵素活性は、標的 D N A を修飾する。いくつかの態様では、酵素活性は、ヌクレアーゼ活性、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、D N A 修復活性、D N A 損傷活性、脱アミノ化活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジン二量体形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポザーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、ヘリカーゼ活性、フォトリアーゼ活性又はグリコシラーゼ活性である。場合によって、酵素活性はヌクレアーゼ活性である。場合によって、ヌクレアーゼ活性は標的 D N A を二本鎖切断する。場合によって、酵素活性は標的 D N A に関連する標的ポリペプチドを改変する。場合によ

50

て、酵素活性は、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性、脱ユビキチン化活性、アデニル化活性、脱アデニル化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、リボシル化活性、脱リボシル化活性、ミリストイル化活性又は脱ミリストイル化活性である。場合によって、標的ポリペプチドがヒストンであり、酵素活性が、メチルトランスフェラーゼ活性、デメチラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、デアセチラーゼ活性、キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性又は脱ユビキチン化活性である。

【0020】

したがって、OMNI-50ヌクレアーゼ、ニックアーゼ又は触媒活性のないヌクレアーゼのバリエーションのいずれか1種を、デアミナーゼ、逆転写酵素（例、プライム編集における使用はAnzaolone et al. (2019)を参照）、DNAのメチル化状態を改変する酵素（例、メチルトランスフェラーゼ）又はヒストンの修飾因子（例、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ）のような塩基エディターを含むがこれらには限定されない、別のDNA調節酵素又はDNA改変酵素と（例えば、直接又はリンカーを介して）融合させてもよい。実際に、この明細書に記載のOMNI-50ヌクレアーゼ、ニックアーゼ、不活性バリエーションは、DNA調節酵素又はそのエフェクタードメインに融合されてもよい。DNA調節因子の例としては、限定するものではないが：デアミナーゼ、ヌクレアーゼ、ニックアーゼ、リコンビナーゼ、メチルトランスフェラーゼ、メチラーゼ、アセチラーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、逆転写酵素、ヘリカーゼ、インテグララーゼ、リガーゼ、トランスポザラーゼ、デメチラーゼ、ホスファターゼ、転写活性化因子又は転写抑制因子が挙げられる。いくつかの態様では、本願のOMNI-50バリエーションのいずれかは、酵素活性を有するタンパク質に融合される。いくつかの態様では、酵素活性は、標的DNA分子を改変する。この明細書に記載のOMNI-50バリエーション又はその融合タンパク質は、疾患に関連する遺伝子中の1か所以上の変異を修正若しくは生成するために、又は遺伝子の発現を増加、修正、減少若しくは防止するために用いてもよい。

【0021】

本発明のいくつかの態様では、この明細書に記載のOMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションのいずれか1種を含む活性CRISPR系とDNA標的部位を接触させることを含む、オフターゲット編集活性が減少した遺伝子編集方法を提供する。

【0022】

いくつかの態様では、

この明細書に記載のバリエーションのいずれか1種のOMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションを含む活性CRISPR系と標的部位遺伝子座を接触させることであって、活性CRISPR系は、野生型OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質を有する野生型CRISPR系と比較して、オフターゲット編集活性が減少し、オンターゲット編集活性が維持されている、接触させること

を含む、オフターゲット編集活性が減少し、及び／又は、オンターゲット編集活性が増加している遺伝子編集方法を提供する。

【0023】

さらなる態様及び本発明の適用可能性の完全な範囲は、本明細書中、以下に与えられる詳細な説明から明らかになる。しかし、本発明の精神及び範囲内のさまざまな変更及び改変がこの詳細な説明から当業者に明らかになることから、詳細な説明及び具体例は、本発明の好ましい態様を示しながら、例示の目的のみで与えられることが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1：ヌクレアーゼ最適化プラットフォームを示す模式図が示される。ヌクレアーゼバリエーションのライブラリーが、合理的設計及びランダム変異誘発、及びそれに続く特殊化した選択アッセイを用いる活性、特異性、多重度（及びいずれかの他の所望の形質）

に関する選択の組合せを用いて作製される。

【図2】図2：野生型OMNI-50ヌクレアーゼ及びそのバリエーションの活性及び忠実度を試験するために用いられるELANE遺伝子及び標的部位の模式図。「alt」及び「ref」は、それぞれ、SNPの「alt」バージョンを有するか又はSNPの「ref」バージョンを有するかのいずれかのアレル中のSNP位置に、ヌクレアーゼを向けるガイドRNA分子を示す。

【図3A】図3A～3B：OMNI-50ヌクレアーゼを最適化により改善できたことを実証する、野生型OMNI-50ヌクレアーゼのアレル特異性及びオフターゲット作用。図3A：野生型OMNI-50alt組成物により編集されたHSCは変異型アレルを除去したが、基本型アレルは無傷で維持された。しかし、野生型OMNI-50ref組成物による編集は、基本型アレルにおける低減及び変異型アレルの部分的のみの保存をもたらし、差次的であるが完全でないアレル特異的編集を提供した。統計学的有意性は、** $P < .01$ 、**** $P < .0001$ として示される。

【図3B】図3B：健常者（HD）及び患者（ESC N-2）におけるrhAmpseq解析—一定ガイド（Sg（constant））、基本型ガイド（Sg（ref））及び変異型ガイド（Sg（alt））に関して特定されたオフターゲットに対する編集されたHSC（RNP（ref）又はRNP（alt））。結果は、野生型OMNI-50が、標的特異的編集を確実にするために除去されるべきである、各ガイドに関して1つのオフターゲットを有することを示す。RNP ref処理HSCにおける編集率が上側パネルにおいて示され；RNP alt処理HSCにおける編集率が下側パネルにおいて示される。

【図4A】図4A～4C：最適化型バリエーションは、野生型OMNI-50ヌクレアーゼと比較して、改善されたアレル特異性と同等の活性を示す。図4A：アレル特異性を、野生型OMNI-50又は最適化型バリエーションを用いて編集された健常者のHSCで決定した。バリエーションは、野生型OMNI-50と比較して、優れたアレル識別性を示す。具体的には、ddPCRで測定するsgRNA-564DS-ref又はsgRNA-564DS-altを用いるアレル特異的編集を代表するグラフが示される。編集特異性は、編集されたアレルからの減少シグナルを規定する、変異型アレルに結合するFAMプローブ及び基本型アレルに結合するHEXプローブの2つの競合的プローブにより決定される。ヘテロ接合体未処理細胞における基本型アレルと変異型アレルとの濃度の間の比率は1である。グラフは、各gDNA試料に関して内因性遺伝子対照RPP30及びSTAT1に対して標準化された、基本型アレル（HEX）、変異型アレル（FAM）の平均濃度を表す。

【図4B】図4B：野生型OMNI-50（WT OMNI-50）又は最適化型バリエーションを用いて編集された健常者のHSCにおける切除率を測定した。3795バリエーションは、WT OMNI-50と比較して同等の活性を示す。3795バリエーションは、活性について妥協することなく、最高のアレル特異性を示した。

【図4C】図4C：バリエーション忠実度を、公知のOMNI-50ヌクレアーゼオフターゲットに対して特異的な次世代配列（NGS）解析で測定した。注記：全てのバリエーションが、高い忠実度を示した。

【図5A】図5A～5B：一定ガイド（Sg（constant））、基本型ガイド（Sg（ref））（RNP（ref）、図5A）、及び変異型ガイド（Sg（alt））分子（RNP（alt））、図5B）に関して特定されたオフターゲットに対する、WT OMNI-50又は3795ヌクレアーゼバリエーションのいずれかを用いて編集された健常者のHSCのrhAmpSeq解析。

【図5B】図5A～5B：一定ガイド（Sg（constant））、基本型ガイド（Sg（ref））（RNP（ref）、図5A）、及び変異型ガイド（Sg（alt））分子（RNP（alt））、図5B）に関して特定されたオフターゲットに対する、WT OMNI-50又は3795ヌクレアーゼバリエーションのいずれかを用いて編集された健常者のHSCのrhAmpSeq解析。

【図5C】図5Cは、3795ヌクレアーゼバリエーションの忠実度を検証する追加の結果が

、WT OMNI-50又は3795ヌクレアーゼバリエントのいずれかと共にHSC試料に対して3種類の異なるガイド分子（g35、g62Ref、又はg62Alt）を用いる場合にオフターゲットを調べることにより実証されることを示す（図5C）。これらの結果は、WT OMNI-50ヌクレアーゼを用いる場合に各ガイドに関して強く検証されたオフターゲット作用があるが、3795ヌクレアーゼバリエントを用いてオフターゲットが検証されなかったことを示し、このことは、3795ヌクレアーゼバリエントが、WT OMNI-50ヌクレアーゼと比較してオフターゲットを取り除くことを示す。

【図6A】図6A～6C：ELANEにおける単一アレル切除は好中球分化を回復させる。図6A：好中球分化を回復させるための遺伝子編集治療の模式図。

【図6B】図6B：標的とされた変異型アレルに対してのみex-vivoで編集され、成熟好中球に分化した、健常者のHSC（HD-2）及び患者に由来するHSC（ESCN-2）を示すフローサイトメトリー分析。

【図6C】図6C：図6Bに示すデータの定量化。

【図7A】図7A：黒色逆三角形として描写されるSCNに関連付けられる代表的なヘテロ接合変異の位置を示す、ELANEの5つのエクソン及び4つのイントロンの線形表示。Makaryanらに基づく（図7B、I～III）。3種類の単一アレル切除戦略を表す、それらに基づいて3種類のアレル特異的sgRNAガイド及び一定ガイドが設計されたELANE変異の大多数に関連付けられる3種類の特定されたSNP（白色逆三角形）及び一般的な切断部位（灰色逆三角形）の模式図。

【図7B】図7A：黒色逆三角形として描写されるSCNに関連付けられる代表的なヘテロ接合変異の位置を示す、ELANEの5つのエクソン及び4つのイントロンの線形表示。Makaryanらに基づく（図7B、I～III）。3種類の単一アレル切除戦略を表す、それらに基づいて3種類のアレル特異的sgRNAガイド及び一定ガイドが設計されたELANE変異の大多数に関連付けられる3種類の特定されたSNP（白色逆三角形）及び一般的な切断部位（灰色逆三角形）の模式図。

【図8A】図8A～8G：OMNIバリエントである3795ヌクレアーゼ組成物のアレル特異性及び切除効率。図8A：実験ワークフローを描写する模式図。健常者及びSCN患者に由来するHSCに、RNPをエレクトロポレーションするか、又は未処理のままにし、続いて、CD34⁺増殖培地中で3日間回復させた。続いて、細胞を、増殖及び骨髓前駆細胞分化のためにIL-3、SCF、GMC SF及びGCSFを用いて7日間培養し、それに続いて好中球分化のためにGCSF中で7日間培養することによる分化に供した。

【図8B】図8B：ddPCRで測定した、RNP（ref）組成物で処理した又は処理を行っていない（NT）、健常者（HD-V3）又はSCN患者（SCN-P41）から得たHSCにおける分化6日目の編集されていない基本型アレル（黒色）及び変異型アレル（灰色）の割合を表す棒グラフ。各アレル濃度の平均を、内因性遺伝子対照RPP30及びSTAT1に対して標準化し、未処理細胞と比較して提示した。（n=3群のHD-V3健常者／SCN-P41患者ドナー由来の細胞）。統計学的有意性は、****P<.0001として示され、ns=統計学的に有意でない。

【図8C】図8C：ddPCRで測定した、健常者（HD-V3）：未処理（NT、黒色）若しくはRNP（ref）処理（灰色）又はSCN患者（SCN-P41）：未処理（NT、白色）若しくはRNP（ref）処理（暗色斜線）のいずれかから得られたHSCにおける分化の6日目及び14日目の切除の割合を表す棒グラフ。（n=3群のHD-V3健常者／SCN-P41患者ドナー由来の細胞）。統計学的有意性は、**P<.01、****P<.0001として示される。

【図8D】図8D：変異部位を標的とする次世代シーケンシング（NGS）で測定した、RNP（ref）組成物で処理した又は処理を行っていない（NT）、SCN-P41患者のHSCから得られたcDNAにおける野生型（黒色）及び変異型（灰色）アレルの割合を表す棒グラフ。（n=3群のSCN-P41患者由来の細胞）。統計学的有意性は、***P<.001として示される。

10

20

30

40

50

【図8E】図8E：ddPCRで測定した、RNP (alt) 組成物で処理した又は処理を行っていない (NT)、SCN患者 (SCN-P55) から得たHSCにおける分化6日目の編集されていない基本型アレル (黒色) 及び変異型アレル (灰色) の割合を表す棒グラフ。各アレル濃度の平均を、内因性遺伝子対照RPP30及びSTAT1に対して標準化し、未処理細胞と比較して提示した。(n=3群のSCN-P55患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、*** $P < .0001$ として示され、ns=統計学的に有意でない。

【図8F】図8F：ddPCRで測定した、SCN患者 (SCN-P55)：未処理 (NT、白色) 又はRNP (alt) 処理 (暗色斜線) から得られたHSCにおける分化の6日目及び14日目の切除の割合を表す棒グラフ。(n=3群のSCN-P55患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、*** $P < .001$ 、**** $P < .0001$ として示される。

10

【図8G】図8G：変異部位を標的とするNGSで測定した、RNP (alt) 組成物で処理した又は処理を行っていない (NT)、SCN-P55患者のHSCから得たcDNAにおける野生型アレル (黒色) 及び変異型アレル (灰色) の割合を表す棒グラフ。(n=3群のSCN-P55患者由来の細胞)。統計学的有意性は、*** $P < .001$ として示される。

【図8H】図8H：未処理 (NT、黒色) であるか又はそれぞれRNP (ref) / RNP (alt) 処理 (切除型、灰色) されたかのいずれかである、SCN-P41及びSCN-P55患者の6日目の分化したHSCにおけるELANE mRNAレベルを表す棒グラフ。データは、NT群と比較して提示される。(n=3群のSCN-P41及びSCN-P55患者由来の細胞)。統計学的有意性は、* $P < .05$ として示される。バーは、標準偏差を伴う平均値を表す。

20

【図9A】図9A~9K：OMNIバリエーションである3795により促進された編集は、in vitroでの好中球分化及び成熟を増強する。図9A：好中球 (CD66b+) 及び単球 (CD14+ / CD66b-) サブセットに関して分析された、未処理 (NT、左側パネル) 及びRNP (ref) 処理 (右側パネル) 健常者 (HD-V3、上側パネル) 及びSCN-P41患者 (下側パネル) 分化HSCの代表的FACSプロット。

【図9B】図9B：未処理 (NT、黒色) 又はRNP (ref) を用いて処理された (灰色)、健常者 (HD-V3) 及びSCN患者 (SCN-P41) 分化HSCにおける好中球 (CD66b+細胞) の割合に関する個別のFACSデータの定量的分析。(n=3群のHD-V3健常者 / SCN-P41患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、*** $P < .0001$ として示され、ns=統計学的に有意でない。

30

【図9C】図9C：未処理 (NT、黒色) 又はRNP (ref) を用いて処理された (灰色)、健常者 (HD-V3) 及びSCN患者 (SCN-P41) 分化HSCにおける単球 (CD14+ / CD66b-細胞) の割合に関する個別のFACSデータの定量的分析。(n=3群のHD-V3健常者 / SCN-P41患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、**** $P < .0001$ として示され、ns=統計学的に有意でない。

【図9D】図9D：未処理 (NT、黒色) 又はRNP (ref) を用いて処理された (灰色)、健常者 (HD-V3) 及びSCN患者 (SCN-P41) 分化HSCによるZymosan Green取り込みの割合の定量化。ns=統計学的に有意でない。

40

【図9E】図9E：グラフは、対照のみの細菌細胞 (大腸菌、円形) と比較した、健常者未処理 (HD-V3、NT；四角形) 又は患者RNP (ref) 処理 (SCN-P41、RNP (ref)；三角形) HSC由来の分化した好中球と共にインキュベートされた200,000個のルシフェラーゼ発現細菌細胞からの、発光におけるリアルタイム変化である相対的光単位 (RLU) を描写する。RLUレベルがプラトーに達した提示される最終時点での大腸菌対照に対する群の各1つに関する統計学的有意性が、* $P < .05$ 、** $P < .01$ として示される。

【図9F】図9F：好中球 (CD66b+) 及び単球 (CD14+ / CD66b-) サブセットに関して分析された、未処理健常者 (HD-V4 NT、左側パネル)、未処理S

50

CN患者 (SCN-P55 NT、中央パネル) 及びRNP (alt) 処理SCN患者 (右側パネル) 分化HSCの代表的FACSプロット。

【図9G】図9G：未処理 (NT、黒色) 又はRNP (alt) を用いて処理された (灰色) かのいずれかである、未処理健常者 (HD-V4、NT；黒色) 及びSCN患者 (SCN-P55) 由来の分化HSCにおける好中球 (CD66b+細胞) の割合に関する個別のFACSデータの定量的分析。 ($n=3$ 群のHD-V4健常者/SCN-P55患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、 $****P<.0001$ として示され、 ns = 統計学的に有意でない。

【図9H】図9H：未処理 (NT、黒色) 又はRNP (alt) を用いて処理された (灰色) かのいずれかである、未処理健常者 (HD-V4、NT；黒色) 及びSCN患者 (SCN-P55) 由来の分化HSCにおける単球 (CD14+/CD66b-細胞) の割合に関する個別のFACSデータの定量的分析。 ($n=3$ 群のHD-V4健常者/SCN-P55患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、 $****P<.0001$ として示され、 ns = 統計学的に有意でない。

【図9I】図9I：RNP (alt) で処理した又はヌクレアーゼ組成物を用いずにエレクトロポレーションした (SCN-P55モック)、P55 SCN患者に由来する分化したHSCのDiff-Quik染色。Nikon DSLRデジタルカメラを用いて400×倍率においてLEITZ LABORLUX S偏光顕微鏡上で顕微鏡写真を得た。

【図9J】図9J：未処理 (NT、黒色) か又はRNP (alt) を用いて処理された (灰色) かのいずれかである、未処理健常者 (HD-V4、NT；黒色) 及びSCN患者 (SCN-P55) 由来の分化HSCによるZymosan Green取り込みの割合の定量化。 ($n=3$ 群のHD-V4健常者/SCN-P55患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、 $*P<.05$ として示される。

【図9K】図9K：グラフは、対照のみの細菌細胞 (大腸菌、円形) と比較した、健常者未処理 (HD-V4、NT；四角形) HSC及び患者RNP (alt) 処理 (SCN-P55、RNP (alt)；三角形) HSC由来の分化した好中球と共にインキュベートされた200,000個のルシフェラーゼ発現細菌細胞からの、発光におけるリアルタイム変化である相対的光単位 (RLU) を描写する。RLUレベルがプラトーに達した提示される最終時点での大腸菌対照に対する群の各1つに関する統計学的有意性が、 $*P<.05$ 、 $***P<.001$ として示される。バーは、標準偏差を伴う平均値を表す。

【図10A】図10A～10B：3種類のSNPによる患者及び健常者の集団のヘテロ接合の頻度及び網羅率。図10A：健常者 (左側) 又は患者 (右側) 集団における3種類の選択されたSNPの各々のヘテロ接合の頻度。ヘテロ接合の頻度は、3種類のSNPの各々において、健常者及び患者集団間で同様であった。 $rs10414837$ 、 p 値 = 0.126、オッズ比 = 0.653； $rs3761005$ 、 p 値 = 0.9615、オッズ比 = 1.014； $rs1683564$ 、 p 値 = 0.9475、オッズ比 = 1.019、全て χ^2 により解析。

【図10B】図10B：健常者 (左側) 又は患者 (右側) 集団における3種類の選択されたSNP (灰色) の少なくとも1種に対してヘテロ接合である集団の割合を表す円グラフ。3種類のSNPによる健常者及び患者集団の同様の網羅率 (75%超、 p 値 = 0.1285、オッズ比 = 0.56、 χ^2)。

【図11】図11：SCN-P41及びSCN-P55患者における変異-SNP連鎖決定。変異部位及び $rs1683564$ SNPの配列決定分析の電気泳動像。SCN-P41患者は、SNPの基本型 (C、シトシン) と同じアレル上に変異を保持するが、SCN-P55患者は、SNPの変異型 (A、アデノシン) と同じアレル上に変異を保持する。

【図12】図12：RNP (ref) 及びRNP (alt) 組成物を用いる同じ編集結果。ELANE遺伝子は、2か所の位置で切断される：1) イントロン4、sgRNA (constant) ガイドによりガイドされる両アレル部位及び2) ヘテロ接合SNP部位、 $rs1683564$ 、変異部位に対する連鎖に応じてsgRNA (ref) 又はsgR

10

20

30

40

50

NA (alt) のいずれかによりガイドされる単一アレル部位。変異が SNP の基本型 (C、シトシン) を保持するアレルに位置する場合、ヌクレアーゼ、sgRNA (ref) 及び sgRNA (constant) を含む RNP (ref) 組成物が選択され、変異を含むセクションが、基本型アレルから切断される (患者 A、上側パネル)。変異が SNP の変異型 (A、アデノシン) を保持するアレルに位置する場合、ヌクレアーゼ、sgRNA (alt) 及び sgRNA (constant) を含む RNP (alt) 組成物が選択され、変異を含むセクションが、変異型アレル (患者 B、下側パネル) から切断される。BioRender.com によって作成された図。

【図 13 A】図 13 A ~ 13 C : 切除後の反転イベント。図 13 A : 反転イベントの検出の模式図 : 切除断片の反転バリエーションを増幅するために、特異的プライマーを設計した。dsDNA に結合する蛍光 DNA 結合性色素である EvaGreen 色素を、全ての反転イベントを測定するために ddPCR アッセイにおいて用いた。BioRender.com によって作成された図。

【図 13 B】図 13 B : 編集していない (黒色) 及び RNP (ref) 処理 (灰色)、HD-V3 健常者及び SCN-P41 患者に由来する分化 HSC について、EvaGreen に基づく ddPCR アッセイで測定した総反転事象の定量化。統計学的有意性は、**** $P < .0001$ として示される。

【図 13 C】図 13 C : 未編集 HD-V4 健常者及び SCN-P55 患者由来分化 HSC (黒色) 並びに RNP (alt) 処理 (灰色) SCN-P55 患者由来分化 HSC において、EvaGreen に基づく ddPCR アッセイで測定した総反転イベントの定量化。統計学的有意性は、**** $P < .0001$ として示される。バーは、標準偏差を伴う平均値を表す。(n = 3 ~ 4 群の HD-V3 又は HD-V4 健常者 / SCN-P41 又は SCN-P55 患者ドナー由来の細胞)。

【図 14 A】図 14 A ~ 14 B : 追加の健常者における切除レベル及びアレル特異性。図 14 A : ddPCR で測定した、未処理 (NT、黒色)、RNP (ref) 処理 (灰色) 又は RNP (alt) 処理 (白色) のいずれかであった健常者から得られた HSC における切除の割合を表す棒グラフ。(n = 4 群の各群における 2 名の健常者由来の細胞)。統計学的有意性は、**** $P < .0001$ として示される。

【図 14 B】図 14 B : ddPCR で測定した、未処理 (NT)、RNP (ref) 又は RNP (alt) を用いて処理された、健常者から得た HSC における未編集基本型アレル (黒色) 及び変異型アレル (灰色) の割合を表す棒グラフ。各アレル濃度の平均を、内因性遺伝子対照 RPP30 及び STAT1 に対して標準化し、未処理細胞と比較して提示した。(n = 4 群の各群における 2 名の健常者由来の細胞)。統計学的有意性は、**** $P < .0001$ として示され、ns = 統計学的に有意でない。バーは、標準偏差を伴う平均値を表す。

【図 15 A】図 15 A ~ 15 C : 長期的 HSC 集団における切除レベル。図 15 A : ソーティング前 (合計、左側パネル) 並びに CD90⁻ (中央パネル) 及び CD90⁺ (右側パネル) 集団へのソーティング後の健常者由来 CD34⁺ HSC の代表的 FACS プロット。

【図 15 B】図 15 B 及び図 15 C : ddPCR で測定した、ソーティング前 (合計、黒色) 並びに CD90⁺ (明灰色) 及び CD90⁻ (暗灰色) 集団へのソーティング後の 2 名の健常者 (MLP1 ; 図 15 B - SNP の変異型に対してヘテロ接合及び MLP2、図 15 C - SNP の変異型に対してホモ接合) から得た HSC からの切除の割合を表す棒グラフ。ソーティング前の未処理 HSC は対照 (NT) として機能した (n = 2 群の各群中の各健常者由来の細胞)。バーは、標準偏差を伴う平均値を表す。

【図 15 C】図 15 B 及び図 15 C : ddPCR で測定した、ソーティング前 (合計、黒色) 並びに CD90⁺ (明灰色) 及び CD90⁻ (暗灰色) 集団へのソーティング後の 2 名の健常者 (MLP1 ; 図 15 B - SNP の変異型に対してヘテロ接合及び MLP2、図 15 C - SNP の変異型に対してホモ接合) から得た HSC からの切除の割合を表す棒グラフ。ソーティング前の未処理 HSC は対照 (NT) として機能した (n = 2 群の各群中

10

20

30

40

50

の各健常者由来の細胞)。バーは、標準偏差を伴う平均値を表す。

【図16A】図16A～16D：CD11b⁺/CD15⁺好中球への分化。図16A：好中球(CD11b⁺/CD15⁺)サブセットに関して分析された、未処理(NT、左側パネル)及びRNP(ref)処理(右側パネル)健常者(HD-V3、上側パネル)及びSCN-P41患者(下側パネル)分化HSCの代表的FACSプロット。

【図16B】図16B：未処理(NT、黒色)又はRNP(ref)を用いて処理(灰色)された、健常者(HD-V3)及びSCN患者(SCN-P41)分化HSCにおける好中球(CD11b⁺/CD15⁺細胞)の割合に関する個別のFACSデータの定量的分析。(n=3群のHD-V3健常者/SCN-P41患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、****P<.0001として示され、ns=統計学的に有意でない。

10

【図16C】図16C：好中球(CD11b⁺/CD15⁺)サブセットに関して分析された、未処理健常者(HD-V4 NT、左側パネル)、未処理SCN患者(SCN-P55 NT、中央パネル)及びRNP(alt)処理SCN患者(右側パネル)分化HSCの代表的FACSプロット。

【図16D】図16D：未処理健常者(HD-V4 NT；黒色)及び未処理(NT、黒色)か又はRNP(alt)を用いて処理(灰色)されたかのいずれかであるSCN患者(SCN-P55)由来の分化HSCにおける好中球(CD11b⁺/CD15⁺細胞)の割合に関する個別のFACSデータの定量的分析。(n=3群のHD-V4健常者/SCN-P55患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、****P<.0001として示される。バーは、標準偏差を伴う平均値を表す。

20

【図17A】図17A～17B：LCL細胞におけるg62のref及びaltアレルのOMNI-50バリエーション編集活性。編集活性は、NGS解析により決定した。3回の反復の平均及び標準偏差が表示される。

【図17B】図17A～17B：LCL細胞におけるg62のref及びaltアレルのOMNI-50バリエーション編集活性。編集活性は、NGS解析により決定した。3回の反復の平均及び標準偏差が表示される。

【図18A】図18A～18B：g62オフターゲットのOMNI-50バリエーション編集活性。2種類の異なるオフターゲットを試験した：g62 OT1及びg62 OT2。3回の反復の平均及び標準偏差が表示される。

【図18B】図18A～18B：g62オフターゲットのOMNI-50バリエーション編集活性。2種類の異なるオフターゲットを試験した：g62 OT1及びg62 OT2。3回の反復の平均及び標準偏差が表示される。

30

【図19A】図19A～19B：プローブ及びガイドの特異性。図19A：SNPの基本型又は変異型のいずれかに対してホモ接合である健常者(HD)細胞から抽出されたDNAに対する各プローブ(FAM、黒色；HEX、灰色)の結合性をddPCRで測定した。陽性イベントの濃度を表す棒グラフ。(n=3群の細胞)。統計学的有意性は、****P<.0001として示される。

【図19B】図19B：ddPCRで測定した、処理を行っていない(NT)又はRNP(alt)若しくはRNP(ref)で処理した、rs1683564 SNPの基本型に対してホモ接合な健常者のHSCにおける切除の割合を表す棒グラフ。(n=3群の細胞)。統計学的有意性は、****P<.0001として示され、ns=統計学的に有意でない。バーは、標準偏差を伴う平均値を表す。

40

【図20】図20A～20B：OMNIバリエーションである3795ヌクレアーゼ及びsgRNAの各々の編集後に検出されたオフターゲットはない。(図20A～C)全てのリードは標的配列のもので、オフターゲットは検出されていない(4つのミスマッチ)ことを示す、OMNIバリエーションである3795ヌクレアーゼ並びに一定ガイド(図20A、SgRNA(constant))、基本型ガイド(図20B、SgRNA(ref))及び変異型ガイド(図20C、SgRNA(alt))の各々を用いる全ゲノムオフターゲット切断の偏りのない調査(GUIDE-seq)。注記：分析は、rs1683564 SNPの基本型に対してホモ接合であるU2OS細胞において行われた。OMNIバリア

50

ントである3795ヌクレアーゼはアレルの高度な識別力を有するので、sgRNA (alt)を用いる場合、基本型アレルのごくわずかなオンターゲット編集しか生じず(参照シトシン遺伝子型の13個のリード)、検出可能なオフターゲットはない。(図20D)数個の考えられるオフターゲットを描写する、一定、変異型及び基本型ガイドに関するin silicoオフターゲット分析の結果をまとめる表。これらのオフターゲットのいずれも、それぞれRNP (ref)及びRNP (alt)で編集したSCN-P41及びSCN-P55患者由来のHSCに対して行ったrhAmpSeq解析により検証されず、右側の2列を参照されたい。rhAmpSeq検証閾値は、0.2%以上の編集に設定した。

【図21】図21A~21J. SCN-P42及びHD-V5におけるRNP (ref)を用いる切除。(図21A) ddPCRで測定した、RNP (ref)組成物で処理した又はヌクレアーゼ組成物を用いずにエレクトロポレーションした(モック)、健常者(HD-V5)又はSCN患者(SCN-P42)から得たHSCにおける分化6日目の編集されていない基本型アレル(黒色)及び変異型アレル(灰色)の割合を表す棒グラフ。(n=3群のHD-V5健常者/SCN-P42患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、****P<.0001として示され、ns=統計学的に有意でない。(図21B) ddPCRで測定した、健常者(HD-V5):モック処理(モック、黒色)若しくはRNP (ref)処理(灰色)、又はSCN患者(SCN-P42):モック処理(モック、白色)若しくはRNP (ref)処理(暗色斜線)のいずれかから得たHSCの分化の6日目及び14日目の切除の割合を表す棒グラフ。(n=3群のHD-V5健常者/SCN-P42患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、****P<.0001として示される。(図21C)モック処理(黒色)又はRNP (ref)処理(灰色)のいずれかであったSCN-P42患者の6日目の分化したHSCにおけるELANE mRNAレベルを表す棒グラフ。データは、モック群と比較して提示される。(n=3群のSCN-P42患者由来の細胞)。統計学的有意性は、**P<.01として示される。(図21D)変異部位を標的とするNGSで測定した、RNP (ref)処理又はモック処理(モック)のいずれかであったSCN-P42患者HSCから得たcDNA中の野生型(黒色)及び変異型(灰色)アレルの割合を表す棒グラフ。(n=3群のSCN-P42患者由来の細胞)。統計学的有意性は、*P<.05として示される。(図21E)好中球(CD66b⁺)及び単球(CD14⁺/CD66b⁻)サブセットに関して分析された、モック処理(モック、左側パネル)及びRNP (ref)処理(右側パネル)健常者(HD-V5、上側パネル)及びSCN-P42患者(下側パネル)分化HSCの代表的FACSプロット。(図21F)モック処理(モック、黒色)又はRNP (ref)を用いて処理された(灰色)、健常者(HD-V5)及びSCN患者(SCN-P42)分化HSCにおける好中球(CD66b⁺細胞)の割合に関する個別のFACSデータの定量的分析。(n=3群のHD-V5健常者/SCN-P42患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、****P<.0001として示され、ns=統計学的に有意でない。(図21G)モック処理(モック、黒色)又はRNP (ref)を用いて処理された(灰色)、健常者(HD-V5)及びSCN患者(SCN-P42)分化HSCにおける単球(CD14⁺/CD66b⁻細胞)の割合に関する個別のFACSデータの定量的分析。(n=3群のHD-V5健常者/SCN-P42患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、****P<.0001として示され、ns=統計学的に有意でない。(図21H)RNP (ref)で処理した又はヌクレアーゼ組成物を用いずにエレクトロポレーションした(SCN-P42モック)、P42 SCN患者に由来する分化したHSCのDiff-Quik染色。Nikon DSLRデジタルカメラを用いて400×倍率においてLEITZ LABORLUX S偏光顕微鏡上で顕微鏡写真を得た。(図21I)モック処理(モック、黒色)又はRNP (ref)を用いて処理された(灰色)、健常者(HD-V5)及びSCN患者(SCN-P42)分化HSCによるZymosan Green取り込みの割合の定量化。統計学的有意性は、****P<.0001として示され、ns=統計学的に有意でない。(図21J)グラフは、対照のみの細菌細胞(大腸菌、円形)と比較した、健常者モック処理(HD-V5、モック;白色四角形)、患者モック処理(SCN-42モック;×印円形)又

10

20

30

40

50

は患者 RNP (ref) 処理 (SCN-P42 RNP (ref) ; 三角形) HSC 由来の分化した好中球と共にインキュベートされた 200, 000 個のルシフェラーゼ発現細菌細胞からの、発光におけるリアルタイム変化である相対的光単位 (RLU) を描写する。RLU レベルがプラトーに達した提示される最終時点での大腸菌対照に対する群の各 1 つに関する統計学的有意性が、 $****P < .0001$ として示される。バーは、標準偏差を伴う平均値を表す。

【図 22】図 22A~22I: SCN-P12 及び HD-V1 における RNP (alt) を用いる切除。(図 22A) ddPCR で測定した、RNP (alt) 組成物で処理した又はヌクレアーゼ組成物を用いずにエレクトロポレーションした(モック)、健常者 (HD-V1) 又は SCN 患者 (SCN-P12) から得た HSC における分化 6 日目の編集されていない基本型アレル (黒色) 及び変異型アレル (灰色) の割合を表す棒グラフ。(n=3 群の HD-V1 健常者 / SCN-P12 患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、 $****P < .0001$ として示され、ns = 統計学的に有意でない。(図 22B) ddPCR で測定した、健常者 (HD-V1): モック処理 (モック、黒色) 若しくは RNP (alt) 処理 (灰色)、又は SCN 患者 (SCN-P12): モック処理 (モック、白色) 若しくは RNP (alt) 処理 (暗色斜線) のいずれかから得た HSC の分化の 6 日目及び 14 日目の切除の割合を表す棒グラフ。(n=3 群の HD-V1 健常者 / SCN-P12 患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、 $***P < .001$ 、 $****P < .0001$ として示される。(図 22C) モック処理 (黒色) 又は RNP (alt) 処理 (灰色) のいずれかであった SCN-P12 患者の 6 日目の分化した HSC における ELANE mRNA レベルを表す棒グラフ。データは、モック群と比較して提示される。(n=3 群の SCN-P12 患者由来の細胞)。統計学的有意性は、 $*P < .05$ として示される。(図 22D) 変異部位を標的とする NGS で測定した、RNP (alt) 処理又はモック処理 (モック) のいずれかであった SCN-P12 患者 HSC から得た cDNA 中の野生型 (黒色) 及び変異型 (灰色) アレルの割合を表す棒グラフ。(n=3 群の SCN-P12 患者由来の細胞)。統計学的有意性は、 $***P < .001$ として示される。(図 22E) 好中球 (CD66b⁺) 及び単球 (CD14⁺ / CD66b⁻) サブセットに関して分析された、モック処理 (モック、左側パネル) 及び RNP (alt) 処理 (右側パネル) 健常者 (HD-V1、上側パネル) 及び SCN-P12 患者 (下側パネル) 分化 HSC の代表的 FACS プロット。(図 22F) モック処理 (モック、黒色) 又は RNP (alt) を用いて処理された (灰色)、健常者 (HD-V1) 及び SCN 患者 (SCN-P12) 分化 HSC における好中球 (CD66b⁺ 細胞) の割合に関する個別の FACS データの定量的分析。(n=3 群の HD-V1 健常者 / SCN-P12 患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、 $**P < .01$ 、 $***P < .001$ として示される。(図 22G) モック処理 (モック、黒色) 又は RNP (alt) を用いて処理された (灰色)、健常者 (HD-V1) 及び SCN 患者 (SCN-P12) 分化 HSC における単球 (CD14⁺ / CD66b⁻ 細胞) の割合に関する個別の FACS データの定量的分析。(n=3 群の HD-V1 健常者 / SCN-P12 患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、 $****P < .0001$ として示され、ns = 統計学的に有意でない。(図 22H) モック処理 (モック、黒色) 又は RNP (alt) を用いて処理された (灰色)、健常者 (HD-V1) 及び SCN 患者 (SCN-P12) 分化 HSC による Zymosan Green 取り込みの割合の定量化。統計学的有意性は、 $***P < .001$ として示され、ns = 統計学的に有意でない。(図 22I) グラフは、対照のみの細菌細胞 (大腸菌、円形) と比較した、健常者モック処理 (HD-V1、モック; 白色四角形)、患者モック処理 (SCN-P12 モック; ×印円形) 又は患者 RNP (alt) 処理 (SCN-P12 RNP (alt); 三角形) HSC 由来の分化した好中球と共にインキュベートされた 200, 000 個のルシフェラーゼ発現細菌細胞からの、発光におけるリアルタイム変化である相対的光単位 (RLU) を描写する。RLU レベルがプラトーに達した提示される最終時点での大腸菌対照に対する群の各 1 つに関する統計学的有意性が、 $*P < .05$ 、 $*P < .01$ 、 $***P < .001$ として示される。バーは、標準偏差を伴う平均値を表

10

20

30

40

50

す。

【図23】図23A～23I：SCN-P56及びHD-V3におけるRNP (alt)を用いる切除。(図23A) ddPCRで測定した、RNP (alt)組成物で処理した又はヌクレアーゼ組成物を用いずにエレクトロポレーションした(モック)、健常者(HD-V3)又はSCN患者(SCN-P56)から得たHSCにおける分化6日目の編集されていない基本型アレル(黒色)及び変異型アレル(灰色)の割合を表す棒グラフ。(n=3群のHD-V3健常者/SCN-P56患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、**** $P<.0001$ として示され、ns=統計学的に有意でない。(図23B) ddPCRで測定した、健常者(HD-V3)：モック処理(モック、黒色)若しくはRNP (alt)処理(灰色)、又はSCN患者(SCN-P56)：モック処理(モック、白色)若しくはRNP (alt)処理(暗色斜線)のいずれかから得たHSCの分化の6日目の切除の割合を表す棒グラフ。(n=3群のHD-V3健常者/SCN-P56患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、*** $P<.001$ として示される。(図23C) 変異部位を標的とするNGSで測定した、RNP (alt)処理又はモック処理(モック)のいずれかであったSCN-P56患者HSCから得たcDNA中の野生型(黒色)及び変異型(灰色)アレルの割合を表す棒グラフ。(n=3群のSCN-P56患者由来の細胞)。統計学的有意性は、**** $P<.0001$ として示される。(図23D) 好中球(CD66b⁺)及び単球(CD14⁺/CD66b⁻)サブセットに関して分析された、モック処理(モック、左側パネル)及びRNP (alt)処理(右側パネル)健常者(HD-V3、上側パネル)及びSCN-P56患者(下側パネル)分化HSCの代表的FACSプロット。(図23E) モック処理(モック、黒色)又はRNP (alt)を用いて処理された(灰色)、健常者(HD-V3)及びSCN患者(SCN-P56)分化HSCにおける好中球(CD66b⁺細胞)の割合に関する個別のFACSデータの定量的分析。(n=3群のHD-V3健常者/SCN-P56患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、**** $P<.0001$ として示され、ns=統計学的に有意でない。(図23F) モック処理(モック、黒色)又はRNP (alt)を用いて処理された(灰色)、健常者(HD-V3)及びSCN患者(SCN-P56)分化HSCにおける単球(CD14⁺/CD66b⁻細胞)の割合に関する個別のFACSデータの定量的分析。(n=3群のHD-V3健常者/SCN-P56患者ドナー由来の細胞)。統計学的有意性は、 $P=0.04$ 、**** $P<.0001$ として示される。(図23G) RNP (alt)で処理した又はヌクレアーゼ組成物を用いずにエレクトロポレーションした(SCN-P56モック)、P56 SCN患者に由来する分化したHSCのDiff-Quik染色。Nikon DSLRデジタルカメラを用いて400×倍率においてLEITZ LABORLUX S偏光顕微鏡上で顕微鏡写真を得た。(図23H) モック処理(モック、黒色)又はRNP (alt)を用いて処理された(灰色)、健常者(HD-V3)及びSCN患者(SCN-P56)分化HSCによるZymosan Green取り込みの割合の定量化。統計学的有意性は、**** $P<.0001$ として示され、ns=統計学的に有意でない。(図23I) グラフは、対照のみの細菌細胞(大腸菌、円形)と比較した、健常者モック処理(HD-V3、モック；白色四角形)、患者モック処理(SCN-P56モック；×印円形)又は患者RNP (alt)処理(SCN-P56 RNP (alt)；三角形)HSC由来の分化した好中球と共にインキュベートされた200,000個のルシフェラーゼ発現細菌細胞からの、発光におけるリアルタイム変化である相対的光単位(RLU)を描写する。RLUレベルがプラトーに達した提示される最終時点での大腸菌対照に対する群の各1つに関する統計学的有意性が、** $P<.01$ として示される。バーは、標準偏差を伴う平均値を表す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

詳細な説明

本開示は、野生型OMNI-50ヌクレアーゼ(配列番号1)と比較して標的部位に対する特異性が増加した遺伝子改変OMNI-50ヌクレアーゼを提供する。野生型OMN

10

20

30

40

50

Ｉ－５０ヌクレアーゼは、国際公開第2020/030782号（参照により明細書に組み込まれる）に開示されている。遺伝子改変OMNI－５０ヌクレアーゼバリエントがCRISPRエンドヌクレアーゼ系で活性の場合、CRISPRエンドヌクレアーゼ系は、野生型OMNI－５０ヌクレアーゼを含むCRISPRエンドヌクレアーゼ系と比較して、オフターゲット編集活性が減少し、オンターゲット編集活性が維持されている。いくつかの態様では、遺伝子改変OMNI－５０ヌクレアーゼは、野生型OMNI－５０ヌクレアーゼと比較して少なくとも1か所のアミノ酸置換を含むOMNI－５０ヌクレアーゼバリエントである。いくつかの態様では、遺伝子改変OMNI－５０ヌクレアーゼは、野生型OMNI－５０ヌクレアーゼと比較して複数のアミノ酸置換を含む。

【0026】

いくつかの態様では、OMNI－５０ヌクレアーゼバリエントは、配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも80%、例えば、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一である。限定するものではない例として、OMNI－５０ヌクレアーゼバリエントは、配列番号1と比較してその残基の最大1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、又は20%でのアミノ酸差異を有してもよい。そのような配列差異は、配列アライメントにより明らかにされてもよい。OMNI－５０ヌクレアーゼバリエントは、別のアミノ酸残基によって、例えば、保存的若しくは非保存的アミノ酸置換によって、OMNI－５０野生型ヌクレアーゼの少なくとも1個のアミノ酸残基を置きかえることにより、及び／又はOMNI－５０野生型ヌクレアーゼのアミノ酸残基を挿入若しくは欠失させることにより、生成されてもよい。この明細書に記載のいずれかの他の変異に加えて、又はこの明細書に記載の変異に追加される変異と共に、限定するものではないが、置換、挿入、又は欠失をはじめとするいずれかのそのような変異を、OMNI－５０野生型ヌクレアーゼからOMNI－５０ヌクレアーゼバリエントを生成するために用いてもよい。いくつかの態様では、OMNI－５０ヌクレアーゼバリエントは、親の野生型OMNI－５０ヌクレアーゼの所望の活性、例えば、ガイドRNA及び標的DNAと相互作用する能力並びに／又はヌクレアーゼの活性（例．二本鎖DNA切断、一本鎖DNA切断を引き起こす能力、又はいずれかのヌクレアーゼ若しくはニッカーゼ活性の欠如）を保持する。いくつかの態様では、バリエントは、親の活性のレベルを超えるか又はそれに等しいレベルで、親の所望の活性、例えば、ヌクレアーゼ活性を保持する。いくつかの態様では、バリエントは、親の活性のレベルの少なくとも100%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、又は30%のレベルで、親の所望の活性を保持する。いくつかの態様では、OMNI－５０ヌクレアーゼバリエントは、OMNI－５０野生型ヌクレアーゼと比較して、オフターゲット作用が減少する。

【0027】

いくつかの態様では、野生型OMNI－５０のアミノ酸配列（配列番号1）に対して少なくとも80%同一である配列を含み、少なくとも1か所のアミノ酸置換を有するOMNI－５０ヌクレアーゼタンパク質のバリエントを提供する。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、正の、負の、非荷電、親水性、疎水性、極性、又は非極性アミノ酸へのアミノ酸残基の置きかえを含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、R、K、H、D、E、S、T、N、Q、C、U、G、P、A、I、L、M、F、W、Y及びVからなる群より選択される異なるアミノ酸のいずれか1つへのアミノ酸の置きかえから選択される。

【0028】

正のアミノ酸としては、正に荷電したR基を有するいずれかのアミノ酸、例えば、リジン（K）、アルギニン（R）、又はヒスチジン（H）が挙げられる。負のアミノ酸としては、負に荷電したR基を有するいずれかのアミノ酸、例えば、アスパラギン酸（D）又はグルタミン酸（E）が挙げられる。非荷電アミノ酸又は中性アミノ酸としては、そのR基が通常は電荷を帯びていないアミノ酸が挙げられる。極性アミノ酸としては、極性R基を有するいずれかのアミノ酸、例えば、セリン（S）、トレオニン（T）、チロシン（Y）

10

20

30

40

50

、アスパラギン（N）、又はグルタミン（Q）が挙げられる。非極性アミノ酸としては、非極性R基を有するいずれかのアミノ酸、例えば、グリシン（G）、アラニン（A）、バリン（V）、システイン（C）、プロリン（P）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、メチオニン（M）、トリプトファン（W）、又はフェニルアラニン（F）が挙げられる。

【0029】

異なるアミノ酸置換が元来のアミノ酸置換と同様の特性を有するR基を有する場合、所与の位置での元来のアミノ酸置換を有する元来のバリエーションタンパク質の特性は、同じ位置での異なるアミノ酸置換を有する異なるバリエーションに及んでよい。例えば、バリエーションタンパク質がリジン（K）残基からグルタミン酸（E）残基に置換することにより、野生型タンパク質と比較して高い特異性を有することが示される場合、リジン（K）とアルギニン（R）の両者が同様の特性を共有する（例、それらの両者が正に荷電したR基を含有する）ので、アルギニン（R）残基からグルタミン酸（E）残基に置換する同様のバリエーションもまた、より高い特異性を示すと考えるのが合理的である。逆に、グルタミン酸（E）とアスパラギン酸（D）の両者が、両者とも負に荷電したR基を含有する同様の特性を共有するので、グルタミン酸（E）残基からアスパラギン酸（D）への置換を有するバリエーションは、より高い特異性特性を示す可能性は低い。

【0030】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列（配列番号1）中の以下の位置の少なくとも1か所においてアミノ酸置換を含有する：R61、Y437、R478、A493、Y545、G606、K688、L690、E695、L718、R788、Q803、L805、L844、K965、V981及びK1036。それぞれの実現可能性は個別の態様である。いくつかの態様では、野生型OMNI-50ヌクレアーゼのアミノ酸配列（配列番号1）に対して少なくとも80%同一である配列を含み、野生型OMNI-50タンパク質配列中の以下の位置の少なくとも1か所において少なくとも1か所のアミノ酸置換を有するOMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションを提供する：R61、Y437、R478、A493、Y545、G606、K688、L690、E695、L718、R788、Q803、L805、L844、K965、V981及びK1036。いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列中の以下の位置における以下のアミノ酸置換の少なくとも1つを含む：R478I、Y545H、Q803V、L805I、R61A、Y437W、R788K、L844N、V981M、G606P、L690V、E695Q、R478T、A493G、K688E、L718C、K965V及びK1036V。それぞれの実現可能性は個別の態様である。いくつかの態様では、置換は表1において列記される変異に対応する。

【0031】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列中の以下の位置における少なくとも1か所のアミノ酸置換を含む：R478、Y545、Q803、及びL805。いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列中の以下の位置にアミノ酸置換を含む：R478、Y545、Q803、及びL805。いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列からの以下のアミノ酸置換を含む：R478I、Y545H、Q803V、及びL805I。

【0032】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列中の以下の位置における少なくとも1か所のアミノ酸置換を含む：R61、Y437、R788、L844、及びV981。いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列中の以下の位置にアミノ酸置換を含む：R61、Y437、R788、L844、

及びV981。いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列からの以下のアミノ酸置換を含む：R61A、Y437W、R788K、L844N、及びV981M。

【0033】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列中の以下の位置における少なくとも1か所のアミノ酸置換を含む：G606、L690、及びE695。いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列中の以下の位置にアミノ酸置換を含む：G606、L690、及びE695。いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列からの以下のアミノ酸置換を含む：G606P、L690V、及びE695Q。

10

【0034】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列中の以下の位置における少なくとも1か所のアミノ酸置換を含む：R478、A493、K688、L718、K965及びK1036。いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列中の以下の位置にアミノ酸置換を含む：R478、A493、K688、L718、K965V及びK1036。いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションは、野生型OMNI-50タンパク質配列からの以下のアミノ酸置換を含む：R478T、A493G、K688E、L718C、K965V及びK1036V。

20

【0035】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、核移行配列（NLS）、細胞膜透過性ペプチド配列、及び／又はアフィニティタグの1種以上を更に含む。ある態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、真核生物細胞の核において検出可能な量でのCRISPRヌクレアーゼを含むCRISPR複合体の蓄積を駆動するために十分な強度の1種以上の核移行配列を含む。

【0036】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、表1において野生型OMNI-50と比較して表示される置換に対応するアミノ酸置換から選択されるアミノ酸置換を含む。

30

【0037】

いくつかの態様では、野生型OMNI-50ヌクレアーゼ配列と比較して1か所以上の置換又は変異を含む単離されたOMNI-50ヌクレアーゼタンパク質のバリエーションを提供し、前記単離されたOMNI-50ヌクレアーゼバリエーションはCRISPR系において活性で、前記CRISPR系は、野生型CRISPR系と比較して、オフターゲット編集活性が減少しオンターゲット編集活性が維持されている。

【0038】

いくつかの態様では、この明細書に記載のOMNI-50ヌクレアーゼバリエーションに対する追加の変異が実行されてもよい。例としては、限定するものではないが、PAM認識配列を変化させるか、酵素のヌクレアーゼ活性を変化させる変異、及びヌクレアーゼの一部の切断又は除去が挙げられる。いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、バリエーションの所望のアミノ酸配列を生成するいずれかの核酸配列によりコードされてもよい。例えば、核酸配列は、細菌細胞、植物細胞、又は哺乳動物細胞のような細胞に対してコドン最適化されてもよい。

40

【0039】

本発明の態様では、CRISPRヌクレアーゼ及び標的化分子は、標的DNA配列の切断をもたらすために標的DNA配列に結合するCRISPR複合体を形成する。CRISPRヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ及びシングलगイドRNA（sgRNA）分子を含むCRISPR複合体を形成してもよい。あるいは、CRISPRヌクレアー

50

ぜは、C R I S P Rヌクレアーゼ、c r R N A分子及びt r a c r R N A分子を含むC R I S P R複合体を形成してもよい。

【0040】

本発明のいくつかの態様では、好適なガイドRNA又はガイドRNA複合体と複合体を形成したO M N I－50タンパク質バリエーションを有する活性C R I S P Rエンドヌクレアーゼ系と標的部位遺伝子座を接触させることであって、活性C R I S P Rエンドヌクレアーゼ系は、野生型O M N I－50 C R I S P R系と比較して、オフターゲット編集活性が減少し、オンターゲット編集活性が維持されている、接触させることを含む、オフターゲット編集活性が減少し、及び／又はオンターゲット編集活性が増加している遺伝子編集の方法を提供する。

10

【0041】

いくつかの態様では、以下の位置の少なくとも1か所にアミノ酸置換を含む野生型O M N I－50タンパク質配列（配列番号1）を有する天然に存在しないO M N I－50ヌクレアーゼバリエーションを提供する：R 61、Y 437、R 478、A 493、Y 545、G 606、K 688、L 690、E 695、L 718、R 788、Q 803、L 805、L 844、V 981、K 965及びK 1036。

【0042】

いくつかの態様では、R 478位及び／又はY 545位、好ましくはR 478位とY 545位の両者のアミノ酸置換。

【0043】

いくつかの態様では、O M N I－50ヌクレアーゼバリエーションは、R 478位及びY 545位の各々のアミノ酸置換を含む。

20

【0044】

いくつかの態様では、R 478位のアミノ酸置換は、以下の置換のいずれか1つである：R 478 D、R 478 E、R 478 S、R 478 T、R 478 N、R 478 Q、R 478 G、R 478 P、R 478 C、R 478 A、R 478 V、R 478 I、R 478 L、R 478 M、R 478 F、R 478 Y、又はR 478 W、好ましくはR 478 V、R 478 H、R 478 L、R 478 M、R 478 P、R 478 F、R 478 W、R 478 Y、R 478 S、R 478 C、R 478 T、R 478 N、又はR 478 Q。

【0045】

いくつかの態様では、アミノ酸置換はR 478位のものであり、アルギニンを置換するアミノ酸は、負に荷電したR基又は電荷のないR基を有するアミノ酸である。

30

【0046】

いくつかの態様では、アミノ酸置換はR 478位のものであり、アルギニンを置換するアミノ酸は、極性アミノ酸又は非極性アミノ酸である。

【0047】

いくつかの態様では、アミノ酸置換はR 478位のものであり、アルギニンを置換するアミノ酸は、非極性アミノ酸である。

【0048】

いくつかの態様では、Y 545位のアミノ酸置換は、以下の置換のいずれか1つである：Y 545 D、Y 545 E、Y 545 S、Y 545 T、Y 545 N、Y 545 Q、Y 545 G、Y 545 P、Y 545 C、Y 545 A、Y 545 V、Y 545 I、Y 545 L、Y 545 M、Y 545 F、Y 545 R、Y 545 K、Y 545 H、又はY 545 W、好ましくはY 545 W、Y 545 F、Y 545 H、Y 545 V、又はY 545 G。

40

【0049】

いくつかの態様では、アミノ酸置換はY 545位のものであり、チロシンを置換するアミノ酸は、負に荷電したR基又は正に荷電したR基を有するアミノ酸である。

【0050】

いくつかの態様では、アミノ酸置換はY 545位のものであり、チロシンを置換するアミノ酸は、非極性アミノ酸である。

50

【0051】

いくつかの態様では、アミノ酸置換はY545位のものであり、チロシンを置換するアミノ酸は、フェニル環を欠くか又はフェニルアラニンである。

【0052】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、R478I及びY545Hである。

【0053】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、以下の置換のいずれか1つである：R478I、Y545H、Q803V、L805I、R61A、Y437W、R788K、L844N、V981M、G606P、L690V、E695Q、R478T、A493G、K688E、L718C、K965V及びK1036V。

10

【0054】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、R478位、Y545位、Q803位、及びL805位の各々のアミノ酸置換を含む。

【0055】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、R478I、Y545H、Q803V、及びL805Iである。

【0056】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、R61位、Y437位、R788位、L844位、及びV981位の各々のアミノ酸置換を含む。

【0057】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、R61A、Y437W、R788K、L844N、及びV981Mである。

20

【0058】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、G606位、L690位、及びE695位の各々のアミノ酸置換を含む。

【0059】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、G606P、L690V、及びE695Qである。

【0060】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、R478位、A493位、K688位、L718位、K965位及びK1036位の各々のアミノ酸置換を含む。

30

【0061】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、R478T、A493G、K688E、L718C、K965V及びK1036Vである。

【0062】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、Q803位のアミノ酸置換を含む。

【0063】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、Q803Vである。

40

【0064】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、Y545位のアミノ酸置換を含む。

【0065】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、Y545Hである。

【0066】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、L805位のアミノ酸置換を含む。

【0067】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、L805Iである。

50

【0068】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエントは、R478位、Y545位、及びQ803位の各々のアミノ酸置換を含む。

【0069】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、R478I、Y545H、及びQ803Vである。

【0070】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエントは、R478位、Y545位、及びL805位の各々のアミノ酸置換を含む。

【0071】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、R478I、Y545H、及びL805Iである。

【0072】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエントは、R478位、Q803位、及びL805位の各々のアミノ酸置換を含む。

【0073】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、R478I、Q803V、及びL805Iである。

【0074】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエントは、Y545位、Q803位、及びL805位の各々のアミノ酸置換を含む。

【0075】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、R478I、Y545H、及びL805Iである。

【0076】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエントは、R478位及び／又はY545位のアミノ酸置換を含む。

【0077】

いくつかの態様では、R478位のアミノ酸置換は、以下の置換のいずれか1つである：R478D、R478E、R478S、R478T、R478N、R478Q、R478G、R478P、R478C、R478A、R478V、R478I、R478L、R478M、R478F、R478Y、又はR478W。

【0078】

いくつかの態様では、アミノ酸置換はR478位のものであり、アルギニンを置換するアミノ酸は、負に荷電したR基又は電荷のないR基を有するアミノ酸である。

【0079】

いくつかの態様では、アミノ酸置換はR478位のものであり、アルギニンを置換するアミノ酸は、極性アミノ酸又は非極性アミノ酸である。

【0080】

いくつかの態様では、アミノ酸置換はR478位のものであり、アルギニンを置換するアミノ酸は、非極性アミノ酸である。

【0081】

いくつかの態様では、アミノ酸置換はR478位のものであり、アルギニンを置換するアミノ酸は、大型疎水性アミノ酸（例、ロイシン、メチオニン、プロリン、バリン）、芳香族アミノ酸（例、ヒスチジン、フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）、及び極性非荷電アミノ酸（例、セリン、システイン、トレオニン、アスパラギン、及びグルタミン）から選択される。

【0082】

いくつかの態様では、Y545位のアミノ酸置換は、以下の置換のいずれか1つである：Y545D、Y545E、Y545S、Y545T、Y545N、Y545Q、Y54

10

20

30

40

50

5 G、Y 5 4 5 P、Y 5 4 5 C、Y 5 4 5 A、Y 5 4 5 V、Y 5 4 5 I、Y 5 4 5 L、Y 5 4 5 M、Y 5 4 5 F、Y 5 4 5 R、Y 5 4 5 K、Y 5 4 5 H、又は Y 5 4 5 W。

【0083】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は Y 5 4 5 位のものであり、チロシンを置換するアミノ酸は、負に荷電した R 基又は正に荷電した R 基を有するアミノ酸である。

【0084】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は Y 5 4 5 位のものであり、チロシンを置換するアミノ酸は、正に荷電した R 基を有するアミノ酸である。正に荷電したアミノ酸の限定するものではない例としては、ヒスチジン、リジン及びアルギニンが挙げられる。

【0085】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は Y 5 4 5 位のものであり、チロシンを置換するアミノ酸は、非極性アミノ酸である。非極性アミノ酸の限定するものではない例としては、グリシン、アラニン、バリン、プロリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、トリプトファン及びフェニルアラニンが挙げられる。

【0086】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は Y 5 4 5 位のものであり、チロシンを置換するアミノ酸は、フェニル環を欠くか又はフェニルアラニンである。

【0087】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は Y 5 4 5 位のものであり、チロシンを置換するアミノ酸は、フェニル環を含む（例、フェニルアラニン）。

【0088】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエントは、R 4 7 8 位及び Y 5 4 5 位の各々のアミノ酸置換を含む。

【0089】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は、R 4 7 8 I 及び Y 5 4 5 H である。しかし、R 4 7 8 位及び Y 5 4 5 位の他のアミノ酸置換もまた考慮される。限定するものではない例として、アラニン（A）、バリン（V）、及びロイシン（L）のような、イソロイシンと同様の非極性特性（non-polar to properties）を有する R 基を有するアミノ酸が、R 4 7 8 位で考慮される置換である。別の限定するものではない例では、メチオニン（M）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、及びトリプトファン（W）のような、イソロイシンと同様の非極性特性（non-polar to properties）を有する R 基を有するアミノ酸が、R 4 7 8 位で考慮される置換である。

【0090】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエントは、配列番号 2～5、63～70、及び 89～97 からなる群より選択される配列番号で示されるアミノ酸配列を有する。

【0091】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエントは、野生型 OMNI-50タンパク質配列（配列番号 1）に対して少なくとも 80% 配列同一性を有する。

【0092】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエントは、核移行配列（NLS）を更に含む。

【0093】

いくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエントは、ガイド RNA 分子と複合体を形成した野生型 OMNI-50ヌクレアーゼと比較して、バリエントを DNA 標的部位に向けるガイド RNA 分子と複合体を形成した場合に、DNA 標的部位に対する特異性が増加する。

【0094】

本発明のいくつかの態様では、DNA 標的部位を標的とするガイド RNA 分子と複合体を形成したこの明細書に記載の OMNI-50ヌクレアーゼバリエントのいずれか 1 つを

10

20

30

40

50

含むCRISPR系であって、野生型OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質及びガイドRNA分子を含む野生型CRISPR系と比較して、オフターゲット編集活性が減少したCRISPR系を提供する。

【0095】

本発明のいくつかの態様では、この明細書に記載のOMNI-50ヌクレアーゼバリエーションタンパク質のいずれか1つを含む活性CRISPR系とDNA標的部位を接触させることを含む、オフターゲット編集活性が減少した遺伝子編集方法を提供する。

【0096】

いくつかの態様では、活性CRISPR系は、野生型OMNI-50ヌクレアーゼタンパク質を含む野生型CRISPR系と比較して、オフターゲット編集活性が減少している。

10

【0097】

いくつかの態様では、遺伝子編集は、真核細胞又は原核細胞中で行われる。

【0098】

いくつかの態様では、真核細胞は、植物細胞又は哺乳動物細胞である。

【0099】

いくつかの態様では、哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【0100】

いくつかの態様では、DNA標的部位は、遺伝子の病原性アレル内又はその近傍に位置する。

20

【0101】

いくつかの態様では、DNA標的部位は、ELANE、CXCR4、EMX、RyR2、KNCQ1、KCNH2、SCN5a、GBA1、GBA2、ロドプシン、GUCY2D、IMPDH1、FGA、BEST1、PRPH2、KRT5、KRT14、ApoA1、STAT3、STAT1、ADA2、RPS19、SBDS、GATA2、RPE65、LDLR、ANGPTL3、B2M、TRAC、TCF4、TGFB β 、PAX6、C3、LRRK2、SARM1、SAMD9、SAMD9L、HAVCR2、CD3E、APLP2、CISH、TIGIT、TNNT2、TNN、MYH7、及びHLA-Eからなる群より選択される遺伝子内に位置する。

【0102】

いくつかの態様では、DNA標的は、外因性ドナー分子によって修復される。

30

【0103】

いくつかの態様では、オフターゲット編集活性は、少なくとも2分の1、10分の1、10²分の1、10³分の1、10⁴分の1、10⁵分の1、又は10⁶分の1まで減少する。

【0104】

本発明のいくつかの態様では、この明細書に記載の方法より得られる改変細胞を提供する。

【0105】

いくつかの態様では、細胞は、生着が可能である。

40

【0106】

いくつかの態様では、細胞は、生着後に子孫細胞を生じさせることが可能である。

【0107】

いくつかの態様では、細胞は、自家生着後に子孫細胞を生じさせることが可能である。

【0108】

いくつかの態様では、細胞は、生着の少なくとも12月間又は少なくとも24月間後に子孫細胞を生じさせることが可能である。

【0109】

いくつかの態様では、細胞は、造血幹細胞、前駆細胞、CD34+造血幹細胞、骨髓細胞、及び末梢単核細胞からなる群より選択される。

50

【0110】

本発明のいくつかの態様では、この明細書に記載の改変細胞のいずれか1つ及び薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。本発明のいくつかの態様では、細胞を薬学的に許容される担体と混合することを含む、組成物を調製するin vitro又はex vivo方法を提供する。

【0111】

本発明のいくつかの態様では、この明細書に記載のOMNI-50バリエーションタンパク質のいずれか1つをコードするポリヌクレオチド分子を提供する。

【0112】

送達

10

この明細書に記載のOMNI-50バリエーション組成物は、タンパク質、DNA分子、RNA分子、リボ核タンパク質(RNP)、核酸ベクター、又はそれらのいずれかの組合せとして送達されてもよい。いくつかの態様では、RNA分子は、化学修飾を含む。好適な化学修飾の限定するものではない例としては、2'-O-メチル(M)、2'-O-メチル、3'-ホスホロチオエート(MS)又は2'-O-メチル、3'チオPACE(MSP)、シュードウリジン、及び1-メチルシュードウリジンが挙げられる。それぞれの実現可能性はこの発明の個別の態様である。

【0113】

OMNI-50バリエーション及び／若しくはこの明細書に記載のOMNI-50バリエーションをコードするポリヌクレオチド、並びに／又はシングलगайдRNA分子、crRNA分子、tracrRNA分子若しくはそのいずれか1つをコードするヌクレオチド分子のような追加の分子を、いずれかの好適な手段により、標的細胞に送達してもよい。標的細胞は、いずれかの環境中の、例えば単離されたか又はされていない、培養中、in vitro、ex vivo、in vivo又はin plantaに維持される、いずれかのタイプの細胞、例えば、真核細胞又は原核細胞であってもよい。標的細胞中の標的部位は、細胞の核内であってもよい。

20

【0114】

この明細書に記載の組成物は、例えば、複製起点、プロモーター及び抗生物質耐性をコードする遺伝子のような追加の配列を有するベクター分子の一部として、細胞に導入してもよい。さらに、組成物は、裸の核酸若しくはタンパク質として、リポソーム、エクソソーム、若しくはポロキサマーのような薬剤と複合体を形成したか若しくはその内部にパッケージングされた核酸若しくはタンパク質として細胞に導入されてもよい。又は組換えウイルス(例、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス及びインテグラーゼ欠損レンチウイルス(IDLV))若しくはウイルス様粒子により送達できる。限定するものではない例として、組成物は、アデノ随伴ウイルス(AAV)に、又は非組み込み型レンチウイルス若しくは逆転写能を欠くレンチウイルスのようなレンチウイルスにパッケージングしてもよい。追加の限定するものではない例としては、リポソーム、細胞外ベシクル又はエクソソームに組成物をパッケージングすることが挙げられ、これらは、水疱性口内炎糖タンパク質(VSVG)を用いて偽型化されるか、又は細胞膜透過性ペプチド、抗体、標的化部分若しくはそれらのいずれかの組合せとコン

30

40

【0115】

いくつかの態様では、送達対象である組成物は、ヌクレアーゼのmRNA及びガイドのRNAを含む。いくつかの態様では、送達対象である組成物は、ヌクレアーゼのmRNA、ガイドのRNA及びドナー鋳型を含む。いくつかの態様では、送達対象である組成物は、CRISPRヌクレアーゼ及びガイドRNAを含む。いくつかの態様では、送達対象である組成物は、CRISPRヌクレアーゼ、ガイドRNA及び、例えば、相同組換え修復を介する遺伝子編集のためのドナー鋳型を含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼのmRNA及びガイドRNA分子(例、シングलगайдRNA分子又はcrRNA分子)を含み、ヌクレアーゼを標的部位に誘導するために用いられる。いくつかの態

50

様では、細胞に送達される組成物は、ヌクレアーゼのmRNA、ガイドRNA分子及びドナー鑄型分子を含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼタンパク質バリエーション及びガイドRNA分子を含む。場合によっては、細胞に送達される組成物は、ヌクレアーゼタンパク質バリエーション、ガイドRNA分子及び／又は相同組換え修復のためのドナー鑄型を含む。場合によっては、細胞に送達される組成物は、ヌクレアーゼバリエーションのmRNA、DNAターゲティングcrRNA分子及びtracrRNA分子を含む。細胞に送達される組成物は、ヌクレアーゼバリエーションのmRNA、DNAターゲティングcrRNA分子及びtracrRNA分子、並びにドナー鑄型分子を含む。細胞に送達される組成物は、ヌクレアーゼタンパク質バリエーション、DNAターゲティングcrRNA分子及びtracrRNA分子を含む。場合によっては、細胞に送達される組成物は、ヌクレ

10

【0116】

いずれかの好適なウイルスベクター系を、そのような組成物を送達するために用いてもよい。慣用のウイルス又は非ウイルスベースの遺伝子導入方法を、細胞（例、哺乳動物細胞、植物細胞等）及び標的組織中に核酸及び／又はOMNI-50バリエーションタンパク質を導入するために使用できる。そのような方法はまた、in vitroで細胞にOMNI-50バリエーションタンパク質をコードする核酸及び／又はOMNI-50バリエーションタンパク質を投与するためにも使用できる。特定の態様では、核酸及び／又はOMNI-50バリエーションタンパク質は、in vivo又はex vivo遺伝子療法用途のために投与される。非ウイルスベクター送達系としては、裸の核酸、及びリポソーム又はポロキサマーのような送達ビヒクルと複合体を形成された核酸が挙げられる。遺伝子治療の手順の総説については、Anderson, Science 256:808-813 (1992); Nabel & Felgner, TIBTECH 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, TIBTECH 11:162-166 (1993); Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993); Miller, Nature 357:455-460 (1992); Van Brunt, Biotechnology 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohm (eds.) (1995)及びYu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994)を参照。

20

30

【0117】

核酸及び／又はタンパク質の非ウイルス送達法には、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティックス、パーティクルガン加速、ピロソーム、ウイルス様粒子、エクソソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン若しくは脂質：核酸コンジュゲート、人工ビリオン、及び薬剤による核酸の取込み促進が含まれ、又は、バクテリア若しくはウイルス（例、アグロバクテリウム (Agrobacterium)、リゾビウム (Rhizobium) sp. NGR234、シノリゾボイウム メリロティ (Sinorhizobium meliloti)、メソリゾビウム ロティ (Mesorhizobium loti)、タバコモザイクウイルス、ジャガイモウイルスX、カリフラワーモザイクウイルス、キャッサバベインモザイクウイルス) によって植物細胞に送達できる。例えばChung et al. Trends Plant Sci. (2006)を参照。例えば、Sonitron 2000系 (Rich-Mar) を使用したソノポレーションも、核酸の送達に使用できる。タンパク質及び／又は核酸のカチオン性脂質媒介送達も、in vivo又はin vitro送達方法として予定されている。Zuris et al., Nat. Biotechnol. (2015)、Coelho et al., N. Engl. J. Med. (2013); Judge et al., Mol. Ther. (2006)及びBasha et al., Mol. Ther. (2011)を参照。

40

【0118】

トランスポゾンベースの系（例、組換えSleeping Beautyトランスポゾン系又は組換えPiggyBacトランスポゾン系）といった非ウイルスベクターも、標的細胞に送達して、標的細胞で組成物の分子のポリヌクレオチド配列又は組成物の分子をコードするポリヌクレオチド配列の転移に利用してもよい。

50

【0119】

別の代表的な核酸送達系には、Amaya (登録商標) Biosystems (Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc. (Rockville, Md.)、BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, Mass.) 及び Copernicus Therapeutics Inc. (例えば、米国特許第6,008,336号を参照) が提供するものが含まれる。リポフェクティンは、例えば、米国特許第5,049,386号、米国特許第4,946,787号及び米国特許第4,897,355号に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている (例、Transfectam (登録商標)、Lipofectin (登録商標) 及び Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX)。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適したカチオン性及び中性脂質は、国際公開第91/17424号及び同第91/16024号に開示のものが含まれる。細胞 (ex vivo 投与) 又は標的組織 (in vivo 投与) への送達が可能である。

10

【0120】

免疫脂質複合体などの標的リポソームを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者に広く知られている (例えば、Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); 米国特許第4,186,183号、同第4,217,344号、同第4,235,871号、同第4,261,975号、同第4,485,054号、同第4,501,728号、同第4,774,085号、同第4,837,028号及び同第4,946,787号を参照)。

20

【0121】

別の送達方法には、EnGeneIC送達ビヒクル (EDV) 中に送達される核酸のパッケージングを使用することが含まれる。EDVは、抗体の一方のアームが標的組織に対して特異性を有し、もう一方のアームがEDVに対して特異性を有する二重特異性抗体を使用して、標的組織に特異的に送達する。抗体はEDVを標的細胞の表面に運び、次いで、EDVはエンドサイトーシスによって細胞内に運ばれる。細胞に入ると、内容物が放出される (MacDiamid et al (2009) Nature Biotechnology 27(7) p. 643参照)。

【0122】

核酸の送達のためのRNA又はDNAウイルスに基づく系の使用は、ウイルスを体内の特異的細胞に向け、核にウイルスペイロードを輸送するための高度に発達した方法を利用する。ウイルスベクターは、患者に直接的に投与できるか (in vivo) 又はin vitroで細胞を処理するために使用でき、改変細胞は患者に投与される (ex vivo)。核酸の送達のための慣用のウイルスに基づく系としては、限定するものではないが、遺伝子導入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス及び単純ヘルペスウイルスベクターが挙げられる。宿主ゲノムへのインテグレーションは、レトロウイルス、レンチウイルス、及びアデノ随伴ウイルス遺伝子導入法を用いて可能であり、しばしば、挿入された導入遺伝子の長期的発現をもたらす。加えて、多数の異なる細胞タイプ及び標的組織において、高い形質導入効率が観察されている。OMNIE-50バリエーション又はバリエーションを発現する核酸、及びいずれかの関連する核酸は、非組み込み型レンチウイルスにより送達されてもよい。場合によっては、レンチウイルスを用いるRNA送達が利用される。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼのmRNA及びガイドRNA分子 (例、シングルガイドRNA分子又はcrRNA分子) を含み、ヌクレアーゼを標的部位に向けるために用いられる。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼのmRNA、ガイドRNA分子及びドナー鋳型分子を含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼタンパク質バリエーション及びガイドRNA分子を含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼタンパク質バリエーション、ガイドRNA分子及び／又は相同組換え修復のためのドナー鋳型分子を含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼバリエーションのmRNA、DNAターゲティングcrRNA分子及びtracrRNA分子を含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼバリエーションのmRNA、DNAターゲティングcrRNA分子及びtracrRNA分子を含む。

30

40

50

N A 分子、並びにドナー鑄型分子を含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼタンパク質バリエーション、DNA ターゲティング c r R N A 分子及び t r a c r R N A 分子を含む。場合によっては、レンチウイルスは、ヌクレアーゼタンパク質バリエーション、DNA ターゲティング c r R N A 分子及び t r a c r R N A 分子、並びに相同組換え修復のためのドナー鑄型分子を含む。

【0123】

これまでに説明したように、この明細書に記載の組成物は、非組み込み型レンチウイルス粒子法、例えば、LentiFlash（登録商標）系を用いて標的細胞に送達してもよい。標的細胞へのRNAの送達、標的細胞の内部でのこの明細書に記載の組成物のアセンブリをもたらすように、そのような方法を、標的細胞に、mRNA又は他のタイプのRNAを送達するために用いてもよい。国際公開第2013/014537号、同第2014/016690号、同第2016/185125号、同第2017/194902号及び同第2017/194903号も参照。

10

【0124】

レトロウイルスのトロピズムは、外来エンベロープタンパク質を組み込むことによって変更でき、標的細胞の潜在的な標的を拡大する。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入又は感染できるレトロウイルスベクターであり、通常、高いウイルス力価を生み出す。レトロウイルス遺伝子導入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大6〜10 kbの外来配列をパッケージングできるシス作用性の長い末端反復配列で構成されている。最小限のシス作用LTRが、ベクターの複製とパッケージングに十分で、その後、治療用遺伝子を標的細胞に組み込んで、恒久的な導入遺伝子の発現を提供するために使用される。広く使用されているレトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス（MuLV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）及びそれらの組合せに基づくものが含まれる（例えば、Buchscher Panganiban, J. Virol. (1992); Johann et al., J. Virol. (1992); Sommerfelt et al., Virol. (1990); Wilson et al., J. Virol. (1989); Miller et al., J. Virol. (1991); 国際公開第94/26877号を参照）。

20

【0125】

臨床試験において、現在、少なくとも6種のウイルスベクター法が遺伝子導入に利用でき、ヘルパー細胞株に挿入された遺伝子による欠陥ベクターの補完を含む方法を利用して、形質導入剤を生成する。

30

【0126】

p L A S N 及び M F G - S は、臨床試験で使用されているレトロウイルスベクターの例である（Dunbar et al., Blood (1995); Kohn et al., Nat. Med. (1995); Mal ech et al., PNAS (1997)）。P A 3 1 7 / p L A S N は、遺伝子治療で使用された最初の治療用ベクターである（Blaese et al., Science (1995)）。M F G - S パッケージ化ベクターでは、50%以上の形質導入効率が観察されている（Ellem et al., Immunol Immunother. (1997); Dranoff et al., Hum. Gene Ther. (1997)）。

【0127】

パッケージングされる細胞は、宿主細胞に感染できるウイルス粒子を形成するために使用される。そのような細胞には、アデノウイルスAAVをパッケージする293細胞、及びレトロウイルスをパッケージする、psi. 2細胞又はPA317細胞が含まれる。遺伝子治療で使用するウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージングするプロデューサー細胞株によって得られる。ベクターは、通常、パッケージングとその後の宿主への組み込み（該当する場合）に必要な最小限のウイルス配列、発現されるタンパク質をコードする発現カセットに置き換えられる他のウイルス配列を含む。不足しているウイルス機能は、パッケージング細胞株によってトランスで供給される。例えば、遺伝子治療で使用するAAVベクターは、通常、パッケージングと宿主ゲノムへの組み込みに必要なAAVゲノムの末端逆方向反復（ITR）配列のみを保有する。ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子、つまりrepとcapをコードするヘルパープラスミドを含む細胞株にパッケージ化されているが、ITR配列は欠いている。細胞株は、ヘルパーとして

40

50

アデノウイルスにも感染している。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製とヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列が欠如しているので大量にパッケージ化されていない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスがAAVより感受性である熱処理によって低減できる。さらに、AAVは、バキュロウイルス系を使用して臨床で使用する規模で生成できる（米国特許第7,479,554号参照）。

【0128】

多くの遺伝子治療において、遺伝子治療ベクターが特定の組織に高い特異性で送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターは、ウイルスの外表面上にウイルス外被タンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現させることによって、目的の細胞に対して特異性を有するように改変できる。リガンドは、対象とする細胞に存在することが知られている受容体に対する親和性を有するように選択される。例えば、Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751 (1995)は、モロニーマウス白血病ウイルスが、gp70に融合したヒトヘレグリンを発現するように改変でき、組換えウイルスは、ヒト上皮成長因子受容体を発現する特定のヒト乳癌細胞に感染することを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、ウイルスが細胞表面受容体のリガンドを含む融合タンパク質を発現する、他のウイルス-標的細胞のペアに拡張できる。例えば、繊維状ファージは、実質的に任意の細胞受容体に対して特異的な結合親和性を有する抗体断片（例、FAB又はFv）を提示するように改変できる。この説明は主にウイルスベクターに適用されるが、同じ原則が非ウイルスベクターにも適用できる。そのようなベクターは、特定の標的細胞による取込みを促進する取込み配列を含むように改変できる。

【0129】

遺伝子治療ベクターは、通常、以下に説明する全身投与（例、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下又は頭蓋内注入）又は局所適用により、個々の患者に投与することでin vivo送達できる。あるいは、ベクターは、個々の患者から移植した細胞（例、リンパ球、骨髄吸引液、生検組織）やユニバーサルドナーの造血幹細胞といった細胞にex vivo送達でき、次いで、通常、ベクターを組み込んだ細胞の選択後に患者に再移植される。

【0130】

診断、研究又は遺伝子治療（例、宿主生物へのトランスフェクト細胞の再注入による）のためのex vivo細胞トランスフェクションは、当業者に広く知られている。好ましい態様では、細胞は、対象生物から単離され、RNA組成物がトランスフェクトされ、対象生物（例、患者）に再注入される。ex vivoトランスフェクションに適したさまざまな細胞は、当業者に周知である（例えば、Freshney et al., Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)と、その患者から細胞を単離し培養する方法についての考察で引用されている参考文献を参照）。

【0131】

適切な細胞には、真核及び原核細胞及び／又は細胞株が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような細胞又はそのような細胞から生成される細胞株の限定するものではない例には、COS、CHO（例、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NSO、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293（例、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）及びperC6細胞、任意の植物細胞（分化又は未分化）、並びに、ツマジロクサヨトウ（Spodoptera frugiperda）（Sf）といった昆虫細胞、又は、サッカロミセス（Saccharomyces）、ピキア（Pichia）及びシゾサッカロミセス（chizosaccharomyces）といった真菌細胞が含まれる。ある態様では、細胞株はCHO-K1、MDCK又はHEK293細胞株である。さらに、初代細胞を単離し、ヌクレアーゼ系（例、CRISP/Cas）で処理した後に、治療対象に再導入するために、ex vivoで使用してもよい。適切な初代細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）、及びCD4+T細胞又はCD8+T細胞などであるがこれらには限定されない血球のサブセットが含まれる。適切

な細胞には、例えば、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞（CD34+）、神経幹細胞及び間葉系幹細胞などの幹細胞も含まれる。

【0132】

ある態様では、幹細胞を、細胞のトランスフェクション及び遺伝子治療のex vivo手順で使用する。幹細胞を使用する利点は、in vitroで他の細胞型に分化できること、又は骨髓に生着する哺乳動物（細胞のドナーなど）に導入できることである。GM-CSF、IFN γ 、TNF α などのサイトカインを使用して、in vitroでCD34+細胞を臨床的に重要な免疫細胞型に分化させる方法が知られている（限定するものではない例として、Inaba et al., J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)を参照）。

【0133】

幹細胞は、公知の方法で形質導入及び分化のために単離される。例えば、幹細胞は、CD4+及びCD8+（T細胞）、CD45+（汎B細胞）、GR-1（顆粒球）並びにIad（分化した抗原提示細胞）などの不要な細胞に結合する抗体で骨髓細胞をパニングすることで、骨髓細胞から単離される（限定するものではない例として、J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)を参照）。いくつかの態様では、改変した幹細胞も使用できる。

【0134】

特に、本願のOMNI-50バリエーションは、有糸分裂後の細胞又は活発に分裂していない細胞（例、停止細胞）のゲノム編集に適している可能性がある。本発明のOMNI-50バリエーションを使用して編集してもよい有糸分裂後の細胞の例には、筋細胞、心筋細胞、肝細胞、骨細胞及びニューロンが含まれるが、これらには限定されない。

【0135】

治療用RNA組成物を含有するベクター（例、レトロウイルス、リポソーム等）は、in vivoでの細胞の形質導入のために生物に直接投与することもできる。あるいは、裸のRNA又はmRNAを投与できる。投与は、血液又は組織細胞との最終的な接触で分子を導入するために通常使用される、注射、注入、局所適用及びエレクトロポレーションが含まれるが、これらには限定されない経路による。そのような核酸を投与する適切な方法が利用可能で、かつ、当業者に周知であって、特定の組成物を投与する複数の経路が使用できるが、多くの場合、特定の経路が、他の経路よりも迅速かつ効果的な反応が得られる。

【0136】

導入遺伝子の免疫細胞（例、T細胞）への導入に適したベクターには、非組込みレンチウイルスベクターが含まれる。例えば米国特許出願公開第2009/0117617号を参照。

【0137】

薬学的に許容される担体は、投与される組成物により、及び、組成物を投与するために用いる方法により、部分的に決まる。したがって、利用可能な医薬組成物の適切な製剤は多種多様であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989を参照されたい。

【0138】

相同組換えによるDNA修復

本発明のいくつかの態様では、OMNI-50ヌクレアーゼバリエーションは、標的部位でDNAを切断して、細胞性修復メカニズム、例えば、限定するものではないが、非相同末端結合（NHEJ）又は相同組換え修復（HDR）を誘導するために利用する。

【0139】

用語「相同組換え修復」又は「HDR」とは、例えば、DNA中の二本鎖及び一本鎖切断の修復中に、細胞においてDNA損傷を修復するためのメカニズムを意味する。HDRは、ヌクレオチド配列相同性を必要とし、二本鎖又は単一切断が生じた配列（例、DNA標的配列）を修復するために、「核酸鋳型」（本明細書中で相互に交換可能に用いられる、核酸鋳型又はドナー鋳型）を用いる。このことは、例えば、核酸鋳型からDNA標的配列への遺伝情報の移行をもたらす。核酸鋳型配列がDNA標的配列とは異なり、そして、核酸鋳型ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの一部又は全てがDNA標的配列に

10

20

30

40

50

組み込まれる場合に、H D Rは、D N A標的配列の変化（例．挿入、欠失、変異）を生じててもよい。いくつかの態様では、核酸鑄型ポリヌクレオチド全体、核酸鑄型ポリヌクレオチドの一部、又は核酸鑄型のコピーが、D N A標的配列の部位でインテグレートされる。

【0140】

用語「核酸鑄型」及び「ドナー」とは、ゲノムに挿入又はコピーされるヌクレオチド配列を意味する。核酸鑄型は、標的核酸に付加されるか若しくは標的核酸中の変化の鑄型となるか、又は標的配列を変化させるために用いてもよい、例えば、1個以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む。核酸鑄型配列は、いずれかの長さ、例えば、2～10,000ヌクレオチド長（又はその間若しくはそれを超えるいずれかの整数値）、好ましくは約100～1,000ヌクレオチド長（又はその間のいずれかの整数）、より好ましくは約200～500ヌクレオチド長であってもよい。核酸鑄型は、一本鎖核酸、二本鎖核酸であってもよい。いくつかの態様では、核酸鑄型は、標的核酸の、例えば、標的位置の野生型配列に対応する、例えば、1個以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸鑄型は、標的核酸の、例えば、標的位置の野生型配列に対応する、例えば、1個以上のリボヌクレオチドのリボヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸鑄型は、修飾型リボヌクレオチドを含む。

10

【0141】

例えば、変異体遺伝子の修正のための又は野生型遺伝子の増加した発現のための、外因性配列（「ドナー配列」、「ドナー鑄型」又は「ドナー」とも称される）の挿入もまた、行うことができる。通常、ドナー配列はそれが位置するゲノム配列に対して同一でないことが、直ちに明らかである。ドナー配列は、対象となる位置での効率的なH D Rを可能にするために、2つの相同領域により隣接された非相同配列を含むことができる。加えて、ドナー配列は、細胞のクロマチン中に、対象となる領域に対して相同でない配列を含むベクター分子を含むことができる。ドナー分子は、細胞のクロマチンに対して相同な数か所の不連続な領域を含むことができる。例えば、通常は対象となる領域中に存在しない配列の標的化された挿入に関して、当該配列は、ドナー核酸分子中に存在でき、対象となる領域中の配列に対して相同な領域に隣接できる。

20

【0142】

ドナーポリヌクレオチドは、D N A又はR N A、一本鎖及び／又は二本鎖であることができ、直鎖状又は環状形態で細胞に導入できる。例えば、米国特許出願公開第2010/0047805号；同第2011/0281361号；同第2011/0207221号及び同第2019/0330620号を参照。直鎖状形態で導入される場合、ドナー配列の末端は、当業者に公知の方法により（例えば、エキソ核酸分解から）保護できる。例えば、1種以上のジデオキシヌクレオチド残基が直鎖状分子の3'末端に付加され、及び／又は自己相補的オリゴヌクレオチドが一方又は両方の末端にライゲーションされる。例えば、Chang and Wilson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987)；Nehls et al., Science (1996)を参照。分解から外因性ポリヌクレオチドを保護するための追加の方法としては、限定するものではないが、末端アミノ基の付加並びに、例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、及びO-メチルリボース又はデオキシリボース残基のような修飾型ヌクレオチド間連結の使用が挙げられる。

30

40

【0143】

したがって、修復のためにドナー鑄型を用いる本発明の態様は、直鎖状又は環状形態で細胞に導入できる、D N A又はR N A、一本鎖及び／又は二本鎖ドナー鑄型を用いてもよい。本発明の態様では、遺伝子編集組成物は：（1）修復前に遺伝子中の二本鎖を切断するガイド配列を含むR N A分子及び（2）修復のためのドナーR N A鑄型を含み、かつ、ガイド配列を含むR N A分子が第1のR N A分子であり、ドナーR N A鑄型が第2のR N A分子である。いくつかの態様では、ガイドR N A分子及び鑄型R N A分子は、単一分子の一部として連結される。

【0144】

50

ドナー配列は、オリゴヌクレオチドで、遺伝子修正又は内因性配列の標的化された変化のために用いてもよい。オリゴヌクレオチドは、ベクター上で細胞に導入してもよい、細胞にエレクトロポレーションしてもよい、又は当技術分野で公知の他の方法を介して導入してもよい。オリゴヌクレオチドは、内因性遺伝子中の変異型配列（例、βグロビンの鎌状変異）を「修正」するために使用できるか、又は内因性遺伝子座に所望の目的を有する配列を挿入するために使用してもよい。

【0145】

ポリヌクレオチドは、例えば、複製起点、プロモーター及び抗生物質耐性をコードする遺伝子のような追加の配列を有するベクター分子の一部として、細胞に導入できる。さらに、ドナーポリヌクレオチドは、裸の核酸として、リボソーム、エクソソーム、若しくはポロキサマーのような薬剤と複合体を形成したか若しくはその内部にパッケージングされた核酸として導入できるか、又は組換えウイルス（例、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス及びインテグラーゼ欠損レンチウイルス（IDLV））若しくはウイルス様粒子により送達できる。トランスポゾンに基づく系、例えば、組換えSleeping Beautyトランスポゾン系又は組換えPiggyBacトランスポゾン系のような非ウイルスベクターもまた、標的細胞におけるポリヌクレオチド配列の転位のために利用してもよい。

【0146】

ドナーは、その発現が、インテグレーション部位の内因性プロモーター、すなわち、ドナーが挿入される内因性遺伝子の発現を駆動するプロモーターにより駆動されるように、一般的に挿入される。しかし、ドナーは、プロモーター及び／又はエンハンサー、例えば、構成的プロモーター又は誘導性若しくは組織特異的プロモーターを含んでよいことが明らかである。

【0147】

ドナー分子は、内因性遺伝子の全部、一部が発現されるか又はいずれも発現されないように、内因性遺伝子に挿入されてもよい。例えば、明細書に記載の導入遺伝子は、例えば導入遺伝子を含む融合体として、内因性配列の一部（導入遺伝子に対してN末端及び／又はC末端）が発現されるか、又は内因性配列が発現されないように、内因性遺伝子座に挿入されてもよい。他の態様では、導入遺伝子（例、内因性遺伝子に対するような追加のコード配列を含むか又は含まない）は、いずれかの内因性遺伝子座、例えば、セーフハーバー遺伝子座、例えば、CCR5遺伝子、CXCR4遺伝子、PPP1R12c（AAVS1としても公知である）遺伝子、アルブミン遺伝子又はRosa遺伝子にインテグレートされる。例えば、米国特許第7,951,925号及び同第8,110,379号；米国特許出願公開第2008/0159996号；同第2010/0218264号；同第2010/0291048号；同第2012/0017290号；同第2011/0265198号；同第2013/0137104号；同第2013/0122591号；同第2013/0177983号及び同第2013/0177960号、並びに米国仮出願第61/823,689号を参照。

【0148】

内因性配列（内因性又は導入遺伝子的一部分）が導入遺伝子と共に発現される場合、内因性配列は、全長配列（野生型又は変異体）又は部分的配列であってもよい。好ましくは、内因性配列は、機能的である。これらの全長又は部分的配列の機能の限定するものではない例としては、導入遺伝子（例、治療用遺伝子）により発現されるポリペプチドの血漿半減期を増加させること及び／又は担体として機能することが挙げられる。

【0149】

さらに、発現に対して必要とされないが、外因性配列はまた、転写又は翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、内部リボソーム侵入部位、2Aペプチドをコードする配列及び／又はポリアデニル化シグナルも含んでよい。

【0150】

特定の態様では、ドナー分子は、タンパク質をコードする遺伝子（例、細胞中では欠如しているタンパク質をコードするコード配列又はタンパク質をコードする遺伝子の個別若

10

20

30

40

50

しくは代替バージョン中)、調節配列及び／又はマイクロRNA若しくはsiRNAのような構造核酸をコードする配列からなる群より選択される配列を含む。

【0151】

DNAターゲティングRNA分子

本発明の態様では、DNAターゲティングRNA分子は、ガイド配列を含む。RNA分子の「ガイド配列」は、特定の標的DNA配列とハイブリダイズできるヌクレオチド配列を指し、例えば、ガイド配列は、ガイド配列の長さに沿って標的とされるDNA配列に完全に相補的なヌクレオチド配列を有する。いくつかの態様では、ガイド配列の長さは、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30ヌクレオチド、又は、約17～30、17～29、17～28、17～27、17～26、27～25、17～24、18～22、19～22、18～20、17～20若しくは21～22ヌクレオチドである。ガイド配列の全長は、ガイド配列の長さに沿って標的とされるDNA配列に完全に相補的である。ガイド配列は、CRISPR複合体のDNAターゲティング部分として機能するガイド配列を有するCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成できるRNA分子の一部分であってもよい。ガイド配列を有するRNA分子がCRISPR分子と同時に存在する場合、RNA分子はCRISPRヌクレアーゼを特定の標的DNA配列にターゲティングできる。それぞれの実現可能性は個別の態様である。RNA分子は、所望の配列を標的とするように特別に設計できる。

10

【0152】

本発明のいくつかの側面では、開示した方法は、明細書に記載した組成物を、細胞に導入することを含む、無細胞系で又は細胞のゲノム中の標的部位で、ヌクレオチド配列を改変する方法を含む。

20

【0153】

いくつかの態様では、細胞は真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞又は植物細胞である。いくつかの態様では、ゲノムの改変は細胞の核の内部で生じる。

【0154】

本発明のいくつかの側面では、開示された方法は、対象のゲノムの標的部位においてヌクレオチド配列を改変することを含む、ゲノムの変異に関連する疾患に罹患している対象の治療のための本願の組成物の使用を含む。

【0155】

本発明のいくつかの側面では、開示された方法は、変異障害に関連するアレルを本願の組成物の標的とすることを含む、変異障害を有する対象を治療する方法を含む。

30

【0156】

いくつかの態様では、変異障害は、腫瘍形成、加齢黄斑変性、統合失調症、神経障害、神経変性疾患、運動障害、脆弱X症候群、セクレターゼ関連障害、プリオン関連障害、ALS、依存症、自閉症、アルツハイマー病、好中球減少症、炎症関連障害、パーキンソン病、血液及び凝固の疾患及び障害、βサラセミア、鎌状赤血球貧血、細胞調節不全、腫瘍に関連する疾患及び障害、炎症及び免疫に関連する疾患及び障害、代謝、肝臓、高コレステロール血症、腎臓及びタンパク質の疾患及び障害、筋肉及び骨格の疾患及び障害、皮膚の疾患及び障害、神経の疾患及び障害、肺の疾患及び障害、角膜の疾患及び障害、網膜の疾患及び障害、並びに、眼の疾患及び障害のいずれかから選択される疾患又は障害に関連する。

40

【0157】

疾患及び治療

本発明のある態様は、遺伝子編集、処置又は治療方法の一形態として、ヌクレアーゼを、疾患又は障害に関連する特定の遺伝子座にターゲティングする。例えば、遺伝子の編集又はノックアウトを誘導するために、特別に設計したガイドRNA分子を使用して、明細書に開示した新規なヌクレアーゼを、遺伝子の病原性変異アレルに特異的にターゲティングしてもよい。ヌクレアーゼのPAM要件を最初に考慮してガイドRNA分子を設計することが好ましく、このことは、明細書で示すように、遺伝子編集が行われる系にも依存す

50

る。例えば、OMNI-50ヌクレアーゼを標的部位に向けるように設計されたガイドRNA分子は、OMNI-140 PAM配列（例、「NGG」）に隣接するDNA二本鎖領域のDNA鎖に相補的なスパーサー配列を含むように設計される。ガイドRNA分子は、好ましくは、ヌクレアーゼの特異的活性を増大させ、オフターゲット効果を減少させるために、十分かつ好ましくは最適な長さのスパーサー領域（すなわち、標的アレルと相補的なガイドRNA分子の領域）を含むように更に設計される。

【0158】

限定するものではない例として、ガイドRNA分子は、ヌクレアーゼによるDNA損傷時に非相同末端結合（NHEJ）経路が誘導されて、フレームシフト変異の導入による変異アレルのサイレンシングがもたらされるように、ヌクレアーゼを変異アレルの特定の領域、例えば、開始コドンの近傍、を標的とするように設計してもよい。ガイドRNA分子を設計するこのアプローチは、ドミナントネガティブ変異の作用を変化させ、それによって対象を治療するのに特に有用である。別の限定するものではない例として、ガイドRNA分子は、ヌクレアーゼによるDNA損傷時に相同性指向修復（HDR）経路が誘導されて、変異アレルのテンプレートを介した修正がもたらされるように、変異したアレルの特定の病原性変異を標的とするように設計してもよい。ガイドRNA分子を設計するこのアプローチは、変異アレルのハプロ不全作用を変化させ、それによって対象を治療するのに特に有用である。

【0159】

疾患又は障害を治療するために改変の標的としてもよい遺伝子の限定するものではない例を以下に示す。変異障害を誘発する疾患関連遺伝子と変異が文献に記載されている。そのような変異は、DNA損傷を引き起こすことによってDNA修復経路を誘導してアレルを改変し、それによって変異障害を治療するCRISPR組成物を、疾患関連遺伝子のアレルを標的とするDNAターゲティングRNA分子を設計するために使用できる。

【0160】

ELANE遺伝子の変異は、好中球減少症に関連している。したがって、ELANEを標的とする本発明の態様は、好中球減少症に罹患した対象の治療方法で、無制限に使用してもよい。ELANE遺伝子を標的とし、好中球減少症の治療に有用なガイドRNA分子はPCT国際特許出願PCT/US2020/059186に開示されており、参照によりこの明細書に組み込まれる。

【0161】

CXCR4は、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）感染における共受容体である。したがって、CXCR4を標的とする本発明の態様は、HIV-1に罹患した対象を治療する方法、又はHIV-1感染に対する耐性を対象に付与する方法において、無制限に使用してもよい。

【0162】

プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）の破壊は、腫瘍細胞のCAR-T細胞による死滅を促進し、PD-1ががん治療の標的となる可能性がある。したがって、PD-1を標的とする本発明の態様は、がん罹患した対象の治療方法で、無制限に使用してもよい。ある態様では、治療は、PD-1欠損となるように本発明に従って改変されたT細胞によるCAR-T細胞療法である。

【0163】

また、BCL11Aはヘモグロビン産生抑制に関与する遺伝子である。BCL11Aを阻害することによって、グロビン産生を増加させ、サラセミアや鎌状赤血球貧血などの疾患を治療してもよい。例えば、国際公開第2017/077394号、米国特許出願公開第2011/0182867号；Humbert et al. Sci. Transl. Med. (2019)及びCanver et al. Nature (2015)を参照。したがって、BCL11Aのエンハンサーを標的とする本発明の態様は、βサラセミア又は鎌状赤血球貧血に罹患した対象の治療方法で、無制限に使用してもよい。

【0164】

10

20

30

40

50

本発明は、以下の表 A 又は表 B に列挙した疾患又は障害の研究、改変又は治療において、疾患関連遺伝子を標的とするために使用してもよい。実際、遺伝子座を有する疾患関連遺伝子は、本明細書に開示のヌクレアーゼを使用して、適切な疾患関連遺伝子、例えば米国特許出願公開第 2018/0282762 号及び欧州特許第 3079726 号 (B1) に列挙されているものを標的とすることによって、研究、改変又は治療してもよい。

【0165】

【表 2】

表 A 疾患、障害とその関連遺伝子

疾患／障害	遺伝子
腫瘍形成	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; ノッチ1; ノッチ2; ノッチ3; ノッチ4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR α ; PPAR γ ; WT1 (Wilms腫瘍); FGF受容体のファミリー (5種: 1, 2, 3, 4, 5); CDKN2a; APC; RB (網膜芽細胞腫); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (アンドロゲン受容体); TSG101; IGF; IGF受容体; Igf1 (4種); g2 (3種); Igf1受容体; Igf2受容体; Bax; Bcl2; カスパーゼファミリー (9種: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Apc
加齢黄斑変性	Abcr; Ccl2; Cc2; cp (セルロプラスミン); Timp3; カテプシンD; Vldlr; Ccr2
統合失調症	ニューレグリン1 (Nrg1); Erb4 (ニューレグリンの受容体); コンプレキシン1 (Cp1x1); Tph1トリプトファンヒドロキシラーゼ; Tph2トリプトファンヒドロキシラーゼ2; ニューレキシン1; GSK3; GSK3a; GSK3b
神経障害、神経変性障害及び運動障害	5-HTT (S1c6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao (Dao1)
トリヌクレオチドリピート障害	HTT (ハンチントン病); SBMA/SMAX1/AR (ケネディー病); FXN/X25 (フリードライヒ病); ATX3 (マチャド・ジョセフ病); ATXN1 及び ATXN2 (脊髄小脳失調症); DMPK (筋緊張性ジストロフィー); アトロフィン-1 及び Atn1 (DRPLA); CBP (Creb-BP - グローバルな不安定性); VLDLR (アルツハイマー); Atxn7; Atxn10
脆弱X症候群	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5
セクレターゼ関連障害	APH-1 (α 及び β); プレセニリン (Psen1); ニカストリン (Ncstn); PEN-2
その他	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2
プリオン関連障害	Prp
ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c)
依存症	Prkce (アルコール); Drd2; Drd4; ABAT (アルコール); GRIA2; Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 (アルコール)
自閉症	Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A; ニューレキシン1; 脆弱X (FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5)
アルツハイマー病	E1; CHIP; UCH; UBB; Tau; LRP; PICALM; クラスチリン; PS1; SORL1; CR1; Vldlr; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1, アクアポリン1); Uchl1; Uchl3; APP
炎症	IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL-17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); IL-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa; NOD2/IBDのCARD15; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b); CTLA4; Cx3cl1
パーキンソン病	x-シヌクレイン; DJ-1; LRRK2; パーキン; PINK1

【0166】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表B 疾患、障害とその関連遺伝子

疾患カテゴリー	疾患とその関連遺伝子
血液及び凝固の疾患及び障害	貧血 (CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT); 裸リンパ球症候群 (TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5); 出血性障害 (Bleeding disorders) (TBXA2R, P2RX1, P2X1); 因子H及び因子H様1 (HF1, CFH, HUS); 因子V及び因子VIII (MCFD2); 因子VI欠乏症 (F7); 因子X欠乏症 (F10); 因子XI欠乏症 (F11); 因子XII欠乏症 (F12, HAF); 因子XIII欠乏症 (F13A1, F13A); 因子XIII欠乏症 (F13B); ファンconi貧血 (FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FADC, FAD, FANCE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596); 血球貪食性リンパ組織球症 (PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3); 血友病A (F8, F8C, HEMA); 血友病B (F9, HEMB); 出血性障害 (Hemorrhagic disorders) (PI, ATT, F5); 白血球の欠乏及び障害 (ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2BA, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4); 鎌状赤血球貧血 (HBB); サラセミア (HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1)
細胞の調節不全並びに腫瘍学の疾患及び障害	B細胞非ホジキンリンパ腫 (BCL7A, BCL7); 白血病 (TAL1, TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, HOX4B, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMPS, AF10, ARHGEF12, LARG, KIAA0382, CALM, CLTH, CEBPA, CEBP, CHIC2, BTL, FLT3, KIT, PBT, LPP, NPM1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN, RUNX1, CBFA2, AML1, WHSC1L1, NSD3, FLT3, AF1Q, NPM1, NUMA1, ZNF145, PLZF, PML, MYL, STAT5B, AF10, CALM, CLTH, ARL11, ARLTS1, P2RX7, P2X7, BCR, CML, PHL, ALL, GRAF, NF1, VRNF, WSS, NFNS, PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1, BCL2, CCND1, PRAD1, BCL1, TCRA, GATA1, GF1, ERYF1, NFE1, ABL1, NQO1, DIA4, NMOR1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN)
炎症並びに免疫関連の疾患及び障害	AIDS (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1); 自己免疫性リンパ増殖症候群 (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A); 複合型免疫不全 (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228); HIV感受性又は感染 (IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCCKR5 (CCR5)); 免疫不全 (CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TACI); 炎症 (IL-10, IL-1 (IL-1a, IL-1b), IL-13, IL-17 (IL-17a (CTLA8), IL-17b, IL-17c, IL-17d, IL-17f), IL-23, Cx3cr1, ptpn22, TNFa, NOD2/CARD15 for IBD, IL-6, IL-12 (IL-12a, IL-12b), CTLA4, Cx3cl1); 重症複合型免疫不全 (SCIDs) (JAK3, JAKL, DCLRE1C, ARTEMIS, SCIDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4)

10

20

30

40

【0167】

【表 3 - 2】

表B 疾患、障害とその関連遺伝子(続き)

疾患カテゴリー	疾患とその関連遺伝子
代謝、肝臓、腎臓及びタンパク質の疾患及び障害	アミロイド神経障害(TTR, PALB);アミロイドーシス(APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB);硬変(KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988);嚢胞性線維症(CFTR, ABCC7, CF, MRP7);グリコーゲン貯蔵病(SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM);肝腺腫, 142330(TCF1, HNF1A, MODY3);肝不全、早期発症かつ神経障害(SCOD1, SCO1);肝リパーゼ欠損症(LIPC)、肝芽腫、がん及び癌腫(CTNNB1, PDGFRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, CTNNB1, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5;髄質嚢胞性腎疾患(UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2);フェニルケトン尿症(PAH, PKU1, QDPR, DHP, PTS);多発性嚢胞腎肝疾患(FCYT, PKHD1, ARPKD, PKD1, PKD2, PKD4, PKDTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63)
筋肉／骨格の疾患及び障害	ベッカー型筋ジストロフィー(DMD, BMD, MYF6), デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD, BMD);エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー(LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A);顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHMD1A, FSHD1A);筋ジストロフィー(FKRP, MDC1C, LGMD2I, LAMA2, LAMM, LARGE, KIAA0609, MDC1D, FCMD, TTID, MYOT, CAPN3, CANP3, DYSF, LGMD2B, SGCG, LGMD2C, DMDA1, SCG3, SGCA, ADL, DAG2, LGMD2D, DMDA2, SGCB, LGMD2E, SGCD, SGD, LGMD2F, CMD1L, TCAP, LGMD2G, CMD1N, TRIM32, HT2A, LGMD2H, FKRP, MDC1C, LGMD2I, TTN, CMD1G, TMD, LGMD2J, POMT1, CAV3, LGMD1C, SEPN1, SELN, RSMD1, PLEC1, PLTN, EBS1);大理石骨病(LRP5, BMND1, LRP7, LR3, OPPG, VBCH2, CLCN7, CLC7, OPTA2, OSTM1, GL, TCIRG1, TIRC7, OC116, OPTB1);筋萎縮症(VAPB, VAPC, ALS8, SMN1, SMA1, SMA2, SMA3, SMA4, BSCL2, SPG17, GARS, SMAD1, CMT2D, HEXB, IGHMBP2, SMUBP2, CATF1, SMARD1)
皮膚科の疾患及び障害	白皮症(TYR, OCA2, TYRP1, SLC45A2, LYST);外胚葉形成不全症(EDAR, EDARADD, WNT10A);エーラス・ダンロス症候群(COL5A1, COL5A2, COL1A1, COL1A2, COL3A1, TNXB, ADAMTS2, PLOD1, FKBP14);魚鱗癬関連障害(FLG, STS, TGM1, ALOXE3/ALOX12B, KRT1, KRT10, ABCA12, KRT2, GJB2, TGM1, ABCA12, CYP4F22, ALOXE3, CERS3, NSHDL, EBP, MBTPS2, GJB2, SPINK5, AGHD5, PHYH, PEX7, ALDH3A2, ERCC2, ERCC3, GFT2H5, GBA);色素失調症(IKBKG, NEMO);結節性硬化症(TSC1, TSC2);早期老化症候群(POLR3A, PYCR1, LMNA, POLD1, WRN, DMPK)

10

20

30

【0168】

40

50

【表 3 - 3】

表B 疾患、障害とその関連遺伝子(続き)

疾患カテゴリー	疾患とその関連遺伝子
神経学的及び神経細胞の疾患及び障害	ALS(SOD1, ALS2, STEX, FUS, TARDBP, VEGF(VEGF-a, VEGF-b, VEGF-c)); アルツハイマー病(APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLAUI, URK, ACE, DCP1, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3); 自閉症(Mecp2, BZRAP1, MDGA2, Sema5A, ニューレキシン1, GLO1, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2); 脆弱X症候群(FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5); ハンチントン病及びハンチントン病様障害(HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17); パーキンソン病(NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, PARK7, LRRK2, PARK8, PINK1, PARK6, UCHL1, PARK5, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, PRKN, PARK2, PDJ, DBH, NDUFV2); レット症候群(MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, x-シヌクレイン, DJ-1); 統合失調症(ニューレグリン1(Nrg1), Erb4(ニューレグリンの受容体), コンプレキシン1(Cplx1), Tph1トリプトファンヒドロキシラーゼ, Tph2, トリプトファンヒドロキシラーゼ2, ニューレキシン1, GSK3, GSK3a, GSK3b, 5-HTT(Slc6a4), COMT, DRD(Drd1a), SLC6A3, DAOA, DTNBP1, Dao(Dao1)); セクレターゼ関連障害(APH-1(α 及び β), プレセニリン(Psen1), ニカストリン(Ncstn), PEN-2, Nos1, Parp1, Natl, Nat2); トリヌクレオチドリピート障害(HTT(ハンチントン病), SBMA/SMAX1/AR(ケネディー病), FXN/X25(フリードライヒ病), ATX3(マチャド-ジョセフ病), ATXN1及びATXN2(脊髄小脳失調症), DMPK(筋緊張性ジストロフィー), アトロフィン-1及びAtn1(DRPLA), CBP(Creb-BP - グローバルな不安定性), VLDLR(アルツハイマー), Atxn7, Atxn10)
眼の疾患及び障害	加齢黄斑変性(Abcr, Ccl2, Cc2, cp(セルロプラスミン), Timp3, カテプシンD, Vldlr, Ccr2); 白内障(CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CYP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1); 角膜薄濁及びジストロフィー(APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, M1S1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); 先天性扁平角膜(KERA, CNA2); 緑内障(MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); レーバー先天性黒内障(CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); 黄斑ジストロフィー(ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2)

10

20

30

40

【0169】

別段の定義がある場合を除き、この明細書で使用する全ての技術用語及び／又は学術用語は、本発明に係る当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様又は同等の方法及び材料が本発明の態様の実施又は試験に使用できるが、代表的な方法及び／又は材料を以下に記載する。矛盾する場合は、定義を含む明細書が優先される。また、材料、方法及び実施例は単に説明のためのもので、必ずしも限定することを意図したものではない。

【0170】

考察において特に言及しない限り、本発明の態様の特徴の状態又は関連性を変更する「

50

実質的に」及び「約」などの形容詞は、状態又は関連性が、意図された用途の態様の動作に許容可能な範囲内に定義されることを意味すると理解される。特に示さない限り、明細書及び特許請求の範囲における「又は」という用語は、排他的な「又は」ではなく包括的な「又は」と見なされ、結合する項目の少なくとも1つ又は任意の組合せを示す。

【0171】

本明細書における用語「1つ (a、an)」は、列挙された構成要素の「1つ以上」を指すことを理解されたい。特に断りのない限り、単数形の使用が複数形を含むことは、当業者には明らかである。したがって、用語「1つ (a、an)」及び「少なくとも1つ」は、この出願では同じ意味である。

【0172】

この教示をより理解し、かつ、決して教示の範囲を限定しないために、特に断りのない限り、量、割合又は比率を示す全ての数字、及び明細書や特許請求の範囲で使用する他の数値は、全ての場合において、用語「約」で修飾されると理解すべきである。したがって、反する指示がない限り、明細書及び特許請求の範囲に記載の数値は、得ようとする所望の特性に応じて変化する可能性がある近似値である。少なくとも、各数値は、報告された有効桁数を考慮し、通常の丸め手法を適用して解釈する必要がある。

【0173】

この明細書及び特許請求の範囲において、動詞「含有する」、「含む」及び「有する」並びにそれらの活用形のそれぞれは、動詞の目的語が必ずしも動詞の主語の成分、要素又は部分の完全なリストではないことを示すために使用される。本明細書の他の用語は、当該技術分野において周知の意味であることを意味する。

【0174】

この明細書では、用語「ターゲティング配列」又は「ターゲティング分子」は、特定の標的配列にハイブリダイズできるヌクレオチド配列又はヌクレオチド配列を含む分子を指し、例えば、ターゲティング配列は、その長さに沿って、ターゲティングされる配列に少なくとも部分的に相補的なヌクレオチド配列を有する。ターゲティング配列又はターゲティング分子は、CRISPR複合体のターゲティング部分として機能するターゲティング配列を有するCRISPRヌクレアーゼが複合体を形成できるRNA分子の一部であってもよい。ターゲティング配列を有する分子がCRISPR分子と同時に存在する場合、RNA分子は、CRISPRヌクレアーゼを特定の標的配列にターゲティングできる。それぞれの実現可能性は個別の態様である。RNA分子は、所望の配列を標的とするように特別に設計できる。

【0175】

この明細書では、用語「標的」は、標的ヌクレオチド配列を有する核酸に対するターゲティング配列又はターゲティング分子の優先的なハイブリダイゼーションを指す。用語「標的」は、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の優先的なターゲティングが存在するが、オンターゲットハイブリダイゼーションに加えて意図しないオフターゲットハイブリダイゼーションも生じ得るような、可変のハイブリダイゼーションを包含することが理解される。RNA分子が配列を標的とする場合、ヌクレアーゼ活性により、RNA分子とCRISPRヌクレアーゼ分子の複合体が配列を標的にすることが理解される。

【0176】

この明細書では、用語「野生型」は、当業者が理解する技術用語で、バリエーション又は変種とは区別される、自然界に存在する生物、株、遺伝子又は特性の代表的な形態を意味する。したがって、この明細書では、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列が野生型の配列を指す場合、バリエーションは、例えば置換、欠失、挿入を含む、その配列のバリエーションを指す。本発明の態様では、改変されたCRISPRヌクレアーゼは、少なくとも1つのアミノ酸修飾（例．置換、削除及び／又は挿入）を含むCRISPRヌクレアーゼのバリエーションであり、配列番号1で示される野生型OMNI-50ヌクレアーゼと比較して、「変異」とも呼ばれる。

【0177】

10

20

30

40

50

用語「非天然」、「天然に存在しない」又は「改変」は、同じ意味で使用され、人間による改変を示す。核酸分子又はポリペプチドで使用する場合、この用語は、核酸分子又はポリペプチドが、自然界で自然に関連付けられており、かつ、自然界で見いだされる少なくとも1つの成分を少なくとも実質的に含まないことを意味してもよい。

【0178】

用語「変異体」又は「バリエント」は同じ意味で使用され、天然に存在しない分子又は改変された分子を指す。

【0179】

この明細書では、用語「アミノ酸」は、天然及び／又は非天然若しくは合成アミノ酸を含み、グリシン及びD又はLの光学異性体、並びにアミノ酸類似体及びペプチド模倣物が含まれる。

10

【0180】

この明細書では、「ゲノムDNA」は、対象とする細胞又は細胞群に存在する、直鎖状及び／若しくは染色体DNA並びに／又はプラスミド若しくは他の染色体外DNAの配列を指す。いくつかの態様では、対象とする細胞は真核細胞である。いくつかの態様では、対象とする細胞は原核細胞である。いくつかの態様では、この方法は、ゲノムDNA配列の所定の標的部位において二本鎖切断(DSB)を引き起こし、ゲノムの標的部位においてDNA配列の変異、挿入及び／又は欠失をもたらす。

【0181】

「真核」細胞は、真菌細胞(酵母など)、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞及びヒト細胞を含むが、これらに限定されるものではない。

20

【0182】

この明細書では、用語「改変細胞」は、標的配列とのハイブリダイゼーション、すなわちオンターゲットハイブリダイゼーションの結果として、RNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体によって二本鎖切断された細胞を指す。用語「改変細胞」は、バリエントによる二本鎖切断の後に変異が修復又は修正された細胞を更に含んでもよい。改変細胞は、単離されている若しくは単離されていない、又は、培養物中、in vitro、ex vivo、in vivo若しくはin plantaで維持されている任意の環境における、真核生物又は原核生物といった任意の細胞であってもよい。

【0183】

本発明は、本明細書に記載のバリエント又は方法によって得られる改変細胞を提供する。ある態様では、これらの改変細胞は、子孫細胞を生じさせることができる。ある態様では、これらの改変細胞は、生着後に子孫細胞を生じさせることができる。限定するものではない例として、改変細胞は、造血幹細胞(HSC)、又は同種異系細胞移植若しくは自家細胞移植に適した細胞であってもよい。この明細書に記載のバリエント及び方法は、キメラ抗原受容体T(CAR-T)細胞を生成するためにも利用してもよい。

30

【0184】

本発明はまた、これらの改変細胞及び薬学的に許容される担体を含む組成物も提供する。細胞を薬学的に許容される担体と混合する工程を含む、これを調製するin vitro又はex vivoの方法も提供される。

40

【0185】

この明細書では、用語「ヌクレアーゼ」は、核酸のヌクレオチドサブユニット間のホスホジエステル結合を切断できる酵素を指す。ヌクレアーゼは、天然の供給源から単離又は誘導されてもよい。天然の供給源は、任意の生物であってもよい。あるいは、ヌクレアーゼは、ホスホジエステル結合切断活性を有する修飾タンパク質又は合成タンパク質であってもよい。

【0186】

この明細書では、用語「プロトスペーサー隣接モチーフ」又は「PAM」は、標的DNA配列の近傍に位置し、CRISPRヌクレアーゼが認識する標的DNAのヌクレオチド

50

配列を指す。PAM配列は、ヌクレアーゼによって異なってもよい。例えば、野生型化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9は、PAM配列「NGG」を認識する。当業者は、シングルガイドRNA分子又はcrRNA:tracrRNA複合体が、例えば、プロトスペーサー隣接モチーフの隣の目的の標的ゲノムDNA配列と結合するように、CRISPRヌクレアーゼと複合化できることを理解する。ヌクレアーゼは、その後、標的DNAの切断により、プロトスペーサー内に二本鎖切断を生成する。

【0187】

この明細書では、分子の配列間のX%の塩基又はアミノ酸が同じで、同じ相対位置にある場合、配列又は分子は、それぞれの配列又は分子に対してX%の「配列同一性」を有する。例えば、第2のヌクレオチド配列との配列同一性が少なくとも95%の第1のヌクレオチド配列は、他の配列と同一の相対位置で少なくとも95%の塩基を有する。

10

【0188】

用語「核局在化配列」及び「NLS」は、関連するタンパク質における、細胞質から核膜バリアを通過する輸送を指示するアミノ酸配列／ペプチドを示し、同じ意味で使用される。用語「NLS」は、特定のペプチドの核局在化配列だけではなく、細胞質ポリペプチドの核膜バリアを通過する移行を指示できるその誘導体も包含することを意図している。NLSは、ポリペプチドのN末端、C末端又はN末端とC末端の両者に付着した場合、ポリペプチドの核移行を指示できる。さらに、ポリペプチドのアミノ酸配列中にランダムに位置するアミノ酸の側鎖にN末端又はC末端で連結したNLSを有するポリペプチドが移行する。通常、NLSはタンパク質表面に露出した正に帯電したリジン又はアルギニンの1つ以上の短い配列で構成されるが、他のタイプのNLSも知られている。NLSの限定するものではない例には、SV40ウイルスラージT抗原、ヌクレオプラスミン、c-myc、hRNPA1 M9 NLS、インポーチンα由来のIBBドメイン、筋腫Tタンパク質、ヒトp53、マウスc-abl IV、インフルエンザウイルスNS1、肝炎ウイルスδ抗原、マウスMx1タンパク質、ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ及びステロイドホルモン受容体(ヒト)グルコルチコイド由来のNLS配列が含まれる。

20

【0189】

用語「CRISPR系」は、明細書に記載の変異体又はバリエーションなどのCRISPRヌクレアーゼタンパク質と、ガイドRNA分子又はガイドRNA複合体の一部分と標的DNA配列との間の相補性に基づいてCRISPRヌクレアーゼタンパク質を所望の標的DNA配列に向けるための、適切なガイドRNA分子又はガイドRNA複合体(例、シングルガイドRNA又はcrRNA:tracrRNA複合体)とを含むCRISPRエンドヌクレアーゼ系を指す。用語「野生型CRISPRエンドヌクレアーゼ系」は、野生型CRISPRタンパク質と、ガイドRNA分子又はガイドRNA複合体の一部分と標的DNA配列との間の相補性に基づいて野生型CRISPRヌクレアーゼタンパク質を所望の標的DNA配列に向けるための、適切なガイドRNA分子又はガイドRNA複合体(例、シングルガイドRNA又はcrRNA:tracrRNA複合体)とを含むCRISPRエンドヌクレアーゼ系を指す。

30

【0190】

この発明では、「オンターゲット編集活性が維持」は、OMNI-50バリエーションに関連し、それによってOMNI-50バリエーションをプログラムする、ガイドRNA分子によって標的とされるDNA標的部位を標的とするOMNI-50バリエーションの能力を指す。いくつかの態様では、OMNI-50バリエーションは、DNA標的に対するオンターゲット編集活性を、野生型OMNI-50ヌクレアーゼの編集率以上で維持する。いくつかの態様では、OMNI-50バリエーションは、DNA標的に対するオンターゲット編集活性を、野生型OMNI-50ヌクレアーゼの編集率の少なくとも100%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%又は30%維持する。

40

【0191】

これまでに説明した態様は互いに適用可能であることが意図されている。例えば、本発明のRNA分子又は組成物は、本発明の方法で利用してもよいことが理解される。

50

【0192】

この明細書では、全ての見出しは単に整理のためであって、いかなる方法でも開示を制限することを意図するものではない。個々の項の内容は、全ての項に等しく適用できる。

【0193】

本発明の追加の目的、利点及び新規な特徴は、限定を意図しない以下の実施例を検討することで、当業者に明らかになる。さらに、これまでに説明し、また、特許請求の範囲に記載する本発明のさまざまな態様及び側面のそれぞれは、以下の実施例で実験的に裏付けられている。

【0194】

明確にするために、別々の態様として説明する本発明の特徴は、一つの態様で組み合わせて提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔にするために、一つの態様として説明する本発明のさまざまな特徴は、別個に、適切なサブコンビネーションとして、又は本発明の他の態様で適切に提供されてもよい。態様がそれらの要素がなくては機能しない場合を除き、さまざまな態様として記述した特定の特徴は、それらの態様の本質的な特徴であると考えべきではない。

【0195】

一般に、この明細書で使用する命名法及びこの発明で利用する実験の手順には、分子、生化学、微生物学及び組換えDNA技術が含まれる。そのような技術は文献に十分に記載されている。例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A laboratory Manual" (1989); Ausubel, R. M. (Ed.), "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (Eds.), "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第4,666,828号; 同第4,683,202号; 同第4,801,531号; 同第5,192,659号及び同第5,272,057号に示された方法; Cellis, J. E. (Ed.), "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III (1994); Freshney, "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" Third Edition, Wiley-Liss, N. Y. (1994); Coligan J. E. (Ed.), "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III (1994); Stites et al. (Eds.), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (Eds.), "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); Clokie and Kropinski (Eds.), "Bacteriophage Methods and Protocols", Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions (2009)を参照、これらは全て参照により組み込まれる。他の一般的な参考資料は、この明細書全体で提供している。

【0196】

本発明の完全な理解を容易くするために、以下に実施例を提供する。以下の実施例は、本発明を製造し、実施する代表的な様式を説明するものである。しかし、この発明の範囲は、これらの実施例に開示された特定の態様に限定されるものではなく、これらは例示のみを目的とするものである。

【実施例】

【0197】

実施例1 バリエーション選択

標的部位に対する特異性（例．オンターゲット切断とオフターゲット切断との間での増加した比率）が増加したOMNI-50ヌクレアーゼバリエーションを選択するために、表1に示すように、野生型OMNI-50配列（配列番号1）のオープンリーディングフレームにアミノ酸置換を導入した。

【 0 1 9 8 】

【 表 4 】

表1 野生型OMNI-50スクレアーズとそのバリエーションのアミノ酸置換の概要。空白のボックスは、OMNI-50バリエーションが、野生型OMNI-50スクレアーズと同じアミノ酸であることを示す。

		位置によるアミノ酸の特定																
バリエーション名称	WT OMNI-50に 対する置換	61	437	478	493	545	606	688	690	695	718	788	803	805	844	965	981	1036
WT OMNI-50		R	Y	R	A	Y	G	K	L	E	L	R	Q	L	L	K	V	K
バリエーション 3795	R478I; Y545H; Q803V; L805I			I		H							V	I				
バリエーション 3942	R61A; Y437W; R788K; L844N; V981M	A	W									K			N		M	
バリエーション 2902	G606P; L690V; E695V						P		V	V								
バリエーション 3954	R478T; A493G; L718C; K965V; K1036V			T	G						C					V		V
バリエーション 6918	Q803V												V					
バリエーション 6919	Y545H					H												
バリエーション 6920	L805I													I				
バリエーション 6864	R478I; Y545H; Q803V			I		H							V					
バリエーション 6865	R478I; Y545H			I		H												
バリエーション 6866	R478I; Q803V; L805I			I									V	I				
バリエーション 6867	Y545H; Q803V; L805I					H							V	I				
バリエーション 7085	R478H; Y545H; Q803V; L805I			H		H							V	I				
バリエーション 7086	R478V; Y545H; Q803V; L805I			V		H							V	I				
バリエーション 7087	R478D; Y545H; Q803V; L805I			D		H							V	I				
バリエーション 7088	R478S; Y545H; Q803V; L805I			S		H							V	I				
バリエーション 7090	R478I; Y545C; Q803V; L805I			I		C							V	I				
バリエーション 7091	R478I; Y545D; Q803V; L805I			I		D							V	I				
バリエーション 7092	R478I; Y545T; Q803V; L805I			I		T							V	I				
バリエーション 7093	R478I; Y545F; Q803V; L805I			I		F							V	I				
バリエーション 7094	R478I; Y545A; Q803V; L805I			I		A							V	I				

【 0 1 9 9 】

10

20

30

40

50

【表 5】

表2 SNPを識別するために設計され、OMNI-50 ヌクレアーゼバリアントの活性とアレル特異的編集の試験に使用するガイド。

標的SNP	gRNA	ガイド配列	位置	メカニズム
rs1683564	g62 REF 20 nt	GUCAAGCCCCAGAGG <u>CC</u> ACA (配列番号29)	3'UTR の下流	切除、アレルの ノックアウト
	g62 ALT 20 nt	GUCAAGCCCCAGAGG <u>AC</u> ACA (配列番号30)		
	sgRNA-564DS-ref 22 nt	GUGUCAAGCCCCAGAGG <u>CC</u> ACA (配列番号31)		
	sgRNA-564DS-alt 22 nt	GUGUCAAGCCCCAGAGG <u>AC</u> ACA (配列番号32)		
	g35 20 nt	AGUCCGGGCUGGGAGCGGU (配列番号33)	イントロン 4	切除、アレルの ノックアウト
	sgRNA-Constant 22 nt	GCAGUCCGGGCUGGGAGCGGU (配列番号34)		

【0200】

実施例2 OMNI-50 変異体はELANE下流組成物のアレル特異的編集を示す
g62alt RNAガイド配列及びg62ref RNAガイド配列を利用して、rs1683564の変異型配列と基本型配列を識別するヌクレアーゼの能力を調べることで、野生型OMNI-50ヌクレアーゼと比較したOMNI-50ヌクレアーゼバリアントの特異性の改善を実証した。図1～図6Cを参照。

【0201】

sgRNA-564DS-altによる編集は野生型OMNI-50ヌクレアーゼを用いて高い特異性の程度を描写したが、sgRNA-564DS-refは、基本型アレルと変異型アレルの両者の編集により表される識別性の欠如を示した。HSCにおける4種類のOMNI-50ヌクレアーゼバリアントv3942、v2902、v3954及びv3795を用いる切除により、アレル特異性を試験した。

【0202】

ddPCRにより、OMNI-50の全てのバリアントで、sgRNA-564DS-altアレルの識別を維持しながら、OMNI-50と比較してsgRNA-564DS-refに対する特異性が改善されることを明らかとなった(図4A)。アレル識別性に加えて、sgRNA-564DS-ref、sgRNA-564DS-alt及びsgconstantに対する1つのオフターゲットが検証され、0.5%未満の編集活性により特徴付けられる、OMNI-50と比較して高い程度のバリアント忠実度を示した(図4B及び図4C)。

【0203】

これらの結果は、OMNI-50ヌクレアーゼバリアントの相対的に高い忠実度を強調する。

【0204】

実施例3 新規CRISPRヌクレアーゼを用いるバリアントアレルノックアウトはELANE好中球減少症における骨髓造血を促進する

代表的ELANE変異及び個別の治療戦略

重症先天性好中球減少症(SCN)は、ELANE遺伝子中の多数のヘテロ接合変異と関連する(図7A)。最新の研究は、各病原性変異を個々に編集する代わりに、ELANE媒介SCN変異の大多数に隣接するSNPのヘテロ接合部位を標的とすることによる、

変異型 E L A N E アレルの除去のための新規アプローチを提示する。E L A N E 遺伝子中の考えられる数百種類の S N P の中で、健常者の集団中では高頻度にヘテロ接合であり、本明細書中で *r s 1 6 8 3 5 6 4*、*r s 1 0 4 1 4 8 3 7* 及び *r s 3 7 6 1 0 0 5* と命名される、健康データベース 1 0 0 0 ゲノムプロジェクトコンソーシアムから取り出された 3 種類の S N P が特定された (図 7 B 上側パネル及び図 1 0 A)。健常者及び患者集団の解析により、S N P の各々において 2 つの集団間での同様のヘテロ接合の頻度が明らかになった。集団 (それぞれ、健常者及び患者) の各々の約 7 6 ~ 8 5 % が、S N P の少なくとも 1 つに対してヘテロ接合であり、このことは、S C N 患者集団の約 7 5 % 超までの本発明者らの戦略の適用可能性を示した。(図 1 0 B、補足表 1)。3 種類の S N P の各々に関して、本発明者らは、2 種類の異なるガイド及び O M N I バリアント 3 7 9 5 と命名される新規の最適化された C R I S P R / C a s 9 ヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質 (R N P) 編集組成物を開発した。一方のガイド (本明細書中で *s g R N A c o n s t a n t* と命名される) は、全 3 種類の組成物に共通であり、イントロン 4 において両者の E L A N E アレルを切断する。第 2 のガイドは、3 種類の S N P の 1 つのヘテロ接合形態を標的とし、したがって、1 つのアレルのみを切断する。S N P *r s 1 6 8 3 5 6 4* を標的とする組成物は、エクソン 5 及び 3' U T R 全体を切除し、不安定化した m R N A 転写産物の分解を引き起こす (図 7 B、I)。S N P *r s 1 0 4 1 4 8 3 7* 又は S N P *r s 3 7 6 1 0 0 5* のいずれかを標的とする組成物は、コード領域及びプロモーターの大部分の切除をもたらし、したがって、変異型アレルの転写を妨げる (図 7 B、I I 及び I I I)。現行の研究は、*r s 1 6 8 3 5 6 4* S N P を標的とする組成物 I に焦点を当てており、*r s 1 6 8 3 5 6 4* S N P の最も高頻度の形態はシトシンであり、本明細書中で基本型 (*r e f*) アレルと称される。アデノシンは S N P の比較的頻度が低い形態であり、本明細書中で変異型 (*a l t*) アレルと称される。処理前に、連鎖決定と称される方法において、変異及び S N P が同じアレル又は異なるアレル上にあるかを決定するために、患者細胞を遺伝子型決定する (図 1 1)。病原性変異が基本型アレルに連鎖する場合、S N P のシトシン形態を標的とするガイド (*s g R N A (r e f)*) を含むヌクレアーゼガイド R N A 組成物が選択される (本明細書中で R N P (*r e f*) と命名される)。病原性変異が変異型アレルと連鎖する場合、S N P のアデノシン形態を標的とするガイド (*s g R N A (a l t)*) を含む組成物が選択される (本明細書中で R N P (*a l t*) と命名される)。ガイドは、1 個のヌクレオチドのみが異なり、*s g R N A c o n s t a n t* と共に用いる場合、同じ編集結果を生じる (図 1 2)。

10

20

30

【0205】

S N P に基づくノックアウト戦略において O M N I バリアントである 3 7 9 5 ヌクレアーゼを用いるアレル特異性及び切除効率

両者のアレルにおいて標的遺伝子を切断する大多数の C R I S P R 関連編集戦略とは異なり、本発明者らのアプローチは、野生型の機能的アレルには影響を及ぼすことなく、変異型アレルの除去を目的とする。本発明者らの単一アレル編集戦略の実行可能性を実証するために、健常者及び S C N 患者から得た S N P *r s 1 6 8 3 5 6 4* に対してヘテロ接合である H S C を、R N P (*r e f*) 若しくは R N P (*a l t*) のいずれか (それらの系統に応じて) を用いて切除するか、又は未処理 (N T) のままにし、H S C を 3 日間 C D 3 4⁺ 増殖培地中で回復させ、続いて、増殖及び骨髓前駆細胞分化のために I L - 3、S C F、G M - C S F 及び G - C S F の存在下で 7 日間培養し、その後、好中球分化のために更に 7 日間、G - C S F を用いて刺激した (図 8 A)。

40

【0206】

細胞の画分を、ゲノム D N A 又は R N A 抽出のために、分化の 6 日目及び 1 4 日目に回収した。変異型アレル又は基本型アレルのいずれかに結合する 2 種類の競合的プローブにより、アレル特異性を決定した。(プローブの特異性に関して、補足方法並びに図 1 9 A 及び図 1 9 B を参照されたい)。R N P (*r e f*) 組成物を試験するために、本発明者らは、両者とも S N P の基本型に対してヘテロ接合である、基本型アレル上に変異を保持する P 4 1 S C N 患者 (S C N - P 4 1) 由来の H S C 及び V 3 健常者 (H D - V 3) 由

50

来のHSCを用いた。HD-V3及びSCN-P41のHSCでは、基本型アレルのそれぞれ約40%及び約20%は無傷であり、RNP(ref)による編集が特異的であったことが、ddPCRで明らかになった(図8B)。しかし、変異型アレルは、未処理細胞(NT)のものと同様の高いレベルで示されるように、RNP(ref)組成物により影響されなかった(図8B)。これらの結果は、RNP(ref)組成物を用いる処理がアレル特異的編集をもたらすことを実証した。

【0207】

次に、本発明者らは、好中球分化の6日目及び14日目の切除効率を評価した。切除は、一方が現行の切除戦略により影響されないエクソン1に対し、第2のプロンプが切除に際して分解されるエクソン5に対する2種類の別々に標識されたプロンプを用いるELANE遺伝子中の2か所の領域の増幅により決定した(図6B、I)。2種類のプロンプのシグナル間の比率を、切除効率に読み替えた。RNP(ref)を用いる処理は、HD-V3のHSCにおける約13%の切除及びSCN-P41のHSCにおける約25%の切除をもたらした(図8C)。ヌクレアーゼの高い特異性(図8B)を考えると、この切除は、SCN-P41のHSCにおける基本型アレルでの切除を受けている細胞集団の約50%に関連した。RNP(ref)処理はまた、EvaGreen染色で測定した場合に、SCN-P41のHSCにおける約6%の反転イベントも含んだ(図13A及び図13B)。注目すべきことに、健常者由来のHSCにおけるRNP(ref)媒介切除レベルを評価する他の実験は、SCN-P41のHSCにおいて測定されるものと同様であった、上記で報告されたよりも高い切除レベルを示した(図14)。加えて、変異を保持するエクソン4を標的とするSCN-P41細胞由来のcDNAのNGS解析は、未処理細胞における野生型と変異型アレルとの間の1:1比率を示した。RNP(ref)処理は、変異型アレル転写産物を差次的に低減させ、それにより、野生型アレルを富化することにより、野生型と変異型アレルとの比率を3:1までシフトさせた(図8D)。

【0208】

RNP(alt)組成物の特異性及び効率を評価するために、本発明者らは、変異型アレル上に変異を保持し、SNPの変異型に対してヘテロ接合である、P55 SCN患者(SCN-P55)由来のHSCを用いた。

【0209】

RNP(alt)に基づく処理は、変異型アレルの約90%の編集をもたらした(10%のみが無傷のままである)、基本型アレルは、分化の6日目で無傷のまま維持された(図8E)。SCN-P55 HSCにおける切除レベルは、好中球分化の6日目及び14日目で約23%であり(図8F)、このことは、細胞集団の約46%が変異型アレルにおける切除を受けていることを示した。RNP(alt)処理は、EvaGreen染色で測定した場合にSCN-P55 HSCにおける7.6%の反転イベントをもたらした(図13C)。健常者のRNP(alt)編集HSCの特異性及び切除効率を試験し、患者由来細胞から得られるものと同様であることが見いだされた(図14)。加えて、変異を保持するエクソン5を標的とするSCN-P55細胞由来のcDNAのNGS解析は、野生型アレルの富化を示した(図8G)。ELANE mRNAレベルは、SCN-P41及びSCN-P55患者由来の細胞における切除後に減少した(図8H)。切除後に得た増加したWT:変異体アレル比(図8D及び図8G)を考慮すると、低減されたmRNAレベルは、主に、変異型転写産物の分解の結果であった。

【0210】

次に、本発明者らは、RNP(alt)に基づく切除が、多系統生着及び造血再構築に対して必須であると考えられるHSCの部分集団(CD34⁺/CD90⁺細胞)において起こっていることを確認した(図15A~図15C)。

【0211】

それぞれ、RNP(ref)及びRNP(alt)を用いて編集されたP41とP55の両者由来のHSCを、アンプリコンNGSにより分析して、一定ガイド(SgRNA(constant))、基本型ガイド(SgRNA(ref))及び変異型ガイド(Sg

RNA (alt)) に関して特定されたオフターゲットに対する編集を測定した。

【0212】

具体的には、3795ヌクレアーゼバリエーション並びに一定ガイド (SgRNA (constant))、基本型ガイド (SgRNA (ref)) 及び変異型ガイド (SgRNA (alt)) の各々を用いる全ゲノムオフターゲット切断の偏りのない調査 (GUIDE-seq) は、特定されたオフターゲットを生じなかった (≤ 4 ミスマッチ) (図20A~図20C)。

【0213】

加えて、in silicoオフターゲット分析を、ガイドの各々に関して行い、数種類の考えられるオフターゲットを特定した。これらのオフターゲットのいずれも、患者SCN-P41及びSCN-P55由来の編集されたHSCに対して行ったrhAmpSeq解析により検証されず (図20D)、このことは、新規ヌクレアーゼ組成物の高い忠実度を実証した。

【0214】

考え併せると、これまでの結果は、野生型の機能的アレルには影響を及ぼさず、変異体アレルを標的とすることができる、活性で高度に正確なヌクレアーゼを提供する。

【0215】

OMNIバリエーションである3795により促進される編集は、in vitroでの好中球分化及び成熟を増強する

本発明者らのSNPに基づく単一アレル編集アプローチの機能的結果を実証するために、本発明者らは、分化の14日目の、in vitroにおけるRNP (ref) 編集及び未処理健常者及び患者由来HSCの好中球分化及び成熟能力を評価した。フローサイトメトリー分析は、SCN-P41由来HSCの36%のみと比較して、分化プロトコルに供されたHD-V3 HSCの約74%が好中球 (CD66b⁺; ドットプロットの2つの右側4分割区域 (Q2+Q3)) に分化したことを示した。対照的に、SCN-P41由来HSCの38%と比較して、HD-V3 HSCの約15%のみが単球 (CD14⁺/CD66b⁻; ドットプロットの左上の4分割区域 (Q1)) に分化した。これらの観察は、SCN患者における特徴的な造血系の欠陥と合致する。(図9A~図9C; NT: HD-V3対SCN-P41)。RNP (ref) を用いて処理されたSCN-P41由来HSCは、好中球 (CD66b⁺細胞) における74%の増加及び単球サブセット (CD14⁺/CD66b⁻) における2分の1の低減を示した (図9A~図9C; SCN-P41: NT対RNP (ref))。好中球カウントにおける同様の増加が、CD11b⁺/CD15⁺細胞のフローサイトメトリー分析により、SCN-P41由来編集済みHSCにおいて観察された (図16A及び図16B)。HD-V3のHSCにおけるRNP (ref) 媒介編集は、単球及び好中球サブセットに影響を及ぼさず、このことは、この組成物の安全性を支持した (図9A~図9C; HD-V3: NT対RNP (ref))。

【0216】

本発明者らのアレル特異的編集アプローチがSCNに関連する細胞異常を顕著に改善したことを実証した後、次に、本発明者らは、RNP (ref) 処理及び未処理健常者 (V3) 及び患者 (P41) HSC由来好中球における好中球機能を評価した。in vitro食作用能を、異なる群由来の好中球によるzymosan green粒子のファゴソーム取り込みの測定により試験した。フローサイトメトリー分析により、HD-V3とSCN-P41の両者に由来するRNP (ref) 処理及び未処理好中球における同等のレベルの食作用が明らかになった (図9D)。加えて、抗細菌死滅能を、細菌ルシフェラーゼ遺伝子を発現する大腸菌と共に未処理健常者HSC (HD-V3、NT) 及びRNP (ref) 処理患者HSC (SCN-P41、RNP (ref)) から誘導された好中球をインキュベートすること、並びに相対的光単位 (RLU) として表される発光におけるリアルタイム変化を追跡することにより調べた。2つの群を、細菌のみ (好中球を伴わない大腸菌対照) と比較した。健常者由来好中球及びRNP (ref) 処理患者由来好中球は、細菌のみの対照と比較して、細菌単位 (RLU) の23~25%減少で示されるように、効率的に細

10

20

30

40

50

菌を死滅させた。実験は、50,000個及び100,000個のHSCを用いて行った(図9E)。

【0217】

RNP(ref)組成物を用いる実験を、別の患者(SCN-P42)由来の細胞に対して行い、好中球分化の回復を実証する組織学的染色をはじめとする、同様の切除、分化及び機能的結果を描写した(図21A~図21J)。つまり、RNP(ref)組成物によるELANE変異型アレルの特異的切除は、好中球への減少した分化の異常な表現型を改善し、好中球の基本的機能を保存した。同様の分析を、RNP(alt)組成物に対して行った。フローサイトメトリー分析は、好中球(CD66b⁺;ドットプロットの2つの右側4分割区域(Q2+Q3))に分化したHD-V4由来HSCの約83%及び単球(CD14⁺/CD66b⁻;ドットプロットの左上の4分割区域(Q1))に分化した約7%を示した。SCN-P55由来HSCは、好中球への分化が低く(約53%)、単球への分化が高く(約29%)(図9F~図9H;NT:HD-V4対SCN-P55)、典型的なSCN造血系欠陥を示した。RNP(alt)を用いて処理されたSCN-P55由来HSCは、好中球(CD66b⁺細胞)における1.5倍の増加及び単球サブセット(CD14⁺/CD66b⁻)における3分の1の低減を提示した(図9F~図9H;SCN-P41:NT対RNP(alt))。好中球サブセットでの同様の増加が、CD11b⁺/CD15⁺細胞のフローサイトメトリー分析により、SCN-P55由来編集済みHSCにおいて観察された(図16C及び図16D)。RNP(alt)で処理した又はヌクレアーゼ組成物を用いずにエレクトロポレーションした(SCN-P55モック)、SCN-P55に由来するHSCのDiff-Quik染色は、モック群と比較して、RNP(alt)処理群における古典的な多形核好中球形態学を有する比較的多数の細胞を明らかとなった(図9I)。zymosan green粒子のフローサイトメトリー分析は、SCN-P55由来の未処理好中球と比較して、RNP(alt)処理好中球において若干高いレベルの食作用を明らかとなった(図9J)。加えて、健常者の未処理好中球(HD-V4、NT)及び患者RNP(alt)処理好中球(SCN-P55、RNP(alt))は、細菌のみの対照と比較して、細菌単位(RLU)の顕著な30%減少で示されるように、効率的に細菌を死滅させた(図9K)。

【0218】

RNP(alt)組成物を用いる実験を、別の患者(SCN-P12)由来の細胞に対して行い、同様の切除、分化及び機能的結果を描写した(図22A~図22I)。さらに、以前の患者において見いだされる変異(エクソン4及び5)の上流に位置するエクソン2上の変異を保持する患者細胞(SCN-P56)に対して行った別の実験は、同様の結果を示した(図23A~図23I)。この明細書に記載の結果は、RNP(ref)及びRNP(alt)新規ヌクレアーゼ組成物を用いるELANE変異型アレルの単一アレルノックアウトが、好中球分化の増強と必須の好中球コア機能の維持の両者において安全で有効であることを示す。

【0219】

OMNIバリエーションである3795は、追跡可能なオフターゲットを伴わない高い忠実度を示した。これは、PAM配列の獲得により媒介されない特異的な単一アレルの遺伝子編集を実証する最初の報告である。本発明者らの新規ヌクレアーゼのこの固有の特徴は、他の技術は対処できない大多数の遺伝子障害を網羅する、顕性、ドミナントネガティブ、及び複合ヘテロ接合体であるさまざまな適応症において遂行できる。

【0220】

OMNIバリエーションである3795組成物は、約25%の切除効率を示した。とりわけ、このヌクレアーゼ組成物の高いアレル特異性を考えると、細胞集団の約50%が変異体アレルにおける切除を受けたことが推定される。機能的側面に関して、ELANE単一アレル切除は、in vitroでの好中球分化を顕著に促進した。SCN患者の造血系欠陥と合致する異常な数の単球もまた低減された。切除された好中球は、正常な食作用及び細菌死滅能を示し、このことは、編集が効果的で安全であったことを示した。

【0221】

つまり、本実施例は、特異的単一アレル切除の新規なCRISPR/Cas9に基づく戦略を提示する。そのような戦略は、効率的、機能的、正確及び安全であることが見いだされた。

【0222】

実施例3 材料及び方法

ヒトHSC単離

HSCを、SCN患者の骨髄及び健常者の動員末梢血から単離した。

【0223】

CRISPR/Cas9 OMNIバリエーション3795 ELANE遺伝子編集

OMNIバリエーションである3795ヌクレアーゼ：sgRNAのモル比が1：2.5のリボ核タンパク質（RNP）系を用いた。ヒトCD34⁺細胞に、CA-137プログラム（Lonza 4D, Nucleofector（商標））を用いてエレクトロポレーションした。

【0224】

デジタルドロップレットPCR（切除、アレル特異性）

切除及びアレル特異性を、ゲノムDNAに対するデジタルドロップレットPCR（商標）を用いて測定した。切除反応に関して、ELANE遺伝子中の2つの領域、エクソン1及びエクソン5の増幅を、それぞれ、2種類の異なるプローブFAM（X1）及びHEX（X1）を用いて行った。プローブシグナル間の比率を、切除効率に読み替えた。アレル特異性に関して、FAMプローブ（変異型アレルに結合する）及びHEXプローブ（基本型アレルに結合する）を用いた（FAM+HEX）。2種類のプローブ間の比率を、内因性遺伝子に対して標準化した。

【0225】

変異型：野生型アレル比の評価

それぞれ患者41及び55においてS126L及びR220Q変異を保持するエクソン4及び5を標的とする次世代シーケンシング（NGS）を用いて、cDNAをマッピングした。処理細胞における変異型：野生型アレルの相対的比率を算出し、未処理細胞のものと比較した。

【0226】

分化アッセイ

編集済み及び未処理HSCを、Nasriらから採用された分化プロトコルに供した。14日目に、細胞を、単球（CD14⁺/CD66b⁻）及び好中球（CD66b⁺）サブセットに関してフローサイトメトリーにより分析した。

【0227】

細菌死滅アッセイ

13日目の分化したHSCの細菌死滅能について、J. T. Atosuoに記載のように評価した。相対的光単位（RLU）を、5時間にわたって測定した。提示される最終時点は、RLUレベルがプラトーに達した時点である。分化したHSCを含まず（大腸菌のみ）、食作用阻害剤であるサイトカラシンDを含むウェル（データは示していない）は対照として機能した。

【0228】

食作用アッセイ

食作用能を、EZCell（商標）食作用アッセイキット（Green Zymosan）、（BioVision, Cat no. K397）を用いて評価した。細胞を、オプソニン化蛍光Zymosan Green粒子の内在化に関してフローサイトメトリーにより分析した。

【0229】

FACS抗体、プローブ、配列、アッセイ、プロトコル及び追加の方法についての詳細は、以下の補足方法に示す。

【0230】

実施例3 補足方法

10

20

30

40

50

ヒトSCN患者HSC単離

3～6 mLの新たに回収された骨髓を、周囲温度で一晩輸送した。造血幹及び前駆細胞、HSPCを、製造業者のプロトコールに従って、RosetteSepヒト骨髓前駆細胞事前富化カクテル (Cat. No.15027) 及びLymphoprep (Cat.no. 07801) を用いて最初に富化した。HSC富化細胞集団を、37℃、5%CO₂において、1%Penn Strep (Cat.no 03-031-1B, Biological Industries)、1×StemSpan CD34増殖添加物 (10×) (Cat.no. 02691)、及び1.0 μM UM729 (Cat.no.72332) を添加したCD34⁺増殖培地 (StemSpan SFEMII培地 (Cat.no. 09655)) 中で4日間培養することにより、増殖させた。増殖後、CD34⁺細胞を、製造業者のプロトコールに従って、EasySepヒトCD34陽性選択キットII (Cat.no. 17856) を用いて更に富化した。富化されたCD34⁺細胞を、Cryostor CS10 (cat.no. 07931) 中で1×10⁶細胞/mLにおいて凍結保存した。細胞を、液体窒素の気相中で保存した。全てのカタログ番号は、別途示されない限り、StemCell Technologiesからの材料を指す。

【0231】

ヒト健常者HSC単離

動員末梢血由来の凍結保存された健康なヒトCD34⁺前駆細胞を、Lonza (Cat no. 4Y-101C) から得た。細胞を、50,000細胞/mLでCD34⁺増殖培地中に懸濁し、エレクトロポレーション前に37℃、5%CO₂において4日間増殖させた。

【0232】

CRISPR/Cas9 OMNIバリエント3795によるELANE遺伝子編集

HSCの編集を、17 μgヌクレアーゼ及び262 pmolの各ガイドを含む、1:2.5 (ヌクレアーゼ:sgRNA) のモル比でのリボ核タンパク質 (RNP) 系を用いて行った。ヌクレアーゼ及びsgRNA複合体を、25℃で10分間インキュベートした。ヒトCD34⁺細胞を、PBSを用いて1回洗浄した。2×10⁵個のCD34⁺細胞を、20 μLのP3エレクトロポレーションバッファー (Lonza P3キットS) 中に懸濁し、RNPミックスに添加した。CA-137プログラム (Lonza 4D, Nucleofector (商標)) を用いるエレクトロポレーション後、細胞を、1.25.0×10⁵細胞/mLの濃度で、予温したCD34⁺増殖培地に移した。ガイドは、Agilentにより製造された。ガイド配列は、以下の表中にまとめる：

【0233】

【表6】

sgRNA 名称	ガイド配列 (足場 + スパーサー)
sgRef	GUGUCAAGCCCCAGAGGCCACAgUUUGAGAGUUAUGAAAAUGACG AGUUCAAAUAUAAAAUUUAUUCAAACCGCCUAUUUAUAGGCCGCGAG AUGUUCUGCUUU (配列番号35)
sgAlt	GUGUCAAGCCCCAGAGGACACAgUUUGAGAGUUAUGAAAAUGACG AGUUCAAAUAUAAAAUUUAUUCAAACCGCCUAUUUAUAGGCCGCGAG AUGUUCUGCUUU (配列番号36)
sgConstant	GCAGUCCGGGCGUGGGAGCGGGUgUUUGAGAGUUAUGAAAAUGAC GAGUUCAAAUAUAAAAUUUAUUCAAACCGCCUAUUUAUAGGCCGCGA GAUGUUCUGCUUU (配列番号37)

【0234】

切除割合及びアレル特異性に関するデジタルドロップレットPCR

切除割合及びアレル特異性を、QIAamp DNAマイクロキット、Qiagen (Cat no. 56304) を用いて抽出されたゲノムDNAに対してデジタルドロップレットPCR (商標) (ddPCR (商標)、Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。製造

業者のプロトコールに従う。

【0235】

ddPCR反応は、1×dUTP不含ddPCR Supermix for probe (#1863024)、HindIIIを用いて消化された25～100 ngのDNA (X1 Cutsmartバッファー中で4 U／μLまで希釈) 及び好適なプライマー／プローブを含有した。切除反応に関して、ELANE遺伝子中の2つの領域、エクソン1及びエクソン5の増幅を、それぞれFAM (X1) 及びHEX (X1) を用いて標識された2種類の異なるプローブを用いて行った。HEXシグナルとFAMシグナルとの間の比率を、切除効率に読み替えた。

【0236】

アレル特異性に関して、2種類の競合的プローブ：変異型アレルに結合するFAMプローブ、及び基本型アレルに結合するHEXプローブを用いた (FAM+HEX)。ヘテロ接合体未処理細胞における2つの濃度間の比率は、各gDNA試料に関して内因性遺伝子RPP30及びSTAT1に対して標準化した、1である。反応合計体積は、22 μLであった。SNPの基本型又は変異型のいずれかに対してホモ接合であった健常者の細胞から抽出したDNAに対する各プローブの結合性をddPCRで測定し、プローブが交差反応しないことを確認した (図19A)。さらに、SNPの基本型に対してホモ接合である健常者の細胞は、未処理細胞と同等な切除レベルを生じたRNP (alt) 組成物を用いる処理と比較して、RNP (ref) 組成物を用いて処理した場合に効率的切除を描写した。このことは、sgRNAの特異的な標的化を更に実証する (図19B)。

【0237】

ddPCR混合物中のゲノムDNAを、QX100液滴生成器を用いて個別の液滴に分け、96穴深ウェルPCRプレートに移し、Bio-Rad PCRサーモサイクラー中で増殖した。製造業者のガイドライン (Bio-Rad) に従って、Bio-Rad液滴リーダー及びQuantaSoftソフトウェアを用いて読み取り、実験を分析した。

【0238】

プライマー及びプローブはBio-Rad製で、以下の表に説明する：

【0239】

【表7】

プローブ名称	カタログ番号
ELANE ddPCRアッセイ エクソン1 (FAM)	dHsaCNS328407057
ELANE ddPCRアッセイ エクソン5 (HEX)	qHsaCEP0055470
rs1683564編集ddPCRアッセイ(FAM+HEX)	dHsaMDS873573221
RPP30	dHsaMDS117591774
STAT1	dHsaCNS850507320

【0240】

変異型：野生型アレル比の評価

RNP (ref) 又はRNP (alt) のいずれかを用いる処理されたHSC由来のcDNAを、それぞれ患者41及び55においてS126L及びR220Q変異を保持するエクソン4及び5を標的とする次世代シーケンシング (NGS) を用いてマッピングした。未加工FASTQファイルを解析し、BAMファイル (生物学的配列を保存するためのテキストベースの形式) を、FASTQ to BAMスクリプトを用いて生成した。野生型アレルに対する変異型アレルの相対的比率を算出し、両者の患者で未処理細胞と比較した。プライマーを、以下の表において詳述する：

【0241】

【表 8】

変異	配列
S126L	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNTACGACCCCGTAAACT TGCT
(P41)	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNCGGAGCGTTGGATGA TAGAG
R220Q	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNTCGCAGTCCAG CTTCCCCAC
(P55)	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNACAGCCAAG GAGCATCAAAC

10

【0242】

分化アッセイ

編集済み及び未処理HSCを、CD34⁺増殖培地中で3日間回復させ、Nasriら²³から採用された分化プロトコールに供した。簡潔には、増殖及び骨髓前駆細胞分化のために、1% Glutamax (Cat.no 35050061, Gibco (商標))、10% FBS (Cat.no 04-001-1A, Biological Industries)、全てPeproTechからの、5 ng/mL IL-3 (Cat.no 200-03)、SCF (Cat.no 300-07)、GM-CSF (Cat.no 300-03) 及び10 ng/mL G-CSF (Cat.no 300-23) を添加したRPMI (Cat.no 11875093, Gibco (商標)) 中で7日間、HSCを培養し、その後、好中球分化及び成熟のためにRPMI、1% Glutamax、10% FBS、1% Penn Strep (Cat.no 03-031-1B, Biological Industries)、10 ng/mL G-CSF 中で7日間培養した。14日目に、細胞を、単球 (CD14⁺/CD66b⁻) 及び好中球 (CD66b⁺) サブセットに関してフローサイトメトリーにより分析した。CD66b抗ヒト、Pacific Blue (Cat No. 305112, Biolegend) 及びCD14、抗ヒト、APC (Cat No. 130-110-520, Miltenyi Biotec) を用いた。

20

【0243】

Cytospin染色

分化の15日目の8×10⁴個のHSCを、Cytospin 4低速細胞遠心分離機 (Thermo Scientific) を用いてCytoslide顕微鏡スライド (ThermoFisher) 上で遠心分離し、製造業者の推奨に従ってDiff-Quick染色系 (MilliporeSigma) を用いて染色した。Nikon DSLRデジタルカメラを用いて400×倍率においてLEITZ LABORLUX S偏光顕微鏡上で顕微鏡写真を得た。

30

【0244】

細菌死滅アッセイ

健常者及びSCN患者 (RNP (ref)、RNP (alt)) のいずれかを用いて編集又は未処理) に由来する13日目の分化したHSC (Nasriらから採用された分化プロトコールに供された) の細菌死滅能について、J. T. Atosuoに記載のように評価した。簡潔には、ウェル当たり100,000個の分化したHSCを、200,000個のルシフェラーゼ発現細菌細胞pAKLUX2 (Addgene, Cat No. 14080) の存在下でインキュベートした。細胞を、200 µL HBSS++、10% FBS中、37℃で培養した。30分間隔で、照度計 (Berthold CentroXS3 LB960) にプレートを移すこと、及びウェルごとに0.5秒間発光を測定することにより、発光を測定した。発光におけるリアルタイム変化である相対的光単位 (RLU) を、5時間にわたって測定した。提示される最終時点は、RLUレベルがプラトーに達した時点である。分化したHSCを含まず (大腸菌のみ)、10 ng/mLの食作用阻害剤であるサイトカラシンD (Santa Cruz Biotec, Cat No. sc-20144) を含むウェル (データは示していない) は対照として機能した。

40

50

【0245】

食作用アッセイ

食作用能を、EZCell（商標）食作用アッセイキット（Green Zymosan）、（BioVision, Cat no. K397、製造業者のプロトコールに従う）を用いて評価した。健常者及びSCN患者（RNP（ref）、RNP（alt）のいずれかを用いて編集又は未処理）由来の14日目の分化したHSC（Nasriらから採用された分化プロトコールに供された）を、HBSS++/10%FBS（ 0.5×10^6 細胞/mL）中に再懸濁し、200mLの懸濁細胞当たり5mLのオプソニン化Alexa Fluor 488コンジュゲート化zymosan粒子の存在下、37℃で1.5時間インキュベートした。陰性対照として、細胞を、Zymosan Green試薬とのインキュベーション1時間前及びインキュベーション中に、10ng/mLの食作用阻害剤であるサイトカラシンD（Santa Cruz Biotech, Cat No. sc-201442）と共にインキュベートした。続いて、内在化されなかった粒子からの蛍光を除去するために、細胞を洗浄し、キットの説明書に基づいて、クエンチャー溶液中でインキュベートした。続いて、細胞を、オプソニン化蛍光Zymosan Green粒子の内在化に関して、フローサイトメトリーを用いて分析した。

10

【0246】

反転

デジタルドロップレットPCR（ddPCR）変異アッセイにより、反転イベントを検出及び定量化した。最初に、完全反転を、SnapGeneソフトウェアを用いて模倣し、NGSにより検証した。続いて、総反転イベントを、dsDNAに結合する蛍光DNA結合性色素であるEvaGreen色素（BIO-RAD、カタログ番号186-4034、製造業者のプロトコールに従う）を用いてddPCRにより定量化した。特異的プライマーを、切除された断片の反転されたバリエーションを増幅するために設計した（図11における図示を参照されたい）。蛍光シグナルは、切除により影響を受けなかったELANEエクソン1領域の増幅に対して標準化した（プライマーの2種類の異なるセットにより行われる。平均された標準化データが提示される）。プライマーは、以下の表において詳述される：

20

【0247】

【表9】

プライマー名称	配列
エクソン4 プライマー	ACGTCTGCACTCTCGTGAGG
エクソン5 プライマー（反転）	TTCAGGCTCCACCCAGTTTGTC
エクソン1 プライマー	ミックス3: GCACAGGGCTATAAGAGGAGC GCGGGAGGTTGGACTCAAAA
	ミックス6: GGGAGAGGAAGTGGAGGGC GAGGGTCATGGTGGGGCT

30

【0248】

長期的HSC集団における切除レベル

AllCellsから購入したリユーコパック（leukopak）から単離した2名の健常者（MLP1（3055934）；SNPの変異型に対してヘテロ接合及びMLP2（3055940）、SNPの変異型に対してホモ接合）のHSCを、軽微な変更を伴って上記の「CRISPR/Cas9 OMNIバリエーションである3795 ELANE遺伝子編集」セクションに従って、解凍の翌日に編集した。細胞数は、2M細胞/エレクトロポレーションであった。ガイド及びヌクレアーゼの大規模化を、状況に応じて行った。85µgヌクレアーゼ及び1310pmolの各ガイドを含む1:2.5（ヌクレアーゼ：sgRNA）のモル比を用いた。P3ヌクレオフェクション溶液（Lonza）及びLonza 4D-Nucleofector（商標）XキットL（プログラムCA-137）において、ヌクレオフェクシ

40

50

ョンを行った。編集の3日間後、CD90-APC-Vio770、ヒト(130-114-863 Milteny)を用いて、FACS ARIA(商標)II SORPフローサイトメーターセル(BD)において、細胞をソーティングした。ソーティングされた細胞を、Nasriらに従って、増殖培地中で7日間インキュベートした。CD90⁺、CD90⁻及び合計集団の切除レベルを、ddPCRの項に記載のとおり、ddPCRで評価した。

【0249】

変異-SNP連鎖

最初に、ELANE変異及び考えられるSNPを、標的化短リードNGSにより、SCN患者由来の細胞において特定した。続いて、変異とSNPの両者を包含する遺伝子の一部分を、連鎖プライマーを用いるPCR反応により増幅し、細菌にクローニングした。各クローンは、1つのアレルからのアンプリコンを担持する。複数クローンのプラスミドを、変異及びSNP領域に関してサンガーシーケンスした(T7及びSP6プライマーを用いる)。変異及びSNPがシスである場合、それらは同じクローンにおいて見いだされ、トランスである場合、変異及びSNPは異なるクローン中に見いだされた。プライマーは、以下の表において詳述される：

【0250】

【表10】

プライマー名称	配列
rs10414837	FP: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNGGTGGGTCCTCAGTGA CTCT RP: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNGGAATTCAGCCTGACCAA
rs3761005	FP: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNGAGTGAGGACCAAGCCTGAG RP: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNAGGGCCATTGTCTCCCTAAC
rs1683564	FP: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNTCCTGCTACCTCCCTTCTT RP: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNTTTTAGGAGGGGCCACTGA
連鎖	FP: GAGGGTCATCATCACTGCCC RP: GCCAGACTCACACCAGAGTCGACAAGT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
R220Q変異	FP: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNTCGCAGTCCAGCTTCCCCAC RP: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNACAGCCAAGGAGCATCAAAC
S126L変異	FP: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNGAGGGTCATCATCACTGCCC RP: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNAGTCCGGGCTGGGAGCGGGT

【0251】

健常者及び患者集団におけるSNPのヘテロ接合の頻度

ELANE遺伝子領域(ELANE遺伝子の±3kb)を包含するバリエーションコールファイルを、Data Slicerツールを用いて1000ゲノムプロジェクトコンソーシアム(フェーズ3)からダウンロードし、R統計計算環境において解析した。3501種類の遺伝子型が、3501名の個体から利用可能であった。家族関係は解析から省略され、これにより血縁関係のない個体由来の2407種類の遺伝子型が生じた。全ての共通の多型に対するアレル頻度(>1%MAF)を算出した。アレル特異的ELANEノックアウトについての集団網羅率を最適化するために、3種類のSNPを選択した(rs3761005、rs1683564、及びrs10414837多型)。3種類の選択されたSNPの少なくとも1種に対してヘテロ接合である集団の割合を算出した。

【0252】

53名の患者の試料を、病原性変異及び3種類の選択されたSNPに関して配列決定した。合計46種類の骨髓試料及び7つのiPSC株を用いた。試料の44種類がSCN患者由来であり、その9種類が周期性好中球減少症を有する患者由来であった。3種類の選

択された S N P の各々のヘテロ接合の頻度及びそれら少なくとも 1 種に対してヘテロ接合である集団の割合を算出した。

【 0 2 5 3 】

統計学的方法

個別の試料に関する 2 標本 T 検定又は適切な場合には A N O V A モデルを、処理群間での連続型変数における差異の統計学的有意性を試験するために適用した。反復測定を用いる二元配置分散分析を、死滅アッセイを解析するために用いた。 χ^2 二乗検定又は適切な場合にはフィッシャーの正確検定を、健常者の集団と患者集団との間でのヘテロ接合における差異の統計学的有意性を試験するために適用した。全ての検定は両側であり、5 % 以下の p 値を統計学的に有意であると見なした。データは、Prism ソフトウェア (Graph P ad バージョン 9 . 0 . 2) を用いて解析した。

10

【 0 2 5 4 】

20

30

40

50

【表 1 1】

補遺表1

患者番号	診断	供給源	ELANE 変異	変異の 位置	rs10414837	rs3761005	rs1683564
1	SCN	骨髓	S126L	4	CC	TA	CC
2	SCN	骨髓	G210V	5	CT	TT	CC
3	SCN	骨髓	C55S	2	CC	TA	CC
4	SCN	骨髓	G221ter	5	CC	TA	AA
5	SCN	骨髓	D230fs	5	CC	AA	CC
6	SCN	骨髓	A57T	2	CT	TA	AA
7	SCN	骨髓	R103P	3	CC	TT	AA
8	SCN	骨髓	T128del	4	CT	AA	CA
9	SCN	骨髓	V83D	3	CT	TT	AA
10	SCN	骨髓	L84P	3	CT	TA	CA
11	SCN	骨髓	L84P	3	CT	TT	CA
12	SCN	骨髓	M154R	4	CC	TT	CA
13	SCN	骨髓	G221ter	5	CT	TT	AA
14	SCN	骨髓	G203R	5	CT	TA	CA
15	SCN	骨髓	G214R	5	CC	AA	CA
16	SCN	骨髓	P139L	4	CC	TA	CC
17	SCN	骨髓	Y228ter	5	CT	TT	AA
18	SCN	骨髓	P139L	4	CC	TA	CA
19	SCN	骨髓	W156R	4	CT	TA	CC
20	SCN	骨髓	P139L	4	CC	AA	CA
21	CyN	iPSC	P139L	4	CC	TT	CC
22	SCN	iPSC	I120N	3	CT	TT	AA
23	SCN	iPSC	G214R	5	CC	TA	CC
24	CyN	iPSC	S46F	2	CC	TA	CA
25	SCN	骨髓	IVS4 +5 G>A	INT4	CC	TT	CA
26	SCN	骨髓	S126L	4	CC	TA	CA
27	SCN	骨髓	R103L	3	CC	TA	CA
28	SCN	骨髓	M66R	2	TT	TT	CC
29	SCN	骨髓	C208X	5	CT	TA	CC
30	SCN	骨髓	M1R	1	CC	TT	CA
31	SCN	骨髓	P234fs	5	CC	AA	CC
32	SCN	骨髓	I60T	2	CC	TT	CA
33	CyN	iPSC	IVS4 +1sd	INT4	CT	TT	CC
34	SCN	iPSC	P139L	4	CT	TT	AA
35	SCN	iPSC	R191S	4	TT	TT	CC
41	SCN	骨髓	S126L	4	CC	AA	CA
42	SCN	骨髓	S126L	4	CC	AA	CA
43	CyN	骨髓	IVS4 +5 G>A	INT4	CC	TT	CC
44	CyN	骨髓	IVS4 +1 G>A	INT4	CT	TA	CA
45	CyN	骨髓	R220Q	5	CT	TT	CC
46	CyN	骨髓	IVS4 +3 A>T	INT4	CC	TA	CC
47	CyN	骨髓	W241ter	5	CT	AA	CC
48	SCN	骨髓	S126L	4	CT	TA	CC
49	SCN	骨髓	S126L	4	CT	TA	CC
50	SCN	骨髓	P139L	4	CT	TA	CC
51	SCN	骨髓	S46F	2	CC	TA	CC
52	SCN	骨髓	IVS3 -8	INT3	CT	TA	CC
53	SCN	骨髓	P139L	4	CC	TA	CA
54	SCN	骨髓	R220Q	5	CC	TA	CA
55	SCN	骨髓	R220Q	5	CT	TA	CA
56	SCN	骨髓	A57V	2	CT	AA	CA
57	SCN	骨髓	R191S	4	TT	TT	CC
58	CyN	骨髓	S126L	4	CC	AA	CA

【0255】

補遺表1．患者集団による3種類のSNPの網羅率。SCN及び周期性好中球減少症（CyN）患者から得た試料におけるELANE遺伝子中の3種類のSNPの配列決定結果。ELANE遺伝子中の病原性変異もまた、配列決定により検証した。緑色のセルはヘテロ接合SNPを描写する。

【0256】

実施例4 ヌクレアーゼの特異性及び忠実度に対するバリエーション3795変異の各々の貢献
バリエーション3795は、極端に低いオフターゲット活性（＜0.05％）及びその間に単一ミスマッチを有する同じ遺伝子の2つのアレル間を識別する能力を有するCRISP

Rに基づくヌクレアーゼの特異性バリエーションである。バリエーションは、4か所の変異を含む：R 4 7 8 I、Y 5 4 5 H、Q 8 0 3 V及びL 8 0 5 I。OMNI-50 V 3 7 9 5において見いだされる各変異の活性及び特異性に対する作用及び寄与を調べるために、4種類の単一変異体バリエーションの3種類、及び4か所の変異の1つが各バリエーションにおいて存在しない4種類の三重変異体バリエーションを、発現及び精製した（表A）。RNP複合体を、sgRNA g 6 2-Refとのアセンブリにより、WT OMNI-50ヌクレアーゼ、V 3 7 9 5バリエーション、及び7種類のバリエーションを用いて調製した。これらのRNP複合体を、ガイド配列の標的に対してヘテロ接合体であるLCL細胞にエレクトロポレーションした（表B）。標的のアレル（REF）及び標的ではないアレル（ALT）の編集レベルをNGSで測定した。図17A～図17Bから理解できるように、V 3 7 9 5の標的アレル（REF）に対する識別は、主にR 4 7 8 I変異により与えられる（表E）。R 4 7 8 I変異を含むバリエーションのみ（例、V 6 8 6 4、V 6 8 6 5、V 6 8 6 6、V 3 7 9 5）が、標的アレルに対する明らかな優先傾向を示し、この変異を除去することによって、識別性が消失した（例、V 6 8 6 7）。

10

【0257】

NGSによりg 6 2の2か所の公知のオフターゲット部位での編集レベルを測定することにより、特異性作用を検証した（g 6 2 OT 1及びg 6 2 OT 2、表C）。OMNI-50 V 3 7 9 5は、WT OMNI-50ヌクレアーゼと比較して、これらの部位での極めて低レベルの編集を有する（図18A～図18B、表F）。全3種類の単一変異体において、オフターゲット部位のWT編集レベルよりも低い編集レベルが観察され、このことは、オフターゲットにおける低減に対する3か所の変異の貢献を示した。しかし、Y 5 4 5 H変異は、オフターゲット編集における最も顕著な低減を有した（OT 1 0.5%及びOT 2 0.04%、表F）。三重バリエーションの全てもまた、V 3 7 9 5ヌクレアーゼバリエーションと同様の、極めて低いオフターゲット活性を示した。意外なことに、Y 5 4 5 H変異が変異のセットから除外された場合（例、V 6 8 6 6）、オフターゲット編集は若干増加した（OT 1 1.90%、OT 2 0.2%、図18A～図18B、表F）。全体として、これらの結果は、V 3 7 9 5ヌクレアーゼバリエーションの高レベルの特異性が、R 4 7 8 I及びY 5 4 5 H変異によるという結論を導いた。

20

【0258】

R 4 7 8 I及びY 5 4 5 HがV 3 7 9 5ヌクレアーゼバリエーションの観察された特異性の原因であることが確立されたら、他の置換の作用を試験した。これらの位置の各々に関して、g 6 2-Ref sgRNA及び他の3か所の変異のバックグラウンドにおいて異なる生化学基からの置換を含む数種類のヌクレアーゼバリエーションを用いて、RNPを生成させた（表A）。識別性及びオフターゲットに対する作用を、これまでに説明したように測定した（図17A～図17B及び図18A～図18B）。

30

【0259】

4 7 8 位に関して：バリエーションV 7 0 8 7におけるアスパラギン酸（D）のような荷電アミノ酸は、識別性を消失させ、オフターゲット編集を増加させる（図18B）。識別性に対する同様の作用が、三重バリエーションV 6 8 6 7におけるアルギニン（R、参照アミノ酸）に関して見られる（図17A～図17B）。しかし、V 7 0 8 6におけるバリン（V）及びV 3 7 9 5におけるイソロイシン（I）のような大型疎水性アミノ酸は、高度な識別性及び低減されたオフターゲットを保持する。V 7 0 8 5におけるヒスチジン（H）のような芳香族アミノ酸及びV 7 0 8 8におけるセリン（S）のような極性非荷電アミノ酸もまた、OMNI-50 V 3 7 9 5と同様の表現型を支持する。

40

【0260】

5 4 5 位に関して：V 7 0 9 3におけるフェニルアラニン（F）、及びV 3 7 9 5におけるヒスチジン（H）のようなアミノ酸への置換は、バリエーションV 3 7 9 5と同様の高度な識別性及び低いオフターゲットを保持する（図17A～図17B及び図18A～図18B）。アラニン（A）は小型疎水性残基であり、これもまたV 3 7 9 5と同様の表現型を示したV 7 0 9 4において代用として用いられる（図17B及び図18B）。

50

【0261】

実施例4 材料及び方法

HTPタンパク質発現及び精製

野生型OMNI-50ヌクレアーゼ及びそのバリエーションを、37℃、350rpm攪拌において自己誘導TB培地中で3.5時間培養し、続いて、18℃に17~20時間移した。4000×gの遠心分離により細胞を回収し、-80℃で保存した。OMNI-50バリエーション及びWT OMNI-50細胞ペレットを解凍し、溶解バッファー中で30分間インキュベートした。粗溶解物を、4000×gで1時間、4℃の遠心分離により清澄化した。清澄化したタンパク質溶解物を、セファロース6Ni-NTA樹脂(Cytiva)と共にインキュベートした。タンパク質結合型Ni-NTA樹脂を96穴フィルターウェルプレートにロードし、夾雑物を除去するためにバッファー(HEPES 20mM、NaCl 0.6M、イミダゾール60mM)を用いて洗浄した。高濃度のイミダゾールバッファー(HEPES 20mM、NaCl 0.6M、イミダゾール0.4M)を用いて、樹脂からタンパク質を溶出した。溶出したタンパク質を、保存バッファーを用いて平衡化した1800μLのG-25 Sephadex樹脂を含有する96穴フィルタープレートを用いて脱塩した。続いて、脱塩したタンパク質を濃縮し(Amicon-ultra 0.5ml 50kDa, Millipore)、滅菌ろ過した(Ultrafree-MC 0.22μm PVDFフィルター)。続いて、精製されたバリエーションを-80℃で保存し、細胞へのトランスフェクション前に、濃度、純度及びin vitro活性に関して分析した。

10

20

【0262】

LCL細胞のRNPエレクトロポレーション

124pmolのsgRNA及び105pmolのヌクレアーゼを混合することにより、RNP混合物を調製した。LCL細胞を、室温、300×gで5分間遠心分離し、PBSを用いて洗浄した。ペレットを適切な体積のLonzaヌクレオフェクションSGエレクトロポレーション溶液中に再懸濁し、RNP混合物に移した。4D-Nucleofectorデバイス(Lonza Bioscience)を用いて、エレクトロポレーションを行った。予温したBLCCL培地を、エレクトロポレーションの直後にキュベットに添加した。細胞を、2~4日間インキュベートした(37℃、5%CO₂)。

30

【0263】

NGS解析

72時間で、細胞を回収し、それらのゲノムDNA内容物を、対応する推定上のゲノム標的を増幅したPCR反応中で用いた。アンプリコンを次世代シーケンシング(NGS)に供し、続いて、得られた配列を、各標的部位の編集イベントの割合を算出するために用いた。切断部位周辺の短い挿入又は欠失(インデル)は、ヌクレアーゼによるDNA切断後のDNA修復の典型的な結果である。したがって、パーセント編集の算出は、各アンプリコン内のインデル含有配列の割合から推定された。

40

【0264】

50

【表 1 2】

表A CRISPRヌクレアーゼ

OMNI-50バリエーション	WT OMNI-50に対する変異	アミノ酸配列(2番目の位置から開始)	DNA配列(2番目の位置から開始)
野生型		配列番号62	配列番号71
V3795	R478I, Y545H, Q803V, L805I	配列番号63	配列番号72
V6918	Q803V	配列番号64	配列番号73
V6919	Y545H	配列番号65	配列番号74
V6920	L805I	配列番号66	配列番号75
V6864	R478I, Y545H, Q803V	配列番号67	配列番号76
V6865	R478I, Y545H, L805I	配列番号68	配列番号77
V6866	R478I, Q803V, L805I	配列番号69	配列番号78
V6867	Y545H, Q803V, L805I	配列番号70	配列番号79
V7085	R478H, Y545H, Q803V, L805I	配列番号89	配列番号98
V7086	R478V, Y545H, Q803V, L805I	配列番号90	配列番号99
V7087	R478D, Y545H, Q803V, L805I	配列番号91	配列番号100
V7088	R478S, Y545H, Q803V, L805I	配列番号92	配列番号101
V7090	R478I, Y545C, Q803V, L805I	配列番号93	配列番号102
V7091	R478I, Y545D, Q803V, L805I	配列番号94	配列番号103
V7092	R478I, Y545T, Q803V, L805I	配列番号95	配列番号104
V7093	R478I, Y545F, Q803V, L805I	配列番号96	配列番号105
V7094	R478I, Y545A, Q803V, L805I	配列番号97	配列番号106

10

20

【0 2 6 5】

【表 1 3】

表B sg62ガイド分子

sgRNA名称	sgRNA配列 (スパーサー及び足場)
sg62	GUGUCAAGCCCCAGAGGCCACAGUUUGAGAGUUAUGAAAAUGACGAG UUCAAAUAUUUUUAUUCAAACCGCCUAUUUAUAGGCCGCAGAU UCUGCUUU (配列番号80)

30

【0 2 6 6】

【表 1 4】

表C ガイド分子標的配列

標的	DNA配列	PAM
g62	GTGTCAAGCCCCAGAGGCCACA (配列番号81)	GGGACA
g62OT1	GCCAAACCCCAAAGGCCACA (配列番号82)	CGGTGT
g62OT2	GCCAAGCCTCAGAGGCCACA (配列番号83)	GGGCAG
g62Alt	GTGTCAAGCCCCAGAGGACACA (配列番号84)	GGGACA

40

【0 2 6 7】

50

【表 1 5 - 1】

表D 使用したpET9aプラスミド

プラスミド	目的	要素
pET9a	細菌でのOMNIホリヘプラスミドの発現	T7プロモーター - SV40 NLS - リンカー - OMNI ORF (ヒトに最適化) - HAタグ - SV40 NLS - 8XHisタグ - T7ターミネーター

【 0 2 6 8 】

【表 1 5 - 2】

表D 付録: pET9a要素

要素	タンパク質配列	DNA配列
HAタグ	YPYDVPDYA (配列番号85)	TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT (配列番号86)
SV40 NLS	PKKKRKV (配列番号87)	CCAAAAAAGAAAAGAAAAGTT (配列番号88)

【 0 2 6 9 】

【表 1 6 - 1】

表E 図17Aに示すLCL細胞における活性

試料名	編集されていないALTの割合(%)	SD	編集されていないREFの割合(%)	SD	図表
NT	49.94	0.57	49.92	0.54	図17A
WT	31.48	0.87	5.87	2.98	図17A
V3795	55.31	0.27	5.52	0.81	図17A
V6918	24.21	0.67	7.86	3.64	図17A
V6919	24.08	6.60	4.98	1.33	図17A
V6920	27.60	5.28	5.43	1.39	図17A
V6864	57.41	0.30	10.34	1.08	図17A
V6865	58.18	1.95	8.71	1.61	図17A
V6866	60.44	0.76	7.30	2.38	図17A
V6867	30.83	1.97	4.68	0.28	図17A

【 0 2 7 0 】

【表 1 6 - 2】

表E(続き) 図17Bに示すLCL細胞における活性

試料名	編集されていないALTの割合(%)	SD	編集されていないREFの割合(%)	SD	図表
NT	49.91	1.43	49.90	1.40	図17B
V3795	62.19	2.45	6.40	4.32	図17B
V7085	61.51	2.16	7.83	4.48	図17B
V7086	61.08	2.06	7.04	3.03	図17B
V7087	27.70	2.00	6.68	0.34	図17B
V7088	56.73	0.04	8.23	2.71	図17B
V7090	34.38	2.13	6.72	2.33	図17B
V7091	21.23	2.37	6.59	0.72	図17B
V7092	36.66	0.91	10.43	1.73	図17B
V7093	59.74	2.75	10.37	6.44	図17B
V7094	61.44	1.07	7.04	4.59	図17B

10

【0 2 7 1】

【表 1 7 - 1】

表F 図18Aに示すオフターゲット編集

試料名	OT1編集の割合(%)	SD	OT2編集の割合(%)	SD	図表
NT	0.04	0.01	0.03	0.01	図18A
WT	38.5	11.10	6.14	0.31	図18A
V3795	0.05	0.01	0.02	0.00	図18A
V6918	20.4	1.30	2.52	0.49	図18A
V6919	0.5	0.05	0.04	0.02	図18A
V6920	31.0	7.39	4.78	1.56	図18A
V6864	0.04	0.01	0.0	0.01	図18A
V6865	0.07	0.03	0.0	0.01	図18A
V6866	1.90	0.11	0.2	0.06	図18A
V6867	0.07	0.03	0.1	0.05	図18A

30

【0 2 7 2】

40

50

【表 17-2】

表F 図18Bに示すオフターゲット編集

試料名	OT1編集の割合(%)	SD	OT2編集の割合(%)	SD	図表
NT	0.03	0.01	0.02	0.00	図18B
V3795	0.04	0.01	0.03	0.01	図18B
V7085	0.18	0.21	0.04	0.02	図18B
V7086	0.13	0.00	0.03	0.00	図18B
V7087	15.92	0.00	2.56	0.10	図18B
V7088	0.12	0.08	0.04	0.03	図18B
V7090	7.49	1.27	0.88	0.14	図18B
V7091	68.40	3.49	0.30	0.18	図18B
V7092	6.87	1.53	1.05	0.33	図18B
V7093	0.05	0.01	0.02	0.00	図18B
V7094	0.10	0.00	0.03	0.01	図18B

【0273】

参考文献

1. Ahmad and Allen (1992) “Antibody-mediated Specific Binding and Cytotoxicity of Liposome-entrapped Doxorubicin to Lung Cancer Cells in Vitro”, Cancer Research 52:4817-20.

2. Anderson (1992) “Human gene therapy”, Science 256:808-13.

3. Atosuo JT, Lilius E-M. The Real-Time-Based Assessment of the Microbial Killing by the Antimicrobial Compounds of Neutrophils. Scientific World Journal. 2011;11:2382-2390.

4. Basha et al. (2011) “Influence of Cationic Lipid Composition on Gene Silencing Properties of Lipid Nanoparticle Formulations of siRNA in Antigen-Presenting Cells”, Mol. Ther. 19(12):2186-200.

5. Behr (1994) “Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: Prospects for gene therapy”, Bioconjugate Chem 5:382-89.

6. Blaese et al. (1995) “Vectors in cancer therapy: how will they deliver”, Cancer Gene Ther. 2:291-97.

7. Blaese et al. (1995) “T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years”, Science 270(5235):475-80.

8. Briner et al. (2014) “Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality”, Molecular Cell 56:333-39.

9. Buchschacher and Panganiban (1992) “Human immunodeficiency virus vectors for inducible expression of foreign genes”, J. Virol. 66:2731-39.

10. Burstein et al. (2017) “New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes”, Nature 542:237-41.

11. Canver et al., (2015) “BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis”, Nature Vol. 527, Pgs. 192-214.

12. Chang and Wilson (1987) “Modification of DNA ends can decrease end-joining relative to homologous recombination in mammalian cells”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963.

13. Charlesworth et al. (2019) “Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans”, Nature Medicine, 25(2), 249.

14. Chung et al. (2006) "Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria", *Trends Plant Sci.* 11(1):1-4.
15. Coelho et al. (2013) "Safety and efficacy of RNAi therapy for trans thyretin amyloidosis" *N. Engl. J. Med.* 369, 819-829.
16. Crystal (1995) "Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success", *Science* 270(5235):404-10.
17. Dillon (1993) "Regulation gene expression in gene therapy" *Trends in Biotechnology* 11(5):167-173.
18. Dranoff et al. (1997) "A phase I study of vaccination with autologous, irradiated melanoma cells engineered to secrete human granulocyte macrophage colony stimulating factor", *Hum. Gene Ther.* 8(1):111-23. 10
19. Dunbar et al. (1995) "Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation", *Blood* 85:3048-57.
20. Ellem et al. (1997) "A case report: immune responses and clinical course of the first human use of granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor-transduced autologous melanoma cells for immunotherapy", *Cancer Immunol Immunother* 44:10-20.
21. Gao and Huang (1995) "Cationic liposome-mediated gene transfer" *Gene Ther.* 2(10):710-22. 20
22. Haddada et al. (1995) "Gene Therapy Using Adenovirus Vectors", in: *The Molecular Repertoire of Adenoviruses III: Biology and Pathogenesis*, ed. Doerfler and Boehm, pp. 297-306.
23. Han et al. (1995) "Ligand-directed retro-viral targeting of human breast cancer cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(21):9747-51.
24. Humbert et al., (2019) "Therapeutically relevant engraftment of a CRISPR-Cas9-edited HSC-enriched population with HbF reactivation in nonhuman primates", *Sci. Trans. Med.*, Vol. 11, Pgs. 1-13.
25. Inaba et al. (1992) "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor", *J Exp Med.* 176(6):1693-702. 30
26. Jinek et al. (2012) "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", *Science* 337(6096):816-21.
27. Johan et al. (1992) "GLVR1, a receptor for gibbon ape leukemia virus, is homologous to a phosphate permease of *Neurospora crassa* and is expressed at high levels in the brain and thymus", *J Virol* 66(3):1635-40.
28. Judge et al. (2006) "Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo", *Mol Ther.* 13(3):494-505.
29. Kohn et al. (1995) "Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency", *Nature Medicine* 1:1017-23. 40
30. Kremer and Perricaudet (1995) "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer", *Br. Med. Bull.* 51(1):31-44.
31. Macdiarmid et al. (2009) "Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug", *Nat Biotechnol.* 27(7):643-51.
32. Makaryan V. et al. The diversity of mutations and clinical outcomes for ELANE-associated neutropenia. *Curr. Opin. Hematol.* 2015;22(1):3-11.
33. Malech et al. (1997) "Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease 50

”, PNAS 94(22):12133-38.

34. Maxwell et al. (2018) “A detailed cell-free transcription-translation-based assay to decipher CRISPR protospacer adjacent motifs”, *Methods* 143:48-57
35. Miller et al. (1991) “Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus”, *J Virol.* 65(5):2220-24.
36. Miller (1992) “Human gene therapy comes of age”, *Nature* 357:455-60.
37. Mitani and Caskey (1993) “Delivering therapeutic genes - matching approach and application”, *Trends in Biotechnology* 11(5):162-66.
38. Nabel and Felgner (1993) “Direct gene transfer for immunotherapy and immunization”, *Trends in Biotechnology* 11(5):211-15. 10
39. Nasri M. et al. CRISPR/Cas9-mediated ELANE knockout enables neutrophilic maturation of primary hematopoietic stem and progenitor cells and induced pluripotent stem cells of severe congenital neutropenia patients. *Haematologica*. 2020;105(3):598-609.
40. Nehls et al. (1996) “Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium” *Science* 272:886-889.
41. Remy et al. (1994) “Gene Transfer with a Series of Lipophilic DNA-Binding Molecules”, *Bioconjugate Chem.* 5(6):647-54.
42. Sentmanat et al. (2018) “A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing”, *Scientific Reports* 8:888, doi:10.1038/s41598-018-19441-8. 20
43. Sommerfelt et al. (1990) “Localization of the receptor gene for type D simian retroviruses on human chromosome 19”, *J. Virol.* 64(12):6214-20.
44. Van Brunt (1988) “Molecular framing: transgenic animals as bioactors” *Biotechnology* 6:1149-54.
45. Vigne et al. (1995) “Third-generation adenovectors for gene therapy”, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8(1,2): 35-36.
46. Wagner et al. (2019) “High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population” *Nature Medicine*, 25(2), 242 30
47. Wilson et al. (1989) “Formation of infectious hybrid virion with gibbon ape leukemia virus and human T-cell leukemia virus retroviral envelope glycoproteins and the gag and pol proteins of Moloney murine leukemia virus”, *J. Virol.* 63:2374-78.
48. Yu et al. (1994) “Progress towards gene therapy for HIV infection”, *Gene Ther.* 1(1):13-26.
49. Zetsche et al. (2015) “Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system” *Cell* 163(3):759-71. 40
50. Zuris et al. (2015) “Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein based genome editing in vitro and in vivo” *Nat Biotechnol.* 33(1):73-80.

【図面】
【図 1】

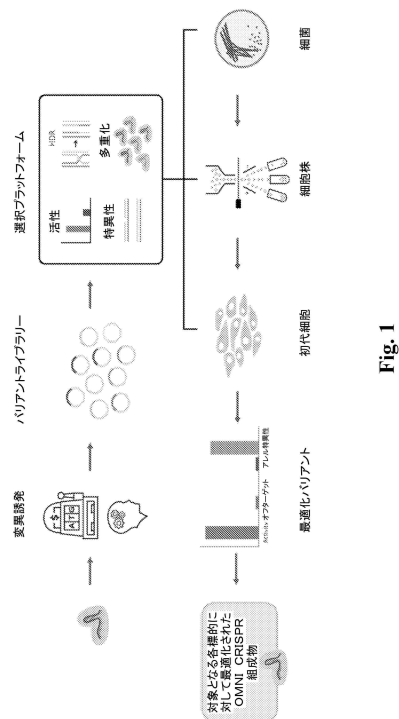


Fig. 1

【図 2】

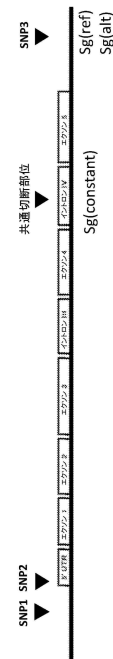


Fig. 2

【図 3 A】

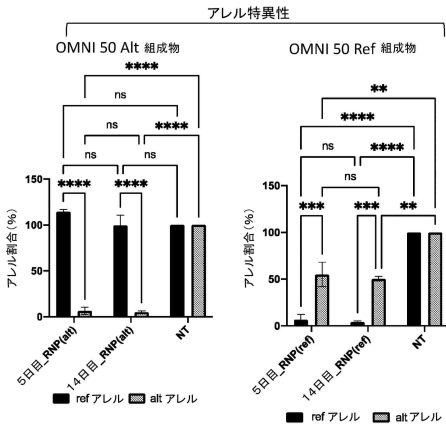


Fig. 3A

【図 3 B】

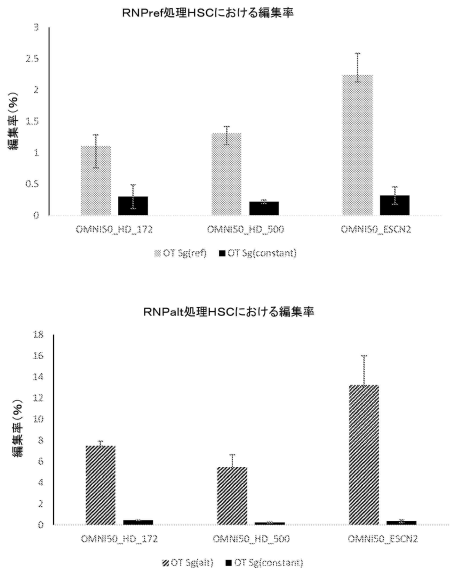


Fig. 3B

【図 4 A】

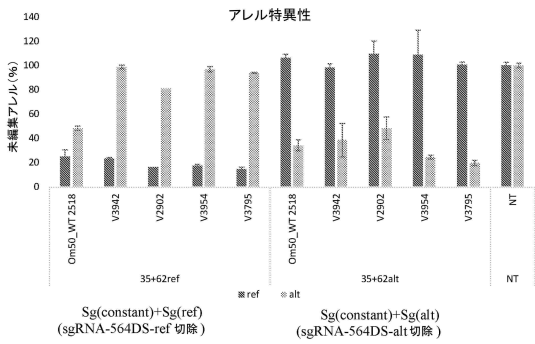


Fig. 4A

【図 4 B】

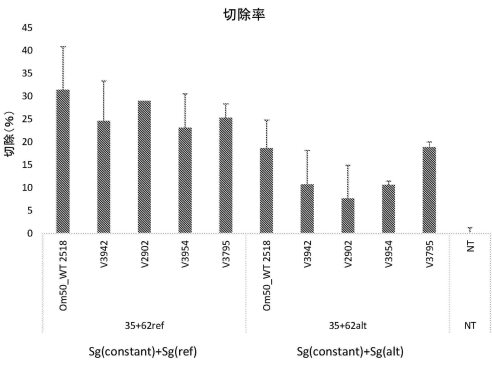


Fig. 4B

【図 4 C】

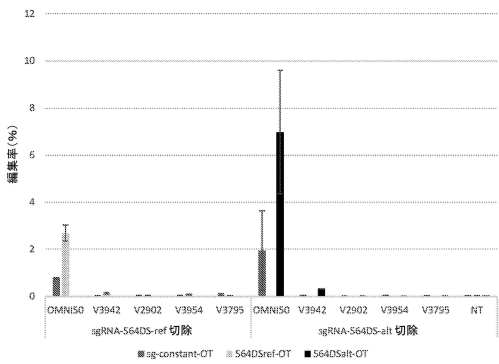


Fig. 4C

【図 5 A】

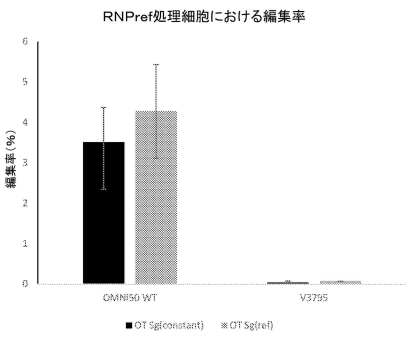


Fig. 5A

10

20

30

40

50

【図 5 B】

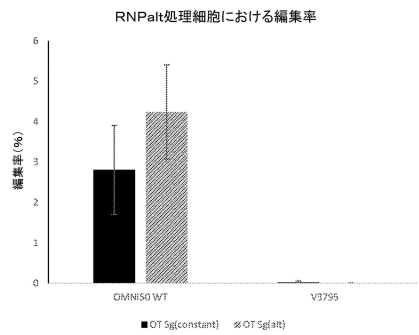


Fig. 5B

【図 5 C】

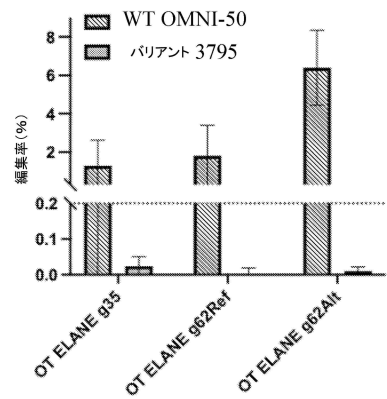


Fig. 5C

【図 6 A】

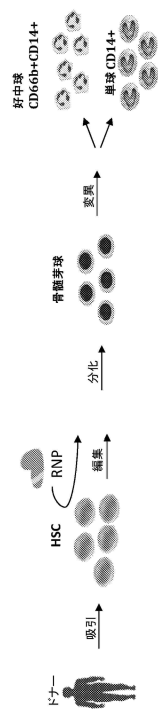


Fig. 6A

【図 6 B】

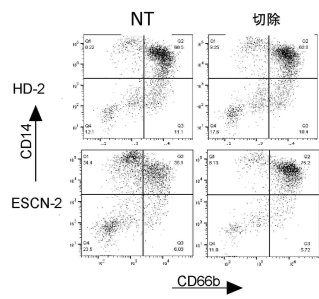


Fig. 6B

【図 6 C】

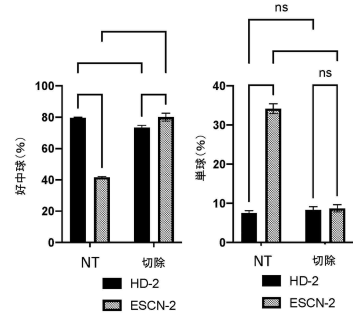


Fig. 6C

【図 7 A】

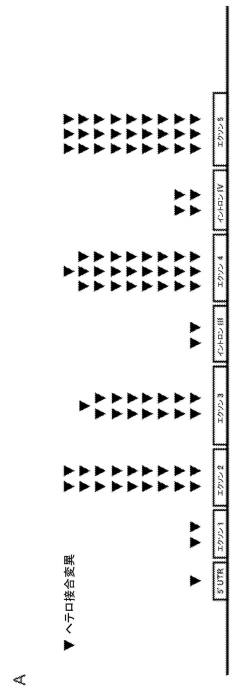


Fig. 7A

【図 7 B】

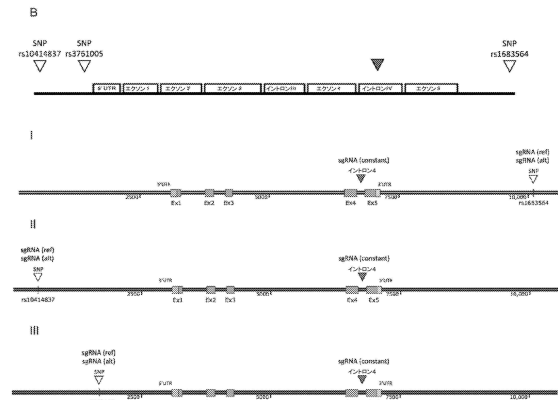


Fig. 7B

【図 8 A】

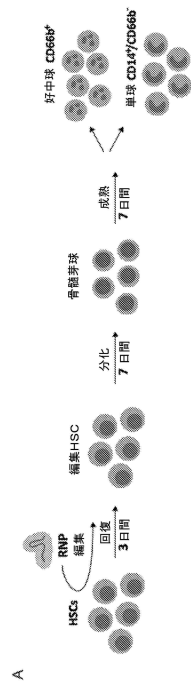


Fig. 8A

10

20

30

40

50

【図 8 B】

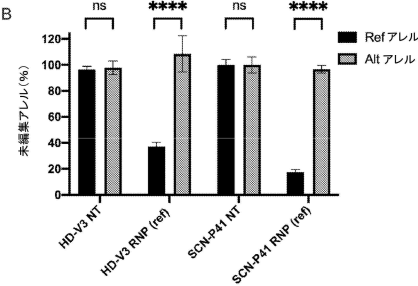


Fig. 8B

【図 8 C】

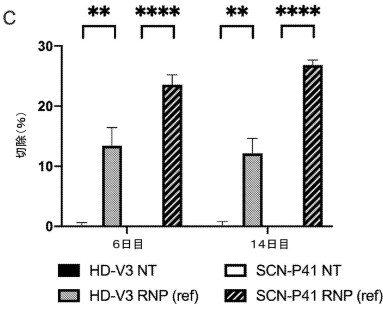


Fig. 8C

【図 8 D】

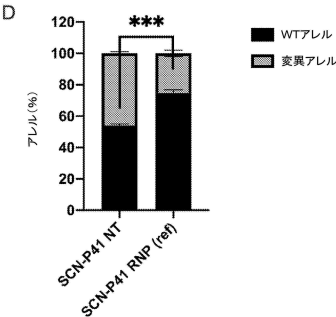


Fig. 8D

【図 8 E】

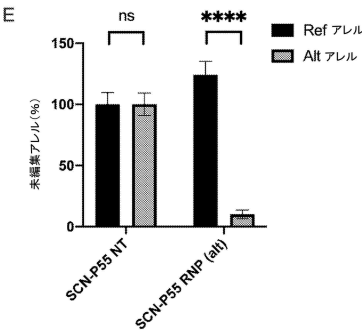


Fig. 8E

10

20

30

40

50

【 図 8 F 】

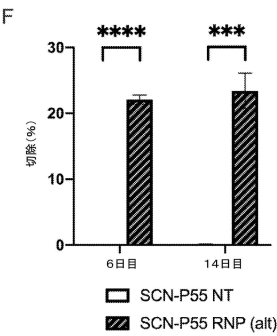


Fig. 8F

【 図 8 G 】

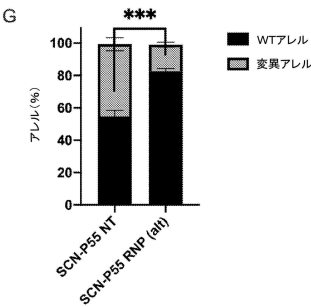


Fig. 8G

【 図 8 H 】

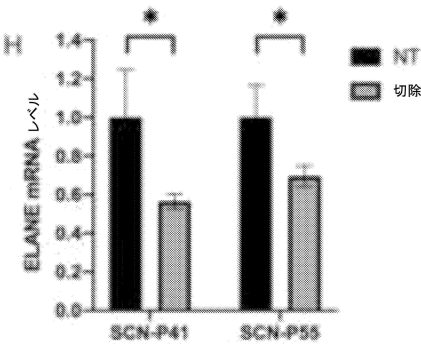


Fig. 8H

【 図 9 A 】

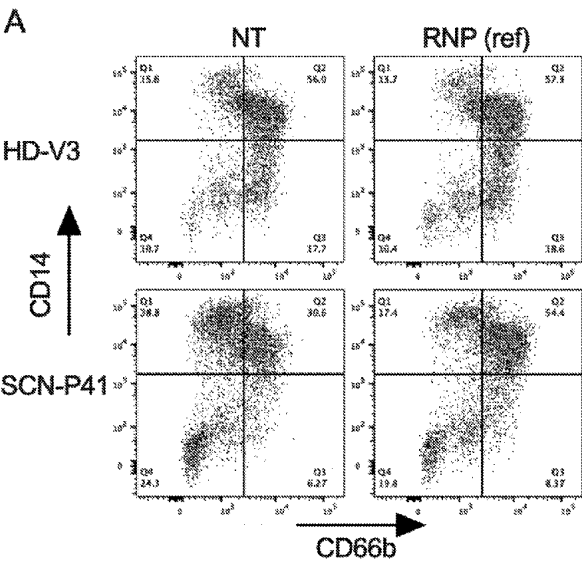


Fig. 9A

【 図 9 B 】

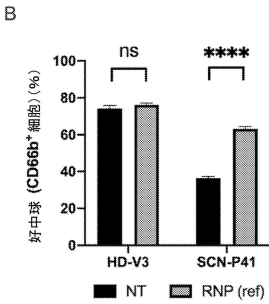


Fig. 9B

【 図 9 C 】

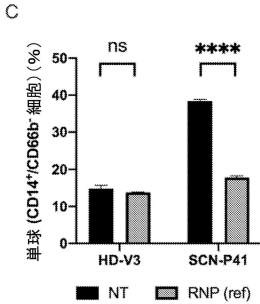


Fig. 9C

【 図 9 D 】

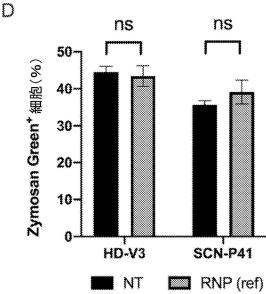


Fig. 9D

【 図 9 E 】

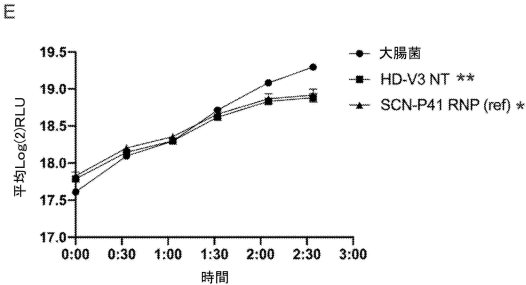


Fig. 9E

10

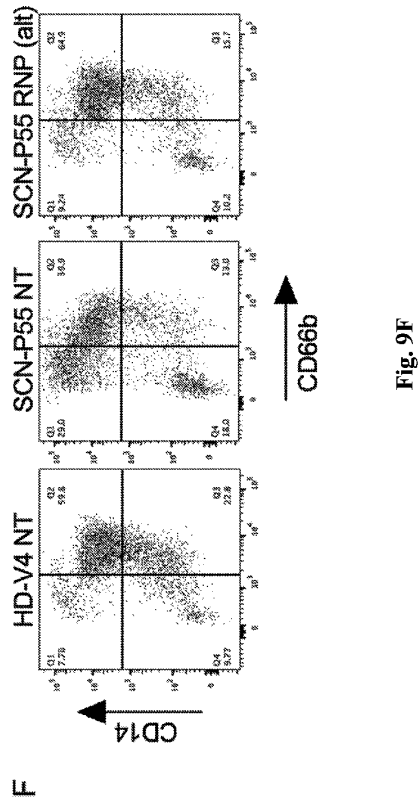
20

30

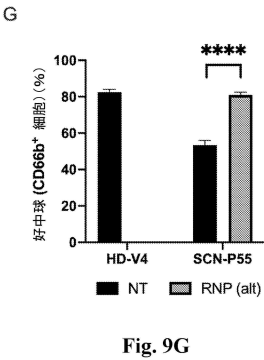
40

50

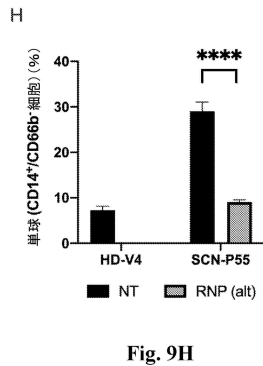
【図 9 F】



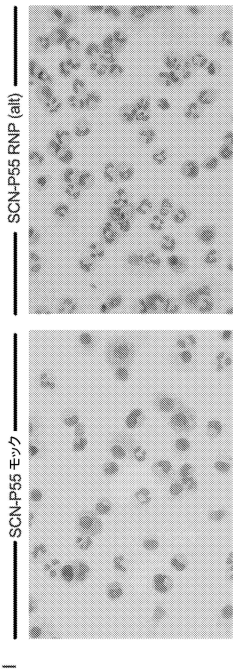
【図 9 G】



【図 9 H】



【図 9 I】



10

20

30

40

50

【図 9 J】

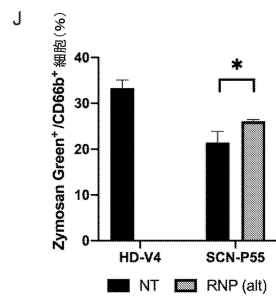


Fig. 9J

【図 9 K】

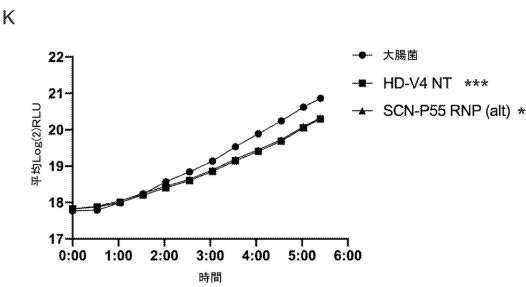


Fig. 9K

【図 1 0 A】

A

SNP ID	ヘテロ接合頻度	
	健常者集団	患者集団
rs10414837	33%	43%
rs3761005	46%	45%
rs1683564	42%	42%

Fig. 10A

【図 1 0 B】

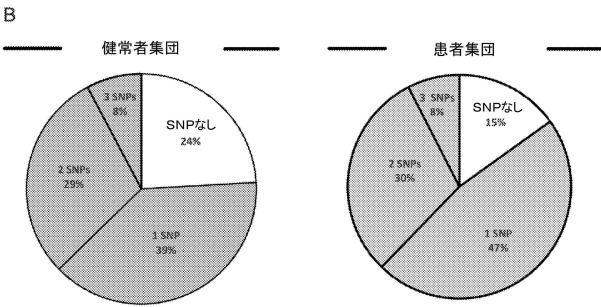


Fig. 10B

【図 1 1】

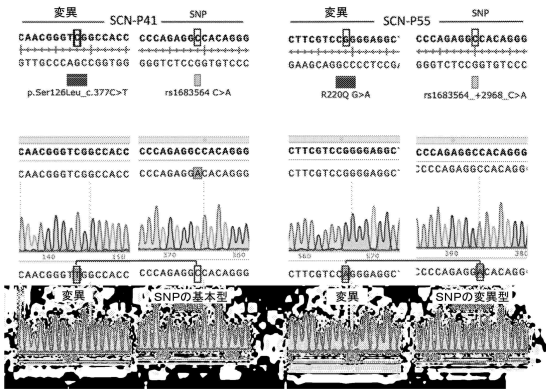


Fig. 11

【図 1 2】

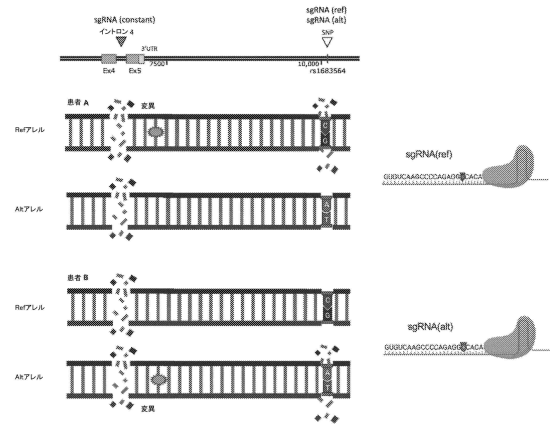


Fig. 12

【図 1 3 A】

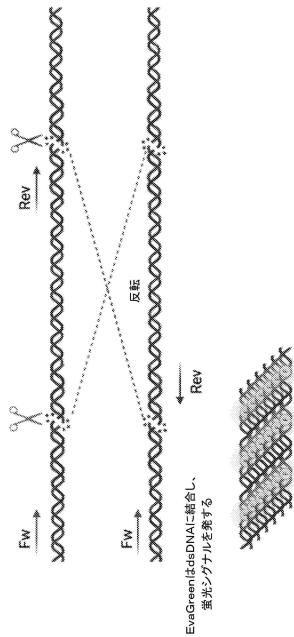


Fig. 13A

【図 1 3 B】

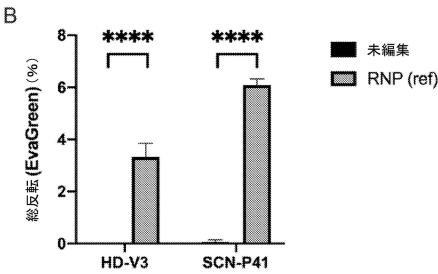


Fig. 13B

【図 1 3 C】

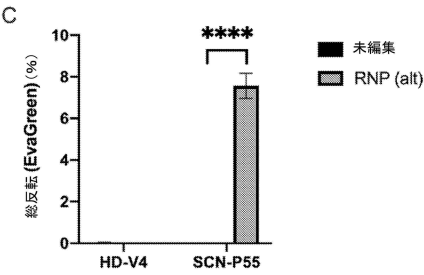


Fig. 13C

【図 1 4 A】

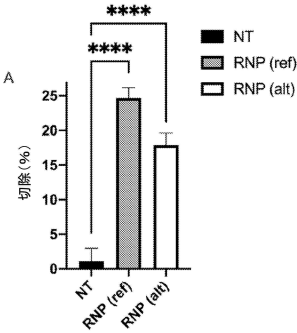


Fig. 14A

【図 1 4 B】

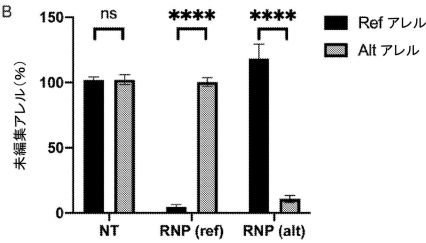


Fig. 14B

【図 1 5 A】

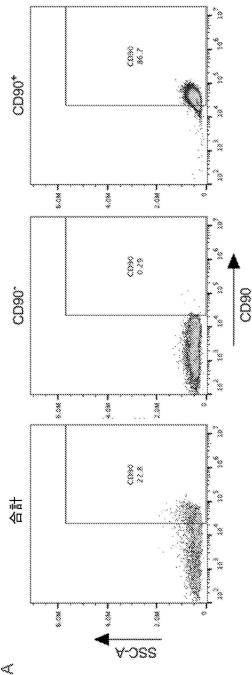


Fig. 15A

10

20

30

40

50

【図 1 5 B】

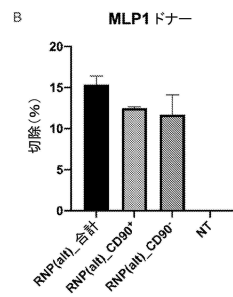


Fig. 15B

【図 1 5 C】

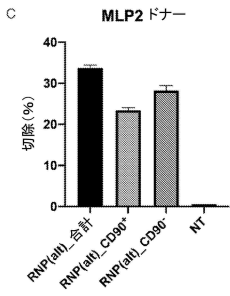


Fig. 15C

【図 1 6 A】

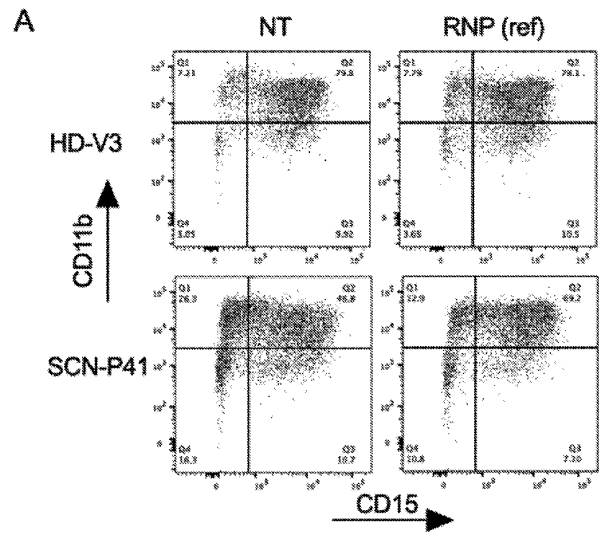


Fig. 16A

【図 1 6 B】

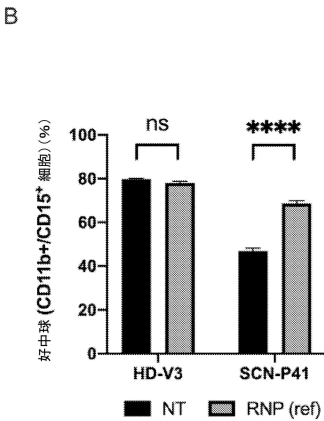


Fig. 16B

【図 18 A】

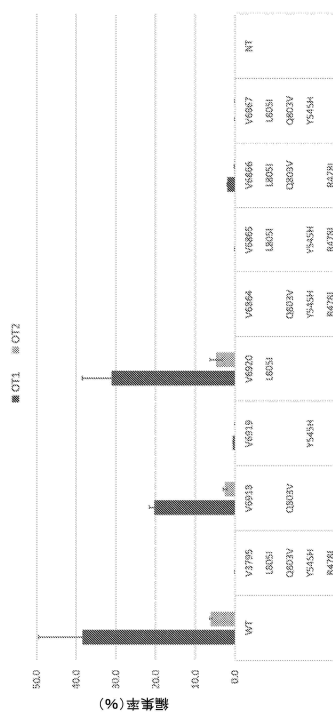


Fig. 18A

【図 18 B】

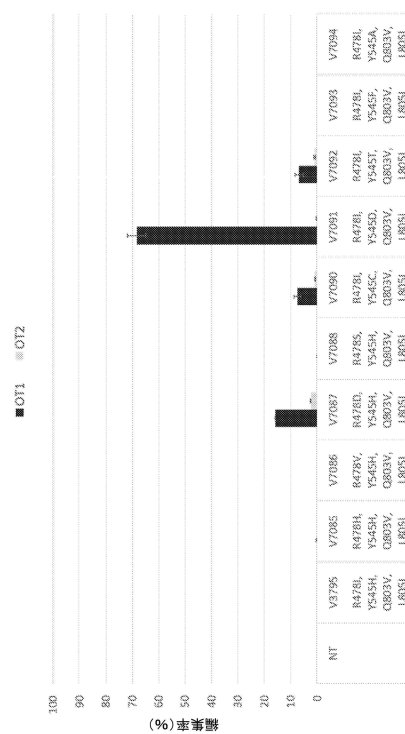


Fig. 18B

10

20

【図 19 A】

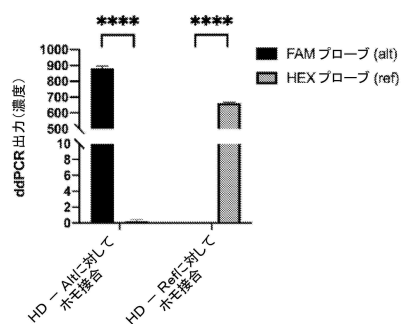


Fig. 19A

【図 19 B】

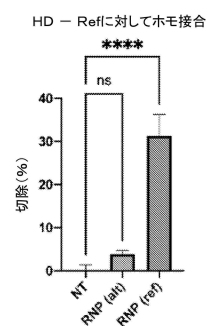


Fig. 19B

30

40

【図 20 A】



Fig. 20A

【図 20 B】

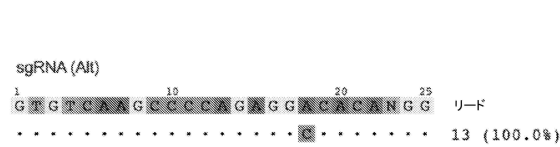


Fig. 20B

【図 20 C】

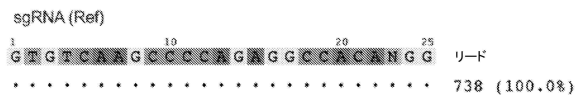


Fig. 20C

【図 20 D】

染色体	位置	遺伝子	型	配列	ミスマッチ	リード SCN-P41	リード SCN-P55
sgRNA-hm5-const							
chr15	20957976	PCCD1	イントロン	GCAGTCCTCCCTGGGAGCAGGTGGG	3	0	0.03±0
chr17	74081352	LINKO2074	イントロン	GCAGTCCTCCCTGGGAGCAGGTGGG	3	0	0.03±0
sgRNA-564DS-alt							
chr22	28058576	ZNRF3	イントロン	GTCACAGCCCCAGAGGACACAGGG	3	0	0.03±0.01
chr2	25995233	DPPY3L5	エクソン	GTTGTCAACCCCAAGAGACACATGG	3		
sgRNA-564DS-ref							
chr12	58121865	NA	遺伝子間	GTTGTCAAGCCCCAGAGGCCAAGGG	3	0.07±0.02	
chr12	316015161	FBXW8	イントロン	GTTGTCAAGCCCCAGAGGCCAAGGG	3	0.03±0.03	

Fig. 20D

10

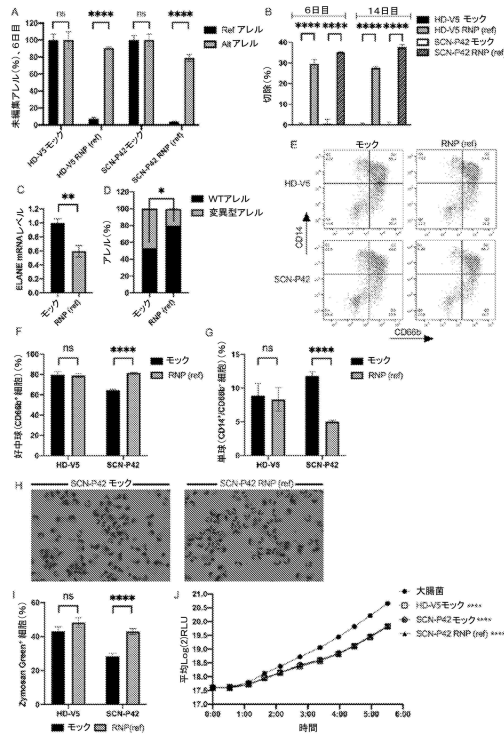
20

30

40

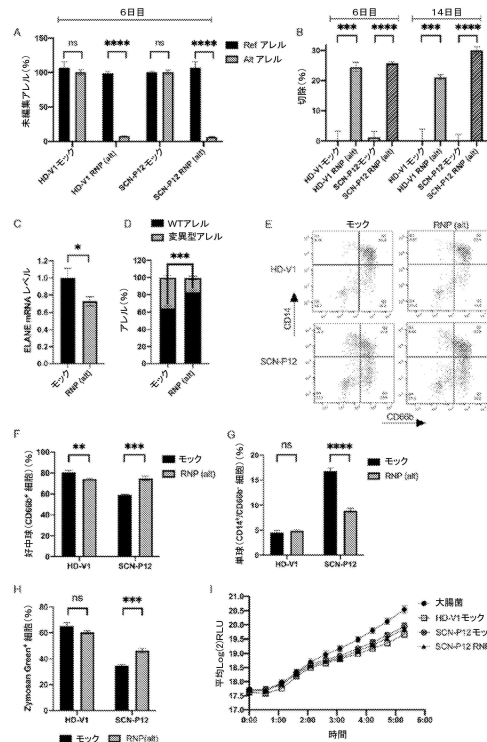
50

【図 2 1】



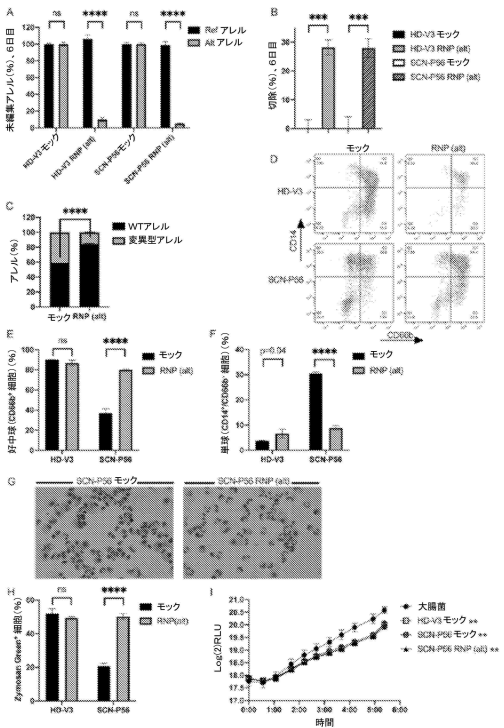
Figs. 21A-J

【図 2 2】



Figs. 22A-I

【図 2 3】



Figs. 23A-I

10

20

30

40

50

【配列表】

2024531217000001.xml

10

20

30

40

50

【手続補正書】
【提出日】令和6年4月22日(2024.4.22)
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】

2024531217000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/74930

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 9/22, C12N 15/10 (2022.01)

ADD. C12N 9/16 (2022.01)

CPC - INV. C12N 9/22, C12N 15/102, C12N 2310/20

ADD. C12N 9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	WO 2020/223514 A2 (EMENDO BIO INC.) 5 November 2020 (05.11.2020). Especially para [0055], [00234], claim 1, SEQ ID NO: 3	1, 13 2
Y — A	US 2017/0081650 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 23 March 2017 (23.03.2017). Especially para [0010], [0018], [0019]	1, 13 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 October 2022

Date of mailing of the international search report

JAN 11 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/74930

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-11, 37-58
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—Go to Extra Sheet for continuation—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1, 2, 13, limited to amino acid substitution R478I.

20

30

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/74930

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/74930

Continuation of Box III: Observations where Unity of Invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+: Claims 1-3, 12-36, drawn to a non-naturally occurring OMNI-50 nuclease.

The non-naturally occurring OMNI-50 nuclease will be searched to the extent that it is the first species named, R478I (claims 1 and 13). This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1, 2, 13 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass non-naturally occurring OMNI-50 nuclease R478I [note: claim 38 is specifically excluded from the first invention because the claims sequences, SEQ ID NO: 2, for example, have multiple amino acid substitutions]. Additional non-naturally occurring OMNI-50 nucleases will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected amino acid substitutions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: amino acid substitution Y545H (claims 1-3, 12, 13, 24).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Among the inventions listed as Groups I+ are the specific amino acid substitutions in OMNI-50 nuclease recited therein. Each invention requires a specific amino acid substitution not required by any other inventions.

No technical features are shared between the polypeptide sequences of Group I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Common Technical Feature:

Additionally, even if Groups I+ inventions were considered to share the technical feature of:
—Group I+ inventions share the common technical feature of claim 1.

Said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is disclosed by WO 2020/223514 A2 to Emendobio, Inc. (hereinafter "Emendobio").

As to the common technical feature, Emendobio discloses (claim 1) a non-naturally occurring OMNI-50 nuclease variant having a wild-type OMNI-50 protein sequence, SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 3; AA 1-1370 100% sequence identity) comprising an amino acid substitution (claim 1; "A non-naturally occurring composition comprising a CRISPR nuclease comprising a sequence having at least 95% identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or a nucleic acid molecule comprising a sequence encoding the CRISPR nuclease"; para [0055]; "In an embodiment, the CRISPR nuclease comprises 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, or 140-150 amino acid substitutions").

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Group I+ lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued): Claims 4-11, 37-58 are dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/0789(2010.01)	C 1 2 N 5/0789	
C 1 2 N 5/078(2010.01)	C 1 2 N 5/078	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(32)優先日 令和3年8月12日(2021.8.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
ン・レジオン、ハバール・シェム・トブ 7

(72)発明者 ヘルマン、アサエル
イスラエル国、7 4 2 0 9 0 3 ネスージオナ、シザフ・ストリート 3

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 AC12 AC20 BA01 CA44
4C087 AA01 AA03 BB37 BB44 BB63 BB65 NA14 ZC02