

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-534720
(P2024-534720A)

(43)公表日 令和6年9月25日(2024.9.25)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)		
C 12 N	15/09 (2006.01)	C 12 N	15/09	1 1 0	4 B 0 6 5
C 12 N	15/11 (2006.01)	C 12 N	15/11	Z Z N A	
C 12 N	5/10 (2006.01)	C 12 N	5/10		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全87頁)

(21)出願番号	特願2024-506903(P2024-506903)	(71)出願人	510144959 ラトガース,ザステートユニバーシティ オブニューイヤージー
(86)(22)出願日	令和4年8月5日(2022.8.5)		アメリカ合衆国,08901ニュージ ヤージー,ニュー・ブランズイック,サ マセットストリート83
(85)翻訳文提出日	令和6年4月3日(2024.4.3)		518258629
(86)国際出願番号	PCT/US2022/074625		ホライズン・ディスカバリー・リミテッド
(87)国際公開番号	WO2023/015307		イギリス国CB259TL,ケンブリッジ シャー,ケンブリッジ,ウォーターピー チ,ケンブリッジ・リサーチ・パーク8100
(87)国際公開日	令和5年2月9日(2023.2.9)		110000671 IBC一一番町弁理士法人
(31)優先権主張番号	63/203,996		
(32)優先日	令和3年8月6日(2021.8.6)		
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子改変細胞を作製するための方法

(57)【要約】

本開示は、共通のC a s 9 エレメントを使用して、規定された核酸標的の正確な編集(ノックアウト)と、所望の座位での選択された外因性配列の導入(ノックイン)とを同時に可能にする、遺伝子改変細胞、特に免疫細胞およびi P S Cの生成のための新たなモジュラーアプローチに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の遺伝子改変を細胞に行うための方法であって、

a) 第1の標的核酸配列に外因性配列を組み込むためのCRISPRシステムであって、

i) 前記第1の標的核酸配列の反対鎖に対して相補的である第1のgRNAおよび第2のgRNA、ならびに

ii) 前記外因性配列を含むドナー核酸配列

を含むCRISPRシステム、

b) 第2の標的核酸配列に遺伝子改変を導入するための塩基編集システムであって、

i) (i) 前記第2の標的核酸配列に対して相補的であるgRNA配列と、(ii) 動員RNAモチーフとを含むRNA足場、および

ii) (i) 前記動員RNAモチーフに結合することができるRNA結合ドメインと、(ii) 塩基修飾酵素を含むエフェクタードメインとを含むエフェクター融合タンパク質

を含む塩基編集システム、ならびに

c) 前記CRISPRシステムの前記第1および第2のgRNA、ならびに前記塩基編集システムの前記RNA足場と相互作用することができるRNAガイド型ニッカーゼを細胞内に導入すること、ならびに/または細胞内で発現させること、ならびに

d) 前記細胞を培養して、複数の遺伝子改変を含む細胞を作製することを含む方法。

【請求項 2】

前記塩基修飾酵素が、シトシン脱アミノ活性、アデノシン脱アミノ活性、DNAメチルトランスフェラーゼ活性、またはデメチラーゼ活性を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記RNAガイド型ニッカーゼが、CRISPR-II型またはV型酵素である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記RNAガイド型ニッカーゼがCas9ニッカーゼである、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記RNA足場がtracrRNAを含む、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

異なる標的核酸配列に結合して複数の異なる遺伝子座を遺伝子改変することができる複数の塩基編集システムを含むモジュラーシステムを使用する、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞が、免疫細胞またはhPSCである、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記hPSCがiPSCである、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞が、T細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)、B細胞、骨髄芽球、リンパ芽球またはCD34+造血幹前駆細胞(HSPC)から選択される免疫細胞である、請求項7に記載の方法。

【請求項 10】

前記第1のgRNAおよび第2のgRNAが、TRACまたはB2MまたはCISH座位の反対鎖に対して相補的である、請求項1~9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

前記 C R I S P R システムが、標的座位に対して特異的な相同性アームによって挟まれた C A R または T C R をコードする配列を含むドナー核酸配列を導入するために使用される、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

C A R または T C R または s c H L A - E 三量体をコードする配列が、前記 T R A C または B 2 M または C I S H 座位に組み込まれる、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 C A R または T C R または s c H L A - E 三量体をコードする配列の発現が、内因性の T R A C または B 2 M または C I S H プロモーターによって駆動される、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記複数の遺伝子改変が同時に起こる、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 C R I S P R システム、塩基編集システムおよび R N A ガイド型ニッカーゼのそれをコードする核酸が、単一の送達ステップで前記細胞に導入される、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ドナー核酸配列が、ウイルスベクターを使用して前記細胞に導入される、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記ウイルスベクターが A A V である、請求項 1 6 に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

前記塩基編集システムが、遺伝子突然変異を是正するか、遺伝子の発現を不活性化するか、遺伝子の発現レベルを変化させるか、またはイントロン - エクソンスプライシングを変化させる、1 つまたは複数の遺伝子改変を導入する、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記塩基編集システムによって導入される前記遺伝子改変が、点突然変異である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記点突然変異が、中途終止コドンを導入するか、開始コドンを破壊するか、スプライス部位を破壊するか、または遺伝子突然変異を是正する、請求項 1 9 に記載の方法。

30

【請求項 2 1】

前記塩基編集システムによって導入される前記遺伝子改変が、T R A C 、 T R B C 1 、 T R B C 2 、 P D C D 1 、 C D 5 2 、 C I I T A 、 N K G 2 A および B 2 M からなる群から選択される遺伝子のうちのいずれか 1 つまたは複数の発現の低下をもたらす、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 R N A 足場が、化学合成された R N A として前記細胞に導入される、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 2 3】

前記 R N A 足場が、1 つまたは複数の化学修飾を含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記動員 R N A モチーフが、前記 R N A 足場の 3 ' 末端に位置する、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記 R N A 足場が、2 つ以上の動員 R N A モチーフを含む、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

50

前記動員 R N A モチーフが R N A アプタマーである、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記動員 R N A モチーフが M S 2 アプタマーである、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 R N A ガイド型ニッカーゼが、1 つまたは 2 つの U G I を有する n C a s 9 であり、前記動員 R N A モチーフが、前記 R N A 足場の 3' 末端に位置する単一の M S 2 アプタマーである、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

導入された前記遺伝子改变が、同種異系 T 細胞の生成をもたらす、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られる遺伝子改变細胞。

【請求項 3 1】

外因性の C A R または T C R をコードする配列を内因性の T R A C または B 2 M 座位に含み、少なくとも 1 つの点突然変異を 2 つ以上の遺伝子に含む、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られる遺伝子改变細胞。

【請求項 3 2】

前記 2 つ以上の遺伝子が T R A C 、 T R B C 1 、 T R B C 2 、 P D C D 1 、 C D 5 2 、 C I I T A 、 N K G 2 A および B 2 M からなる群から選択され、前記遺伝子の機能的ノックアウトをもたらす、請求項 3 1 に記載の遺伝子改变細胞。

【請求項 3 3】

細胞を遺伝子改变するためのシステムであって、

a) 第 1 の標的核酸配列に外因性配列を組み込むための C R I S P R システムであって

、
i i i) 前記第 1 の標的核酸配列の反対鎖に対して相補的である第 1 の g R N A および第 2 の g R N A 、ならびに

i v) 前記外因性配列を含むドナー核酸配列
を含む C R I S P R システム、

b) 第 2 の標的核酸配列に遺伝子改变を導入するための塩基編集システムであって、

i i i) (i) 前記第 2 の標的核酸配列に対して相補的である g R N A 配列と、(i i) 動員 R N A モチーフとを含む R N A 足場、および

i v) (i) 前記動員 R N A モチーフに結合することができる R N A 結合ドメインと、(i i) 塩基修飾酵素を含むエフェクタードメインとを含むエフェクター融合タンパク質

を含む塩基編集システム、ならびに

c) 前記 C R I S P R システムの前記第 1 および第 2 の g R N A 、ならびに前記塩基編集システムの R N A 足場と相互作用することができる R N A ガイド型ニッカーゼを含む、システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2021年8月6日に出願された米国仮特許出願第 6 3 / 2 0 3 , 9 9 6 号に対して、35 U . S . C . § 1 1 9 (e) に基づく優先権を主張する。

【0 0 0 2】

発明の分野

本開示は、複数の遺伝子改变を細胞に導入するためのクラスター化規則的間隔短鎖回文

10

20

30

40

50

反復配列 (Clustered Interspaced Regularly Short Palindromic Repeat) (CRISPR) に基づく遺伝子編集システムを使用して、遺伝子操作された細胞を作製する新たな方法、細胞、システム、キット、および他の態様に関する。

【背景技術】

【0003】

初代ヒト細胞の正確な遺伝的モジュレーションは、免疫療法、自己免疫、および酵素異常症の分野におけるものを含めて、ヒト疾患の処置について複数の用途がある。例えば、患者の免疫細胞の遺伝的モジュレーションは、免疫細胞に加えられる変化に永続性があり、患者によるそのような細胞の拒絶のリスクが低いことから、治療法の魅力的な経路の1つである。免疫細胞の遺伝子編集のための1つのアプローチは、クラスター化規則的間隔短鎖回文反復配列 (CRISPR) システムを使用して、目的の遺伝子の内部に二本鎖切断 (DSB) を誘導し、続いてそれを、効率的ではあるが誤りの多い非相同末端結合 (NHEJ) 経路によって、または効率性は落ちるが忠実度の高い相同指向性修復 (HDR) 経路によって修復する。NHEJ 修復経路は最も活性の高い修復機構であり、しばしば少数のヌクレオチド挿入または欠失 (インデル) を DSB 部位にもたらして、標的遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) 内に中途終止コドンまたはナンセンス突然変異を導くアミノ酸の欠失、挿入またはフレームシフト突然変異を引き起こす。その上、多重化された遺伝子編集手順の間に複数の DSB を誘導することは、望ましくない遺伝毒性および発がん性の可能性のある大規模な染色体転座の形成を引き起こす可能性がある。より正確な遺伝子編集は、1つの活性ヌクレアーゼドメインのみを保持し、平滑末端 DSB ではなく DNA ニックを生成する変換ヌクレアーゼ (例えば、 Cas9 ニッカーゼ) の使用によって達成することができる。SpCas9 の突然変異体であるバリアント Cas9 D10A は、 HNH ヌクレアーゼ活性のみを保持しており、反対 DNA 鎖を標的とする2つのガイド RNA (gRNA) の存在下でねじれ型 DSB を生じさせ、それ故に標的特異性を高める。

【0004】

キメラ抗原受容体 - T (CAR - T) 細胞免疫療法は、患者自身の T 細胞の遺伝子改変を行って、腫瘍抗原に対して特異的な CAR を発現させることを伴う、新規の方法である。本方法は、遺伝子改変細胞をエクスピボで増大させた後に患者に再注入することを伴う、個別化された処置である。この治療法は血液がんにおいて目覚ましい結果を示しており、抗 CD19 CAR - T 療法は CD19 陽性白血病またはリンパ腫の処置に対して承認されており (Yescarta (商標) 、 Kymriah (商標) 、 Tecartus (商標) 、および Breyanzi (商標)) 、抗 BCMA CAR - T 療法は複数の骨髄腫に対して承認されている (Abecma (商標)) 。一部の患者では有望な結果が得られているにもかかわらず、 CAR - T の適用は、いくつかの急性副作用、例えば、サイトカイン放出症候群および神経毒性を引き起こし、場合によっては患者の死亡につながる。

【0005】

長期的な安全アウトカム、例えば、免疫原性、ならびに遺伝子改変 T 細胞の増殖および発生に対する有害効果は、この治療法に関して依然として懸念されている。したがって、患者に対する副作用および健康リスクが低減された、改善された CAR - T 細胞療法を開発することには需要がある。さらに、現在必要とされている個別化されたアプローチに伴う複雑さのレベルを考慮すると、「汎用」のまたは同種異系の CAR - T 細胞療法を開発して、処置までの時間、製造、品質およびコストに関連する問題に対処する必要がある。

【0006】

CAR は典型的には、ランダム組込みベクターを使用して患者の T 細胞に形質導入され、その結果、がん化、多様な導入遺伝子の発現、および転写サイレンシングがもたらされる可能性がある。近年、ゲノム編集の進歩により、効率的で標的化された遺伝子送達が可能になった。 CD19 特異的 CAR を T 細胞受容体 定常 (TRAC) 座位に方向付けることにより、内因性 TRAC 調節エレメントの制御下での CAR の発現が可能になり、こ

10

20

30

40

50

れにより、T細胞の効力が強化され、消耗が遅れることとなる。

【発明の概要】

【0007】

第1の態様では、本開示は、複数の遺伝子改変を細胞に行うための方法であって、

a) 第1の標的核酸配列に外因性配列を組み込むためのCRISPRシステムであって

、
i) 第1の標的核酸配列の反対鎖に対して相補的である第1のgRNAおよび第2のgRNA、ならびに

i i) 外因性配列を含むドナー核酸配列
を含むCRISPRシステム、

b) 第2の標的核酸配列に遺伝子改変を導入するための塩基編集システムであって、

i) 第2の標的核酸配列に対して相補的であるガイドRNA配列と、動員RNAモチーフとを含むRNA足場、および

i i) 動員RNAモチーフに結合することができるRNA結合ドメインと、塩基修飾酵素を含むエフェクタードメインとを含むエフェクター融合タンパク質
を含む塩基編集システム、ならびに

c) CRISPRシステムの第1および第2のgRNA、ならびに塩基編集システムのRNA足場と相互作用することができるRNAガイド型ニッカーゼ
を細胞内に導入すること、ならびに／または細胞内で発現させること、ならびに

細胞を培養して、複数の遺伝子改変を含む細胞を作製すること
を含む方法を提供する。

【0008】

いずれの実施形態においても、RNAガイド型ニッカーゼは、CRISPRシステムおよび塩基編集システムのRNA足場の両方と相互作用することができるため、本方法は、1つのみのRNAガイド型ニッカーゼ（本明細書では単一のRNAガイド型ニッカーゼまたは共通のRNAガイド型ニッカーゼとも称される）を使用して行うことができる。これは、提供されて細胞に送達される必要のある構成要素の数が減ることから、有利であり得る。

【0009】

一部の実施形態では、塩基修飾酵素は、シトシン脱アミノ活性、アデノシン脱アミノ活性、DNAメチルトランスフェラーゼ活性、またはデメチラーゼ活性を有する。

【0010】

一部の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、CRISPR II型またはV型酵素であり得る。一部の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼがCRISPR II型酵素である場合、酵素はCas9ニッカーゼである。一実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、1つまたは2つのウラシルグリコシラーゼ阻害剤（UGI）を有するnCas9である。

【0011】

一部の実施形態では、第1および第2のgRNAは、sgRNAとして提供され得る。

【0012】

一部の実施形態では、本明細書における方法、細胞、システムおよびキットに使用されるRNA足場は、tracrRNAを含み得る。CRISPR II型システムでは、前駆体crRNA（pre-crRNA）の成熟のために、トランスクレッセス性CRISPR（tracr）RNAの関与を必要とする。しかし、CRISPR V型システムでは、tracrRNAは全く同定されておらず、pre-crRNAプロセシングはV型エフェクタータンパク質自体によって媒介される。

【0013】

一部の実施形態では、本明細書における方法、細胞、システムおよびキットに使用されるRNA足場は、化学合成されたRNAとして細胞に導入することができ、1つまたは複数の化学修飾を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0014】

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法、細胞、システム、およびキットは、1つまたは複数の動員RNAモチーフを利用することができます、一部の実施形態では、これはRNA足場の3'末端に位置する。動員RNAモチーフは、MS2アプタマーであり得、一部の実施形態では、伸長したステム、例えば、2~24ヌクレオチドを含む伸長したステムを有するMS2アプタマーであり得る。

【0015】

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法、細胞、システム、およびキットは、シトシン脱アミノ活性またはシチジン脱アミノ活性（これらの用語は互換的に使用される）を有するエフェクタードメイン、例えば、AID、CD4、APOBEC1、APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3D、APOBEC3F、または他のAPOBECファミリー酵素の野生型または遺伝子操作されたバージョンを使用することができます。

10

【0016】

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法、細胞、システム、およびキットは、アデニン脱アミノ活性またはアデノシン脱アミノ活性（これらの用語は互換的に使用される）を有するエフェクタードメイン、例えば、ADA、ADARファミリー酵素、またはtRNAアデノシンデアミナーゼの野生型または遺伝子操作されたバージョンを使用することができます。

20

【0017】

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法、細胞、システム、およびキットは、DNAメチルトランスフェラーゼ活性を有するエフェクタードメイン、例えば、Dnm1、Dnm1a、またはDnm1bの野生型または遺伝子操作されたバージョンを使用することができます。

【0018】

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法、細胞、システム、およびキットは、デメチラーゼ活性を有するエフェクタードメイン、例えば、Tet1、Tet2、またはTSGの野生型または遺伝子操作されたバージョンを使用することができます。

【0019】

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法、細胞、システム、およびキットは、TRACまたはB2M座位の反対鎖に対して相補的である、第1のgRNAおよび第2のgRNAを使用することができます。

30

【0020】

一部の実施形態では、方法、細胞、システム、およびキットは、異なる標的核酸配列に結合して複数の異なる遺伝子座を遺伝子改変することができる複数の塩基編集システムを含むモジュラーシステムを使用することができます。

【0021】

一部の実施形態では、本明細書における方法に使用されるCRISPRシステムは、第1の標的核酸配列に対して特異的な相同性アームによって挟まれたCARまたはTCRをコードする配列を含むドナー核酸配列を導入することができる。一部の実施形態では、CARまたはTCRをコードする配列は、TRACまたはB2M座位に組み込まれる。CARまたはTCRをコードする配列の発現は、内因性TRACまたはB2Mプロモーターによって駆動され得る。

40

【0022】

一部の実施形態では、CRISPRシステム、塩基編集システム、およびRNAガイド型ニッカーゼのそれぞれをコードする核酸を、単一のトランスフェクションステップで細胞に導入することができる。一部の実施形態では、ドナー核酸配列を、ウイルスベクター、例えば、AAVを使用して、細胞に導入することができる。あるいは、ドナー核酸配列を、単一のトランスフェクションステップで細胞に導入することもできる。

【0023】

50

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法、細胞、システム、およびキットは、遺伝子突然変異を是正するか、遺伝子の発現を不活性化するか、遺伝子の発現レベルを変化させるか、またはイントロン - エクソンスプライシングを変化させる、1つまたは複数の遺伝子改変を導入する塩基編集システムを含む。他の実施形態では、塩基編集システムによって導入される遺伝子改変は、点突然変異であり得、必要に応じて、点突然変異は、中途終止コドンを導入するか、開始コドンを破壊するか、スプライス部位を破壊するか、または遺伝子突然変異を是正する。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法に使用されるガイドRNA配列は、スプライスアクセプター - スプライスドナー部位 (S A - S D) 配列を含み得る。

【0024】

10

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法、細胞、システム、およびキットは、細胞における異なる遺伝子を標的とすることができます。例えば、塩基編集システムは、TRAC、TRBC1、TRBC2、PDCD1、CD52、およびB2Mのうちのいずれか1つまたは複数の発現低下をもたらす遺伝子改変を導入することができる。

【0025】

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法、細胞、システム、およびキットは、同時に起こる複数の遺伝子改変を提供するために使用することができる。

【0026】

20

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法は、任意の細胞、特に免疫細胞またはヒト多能性幹細胞 (hPSC) を改変するために使用することができる。免疫細胞には、T細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、B細胞、骨髄芽球、リンパ芽球、およびCD34+造血幹前駆細胞 (HSPC) が含まれ得る。

【0027】

特定の一実施形態では、免疫細胞は初代T細胞である。

【0028】

特定の一実施形態では、細胞は人工多能性幹細胞 (iPSC) である。

【0029】

30

第2の態様では、本開示は、本明細書に記載の方法によって得られる遺伝子改変細胞を提供する。一部の実施形態では、遺伝子改変細胞は、外因性CARまたはTCRをコードする配列を内因性TRACまたはB2M座位に、少なくとも1つの点突然変異を3つ以上の遺伝子に含む。他の実施形態では、遺伝子改変細胞は、外因性CARまたはTCRをコードする配列を内因性TRACまたはB2M座位に、少なくとも1つの点突然変異をTRAC、TRBC1、TRBC2、PDCD1、CD52、およびB2Mからなる群から選択される3つ以上の遺伝子に含み、前記遺伝子の機能的ノックアウトをもたらす。

【0030】

第3の態様では、本開示は、本明細書に記載の方法によって得られる同種異系T細胞を提供する。

【0031】

40

第4の態様では、本開示は、i) CRISPRシステム、ii) 塩基編集システム、およびiii) RNAガイド型ニッカーゼ、または本明細書に記載されるようなi)、ii)、およびiii)をコードする1つもしくは複数の核酸、または本明細書に記載されるようなi)、ii)、およびiii)をコードする1つもしくは複数の発現ベクターを含む、細胞を遺伝子改変するためのシステムを提供する。

【0032】

50

第5の態様では、本開示は、i) CRISPRシステム、ii) 塩基編集システム、およびiii) RNAガイド型ニッカーゼ、または本明細書に記載されるようなi)、ii)、およびiii)をコードする1つもしくは複数の核酸、または本明細書に記載されるようなi)、ii)、およびiii)をコードする1つまたは複数の発現ベクターを含む、細胞を遺伝子改変するためのキットを提供する。本キットは、核酸またはポリペプチドを宿主細胞に導入するための1つまたは複数の構成要素をさらに含み得る。一部の実施形

態では、1つまたは複数の構成要素は、ウイルスベクター、非組込み型ウイルス粒子、細胞外小胞、ナノ粒子、細胞透過性ペプチド、およびドナー核酸配列からなる群から選択される。

【0033】

開示される方法、システム、キット、および他の態様を、以下の図面を参照しながら説明する。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1Aおよび1Bは、塩基編集技術によって所望の座位をノックアウトし、かつ1つまたは複数の遺伝子をノックアウトしながら、その所望の座位（例えば、TRAC座位）における外因性遺伝子を同時にノックインする戦略を説明する概略図の一例を示す。
10

図1Aは、nCas9 - UG1 - UG1によって導入された二重ニックによる所望の座位（例えば、TRAC）のノックアウトを、その座位における外因性遺伝子（例えば、CAR遺伝子）のノックインとともに進行する戦略を説明する概略図を示す。このCRISPRシステムにおける酵素（nCas9 - UG1 - UG1）は、第1および第2のgRNAにより、ノックイン座位に方向付けられる。外因性遺伝子の組込みのためのドナー錆型DNAは、ウイルスベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス（例えば、AAV6）によって送達されるか、または他の方法によって送達される。図1Bは、1つまたは複数の遺伝子（例えば、B2MまたはCD52）の塩基編集ノックアウトのための戦略を説明する概略図を示す。このCRISPRシステムにおける酵素（共通のRNAガイド型ニッカーゼ）は、この例ではnCas9 - UG1 - UG1であり、これもまた、gRNAと連結されたRNAアプタマーを含むRNA足場（sgRNA - アプタマー）によって特定の1つまたは複数の遺伝子に方向付けられる。sgRNA - アプタマーと複合体を形成した酵素が、塩基編集システムのデアミナーゼ構成要素（MCP - デアミナーゼ）を、塩基変換が必要とされる部位に動員する。

【図2】図2は、ある特定の実施形態に使用されるCAR構築物の直鎖状概略図の一例を示す。この例では、CAR構築物は、FMC63マウスハイブリドーマに由来する抗CD19 scFv（FMC63 scFv）、ヒトCD28分子の一部分（ヒンジ細胞外部分、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメイン全体）（図中の黒のボックス）およびCD3-ゼータ鎖のドメイン全体を含む。
20

【図3】図3は、好適なCD19 CAR送達戦略の一例の概略図を示す。本開示のCRISPRシステムにおける酵素により、TRAC座位へのCD19 CARの組込みが誘導された。ドナー構築物（AAV6）は、相同性配列（LHAおよびRHA）によって挟まれたCAR遺伝子を含んでいた。CD19 - CAR遺伝子は、TRACエクソン1座位に組み込まれた。いったん組み込まれると、CAR発現が内因性TCRプロモーターによって駆動され、一方、TRAC座位は破壊された。P2A：自己切断性ブタテッショウウイルス2A配列。pA：ウシ成長ホルモンポリA配列。
30

【図4】図4A、4B、4C、および4Dは、GFPをコードする配列のTRAC座位への標的化組込みの分析を示す。TRAC座位のエクソン1を標的とする一対の合成sgRNA、およびCas9 - UG1 - UG1 mRNAを、エレクトロポレーションを介して、CD3陽性T細胞に同時送達した。これに続いて、GFPをコードする配列がTRAC座位に対するHAによって挟まれているウイルスベクターAAV6 - TRAC - GFPによる形質導入を行った。GFP組込みおよびTCR / 機能的ノックアウトのレベルを、送達の4 ~ 7日後にフローサイトメトリーによって決定し、ウイルスによる形質導入を受けていない細胞と比較した。対照細胞（すなわち、Cas9およびsgRNAのエレクトロポレーションを受けていない細胞）も分析した。図4Aは、生きた集団上のGFP陽性細胞のレベルを示す。図4Bは、生きた集団上のTCR / 陽性細胞のレベルを示す。図4Cは、生きた集団上のTCR - / GFP +、TCR + / GFP -、TCR + / GFP +およびTCR - / GFP +細胞集団の分布を示す。図4Dは、上記の条件下での細胞の生存率を示す。
40

【図5】図5A、5B、5C、および5Dは、CD19-CARをコードする配列のTRAC座位への標的化組込みの分析を示す。TRAC座位のエクソン1を標的とする一対の合成sgRNA、およびCas9-UGI-UGI mRNAを、エレクトロポレーションを介して、CD3陽性T細胞に同時送達した。これに続いて、CD19-CARをコードする配列がTRAC座位に対するHAによって挿まれているウイルスベクターAAV6-TRAC-CARによる形質導入を行った。CAR組込みおよびTCR/機能的ノックアウトのレベルを、送達の4~7日後にフローサイトメトリーによって決定し、ウイルスによる形質導入を受けていない細胞と比較した。対照細胞（すなわち、Cas9およびsgRNAのエレクトロポレーションを受けていない細胞）も分析した。図5Aは、生細胞上のCAR陽性細胞のレベルを示す。図5Bは、生細胞上のTCR/陽性細胞のレベルを示す。図5Cは、生細胞上のTCR-/CAR+、TCR+/CAR-、TCR+/CAR+およびTCR-/CAR+細胞集団の分布を示す。図5Dは、上記の条件下での細胞の生存率を示す。

【図6】図6A、6B、6C、および6Dは、非形質導入細胞およびAAV6形質導入細胞におけるB2MおよびCD52遺伝子の塩基編集効率および機能的KO生成を比較している。TRAC座位のエクソン1を標的とする一対の合成sgRNA、B2MおよびCD52の塩基編集標的化のためのsgRNA-アプタマー、ならびにnCas9-UGI-UGIおよびApobec1-MCP mRNAを、エレクトロポレーションを介して、CD3陽性T細胞に同時送達した。これに続いて、ウイルスベクターAAV6-TRAC-CARによる形質導入を行った。送達の4日後に、B2MおよびCD52に関する塩基編集効率および機能的ノックアウトの生成を、それぞれSangerシーケンシングおよびフローサイトメトリーによって評価した。対照細胞（すなわち、Cas9およびsgRNAのエレクトロポレーションを受けていない細胞）も分析した。図6Aおよび6Bは、送達の4日後にSangerシーケンシングによって決定された、それぞれB2MおよびCD52に関する編集効率を示す。図6Cおよび6Dは、送達の4日後にフローサイトメトリーによって測定された、生細胞上のそれぞれB2MおよびCD52陽性細胞のパーセンテージを示す。

【図7】図7A、7B、および7Cは、本開示の塩基編集技術によって同時に達成された、TRAC座位におけるCAR遺伝子のノックイン、ならびにTRAC、B2MおよびCD52のノックアウトを示す。TRAC座位のエクソン1を標的とする一対の合成sgRNA、B2MおよびCD52の塩基編集標的化のためのsgRNA-アプタマー、ならびにnCas9-UGI-UGIおよびApobec1-MCP mRNAを、エレクトロポレーションを介して、CD3陽性T細胞に同時送達した。これに続いて、ウイルスベクターAAV6-TRAC-CARによる形質導入を行った。送達の4日後に、B2M、CD52およびTCRa/bに関する機能的ノックアウト生成、ならびにCAR組込みを、フローサイトメトリーによって評価した。図7Aは、フローサイトメトリーによって測定した生細胞上のTCRa/b陽性細胞のレベルを示す。図7Bは、フローサイトメトリーによって測定した生細胞上のCAR陽性細胞のレベルを示す。図7Cは、CAR陽性集団（單一KO (TRAC KO + B2M KO + CD52 KO)、二重KO (TRAC - B2M KO + TRAC - CD52 KO + B2M - CD52 KO)、および三重KO (TRAC - B2M - CD52 KO)）内部の1つ、2つ、3つの遺伝子におけるKOまたは非編集の細胞の割合を示すフローサイトメトリーのデータを示す。

【図8】図8A、8B、8C、8D、8E、および8Fは、非形質導入試料およびAAV6形質導入試料におけるB2M、CD52およびPDCD1座位でのシチジン塩基編集技術による塩基編集効率（図8A、8B、8C）ならびにwt Cas9によるインデル形成の効率（図8D、8E、8F）を示す。TRAC座位のエクソン1を標的とする一対の合成sgRNA、B2M、CD52およびPDCD1の塩基編集標的化のためのsgRNA-アプタマー、ならびにnCas9-UGI-UGIおよびApobec1-MCP mRNAを、エレクトロポレーションを介して、CD3陽性T細胞に同時送達した。Cas9試料は、野生型Cas9 mRNAおよび通常のsgRNAによるエレクトロポレー

10

20

30

40

50

ションを受けていた。これに続いて、ウイルスベクター AAV6 - TRAC - CAR による形質導入を行った。送達の 4 日後に、塩基編集効率およびインデル形成の効率を、非形質導入試料および形質導入試料において Sanger によって評価した。

【図 9】図 9 A、9 B、および 9 C は、非形質導入試料および AAV6 形質導入試料におけるシチジン塩基編集 (nCas9 - UG1 - UG1 / Apobec) および wt Cas9 による B2M、CD52、および PDCD1 遺伝子の機能的 KO 生成を示す。TRAC 座位のエクソン 1 を標的とする一対の合成 sgRNA、B2M、CD52 および PDCD1 の塩基編集標的化のための sgRNA - アプタマー、ならびに nCas9 - UG1 - UG1 および Apobec1 - MCP mRNA を、エレクトロポレーションを介して、CD3 陽性 T 細胞に同時送達した。Cas9 試料は、野生型 Cas9 mRNA および通常の sgRNA によるエレクトロポレーションを受けている。これに続いて、ウイルスベクター AAV6 - TRAC - CAR による形質導入を行った。送達の 4 日後に、B2M、CD52 および PDCD1 遺伝子の機能的ノックアウト生成を、フローサイトメトリーによって評価した（それぞれ図 9 A、9 B、および 9 C）。対照試料は、モックエレクトロポレーションを行って非形質導入のままとしたか、または AAV6 - TRAC - CAR による形質導入を行った試料を表す。

【図 10】図 10 A および 10 B は、さらに 3 つの遺伝子を同時にノックアウトした場合の、TRAC 座位における CAR のノックインおよび TRAC のノックアウトを示す。TRAC 座位のエクソン 1 を標的とする 1 対の合成 sgRNA、B2M、CD52 および PDCD1 の塩基編集標的化のための sgRNA - アプタマー、ならびに nCas9 - UG1 - UG1 および Apobec1 - MCP mRNA を、エレクトロポレーションを介して、CD3 陽性 T 細胞に同時送達した。Cas9 試料は、野生型 Cas9 mRNA および通常の sgRNA によるエレクトロポレーションを受けている。これに続いて、ウイルスベクター AAV6 - TRAC - CAR による形質導入を行った。CAR 組込みおよび TCRa/b 機能的ノックアウトのレベルを、送達の 4 ~ 7 日後にフローサイトメトリーによって決定した。図 10 A は、生細胞上の CAR 陽性細胞のレベルを示す。図 10 B は、生細胞上の TCRa/b 陽性細胞のレベルを示す。

【図 11】図 11 は、塩基編集技術を用いて生成された CAR - T 細胞の殺腫瘍能力を示す。CAR - T 細胞の生成のために、TRAC 座位のエクソン 1 を標的とする一対の合成 sgRNA、B2M、CD52 および PDCD1 遺伝子の塩基編集のための sgRNA - アプタマー、ならびに nCas9 - UG1 - UG1 および Apobec1 - MCP mRNA を、エレクトロポレーションを介して、CD3 陽性 T 細胞に同時送達した。Cas9 試料は、野生型 Cas9 mRNA および通常の sgRNA によるエレクトロポレーションを受けている。これに続いて、ウイルスベクター AAV6 - TRAC - CAR による形質導入を行った。エレクトロポレーションの約 7 日後に、CD3+ 細胞を培養物から枯渇させ、得られた同種異系 CAR - T 細胞を、あらかじめカルセイン AM をロードした CD19 陽性 Raji 細胞とともに、1 : 1 および 5 : 1 の CAR - T : Raji 細胞比で 4 時間インキュベートした。インキュベーションの後に、培地を収集して、Raji 細胞溶解の尺度として蛍光発光について分析した。標的細胞死滅のパーセンテージは、[(試験条件の平均値 - 陰性対照条件の平均値) / (陽性対照条件の平均値 - 陰性対照条件の平均値)] × 100 として計算され、ここで陰性対照条件は CAR - T 細胞を伴わない Raji 細胞であり、陽性対照条件は完全な溶解を達成するために 2 % トリトンに曝露させた Raji 細胞である。

【図 12】図 12 は、ある特定の実施形態で使用される sHLA - E 三量体の直鎖状概略図の一例を示す。この例では、sHLA - E 三量体構築物は、ヒト B2M (hB2M 1. p.) のリーダーベプチド、HLA - E 結合性ベプチド抗原、15 アミノ酸のリンカー ((G4S)3)、成熟ヒト B2M (hB2M)、20 アミノ酸のリンカー ((G4S)4) および成熟 HLA - E 重鎖を含む。

【図 13】図 13 は、ある特定の実施形態で使用される環状二本鎖 DNA の概略図の一例を示す。外因性 DNA 鑄型は、B2M 座位由来の相同性アーム（右相同性アーム、RHA

および左相同性アーム、L H A)によって挟まれた。環状形態では、相同性アームを有する外因性DNA鑄型は、B 2 Mゲノム座位 (CTSまたはCRISPR/Cas9標的配列またはsgRNA B 2 M標的化配列)を標的とするgRNA対の配列によって両側から挟まれるか (A) または挟まれていないか (B) であり、このため、ひとたび環状二本鎖DNAが細胞内で一緒にCRISPR構成要素に同時送達されると、ドナー核酸配列が、CRISPR/Casによる切断に続いて、環状dsDNAから直鎖状DNAとして放出された。pA:ウシ成長ホルモンポリA配列

【図14】図14は、好適なscHLA-E三量体送達方法の一例の概略図を示す。本開示のCRISPRシステムにおける酵素は、B 2 M座位へのscHLA-E三量体の組込みを誘導した。外因性DNA鑄型は、相同性配列 (L H A およびR H A) によって挟まれた、scHLA-E三量体をコードする配列を含んでいた。scHLA-E三量体導入遺伝子は、B 2 Mエクソン1座位に組み込まれた。ひとたび組み込まれると、scHLA-E三量体の発現は内因性B 2 Mプロモーターによって駆動され、一方、B 2 M座位は破壊された。pA:ウシ成長ホルモンポリA配列

【図15】図15A、15B、15C、および15Dは、外因性DNA鑄型を環状二本鎖DNAとして送達する場合の、tGFPをコードする配列のB 2 M座位への標的化組込み、およびCITA座位での塩基編集の分析を示す。B 2 M座位のエクソン1を標的とする一対の合成sgRNA、CITAの塩基編集標的化のためのsgRNA-アプタマー、nCas9-UGI-UGIおよびProbe c1-MCP mRNA、ならびにB 2 M遺伝子に対する相同性アームを有するGFPコード配列を含む環状二本鎖DNAを、エレクトロポレーションを介して、iPSCに同時送達した。環状形態では、相同性アームを有する外因性DNA鑄型は、sgRNA B 2 M標的化配列 (グラフ中では、それぞれCTS_B 2 M_tGFPおよびB 2 M_tGFP) (CTSはCRISPR/Cas9標的配列を表す) によって両側から挟まれるか、または挟まれていないかであった。GFP組込みのレベルを、送達の5~7日後にインターフェロン- γ による48時間の処理の後にフローサイトメトリーによって決定して、外因性DNA鑄型を受けなかった細胞と比較した。CITA座位での塩基編集効率を、送達の5~7日後にSangerシークエンシングによって評価した。対照細胞 (すなわち、Cas9およびsgRNAsのエレクトロポレーションを受けなかった細胞) も分析した。図15Aは、Sangerシークエンシングによって決定されたCITA遺伝子の塩基編集効率を示す。図15Bは、生細胞上のB 2 M陽性細胞のレベルを示す。図15Cは、生細胞上のGFP陽性細胞のレベルを示す。図15Dは、生細胞上のGFP-/B 2 M+、GFP-/B 2 M+、GFP+/B 2 M+、およびGFP+/B 2 M-細胞集団の分布を示す。

【図16】図16A、16B、16C、および16Dは、外因性DNA鑄型を直鎖状二本鎖DNAとして送達する場合の、tGFPをコードする配列のB 2 M座位への標的化組込み、およびCITA遺伝子での塩基編集の分析を示す。B 2 M座位のエクソン1を標的とする一対の合成sgRNA、CITA遺伝子の塩基編集標的化のためのsgRNA-アプタマー、nCas9-UGI-UGIおよびProbe c1-MCP mRNA、ならびにB 2 M遺伝子に対する相同性アームを有するtGFPコード配列を含む直鎖状二本鎖DNAを、エレクトロポレーションを介して、iPSCに同時送達した。直鎖状形態では、相同性アームを有する外因性DNA鑄型は、sgRNA B 2 M標的化配列 (グラフ中では、それぞれ直鎖状CTS_B 2 M_tGFPおよび直鎖状B 2 M_tGFP) (CTSはCRISPR/Cas9標的配列を表す) によって両側から挟まれるか、または挟まれていないかであった。GFP組込みのレベルを、送達の5~7日後にインターフェロン- γ による48時間の処理の後にフローサイトメトリーによって決定して、外因性DNA鑄型を受けなかった細胞と比較した。CITA遺伝子での塩基編集効率を、送達の5~7日後にSangerシークエンシングによって評価した。対照細胞 (すなわち、Cas9およびsgRNAのエレクトロポレーションを受けなかった細胞) も分析した。図16Aは、Sangerシークエンシングによって決定されたCITAの塩基編集効率を示す。図16Bは、生細胞上のB 2 M陽性細胞のレベルを示す。図16Cは、生細胞上の

10

20

30

40

50

GFP陽性細胞のレベルを示す。図16Dは、生細胞上のGFP-/B2M+、GFP-/B2M+、GFP+/B2M+、およびGFP+/B2M-細胞集団の分布を示す。

【図17】図17A、17B、および17Cは、外因性DNA鑄型を環状二本鎖DNAとして送達する場合の、scHLA-E三量体をコードする配列のB2M座位への標的化組込み、およびCITA遺伝子での塩基編集の分析を示す。B2M座位のエクソン1を標的とする一対の合成sgRNA、CITAの塩基編集標的化のためのsgRNA-アプタマー、nCas9-UGI-UGIおよびApobec1-MCP mRNA、ならびにB2M遺伝子に対する相同性アームを有するscHLA-E三量体をコードする配列を含む環状二本鎖DNAを、エレクトロポレーションを介して、iPSCに同時送達した。環状形態では、相同性アームを有する外因性DNA鑄型は、sgRNA B2M標的化配列（グラフ中ではそれぞれ、直鎖状CTS_B2M_scHLA-E三量体および直鎖状B2M_scHLA-E三量体）（CTSはCRISPR/Cas9標的配列を表す）によって両側が挟まれているか、または挟まれていないかであった。scHLA-E三量体組込みのレベルを、送達の5~7日後にインターフェロン-αによる48時間の処理の後にフローサイトメトリーによって決定し、外因性DNA鑄型を受けなかった細胞と比較した。CITA遺伝子での塩基編集効率を、送達の5~7日後にSangerシーケンシングによって評価した。対照細胞（すなわち、Cas9およびsgRNAのエレクトロポレーションを受けなかった細胞）も分析した。図17Aは、Sangerシーケンシングによって決定されたCITA遺伝子の塩基編集効率を示す。図17Bは、生細胞上のB2M陽性細胞のレベルを示す。図17Cは、生細胞上のscHLA-E三量体陽性細胞のレベルを示す。

10

20

30

40

40

50

【発明を実施するための形態】

【0035】

本開示は、共通のCas9エレメントを使用して、規定された核酸標的の正確な編集（ノックアウト）と、所望の座位での選択された外因性配列の導入（ノックイン）とを同時に可能にする、遺伝子改変細胞、特に免疫細胞およびiPSCの生成のための新たなモジュラーアプローチに関する。

【0036】

本発明者らは、共通のCRISPR/Cas9標的化エレメントを使用して、規定された核酸標的の正確な編集（ノックアウト）と、所望の座位での選択された外因性配列の導入（ノックイン）とを同時に可能にする、遺伝子改変細胞、特に免疫細胞およびiPSCの生成のための新たなモジュラーアプローチを開発した。有利なことに、本開示による方法およびシステムを使用して、外因性遺伝子、例えば、CARまたはTCRのノックインと、複数の遺伝子を塩基編集して機能的ノックアウトを生じさせることとを同時に行えることが、本明細書で示されている。

【0037】

本明細書で提供される方法は、細胞、特に免疫細胞における異なる遺伝子を標的とすることができる。例えば、本方法で使用される塩基編集構成要素を使用して、遺伝子TRA C、TRBC1、TRBC2、PDCD1、CD52、CITA、NKG2AおよびB2Mによってコードされる上記のタンパク質のうちのいずれかのその後の表現型喪失をもたらす所望の塩基変化をもたらす遺伝子改変を導入することができる。本方法を使用して、細胞、例えば、免疫細胞またはiPSC細胞において、標的遺伝子の一方または両方のアレルを編集することができる。本明細書で提供される方法を使用して、複数の異なる遺伝子を編集して（多重塩基編集）、標的遺伝子の一方または両方のアレルを首尾よく編集することができる。例えば、異なるガイドRNA配列を含む複数のRNA足場を本方法に使用して、複数の異なる遺伝子座（例えば、2~10個）の遺伝子改変（塩基編集）を行うことができる。有利なことに、本方法およびシステムを使用して、外因性遺伝子、例えば、CARまたはTCRをコードする配列のノックインと、複数の遺伝子を塩基編集して機能的ノックアウトを生じさせることとを同時に行えることが、本明細書で示されている。

【0038】

本開示による方法は、遺伝子操作された細胞、特に免疫細胞、ならびに免疫細胞に分化し得る幹細胞および前駆細胞が作製されるように構成することができる。免疫細胞には、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、骨髄芽球、リンパ系樹状細胞、骨髄系樹状細胞、マクロファージ、好酸球、好中球、好塩基球およびCD34+造血幹前駆細胞（HSPC）が含まれる。HSPCは、T細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、骨髄芽球、および他の免疫細胞、赤芽球、巨核芽球およびマスト細胞に分化することができる共通の骨髄系および共通のリンパ系前駆細胞を生じることができる。加えて、ヒト由来の多能性幹細胞であり、hESC（ヒト胚性幹細胞）および人工多能性幹細胞（iPSC）を含むhPSC（ヒト多能性幹細胞）を使用して、免疫細胞を導き出すことができる。hPSCおよび例えばiPSCを、所望の細胞型の集団に分化させる前に遺伝子操作することができ、またはiPSCを所望の細胞型の集団に分化させた後に、続いて遺伝子操作することもできる。

10

20

【0039】

一部の実施形態では、免疫細胞は、T細胞、例えば、CAR-T/TCR-T細胞である。遺伝子操作されたT細胞は、初代T細胞から導き出すこともでき、または治療用途のための「普遍的に許容される」細胞として好適である幹細胞から分化させることもできる。好適な幹細胞には、造血幹細胞（HSC）、神経、間葉、中胚葉、肝臓、脾臓、筋肉、および網膜幹細胞に由来する胚性および人工多能性幹細胞（iPSC）が含まれるが、これらに限定されない哺乳動物幹細胞、例えばヒト幹細胞が含まれるが、これらに限定されない。他の幹細胞には、マウス幹細胞、例えば、マウス胚性幹細胞などの哺乳動物幹細胞が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

50

60

70

【0040】

本開示のCRISPRに基づくプラットフォームを使用して、外因性DNA配列を、細胞、特にT細胞またはiPSCの1つまたは複数の標的核酸配列に組み込むことができる。外因性DNAは、CARもしくはTCR配列を含むことができ、または治療用タンパク質をコードすること、もしくはゲノム中の点突然変異/インデルを是正することができる。

【0041】

一実施形態では、本開示は、標的遺伝子の機能的消失をもたらす1つまたは複数の部位特異的突然変異を有するCAR-T細胞の生成のためのCRISPRに基づくプラットフォームの適用に基づく（図1）。本システムを多重様式で使用して、免疫抑制性副作用、移植片対宿主病および宿主対移植片病の予防などの有利な特性を有するCAR-T細胞を生成させることができる。本開示は、特に、同種異系の汎用の治療法の開発にとって適切である可能性がある。

【0042】

定義

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、+/-10%を指す。

【0043】

本明細書で使用される場合、「アンチセンス」という用語は、特定のDNAまたはRNA配列に対して相補的なヌクレオチド配列を指す。「アンチセンス鎖」という用語は、「センス」鎖に対して相補的な核酸鎖を参照して使用される。アンチセンス分子は、相補鎖の合成を可能にするウイルスプロモーターに対して逆方向に目的の遺伝子をライゲートすることによる合成を含む、任意の方法によって作製することができる。ひとたび細胞に導入されると、この転写された鎖は、細胞によって産生された天然の配列と組み合わさせて二重鎖を形成する。これらの二重鎖は続いて、さらなる転写または翻訳のいずれかを遮断する。

【0044】

「細胞」は、本明細書で定義される場合、単離されているか否か、培養されているか否か、分化しているか否かを問わず、任意の種類の細胞、原核細胞または真核細胞を含み、細胞のより高レベルの組織体、例えば、組織、器官、生物体またはそれらの部分も含む。

例示的な細胞には、脊椎動物細胞、哺乳動物細胞、ヒト細胞、植物細胞、動物細胞、無脊椎動物細胞、線虫細胞、昆虫細胞、幹細胞などが含まれるが、これらに限定されない。

【0045】

「相補物」または「相補的な」は、本明細書で使用される場合、核酸分子のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の間のワトソン・クリック（例えば、A - T / U および C - G）またはフーグスティーン塩基対形成を意味する。完全な相補物または完全に相補的なとは、核酸分子のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の間の 100% 相補的な塩基対形成を意味し得る。部分的に相補的なとは、100% 未満の相補性、例えば、80% 未満の相補性を意味し得る。「相補的な」は、本明細書で使用される場合、第 1 の配列が、8 10 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 、 17 、 18 、 19 、 20 、 21 、 2 2 、 23 、 24 、 25 、 30 、 35 、 40 、 45 、 50 、 55 、 60 、 65 、 70 、 75 、 80 、 85 、 90 、 95 、 100 ヌクレオチドもしくはそれ以上のヌクレオチドの領域にわたって、第 2 の配列の相補物に対して少なくとも 60% 以上、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% 同一であること、または 2 つの配列がストリングエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることを意味する。

【0046】

「送達ベクター（単数）」または「送達ベクター（複数）」は、本発明において必要とされる薬剤 / 化学物質および分子（タンパク質または核酸）を、細胞との接触下に置くか、または細胞内もしくは細胞内区画内に送達するために本発明で使用することができる任意の送達ベクターを対象とする。これには、形質導入ベクター、リポソーム送達ベクター、プラスミド送達ベクター、ウイルス送達ベクター、細菌送達ベクター、薬物送達ベクター、化学的担体、ポリマー担体、リポプレックス、ポリプレックス、デンドリマー、マイクロバブル（超音波造影剤）、ナノ粒子、エマルジョンまたは他の好適な移入ベクターが含まれるが、これらに限定されない。これらの送達ベクターは、分子、化学物質、高分子（遺伝子、核酸、タンパク質）、またはプラスミドおよび T - DNA などの他のベクターの送達を可能にする。これらの送達ベクターは、分子担体である。

【0047】

「ドナー核酸」は、DNA 修復機構、相同組換え（HR）、または非相同末端結合（NHEJ）のいずれかによって標的配列に全体的または部分的に挿入されるかまたは組換えられるために、生物またはレセプタクルに供給される任意の核酸と、本明細書で定義される。

【0048】

「遺伝子」は、本明細書で使用される場合、転写および / もしくは翻訳調節配列ならびに / またはコード領域ならびに / または非翻訳配列（例えば、イントロン、5' - および 3' - 非翻訳配列）を含む、天然（例えば、ゲノム）または合成遺伝子であり得る。遺伝子のコード領域は、アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、または機能性 RNA、例えば、tRNA、rRNA、触媒 RNA、siRNA、miRNA もしくはアンチセンス RNA であり得る。遺伝子はまた、コード領域（例えば、エクソンおよび miRNA）に対応する mRNA または cDNA であってもよく、必要に応じて、5' - または 3' - 非 40 翻訳配列が連結されていてもよい。遺伝子はまた、コード領域の全体もしくは一部および / またはそれと連結された 5' - もしくは 3' - 非翻訳配列を含む、in vitro で產生された増幅された核酸分子であってもよい。

【0049】

「遺伝子標的化」は、標的配列におけるヌクレオチドの欠失、挿入、突然変異、および置き換えを含む、標的核酸配列に対する永続的な変化を誘導する任意の遺伝学的手法として、本明細書で使用される。

【0050】

「標的核酸」または「標的配列」は、本明細書で使用される場合、それに対して作用が行われる任意の所望の所定の核酸配列であり、これには、コード配列または非コード配列 50

、遺伝子、エクソンまたはイントロン、調節配列、遺伝子間配列、合成配列および細胞内寄生体配列が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、標的核酸は、標的の細胞、組織、器官または生物体の内部に存在する。標的核酸は、標的配列内に1つまたは複数のヌクレオチドを含む標的部位を含み、これらのヌクレオチドは、本明細書に開示される方法および組成物によって任意の程度に改変される。例えば、標的部位は、1個のヌクレオチドを含むことができる。例えば、標的部位は、1～300個のヌクレオチドを含むことができる。例えば、標的部位は、約1～100個のヌクレオチドを含むことができる。例えば、標的部位は、約1～50個のヌクレオチドを含むことができる。例えば、標的部位は、約1～35個のヌクレオチドを含むことができる。一部の実施形態では、標的核酸は複数の標的部位を含むことができ、これらは同一であっても異なってもよい。

10

【0051】

「ゲノムまたは遺伝子改変」は、遺伝子標的化または遺伝子機能改変の結果として、生物体のゲノムまたは染色体または染色体外DNAまたはオルガネラDNAに生じた任意の改変として、本明細書で使用される。

【0052】

「突然変異体」は、本明細書で使用される場合、配列の機能の少なくとも一部分が失われた配列を指し、例えば、プロモーターまたはエンハンサー領域における配列の変化は、生物体におけるコード配列の発現に少なくとも部分的に影響を及ぼすと考えられる。本明細書で使用される場合、「突然変異」という用語は、欠失、付加、置換、または再編成などから生じ得る核酸配列における配列の任意の変化を指す。突然変異はまた、その配列が関与する1つまたは複数のステップにも影響を及ぼし得る。例えば、DNA配列の変化は、活性であるか、部分的に活性であるか、または不活性である、変更されたmRNAおよび/またはタンパク質の合成をもたらし得る。

20

【0053】

「外因性」配列は、本明細書で使用される場合、特定の細胞のゲノム中に通常は存在しないが、本開示の方法によって細胞に導入することができる配列を指す。

【0054】

「%インデル」という用語は、本明細書で使用される場合、ゲノムの標的配列におけるいくつかのヌクレオチドの挿入または欠失のパーセンテージを指す。

30

【0055】

本明細書で使用される場合、「バリアント」という用語は、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドと実質的に類似した配列を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。ポリヌクレオチドの場合、バリアントは、参照ポリヌクレオチドと比較して、5'末端、3'末端、および/または1つもしくは複数の内部部位における1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、置換、付加を有し得る。バリアントと参照ポリヌクレオチドとの間の配列の類似性および/または差異は、当技術分野で公知の従来の手法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびハイブリダイゼーション手法を使用して検出することができる。バリアントポリヌクレオチドにはまた、合成的に誘導されるポリヌクレオチド、例えば、部位特異的突然変異誘発を使用して生成されるものも含まれる。一般に、DNAを含むがこれに限定されないポリヌクレオチドのバリアントは、当業者に公知の配列アライメントプログラムによる決定で、参照ポリヌクレオチドに対して少なくとも約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を有し得る。ポリペプチドの場合、バリアントは、参照ポリペプチドと比較して、1つまたは複数のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し得る。バリアントと参照ポリペプチドとの間の配列の類似性および/または差異は、当技術分野で公知の従来の手法、例えば、ウエスタンプロットを使用して検出することができる。一般に、ポリペプチドのバリアントは、当業者に公知の配列アライメントプログラムによる決定で、参照ポリペプチドに対して少なくとも約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約86%、約90%またはそれ以上の配列同一性を有し得る。

40

50

87%、約88%約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれ以上の配列同一性を有し得る。

【0056】

組み込まれる外因性配列（例えば、CARまたはsHLA-E）

一部の実施形態では、外因性配列を含むドナー核酸配列は、目的のタンパク質をコードする配列である。一部の実施形態では、ドナー核酸配列は、CAR核酸構築物、TCR核酸、およびsHLA-Eからなる群から選択される。

【0057】

「キメラ抗原受容体」（CAR）は、「キメラ受容体」、「Tボディ」、または「キメラ免疫受容体」（CIR）と呼ばれることもある。本明細書で使用される場合、「キメラ抗原受容体」（CAR）という用語は、膜貫通ドメインおよび少なくとも1つの細胞内ドメインに作動可能に連結された抗体の細胞外抗原結合ドメイン（例えば、単鎖可変断片（scFv））を含む、人工的に構築されたハイブリッドタンパク質またはポリペプチドを指す。一般に、CARの抗原結合ドメインは、目的の標的細胞の表面に発現される特定の抗原に対する特異性を有する。例えば、T細胞を操作して、B細胞リンパ腫上のCD19に対して特異的なCARを発現させることができる。

【0058】

第1世代のCAR構築物は、結合ドメイン（scFv抗体）、ヒンジ領域、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む（Liulà、2019年、Frontiers in Immunology、そのすべての内容は参照により本明細書に組み入れられる）。

【0059】

Yescarta（商標）（アキシカブタゲンシロロイセル）は、従来の処置が奏効しなかった大細胞型B細胞リンパ腫の処置のために2017年に使用が承認され、これはこの種の最初の治療法の1つであった。これは、正常B細胞、B細胞白血病、およびリンパ腫によって発現されるタンパク質であるCD19を標的とする結合ドメインを採用している。この治療法に使用される第2世代のCAR（Kochenderferら、2009年、J Immunotherapy、そのすべての内容は参照により本明細書に組み入れられる）は、FMC63マウスハイブリドーマ（Nicholsonら、1997、Mol Immunology、そのすべての内容は参照により本明細書に組み入れられる）由来の抗CD19 scFv、ヒトCD28分子の一部分（ヒンジ細胞外部分、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン全体）、およびCD3-ゼータ鎖のドメイン全体からなる。

【0060】

一部の実施形態では、標的核酸配列に組み込まれた外因性配列は、CARをコードする配列を含む。一部の実施形態では、CAR構築物は、結合ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む。本開示の実施形態のいくつかに使用されるCAR構築物を図2に示す。

【0061】

一部の実施形態では、結合ドメインはscFv抗体である。一部の実施形態では、scFv抗体は、FMC63マウスハイブリドーマ（FMC63 scFv）由来の抗CD19 scFvを含む。特定の一実施形態では、結合ドメインは抗CD19 scFvである。別の実施形態では、結合ドメインは抗B細胞成熟抗原（BCMA）scFvである。

【0062】

一部の実施形態では、CAR構築物は、ヒトCD28分子の一部分（例えば、ヒンジ細胞外部分、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメイン全体）を含む。

【0063】

一部の実施形態では、CAR構築物は、CD3-ゼータ鎖のドメイン全体を含む。

【0064】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、標的核酸配列に組み込まれた外因性配列は、F M C 6 3 s c F V、C D 2 8 ヒンジ細胞外部分、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメイン全体、ならびにC D 3 Ζ鎖を含むC A R コード配列を含む。

【0065】

細胞内シグナル伝達ドメインは、抗原結合後にC D 3 - ゼータのリン酸化を介して、細胞内でシグナル伝達を生じさせる。C D 3 - ゼータの細胞質ドメインは、主なC A R エンドドメイン構成要素として日常的に使用される。C D 3 シグナル伝達に加えて、他の補助刺激分子もT細胞の活性化に必要とされるため、C A R 受容体は典型的には、C D 2 8、C D 2 7、C D 1 3 4 (O x 4 0) およびC D 1 3 7 (4 - 1 B B) を含む補助刺激分子を含む。

10

【0066】

第1、第2、第3および第4世代のC A R の例は、Subklewe Mら、Transfusion Medicine and Hemotherapy. 2019年、Feb; 46(1): 15~24ページに記載されており、これらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。一部の実施形態では、外因性配列は、第1、第2、第3または第4世代のC A R のC A R 配列である。

20

【0067】

特定の一実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3 - ゼータ鎖の細胞内ドメイン全体である。一実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、さらに、4 1 B B - C D 3 - ゼータ鎖またはC D 2 8 - C D 3 - ゼータ鎖を含む。

20

【0068】

ヒンジ領域は、典型的には、結合ドメインと細胞外膜との間に位置する小さな構造スペーサーである。理想的には、これはs c F Vの柔軟性を高めて、C A R とその標的抗原との間の空間的制約を減少させる。ヒンジ領域の設計は当技術分野で記載されており、典型的には、他の免疫分子、例えば、I g G、C D 8 およびC D 2 8 に由来する膜近位領域である配列に基づく(Chandran、SSら、2019年、Immunological Reviews、290(1): 127~147ページおよびQin Lら、2017年、Journal of Hematologic Oncology、10(1) 68ページ、これらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

30

【0069】

膜貫通ドメインは、細胞膜を貫通する疎水性アルファヘリックスからなる構造要素である。これはC A R を原形質膜に係留し、それによってヒンジ領域および結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインと架橋することによって機能する。C D 2 8 膜貫通ドメインは、典型的にはC A R で使用され、安定に発現される受容体をもたらすことが知られている。

【0070】

一部の実施形態では、C A R 核酸構築物は、C D 1 9 を標的とする結合ドメイン、ならびにC D 3 - ゼータ鎖の細胞内ドメイン全体およびC D 2 8 補助刺激分子の一部分を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

40

【0071】

C A R T細胞の遺伝子改変は、ウイルスに基づく遺伝子移入法を介して、または非ウイルス性の方法、例えば、D N A に基づくトランスポゾン、C R I S P R / C a s 9 技術、もしくはエレクトロポレーションによるi n v i t r o 転写されたm R N A の直接導入によって行われ得る。遺伝子移入技術により、目的の特定の座位への組込みが行われるか、またはランダムもしくは擬似ランダムにゲノム中への組込みが行われる。ランダムまたは擬似ランダムなゲノム組込み遺伝子移入方法には、トランスポゾン、レンチウイルス、レトロウイルス、およびアデノウイルスなどの方法が含まれるが、これらに限定されない。座位特異的な組込み手法は、ゲノムの領域を置き換えて、外因性遺伝物質を正確に挿入できる可能性があるため、より予測可能であるという利点がある。一部の実施形態では、C A R 核酸は、遺伝子標的化の結果として、生物体のゲノムまたは染色体

50

外DNAまたはオルガネラDNAに組み込まれる。

【0072】

他の実施形態では、ドナー核酸配列はT C R遺伝子である。

【0073】

他の実施形態では、ドナー核酸配列はs c H L A - E三量体である。s c H L A - E三量体は、以下の要素：(a) B 2 Mのリーダーペプチド、(b) V M A P R T L I L (H L A - E結合ペプチド、配列番号1)、(c) 15アミノ酸のリンカー(G 4 S)3、(d) 成熟ヒトB 2 M、(e) 20アミノ酸のリンカー(G 4 S)4、および(f) 成熟H L A - E重鎖を含むキメラタンパク質である。

【0074】

一部の実施形態では、s c H L A - E三量体核酸配列は、受託番号A Y 2 8 9 2 3 6 . 1(配列番号2)に記載された配列を含む：

AAGCTTTGAGCCGAGATGTCCTCGCTCCGTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCT
 CTTCTGGCCTCGAGGCTGTTATGGCTCCGGACTTTAATTAGGTGGTGGCGG
 ATCCGGTGGTGGCGGTTCTGGTGGTGGCGGCTCCATCCAGCGTACGCCAAAGATT
 AGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAATGAAAGTCAAATTCTGAATTGCTAT
 GTGTCTGGTTTATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAG
 AATTGAAAAAGTGGAGCATTGAGACTTGTCTTCAGCAAGGACTGGTCTTCTATC
 TCTTGTACTACACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTG
 AACCATGTGACTTTGTCACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATCGCGACATGGGTGG
 TGGCGGTTCTGGTGGTGGCGGTAGTGGCGGCGGAGGAAGCGGGTGGTGGCGGTTCCG
 GATCTCACTCCTTGAAGTATTCCACACTTCCGTGTCCGGCCGGCCGGAG
 CCCCCTTCATCTCTGTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGCCTCGACAA
 CGACGCCGCGAGTCCGAGGATGGTGCCGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGT
 CAGAGTATTGGGACCGGGAGACACGGAGCGCCAGGGACACCGCACAGATTTCGA
 GTGAACCTGCGGACGCTGCGCGGCTACTACAATCAGAGCGAGGCCGGTCTCACAC
 CCTGCAGTGGATGCATGGCTGCGAGCTGGGCCACAGGCCTCCCGCGGGT
 ATGAACAGTTGCGCTACGACGGCAAGGATTATCTCACCTGAATGAGGACCTGCGC
 TCCTGGACCGCGGTGGACACGGCGGCTCAGATCTCGAGCAAAAGTCAAATGATGC
 CTCTGAGGCGGAGCACCAAGAGAGCCTACCTGGAAGAGACACATGCGTGGAGTGGCTCC
 ACAAAATACCTGGAGAAGGGGAAGGAGACGCTGCTTCACCTGGAGCCCCAAAGACA
 CACGTGACTCACCAACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCCTGAGGTGCTGGCTCT
 GGGCTTCTACCCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCAGGATGGGAGGGCCATA
 CCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCCTGCAGGGATGGAACCTCCAGAAG
 TGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGAGCAGAGATAACGTGCCATGTGCA
 GCATGAGGGGCTACCGAGGCCGTACCCCTGAGATGGAAGGCCGGCTTCCCAGCCCA
 CCATCCCCATCGTGGGCATCATTGCTGGCTGGTTCTCCTGGATCTGTGGCTCTG
 GAGCTGTGGTTGCTGATATGGAGGAAGAAGAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGG
 AGCTACTATAAGGCTGAGTGGAGCGACAGTGCCAGGGTCTGAGTCTCACAGCTT
 GTAATCTAGA

一部の実施形態では、A Y 2 8 9 2 3 6 . 1配列は、内因性座位を標的化するために使用されるs g R N Aペアによる認識を回避するために、特定のヌクレオチドが改変される。導入遺伝子はまた、それが組み込まれる座位に由来し、C R I S P R / C a s 9切断部位を取り囲む相同性アーム(例えば、B 2 M相同性アーム)によって挟まれている。B 2 M座位に組み込まれることを目的とする、その結果得られる配列は、s c H L A - E三量体B 2 M - 9 0 0 H A(配列番号3)と称される：

TAATTCAATTCAATTCAATTCCATTGTTCAATTGGTTACTGAGTACCTACTATGT
 GCCAGCCCCCTGTTCTAGGGTGGAAACTAAGAGAATGATGTACCTAGAGGGCGCTGG
 AAGCTCTAAAGCCCTAGCAGTTACTGCTTTACTATTAGTGGTCGTTTTCTCCC
 CCCCAGCCCCCGACAAATCAACAGAACAAAGAAAATTACCTAAACAGCAAGGACAT

10

20

30

40

50

AGGGAGGAACCTCTGGCACAGAACCTTCAAACACTTTCCCTGAAGGGATACAA
 GAAGCAAGAAAGGTACTCTTCACTAGGACCTCTGAGCTGTCCTCAGGATGCT
 TTTGGGACTATTTCTTACCCAGAGAATGGAGAAACCCCTGCAGGGAAATTCCAAG
 CTGTAGTTATAAACAGAACAGTTCTCCTCTGCTAGGTAGCATTCAAAGATCTAATC
 TTCTGGGTTCCGTTCTCGAATGAAAAATGCAGGTCCGAGCAGTTAAGTGGCTG
 GGGCACCAATTAGCAAGTCACCTAGCATCTCTGGGCCAGTCTGCAAAGCGAGGGGG
 CAGCCTTAATGTGCCCTCAGCCTGAAGTCCTAGAACATGAGCGCCGGTGTCCAAGC
 TGGGGCGCGCACCCAGATCGGAGGGGCCGATGTACAGACAGCAAACCTCACCCAG
 TCTAGTGCATGCCTCTTAAACATCACGAGACTCTAACAGAAAAGGAAACTGAAAACG
 GGAAAGTCCCTCTCTAACCTGGCACTGCGTCGCTGGCTTGGAGACAGGTGACGG 10
 TCCCTGCGGGCTTGTCTGATTGGCTGGCACCGCTTAATATAAGTGGAGGGT
 CGCGCTGGCGGGCATTCTGAAGCTGACAGCATTGGGACGAGATGTCGCTCAG
 TCGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTGTCGGGCTCGAACAGCTGTTATGGCTC
 CGCGGACTTTAATTAGGTGGTGGCGGATCCGGTGGTGGCGGTTCTGGTGGTGGC
 GGCTCCATCCAGCGTACGCCAAAGATTCAAGGTTACTCACGTACCCAGCAGAGAA
 TGGAAAGTCAAATTCTGAATTGCTATGTGTCTGGTTTATCCATCCGACATTG
 AAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATTCAAGACTTG
 TCTTCAGCAAGGACTGGCTTTCTATCTCTGTACTACACTGAATTCAACCCCCACT
 GAAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTGTACAGCCAAAGAT 20
 AGTTAAGTGGATCGCACATGGGTGGTGGCGGTTCTGGTGGTGGCGGTAGTGGCG
 GCGGAGGAAGCGGTGGTGGCGGTTCCGGATCTCACTCCTGAAGTATTCCACACT
 TCCGTGTCCCAGGCGCCGGCGCGGGAGCCCCGCTTCATCTCTGTGGCTACGTGGA
 CGACACCCAGTTCGTGCCTCGACAACAGACGCCGAGTCCGAGGATGGTGC
 GGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGTCAGAGTATTGGACCGGGAGACACGGAGC
 GCCAGGGACACCGCACAGATTTCGAGTGAACCTGCGGACGCTGCGCGGCTACTA
 CAATCAGAGCGAGGCCGGTCTCACACCCCTGCAGTGGATGCATGGCTGAGCTGG 30
 GGCCGACAGGCCTTCCTCCGGGTATGAACAGTTGCCTACGACGGCAAGGAT
 TATCTCACCTGAATGAGGACCTGCGCTCTGGACCGGGTGGACACGGCGGCTCA
 GATCTCCGAGCAAAGTCAAATGATGCCTCTGAGGCAGCAGAGAGCCTTAC
 TGGAAAGACACATGCGTGGAGTGGCTCCACAAATACCTGGAGAAGGGAGGGAGC 30
 CTGCTTCACCTGGAGCCCCAAAGACACACAGTGAACCTACCCACCCATCTGACCA
 TGAGGCCACCCCTGAGGTGCTGGCTCTGGCTTCTACCCCTGCGGAGATCACACTGA
 CCTGGCAGCAGGATGGGAGGGCCATACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGG
 CCTGCAGGGATGGAACCTTCAGAACAGTGGCAGCTGTGGTGGCTTCTGGAGA
 GGAGCAGAGATAACAGTGCCATGTGCAGCATGAGGGCTACCCGAGCCGTCACCC
 TGAGATGGAAGCCGGCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCGTGGGCATCATTGCTGGC
 CTGGTTCTCTTGATCTGTGGCTCTGGAGCTGTGGTGTGCTGTGATATGGAG
 GAAGAAGAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTACTATAAGGCTGAGTGGAGCACA
 GTGCCAGGGTCTGAGTCTCACAGCTTGTAAataaacccgtatcagcctgactgtgc
 tctagttgccagccatctgtgttgcctccctccctgccttgcaccctgaaagggt
 ccactccca 40
 ctgtcccttcataaaaaatgaggaaattgcattgcattgtctgagtaggtgtcatt
 ctattcttgggggg
 tgggtggggcaggacagcaagggggaggattggaaagacaatagcaggcatgt
 gggatgcgg
 gggctctatggAGGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCCTCCGCTCTGG
 CCTCTCCGCTCTGCACCCCTCTGTGGCCCTCGCTGTGCTCTCGCTCCGTGACTTC
 CCTCTCCAAGTTCTCCTTGGTGGCCCGCTGGGCTAGTCCAGGGCTGGATCTC
 GGGGAAGCGGGGGGTGGCCTGGGAGTGGGAAGGGGGTGCACCCGGGACGCC
 GCTACTTGGCCCTTTCGGGGAGCAGGGAGACCTTGGCCTACGGCGACGGGA
 GGGTCGGGACAAAGTTAGGGCGTCGATAAGCGTCAGAGCGCCGAGGTTGGGGAG
 GTTTCTCTCCGCTCTTCGGGGCCTGGCTCCCCAGCGCAGCTGGAGTGG
 GGGACGGGTAGGCTCGTCCAAAGGCGGGCGCTGAGGTTGTGAACCGTGGAGG 50

GGCGCTTGGGGTCTGGGGAGGCCTGCCCGGGTAAGCCTGCTGCTGCGGCTCTG
 CTTCCCTTAGACTGGAGAGCTGTGGACTTCGTCTAGGCGCCGCTAAGTTCGCATG
 TCCTAGCACCTCTGGGTCTATGTGGGCCACACCGTGGGGAGGAAACAGCACGCGA
 CGTTGTAGAATGCTTGGCTGTGATACAAAGCGGTTTCAATAATTAACTTATTTG
 TTCCCACATCACATGTCACTTTAAAAAATTATAAGAACTACCCGTTATTGACATCTT
 CTGTGTGCCAAGGACTTTATGTGCTTGCCTCATTAAATTGAAACAGTTATCTT
 CCGCCATAGATAACTACTATGGTTATCTTCTGCCTCTCACAGATGAAGAAACTAAG
 GCACCGAGATTAAAGAAACTTAATTACACAGGGATAAATGGCAGCAATCGAGAT
 TGAAGTCAAG

一部の実施形態では、相同性アームによって挿まれた s c H L A - E 三量体導入遺伝子は、所望の座位に対する s g R N A 標的化配列によって挿まれ、その結果、ドナー核酸配列は、C R I S P R 構成要素と一緒にひとたび細胞内に同時送達されると、C R I S P R / C a s によって切断された後に、プラスミドから直鎖状D N A として放出される。一部の実施形態では、相同性アームによって挿まれた s c H L A - E 三量体導入遺伝子は、B 2 M 座位を標的とする g R N A ペアの配列によって挿まれる。その結果得られる配列は、

s c H L A - E _ 三量体 _ B 2 M - 9 0 0 H a s _ C T S (配列番号 : 4) と称される :
 CCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGTAATTCA
 ATTTCATCCATCCATTGTTCATTCGGTTACTGAGTACCTACTATGTGCCAGCCCC
 TGTTCTAGGGTGGAAACTAAGAGAATGATGTACCTAGAGGGCGCTGGAAGCTCTAA
 AGCCCTAGCAGTTACTGCTTTACTATTAGTGGTCGTTTTCTCCCCCCCCGCCCC
 CCGACAAATCAACAGAACAAAGAAAATTACCTAACAGCAAGGACATAGGGAGGAA
 CTTCTTGGCACAGAACTTCAAACACTTTCTGAAGGGATAACAAGAAGCAAGA
 AAGGTACTCTTCACTAGGACCTCTGAGCTGTCCTCAGGATGCTTTGGACT
 ATTTTCTTACCCAGAGAATGGAGAACCCCTGCAGGGATTCCAAAGCTGTAGTTA
 TAAACAGAAGTTCTCCTTGCTAGGTAGCATTCAAAGATCTTAATCTTCTGGGTT
 TCCGTTTCTGAATGAAAAATGCAGGTCCGAGCAGTTAAGTGGCTGGGACCAT
 TAGCAAGTCACTTAGCATCTCTGGGCCAGTCTGCAAAGCGAGGGGCAGCCTAA
 TGTGCCTCCAGCCTGAAGTCCAGAATGAGCGCCGGTGTCCAAAGCTGGGCGCG
 CACCCCAGATCGGAGGGCGCCGATGTACAGACAGCAAACCTCACCCAGTCTAGTGCA
 TGCCCTTCTAAACATCACGAGACTCTAAGAAAAGGAAACTGAAAACGGGAAAGTCC
 CTCTCTCTAACCTGGCACTGCGTCGCTGGCTTGGAGACAGGTGACGGTCCCTGC
 GCCTTGTCTGATTGGCTGGCACCGTAAATATAAGTGGAGGCCTCGCGCTGGC
 GGGCATTCTGAAGCTGACAGCATTGGGACGAGATGTCTCGCTCAGTCGCCTTAG
 CTGTGCTCGCGCTACTCTCTGTCCGGCTCGAACAGCTGTTATGGCTCCGGACTT
 TAATTTAGGTGGTGGCGATCCGGTGGTGGCGGTTCTGGTGGTGGCGGCTCCATC
 CAGCGTACGCCAAGATTCAAGGTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTC
 AAATTCCTGAATTGCTATGTGCTGGTTTCAATCCATCCGACATTGAAGTTGACTT
 ACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATTCACTGAATTCAACCC
 AGACTGGCTTTCTATCTCTTGACTACACTGAATTCAACCCACTGAAAAAGAT
 GAGTATGCCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTGTACAGCCCAAGATAGTTAAGTG
 GGATCGCGACATGGTGGTGGCGGTTCTGGTGGTGGCGGTAGTGGCGGGAGGAA
 GCGGTGGTGGCGGTTCCGGATCTCACTCCTGAAAGTATTTCCACACTTCCGTG
 CCCGGCCGCGGGAGCCCCGCTTCATCTCTGTGGCTACGTGGACGACACCCAG
 TTGCGCGCTTCGACAACGACGCCGAGTCCGAGGATGGTGCCTCGCGGGCGCC
 GATGGAGCAGGAGGGTCAGAGTATTGGACCGGGAGACACGGAGCGCCAGGGACA
 CCGCACAGATTTCCGAGTGAACCTGCGGACGCTGCGCGGCTACTACAATCAGAGC
 GAGGCCGGTCTCACACCCCTGCAGTGGATGCATGGCTGCGAGCTGGGGCCGACAG
 GCGCTTCCCTCCGGGTATGAACAGTTGCCTACGACGGCAAGGATTATCTCACCC
 TGAATGAGGACCTGCGCTCTGGACCGGGTGGACACGGCGGCTCAGATCTCCGAG
 CAAAAGTCAAATGATGCCTCTGAGGCAGCAGAGCAGCCTACCTGGAAGACAC

10

20

30

40

50

ATGCGTGGAGTGGCTCCACAAATACCTGGAGAAGGGGAAGGAGACGCTGCTTCACC
 TGGAGCCCCAAAGACACACGTGACTCACCAACCCATCTCTGACCATGAGGCCACC
 CTGAGGTGCTGGCTCTGGCTTCTACCCCTGCAGAGATCACACTGACCTGGCAGCA
 GGATGGGGAGGGCCATACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCTGCAGGG
 ATGGAACCTTCCAGAAGTGGCAGCTGTGGTGGTGCCTCTGGAGAGGAGCAGAGA
 TACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGCTACCCGAGCCGTACCCCTGAGATGGAA
 GCCGGCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCGTGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCT
 TGGATCTGTGGTCTCTGGAGCTGTGGTGTGCTGTGATATGGAGGAAGAAGAGCT
 CAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTACTATAAGGCTGAGTGGAGCGACAGTGCCAGGG
 TCTGAGTCTCACAGCTTGTAAataaaaccgcgtatcagccctcgactgtgccttctagttgccagc
 catctgttgcctcccccgtgccttcgtaccctggaaagggtgccactccactgtcccttccta
 ataaaatgagaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggtggggc
 aggacagcaagggggaggattggaaagacaatagcaggcatgtgggatgcgggtggctatgg
 GGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCCTACCCCTCCGCTTGCTCCGTGACTTCCCTCTCCGC
 TCTGCACCCCTCTGTGGCCCTCGCTGTGCTCTCGCTCCGTGACTTCCCTCTCCAA
 GTTCTCCTTGGTGGCCCGCCGTGGGCTAGTCCAGGGCTGGATCTCGGGAAAGCGG
 CGGGTGGCCTGGGAGTGGGAAGGGGGTGCACCCGGGACGCGCGCTACTTGCC
 CCTTCGGCGGGAGCAGGGAGACCTTGGCCTACGGCGACGGGAGGGTCGGGAC
 AAAGTTAGGGCGTCGATAAGCGTCAGAGCGCCGAGGTTGGGGAGGGTTCTCTT
 CCGCTTTCGCGGGGCCTCTGGCTCCCCAGCGCAGCTGGAGTGGGGACGGGTA
 GGCTCGTCCAAAGGCGCGCGCTGAGGTTGTGAACCGGTGGAGGGCGCTTGGG
 GTCTGGGGGAGGCCTCGCCCGGTAAGCCTGTCTGCTGCCTCTGCTTCCCTTAG
 ACTGGAGAGCTGTGGACTTCGTCTAGGCCTCGCTAACGTTGCATGTCCCTAGCACC
 TCTGGGTCTATGTGGGCCACACCGTGGGAGGAAACAGCACGCGACGTTGTAGA
 ATGCTTGGCTGTGATACAAAGCGGTTTGAATAATTAACTTATTTGTTCCCATCAC
 ATGTCACTTTAAAAAATTATAAGAACTACCCGTTATTGACATCTTCTGTGTGCC
 AAGGACTTTATGTGCTTGCCTCATTTAATTGAAAACAGTTATCTTCCGCCATAG
 ATAACACTATGGTTATCTCTGCCTCTCACAGATGAAGAAACTAAGGCACCGAGA
 TTTAAGAAACTTAATTACACAGGGATAAAATGGCAGCAATCGAGATTGAAGTC
 GCCGTGGCCTTAGCTGTGCCTACTCTCTTCTGGCCTGGAGG

ア口反応性に起因する移植片拒絶反応は、ドナー由来の同種異系細胞／組織の使用に関連する合併症である。HLAタンパク質は細胞膜上に存在する抗原提示受容体であり、T細胞受容体（TCR）と相互作用して、適応免疫系による免疫監視を媒介する。

【0075】

主要組織適合遺伝子複合体1（MHC-1）座位でコードされるクラス1 HLAタンパク質（HLA-A/-B/-C/-E/-F/-G）は、ベータ2-ミクログロブリン（B2M）とヘテロ二量体受容体を形成し、ほとんどの細胞の表面で細胞内抗原を提示する。同種異系移植片の場合、HLAクラス1タンパク質によって提示された抗原は、TCR複合体を介して宿主CD8+細胞傷害性T細胞によって異物として認識され、直接的な細胞溶解攻撃および注入された細胞の消失を招く。TCRは、HLA受容体によって提示された抗原を認識することに加えて、HLA受容体自体にも直接係合してそれを認識し、それが「自己」または「非自己」のいずれであるかを同定する。

【0076】

MHC-2座位でコードされるクラス2 HLA（HLA-DR/-DQ/-DP）は、細胞外抗原を提示するアルファ鎖およびベータ鎖で構成されるヘテロ二量体を形成し、特殊な抗原提示細胞、例えば、マクロファージおよび樹状細胞、ならびにミクログリア、内皮、上皮細胞を含む他の細胞種によって、炎症性サイトカインに応答して恒常に発現される。クラス2 HLAによって提示された外来性細胞外抗原は、分泌されたケモカインを通して細胞傷害性T細胞およびNK細胞を動員するCD4+ヘルパーT細胞のCD4+ / TCR媒介性応答を活性化する。HLAタンパク質のミスマッチまたは外来性抗原提

10

20

30

40

50

示のいずれかを通して、同種異系移植片が非自己であると認識されると、宿主T細胞のアロ反応性を招き、その結果、炎症および細胞溶解攻撃を通して移植片が拒絶される。

【0077】

このため、HLA適合は、細胞および組織の移植を成功させるために不可欠である。しかし、HLA-A、HLA-B、HLA-CおよびHLA-DQをコードする遺伝子は、ヒト集団において最も高度な多型性をコードする座位の一部であり、このため、同種異系移植片のHLA適合は、従来の細胞および組織の供与、ならびにiPSC由来の細胞療法薬の適用の両方において克服すべき大きな課題である。

【0078】

HLAクラス1タンパク質は、細胞表面での提示のためにB2Mとの二量体化に依存するため、B2M座位の遺伝子改変は、同種異系細胞を細胞傷害性CD8+T細胞から隠蔽して、患者の免疫系による排除を回避させる可能性がある。同様に、クラス2トランスアクチベータータンパク質(CIITA)の機能を破壊すると、HLAクラス2タンパク質の発現が停止し、細胞はCD4+ヘルパーT細胞から隠蔽される。しかし、そのようなアプローチはT細胞媒介性の免疫監視を回避するものの、HLA発現を完全に消失させると、NK細胞媒介性の「自己喪失」応答が誘発される。この「自己喪失」応答は、多型性が最小限であるHLA-E分子を強制発現させることによって阻止することができる。HLA-Eの誘導可能で調節された表面発現を、HLA-A、BまたはCの表面発現なしに得るために、HLA-E、B2Mおよび抗原ペプチドを含む単鎖HLA-E三量体(schHLA-E三量体)をB2M座位にノックインすることができる。この理論に拘束されることは望まないが、このアプローチ(B2Mの枯渇およびHLA-Eの強制発現)は、NK媒介性死滅に対する抵抗性を付与すると考えられる一方で、細胞は宿主CD8+T細胞によって異物として認識されないと考えられる。

【0079】

iPSCにおける同時ノックイン-ノックアウト戦略を立証するために、本開示では、CIITA遺伝子の塩基編集ノックアウトと、B2M遺伝子のノックアウトを伴うB2M座位におけるschHLA-E三量体配列の同時ノックインとを生成させる。

【0080】

座位特異的組込みのための一般的な方法は、CRISPR-Cas技術を使用して、ゲノムに対する相補的領域および改変されることが望まれる領域を有する外因性DNA配列の存在下で、目的の部位を標的化して切断することである。CRISPR-Cas技術による挿入のためのDNA配列は、非組込み型アデノ随伴ウイルス(AAV)による形質導入の方法、またはDNA鑄型を供給することを含む、複数の方法によって供給することができる。CRISPR-Casによるゲノムへの挿入のための外因性鑄型は、CRISPR-Cas技術によって切断される特定の領域によって挟まれることになる挿入配列を必要とし、これらは一般に「相同性アーム」として公知である。

【0081】

一部の実施形態では、外因性DNA鑄型または外因性配列は、一本鎖および二本鎖DNAとして供給される。ここでDNAは、DNAの5'末端および3'末端が露出している開いた直鎖状構造であるか、またはDNAの露出末端が存在しない閉じた構造であり得る。閉じたDNA分子には、環状dsDNA、直鎖状dsDNA、プラスミド、ミニサークル、環状化ssDNA、およびドギーボーンDNA(dbdNA)が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、外因性配列は、直鎖状dsDNAとして送達される。一部の実施形態では、外因性配列は、環状dsDNA中にて送達される。一部の実施形態では、環状dsDNAが外因性配列の送達のために使用される場合、外因性DNAは、挿入されることになる座位由来の相同性アームによって挟まれている。一部の実施形態では、環状dsDNAが外因性配列の送達のために使用される場合、挿入されることになる座位由来の相同性アームによって挟まれた外因性DNAは、挿入されることになる座位を標的とするsgRNA標的配列によって両側から挟まれる。

【0082】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、外因性配列は、ウイルスベクターを使用して細胞に導入される。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）およびアデノウイルスからなる群から選択される。AAVには種々の血清型があり、それらは組織型に対して異なる選好性を有する。本開示で使用することができるAAVの例には、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV-DJ9が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、AAV血清型6（AAV6）である。AAV6ベクターは、CAR-T細胞生成の分野において導入効率の改善をもたらすことが示されている（Wangら、Nucleic Acid Research 2016年、その内容は参照により本明細書に組み入れられる）。AAVは、一本鎖DNAゲノムを含む直径25nmの小さな正二十面体の無エンベロープウイルスであり、近年、不可欠な治療用遺伝子送達ツールとなっている。これは、疾患の処置のためにin vivoで標的細胞に遺伝子を送達する目的で高頻度に使用されており、学界および産業界における臨床応用に広範に使用されている（Hamiehら、Nature 2019年、568(7750)112~116ページ、その内容は参照により本明細書に組み入れられる）。

10

20

【0083】

一実施形態では、外因性配列（例えば、CAR、TCRまたはscHLA-E）配列の外因性遺伝子送達の方法は、AAV6によるものである。別の実施形態では、CAR、TCRまたはscHLA-E配列の細胞外遺伝子送達の方法は、プラスミドまたは直鎖状DNAを用いるものである。特定の座位における組込み部位は、内因性遺伝子（例えば、TRAC、B2MまたはCISH）を破壊し、その一方で、導入遺伝子（例えば、CAR、TCRまたはscHLA-E遺伝子）を含む外因性DNA断片を挿入すると考えられる。一部の実施形態では、外因性配列は、内因性プロモーターの制御下に挿入される。他の実施形態では、外因性配列は、それ自体のプロモーターによって制御される。

30

30

【0084】

一部の実施形態では、本開示の方法またはシステムは、2つ以上の外因性配列の組込みを含む。一部の実施形態では、複数のCAR外因性配列が組み込まれ、これらの複数のCARは異なる抗原を認識して、例えば、二重標的化CAR-T細胞を生成して、処置中の抗原エスケープを制限する。

30

40

50

【0085】

RNAガイド型ニッカーゼ

本明細書で使用される場合、Casタンパク質、CRISPR関連タンパク質、またはCRISPRタンパク質は互換的に使用され、RNAガイドDNA結合ドメインを有するCRISPR-CasI型、II型、またはタイプII型システムのタンパク質、またはそれらに由来するタンパク質を指す。好適なCRISPR/Casタンパク質の非限定的な例には、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e（またはCasD）、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、CasY1、CasY2、CasY3、CasE1（またはCasA）、CasE2（またはCasB）、CasE3（またはCasE）、CasE4（またはCasC）、CasC1、CasC2、CasA5、CasN2、CasM2、CasM3、CasM4、CasM5、CasM6、CasR1、CasR3、CasR4、CasR5、CasR6、CasB1、CasB2、CasB3、CasX17、CasX14、CasX10、CasX16、CasA-X、CasX3、CasZ1、CasX15、CasF1、CasF2、CasF3、CasF4、およびCas1966が含まれるが、これらに限定されない。CRISPRシステムの第1および第2のsgRNAならびに塩基編集システムのRNA足場と相互作用することができるRNAガイド型ニッカーゼの非限定的な例には、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e（またはCasD）、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、CasY1、CasY2、CasY3、CasE1（またはCasA）、CasE2（またはCasB）、CasE3

(またはCasE)、Cse4(またはCasC)、Csc1、Csc2、Cas5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CasX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、およびCu1966が含まれるが、これらに限定されない。例えば、その内容が参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、KooninおよびMakarova、2019年、Origins and Evolution of CRISPR-Cas systems, Review Philosoph Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2019年5月、13; 374 (177 2ページ); V型については、Yanら、Science、363 88~92ページ、2019年; および小型Cas14については、Harringtonら、2018年、Science、vol 362 839~842ページを参照されたい。
10

【0086】

本明細書で提供される方法およびシステムの配列標的化構成要素は、典型的には、細菌種由来のCRISPR/CasシステムのCasタンパク質を、RNAガイド型ニッカーゼとして利用する。一部の実施形態では、Casタンパク質は、II型CRISPRシステム由来である。例えば、その内容が参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、Makarova、K.S.、Wolf、Y.I.、Iranzo、J.ら、Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nat Rev Microbiol 18、67~83ページ(2020年)を参照されたい。
20

【0087】

一実施形態では、Casタンパク質は、II型CRISPR-Casシステムに由来する。例示的な一実施形態では、Casタンパク質は、Cas9タンパク質であるかまたはCas9タンパク質に由来する。一部の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、Cas9タンパク質であるか、Cas9タンパク質に由来するか、またはWT Cas9タンパク質と比較して突然変異を含む。Cas9タンパク質は、化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)、 streptococcus thermophilus)、streptococcus属種(*Streptococcus sp.*)、ノカルジオプシス・ダソンビレイ(*Nocardiosis dassonvillei*)、streptomyces pristinaespiralis)、streptomyces pristinaespiralis)、streptomyces viridochromogenes)、streptomyces viridochromogenes、streptosporangium roseum)、streptosporangium roseum)、streptosporangium roseum)、アリシクロバチルス・アシドカルダリウス(*Aliicycllobacillus acidocaldarius*)、バチルス・シュードマイコイデス(*Bacillus pseudomycoides*)、バチルス・セレニティレデュセンス(*Bacillus selenitireducens*)、エキシグオバクテリウム・シビリカム(*Exiguobacterium sibiricum*)、ラクトバチルス・デルブレッキイ(*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルス・サリバリウス(*Lactobacillus salivarius*)、マイクロシーラ・マリナ(*Microscilla marina*)、バーグホルデリア・バクテリウム(*Burkholderiales bacterium*)、ポラロモナス・ナフタレニボランス(*Polaromonas naphthalenivorans*)、ポラロモナス属種(*Polaromonas sp.*)、クロコスファエラ・ワトソニー(*Crocosphaera watsoni*)、シアノセイス属種(*Cyanotheca sp.*)、ミクロキスティス・エルギノーサ(*Microcytis aeruginosa*)、シネココッカス属種(
30
40
50

Synechococcus sp.)、アセトハロビウム・アラバティカム (*Acetohalobium arabaticum*)、アンモニフェックス・デゲンシイ (*Ammonifex degensis*)、カルジセルロシルプトル・ベスシ (*Caldicellulosiruptor beccsii*)、カンジディタス・デサルホルディス (*Candidatus Desulfurovulgaris*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*)、フィネゴルディア・マグナ (*Finegoldia magna*)、ナトロアナエロビウス・サーモフィルス (*Natranaerobius thermophilus*)、ペロトマクルム・サーモプロビオニカム (*Pelotomaculum thermopropionicum*)、アシディチオバチルス・カルダス (*Acidithiobacillus caldus*)、アシディチオバチルス・フェロオキシダンス (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、アロクロマチウム・ビノスム (*Allochromatium vinosum*)、マリノバクター属種 (*Marinobacter* sp.)、ニトロソコッカス・ハロフィルス (*Nitrosococcus halophilus*)、ニトロソコッカス・ワトソニイ (*Nitrosococcus watsoni*)、シュードアルテロモナス・ハロプランクティス (*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、クテドノバクター・ラセミファー (*Ktedonobacter racemifer*)、メタノハロビウム・エベスチガータム (*Methanohalobium evestigatum*)、アナベナ・バリアビリス (*Anabaena variabilis*)、ノジュラリア・スプミゲナ (*Nodularia spumigena*)、ノストック属種 (*Nostoc* sp.)、アルスロスピラ・マキシマ (*Arthrosphaera maxima*)、アルスロスピラ・プラテンシス (*Arthrosphaera plateensis*)、アルスロスピラ属種 (*Arthrosphaera* sp.)、リングビア属種 (*Lyngbya* sp.)、ミクロコレウス・クソノプラステス (*Microcoleus chthonoplastes*)、オスキラトリア属種 (*Oscillatoria* sp.)、ペトロトガ・モビリス (*Petrotoga mobilis*)、サーモシフォ・アフリカヌス (*Thermosiphon africanus*)、アカリオクロリス・マリナ (*Acariochloris marina*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、フランシセラ・ノビサイダ (*Francisella novicida*)、ガンマ・プロテオバクテリア (*gamma proteobacterium*) HTCC5015、パラステレラ・エクスクレメンティホミニス (*Parasutterella exrementihominis*)、ステレラ・ワズワースエンシス (*Sutterella wadsworthensis*)、スルフロスピリラム属種 (*Sulfurospirillum* sp.) SC ADC、ルミノバクター属種 (*Ruminobacter* sp.) RM87、バークホルデリア・バクテリウム (*Burkholderiales bacterium*) 1147、バクテロイデス門 (*Bacteroidetes*) 口腔タクソン274 str. F0058、ウォリネラ・サクシノゲネス (*Wolinella succinogenes*)、バークホルデリア目 (*Burkholderiales*) 菌YL45、ルミノバクター・アミロフィラス (*Ruminobacter amylophilus*)、キャンピロバクター属種 (*Campylobacter* sp.) P0111、キャンピロバクター属種 (*Campylobacter* sp.) RM9261、キャンピロバクター・ラニエナエ (*Campylobacter lanienae*) 株RM8001、キャンピロバクター・ラニエナエ (*Campylobacter lanienae*) 株P0121、ツリシモナス・ムリス (*Turicimonas muris*)、レジオネラ・ロンジニエンシス (*Legionella londinensis*)、サリニビプリオ・シャルメンシス (*Salinivibrio sharmensis*)、レプトスピラ属種 (*Leptospira* sp.) 分離株FW.030、モリテラ属種 (*Moritella* sp.) 分離株NORP46、エンドゾイコモナス属種 (*Endoz* 50

o i c o m o n a s) S - B 4 - 1 U 、 タミルナドウイバクター・サリナス (T a m i l n a d u i b a c t e r s a l i n u s) 、 ビブリオ・ナトリエゲンス (V i b r i o n a t r i e g e n s) 、 アルコバクター・スキロウイイ (A r c o b a c t e r s k i r r o w i i) 、 フランシセラ・フィロミラギア (F r a n c i s e l l a p h i l o m i r a g i a) 、 フランシセラ・ヒスピニエンシス (F r a n c i s e l l a h i s p a n i e n s i s) 、 またはパレンドゾイコモナス・ハリクロナエ (P a r e n d o z o i c o m o n a s h a l i c l o n a e) に由来し得る。

【 0 0 8 8 】

C a s タンパク質またはRNAガイド型ニッカーゼは、当技術分野で公知の方法により、組換え融合ポリペプチドとして、例えば、グルタチオン-s-トランスフェラーゼ (G S T) 、 6 x - H i s エピトープタグ、またはM 1 3 G e n e 3 タンパク質との融合タンパク質として得られ、好適な宿主細胞内で発現させることができる。あるいは、C a s タンパク質またはRNAガイド型ニッカーゼを、化学合成することも（例えば、C r e i g h t o n 、「 P r o t e i n s : S t r u c t u r e s a n d M o l e c u l a r P r i n c i p l e s 」、W . H . F r e e m a n & C o . 、 N Y 、 1 9 8 3 年を参照）、または本明細書に記載されるような組換えDNA技術によって作製することもできる。さらなる手引きについては、当業者は、F r e d e r i c k M . A u s u b e l ら、 C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s , 2 0 0 3 年；およびS a m b r o o k ら、「 M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l 」、C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y , 2 0 0 1 年）を参照することができ、それぞれのすべての内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【 0 0 8 9 】

別の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、化膿性連鎖球菌D 1 0 A 突然変異体 (C a s 9 (D 1 0 A)) 由来のヌクレアーゼ欠損ニッカーゼn C a s 9 である。別の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、ヌクレアーゼ欠損ニッカーゼn C a s 9 H 8 4 0 A 突然変異体である。別の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、一方のDNA鎖のみを切断するヌクレアーゼタンパク質である。一部の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、配列番号1 9 に記載された配列を含む。一部の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、配列番号1 9 に記載された配列からなる。

【 0 0 9 0 】

表1は、C a s 9 の例、およびそれに対応するP A M 要件の完全に網羅的ではないリストを列挙する。また、R a u c h ら、P r o g r a m m a b l e R N A - G u i d e d R N A E f f e c t o r P r o t e i n s B u i l t f r o m H u m a n P a r t s . C e l l 1 7 8 卷、1号、2 7 2 0 1 9 年6月、1 2 2 ~ 1 3 4 ページ、e 1 2 に記載されているような合成C a s 代替物を使用することもでき、そのすべての内容は、参照により本明細書に組み入れられる。一部の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、本明細書に記載されるC a s タンパク質または合成C a s 代替物の機能的バリアントまたは断片である。機能的バリアントまたは断片は、C a s タンパク質または合成C a s 代替物と少なくとも約7 0 % (例えば、少なくとも約8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 %) の相同性を有する。

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

40

50

【表1】

表1.

種	PAM
化膿性連鎖球菌	NGG
streptococcus · agalactiae	NGG
黄色ブドウ球菌	NNGRRT
streptococcus · thermophilus	NNAGAAW
streptococcus · thermophilus	NGGNG
體膜球菌	NNNNGATT
streptococcus · thermophilus	NAAAAC
他の細菌種に由来する他のII型 CRISPR/Cas9システム	

10

20

30

40

50

【0092】

本開示の一部の態様では、上記の配列標的化構成要素は、(a) RNAガイド型ニッカーゼと、(b)ウラシルDNAグリコシラーゼ(UNG)阻害ペプチド(UGI)との融合物を含む。例えば、一部の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、1つまたは複数のUGIと融合されたCasタンパク質、例えば、Cas9タンパク質を含む。そのような融合タンパク質は、UGIドメインを含まない融合タンパク質と比較して、核酸編集効率の増加を示し得る。一部の実施形態では、UGIは、野生型UGI配列または以下のアミノ酸配列：タンパク質受託番号：sp | P14739 | UNGI_BPPB2：ウラシル-DNAグリコシラーゼ阻害剤(UGI)を有するものを含む。一部の実施形態では、UGIペプチドは、以下のアミノ酸配列：MTNLSDIIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKML(配列番号：5)を含む。他の一実施形態では、UGIペプチドは、配列番号：5に記載された配列からなる。

【0093】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるUGIタンパク質は、UGIの断片、およびUGIまたはUGI断片と相同なタンパク質を含む。例えば、一部の実施形態では、UGIは、上記のアミノ酸配列の断片を含む。一部の実施形態では、UGIは、上記のアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列、または上記のUGI配列に記載されたアミノ酸配列の断片と相同なアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、UGIもしくはUGIの断片、またはUGIもしくはUGI断片の相同体を含むタンパク質は、「UGIバリアント」と称される。UGIバリアントは、UGIまたはその断片と相同性を有する。例えば、UGIバリアントは、上記のUGI配列(配列番号5)であり得る野生型UGIと比較して、少なくとも約70%の配列同一性(例えば、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%)を含む。

【0094】

好適なUGIタンパク質およびヌクレオチド配列が本明細書で提供され、さらなる好適なUGI配列が当業者に公知であり、これらには、例えば、Wangら、Uracil-DNA glycosylase inhibitor gene of bacteriophage PBS2 encodes a binding proteins

pecific for uracil-DNA glycosylase. J Biol. Chem. 264: 1163~1171ページ(1989年); Lundquistら、Site-directed mutagenesis and characterization of uracil-DNA glycosylase inhibitor protein. Role of specific carboxylic amino acids in complex formation with Escherichia coli uracil-DNA glycosylase. J Biol. Chem. 272: 21408~21419ページ(1997年); Ravishankarら、X-ray analysis of a complex of Escherichia coli uracil DNA glycosylase (EcUDG) with a proteinaceous inhibitorにおいて公開されたものが含まれる。

【0095】

一実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、UGIと融合された化膿性連鎖球菌(D10A突然変異体)由来のヌクレアーゼ欠損ニッカーゼnCas9である。別の実施形態では、RNAガイド型ニッカーゼは、2つのUGIペプチド(本明細書ではnCas9-UGI-UGIと称する)と融合された化膿性連鎖球菌(D10A突然変異体)由来のヌクレアーゼ欠損ニッカーゼnCas9である。

【0096】

nCas9-UGI-UGI-配列番号195:

PKKKRKV DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKFKVL GNTDRHS IKNLIG ALL
 FD SGETAEATRLKRTARR YTRRKNR ICYLQE IFSNE MAKV DSSFFHRLE EFLVEED
 KKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK KLV DSTD KADLRLIYLA LAHMIKFRGH
 FLIEGDLNPDNSD VDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK AILSAR LSKSRRLEN L
 IAQLPGEKKNGLFGN LIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTY DDDLDNLLAQIG
 DQYADLFLAAKNLSDA ILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ
 QLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLV KLNREDLL
 RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNR EKIEKILTFRIPYYVGPLAR
 GNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS FIERMTNFDKNLPNEKVL PKHSL
 LY EYFTVYNE LT KVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVD LFKTNRKV TVKQLKEDYFK
 KIECFDSVEISGV EDRFN ASLGTYHDLLKIKD KDFLDNEENEDILEDIVLT LTFEDR
 EMIEERLKTYAHLFDDKVMQ LKRRRTG WGR LSRK LINGIRD KQSGK TILD FLKSD
 GFANRNF MQLIH DDSLTF KEDIQKAQVSGQGD S LHEHIANLAGSPA IKKG I LQTV KV
 VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKR IEEGI KELGS QILKEHP
 VENTQLQNEKLYLYLQNGRD MYV DQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDD SIDNKV
 LTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD
 KAGFIKRQLVETRQITKVAQILD S R MNTK YDENDKLIREVKVITLKS KL VSDFRKDF
 QFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYK VYDVRKMIAKSE
 QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETN GETGEIVWDKGRDFATVR
 KVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD WDPKKYGGFD SPTVAY
 SVL VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNP IDFLEAKGYKEVKKDLI I KLPK
 YSLFELENGRK RMLASAGELQKGNE LALPSKYVN FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQL
 FVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLT
 NLGAPAAFKYFD TIDRK RY TSTKEVLDATL IHQSITGLYETRIDLSQLGGD SGGSGG
 SGGSTNLSDII EKETGKQLV I QESI LMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENV
 MLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKM LSGGSGGSGG STNLSDII EKETGKQLV I Q
 ENKIKMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV

一部の実施形態では、CRISPRシステムの第1および第2のgRNA、ならびに塩基編集システムのRNA足場と相互作用することができるRNAガイド型ニッカーゼは、

10

20

30

40

50

単一分子であり、すなわち、同一のニッカーゼ分子が C R I S P R システムの第 1 および第 2 の g R N A と相互作用し、かつ塩基編集システムの R N A 足場と相互作用する。したがって、R N A ガイド型ニッカーゼは、第 1 の標的核酸配列の一方の鎖の切断と、第 2 / 第 3 / 第 4 の標的核酸配列の塩基編集とを同時に行う。

【 0 0 9 7 】

g R N A

C R I S P R - C a s システムは、さまざまな生物体の細胞においてゲノム編集を行うために使用してきた。このシステムの特異性は、標的 D N A とカスタム設計されたガイド R N A (g R N A) との間の塩基対形成によって規定される。ガイド R N A の塩基対形成特性を操作および調整することによって、標的配列中に P A M 配列が存在するという条件付きで、目的の任意の核酸配列を標的化することができる。したがって、外因性配列が組み込まれる第 1 の標的核酸配列または座位は、第 1 および第 2 の g R N A によって認識される P A M 配列によって挟まれた任意の座位である。

10

【 0 0 9 8 】

本開示の C R I S P R システムを使用して、外因性 D N A 配列を含むドナー核酸配列を、細胞の標的核酸配列、特に免疫細胞、T 細胞または i P S C に組み込むことができる。一部の実施形態では、外因性 D N A は、C A R 、T C R もしくは s c H L A - E 三量体をコードする配列を含むか、または治療用タンパク質をコードするか、またはゲノム中の点突然変異 / インデルを是正することができる。

20

【 0 0 9 9 】

本開示の一実施形態によれば、第 1 の標的核酸配列は、宿主細胞、特に T 細胞または i P S C への C A R 組込み部位を表す。上述したように、細胞の標的核酸配列に組み込もうとする C A R 遺伝子を、ウイルスベクターを使用して宿主細胞内に送達することができる。一部の実施形態では、細胞の標的核酸配列に組み込もうとする C A R 遺伝子を、A A V を使用して宿主細胞内に送達することができる。一部の実施形態では、A A V は A A V 6 である。

20

【 0 1 0 0 】

本開示の一実施形態によれば、第 1 の標的核酸配列は、宿主細胞、特に T 細胞または i P S C への T C R 組込み部位を表す。上述したように、細胞の標的核酸配列に組み込もうとする C A R 遺伝子を、ウイルスベクターを使用して宿主細胞内に送達することができる。一部の実施形態では、細胞の標的核酸配列に組み込もうとする T C R 遺伝子を、A A V を使用して宿主細胞内に送達することができる。一部の実施形態では、A A V は A A V 6 である。

30

【 0 1 0 1 】

本開示の一実施形態によれば、第 1 の標的核酸配列は、宿主細胞、特に T 細胞または i P S C への s c H L A - E 三量体組込み部位を表す。上述したように、細胞の標的核酸配列に組み込もうとする s c H L A - E 三量体遺伝子を、ウイルスベクターを使用して宿主細胞内に送達することができる。一部の実施形態では、細胞の標的核酸配列に組み込もうとする s c H L A - E 三量体遺伝子を、A A V を使用して宿主細胞内に送達することができる。一部の実施形態では、A A V は A A V 6 である。

40

【 0 1 0 2 】

I I 型 C R I S P R システムについては、g R N A の 2 つの構成要素は c r R N A および t r a c r R N A であり、これらは一緒にになって配列の標的化および認識のための C R I S P R / C a s ベースのモジュールを形成する。c r R N A は標的特異性を提供し、あらかじめ選択された目的の標的部位 (ガイド R N A 配列) に対して相補的であってそれとハイブリダイズすることができる領域を含む。t r a c r R N A は、C a s タンパク質と相互作用する g R N A の領域である。

【 0 1 0 3 】

さまざまな一実施形態では、c r R N A は、約 1 0 ヌクレオチドから約 2 5 を上回るヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ガイド配列と対応する標的部位配列 (c r R N

50

A)との間の塩基対形成の領域は、約 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25 ヌクレオチド長、または 25 ヌクレオチド長を上回る。例示的な一実施形態では、c r R N A は、約 17 ~ 20 ヌクレオチド長、例えば、20 ヌクレオチドである。

【 0 1 0 4 】

g R N A の t r a c r R N A 構成要素は、C a s タンパク質に特異的に結合し、C a s タンパク質を標的 D N A または R N A 配列に導く。一部の実施形態では、t r a c r R N A は化膿性連鎖球菌由来である。一部の実施形態では、t r a c r R N A は、約 10 ヌクレオチドから約 50 ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、t r a c r R N A は、約 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25、30、35、40、45 ヌクレオチド長、または 50 を上回るヌクレオチド長である。

【 0 1 0 5 】

好適な標的核酸を選択するための 1 つの要件は、それが 3' プロトスペーサー 隣接モチーフ (P A M) 部位 / 配列を有することである。各標的配列およびその対応する P A M 部位 / 配列は、本明細書では C a s 標的部位と称される。最も詳細に特徴付けられているシステムの 1 つである I I 型 C R I S P R システムは、C a s 9 タンパク質、および標的配列に対して相補的な c r R N A のみを、標的切断を起こすために必要とする。一例として、化膿性連鎖球菌の I I 型 C R I S P R システムは、N 1 2 - 2 0 N G G を有する標的部位を使用するが、ここで N G G は化膿性連鎖球菌由来の P A M 部位を表し、N 1 2 - 2 0 は P A M 部位のすぐ 5' 側に位置する 1 2 ~ 2 0 ヌクレオチドを表す。他の細菌種に由来する他の P A M 部位配列の例には、N G G N G 、 N N N N G A T T 、 N N A G A A 、 N N A G A A W および N A A A A C が含まれるが、これらに限定されない。例えば、U S 2 0 1 4 0 2 7 3 2 3 3 、 W O 2 0 1 3 1 7 6 7 7 2 、 C o n g ら、(2 0 1 2 年) 、 S c i e n c e 3 3 9 (6 1 2 1) : 8 1 9 ~ 8 2 3 ページ、 J i n e k ら、(2 0 1 2 年) 、 S c i e n c e 3 3 7 (6 0 9 6) : 8 1 6 ~ 8 2 1 ページ、 M a l i ら、(2 0 1 3 年) 、 S c i e n c e 3 3 9 (6 1 2 1) : 8 2 3 ~ 8 2 6 ページ、 G a s i u n a s ら、(2 0 1 2 年) 、 P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 1 0 9 (3 9) : E 2 5 7 9 ~ E 2 5 8 6 ページ、 C h o ら、(2 0 1 3 年) N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 3 1 、 2 3 0 ~ 2 3 2 ページ、 H o u ら、 P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 2 0 1 3 年 9 月 2 4 ; 1 1 0 (3 9) : 1 5 6 4 4 ~ 9 ページ、 M o j i c a ら、 M i c r o b i o l o g y . 2 0 0 9 年 3 月 ; 1 5 5 (P t 3) : 7 3 3 ~ 4 0 ページ、および w w w . a d d g e n e . o r g / C R I S P R / を参照されたい。これらの文書の内容は、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。

【 0 1 0 6 】

一実施形態では、2 つ以上のニッカーゼ切断部位が必要とされる場合、P A M 部位はそれらが 20 ~ 2 0 0 b p 隔たっているように設計される。他の実施形態では、2 つ以上のニッカーゼ切断部位が必要とされる場合、P A M 部位はそれらが 40 および 70 b p 隔たっているように設計される。一部の実施形態では、2 つ以上のニッカーゼ切断部位が必要とされる場合、P A M 部位は外側にある(「 P A M - o u t 」構成として公知である)。

【 0 1 0 7 】

一部の実施形態では、標的核酸は、s s D N A 、 d s D N A 、 s s R N A または d s R N A である。一部の実施形態では、標的核酸は、宿主細胞における二本鎖核酸上の 2 つの鎖のうちのいずれかである。一部の実施形態では、標的核酸は、一本鎖核酸である。標的核酸の例には、ゲノム D N A 、宿主細胞染色体、ミトコンドリア D N A 、または安定に維持されるプラスミドが含まれるが、これらに限定されない。しかし、本方法は、宿主細胞 d s D N A の性質にかかわらず、C a s 標的部位が存在する限り、宿主細胞内に存在する他の標的核酸、例えば、不安定なプラスミド D N A 、ウイルス D N A 、およびファージミド D N A に対して実施され得ることが理解されるべきである。本方法は、R N A に対して

10

20

30

40

50

も実施することができる。

【0108】

一部の実施形態では、gRNAは、天然のcrrRNA:tracrRNA二重鎖を模倣する、上記のcrrRNAがtracrRNAと融合されたハイブリッドRNA分子である。本明細書で使用される場合、tracrRNAの活性部分は、Casタンパク質、例えば、Cas9またはdCas9またはnCas9と複合体を形成する能力を保持する。例えば、WO 2014144592を参照されたい。crrRNA-tracrRNAハイブリッドRNA（単一ガイドRNAまたはsgRNAとしても公知である）を生成する方法は、当技術分野で公知である。crrRNAおよびtracrRNAが単一のgRNA（sgRNA）として提供される実施形態では、2つの構成要素は典型的には、テトラループ（リピート：アンチリピートとも呼ばれる）を介して互いに連結される。例えば、WO 2014099750、US 20140179006、およびUS 20140273226を参照されたい。これらの文書の内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0109】

一部の実施形態では、本明細書における方法に使用されるgRNAは、化学合成されたRNA分子として細胞に導入することができる。gRNAは、本明細書の以下に記載されるような1つまたは複数の修飾を含むことができる。例えば、ガイドRNA配列は、ガイドRNA配列の少なくとも1つの5'スクレオチドおよび/または少なくとも1つの3'スクレオチド上に2'-(9-メチルホスホルチオエート)修飾を含むように化学的に修飾することができる。gRNAは、単一分子（sgRNA）として合成することも、または2つの別個の構成要素として合成もしくは発現させることもでき、必要に応じて、第1の構成要素は（a）crrRNAを含み、第2の構成要素は（b）tracrRNAを含む。続いて、2つの構成要素を、細胞に導入する前にハイブリダイズさせることができる。

【0110】

本開示の第1の態様によれば、本方法は、第1のgRNAおよび第2のgRNAを使用する。これらは同時に機能して、RNAガイド型ニッカーゼを標的DNA部位の反対鎖に誘導して、（交互の）DSBを生じさせる。このため、第1および第2のgRNAの設計により、DSBの正確な位置が規定される。DSBの位置およびドナー核酸の相同性アームの設計は、ドナー配列の組込みの正確な位置に影響を及ぼす。

【0111】

本開示はまた、複数の遺伝子改変を細胞に行うための方法であって、a)第1の標的核酸配列に外因性配列を組み込むためのCRISPRシステムであって、第1の標的核酸配列の反対鎖に対して相補的な第1のsgRNAおよび第2のsgRNAと、外因性配列を含むドナー核酸配列とを含むCRISPRシステム、ならびに第2の標的核酸配列に遺伝子改変を導入するための塩基編集システムであって、第2の標的核酸配列に対して相補的であるガイドRNA配列と、動員RNAモチーフとを含むRNA足場、および動員RNAモチーフに結合することができるRNA結合ドメインと、塩基修飾酵素を含むエフェクタードメインとを含むエフェクター融合タンパク質を含む塩基編集システム、ならびにCRISPRシステムの第1および第2のsgRNA、ならびに塩基編集システムのRNA足場と相互作用することができる単一のRNAガイド型ニッカーゼを細胞内に導入すること、ならびに/または細胞内で発現させること、ならびに細胞を培養して、複数の遺伝子改変を含む細胞を作製することを含む方法も提供する。

【0112】

一実施形態では、第1のgRNAおよび第2のgRNAは、第1の標的核酸配列の反対鎖に結合する。

【0113】

一実施形態では、外因性配列は、TRAC座位に組み込まれる。別の実施形態では、CARコード配列は、TRAC座位に組み込まれる。一実施形態では、外因性配列は、B2M座位に組み込まれる。別の実施形態では、CARコード配列は、B2M座位に組み込まれる。

10

20

30

40

50

れる。一実施形態では、外因性配列は、P D C D 1 座位に組み込まれる。別の実施形態では、C A R コード配列は、P D C D 1 座位に組み込まれる。一実施形態では、外因性配列は、T R B C 2 座位に組み込まれる。別の実施形態では、C A R コード配列は、T R B C 2 座位に組み込まれる。一実施形態では、外因性配列は、T R B C 1 座位に組み込まれる。別の実施形態では、C A R コード配列は、T R B C 1 座位に組み込まれる。一実施形態では、外因性配列は、T R B C 1 / 2 座位に組み込まれる。別の実施形態では、C A R コード配列は、T R B C 1 / 2 座位に組み込まれる。一実施形態では、外因性配列は、C D 5 2 座位に組み込まれる。別の実施形態では、C A R コード配列は、C D 5 2 座位に組み込まれる。一実施形態では、外因性配列は、C I S H 座位に組み込まれる。別の実施形態では、C A R コード配列は、C I S H 座位に組み込まれる。

10

【 0 1 1 4 】

別の実施形態では、外因性配列の発現は、それが組み入れられる座位の内因性プロモーターによって駆動される。別の実施形態では、外因性配列の発現は、それ自体のプロモーターによって駆動される。別の実施形態では、C A R 発現は、T R A C 内因性プロモーターによって駆動される。別の実施形態では、C A R 発現は、それ自体のプロモーターによって駆動される。

【 0 1 1 5 】

図 3 は、好適な C D 1 9 C A R 送達戦略の一例の概略図を示す。この例では、C A R をコードする配列が、T R A C 座位のエクソン 1 中に、上流の T R A C 座位とインフレームに、T 細胞受容体アルファ鎖可変領域の膜貫通ドメインの前に挿入された。A A V 6 ベクター中の C A R をコードする配列は、T R A C エクソン 1 中の二重ニックの左および右の配列に隣接して、左相同性アーム (L H A) および右相同性アーム (R H A) によって挟まれた。ブタテッショウウイルス - 1 由来の 2 A ペプチド (P 2 A) が、T 細胞受容体アルファ鎖可変領域からの干渉を避けるために導入された。典型的には、2 A ペプチドはおよそ 20 アミノ酸を有し、「自己切断」は最後の 2 アミノ酸であるグリシン (G) とプロリン (P) との間で起こる。

20

【 0 1 1 6 】

本開示は、複数の塩基編集システムを含む追加のモジュール構成要素をさらに含むことができる。複数のモジュールが使用される場合、各ガイド R N A 配列は、複数の核酸部位の編集を可能にするユニークな配列に対して相補的である。本モジュールシステムは、複数の座位（例えば、2 ~ 10 個）を標的とするためのツールを提供し、その結果、複数の遺伝子を同時にまたは逐次的にノックアウトすることができる。

30

【 0 1 1 7 】

したがって、本開示の方法はモジュールシステムを使用することができ、ここで各モジュールは、第 2 のまたはさらなる標的核酸配列に遺伝子変更を導入するための塩基編集システム、すなわち、異なる標的核酸配列に結合して、複数の異なる遺伝子座を遺伝子変更することができる複数の塩基編集システムを含む。本モジュールシステムに存在する各モジュールは、

40

- a) i) 第 2 のまたはさらなる標的核酸配列に対して相補的なガイド R N A 配列と、
i i) 動員 R N A モチーフとを含む

R N A 足場、および

- b) i) 動員 R N A モチーフに結合することができる R N A 結合ドメインを含むエフェクター融合タンパク質
を含む。

【 0 1 1 8 】

第 2 のまたはさらなる標的核酸配列は、第 1 の標的核酸配列とは別個である。

【 0 1 1 9 】

R N A 足場は、さらに、R N A ガイド型ニッカーゼに結合することができる t r a c r R N A を含み得る。

【 0 1 2 0 】

50

本明細書で提供されるデータは、本開示のシステムを、Casタンパク質とエフェクタータンパク質（例えば、デアミナーゼ）との直接融合を使用する別の塩基編集システム（本明細書では代替的融合シチジン塩基編集（CBE）システムと称される）と比較する。本開示のシステムのモジュール設計は、柔軟なシステムエンジニアリングを可能にする。モジュールは互換的であり、異なるモジュールの多くの組合せは、RNA足場のヌクレオチド配列を単に交換することによって達成することができる。一方、配列標的化ユニットのタンパク質構成要素との直接融合または直接相互作用によるエフェクターの動員は、新たな融合タンパク質のリエンジニアリングを常に必要とし、これは技術的により困難であり、結果を予測しにくい。本明細書に記載のシステムは、二本鎖切断活性を欠くCas9のDNA標的化能力を利用するため開発された塩基編集（BE）法に基づいており、DNA/RNAシチジンデアミナーゼのAPOBECファミリーの酵素メンバーであるAPOBEC-1などのデアミナーゼのDNA編集能力と組み合わされている。デアミナーゼエフェクターを、二本鎖切断活性を欠くCasタンパク質、例えば、dCas9またはnCas9タンパク質と直接融合させることにより、塩基エディターと称されるこれらのツールは、DSBを生成することなく、またHDR活性も必要とせずに、ゲノムDNAまたはRNAに標的化点突然変異を導入することができる。本質的に、本BEシステムは、二本鎖切断活性を欠くCRISPR/Cas9複合体をDNA標的化機構として利用しており、ここで突然変異型Cas9は、直接的なタンパク質-タンパク質融合を通してシチジンまたはアデニンデアミナーゼを動員するためのアンカーとして機能する。GB2015204.7およびGB2010692.8（そのすべての内容は、参照により本明細書に組み入れられる）に以前に記載され、本明細書で使用されるように、CRISPR/Cas9複合体のRNA構成要素（足場）は、RNAモチーフ（アプタマー）をRNA分子に含めることによって、エフェクター動員のためのアンカーとして機能する。RNAアプタマーは、RNAアプタマーリガンドと融合されたエフェクター、例えば、塩基編集酵素を動員する。

10

20

30

40

【0121】

本明細書で提供される方法は、免疫細胞における異なる遺伝子を標的として、例えば、所望の塩基変化および/またはその後のタンパク質の表現型喪失をもたらす遺伝子改変を導入することができる。標的化され得る遺伝子の例には、以下の遺伝子、TRAC、TRBC1、TRBC2、PDCD1、CD52、CISH、CITA、およびB2Mのいずれかが含まれるが、これらに限定されない。本方法を使用して、細胞における標的遺伝子の一方または両方のアレルを編集することができる。本明細書で提供される方法を使用して、複数の異なる遺伝子を編集して（多重塩基編集）、標的遺伝子の一方または両方のアレルを首尾よく編集することができる。例えば、異なるガイドRNA配列を含む複数のRNA足場を本方法に使用して、複数の異なる遺伝子座（例えば、2~10個）の遺伝子改変（塩基編集）することができる。有利なことに、本システムを使用して、複数の遺伝子の塩基編集を行って、例えば、標的遺伝子の一方または両方のアレルに点突然変異を導入することによって、機能的ノックアウトを生じさせることと、細胞に外因性配列を導入することとを同時にできることが、本明細書で示されている。

【0122】

RNA足場

RNA足場は、単一のRNA分子であるか、または複数のRNA分子の複合体の一部であるかのいずれでもあり得る。例えば、crrRNA、必要に応じてtracrRNA、および動員RNAモチーフは、1つの長い単一のRNA分子の3つのセグメントであり得る。あるいは、それらのうちの1つ、2つ、または3つが、別々の分子にあってもよい。後者の場合、3つの構成要素を一緒に連結して、例えば、ワトソン-クリック塩基対形成を含む、共有結合性または非共有結合性の連結または結合を介して足場を形成することができる。

【0123】

一実施形態では、RNA足場は、2つの別々のRNA分子を含む。第1のRNA分子は

50

、プログラム可能なc r R N Aと、相補的領域を有するステム二重鎖構造を形成することができる領域とを含み得る。第2のR N A分子は、t r a c r R N AおよびR N Aモチーフに加えて、相補的領域を含むことができる。このステム二重鎖構造を介して、第1および第2のR N A分子は、本開示のR N A足場を形成する。一実施形態では、第1および第2のR N A分子はそれぞれ、他の配列と塩基対形成する配列（約6～約20ヌクレオチドのもの）を含む。一部の実施形態では、t r a c r R N AおよびR N Aモチーフは、異なるR N A分子上に存在し、別のステム二本鎖構造と一緒にすることもできる。一部の実施形態では、c r R N Aおよびt r a c r R N Aは、単一のR N A分子の一部である。

【0124】

本開示のR N Aおよび関連する足場は、細胞ベースの発現、i n v i t r o 転写、および化学合成を含む、当技術分野で公知のさまざまな方法によって作製することができる。T C - R N A化学（例えば、米国特許第8,202,983号を参照）を使用して比較的長いR N A（200merまたはそれ以上の長さ）を化学的に合成する能力は、基本的な4つのリボヌクレオチド（A、C、G、およびU）によって可能であるものよりも優れた特別な特徴を有するR N Aを作製することを可能にする。

【0125】

C a sタンパク質 - ガイドR N A足場複合体は、当技術分野で公知の宿主細胞系またはインビトロ翻訳 - 転写系を使用する組換え技術によって作製することができる。そのようなシステムおよび技術の詳細は、例えば、W O 2 0 1 4 1 4 4 7 6 1、W O 2 0 1 4 1 4 4 5 9 2、W O 2 0 1 3 1 7 6 7 7 2、U S 2 0 1 4 0 2 7 3 2 2 6、およびU S 2 0 1 4 0 2 7 3 2 3 3に見出すことができ、これらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。本複合体は、細胞の細胞材料またはそれらが產生されるインビトロ翻訳 - 転写系から、少なくともある程度は、単離または精製することができる。

【0126】

R N Aモチーフ

本明細書で提供される塩基編集システムおよび方法は、R N A足場媒介性のエフェクタータンパク質動員に基づく。より具体的には、本プラットフォームは、さまざまな動員R N Aモチーフ / R N A結合タンパク質の結合ペアを利用する。この目的のために、R N A足場は、R N A結合タンパク質（例えば、M S 2コートタンパク質、M C P）に特異的に結合するR N Aモチーフ（例えば、M S 2オペレーターモチーフ）が、g R N A - C R I S P R足場と連結されるように設計される。その結果、本明細書に開示されるプラットフォームのこのR N A足場構成要素は、設計されたR N A分子であり、これは特異的なD N A / R N A配列認識のためのc r R N A、および必要に応じてC a sタンパク質結合のためのC R I S P R R N Aモチーフ（t r a c r R N A）を含むガイドR N A配列を含む。R N A足場構成要素はまた、エフェクター動員のためのR N Aモチーフ（動員R N Aモチーフとも称される）を含む。このようにして、エフェクタータンパク質融合物は、R N Aモチーフへの結合能力を通してその部位に動員され得る。本明細書で提供される方法およびシステムに使用され得ると考えられる動員R N Aモチーフ / R N A結合タンパク質対の例の完全に網羅的ではないリストを、表2にまとめる。一部の実施形態では、動員R N AモチーフはR N Aアプタマーであり、R N A結合タンパク質はアプタマー結合タンパク質である。一部の実施形態では、動員R N AモチーフはM S 2ファージオペレーターステム - ループであり、R N A結合タンパク質はM S 2コートタンパク質（M C P）である。

【0127】

当業者には明らかであろうが、R N Aモチーフおよびその結合パートナーの化学的に修飾されたバージョンおよび / または配列バリエントを利用することもできる。R N Aモチーフ / R N A結合タンパク質ペアを動員するさらなる例は、例えば、Pumpens Pら、I n t e r v i r o l o g y ; 2 0 1 6 年 ; 5 9 : 7 4 ~ 1 1 0 ページ、およびT a r s K. (2 0 2 0 年) ; B i o c o m m u n i c a t i o n o f P h a g e s , 2 6 1 ~ 2 9 2 ページに見出すことができ、これらの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 8 】

【 表 2 】

表 2. 本開示とともに使用することができる動員 RNA モチーフ、ならびにそれらと対形成する RNA 結合タンパク質/タンパク質ドメインの例。

RNA モチーフ	対形成する相互作用	配列番号	生物
	タンパク質*		
テロメラーゼ Ku 結合モチーフ	Ku	6~8	酵母
テロメラーゼ Sm7 結合モチーフ	Sm7	9~10	酵母
MS2 ファージオペレーターステム-ループ	MS2 コートタンパク質(MCP)	11~12	ファージ
PP7 ファージオペレーターステム-ループ	PP7 コートタンパク質(PCP)	13~14	ファージ
SfMu ファージ Com ステム-ループ	Com RNA 結合タンパク質	15~16	ファージ
非天然 RNA アプタマー	対応するアプタマーリガンド		人工的に設計

*動員されたタンパク質は、エフェクタータンパク質に融合され、これについては例えば、表 3 を参照されたい。

20

【 0 1 2 9 】

上記の結合ペアの配列を以下に列挙する。

【 0 1 3 0 】

1. テロメラーゼ Ku 結合モチーフ / Ku へテロ二量体

a. Ku 結合ヘアピン

5'-UUCUUGUCGUACUUUAAGAUCGUACGUUAUUCAUUUUGAAAAUCUGAGU
CCUGGGAGUGCGGA-3' (配列番号 6)

b. Ku へテロ二量体

MSGWESYYKTEGDEEAEEEQEEENLEASG DYKYSGRDSLIFLVDASKAMFESQSEDEL
TPFDMSIQCIQS VYISKIIS SDR DLLAVV FYGTEKDKNSVNFKNIYVLQELDNP GAKRI
LELDQFKGQQGQKRFQDM MGHS DYSLSEVLWVCANLFSDVQFKMSHKRIMLFTN
EDNPHGNDSAKASRARTKAGDLRDTGIFLDLMHLKKPGGF DISLFYRDIISIAEDEDL
RVHFEESSKLEDLLRKVRAKETRKRALSR LKLKLNKDIVISVGIYNLVQKALKPPIK
LYRETNEPVKTKTRTFNTSTGGLLPSDTKRSQIYGSRQIILEKEETEELKRFDDPGL
MLMGFKPLVLLKKHHYL RPSLFVYPEESL VIGSSTLFSALLIKCLEKEVAALCRYTPR
RNIPPYFVALVPQEEELDDQKIQVT PPGFQLVFLPFADDKRKMPFTEKIMATPEQVG
KMKAIKEVLRFTYRSDFENPVLQHQHFRNLEALALDLMEPEQAVDLTLPKVEAMNK
RLGSLVDEFKELVYPPDYNPEGKVTKRKHDNEGSGSKRPKVEYSEEELKTHISKGTL
GKFTVPM LKEACRAYGLKSGLKKQELLEALTKHFQD (配列番号 7)

30

MVRSGNKA AVVLCMDVGFTMSNSIPGIESPFEQAKKVITMFVQRQVFAENKDEIALV
LFGTDGTDNPLSGGDQYQNI TVHRHLMPDFDLLEDIESKIQPGSQQADFLDALIVS
MDVIQHETIGKKFEKRHIEIFTD LSSRFSKSQLDIIHSLKKCDISERHSIHWPCRLTIG
SNLSIRIAAYKSILQERVKKTWTVVDAKTLKKEDIQKETVYCLNDDDETEVLKEDIIQ
GFRYGS DIVPFSKVDEEQMKYKSEGKCF SVLGFCCKSSQVQRRFFMGNQVLKVFAARD
DEAAAVALSSLIHALDDLMVAIVRYAYDKRANPQVGVAFPHIKHNYECLVYVQLP
F MEDLRQYMFSSLKNSKKYAPTEAQLNAVDALIDMSLAKKDEKTDTLEDLFPTTKI
PNPRFQRLFQCLLHRALHPREPLPPIQQHIWNMLNPPAEVTTKSQIPLSKIKTLFPLI
EAKKKDQVTAQEIFQDNHEDGPTAK (配列番号 8)

40

2. テロメラーゼ Sm7 結合モチーフ / Sm7 へモヘアピン

50

a . S m コンセンサス部位 (一本鎖)

5'-AAUUUUUGGA-3' (配列番号 9)

b . 单量体 S m 様タンパク質 (古細菌)

GSVIDVSSQRVNVQRPLDALGNLSNSPVIKLKGDRFRGVVLKSFDLHMNLVLNDAE
ELEDGEVTRRLGTVLIRGDNIVYISP (配列番号 10)

3 . M S 2 ファージオペレーターステムループ / M S 2 コートタンパク質

a . M S 2 ファージオペレーターステムループ

5'-GCGCACAUAGAGGAUCACCAUAGUGC-3' (配列番号 11)

b . M S 2 コートタンパク質

MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGIAEWISSLNSRSQAYKVTCSVRQSSAQN
RKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNIPIPSAIAANS
GIY (配列番号 12)

4 . P P 7 ファージオペレーターステムループ / P P 7 コートタンパク質

a . P P 7 ファージオペレーターステムループ

5'-aUAAGGAGUUUAUAGGAACCUUA-3' (配列番号 13)

b . P P 7 コートタンパク質 (P C P)

MSKTIIVLSVGEATRTLTIQSTADQRQIFEEKVGPLVGRRLTASLRQNGAKTAYRVNL
KLDQADVVDCSTSVCGELPKVRYTQVWSHDVTIVANSTEASRKSLYDLTKSLVATSQ
VEDLVVNLVPLGR. (配列番号 14)

5 . S f M u C o m ステムループ / S f M u C o m 結合タンパク質

a . S f M u C o m ステムループ

5'-CUGAAUGCCUGCGAGCAUC-3' (配列番号 15)

b . S f M u C o m 結合タンパク質

MKSIRCKNCNKLLFKADSFHDIEIRCPRCKRHIIMLNACEHPTEKHCGKREKITHSDE
TVRY (配列番号 16)

R N A モチーフは、R N A 足場のさまざまな位置に位置し得る。一部の実施形態では、R N A モチーフは、ガイドR N A の3'末端、特に、t r a c r R N A の3'末端（存在する場合）、g R N A のテトラループ、t r a c r R N A のステムループ2（存在する場合）、またはt r a c r R N A のステムループ3（存在する場合）に位置する。一部の実施形態では、M S 2 アプタマーは、g R N A の3'末端に位置する。特に、M S 2 アプタマーは、t r a c r R N A の3'末端（存在する場合）、g R N A のテトラループ、t r a c r R N A のステムループ2（存在する場合）、およびt r a c r R N A のステムループ3（存在する場合）に位置することができる。R N A モチーフ（例えば、M S 2 アプタマー）の位置付けは、かさ高いループから生じ得る立体障害の点から極めて重要である。一部の実施形態では、M S 2 アプタマーはg R N A の3'末端にある。有利なことに、g R N A の3'末端におけるM S 2 アプタマーの位置付けは、したがって、R N A 足場の他のかさ高いループとの立体障害を減少させている。

【 0 1 3 1 】

一部の実施形態では、動員R N A モチーフは、リンカー配列を介してガイドR N A（存在する場合には特にt r a c r R N A）と連結され得る。リンカー配列は、2、3、4、5、6、7ヌクレオチド、または7ヌクレオチドを上回るものであり得る。有利なことに、リンカー配列は、R N A 足場に柔軟性を提供する。リンカー配列は、G C リッチな配列であってもよい。

【 0 1 3 2 】

修飾を、動員R N A モチーフに対して行うことができる。特定の一実施形態では、M S 2 アプタマーへの修飾は、10位のアデニンの2-アミノプリン（2- A P）への置換である。有利なことに、置換は、より大きな親和性をもたらす高次構造変化を誘導する。

【 0 1 3 3 】

c r R N A および必要に応じてC R I S P R R N A モチーフ（t r a c r R N A）を含む核酸標的化モチーフまたはガイドR N A 配列は、単一のガイドR N A（s g R N A）

10

20

30

40

50

として提供することができる。一部の実施形態では、2つの構成要素（c r R N A および必要に応じてt r a c r R N A）は、「リピート：アンチリピート」または「テトラループ」を介して連結されている。リピート：アンチリピートの上部ステムは、ループの柔軟性、適正なフォールディングおよび安定性を高めるために伸長させることができる。テトラループは、2、3、4、5、6、7 b p、または7 b pを上回って伸長させることができる。

【0134】

一部の実施形態では、R N A 足場は、上記の修飾の1つまたは複数を有することができる。1つまたは複数の修飾は、R N A 足場の異なる構成要素上にあるもの、例えば、s g R N A のテトラループの伸長およびR N A モチーフの伸長であり得、またはR N A 足場の同じ構成要素上にあるもの、例えば、R N A モチーフの伸長およびR N A モチーフのスクレオチドの置換であり得る。一部の実施形態では、修飾は、2つ以上、3つ以上、4つ以上、または5つ以上のスクレオチドであってもよい。一実施形態では、修飾は、R N A モチーフの伸長であってもよく、および/または1つもしくは複数のスクレオチドの置換であってもよい。

10

【0135】

動員R N A モチーフの一例は、本明細書で使用される場合、M S 2 アプタマーである。M S 2 アプタマーは、M S 2 バクテリオファージコートタンパク質（M C P）に特異的に結合する。一実施形態では、M S 2 アプタマーは、野生型M S 2 アプタマー（配列番号：11）、突然変異型M S 2 アプタマーまたはそのバリアントである。別の実施形態では、M S 2 アプタマーは、C - 5 および/またはF - 5 突然変異を含む。一部の実施形態では、M S 2 アプタマーは、單一コピー（すなわち、1つのM S 2 アプタマー）または二重コピー（すなわち、2つのM S 2 アプタマー）であり得る。一部の実施形態では、R N A モチーフは、單一コピーR N A モチーフである。他の実施形態では、R N A モチーフは、1つまたは複数のコピーを含む。

20

【0136】

エフェクター融合タンパク質

エフェクター融合タンパク質は、動員R N A モチーフに結合することができるR N A 結合ドメインと、塩基修飾酵素を含むエフェクタードメインとの2つの構成要素を含む。一部の実施形態では、塩基修飾酵素は、シトシン脱アミノ活性、アデノシン脱アミノ活性、D N A メチルトランスフェラーゼ活性およびデメチラーゼ活性からなる群から選択される活性を有する。シトシンおよびシチジンという用語は、デアミナーゼおよび脱アミノ活性に関して互換的に使用され、アデニンおよびアデノシンという用語についても同様である。

30

【0137】

R N A 結合ドメイン

一部の実施形態では、R N A 結合ドメインは、C a s タンパク質（例えば、C a s 9）またはそのバリアント（例えば、d C a s 9 またはn C a s 9）のR N A 結合ドメインではない。好適なR N A 結合ドメインの例を、R N A モチーフ - R N A 結合ペアを含めて、表2に列挙している。R N A 足場媒介性動員の柔軟性が理由で、R N A 結合ドメインの機能性单量体、ならびに二量体、四量体、またはオリゴマーが、標的D N A またはR N A 配列の近くで比較的容易に形成され得る。

40

【0138】

エフェクタードメイン

エフェクタードメインまたはエフェクタータンパク質は、シチジンデアミナーゼ活性（例えば、A I D、A P O B E C 1、A P O B E C 3 G）またはアデノシンデアミナーゼ活性（例えば、A D A およびt a d A）またはD N A メチルトランスフェラーゼ活性（例えば、D n m t 1 およびD n m t 3 a）またはデメチラーゼ活性（例えば、T e t 1 およびT e t 2）を有する塩基修飾酵素を含む。一部の実施形態では、エフェクターは、例えば、D N A を編集するために修飾を必要とするA D A およびt a d A の場合に、D N A 編集

50

活性を誘導または改善するように修飾される。一部の実施形態では、塩基修飾酵素は、A I D、C D A、A P O B E C 1、A P O B E C 3 A、A P O B E C 3 B、A P O B E C 3 C、A P O B E C 3 D、A P O B E C 3 F、または他のA P O B E C ファミリー酵素の野生型または遺伝子操作されたバージョンである。

【0139】

一部の実施形態では、塩基修飾酵素は、シトシンデアミナーゼ、例えば、A P O B E C 1である。一部の実施形態では、塩基修飾酵素はA P O B E C 1であり、以下の配列番号17に記載された配列を含む：

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPEHFEVFFDPRELKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFYIARLYHHADPRNRQGLRDLISSLGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLK

エフェクタードメインは、R N A 結合ドメインと連結されて、エフェクター融合タンパク質を生み出す。これは、化学修飾、ペプチドリンカー、化学リンカー、共有結合もしくは非共有結合、もしくはタンパク質融合によるものであってもよく、または当業者に公知である任意の手段によるものであってもよい。連結は永続的または可逆的であり得る。例えば、米国特許第4 6 2 5 0 1 4号、同第5 0 5 7 3 0 1号および同第5 5 1 4 3 6 3号、米国特許出願第2 0 1 5 0 1 8 2 5 9 6号および同第2 0 1 0 0 0 6 3 2 5 8号、ならびにWO 2 0 1 2 1 4 2 5 1 5を参照されたい。これらの内容は、参照により全体として本明細書に組み入れられる。一部の実施形態では、エフェクタードメインは、ペプチドリンカーによってR N A 結合ドメインと連結される。

【0140】

一部の実施形態では、エフェクター融合タンパク質は、R N A 結合ドメインおよびエフェクタードメインとは別に、他のドメインを含むことができる。ある特定の実施形態では、エフェクター融合タンパク質は、少なくとも1つの核局在化シグナル(N L S)を含むことができる。一般に、N L Sは、塩基性アミノ酸の連鎖からなる。核局在化シグナルは当技術分野で公知である(例えば、Lang et al.、J. Biol. Chem.、2007年、282:5101~5105ページを参照、そのすべての内容は参照により本明細書に組み入れられる)。N L Sは、融合タンパク質のN末端、C末端、または内部位置に位置することができる。

【0141】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、タンパク質の標的細胞への送達を容易にするために、少なくとも1つの細胞透過性ドメインを含むことができる。一実施形態では、細胞透過性ドメインは、細胞透過性ペプチド配列であり得る。さまざまな細胞透過性ペプチド配列が当技術分野で公知であり、その例には、H I V - 1 T A T タンパク質、ヒトH B V のT L M、P e p - 1、V P 2 2、およびポリアルギニンペプチド配列が含まれる。

【0142】

さらに他の実施形態では、融合タンパク質は、少なくとも1つのマーカードメインを含むことができる。マーカードメインの非限定的な例には、蛍光タンパク質、精製タグ、およびエピトープタグが含まれる。一部の実施形態では、マーカードメインは蛍光タンパク質であり得る。他の実施形態では、マーカードメインは、精製タグおよび/またはエピトープタグであり得る。例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、U S 2 0 1 4 0 2 7 3 2 3 3を参照されたい。

【0143】

一実施形態では、A I Dは、エフェクタードメインとして、およびシステムがどのように動作するかを示すための例として使用される。A I Dは、D N A またはR N A との関連でシチジンの脱アミノ反応を触媒することができるシチジンデアミナーゼである。標的部位に運ばれると、A I DはC 塩基をU 塩基に変化させる。分裂細胞において、これはC からTへの点突然変異を招き得る。あるいは、C からUへの変化は、細胞のD N A 修復経路、主に除去修復経路を誘発する可能性があり、これはミスマッチ性のU - G 塩基対を除去

10

20

30

40

50

し、それを T - A、A - T、C - G または G - C 対に置き換える。その結果、標的 C - G 部位に点突然変異が生成されると考えられる。除去修復経路は、すべてではないにしてもほとんどの体細胞に存在するので、標的部位への A I D の動員により、C - G 塩基対を他のものに是正することができる。その場合、C - G 塩基対が体細胞組織 / 細胞における基礎疾患を引き起こす遺伝子突然変異である場合には、上記のアプローチを使用して、突然変異を是正し、それによって疾患を処置することができる。

【 0 1 4 4 】

別の実施形態では、A P O B E C が、エフェクタードメインとして、およびシステムがどのように動作するかを示すための例として使用される。A P O B E C は、D N A またはR N A との関連でシチジンの脱アミノ反応を触媒することができるシチジンデアミナーゼでもある。

10

【 0 1 4 5 】

別の実施形態では、アデノシンデアミナーゼをエフェクタードメインとして、およびシステムがどのように動作するかを示すための例として使用した。アデノシンデアミナーゼは、D N A またはR N A との関連でアデノシンの脱アミノ反応を触媒することができる。同じ理由で、遺伝子突然変異を引き起こす基礎疾患が特定の部位での A - T 塩基対である場合には、同じアプローチを使用して、アデノシンデアミナーゼを特定の部位に動員することができる、そこでアデノシンデアミナーゼは A - T 塩基対を他のものに是正することができる。例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、D a v i d L i u - U S 1 0 1 1 3 1 6 3 を参照されたい。他のエフェクター酵素は、塩基対形成において他の種類の変化を生じさせることが期待される。塩基修飾酵素の例の完全に網羅的ではない例を、表 3 に詳述する。

20

【 0 1 4 6 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるエフェクタータンパク質は、機能的バリアント、例えば、表 3 に記載されるようなエフェクタータンパク質の断片、および断片またはタンパク質と相同なタンパク質を含むことができる。機能的バリアントは、野生型エフェクタータンパク質と比較して、例えば、少なくとも約 70 % (例えば、少なくとも約 80 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %) のエフェクタータンパク質またはその断片との相同性を有すると考えられる。

30

【 0 1 4 7 】

40

50

【表3】

表3. 本開示に使用することができるエフェクタタンパク質の例

酵素の種類	遺伝子変化	エフェクタタンパク質の略称
		AID
		APOBEC1
		APOBEC3A
		APOBEC3B
		APOBEC3C
		APOBEC3D
		APOBEC3F
		APOBEC3G
		APOBEC3H
		CDA
シチジンデアミナーゼ	C→U/T	ADA
		ADAR1
		ADAR2
		ADAR3
		tadA
DNA メチルトランスフェラーゼ	C→Met-C	Dnmt1
		Dnmt3a
		Dnmt3b
デメチラーゼ	Met-C→ C	Tet1
		Tet2
		TDG

エフェクタタンパク質の正式名称:

AID: 活性化誘導シチジンデアミナーゼ、別名 AICDA

APOBEC1: アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 1

APOBEC3A: アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3A

APOBEC3B: アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3B

APOBEC3C: アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3C

APOBEC3D: アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3D

APOBEC3F: アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3F

APOBEC3G: アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3G

APOBEC3H: アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3H

ADA: アデノシンデアミナーゼ

ADAR1: RNA 1 に対して作用するアデノシンデアミナーゼ

ADAR2: RNA 2 に対して作用するアデノシンデアミナーゼ

ADAR3: RNA 3 に対して作用するアデノシンデアミナーゼ

CDA: シチジンデアミナーゼ

Dnmt1: DNA(シトシン-5-)-メチルトランスフェラーゼ 1

Dnmt3a: DNA(シトシン-5-)-メチルトランスフェラーゼ 3 アルファ

Dnmt3b: DNA(シトシン-5-)-メチルトランスフェラーゼ 3 ベータ

tadA: tRNA アデノシンデアミナーゼ

Tet1: 10-11 転座 1(ten-eleven translocation 1)

Tet2: 10-11 転座 2(ten-eleven translocation 2)

Tdg: チミン DNA グリコシラーゼ

【0 1 4 8】

上記の 3 つの特定の構成要素が、技術プラットフォームを構成する。各構成要素は、特定の治療 / 有用性の目標を達成するために、それぞれ表 1 ~ 3 のリストから選択することができる。

【0 1 4 9】

一実施形態では、RNA 足場媒介性動員システムを、(i) RNA ガイド型ニッカーゼとしての化膿性連鎖球菌由来の Cas9、dCas9 または nCas9、(ii) ガイド RNA 配列と、tracrRNA と、MS2 ファージオペレーターステム - ループを含む動員 RNA モチーフとを含む RNA 足場、および (iii) MS2 ファージオペレーター

10

20

30

40

50

ステム - ループ結合タンパク質 (M C P) と融合したヒト A I D を含むエフェクター融合タンパク質を使用して構築した。構成要素の配列を以下に列挙する。

【 0 1 5 0 】

化膿性連鎖球菌 d C a s 9 タンパク質配列 (配列番号 : 1 8)

【 0 1 5 1 】

【 化 1 】

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAETRLKRTA
 RRRYTRRKNRICYLQEIFSNEAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYH
 LRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFQLVQTYNQLFEENPINASG
 VDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDD 10
 DLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ
 QLPEKYKEIFFDQSCKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGS
 IPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRKREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNF
 EEVVDKGASAQSFIERNMTNFDKNLPNEVKLPKHSLLYEYFTVYNELTVKVYVTEGMRKPAFLSGEQ
 KKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENE
 DILEDIVLTTLFEDREMIERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRTGWRRLSRKLINGIRDKQSGKTILDF 20
 LKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKGILQTVKVVDELVK
 VMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL
 QNGRDMDYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY
 WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLI
 REVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYKVRINNNYHHAHDAYLNAVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYD
 VRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV
 LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKYGGFDSPVAYSVLVVAKVEKG
 KSKKLKSVKELLGITIMERSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ
 KGNEALPSKYVNFLYASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDK
 VLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYET
 RIDLSQLGGD

(下線を施した残基: D10A、H840A活性部位突然変異体)

30

20

30

30

40

50

【 0 1 5 2 】

C a s 9 D 1 0 A タンパク質 (下線を施した残基 : D 1 0 A 、 配列番号 1 9) (n C a s 9)

【 0 1 5 3 】

【化2】

DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
 RRYTRRKNRICYLQEIFSNEAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
 RKKLVDSTDKA DLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGV
 DAKA ILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGN LIALSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDD
 LDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDA ILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ
 LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLV KLNREDLLRKQRTFDNGSIP
 HQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEE
 VVDKGASAQS FIERMTNF DKNLPNEKVL PKHSLLYEYFTVYNE LTKV KYVTEGMRKPAFLSGEQKK
 AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGV EDRFNASL GTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDIL
 EDIVLT LTFEDREMIEERL KTYAHLFDDKVMKQLKRRRTG WGRLSRKLINGIRD KQSGKTI DFLK
 SDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVK VVDELVKV
 GRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQN
 GRD MYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMNYWR
 QLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE
 VKVITLKS KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAH DAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYK VYDVR
 KMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
 MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD WDPKKYGGFD SPTVAYS VLVVAKVEKGKS
 KKLKSVKELLGITIMERSSFEKNP IDFLEAKGYKEVKKDLI KLPKYS LFELENGRKRMLASAGELQKG
 NELALPSKYVN FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKV
 SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFD TIDRKRTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRID
 LSQLGGD

10

20

50

【0154】

Cas9 D10Aタンパク質をコードするDNA（配列番号20）

GATAAAAAGTATTCTATTGGTTAGCCATCGGCACTAATTCCGTTGGATGGGCTGT
 CATAACCGATGAATACAAAGTACCTTCAAAGAAATTAAAGGTGTTGGGAACACAG
 ACCGTCATTGATTAAGAATCTTATCGGTGCCCTCCTATTGATAGTGGCGAA
 ACGGCAGAGGCAGCTCGCTGAAACGAACCGCTCGGAGAAGGTATAACAGTCGCAA
 GAACCGAATATGTTACTTACAAGAAATTAGCAATGAGATGGCCAAAGTTGACG
 ATTCTTCTTCACCGTTGGAAAGAGTCCTCCTGTCGAAGAGGACAAGAACAT
 GAACGGCACCCATCTTGAAACATAGTAGATGAGGTGGCATATCATGAAAAGTA
 CCCAACGATTTATCACCTCAGAAAAAGCTAGTTGACTCAACTGATAAAGCGGACC
 TGAGGTTAATCTACTTGGCTCTGCCATATGATAAAGTTCCGTGGCACTTTCTCA
 TTGAGGGT GATCTAAATCCGGACA ACTCGGATGTCGACAAACTGTTCATCCAGTTA
 GTACAAACCTATAATCAGTTGTTGAAGAGAACCC TATAAATGCAAGTGGGTGGA
 TCGAAGGGTATTCTAGCGCCGCCTCTAAATCCGACGGCTAGAAAACCTGA
 TCGCACAAATTACCCGGAGAGAAGAAAAATGGGTTGTTCGGTACCTTATAGCGCTC
 TCACTAGGCCTGACACCAAATTAAAGTCGAACCTCGACTTAGCTGAAGATGCCA
 ATTG CAGCTTAGTAAGGACACGTACGATGACGATCTCGACAATCTACTGGCACAAA
 TTGGAGATCAGTATCGGACTTATTGGCTGCCAAAACCTTAGCGATGCAATC
 CTCCTATCTGACATACTGAGAGTTAATACTGAGATTACCAAGGGCCGTTATCGC
 TTCAATGATCAAAGGTACGATGAACATCACCAAGACTTGACACTTCTCAAGGCC
 TAGTCCGTCAGCAACTGCCTGAGAAATATAAGGAAATTCTTGTAGTCAGTC
 AACGGGTACGCAGGTTATATTGACGGCGGAGCGAGTCAAGAGGAATTCTACAAGTT
 TATCAAACCCATATTAGAGAAGATGGATGGGACGGAAGAGTTGCTGTAAAAC
 ATCGCGAAGATCTACTCGAAAGCAGCGGACTTCGACAAACGGTAGCATTCCAC
 CAAATCCACTTAGGCAGATTGCATGCTATACTTAGAAGGCAGGAGGATTTTATCC
 GTTCCCTCAAAGACAATCGTAAAAGATTGAGAAAATCCTAACCTTCGCATACCTT

30

40

50

ACTATGTGGGACCCCTGGCCCAGGGAACTCTCGGTTCGCATGGATGACAAGAAAG
 TCCGAAGAAACGATTACTCCATGGAATTGGAGGAAGTTGTCGATAAAGGTGCGTC
 AGCTCAATCGTTCATCGAGAGGATGACCAACTTGCAGTACAGTGTACAATGAAC
 AAGTATTGCCTAACGACAGTTACTTACGAGTACAGTGTACAATGAAC
 ACGAAAGTTAACGACTGTCAGTGGCATGCGAAACCGCCTTCTAACGCGAGA
 ACAGAAGAAAGCAATAGTAGATCTGTTATTCAAGACCAACCGCAAAGTGACAG
 AGCAATTGAAAGAGGACTACTTAAAGAAAATTGAATGCTCGATTCTGTCGAGATC
 TCCGGGGTAGAAGATCGATTTAACGTCAGTGGTACGTATCATGACCTCCTAAA
 GATAATTAAAGATAAGGACTTCCCTGGATAACGAAGAGAATGAAGATATCTTAGAAG
 ATATAGTGTGACTCTTACCCCTTTGAAGATCGGGAAATGATTGAGGAAAGACTA
 10 AAAACATACGCTCACCTGTTGACGATAAGGTTATGAAACAGTTAAAGAGGCGTCG
 CTATACGGCTGGGGACGATTGTCGCGGAAACTTATCAACGGATAAGAGACAAGC
 AAAGTGGTAAAACATTCTGATTTCCTAAAGAGCGACGGCTTCGCCAATAGGAAC
 TTTATGCAGCTGATCCATGATGACTCTTAAACCTCAAAGAGGATATACAAAAGGC
 ACAGGTTCCGGACAAGGGACTCATTGCACGAACATATTGCAATCTTGCTGGTT
 CGCCAGCCATCAAAAGGGCATACTCCAGACAGTCAAAGTAGTGGATGAGCTAGTT
 AAGGTCACTGGGACGTACAAACCGGAAACATTGTAATCGAGATGGCACGCGAAAA
 TCAAACGACTCAGAAGGGCAAAAAACAGTCGAGAGCGGATGAAGAGAATAGAAG
 AGGGTATTAAAGAACTGGGCAGCCAGATCTTAAAGGAGCATCCTGTGGAAAATACC
 20 CAATTGCAAGCAGAAACTTACCTCTATTACCTACAAATGGAAGGGACATGTA
 TGTTGATCAGGAACCTGGACATAAACCGTTATCTGATTACGACGTCGATCACATTG
 TACCCCAATCCTTTGAAGGACGATTCAATCGACAATAAAGTGCTTACACGCTCG
 GATAAGAACCGAGGGAAAGTGACAATGTTCCAAGCGAGGAAGTCGAAAGAAAAT
 GAAGAACTATTGGCGGCAGCTCTAAATGCGAAACTGATAACGCAAAGAAAAGTCG
 ATAACTTAACTAAAGCTGAGAGGGTGGCTGTGAACTTGACAAGGCCGGATT
 ATTAAACGTCAGCTCGTGGAAACCCGCAAATCACAAAGCATGTTGCACAGATACT
 AGATTCCCAGAATGAATACGAAATACGACGAGAACGATAAGCTGATTGGAAAGTCA
 AAGTAATCACTTAAAGTCAAAATTGGTGTGGACTTCAGAAAGGATTTCATTC
 TATAAAGTTAGGGAGATAAAACTACCAACCATGCGCACGACGCTTATCTTAAATGC
 CGTCGTAGGGACCGCACTCATTAAGAAATACCGAAGCTAGAAAGTGAGTTGTG
 30 ATGGTGTGATTACAAAGTTATGACGTCGTAAGATGATCGCGAAAAGCGAACAGGAG
 ATAGGCAAGGCTACGCCAAATACTCTTTATTCTAACATTATGAATTCTTAA
 GACGGAAATCACTCTGGCAAACGGAGAGAACGACCTTAAATTGAAACCCA
 ATGGGGAGACAGGTGAAATCGTATGGATAAGGGCGGGACTTCGCGACGGTGAGA
 AAAGTTTGTCCATGCCCAAGTCACATAGTAAAGAAAAGTGGTGCAGACCGG
 AGGGTTTCAAAGGAATCGATTCTCCAAAAGGAATAGTGATAAGCTCATCGCTC
 GTAAAAAGGACTGGGACCCGAAAAGTACGGTGGCTCGATAGCCCTACAGTGGC
 TATTCTGTCTAGTAGTGGCAAAGTTGAGAACGGAAAATCCAAGAAACTGAAGTC
 AGTCACAAAGAATTATTGGGATAACGATTATGGAGCGCTCGTCTTTGAAAAGAAC
 CCATCGACTTCCTTGAGGCAGGGTTACAAGGAAGTAAAAAGGATCTCATAATT
 40 AACTACCAAAGTATAGTCTGTTGAGTTAGAAAATGGCGAAAACGGATGTTGGC
 TAGGCCGGAGAGCTTCAAAAGGGAACGAACTCGCACTACCGTCTAAATACGTGA
 ATTTCCTGTATTAGCGTCCCATTACGAGAACGTTGAAAGGTTCACCTGAAGATAAC
 GAACAGAACGCAACTTTTGTGAGCAGCACAAACATTATCTCGACGAAATCATAGA
 GCAAATTCTGGAATTCAAGTAAGAGAGTCATCCTAGCTGATGCCAATCTGGACAAAG
 TATTAAGCGCATACAACAAGCACAGGGATAAACCCATACGTGAGCAGGCCGGAAAAT
 ATTATCCATTGTTACTCTTACCAACCTCGGCGCTCCAGCCGATTCAAGTATT
 GACACAAACGATAGATCGCAAACGATAACACTTCTACCAAGGAGGTGCTAGACGCGAC
 ACTGATTACCAATCCATCACGGGATTATGAAACTCGGATAGATTGTCACAGC
 TTGGGGGTGAC

20ヌクレオチドのプログラム可能な配列、tracrRNAモチーフ、およびMS2ファージオペレーターステムループモチーフを含むRNA足場発現カセット（化膿性連鎖球菌）（配列番号21）：

【0155】

【化3】

N₂₀GTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTG
GCACCGAGTCGGTGCACATGAGGATCACCCATGTGCTTTTTTG

（N₂₀：プログラム可能な配列：crRNA；下線：tracrRNAモチーフ；太字：動員RNAモチーフ—MS2モチーフ；斜体：ターミネーター）

10

【0156】

1つのMS2ループ（1×MS2）を含む上記のRNA足場。以下に示すのは、2つのMS2ループ（2×MS2）を含むRNA足場であり、ここでMS2足場には下線を施している：

【0157】

【化4】

N₂₀GTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTG
GCACCGAGTCGGTGCgggagcACATGAGGATCACCCATGT_{gccacgagcg}ACATGAGGATCACCCA
TGTcgctcggtcccTTTTTTCTCCGCT（配列番号22）

20

【0158】

エフェクターAID-MCP融合物を含むエフェクター融合タンパク質（配列番号：23）：

【0159】

【化5】

MDSLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDSATSFSLDGYLRNKGCHVELLFLRYIS
DWDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGNPNLSRIFTARLYFCEDRKAEP EGLRRLHR
AGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHENSVRLSRQLRILLPLYEVDDLRAFRTLGL
ELKTPLGDTTHTSPPCPAPELLGGPMASNFTQFVLVDNGTGDVTVAPSNFANGIAEWISSNSRS
QAYKVTCSVRQSSAQNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTIPATNSDCELIVKAMQGLLKDGNPIP
SAIAANSGIY

30

（NH₂）—AID—リンカー—MCP—（COOH）

【0160】

エフェクターAprobec1-MCP融合物を含むエフェクター融合タンパク質（配列番号24）：

【0161】

【化6】

MSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYEINWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFI
EKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFYIARLYHHADPRNRQGLRDLI
SSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNIRRKQPQ
LTFFTIALQSCHYQRLPPHILWATGLKE_{LKTPLGDTTHTSPPCPAPELLGGPMASNFTQFVLVDNG}
GTGDVTVAPSNFANGIAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSAQNRKYTIKVEVPKGAWRSYLNMELTI
PIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNPIPSAIAANSGIY

40

（NH₂）—Apobec1—リンカー—MCP—（COOH）

【0162】

本明細書に記載のCasタンパク質と同様に、このエフェクター融合タンパク質もまた、組換えポリペプチドとして得ることができる。組換えポリペプチドを作製するための手法は、当技術分野で公知である。例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み入れ

50

られる、Creighton、「Proteins: Structures and Molecular Principles」、W.H. Freeman & Co.、NY、1983年) ; Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、2003年; およびSambrookら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、NY、2001年を参照されたい。

【0163】

本明細書に記載されるように、AIDにおけるSer38をAlaに突然変異させることによって、オフターゲット部位へのAIDの動員を減少させることができる。以下に列挙するのは、野生型AID、ならびにAID_S38A(リン酸化ヌル、p_nAID)の両方のDNAおよびタンパク質配列である。

10

【0164】

wt AID cDNA(太字および下線部はSer38コドン、配列番号: 25):

【0165】

【化7】

ATGGACAGCCTCTTGATGAACCGGAGGAAGTTCTTACCAATTCAAAATGTCCGCTGGGC
TAAGGGTCGGCGTGAGACCTACCTGTGCTACGTAGTGAAGAGGCGTGACAGTGCTACATCCT
TTTCACTGGACTTGGTTATCTCGCAATAAGAACGGCTGCCACGTGGAATTGCTTTCCCTCC
GCTACATCTCGGACTGGACCTAGACCCTGGCCGCTGCTACCGCGTCACCTGGTTCACCTCC
TGGAGCCCCTGCTACGACTGTGCCGACATGTGGCCGACTTCTGCGAGGGAACCCAACCT
CAGTCTGAGGATCTCACCGCGCGCCTCTACTTCTGTGAGGACCGCAAGGCTGAGCCGAGG
GGCTGCGGCGGCTGCACCGCGCCGGGTGCAAATAGCCATCATGACCTCAAAGATTATTTT
TACTGCTGGAATACTTTGTAGAAAACCATGAAAGAACTTCAAAGCCTGGGAAGGGCTGCAT
GAAAATTCAAGTTCGTCTCTCCAGACAGCTCGGCGCATCCTTGCCCCGTATGAGGTTGAT
GACTTACGAGACGCATTCGTACTTGGGACTT

20

【0166】

wt AIDタンパク質(太字および下線部はSer38、配列番号: 26):

30

【0167】

【化8】

MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGYLRNKGCHVELLFLRYIS
DWLDLPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGNPNLSLRIFTARLYFCEDRKAEP EGLRRLHR
AGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHENSVRLSRQLRILLPLYEVDDLRAFRTLGL

【0168】

AID_S38A cDNA(太字および下線部はS38A突然変異、配列番号: 27):

【0169】

【化9】

ATGGACAGCCTCTTGATGAACCGGAGGAAGTTCTTACCAATTCAAAATGTCCGCTGGGC
TAAGGGTCGGCGTGAGACCTACCTGTGCTACGTAGTGAAGAGGCGTGACCGCCGCTACATCCT
TTTCACTGGACTTGGTTATCTCGCAATAAGAACGGCTGCCACGTGGAATTGCTTTCCCTCC
GCTACATCTCGGACTGGACCTAGACCCTGGCCGCTGCTACCGCGTCACCTGGTTCACCTCC
TGGAGCCCCTGCTACGACTGTGCCGACATGTGGCCGACTTCTGCGAGGGAACCCAACCT
CAGTCTGAGGATCTCACCGCGCGCCTCTACTTCTGTGAGGACCGCAAGGCTGAGCCGAGG
GGCTGCGGCGGCTGCACCGCGCCGGGTGCAAATAGCCATCATGACCTCAAAGATTATTTT
TACTGCTGGAATACTTTGTAGAAAACCATGAAAGAACTTCAAAGCCTGGGAAGGGCTGCAT
GAAAATTCAAGTTCGTCTCTCCAGACAGCTCGGCGCATCCTTGCCCCGTATGAGGTTGAT
GACTTACGAGACGCATTCGTACTTGGGACTT

40

50

【 0 1 7 0 】

A I D _ S 3 8 A タンパク質（太字および下線部は S 3 8 A 突然変異、配列番号： 2 8 ）

【 0 1 7 1 】

【 化 1 0 】

MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDAATSFSLDGYLRNKNGCHVELLFLRYIS
DWDLDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGNPNLRLIFTARLYFCEDRKAEP EGLRRLHR
AGVQIAIMTFKDYFYCWNTFVENHERTFKAWEGLHENSVRLSRQLRILLPLYEVDDLRAFRTLGL

【 0 1 7 2 】

本明細書に開示されるプラットフォーム / システムの上記の 3 つの構成要素は、1 つ、
2 つまたは 3 つの発現ベクターを使用して発現させることができる。本システムは、事実
上あらゆる D N A または R N A 配列を標的とするようにプログラムすることができる。上
記の第 2 世代の塩基エディターに加えて、任意の好適な C a s オルソログ、デアミナーゼ
オルソログ、および他の D N A 修飾酵素を含む、システムのモジュール構成要素を変化さ
せることによって、類似の第 2 世代の塩基エディターを生成させることができる。

【 0 1 7 3 】

一部の実施形態では、第 2 の標的核酸配列は、B 2 M および / または C D 5 2 である。
この実施形態では、本方法は 2 つのモジュールを含み、1 つは B 2 M 遺伝子を標的とし、
もう 1 つは C D 5 2 を標的とする。

【 0 1 7 4 】

本発明者らは、本明細書に記載のシステムが、代替的な融合 C B E システムと比較して
、遺伝子ノックインを生成するのに著しくより有効であることを示した（図 7 ）。同様に
、本開示による二重ニッキングによる遺伝子ノックアウトの効率は、代替的な融合 C B E
システムを使用した場合よりも 6 倍の高さである（図 7 ）。

【 0 1 7 5 】

また、本開示を使用して、（ i ）免疫細胞、例えば、T 細胞および N K 細胞のフラトリ
サイドに関与する遺伝子、または（ i i ）対象もしくは動物の免疫系に、外来性の細胞、
粒子もしくは分子が対象もしくは動物に侵入したことを警告する遺伝子、例えば、B 2 M
遺伝子、または（ i i i ）例えば、C D 5 2 および P D C D 1 遺伝子のような、免疫反応
を低下または増強するために使用される現行の治療標的であるタンパク質をコードする遺
伝子を、ノックアウトまたは改変することができる。例えば、C D 7 + 白血病（例えば、
A M L ）に対するキメラ抗原受容体（ C A R ） T 療法については、フラトリサイドを回避
するために C A R T 細胞が C D 7 を含まないように遺伝子改変する必要がある。

【 0 1 7 6 】

さまざまな実施形態では、本開示を使用して、哺乳動物由来の細胞を含むがこれらに限
定されないさまざまな種類の細胞または細胞株において、遺伝子のノックアウトを生成す
るか、または単一遺伝子もしくは複数遺伝子の発現を改変もしくは増加させることができる。
本システムおよび方法は、当技術分野で公知であるように、複数の遺伝子または同じ
遺伝子の内部の複数の標的を遺伝子改変することを含む、多重遺伝子改変に適用するこ
とができる。この技術は、非宿主細胞を宿主に対して非免疫原性にすることによって移植片
対宿主病を予防するための遺伝子のノックアウト、または非宿主細胞を宿主による攻撃に
対して抵抗性にすることによって宿主対移植片病を予防するための遺伝子のノックアウトを
含むがこれらに限定されない、多くの用途に使用することができる。これらのアプローチはまた、同種異系（汎用の）または自己（患者特異的な）細胞ベースの治療薬を生成す
るためにも適切である。そのようなノックアウト遺伝子には、T 細胞受容体（ T R A C 、
T R B C 1 、 T R B C 2 、 T R D C 、 T R G C 1 、 T R G C 2 ）、B 2 M を含む主要組織
適合遺伝子複合体（ M H C クラス I およびクラス I I ）遺伝子、補助受容体（ H L A - F
、 H L A - G ）、先天性免疫応答に関与する遺伝子（ M I C A 、 M I C B 、 H C P 5 、 S
T I N G 、 D D X 4 1 および T o l 1 様受容体（ T L R ））、炎症（ N K B B i L 、 L T
A 、 T N F 、 L T B 、 L S T 1 、 N C R 3 、 A I F 1 ）、ヒートショックタンパク質（ H

10

20

30

40

50

S P A 1 L、H S P A 1 A、H S P A 1 B)、補体カスケード、調節性受容体 (N O T C H ファミリーメンバー)、抗原プロセシング (T A P、H L A - D M、H L A - D O)、効力もしくは持続性の増加 (例えば、P D - 1、C T L A - 4 およびチェックポイントタンパク質のB 7 ファミリーの他のメンバー)、免疫抑制免疫細胞に関与する遺伝子 (例えば、F O X P 3 およびインターロイキン (I L) - 1 0)、T 細胞と腫瘍微小環境との相互作用に関与する遺伝子 (T G F B、I L - 4、I L - 7、I L - 2、I L - 1 5、I L - 1 2、I L - 1 8、I F N ガンマなどのサイトカインの受容体を含むがこれらに限定されない)、サイトカイン放出症候群に寄与する遺伝子 (I L - 6、I F N ガンマ、I L - 8 (C X C L 8)、I L - 1 0、G M - C S F、M I P - 1 / 、M C P - 1 (C C L 2)、C X C L 9、およびC X C L 1 0 (I P - 1 0) を含むがこれらに限定されない)、C A R / T C R によって標的とされる抗原をコードする遺伝子 (例えば、C A R がC S 1 に対して設計されている内因性C S 1)、またはC A R T / T C R - T (例えば、T E T 2、A R G 2、N R 4 A 1、N R 4 A 2、N R 4 A 3、T O X およびT O X 2) もしくはC A R - N K、C A R - Bなどを含むがこれらに限定されない他の細胞ベースの治療薬に有益であることが見出された他の遺伝子が含まれるがこれらに限定されない。例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、D e R e n z o ら、G e n e t i c M o d i f i c a t i o n S t r a t e g i e s t o E n h a n c e C A R T C e l l P e r s i s t e n c e f o r P a t i e n t s W i t h S o l i d T u m o r s . F r o n t . I m m u n o l . 、2 0 1 9 年 2 月 1 5 日を参照されたい。

10

20

30

【 0 1 7 7 】

本明細書で提供される方法およびシステムの1つの用途は、骨髄細胞またはi P S 細胞から分化した骨髄細胞のH L A アレルを操作して、ハプロタイプ適合を高めることである。操作された細胞は、白血病を処置するための骨髄移植に使用することができる。他の用途は、鐸状赤血球貧血およびベータ - サラセミアを処置するために、造血幹細胞における胎児ヘモグロビン遺伝子の負の調節エレメントを操作することである。負の調節エレメントを突然変異させると、胎児ヘモグロビン遺伝子の発現が造血幹細胞において再活性化されて、成人アルファまたはベータヘモグロビン遺伝子の突然変異に起因する機能喪失が代償される。さらなる用途は、パーキンソン病 (神経細胞喪失)、1型糖尿病 (膵臓ベータ細胞喪失) を含むさまざまな変性疾患のための同種異系治療用細胞を生成させるために、i P S 細胞を操作することである。他の例示的な用途には、C C R 5 遺伝子およびH I V が細胞に侵入するのに必要な受容体をコードする他の遺伝子を不活性化することによってH I V 感染耐性T 細胞を操作すること、D M D 遺伝子における中途停止コドンを除去してジストロフィンの発現を復旧させること、ならびにがんドライバー突然変異、例えば、p 5 3 Y 1 6 3 C を是正することが含まれる。

30

40

50

【 0 1 7 8 】

構成要素の細胞内への送達

本明細書で提供される実施形態では、ガイドR N A 分子は、以下に列挙されるがこれらに限定されないさまざまな方法を介して標的細胞に送達され得る。第一に、合成R N A 分子 (s g R N A、c r R N A、またはt r a c r R N A およびそれらの修飾物のいずれであっても) の、エレクトロポレーション、又クレオフェクション、トランスフェクションによる、ナノ粒子を介した、ウイルス媒介R N A 送達を介した、非ウイルス媒介送達を介した、細胞外小胞 (例えば、エキソソームおよびマイクロベシクル) を介した、真核細胞移入 (例えば、組換え酵母による) を介した、およびR N A 分子をパッケージングすることができ、ゲノムランドスケープを変化させずに標的生細胞へと送達することができる他の方法による、目的の細胞への直接導入。ガイドR N A 分子の導入のための他の方法には、分子が標的ガイドR N A 分子へと転写され得るように、タンパク質動員のための関連配列を含むD N A ポリヌクレオチドの非組込み型一過性移入が含まれ、これには、D N A のみのビヒクル (例えば、プラスミド、ミニサークル、ミニベクター、ミニストリング、プロテロメラーゼにより生成されたD N A 分子 (例えば、ドギーボーン) 、人工染色体 (例

えば、H A C)、コスミド)、ナノ粒子によるD N A ビヒクルを介した、細胞外小胞 (例えれば、エキソソームおよびマイクロベシクル)、真核細胞移入 (例えれば、組換え酵母による) を介した、A A V による一過性ウイルス移入、非組込み型ウイルス粒子 (例えれば、レンチウイルスおよびレトロウイルスベースのシステム)、細胞透過性ペプチド、およびゲノムランドスケープに直接組み込まれずに細胞へのD N A の導入を媒介し得る他の技術が含まれるが、これらに限定されない。ガイドR N A の導入のための別の方法には、標的細胞のゲノム中へのガイドR N A 転写のための機構の安定な導入のための組込み型遺伝子導入技術の使用が含まれ、これはガイドR N A 発現を減弱させるための恒常的なまたはプロモーター誘導性のシステムを介して制御することができ、これをまた、効用が満たされた後にシステムを除去し得るように設計することもでき (例えれば、C r e - L o x 組換えシステムの導入)、安定な遺伝子導入のためのそのような技術には、ウイルス粒子 (例えれば、レンチウイルス、アデノウイルス、およびレトロウイルスベースのシステム) の組込み、トランスポザーゼ媒介性移入 (例えれば、S l e e p i n g B e a u t y およびP i g g y b a c)、D N A 切断によって導入される非相同修復経路の利用 (例えれば、C R I S P R およびT A L E N の利用) 技術およびサロゲートD N A 分子、ならびに目的の細胞への標的D N A の組込みを促す他の技術が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 7 9 】

エフェクター融合タンパク質およびC R I S P R 標的化構成要素を送達するための方法は、多くの場合、同じ技術によって媒介される。状況によっては、ある方法によってエフェクター融合タンパク質の送達を媒介し、別の方法を介してC R I S P R 標的化構成要素の送達を媒介することに利点がある。適用可能な方法を以下に列挙するが、これらには限定されない。第一に、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、トランスフェクションによる、ナノ粒子を介した、ウイルス媒介パッケージ送達を介した、細胞外小胞 (例えれば、エキソソームおよびマイクロベシクル) を介した、真核細胞移入 (例えれば、組換え酵母による) を介した、および高分子をパッケージングすることができ、ゲノムランドスケープに組み込まれずに標的生細胞へと送達することができる他の方法による、m R N A およびタンパク質分子の直接的な、目的の細胞への直接導入。エフェクター融合タンパク質のコード配列の導入のための他の方法には、1つまたは複数の分子が標的タンパク質分子へと転写および翻訳され得るよう、タンパク質動員のための関連配列を含むD N A ポリヌクレオチドの非組込み型一過性移入が含まれる。これには、D N A のみのビヒクル (例えれば、プラスミド、ミニサークル、ミニベクター、ミニストリング、プロテロメラーゼにより生成されたD N A 分子 (例えれば、ドギーボーン)、人工染色体 (例えれば、H A C)、コスミド)、ナノ粒子によるD N A ビヒクルを介した、細胞外小胞 (例えれば、エキソソームおよびマイクロベシクル)、真核細胞移入 (例えれば、組換え酵母による) を介した、A A V による一過性ウイルス移入、非組込み型ウイルス粒子 (例えれば、レンチウイルスおよびレトロウイルスに基づくシステム)、およびゲノムランドスケープに直接組み込まれずに細胞へのD N A の導入を媒介し得る他の技術が含まれるが、これらに限定されない。エフェクター融合タンパク質 (例えれば、デアミナーゼ) および / またはC R I S P R 標的化構成要素の導入のための別の方法には、標的細胞のゲノム中への転写および翻訳のための機構の安定な導入のための組込み型遺伝子導入技術の使用が含まれ、これは1つまたは複数の分子の発現を減弱させるための恒常的なまたは誘導性のプロモーターシステムを介して制御することができ、これをまた、効用が満たされた後にシステムを除去し得るように設計することもでき (例えれば、C r e - L o x 組換えシステムの導入)、安定な遺伝子導入のためのそのような技術には、ウイルス粒子 (例えれば、レンチウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルスに基づくシステム) の組込み、トランスポザーゼ媒介性移入 (例えれば、S l e e p i n g B e a u t y およびP i g g y b a c)、D N A 切断によって導入される非相同修復経路の利用 (例えれば、C R I S P R およびT A L E N を利用) 技術およびサロゲートD N A 分子、ならびに目的の細胞への標的D N A の組込みを促す他の技術が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 8 0 】

発現系

R N A 足場、エフェクター融合タンパク質またはニッカーゼをコードする核酸を、複製および／または転写のために原核細胞または真核細胞に導入するための 1 つまたは複数の中間発現ベクター中にクローニングすることができる。中間ベクターは典型的には、R N A 足場またはタンパク質構成要素の產生のための R N A 足場またはタンパク質構成要素をコードする核酸の保存または操作のための原核生物ベクター、例えば、プラスミド、またはシャトルベクター、または昆虫ベクターである。また、核酸を、植物細胞、動物細胞への投与のために、1 つまたは複数の発現ベクター中にクローニングすることもできる。一部の実施形態では、核酸を、哺乳動物細胞またはヒト細胞、真菌細胞、細菌細胞、または原生動物細胞への投与のために、1 つまたは複数の発現ベクター中にクローニングすることができる。したがって、本開示は、上記の R N A 足場またはタンパク質のいずれかをコードする核酸を提供する。一部の実施形態では、核酸は単離および／または精製される。

10

20

30

40

【0181】

本開示はまた、上記の R N A 足場またはタンパク質のうちの 1 つまたは複数をコードする配列を有する組換え構築物またはベクターも提供する。構築物の例には、本開示の核酸配列が順方向または逆方向に挿入されているベクター、例えば、プラスミドまたはウイルスベクターが含まれる。一実施形態では、構築物は、配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む調節配列をさらに含む。多数の好適なベクターおよびプロモーターが当業者に公知であり、市販されている。原核生物および真核生物宿主とともに使用するための適切なクローニングおよび発現ベクターも、例えば、Sambrookら(2001年、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press)に記載されており、そのすべての内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0182】

細胞の培養

本開示の方法は、ガイド R N A がエフェクタータンパク質を標的配列中の標的部位に導き、エフェクタードメインが標的配列を改変するような適切な条件下で細胞を維持することをさらに含む。一般に、細胞は、細胞の増殖および／または維持に適した条件下で維持することができる。好適な細胞培養条件は当技術分野で周知であり、例えば、Current Protocols in Molecular Biology」、Ausubelら、John Wiley & Sons、New York、2003年、または「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Sambrook & Russell、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、第3版、2001年)、Santagata(2008年)PNAS 105: 5809~5814ページ；Moehleら(2007年)PNAS 104: 3055~3060ページ；Urnovら(2005年)Nature 435: 646~651ページ；およびLombardoら(2007年)Nat. Biotechnology 25: 1298~1306ページに記載されており、それぞれのすべての内容は、参照により本明細書に組み入れられる。当業者は、細胞を培養する方法が当技術分野で公知であり、細胞型に応じて異なり得ること、および異なるであろうことを認識している。いずれの場合も、慣行的な最適化を使用して、特定の細胞型に対する最良の手法を決定することができる。

【0183】

本明細書で提供される方法にとって有用な細胞は、新たに単離された初代細胞であることができ、または初代細胞培養物の凍結アリコートから得ることができる。一部の実施形態では、細胞は、g R N A および塩基編集融合タンパク質の取込みのためにエレクトロポレーションを受ける。以下の実施例に記載されるように、いくつかのアッセイ(例えば、T 細胞について)のためのエレクトロポレーションの条件は、1600 ボルト、10 ミリ秒のパルス幅、3 回のパルスを含み得る。エレクトロポレーションの後に、エレクトロポレーションを受けた T 細胞を細胞培養培地中で回復させ、続いて、T 細胞増殖培地中で培

50

養する。場合によっては、エレクトロポレーションを受けた細胞を、細胞培養培地中で約5～約30分間（例えば、約5、10、15、20、25、30分間）にわたり回復させる。一実施形態では、回復用細胞培養培地は、抗生物質または他の選択剤を含まない。場合によっては、T細胞増殖培地は、完全CTS Optimizer T-cell ExpansionまたはImmunoCult-XT Expansion培地である。

【0184】

本開示による組成物および方法のさまざまな例示的実施形態を、以下の実施例において記載する。

【0185】

【実施例】

【実施例1】

T細胞のTRAC座位へのプロモーターレス導入遺伝子の組込みと、それとともにTRAC内因性プロモーターによって駆動される導入遺伝子の発現およびTCRa/b発現の破壊

本実施例では、初代ヒト汎Tリンパ球を使用して、プロモーターレス導入遺伝子のTRAC座位への特異的組込みに対するCRISPRシステム標的化モジュール（nCas9-UGI-UGI）の有用性を立証した。抗CD3抗体および抗CD28抗体を使用して汎T細胞を活性化し、続いて、nCas9-UGI-UGI構成要素のmRNAと、TRAC遺伝子の第1エクソン中の反対鎖を標的とする2つのsgRNAとを使用して、エレクトロポレーションを行った。sgRNAによって認識される2つの標的座位でnCas9-UGU-UGIによって生成された2つの單一ニックは、交互の二本鎖切断（DSB）をもたらした。エレクトロポレーションの後に、細胞にAAV6ウイルスによる形質導入を行い、これを使用して、TRAC遺伝子とインフレームにGFPコード配列の組込みを促した。この座位でDSBによって誘導された相同指向性修復（HDR）または非相同末端結合（NHEJ）による導入遺伝子の組込みは、TRAC遺伝子の効率的なノックアウトおよびTCRa/b複合体の破壊をもたらした。形質導入の後に、細胞を4～7日間インキュベートし、GFP発現およびTCRa/bの表面ノックアウトについて細胞をフローサイトメトリーによって検査した。

【0186】

このデータは、本開示の技術が、表面からのTCR / の喪失を効率的に誘導し（図4B）、良好なレベルのGFP組込みを生成させることができることを示す（図4A）。GFPの発現は、対照細胞では観察されなかった。対照細胞は、標的化構成要素を受けなかった細胞、すなわち、nCas9-UGI-UGI構成要素とTRAC遺伝子を標的とする2つのsgRNAとによるエレクトロポレーションを受けなかった細胞であった。GFPの発現は、TRAC座位が切断され、それ故にGFPが組み込まれ、TRACプロモーターによって転写が制御された細胞でのみ観察された。予想された通り、GPFを発現するT細胞はTCRa/bの発現を喪失した（図4C）。さらに、標的化構成要素のエレクトロポレーションとAAV形質導入との組合せは、形質導入のみと比較した場合、生存率に影響を及ぼさず、このことはこの技術が細胞にとって有害ではないことを示す（図4D）。

【0187】

材料および方法

ノックインガイドRNA

TRAC座位を破壊して、GFPをその転写制御下に置くために、本発明者らは、TRACの第1のエクソンの5'末端を標的とするsgRNAペアと、標的座位に対する相同性アームを有し、自己切断性P2Aペプチドの後にGFP cDNAをコードするAAVベクターとを設計した。TRAC座位を標的とするsgRNAを、PAM-out配置（PAM部位が標的領域の外側に面する）の規則に従って設計し、切断部位が40～70bp隔たるようにした。ノックインガイドは、1xMS2アブタマーを含まないように設計した。sgRNAは、Horizon Discovery社（以前のDharma

10

20

30

40

50

n社)によって合成された。

【0188】

合成sgRNA配列(配列番号:29)

mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U
(m)2-Oメチルおよび(*)ホスホロチオエート修飾残基

N(スペーサー)=G、U、AまたはCのいずれか

5'sgRNA配列(配列番号:30)

mG*mA*GAAUCAAAUCGGUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA
AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U

3'sgRNA配列(配列番号:31)

mA*mA*CAAAUGUGUCACAAAGUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA
AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U

メッセンジャーRNA

メッセンジャーRNA分子は、修飾ヌクレオチドであるブソイドウリジンおよび5'-メチル-シトシンを利用して、TriLink Biotechnologies社によってカスタム合成された。このmRNA構成要素は以下のタンパク質:nCas9=NLS-nCas9-UGI-UGI-NLSへと翻訳された。

【0189】

AAVプラスミドの構築

AAVプラスミドは、GenScript社によってカスタム合成された。pAAV骨格に基づいて、本発明者らは、以下のもの:ゲノムTRACの0.9kb左相同性アームとそれに隣接する5'gRNA標的化配列、GSG(gly-ser-gly)ペプチドとそれと続くTRACの第1のエクソンとインフレームにある自己切断性P2Aペプチド、GFPコード配列、ウシ成長ホルモンのポリAシグナル(bGHPA)、およびゲノムTRACの0.9kb右相同性アームとそれに隣接する3'gRNA標的化配列を順に含むpAAV-TRAC-GFPを設計した。

【0190】

細胞

CD3+T細胞は、全血から単離するか、またはHemacare社への外部委託とした。手短に述べると、末梢血単核細胞を密度勾配遠心分離(SepMate PBMC単離チューブ、STEMCELL Technologies)によって単離し、続いてTリンパ球をEasySep(商標)Human T Cell Isolation Kit(STEMCELL Technologies)を使用して精製した。細胞を、100U/ml IL-2(STEMCELL Technologies)および1×ペニシリン/ストレプトマイシン(ThermoFisher)を添加したImmuno cult XT T Cell Expansion培地(STEMCELL Technologies)中のDynabeads(ビーズ:細胞が1:1)Human T-Activator CD3/CD28(ThermoFisher)により、37および5%CO₂下で48時間、細胞10⁶個/mlの密度で活性化した。活性化の後に、ビーズを磁石の上に置くことによって除去し、細胞を培養下に戻した。

【0191】

T細胞のエレクトロポレーション

活性化の48~72時間後に、Neon Electroporator(ThermoFisher)を使用してT細胞のエレクトロポレーションを行った。Neon Electroporatorの条件は、細胞250K個の入った10μlチップを用いた1600V/10ms/3パルスを、合計1~5μgのmRNA量および各2μMの標的化gRNAと組み合わせた。エレクトロポレーション後の細胞を、100U/ml IL-2、100U/ml IL-7および100U/ml IL-15(STEMCELL Technologies)を含むImmuno cult XT培地に移し、37および50

び 5 % CO₂ 下で 48 ~ 72 時間培養した。

【 0192 】

T 細胞の形質導入

組換えAAV6 粒子は、Vigene Biosciences 社によって生成された。該当する場合には、GFP コード配列を保有する組換えAAV6 粒子を、エレクトロポレーションの 2 ~ 4 時間後に、細胞 1 個当たり 1×10^6 ゲノムコピー (GC) で培養物に添加した。その後に、編集された細胞を 37 および 5 % CO₂ 下で 96 時間培養し、1 ml 当たり細胞約 1×10^6 個の密度を維持した。

【 0193 】

フローサイトメトリー

T 細胞の実体および QC を、CD3 抗体染色 (Biologend) によって確認した。T 細胞の活性化は、CD25 染色によって確認した。GFP 陽性細胞を、エレクトロポレーション / 形質導入の 7 日後にフローサイトメトリーによって測定した。TCR- / GFP+ 細胞のレベルを、エレクトロポレーション / 形質導入の 7 日後に、TCR / 抗体 (Biologend) を使用したフローサイトメトリーによって評価した。いずれの表現型データも、生細胞染色によって確認された生細胞のパーセンテージとして報告した。

【 0194 】

[実施例 2]

T 細胞の TRAC 座位への CAR 遺伝子の組込みと、TRAC 内因性プロモーターによって駆動される導入遺伝子の発現および TCR 発現の破壊

本実施例では、初代ヒト汎 T リンパ球を使用して、CAR 遺伝子の TRAC 座位への特異的組込みに対する CRISPR システムにおける酵素、標的化モジュール、(nCas9 - UG I - UG I) の有用性を立証した。抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を使用して汎 T 細胞を活性化し、続いて、nCas9 - UG I - UG I 構成要素の mRNA と、TRAC 遺伝子の第 1 のエクソン中の反対鎖を標的とする 2 つの sgRNA とによるエレクトロポレーションを行った。sgRNA によって認識される 2 つの標的座位で nCas9 - UGU - UG I によって生成された 2 つの单ニックは、交互の二本鎖切断 (DSB) をもたらした。エレクトロポレーションの後に、細胞に AAV6 ウィルスによる形質導入を行い、これを使用して、TRAC 遺伝子とインフレームに CAR コード配列の組込みを促した。この座位で DSB によって誘導された相同指向性修復 (HDR) または非相同末端結合 (NHEJ) による導入遺伝子の組込みは、TRAC 遺伝子の効率的なノックアウトおよび TCR 複合体の破壊をもたらした。形質導入の後に、細胞を 4 ~ 7 日間インキュベートし、CAR 発現および TCR の表面ノックアウトについて細胞をフローサイトメトリーによって検査した。

【 0195 】

このデータは、本開示の技術が、表面からの TCR / の喪失を効率的に誘導し、良好なレベルの CAR 組込みを生成させることができることを示す (図 5 A ~ B)。CAR の発現は、対照細胞 (nCas9 - UG I - UG I および TRAC 遺伝子構成要素を標的とする 2 つの sgRNA を受けなかった細胞) では観察されず、TRAC 座位が切断され、それ故に CAR が組み込まれ、TRAC プロモーターによって転写が制御された細胞でのみ観察された。予想された通り、CAR 発現 T 細胞は TCR の発現を喪失した (図 5 C)。さらに、標的化構成要素のエレクトロポレーションと AAV 形質導入との組合せは、形質導入のみと比較した場合、生存率に影響を及ぼさず、このことはこの技術が細胞にとって有害ではないことを示す (図 5 D)。

【 0196 】

材料および方法

ノックインガイド RNA

TRAC 座位を破壊して、CD19 特異的な 1928z CAR 遺伝子をその転写制御下に置くために、本発明者らは、TRAC の第 1 のエクソンの 5' 末端を標的とする sg

10

20

30

40

50

R N A ペアと、標的座位に対する相同性アームを有し、自己切断性 P 2 A ペプチドの後に C A R c D N A をコードする A A V ベクターとを設計した。 T R A C 座位を標的とする s g R N A を、 P A M - o u t 配置 (P A M 部位が標的領域の外側に面する) の規則に従って設計し、切断部位が 4 0 ~ 7 0 b p 隔たるようにした。ノックインガイドは、 1 × M S 2 アプタマーを含まないように設計した。 s g R N A は H o r i z o n D i s c o v e r y 社 (以前の D h a r m a c o n 社) によって合成された。

【 0 1 9 7 】

合成 s g R N A 配列 (配列番号 : 29)

mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAA
 UAAGGUAGUCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U 10
 (m) 2-Oメチルおよび(*)ホスホロチオエート修飾残基

5' s g R N A 配列 (配列番号 : 30)

mG * mA * GAAUCAAAUCGGUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAAGCAAGUUAAAUA
AGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUmU * mU * U
3 ' s g R N A 配列 (配列番号 : 31)

m A * m A * C A A A U G U G U C A C A A A G U A G I

AGGUAGUCCGUUAUCACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUmU*mU*U
ゲンカシゴトキ RNA

ヌクレイン酸 - RNA

ヌクレオツチア - rRNA 分子は、修飾ヌクレオチドであるノクレオツチアおよび U - ネオチル - シトシンを利用して、TriLink Biotechnologies 社によってカスタム合成された。mRNA 構成要素は以下のタンパク質 : nCas9 = NLS - nCas9 - UGII - UGII - NLS へと翻訳された。 20

【 0 1 9 8 】

AAVプラスミドの構築

A A V プラスミドは、GenScript社によってカスタム合成された。p A A V 骨格に基づいて、本発明者らは、以下のもの：ゲノムTRACの0.9kb左相同性アームとそれに隣接する5' gRNA標的化配列、GSG(gly-ser-gly)ペプチドとそれに続くTRACの第1のエクソンとインフレームにある自己切断性P2Aペプチド、Yes carta(商標)療法に使用される1928z CARまたはGFPコード配列、ウシ成長ホルモンのポリアシグナル(bGHPA)、およびゲノムTRACの0.9kb右相同性アームとそれに隣接する3' gRNA標的化配列を順に含むp A A V - TRAC - 1928Z_CARおよびp A A V - TRAC - GFPを設計した。手短に述べると、CD19 - CAR(Kochenderferら、2009年、J Immunotherapy)は、FMC63マウスハイブリドーマ(Nicholsonら、1997年、Mol Immunology)由来のヒトCD19に対して特異的な単鎖可変断片scFV、ヒトCD28分子の一部分(ヒンジ細胞外部分、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインの全体)およびCD3 - ゼータ鎖のドメイン全体で構成された(図2)。

【 0 1 9 9 】

細胞

C D 3 + T 細胞は、全血から単離するか、または Hemacare 社への外部委託とした。手短に述べると、末梢血単核細胞を密度勾配遠心分離 (SepMate PBMC 単離チューブ、STEMCELL Technologies) によって単離し、続いて T リンパ球を Easy Sep (商標) Human T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies) を使用して精製した。細胞を、100U/ml IL-2 (STEMCELL Technologies) および 1 × ペニシリノ / ストレプトマイシン (Thermo Fisher) を添加した Immunocult XT T Cell Expansion 培地 (STEMCELL Technologies) 中の Dynabeads (ビーズ: 細胞が 1 : 1) Human T-Activator CD3 / CD28 (Thermo Fisher) により、37 および 5% CO₂ 下で 48 時間、細胞 10⁶ 個 / ml の密度で活性化した。活性化の後に

、ビーズを磁石の上に置くことによって除去し、細胞を培養下に戻した。

【0200】

T細胞のエレクトロポレーション

活性化の48～72時間後に、Neon Electroporator (Thermo Fisher)を使用してT細胞のエレクトロポレーションを行った。Neon Electroporatorの条件は、細胞250K個の入った10μlチップを用いた1600v/10ms/3パルスを、合計1～5μgのmRNA量および各2μMの標的化gRNAと組み合わせた。エレクトロポレーションの後に、細胞を100U/ml IL-2、100U/ml IL-7および100U/ml IL-15 (STEMCELL Technologies)を含むImmunoCult XT培地に移し、37および5% CO₂下で48～72時間培養した。10

【0201】

T細胞の形質導入

組換えAAV6粒子は、Vigene Biosciences社によって生成された。該当する場合には、CD19-CARコード配列を保有する組換えAAV6粒子を、エレクトロポレーションの2～4時間後に、細胞1個当たり 1×10^6 GCで培養物に添加した。その後に、編集された細胞を37および5% CO₂下で96時間培養し、1ml当たり細胞約 1×10^6 個の密度を維持した。

【0202】

フローサイトメトリー

T細胞の実体およびQCを、CD3抗体染色 (Biolegend)によって確認した。T細胞の活性化は、CD25染色によって確認した。CD19-CAR陽性細胞を、エレクトロポレーション/形質導入の96時間後に、抗FMC63 scFv抗体 (AcroBiosystems)を使用したフローサイトメトリーによって検出した。TCR-/CAR+細胞のレベルは、TCRα/b抗体 (Biolegend)と組み合わせた染色によって評価した。いずれの表現型データも、生細胞染色によって確認された生細胞のパーセンテージとして報告した。20

【0203】

[実施例3]

アプタマーに基づく塩基編集システムによるユニバーサルCAR-T細胞の生成30

本実施例では、初代ヒト汎Tリンパ球を使用して、CAR遺伝子のTRAC座位への特異的組込み、およびシトシン塩基編集システムによるTRAC、B2MおよびCD52遺伝子の同時ノックアウトに対する、CRISPRアプタマーに基づく遺伝子編集システムの有用性を立証した。本開示の方法により、塩基編集ガイド型ノックアウトが、sgRNA-アプタマーによる標的部位へのデアミナーゼの動員を介して達成された。CAR組込みおよびその結果としてのTRACノックアウトは、sgRNAと組み合わせてCRISPRシステムに使用されたのと同じ酵素によって達成された。以前のシステムを上回る利点は、1つのCRISPR酵素、または単一のRNAガイド型ニッカーゼを使用して両方の改変が達成されたことであり、すなわち、CAR遺伝子のノックインならびにTRAC、B2MおよびCD52遺伝子のノックアウトのために同じ酵素が使用された。40

【0204】

抗CD3抗体および抗CD28抗体を使用して汎T細胞を活性化し、続いて以下の構成要素：(i) デアミナーゼ-MCPをコードするmRNA、(ii) nCas9-UGI-UGIタンパク質をコードするmRNA、(iii) TRAC遺伝子の第1エクソン中の反対鎖を標的とする2つのsgRNA、および(iv) 2つの異なる遺伝子に対するsgRNA-アプタマーを使用してエレクトロポレーションを行った。sgRNAによって認識される2つの標的座位でnCas9-UGU-UGIによって生成された2つの単一ニックは、交互の二本鎖切断(DSB)をもたらした。エレクトロポレーションの後に、細胞にAAV6ウイルスによる形質導入を行い、これを使用して、相同指向性修復(HDR)により、TRAC遺伝子とインフレームにCARコード配列の組込みを促した。この50

座位で D S B によって誘導された H D R または非相同末端結合 (N H E J) による導入遺伝子の組込みは、 T R A C 遺伝子の効率的なノックアウトおよび T C R 複合体の破壊をもたらした。形質導入の後に、細胞を 4 ~ 7 日間インキュベートし、続いて、 C A R 発現ならびに T C R 、 B 2 M および C D 5 2 の表面ノックアウトについてフローサイトメトリーによって検査した。塩基変換は、標的化 P C R 増幅および S a n g e r シークエンシングによって測定した。マルチ抗体パネルを使用して、 C A R + 集団内の多重 K O レベルをフローサイトメトリーによって確認した。

【 0 2 0 5 】

塩基編集構成要素が細胞に送達された場合、高レベルの塩基変換が2つの標的化座位であるB2MおよびCD52で観察され、編集の効率はウイルスベクター送達によって損なわれなかつた（図6A～B）。このデータは、sgRNA-アプタマーに基づく塩基編集が、デアミナーゼをCasタンパク質と融合させる従来のCRISPR補助による塩基編集システムと、効率の点で同等であったことを示す。フローサイトメトリーによって生成された機能的KO情報は、塩基変換と相関した（図6C～D）。しかし、表面からのTCR/の喪失およびCARの組込みは、代替的な融合CBEシステムによってではなく、本開示のCRISPRシステムの酵素のみによって効率的に達成された（図7A～B）。高レベルの複数遺伝子KO（この例では三重KO）が、本技術によってCAR発現集団において達成された（図7C）。このデータは、本技術により、複数の遺伝子に機能的ノックアウトを有し、ユニバーサルCAR-T細胞として機能するCAR-T細胞が生成されたことを示す。このデータはまた、HDRガイド型組込みを達成する本開示のCRISPRに基づく遺伝子編集システムが、代替的な融合CBEシステムと比較して優れることも示す。

【 0 2 0 6 】

材料および方法

塩基編集用ガイド RNA

内部生成データを使用して、PAMモチーフ(NGG)からの設定距離で計算された塩基編集ウィンドウを特定した。このデータを使用して、以下の遺伝子: TRAC、TRBC1、TRBC2、PDCD-1、B2M、およびCD52(表4)に関する表現型または遺伝子KOに適用可能なガイド配列を予測するアルゴリズムを開発した。sgRNAは、1×MS2アプタマーを含むように設計した。ガイドRNA配列は、Horizon Discovery社(以前のDharmacon社)およびAgilent社によって合成された。

〔 0 2 0 7 〕

合成 $1 \times M S 2$ s g R N A 配列 (配列番号 3 2)

mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAAGCAAGUUAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGCGCACAU
GACCAUCACCCGAUCGUCCUUUUUmU*mU*mU

(m) ? - 0 メモリを上げ (*) 来る 来る メモリ = ト修飾 残基

[0 2 0 8 1]

【表4-1】

表4: TRAC、TRBC1、TRBC2、PDCD1、CD52 および B2M 遺伝子に対する単一ガイド RNA(sgRNA)における crRNA 配列。例示された塩基編集技術を使用して機能的ノックアウトを作り出すことができるガイド RNA 配列のガイドデザインの例示的リスト。このリストは、所有権のある社内ソフトウェアによって作製された中途終止コドンおよびスプライス破壊部位の導入に対して特異的なガイドを含む。

遺伝子名	ガイド ID	KOの種類*	鎖	ガイド配列	配列番号	PAM
B2M	B2M_1	終止	センス	CACAGCCCAAGATAGTTAAG	33	TGG
	B2M_2	終止	センス	ACAGCCCAAGATAGTTAAGT	34	GGG
	B2M_3	終止	アンチ	TTACCCCCACTTAACCTATCTT	35	GGG
	B2M_4	終止	アンチ	CTTACCCCCACTTAACCTATCT	36	TGG
	B2M_5	スプライス	アンチ	ACTCACGCTGGATAGCCTCC	37	AGG
	B2M_6	スプライス	アンチ	TTGGAGTACCTGAGGAATAT	38	CGG
	B2M_7	スプライス	アンチ	TCGATCTATGAAAAAGACAG	39	TGG
	B2M_8	スプライス	アンチ	AACCTGAAAAGAAAAGAAAA	40	AGG
CD52	CD52_1	終止	センス	GTACAGGTAAGAGCAACGCC	41	TGG

【0209】

10

20

30

40

50

【表4-2】

	CD52_2	終止	センス	CTCCTCCTACAGATACAAAC	42	TGG
	CD52_3	終止	センス	CAGATACAAACTGGACTCTC	43	AGG
	CD52_4	スプ ライ ス	アンチ	CTCTTACCTGTACCATAACC	44	AGG
	CD52_5	スプ ライ ス	アンチ	GTATCTGTAGGAGGGAGAAGT	45	GGG
	CD52_6	スプ ライ ス	アンチ	TGTATCTGTAGGAGGGAGAAG	46	TGG
	CD52_7	スプ ライ ス	アンチ	GTCCAGTTGTATCTGTAGG	47	AGG
TRAC	TRAC_1	終止	センス	AACAAATGTGTCACAAAGTA	48	AGG
	TRAC_2	終止	センス	CTTCTTCCCCAGCCCAGGTA	49	AGG
	TRAC_3	終止	センス	TTCTTCCCCAGCCCAGGTAA	50	GGG
	TRAC_4	終止	センス	AGCCCAGGTAAGGGCAGCTT	51	TGG
	TRAC_5	終止	センス	TTTCAAAACCTGTCAGTGAT	52	TGG
	TRAC_6	終止	センス	TTCAAAACCTGTCAGTGATT	53	GGG
	TRAC_7	終止	センス	CCGAATCCTCCTCCTGAAAG	54	TGG

【0210】

10

20

30

40

50

【表4-3】

	TRAC_8	ス プ ラ イ ス	アンチ	CTTACCTGGGCTGGGAAGA	55	AGG
	TRAC_9	ス プ ラ イ ス	アンチ	TTCGTATCTGTAAAACCAAG	56	AGG
TRBC1/2	TRBC1/2_1	終 止	センス	CCACACCCAAAAGGCCACAC	57	TGG
	TRBC1/2_2	終 止	アンチ	CCCACCCAGCTCAGCTCCACG	58	TGG
	TRBC1/2_3	終 止	センス	CGCTGTCAAGTCCAGTTCTA	59	CGG
	TRBC1/2_4	終 止	センス	GCTGTCAAGTCCAGTTCTAC	60	GGG
	TRBC1/2_5	終 止	センス	AGTCCAGTTCTACGGGCTCT	61	CGG
	TRBC1/2_6	終 止	センス	CACCCAGATCGTCAGCGCCG	62	AGG
	TRBC1/2_7	ス プ ラ イ ス	アンチ	ACCTGCTCTACCCCAGGCCT	63	CGG
	TRBC1/2_8	ス プ ラ イ ス	アンチ	CCACTCACCTGCTCTACCCC	64	AGG
TRBC1	TRBC1_1	終 止	センス	CACGGACCCGCAGCCCCCTCA	65	AGG
	TRBC1_2	終 止	アンチ	GCGGGGGTTCTGCCAGAAGG	66	TGG
	TRBC1_3	終 止	アンチ	GTTGCGGGGGTTCTGCCAGA	67	AGG

10

20

30

40

【0211】

【表4-4】

	TRBC1_4	終止	センス	ATGACGAGTGGACCCAGGAT	68	AGG
	TRBC1_5	終止	センス	TGACGAGTGGACCCAGGATA	69	GGG
	TRBC1_6	終止	アンチ	ACCTGCTCTACCCCAGGCCT	70	CGG
	TRBC1_7	終止	センス	CCAACAGTGTCTACCAGCA	71	AGG
	TRBC1_8	終止	センス	CAACAGTGTCTACCAGCAA	72	GGG
	TRBC1_9	終止	センス	AACAGTGTCTACCAGCAAG	73	GGG
	TRBC1_10	スプライス	アンチ	GTCTGAAAGAAAGCAGGGAG	74	AGG
	TRBC1_11	スプライス	アンチ	CCACAGTCTGAAAGAAAGCA	75	GGG
	TRBC1_12	スプライス	アンチ	GCCACAGTCTGAAAGAAAGC	76	AGG
	TRBC1_13	スプライス	アンチ	GACACTGTTGGCACGGAGGA	77	AGG
	TRBC1_14	スプライス	アンチ	GTAGGACACTGTTGGCACGG	78	AGG
	TRBC1_15	スプライス	アンチ	TACCATGGCCATCAACACAA	79	GGG
	TRBC1_16	スプライス	アンチ	TTACCATGGCCATCAACACA	80	AGG
TRBC2	TRBC2_1	終止	アンチ	CCAGCTCAGCTCCACGTGGT	81	CGG
	TRBC2_2	終止	センス	CACAGACCCGCAGCCCCCTCA	82	AGG
	TRBC2_3	終止	アンチ	GCGGGGGTTCTGCCAGAAGG	83	TGG
	TRBC2_4	終止	アンチ	GTTGCGGGGTTCTGCCAGA	84	AGG
	TRBC2_5	終止	センス	ATGACGAGTGGACCCAGGAT	85	AGG
	TRBC2_6	終止	センス	TGACGAGTGGACCCAGGATA	86	GGG
	TRBC2_7	終止	アンチ	ACCTGCTCTACCCCAGGCCT	87	CGG

10

20

30

40

【0212】

【表4-5】

	TRBC2_8	終止	センス	TCAACAGAGTCTTACCAAGCA	88	AGG
	TRBC2_9	終止	センス	CAACAGAGTCTTACCAAGCAA	89	GGG
	TRBC2_10	終止	センス	AACAGAGTCTTACCAAGCAAG	90	GGG
	TRBC2_11	スプ ライ ス	アンチ	CACAGTCTGAAAGAAAACAG	91	AGG
	TRBC2_12	スプ ライ ス	アンチ	CCACAGTCTGAAAGAAAACA	92	AGG
	TRBC2_13	スプ ライ ス	アンチ	GCCACAGTCTGAAAGAAAAC	93	AGG
PD_CD1	PD_CD1_1	終止	センス	TCCAGGCATGCAGATCCCAC	94	AGG
	PD_CD1_2	終止	センス	TGCAGATCCCACAGGGCGCCC	95	TGG
	PD_CD1_3	終止	アンチ	CGACTGGCCAGGGCGCCTGT	96	GGG
	PD_CD1_4	終止	アンチ	ACGACTGGCCAGGGCGCCTG	97	TGG
	PD_CD1_5	終止	アンチ	ACCGCCCAGACGACTGGCCA	98	GGG
	PD_CD1_6	終止	アンチ	CACCGCCCAGACGACTGGCC	99	AGG
	PD_CD1_7	終止	アンチ	TGTAGCACCGCCCAGACGAC	100	TGG
	PD_CD1_8	終止	センス	GGGCGGTGCTACAACCTGGC	101	TGG
	PD_CD1_9	終止	センス	CGGTGCTACAACCTGGCTGG	102	CGG
	PD_CD1_10	終止	センス	CTACAACTGGCTGGCGGCC	103	AGG
	PD_CD1_11	終止	アンチ	CACCTACCTAAGAACCATCC	104	TGG
	PD_CD1_12	終止	アンチ	GGGGTTCCAGGGCCTGTCTG	105	GGG
	PD_CD1_13	終止	アンチ	GGGGGTTCCAGGGCCTGTCT	106	GGG
	PD_CD1_14	終止	アンチ	GGGGGGTTCCAGGGCCTGTGTC	107	TGG
	PD_CD1_15	終止	センス	CAGCAACCAGACGGACAAGC	108	TGG
	PD_CD1_16	終止	センス	CCCGAGGGACCGCAGCCAGCC	109	CGG

10

20

30

40

【0 2 1 3】

【表4-6】

PDCD1_17	終止	センス	GGACCGCAGCCAGCCCCGGCC	110	AGG	10
PDCD1_18	終止	センス	CGTGTACACACAAC TGCCCAA	111	CGG	
PDCD1_19	終止	センス	GTGTCACACAACTGCCAAC	112	GGG	
PDCD1_20	終止	センス	CGCAGATCAAAGAGAGGCCTG	113	CGG	
PDCD1_21	終止	センス	GCAGATCAAAGAGAGGCCTG	114	GGG	
PDCD1_22	終止	センス	AGCCGCCAGTTCCAAACCCCTGG	115	TGG	
PDCD1_23	終止	センス	CGGCCAGTTCCAAACCCCTGG	116	TGG	
PDCD1_24	終止	センス	CAGTTCCAAACCCCTGGTGGT	117	TGG	
PDCD1_25	終止	アンチ	GGACCCAGACTAGCAGCACC	118	AGG	
PDCD1_26	スプライス	アンチ	CACCTACCTAAGAACCATCC	119	TGG	
PDCD1_27	スプライス	アンチ	GGAGTCTGAGAGATGGAGAG	120	AGG	
PDCD1_28	スプライス	アンチ	TCTGGAAGGGCACAAAGGTC	121	AGG	20
PDCD1_29	スプライス	アンチ	TTCTCTCTGGAAGGGCACAA	122	AGG	
PDCD1_30	スプライス	アンチ	TGACGTTACCTCGTGCAGGCC	123	CGG	
PDCD1_31	スプライス	アンチ	TCCCTGCAGAGAACACACT	124	TGG	
PDCD1_32	スプライス	アンチ	GAGACTCACCAAGGGCTGGC	125	CGG	30
PDCD1_33	スプライス	アンチ	TCTTGAGGAGAAAGGGAGA	126	GGG	
PDCD1_34	スプライス	アンチ	TTCTTGAGGAGAAAGGGAG	127	AGG	
*終止=中途終止コードン、スプライス=スプライス部位の破壊						40

【0214】

ノックインガイドRNA

TRAC座位を破壊して、CD19特異的な1928zCAR遺伝子をその転写制御下に置くために、本発明者らは、TRACの第1のエクソンの5'末端を標的とするsgRNAペアと、標的座位に対する相同性アームを有し、自己切断性P2Aペプチドの後にCAR cDNAをコードするAAVベクターとを設計した。TRAC座位を標的とするsgRNAを、PAM-out配置(PAM部位が標的領域の外側に面する)の規則に従って設計し、切断部位が40~70bp隔たるようにした。ノックインガイドは、1×MS2アプタマーを含まないように設計した。sgRNAは、Horizon Discos

very社(以前のDharmacon社)によって合成された。

【0215】

合成sgRNA配列(配列番号:29)

mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U
(m) 2-Oメチルおよび(*)ホスホロチオエート修飾残基

5'sgRNA配列(配列番号:30)

mG*mA*GAAUCAAAUCGGUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA
AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U

3'sgRNA配列(配列番号:31)

mA*mA*CAAAUGUGUCACAAAGUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUA
AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U

メッセンジャーRNA

メッセンジャーRNA分子は、修飾ヌクレオチドであるブソイドウリジンおよび5'-メチル-シトシンを利用して、TriLink Biotechnologies社によってカスタム合成された。mRNA構成要素は以下のタンパク質:デアミナーゼA probe c1=NLS-rA probe c1-リンカー-MCPおよびnCas9=NLS-nCas9-UGI-UGI-NLSへと翻訳された。

【0216】

AAVプラスミドの構築

AAVプラスミドは、GenScript社によってカスタム合成された。pAAV骨格に基づいて、本発明者らは、以下のもの:ゲノムTRACの0.9kb左相同性アームとそれに隣接する5'gRNA標的化配列、GSG(gly-ser-gly)ペプチドとそれに続くTRACの第1のエクソンとインフレームにある自己切断性P2Aペプチド、YesCarta(商標)療法に使用される1928zCAR、ウシ成長ホルモンのポリアシグナル(bGHPA)、およびゲノムTRACの0.9kb右相同性アームとそれに隣接する3'gRNA標的化配列を順に含むpAAV-TRAC-1928Z_CARを設計した。手短に述べると、CD19-CAR(Kochenderferら、2009年、J Immunotherapy)は、FMC63マウスハイブリドーマ(Nicholsonら、1997年、Mol Immunology)由来のヒトCD19に対して特異的な単鎖可変断片scFV、ヒトCD28分子の一部分(ヒンジ細胞外部分、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインの全体)およびCD3-ゼータ鎖のドメイン全体で構成された。CD19-CAR CDSをturboGFPコード配列で置き換えた第2のAAVベクターを設計し、クローニングした。

【0217】

細胞

CD3+T細胞は、全血から単離するか、またはHemacare社への外部委託とした。手短に述べると、末梢血単核細胞を密度勾配遠心分離(SepMate PBMC単離チューブ、STEMCELL Technologies)によって単離し、続いてTリンパ球をEasySep(商標)Human T Cell Isolation Kit(STEMCELL Technologies)を使用して精製した。細胞を、100U/ml IL-2(STEMCELL Technologies)および1×ペニシリン/ストレプトマイシン(ThermoFisher)を添加したImmuno cult XT T Cell Expansion培地(STEMCELL Technologies)中のDynabeads(ビーズ:細胞が1:1)Human T-Activator CD3/CD28(ThermoFisher)により、37および5%CO₂下で48時間、細胞10⁶個/mlの密度で活性化した。活性化の後に、ビーズを磁石の上に置くことによって除去し、細胞を培養下に戻した。

【0218】

T細胞のエレクトロポレーション

10

20

30

40

50

活性化の48～72時間後に、Neon Electroporator (Thermofisher)を使用してT細胞のエレクトロポレーションを行った。Neon Electroporatorの条件は、デアミナーゼ-MCPおよびnCas9-UGI-UGIの両方について、細胞250K個の入った10μlチップを用いた1600v/10ms/3パルスを、合計1～5μgのmRNA量と組み合わせ、該当する場合には標的化gRNAを各2μMとした。エレクトロポレーション後の細胞を、100U/ml IL-2、100U/ml IL-7および100U/ml IL-15 (STEMCELL Technologies)を含むImmunoCult XT培地に移し、37および5% CO₂下で48～72時間培養した。

【0219】

10

T細胞の形質導入

組換えAAV6粒子は、Vigene Biosciences社によって生成された。該当する場合には、組換えAAV6粒子を、エレクトロポレーションの2～4時間後に、細胞1個当たり 1×10^6 GCで培養物に添加した。その後に、編集された細胞を37°Cおよび5% CO₂下で96時間培養し、1ml当たり細胞約 1×10^6 個の密度を維持した。

【0220】

20

フローサイトメトリー

T細胞の実体およびQCを、CD3抗体染色 (Biologend)によって確認した。T細胞の活性化は、CD25染色によって確認した。CD19-CAR+細胞は、エレクトロポレーション/形質導入の96時間後に、抗FMC63 scFv抗体 (Acro Biosystem)を使用したフローサイトメトリーによって検出した。表現型遺伝子の多重KOは、エレクトロポレーション/形質導入の96時間後に評価した：TRACはTCRab抗体染色 (Biologend)によって、B2MはB2M抗体 (Biologend)によって、およびCD52はCD52抗体 (Biologend)によって確認し、いずれの表現型データも、生細胞染色によって確認された生細胞のパーセンテージとして報告した。

【0221】

30

ゲノムDNA解析

エレクトロポレーションの96時間後に、溶解した細胞からゲノムDNAを放出させた。目的の座位をPCRによって增幅し、続いて産物をSangerシーケンシング (Genewiz)に供した。データは、所有権のある社内ソフトウェアによって解析した。

【0222】

40

50

【表5】

表5: TRAC 座位におけるノックイン組込みのための単一ガイド RNA。対として使用され、実施例の nCas9-UGI-UGI と組み合わされた場合に、反対鎖に 2 つのニックを生成して、機能的なノックアウトを作り出し、例示された塩基編集技術および座位に対する相同性アームを有するテンプレート導入遺伝子を使用した部位特異的組込みを誘導するガイド RNA 配列のためのガイド設計の例示的リスト。組込み部位の 5' 側に位置する PAM を有する単一ガイド RNA は、組込み部位の 3' 側に位置する PAM を有する単一ガイド RNA と組み合わせる必要がある。

遺伝子名	ガイド ID	鎖	組込み部位に対する PAM の位置	スペーサー配列	配列 ID:	PAM
TRAC	TRAC_5'_1	アンチ	5'	TCAGGGTTCTGGATATCTGT	128	GGG
	TRAC_5'_2	アンチ	5'	CTCTCAGCTGGTACACGGCA	129	GGG
	TRAC_5'_3	アンチ	5'	AGCTGGTACACGGCAGGGTC	130	AGG
	TRAC_5'_4	アンチ	5'	ACACGGCAGGGTCAGGGTTC	131	TGG
	TRAC_5'_5	アンチ	5'	GAGAATCAAATCGGTGAAT	132	AGG
	TRAC_3'_1	センス	3'	AACAAATGTGTCACAAAGTA	133	AGG
	TRAC_3'_2	センス	3'	TGTGCTAGACATGAGGTCTA	134	TGG

10

20

30

40

50

【0223】

[実施例4]

C R I S P R - アプタマーに基づく遺伝子編集システムによる同種異系 C A R 療法のための i P S C 細胞株の生成

本実施例では、人工多能性幹細胞 (i P S C) を使用して、C A R 遺伝子の T R A C 座位または B 2 M 座位への特異的な組込み、ならびに T R A C 、 B 2 M および C I I T A 遺伝子の同時ノックアウトに対する、C R I S P R - アプタマーに基づく遺伝子編集システムの有用性を立証する。本開示の方法により、塩基編集ガイド型ノックアウトが、s g R N A - アプタマーによる標的部位へのデアミナーゼの動員を介して達成される。C A R の組込みおよびその結果としての B 2 M ノックアウトは、(s g R N A と組み合わせて) C R I S P R システムに使用されたのと同じ酵素、および塩基編集システムを用いて達成される。以前のシステムを上回る利点は、1 つの酵素、または単一の R N A ガイド型ニッカーゼを使用してすべての変更が達成されることであり、すなわち、C A R 遺伝子のノックインならびに T R A C および C I I T A 遺伝子のノックアウトのために同じ酵素が使用される。

【0224】

i P S C を細胞株特異的な培地で培養し、解離させ、続いて、デアミナーゼ - M C P 、 n C a s 9 - U G I - U G I 構成要素、 B 2 M 遺伝子の第 1 のエクソン中の反対鎖を標的とする 2 つの s g R N A 、 2 つの異なる遺伝子 (T R A C および C I I T A) に対する s g R N A - アプタマー、および外因性 d s D N A 鑄型の両方に対する m R N A 構成要素を使用して、エレクトロポレーションを行う。 s g R N A によって認識される 2 つの標的座位で n C a s 9 - U G U - U G I によって生成される 2 つの単一ニックは、交互の二本鎖切断 (D S B) をもたらす。外因性 d s D N A 鑄型は、 B 2 M 座位上の D N A 切断標的部位に関連する相同性アームを含み、C A R 導入遺伝子カセットも含んでいた。エレクトロポレーションの後に、細胞を 4 ~ 7 日間インキュベートし、続いて、C A R 発現ならびに B 2 M および C I I T A のノックアウトについて、フローサイトメトリーによって検査する。また、塩基変換についても、 T R A C および C I I T A に関する標的化 P C R 増幅および S a n g e r シークエンシングによって測定する。マルチ抗体パネルを使用して、

C A R + 集団内の多重K O レベルをフローサイトメトリーによって確認する。

【 0 2 2 5 】

この技術により、極めて特異的な座位に導入遺伝子が含まれること、および同時に多重編集が行われることの両方を有する i P S C 系統が生成される可能性があり、これは現在利用可能な技術よりも優れる可能性がある。続いて、これらの編集された i P S C を利用して、臨床的に適切な i P S C 由来の同種異系 C A R T 細胞に分化させるか、またはプログラムを進めることができる。

【 0 2 2 6 】

[実施例 5]

C R I S P R - アプタマーに基づく遺伝子編集システムによる同種異系 C A R 療法のための改良された N K 細胞の生成

本実施例では、N K 細胞を使用して、C A R の C I S H 座位への特異的組込み、ならびに P D 1 および N K G 2 A の同時ノックアウトに対する、C R I S P R に基づく遺伝子編集方法の有用性を立証する。このシステムにより、s g R N A - アプタマーによる標的部位へのデアミナーゼの動員を介して、塩基編集ガイド型ノックアウトが達成される。C A R の組込みおよびその結果としての C I S H ノックアウトは、C R I S P R システムおよび塩基編集システムのために使用されたのと同じ酵素を用いて達成される。以前のシステムを上回る利点は、1 つの酵素、または 1 つの R N A ガイド型ニッカーゼを使用して、両方の改変が達成されることである。

【 0 2 2 7 】

N K 細胞に対して、デアミナーゼ - M C P 、 n C a s 9 - U G I - U G I 構成要素、 C I S H 遺伝子の第 1 のエクソン中の反対鎖を標的とする 2 つの s g R N A 、および 2 つの異なる遺伝子 (P D 1 および N K G 2 A) に対する s g R N A - アプタマーに対する両方の m R N A 構成要素を使用して、エレクトロポレーションを行う。 s g R N A によって認識される 2 つの標的座位で n C a s 9 - U G U - U G I によって生成される 2 つの單一ニックは、交互の二本鎖切断 (D S B) をもたらす。エレクトロポレーションの後に、細胞に A A V 6 ウィルスによる形質導入を行い、これを用いて、相同指向性修復 (H D R) により、 C I S H 遺伝子とインフレームに C A R コード配列の組込みを促す。この座位で D S B によって誘導される H D R または非相同末端結合 (N H E J) による導入遺伝子の組込みは、 C I S H 遺伝子の効率的なノックアウトをもたらす。形質導入の後に、細胞を 4 ~ 7 日間インキュベートし、続いて C A R 発現ならびに C I S H 、 P D 1 および N K G 2 A のノックアウトについて、フローサイトメトリーによって検査する。また、塩基変換についても、 P D 1 および N K G 2 A に関する標的化 P C R 増幅および S a n g e r シークエンシングによって測定する。マルチ抗体パネルを使用して、フローサイトメトリーによって C A R + 集団内の多重K O レベルを確認する。

【 0 2 2 8 】

したがって、この技術により、極めて特異的な座位に導入遺伝子が含まれること、および同時に多重編集が行われることの両方を有する N K 細胞が生成される可能性があり、これは現在利用可能な技術よりも優れる可能性がある。これらの編集された N K 細胞を、改良された C A R - N K 細胞として使用することができる。

【 0 2 2 9 】

[実施例 6]

4 つの遺伝子のノックアウトを有する、C R I S P R - アプタマーに基づく遺伝子編集システムによるユニバーサル C A R - T 細胞の生成

本実施例では、初代ヒト汎 T リンパ球を使用して、C A R 遺伝子の T R A C 座位への特異的な組込み、ならびにシトシン塩基編集システムによる T R A C 、 B 2 M 、 C D 5 2 および P D C D 1 遺伝子の同時ノックアウトに対する、C R I S P R に基づく遺伝子編集システムの有用性を立証した。本開示の方法により、塩基編集ガイド型ノックアウトが、 s g R N A - アプタマーによる標的部位へのデアミナーゼの動員を介して達成された。C A R 遺伝子の組込みおよびその結果としての T R A C ノックアウトは、 s g R N A と組み合

10

20

30

40

50

わせて C R I S P R システムに使用されたのと同じ酵素を用いて達成された。以前のシステムを上回る利点は、1つの C R I S P R 酵素、または単一の R N A ガイド型ニッカーゼを使用して、両方の改変が達成されることである。

【 0 2 3 0 】

抗 C D 3 抗体および抗 C D 2 8 抗体を使用して汎 T 細胞を活性化し、続いて以下の構成要素：デアミナーゼ - M C P 、 n C a s 9 - U G I - U G I タンパク質、 T R A C 遺伝子の第 1 のエクソン中の反対鎖を標的とする 2 つの s g R N A 、および 3 つの異なる遺伝子に対する s g R N A - アプタマーの m R N A 構成要素を使用してエレクトロポレーションを行った。 s g R N A によって認識される 2 つの標的座位で n C a s 9 - U G U - U G I によって生成される 2 つの單一ニックは、交互の二本鎖切斷 (D S B) をもたらす。エレクトロポレーションの後に、細胞に A A V 6 ウィルスによる形質導入を行い、これを用いて、相同指向性修復 (H D R) により、 T R A C 遺伝子とインフレームに C A R コード配列の組込みを促した。この座位で D S B によって誘導された H D R または非相同末端結合 (N H E J) による導入遺伝子の組込みは、 T R A C 遺伝子の効率的なノックアウトおよび T C R 複合体の破壊をもたらした。形質導入の後に、細胞を 4 ~ 7 日間インキュベートし、続いて、 C A R 発現ならびに T C R a / b 、 B 2 M 、 C D 5 2 および P D 1 の表面ノックアウトについてフローサイトメトリーによって検査した。塩基変換は、標的化 P C R 増幅および S a n g e r シークエンシングによって測定した。

10

【 0 2 3 1 】

塩基編集構成要素が細胞に送達された場合、高レベルの C から T への変換が、 3 つの標的座位である B 2 M 、 C D 5 2 および P D C D 1 において観察され、塩基編集効率はウィルスベクター送達によって損なわれなかった (図 8 A ~ C) 。それに対し、インデル形成による同程度のレベルの編集が、野生型 C a s 9 により 3 つの標的化座位である B 2 M 、 C D 5 2 および P D C D 1 で観察された (図 8 D ~ F) 。フローサイトメトリーによって生成された B 2 M 、 C D 5 2 および P D 1 遺伝子に対する機能的 K O は、塩基変換またはインデル形成と相関し、 w t C a s 9 によって生成されたノックアウトと同等であった (図 9 A ~ C) 。 C A R 陽性細胞または T C R a / b 陽性細胞として測定された C A R 組込みは、本塩基編集システムを用いて効率的に達成され、野生型 C a s 9 を用いて観察されたレベルと同等であった (図 10 A ~ B) 。

20

【 0 2 3 2 】

同種異系 C A R - T 細胞を、本開示の塩基編集システムを用いて生成させた。 C A R - T 細胞の作製のために、 T R A C 座位のエクソン 1 を標的とする一対の合成 s g R N A 、 B 2 M 、 C D 5 2 および P D C D 1 の塩基編集標的化のための s g R N A - アプタマー、ならびに n C a s 9 - U G I - U G I および A p o b e c 1 - M C P m R N A を、 C D 3 陽性 T 細胞に同時送達した。 C a s 9 試料に対して、野生型 C a s 9 m R N A および通常の s g R N A によるエレクトロポレーションを行った。これに続いて、ウィルスベクター A A V 6 - T R A C - C A R による形質導入を行った。エレクトロポレーションの約 7 日後に、 C D 3 + 細胞を培養物から枯渇させ、得られた C A R - T 細胞を、あらかじめカルセイン A M をロードした C D 1 9 陽性 R a j i 細胞と、 C A R - T : R a j i 細胞比 1 : 1 および 5 : 1 で 4 時間インキュベートした。図 11 に示されるように、本開示の同種異系 C A R - T 細胞は、抗原陽性がん細胞 (C D 1 9 陽性 R a j i 細胞) を効率的に死滅させ、これは w t C a s 9 の結果と同等であった。このデータは、この技術により、複数の遺伝子に機能的ノックアウトを有し、ユニバーサル C A R - T 細胞として効率的に機能する C A R - T 細胞を生成させることができることを示している。

30

40

【 0 2 3 3 】

材料および方法

塩基編集用ガイド R N A :

内部生成データを使用して、 P A M モチーフ (N G G) からの設定距離で計算された塩基編集ウィンドウを特定した。このデータを使用して、以下の遺伝子： T R A C 、 T R B C 1 、 T R B C 2 、 P D C D - 1 、 B 2 M および C D 5 2 (表 4) に関する表現型または

50

遺伝子 K O に適用可能なガイド配列を予測するアルゴリズムを開発した。sgRNA は、1 × MS2 アプタマーを含むように設計した。ガイド RNA 配列は、Horizon Discovery 社（以前の Dharmacon 社）および Agilent 社によって合成された。

【0234】

合成 1 × MS2 sgRNA 配列（配列番号 32）
 mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGCACA
 GAGGAUCACCCAUUGUGCUUUUmU*mU*U
 (m) 2 - O メチルおよび(*) ホスホロチオエート修飾残基
 ノックインガイド RNA :

10

TRAC 座位を破壊して、CD19 特異的な 1928z CAR 遺伝子をその転写制御下に置くために、本発明者らは、TRAC の第 1 のエクソンの 5' 末端を標的とする sgRNA ペアと、標的座位に対する相同性アームを有し、自己切断性 P2A ベプチドの後に CAR cDNA をコードする AA V ベクターとを設計した。TRAC 座位を標的とする sgRNA を、PAM-out 配置（PAM 部位が標的領域の外側に面する）の規則に従って設計し、切断部位が 40 ~ 70 bp 隔たるようにした。ノックインガイドは、1 × MS2 アプタマーを含まないように設計した。sgRNA は、Horizon Discovery 社（以前の Dharmacon 社）によって合成された。

20

【0235】

合成 sgRNA 配列（配列番号 29）
 mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U
 (m) 2 - O メチルおよび(*) ホスホロチオエート修飾残基
 5' sgRNA 配列（配列番号：30）
 mG*mA*GAAUCAAAUUCGGUGAAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA
 AGGCUAGUCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U
 3' sgRNA 配列（配列番号：31）
 mA*mA*CAAAUGUGUCACAAAGUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA
 AGGCUAGUCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U
 メッセンジャー RNA

30

メッセンジャー RNA 分子は、修飾ヌクレオチドであるブソイドウリジンおよび 5' - メチルシトシンを利用して、TriLink Biotechnologies 社によってカスタム合成された。mRNA 構成要素は以下のタンパク質：デアミナーゼ Apobec1 = NLS - rApobec1 - リンカー - MCP および nCas9 = NLS - nCas9 - UGI - UGI - NLS へと翻訳された。

【0236】

AAV プラスミドの構築

AAV プラスミドは、GenScript 社によってカスタム合成された。pAAV 骨格に基づいて、本発明者らは、pAAV - TRAC - 1928Z_CAR を設計した：ゲノム TRAC の 0.9 kb 左相同性アームとそれに隣接する 5' gRNA 標的化配列、GSG (gly-ser-gly) ベプチドとそれに続く TRAC の第 1 のエクソンを有するインフレームにある自己切断性 P2A ベプチド、Yes carta (商標) 療法に使用される 1928z CAR、ウシ成長ホルモンのポリ A シグナル (bGHPA)、およびゲノム TRAC の 0.9 kb 右相同性アームとそれに隣接する 3' gRNA 標的化配列。手短に述べると、CD19 - CAR (Kochenderfer ら、2009 年、J Immunotherapy) は、FMC63 マウスハイブリドーマ (Nicholson ら、1997 年、Mol Immunology) 由来のヒト CD19 に対して特異的な单鎖可変断片 scFV、ヒト CD28 分子の一部分（ヒンジ細胞外部分、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインの全体）および CD3 - ゼータ鎖のドメイン全体で構成された

40

50

。 C D 1 9 - C A R C D S を t u r b o G F P コード配列で置き換えた第 2 の A A V ベクターを設計し、クローニングする。

【 0 2 3 7 】

細胞

C D 3 + T 細胞は、全血から単離するか、または H e m a c a r e 社への外部委託とした。手短に述べると、末梢血単核細胞を密度勾配遠心分離 (S e p M a t e P B M C 単離チューブ、 S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s) によって単離し、続いて T リンパ球を E a s y S e p (商標) ヒト T 細胞単離キット (S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s) を使用して精製した。細胞を、 1 0 0 U / m l I L - 2 (S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s) および 1 × ペニシリン / ストレプトマイシン (T h e r m o F i s h e r) を添加した I m m u n o c u l t X T T C e l l E x p a n s i o n 培地 (S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s) 中の D y n a b e a d s (ビーズ：細胞が 1 : 1) H u m a n T - A c t i v a t o r C D 3 / C D 2 8 (T h e r m o F i s h e r) により、 3 7 および 5 % C O 2 下で 4 8 時間、細胞 1 0 ⁶ 個 / m l の密度で活性化した。活性化の後に、ビーズを磁石の上に置くことによって除去し、細胞を培養下に戻した。

【 0 2 3 8 】

T 細胞のエレクトロポレーション

活性化の 4 8 ~ 7 2 時間後に、 N e o n E l e c t r o p o r a t o r (T h e r m o f i s h e r) を使用して T 細胞のエレクトロポレーションを行った。 N e o n E l e c t r o p o r a t o r の条件は、デアミナーゼ - M C P および n C a s 9 - U G I - U G I の両方について、細胞 2 5 0 K 個の入った 1 0 μ l チップを用いた 1 6 0 0 v / 1 0 m s / 3 パルスを、合計 1 ~ 5 μ g の m R N A 量と組み合わせ、該当する場合には標的化 g R N A を各 2 μ M とした。エレクトロポレーション後の細胞を、 1 0 0 U / m l I L - 2 、 1 0 0 U / m l I L - 7 および 1 0 0 U / m l I L - 1 5 (S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s) を含む I m m u n o c u l t X T 培地に移し、 3 7 および 5 % C O 2 下で 4 8 ~ 7 2 時間培養した。

【 0 2 3 9 】

T 細胞の形質導入

組換え A A V 6 粒子は、 V i g e n e B i o s c i e n c e s 社によって生成された。該当する場合には、組換え A A V 6 粒子を、エレクトロポレーションの 2 ~ 4 時間後に、細胞 1 個当たり 1 × 1 0 ⁶ G C で培養物に添加した。その後に、編集された細胞を 3 7 および 5 % C O 2 下で 9 6 時間培養し、細胞約 1 × 1 0 ⁶ 個 / m l の密度を維持した。

【 0 2 4 0 】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーによる P D 1 の検出のために、細胞を分析前の 4 8 時間にわたり、 P M A (5 0 n g / m l) およびイオノマイシン (2 5 0 n g / m l) で刺激した。

【 0 2 4 1 】

T 細胞の実体および Q C は、 C D 3 抗体染色 (B i o l e g e n d) によって確認した。T 細胞の活性化は、 C D 2 5 染色によって確認した。 C D 1 9 - C A R + 細胞は、エレクトロポレーション / 形質導入の 9 6 時間後に、抗 F M C 6 3 s c F v 抗体 (A c r o B i o s y s t e m) を使用して検出した。表現型遺伝子の多重 K O は、エレクトロポレーション / 形質導入の 9 6 時間後に評価した： T R A C は T C R a b 抗体染色 (B i o l e g e n d) によって、 B 2 M は B 2 M 抗体 (B i o l e g e n d) によって、 C D 5 2 は C D 5 2 抗体 (B i o l e g e n d) によって、および P D 1 は P D 1 抗体 (B i o l e g e n d) によって確認し、いずれの表現型データも、生細胞染色によって確認された生細胞のパーセンテージとして報告した。

【 0 2 4 2 】

ゲノム D N A 解析

エレクトロポレーションの 9 6 時間後に、溶解した細胞からゲノム D N A を放出させた

10

20

30

40

50

。目的の座位を P C R によって増幅し、続いて産物を S a n g e r シークエンシング (G e n e w i z) に供した。データは、所有権のある社内ソフトウェアによって解析した。

【 0 2 4 3 】

死滅アッセイ

塩基編集技術を用いて生成された C A R - T 細胞の機能を試験するために、改変された C A R - T 細胞から、最初に E a s y S e p (商標) H u m a n C D 3 P o s i t i v e S e l e c t i o n K i t I I (S t e m c e l l) を使用して C D 3 陽性細胞を枯渇させ、続いて、 C D 1 9 陽性 R a j i 細胞と、 C A R - T : R a j i 細胞比 1 : 1 または 5 : 1 でインキュベートした。インキュベーションの前に、 R a j i 細胞にカルセイン A M をロードした。4 時間のインキュベーションの後に、培養物からの上清を回収し、励起 / 発光が 4 9 4 / 5 1 7 であるプレートリーダーを使用して蛍光発光について分析した。蛍光のレベルは、標的 R a j i 細胞の死滅のレベルに比例する。標的細胞死滅のパーセンテージは、 [(試験条件の平均値 - 陰性対照条件の平均値) / (陽性対照条件の平均値 - 陰性対照条件の平均値)] × 1 0 0 として計算され、ここで陰性対照条件は、 C A R - T 細胞を含まない R a j i 細胞であり、陽性対照条件は、完全な溶解を達成するために 2 % トリトンに曝露させた R a j i 細胞である。

10

【 0 2 4 4 】

[実施例 7]

i P S C の B 2 M 座位へのプロモーターレス導入遺伝子の組込みと、それとともに B 2 M 内因性プロモーターによって駆動される導入遺伝子の発現、ならびに B 2 M 発現の破壊および C I I T A 遺伝子の塩基編集

20

本実施例では、 i P S C を使用して、 B 2 M 座位へのプロモーターレス導入遺伝子 (G F P) の特異的組込み、ならびにシトシン塩基編集システムによる B 2 M および C I I T A 遺伝子の同時ノックアウトに対する、 C R I S P R - アブタマーに基づく遺伝子編集システムの有用性を立証した。本開示の方法により、塩基編集ガイド型ノックアウトが、 s g R N A - アブタマーによる標的部位へのデアミナーゼの動員を介して達成された。 G F P の組込みおよびその結果としての B 2 M ノックアウトは、 s g R N A と組み合わせて C R I S P R システムに使用されたのと同じ酵素によって達成された。以前のシステムを上回る利点は、 1 つの C R I S P R 酵素、または単一の R N A ガイド型ニッカーゼを使用して両方の改変が達成されたことであり、すなわち、導入遺伝子のノックインならびに B 2 M および C I I T A 遺伝子のノックアウトのために同じ酵素が使用された。

30

【 0 2 4 5 】

本実施例では、外因性 D N A 鑄型を、環状または直鎖状二本鎖 D N A の形態で送達した。外因性 D N A 鑄型は、 B 2 M 座位由来の相同性アームによって挟まれた。相同性アームを有する外因性 D N A 鑄型は、 s g R N A B 2 M 標的化配列 (C R I S P R / C a s 9 標的配列 (C T S)) (それぞれ図 1 3 A および B) によって挟まれるか、または挟めなかった。場合によっては、相同性アームによって挟まれた G F P 導入遺伝子は、 B 2 M 座位を標的とする g R N A ペアの配列によって挟まれ、その結果、環状二本鎖 D N A が細胞内に C R I S P R 構成要素と一緒に同時に送達されると、ドナー核酸配列は、 C R I S P R / C a s による切断の後に環状 d s D N A から直鎖状 D N A として放出された。

40

【 0 2 4 6 】

i P S C に対して、以下の構成要素： (i) デアミナーゼ - M C P をコードする m R N A (配列番号 : X X) 、 (i i) n C a s 9 - U G I - U G I タンパク質をコードする m R N A 、 (i i i) B 2 M 遺伝子の第 1 のエクソン中の反対鎖を標的とする 2 つの s g R N A 、 (i v) C I I T A 遺伝子に対する s g R N A - アブタマー、および (v) B 2 M 遺伝子に対する相同性アームを有する G F P コード配列を含む環状または直鎖状の二本鎖 D N A によるエレクトロポレーションを行った。環状形態および直鎖状形態において、相同性アームは、 s g R N A B 2 M 標的化配列 (C R I S P R / C a s 9 標的配列 (C T S)) によって挟まれることも (C T S _ B 2 M _ t G F P - 配列番号 : 1 3 6) 、または挟まれないことも (B 2 M _ t G F P - 配列番号 : 1 3 5) 可能である。

50

【 0 2 4 7 】

B 2 M - t G F P - 配列番号 : 1 3 5 :

CCGTGGCCTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTCTGGCCTGGAGGTAAATTCAATT
 CATTCAATCCATTGTTCAATTGGTTACTGAGTACCTACTATGTGCCAGCCCC
 TGTTCTAGGGTGGAAACTAAGAGAATGATGTACCTAGAGGGCGCTGGAAGCTCTAA
 AGCCCTAGCAGTTACTGCTTTACTATTAGTGGCGTTCTCCCCCCCCGCC
 CCGACAAATCAACAGAACAAAGAAAATTACCTAAACAGCAAGGACATAGGGAGGAA
 CTTCTGGCACAGAACTTCAAACACTTTCTGAAGGGATAACAAGAAGCAAGA
 AAGGTACTCTTCACTAGGACCTCTGAGCTGTCCTCAGGATGCTTTGGGACT
 ATTTTCTTACCCAGAGAATGGAGAACCCCTGCAGGGAATTCCCAAGCTGTAGTTA 10
 TAAACAGAAGTTCTCCTCTGCTAGGTAGCATTCAAAGATCTTAATCTTCTGGGTT
 TCCGTTTCTCGAATGAAAAATGCAGGTCCGAGCAGTTAAGTGGCTGGGACCCAT
 TAGCAAGTCACTTAGCATCTCTGGGCCAGTCTGCAAAGCAGGGGGCAGCCTTAA
 TGTGCCTCCAGCCTGAAGTCCTAGAATGAGCGCCCGGTGTCCTAAGCTGGGCGCG
 CACCCCAGATCGGAGGGCGCGATGTACAGACAGCAAACACTCACCCAGTCTAGTGCA
 TGCCTTCTTAAACATCACGAGACTCTAAGAAAAGGAAACTGAAAACGGAAAGTCC
 CTCTCTCTAACCTGGCACTGCGTCGCTGGCTTGGAGACAGGTGACGGTCCCTGCGG
 GCCTTGTCCCTGATTGGCTGGCACCGTTAATATAAGTGGAGGCGTCGCGCTGGC
 GGCATTCTGAAGCTGACAGCATTGGGACGAGatggagagagcagagagcggctgcc 20
 cggccatggagatcgagtggccgatcaccggcacccctgaacggcggtggagttcgagctggtggcgcc
 ggagagggcaccccgagcagggccgatgaccaacaagatgaagagcaccaaaggccctgac
 cttcagccctacctgctgagccacgtgatggctacggcttaccacttggcacctacccagcg
 gctacgagaaccccttctgcacgcccataacaacacggcgctacaccaacacccgcatcgagaagta
 cgaggacggcggtgctgacgtgagcttgcacgttaccgtacgaggcccggtgatcgccgac
 ttcaaggtgatgggacccggctcccgaggacagcgtgatcttaccgacaagatcatccgcagcaa 30
 cggccaccgtggagcacctgcacccatggcgataacgatctggatggcagcttccaccgcaccc
 gcctgcgcacggcgctactacagctccgtggacagccacatgcacttcaagagcgccatcca
 cccagcatctgcagaacggggccatgttgccttcgcgcgtggaggaggatcacagcaac
 accgagctgggcatcgtggagttaccagcacgcctcaagacccggatgcagatgcgggtgaagaat
 gactgtgcctctagttccagccatctgttgcctcccccgtgccttgcaccctggaaaggt
 gccactcccactgtcccttctaataaaatgagggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattcta 40
 ttctgg
 gggatgcggggggctatggGGAGGTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCCTCCGCT
 TGGTCCTTCCCTCTCCGCTCTGCACCCCTCTGTGGCCCTCGCTGTGCTCTCGCTCC
 GTGACTTCCCTCTCCAAGTTCTCCTGGTGGCCCGCCGTGGGCTAGTCCAGGGC
 TGGATCTGGGGAAAGCGGGGGGTGGCCTGGAGTGGGAAGGGGGTGCACCCCG
 GGACGCGCGCTACTTGCCTTTCGGGGAGCAGGGAGACCTTGGCTACGG
 CGACGGGAGGGTGGGACAAAGTTAGGGCGTCGATAAGCGTCAGAGCGCCGAGGT
 TGGGGGAGGGTTCTTCCGCTCTTCGCGGGGCTCTGGCTCCCCCAGCGCAGC
 TGGAGTGGGGGACGGGTAGGCTCGTCCCAAAGGGCGGGCTGAGGTTGTGAACG
 CGTGGAGGGCGCTTGGGTCTGGGGAGGGCGTCGCCCGGGTAAGCCTGTCTGCTG
 CGGCTCTGCTTCCCTAGACTGGAGAGCTGTGGACTTCGTCTAGGCAGCCGCTAAG
 TTCGCATGTCCTAGCACCTCTGGTCTATGTGGGCCACACCGTGGGAGGAAACA
 GCACGCGACGTTGTAGAATGCTGGCTGTGATACAAAGCGGTTCGAATAATTAA
 CTTATTGTTCCCATCACATGTCACTTAAAAAATTATAAGAACTACCCGTTATTG
 ACATCTTCTGTGTGCCAAGGACTTATGTGCTTGCCTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTTTCT
 GTTATCTTCCGCCATAGATAACTACTATGGTTATCTTCTGCCTCTCACAGATGAAG
 AAACTAAGGCACCGAGATTTAAGAAACTTAATTACACAGGGATAAAATGGCAGCA
 ATCGAGATTGAAGTCAAGCCGTGGCCTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTTTCT
 GGCGTGGAGG 50

C T S _ _ B 2 M _ t G F P - 配列番号 1 3 6 :

TAATTCAATTCAATTCAATTCCATTGTTCAATTGGTTACTGAGTACCTACTATGT
 GCCAGCCCCCTGTTCTAGGGTGGAAACTAAGAGAATGATGTACCTAGAGGGCGCTGG
 AAGCTCTAAAGCCTAGCAGTTACTGCTTTACTATTAGTGGTCGTTTTCTCCC
 CCCCCGCCCCCGACAAATCAACAGAACAAAGAAAAATTACCTAAACAGCAAGGACAT
 AGGGAGGAACCTTCTTGGCACAGAACCTTCCAAACACTTTCTGAAGGGATACAA
 GAAGCAAGAAAGGTACTCTTCACTAGGACCTTCTGAGCTGTCCTCAGGATGCT
 TTTGGGACTATTTTCTTACCCAGAGAATGGAGAAACCTGCAGGGAAATTCCCAAG
 CTGTAGTTATAAACAGAAGTTCTCCTTCTGCTAGGTAGCATTCAAAGATCTTAATC
 TTCTGGGTTTCCGTTCTCGAATGAAAAATGCAGGTCCGAGCAGTTAAGTGGCTG 10
 GGGCACCAATTAGCAAGTCACCTAGCATCTCTGGGCCAGTCTGCAAAGCGAGGGGG
 CAGCCTTAATGTGCCTCCAGCCTGAAGTCCTAGAATGAGCGCCGGTGTCCCAAGC
 TGGGGCGCGCACCCCCAGATCGGAGGGCGCCGATGTACAGACAGCAAACCTACCCAG
 TCTAGTGCATGCCTTCTTAAACATCACGAGACTCTAAGAAAAGGAAACTGAAAACG
 GGAAAGTCCCTCTCTAACCTGGCACTGCGTCGCTGGCTTGGAGACAGGTGACGG
 TCCCTGCAGGGCTTGTCTGATTGGCTGGCACCGCGTTAATATAAGTGGAGGC
 CGCGCTGGCGGGCATTCCGAAGCTGACAGCATCGGGACGAGatggagagcag
 agcgccctgcccgcattggagatcgagtgccgcatcaccggcaccctgaacggcgtgg
 agtgcg 20
 tggggcggggagagggcaccggcagcaggccgcattggaccaacaagatgaagag
 gacccaaaggccctgacccttgcggccatggagatcgagtgccgcatcaccggcacc
 ctaccccgccatggagatcgagtgccgcatcaccggcaccctgaacggcgtgg
 atcgagaagtacgaggacggccggcgatgcacgtgacggatccatggcggccgc
 gtgatcggcgacttcaaggatggatggccggatccggatccggatccggatccgg
 atccgcagcaacgcaccgtggagcaccctgcacccatggcgataacgatctgg
 accccgcacccatccgcggctactacagctccgtggacagccacatgcactcaa
 gagcccatccacccagcatcctgcagaacggggcccatgttcgcctccgcgtgg
 gatcacagcaacaccgagctggcatctggatccggatccggatccggatccgg
 ccggtaagaatgactgtgcctctagtgccagccatctgttgcctccgc
 accctggaaagggtgccactcccactgtcccttaataaaatgaggaaattgc
 atcgcatcgattgtcatttctgggggtggggcaggacagcaaggggaggattgg
 acaata 30
 gcaggcatgtgggatgcggggatgcggatgcggatgcggatgcggatgcgg
 CCTCCCGCTCTGGTCCTTCCCTCTCCCGCTCTGCACCCCTCTGTGGCCCTCGCT
 CTCTCGCTCCGTGACTTCCCTCTCCAAGTTCTCCTTGGTGGCCCGCGTGGGCTA
 GTCCAGGGCTGGATCTGGGGAAAGCGGGGGGTGGCCTGGGAGTGGGAAGGGGT
 GCGCACCCGGGACGCGCGCTACTTGCCCCCTTCGGCGGGAGCAGGGAGACCTT
 GGCGTACGGCGACGGGAGGGTCGGGACAAAGTTAGGGCGTCGATAAGCGTCAGAG
 CGCCGAGGTTGGGGAGGGTTCTCTCCGCTCTTCGGCCCTCTGGCTCCCC
 CAGCGCAGCTGGAGTGGGGACGGTAGGCTCGTCCAAAGGGCGGGCGCTGAGGT
 TTGTGAACGCGTGGAGGGCGCTTGGGTCTGGGGAGGGCGTCGCCCCGGTAAGCC
 TGTCTGCTGCGGCTCTGCTTCCCTAGACTGGAGAGCTGTGGACTTCGTCTAGGC
 CCCGCTAAGTTGCATGTCTAGCACCTCTGGGCTATGTGGGCCACACCGTGGG
 GAGGAAACAGCACGCGACGTTGTAGAATGCTTGGCTGTGATACAAAGCGGTT
 AATAATTAACTTATTGTTCCCATCACATGTCACTTAAAAAATTATAAGAACTA
 CCCGTTATTGACATCTTCTGTGTGCCAAGGACTTTATGTGCTTGCCTCATTAA
 TTTGAAAACAGTTATCTTCCGCCATAGATAACTACTATGGTTATCTTCTGCCT
 CAGATGAAGAAACTAAGGCACCGAGATTTAAGAAACTTAATTACACAGGGATAA
 ATGGCAGCAATCGAGATTGAAGTCAAG 40

B 2 M エクソン 1 中の s g R N A によって認識される 2 つの標的座位で n C a s 9 - U
 G U - U G I によって生成される 2 つの単一ニックは、交互の二本鎖切断 (D S B) をも
 たらした。 G F P 導入遺伝子の組込みは、相同組換え修復 (H D R) により、 B 2 M 座位

に対する相同性アームによって促された。この座位で D S B によって誘導される H D R または非相同末端結合 (N H E J) による導入遺伝子の組込みは、B 2 M 遺伝子の効率的なノックアウトをもたらした。B 2 M 発現レベルは i P S C を含む多能性幹細胞では低く、インターフェロン - γ による処置によって誘導することができた。B 2 M の機能的ノックアウトおよび B 2 M 座位における G F P ノックインの成功を検出するために、エレクトロポレーションの 2 日後または 4 日後に、編集された細胞をインターフェロン - γ により 48 時間処置し、続いてフローサイトメトリーによって分析した。C I I T A 座位での塩基変換を、エレクトロポレーションの 4 ~ 6 日後に標的化 P C R 増幅および S a n g e r シークエンシングによって測定した。

【 0 2 4 8 】

10

塩基編集構成要素、および B 2 M に対する相同性アームを有する t G F P コード配列を含む環状二本鎖 D N A が細胞に送達された場合、C から T への変換が標的化 C I I T A 座位で観察され、塩基編集効率はドナー D N A の送達によって損なわれなかった (図 15 A)。効率的な B 2 M ノックアウトが観察された (図 15 B)。インターフェロン - γ で処置した細胞における t G F P 陽性細胞として測定された、B 2 M 座位における t G F P の組込みが達成された (図 15 C)。最も高度の組込みは、s g R N A - B 2 M 標的化配列 (C T S - B 2 M - t G F P) によって両側から挟まれたドナー鑄型を用いて達成された。予想された通り、G F P 陽性細胞の大部分は B 2 M 陰性である (図 15 D)。

【 0 2 4 9 】

20

塩基編集構成要素、および B 2 M に対する相同性アームを有する t G F P コード配列を含む直鎖状二本鎖 D N A が細胞に送達された場合、C から T への変換が標的化 C I I T A 座位で観察され、塩基編集効率はドナー D N A の送達によって損なわれなかった (図 16 A)。効率的な B 2 M ノックアウトが観察された (図 16 B)。インターフェロン - γ で処置した細胞における t G F P 陽性細胞として測定された、B 2 M 座位における t G F P の組込みが達成された (図 16 C)。最も高度の組込みは、s g R N A - B 2 M 標的化配列 (C T S - B 2 M - t G F P) によって両側から挟まれたドナー鑄型を用いて達成された。予想された通り、G F P 陽性細胞の大部分は B 2 M 陰性である (図 16 D)。

【 0 2 5 0 】

[実施例 8]

C R I S P R - アプタマーに基づく遺伝子編集システムによるユニバーサル i P S C の生成

30

本実施例では、i P S C を使用して、B 2 M 座位への s c H L A - E 三量体導入遺伝子の特異的組込み (構築物の概略図については図 12 を参照)、ならびにシトシン塩基編集システムによる B 2 M および C I I T A 遺伝子の同時ノックアウトに対する、C R I S P R - アプタマーに基づく遺伝子編集システムの有用性を立証した。本開示の方法により、塩基編集ガイド型ノックアウトが、s g R N A - アプタマーによる標的部位へのデアミナーゼの動員を介して達成された。s c H L A - E 三量体の組込みおよびその結果としての B 2 M ノックアウトは、s g R N A と組み合わせて C R I S P R システムに使用されたのと同じ酵素によって達成された。以前のシステムを上回る利点は、1 つの C R I S P R 酵素、または単一の R N A ガイド型ニッカーゼを使用して、両方の改変が達成されたことであり、すなわち、s c H L A - E 三量体導入遺伝子のノックインならびに B 2 M および C I I T A 遺伝子のノックアウトのために同じ酵素が使用された。

40

【 0 2 5 1 】

本実施例では、外因性 D N A 鑄型を、環状二本鎖 D N A の形態で送達した。外因性 D N A 鑄型は、B 2 M 座位由来の相同性アームによって挟まれ、s g R N A - B 2 M 標的化配列によって両側から挟まれるか、または挟まれなかつた (図 13)。場合によっては、相同性アームによって挟まれた s c H L A - E 三量体導入遺伝子は、B 2 M 座位を標的とする g R N A ペアの配列によって挟まれ、その結果、環状二本鎖 D N A が細胞内に C R I S P R 構成要素と一緒に同時に送達されると、ドナー核酸配列は、C R I S P R / C a s による切断の後にプラスミドから直鎖状 D N A として放出される。

50

【0252】

図14は、好適なs c H L A - E三量体送達方法の一例の概略図を示す。本実施例では、s c H L A - E三量体遺伝子は、上流のB 2 M座位とインフレームに、B 2 M座位のエクソン1に組み込まれた。外因性DNA鑄型は、相同性配列(L H AおよびR H A)によって挟まれたs c H L A - E三量体コード配列を含んでいた。ひとたび組み込まれると、s c H L A - E三量体の発現は内因性B 2 Mプロモーターによって駆動され、一方、B 2 M座位は破壊された。

【0253】

i P S Cに対して、以下の構成要素：(i) デアミナーゼ - M C Pをコードするm R N A、(i i) n C a s 9 - U G I - U G Iタンパク質をコードするm R N A、(i i i) B 2 M遺伝子の第1のエクソン中の反対鎖を標的とする2つのs g R N A、(i v) C I I T A遺伝子に対するs g R N A - アプタマー、および(v) s c H L A - E三量体コード配列を含む環状二本鎖外因性DNA鑄型によるエレクトロポレーションを行った。s g R N Aによって認識される2つの標的座位でn C a s 9 - U G U - U G Iによって生成される2つの単一ニックは、交互の二本鎖切断(D S B)をもたらした。s c H L A - E三量体導入遺伝子の組込みは、相同指向性修復(H D R)により、B 2 M座位に対する相同性アームによって促された。この座位でD S Bにより誘導されるH D Rまたは非相同末端結合(N H E J)による導入遺伝子の組込みは、B 2 M遺伝子の効率的なノックアウトをもたらした。B 2 M発現レベルはi P S Cを含む多能性幹細胞では低く、インターフェロン- γ による処置によって誘導することができる。B 2 Mの機能的ノックアウトおよびB 2 M座位におけるs c H L A - E三量体ノックインの成功を検出するために、エレクトロポレーションの2日後または4日後に、編集された細胞をインターフェロン- γ により4時間処置し、続いてフローサイトメトリーによって分析した。C I I T A座位での塩基変換を、エレクトロポレーションの4~6日後に標的化P C R增幅およびS a n g e rシーケンシングによって測定した。

【0254】

塩基編集構成要素、およびB 2 Mに対する相同性アームを有するs c H L A - E三量体コード配列を含む環状二本鎖DNAが細胞に送達された場合、CからTへの変換が標的C I I T A座位で観察され、塩基編集効率はドナーDNAの送達によって損なわれなかつた(図17A)。効率的なB 2 Mノックアウトが観察された(図17B)。インターフェロン- γ で処置した細胞におけるs c H L A - E三量体陽性細胞として測定された、B 2 M座位におけるs c H L A - E三量体の組込みが達成された(図17C)。最も高度の組込みは、s g R N A B 2 M標的化配列(C T S _ B 2 M _ s c H L A - 三量体)によって両側から挟まれたドナー鑄型を用いて達成された。

【0255】

このデータは、本塩基編集システムが、導入遺伝子の部位特異的組込みおよびB 2 Mの機能的ノックアウトを、他の座位(C I I T A)での高レベルの塩基編集を達成しながら、効率的に誘導できることを示す。これらの遺伝子改変により、免疫原性の低いユニバーサルi P S Cの生成が可能となる。

【0256】

実施例7および8に関する材料および方法

塩基編集用ガイドR N A :

内部生成データを使用して、P A Mモチーフ(N G G)からの設定距離で計算された塩基編集ウインドウを特定した。このデータを使用して、C I I T A(表X)に関する表現型または遺伝子K Oに適用可能なガイド配列を予測するアルゴリズムを開発した。1 x M S 2アプタマーを含むs g R N Aを設計した。ガイドR N A配列は、H o r i z o n D i s c o v e r y社(以前のD h a r m a c o n社)およびA g i l e n t社によって合成された。

【0257】

合成1 x M S 2 s g R N A配列(配列番号32)

10

20

30

40

50

mN * mN * NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUUAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGCGCACAU
GAGGAUCACCCAUUGUGCUUUUmU * mU * U

(m) 2-0メチルおよび(*) ホスホロチオエート修飾残基

【 0 2 5 8 】

【表 6 - 1】

表 6: CIITA 遺伝子に対する単一ガイド RNA(sgRNA)における crRNA 配列。例示された塩基編集技術を使用して機能的ノックアウトを作り出すことができるガイド RNA 配列のためのガイド設計の例示的リスト。このリストは、所有権のある社内ソフトウェアによって作製された中途終止コドンおよびスプライス破壊部位の導入に対して特異的なガイドを含む。

10

遺伝子名	ガイドID	KOの種類*	鎖	ガイド配列	配列番号	PAM
CIITA	CIITA_1	終止	センス	GAGCCCCAAGGTAAAAAGGC	137	CGG
	CIITA_2	終止	センス	AGCCCCAAGGTAAAAAGGCC	138	GGG
	CIITA_3	終止	センス	CAGCTCACAGTGTGCCACCA	139	TGG
	CIITA_4	終止	センス	TATGACCAGATGGACCTGGC	140	TGG
	CIITA_5	終止	センス	ACTGGACCAGTATGTCTTC	141	AGG
	CIITA_6	終止	センス	TGTCTTCCAGGACTCCCAGC	142	TGG
	CIITA_7	終止	センス	CTTCCAGGACTCCCAGCTGG	143	AGG
	CIITA_8	終止	センス	TTCCAGGACTCCCAGCTGGA	144	GGG
	CIITA_9	終止	アンチ	TTCCAGTGCTTCAGGCTCTG	145	CGG
	CIITA_10	終止	センス	TTCAACCAGGAGGCCAGCCTC	146	CGG
	CIITA_11	終止	センス	GACCAGATTCCCAGTATGTT	147	AGG
	CIITA_12	終止	センス	ACCAGATTCCCAGTATGTTA	148	GGG
	CIITA_13	終止	センス	CTCTGGCAAATCTCTGAGGC	149	TGG
	CIITA_14	終止	センス	AGCCAAGTACCCCCCTCCAG	150	TGG
	CIITA_15	終止	センス	ACCTCCGAGCAAACATGAC	151	AGG
	CIITA_16	終止	センス	CCCACCCAATGCCGGCAGC	152	TGG
	CIITA_17	終止	アンチ	AGGCCATTGGAAAGCTTGT	153	TGG
	CIITA_18	終止	センス	TGGTGCAGGCCAGGCTGGAG	154	AGG
	CIITA_19	終止	センス	GAACGGCAGCTGGCCAAGG	155	AGG
	CIITA_20	終止	センス	GGCCCAAGGAGGCCTGGCTG	156	AGG
	CIITA_21	終止	センス	GACACGAGTGATTGCTGTGC	157	TGG
	CIITA_22	終止	センス	ACACGAGTGATTGCTGTGCT	158	GGG
	CIITA_23	終止	センス	CTGGTCAGGGCAAGAGCTAT	159	TGG
	CIITA_24	終止	センス	TGGTCAGGGCAAGAGCTATT	160	GGG
	CIITA_25	終止	センス	TTCCAGAAGAAGCTGCTCCG	161	AGG
	CIITA_26	終止	センス	CAGACATCAAAGTACCCCTAC	162	AGG
	CIITA_27	終止	センス	ACATCAAAGTACCCCTACAGG	163	AGG
	CIITA_28	終止	アンチ	CGCCCCAGGTCTCACGTCTG	164	CGG
	CIITA_29	終止	センス	CTTAGTCCAACACCCACCGC	165	GGG
	CIITA_30	終止	センス	GGAAGCAGAAGGTGCTTGC	166	AGG
	CIITA_31	終止	センス	GGCTGCAGCCGGGGACACTG	167	CGG
	CIITA_32	終止	センス	GCTGCAGCCGGGGACACTGC	168	GGG
	CIITA_33	終止	アンチ	CTGCCAAATTCACGCCCTCCT	169	CGG
	CIITA_34	終止	センス	GGCGGGCCAAGACTTCTCCC	170	TGG
	CIITA_35	終止	センス	TGTGCAGACTCAGAGGTGAG	171	AGG
	CIITA_36	終止	センス	AGACTCAGAGGTGAGAGGAG	172	AGG
	CIITA_37	終止	センス	CTCAGAGGTGAGAGGAGAGG	173	CGG
	CIITA_38	終止	センス	CGTCCAGTACAACAAGTTCA	174	CGG

20

30

40

【 0 2 5 9 】

【表6-2】

CIITA_39	スプライス	アンチ	TTTTACCTTGGGGCTCTGAC	175	AGG
CIITA_40	スプライス	アンチ	TTCTGGGAGGAAAAGTCCT	176	TGG
CIITA_41	スプライス	アンチ	TACTGAAAATGTCCTTGCTC	177	AGG
CIITA_42	スプライス	アンチ	CACCTGGCTTCCAGTGCTTC	178	AGG
CIITA_43	スプライス	アンチ	GGGCTCAGCTGTGAGGAAGT	179	GGG
CIITA_44	スプライス	アンチ	TAACATACTGGGAATCTGGT	180	CGG
CIITA_45	スプライス	アンチ	CTTACCTGTCATGTTGCTC	181	GGG
CIITA_46	スプライス	アンチ	CCTTACCTGTCATGTTGCT	182	CGG
CIITA_47	スプライス	アンチ	TGCTCTGGAGATGGAGAAGC	183	AGG
CIITA_48	スプライス	アンチ	ACCGGCTCTGCAAAGGCCAG	184	GGG
*終止=中途終止 コドン、スプライス =スプライス部位 の破壊					

【0260】

ノックインガイドRNA:

B2M座位を破壊して、scHLA-E三量体遺伝子をその転写制御下に置くために、本発明者らは、B2Mの第1のエクソンの5'末端を標的とするsgRNAペアと、標的座位に対する相同性アームを有し、scHLA-E三量体をコードするドナーDNA鑄型とを設計した。B2M座位を標的とするsgRNAを、PAM-out配置（PAM部位が標的領域の外側に面する）の規則に従って設計し、切断部位が40~70bp隔たるようにした（表7）。ノックインガイドは、1×MS2アプタマーを含まないように設計した。sgRNAは、Horizon Discovery社（以前のDharmacon社）によって合成された。

【0261】

合成sgRNA配列（配列番号29）

10

20

30

40

50

mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAA
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU*mU*U
 (m) 2 - Oメチルおよび(*)ホスホ口チオエート修飾残基

5 ' s g R N A 配列 2 (配列番号 : 1 8 5)

mC * mG * CGAGCACAGCUAAGGCCAGUUUAGAGCUAGAAAAGCAAGUUAAAUA
AGGUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUMU * mU * U
3' s g R N A 配列 2 (配列番号: 186)

m A * m C * U C U C U C U U U C U G G C C U G G G U U U

AGGUAGUCCGUUAUCUACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGGUUm U * m U * U
[0 2 6 2]

【表7】

10

卷之三

表 7. B2M 座位におけるスクレイン組込みのための單一ガイド RNA。対として使用され、実施例の nCas9-UGI-UGI と組み合わされた場合に、反対鎖に 2 つのニックを生成して、機能的ノックアウトを作り出し、例示された塩基編集技術および座位に対する相同意アームを有するテンプレート導入遺伝子を使用した部位特異的組込みを誘導するガイド RNA 配列のためのガイド設計の例示的リスト。組込み部位の 5' 側に位置する PAM を有する單一ガイド RNA は、組込み部位の 3' 側に位置する PAM を有する單一ガイド RNA と組み合わせる必要がある。

遺伝子名	ガイド ID	鎖	組込み部位に対する PAM の位置	スペーサー配列	配列 ID:	PAM
B2M	B2M_5'_1	アンチ	5'	GCCCCGAATGCTGTCAGCTTC	187	AGG
	B2M_5'_2	アンチ	5'	GGCCACGGAGCGAGACATCT	188	CGG
	B2M_5'_3	アンチ	5'	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	189	CGG
	B2M_5'_4	アンチ	5'	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	190	AGG
	B2M_3'_1	センス	3'	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	191	TGG
_	B2M_3'_2	センス	3'	CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	192	TGG
_	B2M_3'_3	センス	3'	GCTACTCTCTCTTCTGGGCC	193	TGG
	B2M_3'_4	センス	3'	ACTCTCTCTTCTGGCCTGG	194	AGG

20

30

【 0 2 6 3 】

メッセンジャー RNA

メッセンジャーRNA分子は、修飾ヌクレオチドであるブソイドウリジンおよび5'-メチルシトシンを利用して、TriLink Biotechnologies社によってカスタム合成された。mRNA構成要素は以下のタンパク質：デアミナーゼApobec1=NLS-rApobec1-リンカー-MCPおよびnCas9=NLS-nCas9-UGI-UGI-NLSへと翻訳された。

【 0 2 6 4 】

40

ドナ - D N A 鑄型の構築

ドナー-DNA鑄型は、GenScript社によってカスタム合成され、pUC19クローニングプラスミド中にクローニングされた。sHLA-E三量体をコードするドナーダNA鑄型は、以下のもの：ゲノムB2Mの0.9kb左相同性アームとそれに隣接する5'gRNA標的化配列、sHLA-E三量体コード配列、ウシ成長ホルモンのポリAシグナル(bGHPA)、およびゲノムB2Mの0.9kb右相同性アームとそれに隣接する3'gRNA標的化配列を順に含んだ。手短に述べると、sHLA-E三量体は、以下の要素：(a)B2Mのリーダーペプチド、(b)VMAPRTLIL(HLA-E結合ペプチド)、(c)15アミノ酸リンカー(G4S)3、(d)成熟ヒトB2M、(e)20アミノ酸リンカー(G4S)4、および(f)成熟HLA-E重鎖を含む

50

キメラタンパク質である。相同性アームを有するドナーDNA鑄型は、B2M座位を標的とするsgRNA標的化配列によって両側から挟まれているか、または挟まれていない。sHLA-E三量体コード配列をturboGFPコード配列で置き換えた第2のドナーDNA鑄型を設計し、クローニングした。ドナーDNA鑄型の直鎖状二本鎖形態を得るために、上記のプラスミドを特異的制限酵素によって消化して、プラスミドからドナーDNA鑄型を切り出した。続いて、ゲル精製キットを使用したゲル電気泳動の後に、正しいサイズの断片を精製した。

【0265】

ヒトiPSCの培養

凍結ヒトiPSCを、ThermoFisher Scientificから入手した(Gibcoライン)。細胞を解凍し、ビトロネクチン-XF(STEMCELL Technologies)でコーティングした非付着細胞培養プラスチック器具(Greiner Bio-One)上で、mTesr-PLUS培地(STEMCELL Technologies)中にて、37°Cおよび5% CO₂下で培養した。集密化した時点で、細胞をVersene解離試薬(ThermoFisher Scientific)を使用して凝集塊として継代した。培地を1~3日間隔で交換し、細胞を必要に応じて3~5日間隔で継代した。

【0266】

ヒトiPSCのエレクトロポレーションおよびエレクトロポレーション後の培養

エレクトロポレーションの2~4時間前に、iPSCに10 μMのY-27632(STEMCELL Technologies)を含む新鮮なmTesr-PLUS培養培地(STEMCELL Technologies)を与え、続いてAccutase(ThermoFisher Scientific)を使用して単細胞に解離させた。150k~200k個の細胞を20 μlの緩衝液P3(Lonza)に再懸濁させて、デアミナーゼ-MCPおよびnCas9-UGIタンパク質をコードする1~4 μgの改変mRNA(Trilink)、1~4 μMの各sgRNA(Agilent)ならびに1~2 μgのドナーDNAと合わせた。エレクトロポレーションは、4D Nucleofector(Lonza)を用い、16×20 μlのマルチウェルキュベット中にてプログラムCM138またはDN100を使用して実施した。エレクトロポレーションの後に、Geltrex(ThermoFisher Scientific)でコーティングした細胞培養プラスチック器具(Corning)上で、10 μMのRhöキナーゼ阻害剤Y-27632(STEMCELL Technologies)を含めたmTesr-PLUS(STEMCELL Technologies)中に細胞を播種し、細胞の生存を促すためにエレクトロポレーション後24時間、培地中に置いた。エレクトロポレーションの2日後または4日後に、細胞をmTesr-PLUS培養培地(STEMCELL Technologies)中にて濃度100 ng/mlのインターフェロン-αにより48時間処置した後に、フローサイトメトリー分析を行った。

【0267】

フローサイトメトリー

sHLA-E三量体陽性細胞を、インターフェロン-αにより48時間処置した後に、抗HLA-E抗体(Biolegend)を使用して検出した。B2Mの表現型ノックアウトを、インターフェロン-αにより48時間処置した後に、B2M-抗体(Biolegend)を使用して評価し、いずれの表現型データも、生細胞染色によって確認された生細胞のパーセンテージとして報告した。

【0268】

ゲノムDNA解析

エレクトロポレーションの96時間後に、溶解した細胞からゲノムDNAを放出させた。目的の座位をPCRによって增幅し、続いて産物をSangerシークエンシング(Genewiz)に供した。データは、所有権のある社内ソフトウェアによって解析した。

10

20

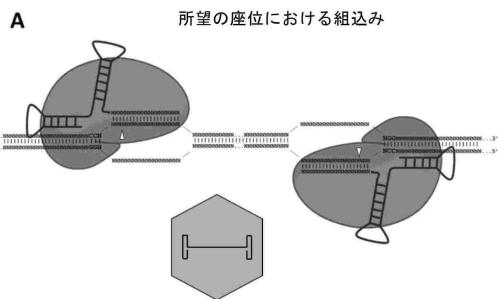
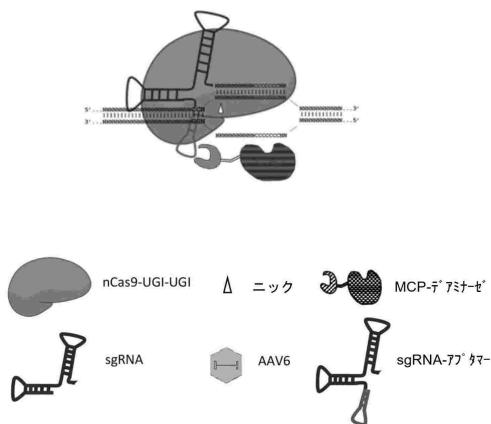
30

40

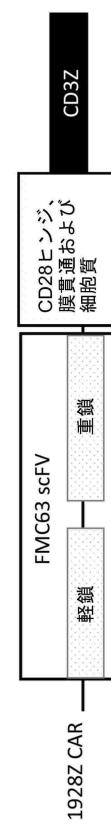
50

【図面】

【図1】

**B** 1つまたは複数の座位での塩基編集ノックアウト

【図2】



10

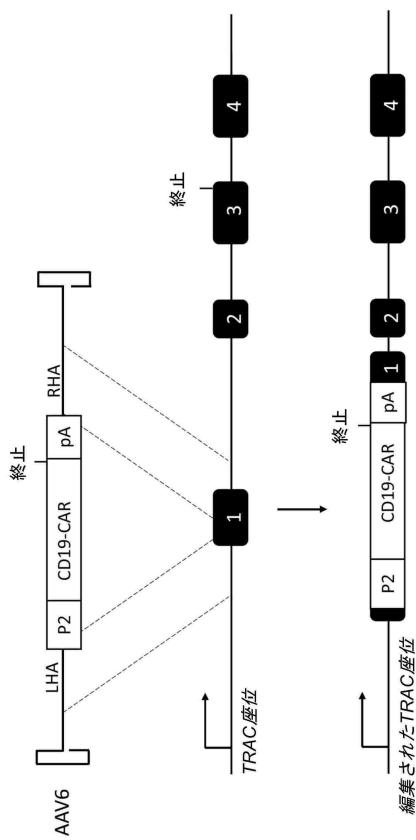
20

30

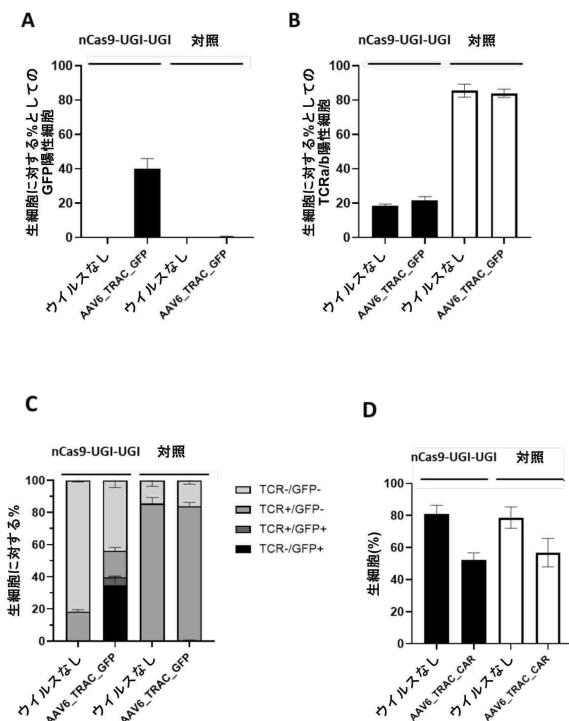
40

50

【図3】



【図4】



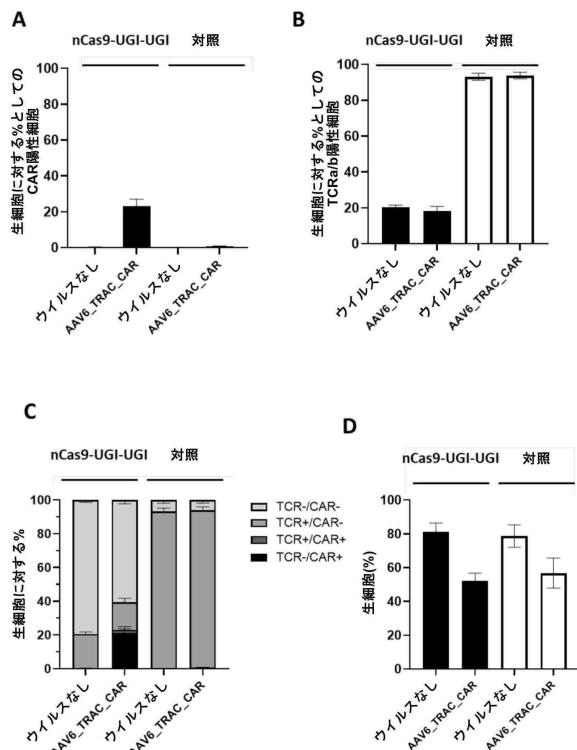
10

20

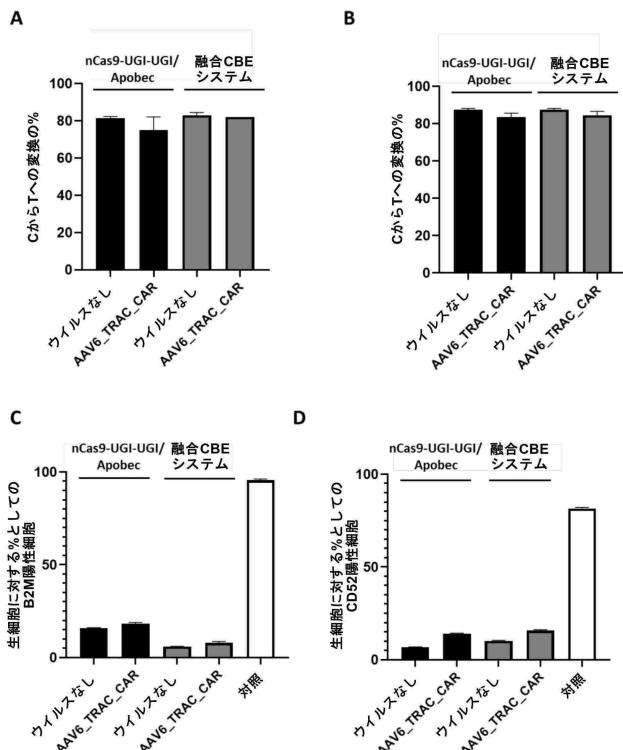
30

40

【図5】

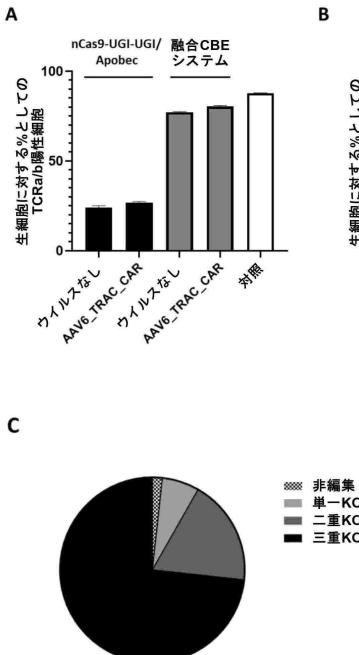


【図6】

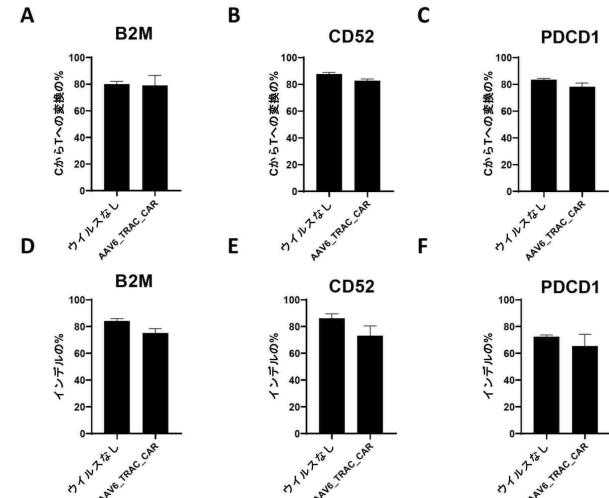


50

【図7】



【図8】



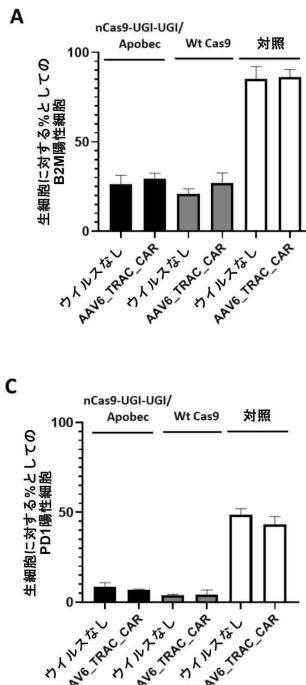
10

20

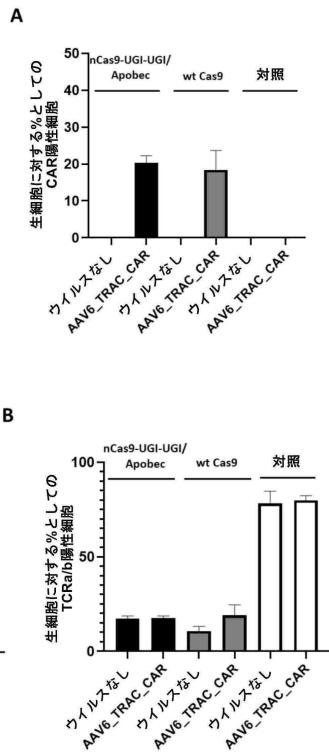
30

40

【図9】

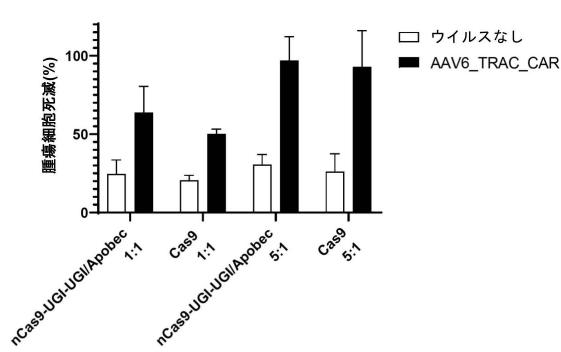


【図10】

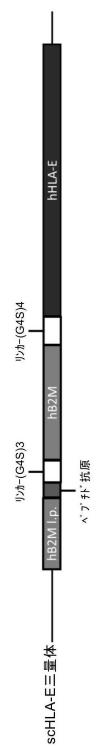


50

【図 1 1】



【図 1 2】



10

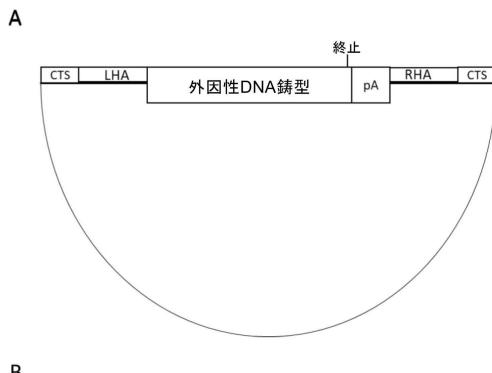
20

30

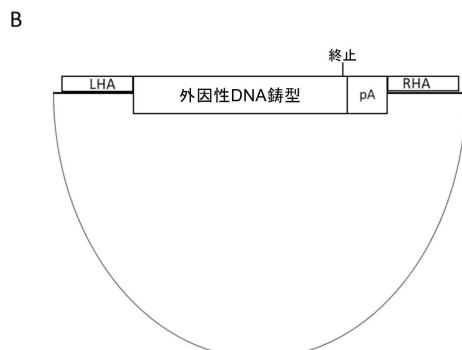
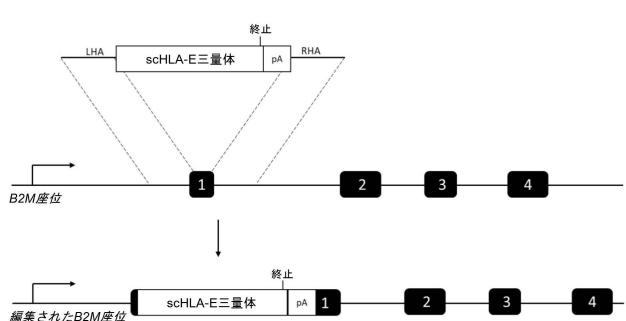
40

50

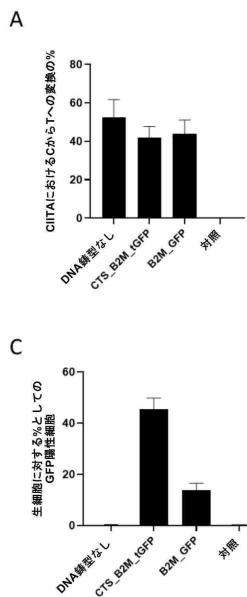
【図 1 3】



【図 1 4】

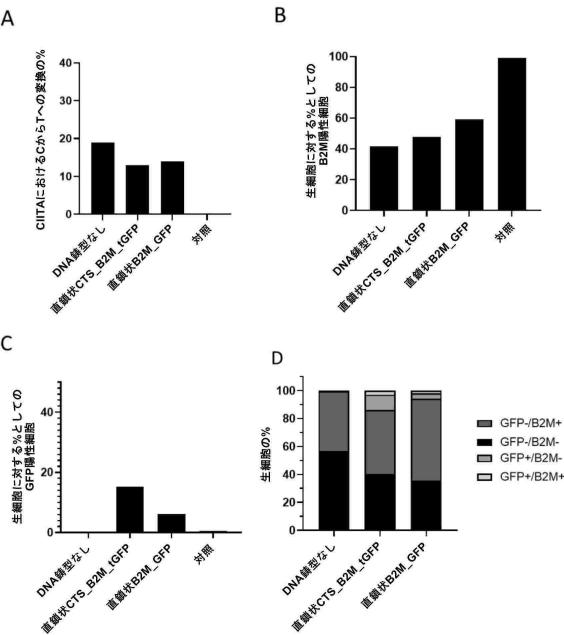


【図15】



B

【図16】



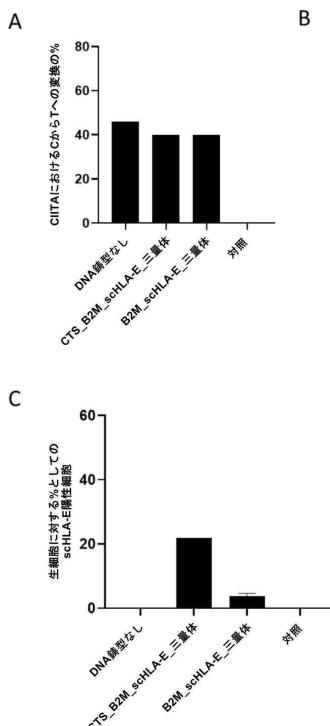
10

20

30

40

【図17】



【配列表】

20245347200000001.xml

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 22/74625
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61K 48/00, C12N 15/85 (2022.01) ADD. C12N 9/22, C12N 15/113 (2022.01) CPC - INV. A61K 48/00, C12N 2310/20 ADD. C12N 9/22, C07K 2319/00 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.
X	WO 2021/055459 A1 (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY) 25 March 2021 (25.03.2021) Claim 1; Claim 7; Claim 11; Claim 15; p5, In 13-16; p6, In 1-2; p13, In 4-8; p15, In 1; p15, In 20; p19, In 2-8; p19, In 27-31; p47, In 2-4; p47, In 24-27; p48, In 10-11; p52, In 29-31; p62, In 17-23; p82, In 7-10	1-3, 33
A	US 2019/0335726 A1 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 7 November 2019 (07.11.2019) Abstract	1-3, 33
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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) "Q" 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		
Date of the actual completion of the international search 9 October 2022		Date of mailing of the international search report NOV 01 2022
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 Karl Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 22/74625
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>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:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), <input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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.</p> <p>3. Additional comments:</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/74625

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.: 4-32 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:

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.:

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.

フロントページの続き

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,N
E,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,J
M,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,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ジン , シエンカン
アメリカ合衆国 , ニュージャージー , ニュー ブランズウィック , サマセット ストリート 83
ケアオブ ラトガース , ザ ステート ユニバーシティ オブ ニュー ジャージー
- (72)発明者 コランテス , フアン - カルロス
アメリカ合衆国 , ニュージャージー , ニュー ブランズウィック , サマセット ストリート 83
ケアオブ ラトガース , ザ ステート ユニバーシティ オブ ニュー ジャージー
- (72)発明者 ランボーン , ジョン
英国 , ケンブリッジシャー , ケンブリッジ , ウォータービーチ , ケンブリッジ リサーチ パーク
8100 ケアオブ ホライズン ディスカバリー リミテッド
- (72)発明者 ポレカ , イマコラータ
英国 , ケンブリッジシャー , ケンブリッジ , ウォータービーチ , ケンブリッジ リサーチ パーク
8100 ケアオブ ホライズン ディスカバリー リミテッド
- (72)発明者 セルミ , トンマーゾ
英国 , ケンブリッジシャー , ケンブリッジ , ウォータービーチ , ケンブリッジ リサーチ パーク
8100 ケアオブ ホライズン ディスカバリー リミテッド
- F ターム (参考) 4B065 AA90X AA94X AB01 BA02 BD39 CA24 CA44