

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7515254号  
(P7515254)

(45)発行日 令和6年7月12日(2024.7.12)

(24)登録日 令和6年7月4日(2024.7.4)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N	5/0781(2010.01)
A 6 1 K	35/17 (2015.01)
A 6 1 K	39/395 (2006.01)
A 6 1 P	9/00 (2006.01)
A 6 1 P	19/10 (2006.01)
	C 1 2 N 5/0781
	A 6 1 K 35/17
	A 6 1 K 39/395
	A 6 1 P 9/00
	A 6 1 P 19/10

請求項の数 18 (全96頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-502554(P2019-502554)	(73)特許権者	399052796
(86)(22)出願日	平成29年4月4日(2017.4.4)		デイナ ファーバー キャンサー インス
(65)公表番号	特表2019-510513(P2019-510513)		ティチュート, インコーポレイテッド
	A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(43)公表日	平成31年4月18日(2019.4.18)		2 1 5 , ボストン, ブルックライン ア
(86)国際出願番号	PCT/US2017/026011	(74)代理人	ベニュー 4 5 0
(87)国際公開番号	WO2017/176806		100108453
(87)国際公開日	平成29年10月12日(2017.10.12)		弁理士 村山 靖彦
審査請求日	令和2年4月6日(2020.4.6)	(74)代理人	100110364
審判番号	不服2022-10613(P2022-10613/J 1)	(74)代理人	弁理士 実広 信哉
審判請求日	令和4年7月7日(2022.7.7)	(74)代理人	100133400
(31)優先権主張番号	PCT/US2016/025920	(72)発明者	マイケル・ゴールドバーグ
(32)優先日	平成28年4月4日(2016.4.4)		アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0
(33)優先権主張国・地域又は機関	最終頁に続く		2 4 4 6 ・ ブルックライン・チャペル・
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 B 細胞のゲノム編集のための組成物及び方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

1つ又は複数のゲノムの改変を含む、ヒト患者から単離されたB細胞であって、  
前記1つ又は複数のゲノムの改変が、1つ又は複数のB細胞受容体座位における1つ又は複数の核酸配列の挿入を含み、  
前記1つ又は複数の核酸配列の挿入が、外来性の抗体及びマーカーをコードし、  
前記B細胞は、アポトーシス阻害剤を含む培地内で培養され、  
前記1つ又は複数のゲノムの改変が、ヌクレアーゼを用いて達成される、  
単離されたB細胞。

## 【請求項 2】

前記B細胞における前記1つ又は複数のゲノムの改変が、内在性B細胞受容体をコードする1つ又は複数のB細胞受容体座位の1つ又は複数の核酸配列の欠失を含む、請求項1に記載の単離されたB細胞。

## 【請求項 3】

前記B細胞は、外来性抗体を分泌する、請求項1又は2に記載の単離されたB細胞。

## 【請求項 4】

前記外来性の抗体は、TNF- 、IGHE、IL-1、IL-1 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6R、IL-9、IL-12、IL-13、IL-17A、IL-20、IL-22、IL-23、IL-25、BAFT、RANKL、インテグリン- 4 4 、VEGF-A、VEGFR1、VEGFR2、EGFR、HER2、HER3、CA125、インテグリン 4 7 、インテグリン 7 7 、インターフェロン / 受容体、CXCR4、CD

2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD56、CD70、CD74、CD79B、CD80、CD125、CD137、CD140a、CD147、CD152、CD154、CD200、CD221、CCR4、CCR5、gp120、アンジオポエチン3、PCSK9、HNGF、HGF、GD2、GD3、C5、FAP、ICAM-1、LFA-1、インターフェロン- $\gamma$ 、インターフェロン- $\beta$ 、インターフェロン- $\alpha$ 、誘導タンパク質、SLAMF7、HHGFR、TWEAK受容体、NRP1、EpCAM、CEA、CEA関連抗原メソテリン(mesothelin)、MUC1、IGF-1R、TRAIL-R2、DR5、DLL4、VWF、MCP-1、 $\beta$ -アミロイド、ホスファチジルセリン、アカゲザル因子、CCL11、NARP-1、RTN4、ACVR2B、SOST、NOGO-A、スクレロスチン、炭疽菌、トリインフルエンザ、インフルエンザA赤血球凝集素、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、呼吸器多核体ウイルス、狂犬病ウイルス糖タンパク質、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、結核、エボラ、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、SARS、MERS、マラリア、RSV、HPV、TGF- $\beta$ 、TGF- $\alpha$ 、NGF、LTA、AOC3、ITGA2、GM-CSF、GM-CSF受容体、oxLDL、LOXL2、RON、KIR2D、PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、BTLA、エピシアリン、ミオスタチン、又はHTV-1に対して特異的である、請求項1から3のいずれか一項に記載の単離されたB細胞。

【請求項5】

前記ヌクレアーゼが、操作されたヌクレアーゼである、請求項1から4のいずれか一項に記載の単離されたB細胞。

【請求項6】

前記ヌクレアーゼが、CRISPRヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、又は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼである、請求項1から4のいずれか一項に記載の単離されたB細胞。

【請求項7】

前記CRISPRヌクレアーゼが、Casヌクレアーゼ、Cpf1ヌクレアーゼ、C2c1ヌクレアーゼ、C2c3ヌクレアーゼ、又は、Cas9ニッカーゼバリアントである、請求項6に記載の単離されたB細胞。

【請求項8】

前記1つ又は複数の核酸配列の挿入が、外来性抗体の軽鎖及び重鎖をコードする、請求項1から7のいずれか一項に記載の単離されたB細胞。

【請求項9】

前記1つ又は複数のB細胞受容体座位が、少なくとも1つのB細胞受容体軽鎖座位及びB細胞受容体重鎖座位を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の単離されたB細胞。

【請求項10】

前記1つ又は複数のB細胞受容体座位が、IGHV、IGHD、IGHJ、IGHC、IGKV、IGKJ、IGLV、IGLJ、及び、IGLCからなる群から選択される、請求項1から9のいずれか一項に記載の単離されたB細胞。

【請求項11】

前記1つ又は複数のB細胞受容体座位が、再構成された可変領域の上流の遺伝子座位を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の単離されたB細胞。

【請求項12】

前記再構成された可変領域が、IGHV3-23又はIGKV3-20である、請求項11に記載の単離されたB細胞。

【請求項13】

前記1つ又は複数のB細胞受容体座位が、再構成された結合領域の下流の遺伝子座位を含む、請求項1から12のいずれか一項に記載の単離されたB細胞。

【請求項14】

前記再構成された結合領域が、IGHJ6又はIGKJ5である、請求項13に記載の単離されたB細胞。

【請求項15】

10

20

30

40

50

前記マーカーが、目に見えるマーカー、蛍光マーカー、選別可能なマーカー、表現型マーカー、栄養要求性マーカー、抗生剤耐性マーカー、抗原感受性マーカー、細胞表面マーカー、酵素マーカー、又は、核酸マーカーである、請求項1から14のいずれか一項に記載の単離されたB細胞。

【請求項16】

請求項1から15のいずれか一項に記載の単離されたB細胞から増殖した、単離されたヒトリンパ球。

【請求項17】

請求項1から15のいずれか一項に記載の単離されたB細胞から増殖した、単離したヒトリンパ球の集団。

10

【請求項18】

請求項17に記載の単離したヒトリンパ球の集団を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2016年6月14日出願の米国特許出願第15/161,213号の一部継続出願であり、米国特許出願第15/161,213号は2016年4月4日出願のPCT特許出願PCT/US2016/025920の一部継続出願であり、このPCT特許出願PCT/US2016/025920は、2015年4月3日出願の米国仮出願第62/142,882号の優先権及び権益を主張し、それらの各々の内容は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

参照による配列表の組込み

本出願は、EFS-Webを介してASCIIフォーマットで提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2016年6月13日に作成された上記ASCIIコピーは、DFCI-106/002WO\_ST25.txtという名称であり、9,514バイトのサイズである。

20

【0003】

本発明は、免疫療法のための操作されたB細胞を開発する方法に関し、より具体的には、目的の遺伝子を挿入、欠失、又は改変して、改変された特異性及び/又は機能、並びに、特に治療用抗体の分泌を有するB細胞を作製するための、ゲノム編集を用いることによるB細胞を改変する方法に関する。

30

【背景技術】

【0004】

モノクローナル抗体療法は、癌から自己免疫疾患までの様々な疾患を治療するのに広く使用されている。それらは、素晴らしい医学的な利益を与えるが、抗体は繰り返し注射(静脈内の場合が多い)により投与される必要がある。多くの抗体で、この投与は、移動、時間、費用、及び訓練された医療専門家を必要とする臨床状況において実施される必要がある。更に、バイオリアクターにおいて(例えばCHO細胞を用いて)作製される抗体は、ヒト起源のものとは異なるグリコシル化パターンを有し得るものであり、したがって、有害な免疫応答を発生する可能性がある。抗体を産生することに加えて、B細胞は、抗原提示細胞及びサイトカイン産生源として機能することができる。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】米国特許第6,453,242号

【文献】米国特許第6,534,261号

【文献】米国特許第6,599,692号

【文献】米国特許第6,503,717号

【文献】米国特許第6,689,558号

【文献】米国特許第7,030,215号

50

【文献】米国特許第6,794,136号	
【文献】米国特許第7,067,317号	
【文献】米国特許第7,262,054号	
【文献】米国特許第7,070,934号	
【文献】米国特許第7,361,635号	
【文献】米国特許第7,253,273号	
【文献】米国特許出願公開第2005/0064474号	
【文献】米国特許出願公開第2007/0218528号	
【文献】米国特許出願公開第2005/0267061号	
【文献】米国特許第5,789,538号	10
【文献】米国特許第5,925,523号	
【文献】米国特許第6,007,988号	
【文献】米国特許第6,013,453号	
【文献】米国特許第6,410,248号	
【文献】米国特許第6,140,466号	
【文献】米国特許第6,200,759号	
【文献】米国特許第6,242,568号	
【文献】WO98/37186	
【文献】WO98/53057	
【文献】WO00/27878	20
【文献】WO01/88197	
【文献】GB 2,338,237	
【文献】米国特許第6,479,626号	
【文献】米国特許第6,903,185号	
【文献】米国特許第7,153,949号	
【文献】米国特許第6,140,0815号	
【文献】米国特許第789,538号	
【文献】WO95/19431	
【文献】WO96/06166	
【文献】WO98/54311	30
【文献】WO01/60970	
【文献】WO98/53058	
【文献】WO98/53059	
【文献】WO98/53060	
【文献】WO02/016536	
【文献】WO03/016496	
【文献】米国特許第5,420,032号	
【文献】米国特許第6,833,252号	
【文献】米国特許出願公開20070117128	
【文献】米国特許出願第20110301073号	40
【文献】米国特許出願第20110145940号	
【文献】WO2010079430	
【文献】米国特許第6,607,882号	
【文献】米国特許第6,824,978号	
【文献】米国特許第6,979,539号	
【文献】米国特許第6,933,113号	
【文献】米国特許第7,163,824号	
【文献】米国特許第7,013,219号	
【文献】米国特許出願公開第20030232410号	
【文献】米国特許出願公開第20050208489号	50

【文献】米国特許出願公開第20050026157号	
【文献】米国特許出願公開第20050064474号	
【文献】米国特許出願公開第20060188987号	
【文献】米国特許出願公開第20060063231	
【文献】国際特許出願公開WO07/014,275	
【文献】米国特許第8,586,526号	
【文献】米国特許出願公開第20060206949号	
【文献】米国特許出願公開第20060153826号	
【文献】米国特許出願公開第20060078552号	
【文献】米国特許出願公開第20040002092号	
【文献】米国特許第7,888,121号	10
【文献】米国特許第8,409,861号	
【文献】米国仮出願第61/343,729号	
【文献】米国特許第5,356,802号	
【文献】米国特許第5,436,150号	
【文献】米国特許第5,487,994号	
【文献】米国特許第7,914,796号	
【文献】米国特許第8,034,598号	
【文献】米国特許第8,623,618号	
【文献】米国特許出願公開第20110201055号	20
【文献】米国特許出願公開第20090068164号	
【文献】WO2009/042163	
【文献】米国特許第7,074,596号	
【文献】米国特許第8,153,773号	
【文献】米国特許第6,008,336号	
【文献】米国特許第5,049,386号	
【文献】米国特許第4,946,787号	
【文献】米国特許第4,897,355号	
【文献】WO91/17424	
【文献】WO91/16024	30
【文献】米国特許第4,186,183号	
【文献】米国特許第4,217,344号	
【文献】米国特許第4,235,871号	
【文献】米国特許第4,261,975号	
【文献】米国特許第4,485,054号	
【文献】米国特許第4,501,728号	
【文献】米国特許第4,774,085号	
【文献】米国特許第4,837,028号	
【文献】PCT/US94/05700	
【文献】米国特許第4,797,368号	40
【文献】WO93/24641	
【文献】米国特許第5,173,414号	
【非特許文献】	
【0 0 0 6】	
【文献】Beerii等、(2002)Nature Biotechnol.20:135 ~ 141頁	
【文献】Pabo等、(2001)Ann. Rev. Biochem.70:313 ~ 340頁	
【文献】Isalan等、(2001)Nature Biotechnol.19:656 ~ 660頁	
【文献】Segal等、(2001)Curr. Opin. Biotechnol.12:632 ~ 637頁	
【文献】Choo等、(2000)Curr. Opin. Struct Biol.10:411 ~ 416頁	
【文献】Maiers等、(2007)Human Immunology 68:779 ~ 788頁	50

【文献】Belfort等、(1997)Nucleic Acids Res. 25:3379 ~ 3388頁

【文献】Dujon等、(1989)Gene 82:115 ~ 118頁

【文献】Perler等、(1994)Nucleic Acids Res. 22:1125 ~ 1127頁

【文献】Jasin(1996)Trends Genet 12:224 ~ 228頁

【文献】Gimble等、(1996)J. Mol. Biol. 263:163 ~ 180頁

【文献】Argast等、(1998)J. Mol. Biol. 280:345 ~ 353頁

【文献】Chevalier等、(2002)Molec. Cell 10:895 ~ 905頁

【文献】Epinat等、(2003)Nucleic Acids Res. 31:2952 ~ 2962頁

【文献】Ashworth等、(2006)Nature 441:656 ~ 659頁

【文献】Paques等、(2007)Current Gene Therapy 7:49 ~ 66頁

【文献】Boch等、(2009)Science 326:1509 ~ 1512頁

【文献】Moscou及びBogdanove(2009)Science 326:1501頁

【文献】Heuer等、(2007)Applied and Environmental Microbiology 73(13):4379 ~ 4384頁

【文献】Kay等、(2007)Science 318:648 ~ 651頁

【文献】Bonas等、(1989)Mol Gen Genet 218:127 ~ 136頁

【文献】Schomack S等、(2006)J Plant Physiol 163(3):256 ~ 272頁

【文献】Chames等、(2005)Nucleic Acids Res 33(20):e178

【文献】Arnould等、(2006)J. Mol. Biol. 355:443 ~ 458頁

【文献】Jansen等、2002.Mol. Microbiol. 43:1565 ~ 1575頁

【文献】Makarova等、2002.Nucleic Acids Res. 30:482 ~ 496頁

【文献】Makarova等、2006.Biol. Direct 1: 7

【文献】Haft等、2005.PLoS Comput Biol. 1 :e60

【文献】Kim等、(1996)Proc Natl Acad Sci USA 93(3):1156 ~ 1160頁

【文献】Boissel等、(2013)Nucl Acid Res: 1 ~ 13頁

【文献】Beurdeley等、(2013)Nat Comm: 1 ~ 8頁

【文献】Monet等、(1999)Biochem Biophysics. Res. Common. 255:88 ~ 93頁

【文献】Route等、(1994)Mol. Cell. Biol. 14:8096 ~ 106頁

【文献】Chilton等、(2003)Plant Physiology. 133:956 ~ 65頁

【文献】Puchta等、(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5055 ~ 60頁

【文献】Rong等、(2002)Genes Dev. 16:1568 ~ 81頁

【文献】Gouble等、(2006)J. Gene Med. 8(5):616 ~ 622頁

【文献】Porteus等、(2005)Nat Biotechnol. 23:967 ~ 73頁

【文献】Sussman等、(2004)J. Mol. Biol. 342:31 ~ 41頁

【文献】Linn等、(編集)Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993

【文献】Li等、(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275 ~ 4279頁

【文献】Li等、(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764 ~ 2768頁

【文献】Kim等、(1994a)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883 ~ 887頁

【文献】Kim等、(1994b)J. Biol. Chem 269:31,978-31,982

【文献】Bitinaite等、(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10,570-10,575

【文献】Roberts等、(2003)Nucleic Acids Res. 31:418 ~ 420頁

【文献】Anderson、Science 256:808 ~ 813頁(1992)

【文献】Nabel及びFeigner、TIBTECH 11:211 ~ 217頁(1993)

【文献】Mitani及びCaskey、TIBTECH 11:162 ~ 166頁(1993)

【文献】Dillon、TIBTECH 11:167 ~ 175頁(1993)

【文献】Miller、Nature 357:455 ~ 460頁(1992)

【文献】Van Brunt、Biotechnology 6(10):1149 ~ 1154頁(1988)

【文献】Vigne、Restorative Neurology and Neuroscience 8:35 ~ 36頁(1995)

【文献】Kremer及びPerricaudet、British Medical Bulletin 51(I):31 ~ 44頁(1995)

【文献】Haddada等、in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfl 50

er and Bohm(編集)(1995)

【文献】Yu等、Gene Therapy 1:13 ~ 26頁(1994)

【文献】Crystal、Science 270:404 ~ 410頁(1995)

【文献】Blaese等、Cancer Gene Ther 2:291 ~ 297頁(1995)

【文献】Behr等、Bioconjugate Chem 5:382 ~ 389頁(1994)

【文献】Remy等、Bioconjugate Chem 5:647 ~ 654頁(1994)

【文献】Gao等、Gene Therapy 2:710 ~ 722頁(1995)

【文献】Ahmad等、Cancer Res. 52:4817 ~ 4820頁(1992)

【文献】Buchscher等、J. Virol. 66:2731 ~ 2739頁(1992)

【文献】Johann等、J. Virol. 66:1635 ~ 1640頁(1992)

10

【文献】Sommerfelt等、Virol. 176:58 ~ 59頁(1990)

【文献】Wilson等、J. Virol. 63:2374 ~ 2378頁(1989)

【文献】Miller等、J. Virol. 65:2220 ~ 2224頁(1991)

【文献】West等、Virology 160:38 ~ 47頁(1987)

【文献】Kotin、Human Gene Therapy 5:793 ~ 801頁(1994)

【文献】Muzyczka、J. Clin. Invest. 94:1351(1994)

【文献】Tratschin等、Mol. Cell. Biol. 5:3251 ~ 3260頁(1985)

【文献】Tratschin等、Mol. Cell. Biol. 4:2072 ~ 2081頁(1984)

【文献】Hermonat及びMuzyczka、PNAS 81:6466 ~ 6470頁(1984)

【文献】Samulski等、J. Virol. 63:303822 ~ 3828頁(1989)

20

【文献】Dunbar等、Blood 85:3048 ~ 305頁(1995)

【文献】Kohn等、Nat. Med. 1:1017 ~ 102頁(1995)

【文献】Malech等、PNAS 94:22 12133 ~ 12138頁(1997)

【文献】Blaese等、Science 270:475 ~ 480頁(1995)

【文献】Ellem等、Immunol Immunother. 44(1):10 ~ 20頁(1997)

【文献】Dranoff等、Hum. Gene Ther. 1:111 ~ 2頁(1997)

【文献】Wagner等、Lancet 351:9117 1702 ~ 3頁(1998)

【文献】Keams等、Gene Ther. 9:748 ~ 55頁(1996)

【文献】Sterman等、Hum. Gene Ther. 7:1083 ~ 9頁(1998)

【文献】Rosenecker等、Infection 24:1 5 ~ 10頁(1996)

30

【文献】Welsh等、Hum Gene Ther. 2:205 ~ 18頁(1995)

【文献】Alvarez等、Hum. Gene Ther. 5:597 ~ 613頁(1997)

【文献】Topf等、Gene Ther. 5:507 ~ 513頁(1998)

【文献】Schumann等、「Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins.」、Proc Natl Acad Sci U S A. 2015年9月18日、112(33):10437 ~ 42頁

【文献】Guell等、「Genome Editing Assessment using CRISPR Genome Analyzer (CRISPR-GA)」、Bioinformatics 30(20):2968 ~ 2970頁

【文献】Brinkman等、2014「Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition」、Nucleic Acids Research, 42(22)

40

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

改变された特異性及び/又は機能を有する細胞を作製するために患者のB細胞を操作するための組成物及び方法への必要性が存在する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明は、B細胞の内在性B細胞受容体(BCR)をコードする配列を、規定された治療用モノクローナル抗体をコードする配列で置き換えるためにゲノム編集の使用を採用する。したがって、本発明によって作製されるB細胞は、治療用モノクローナル抗体を分泌するで

50

あろう。そのようなB細胞は、ヒト患者に移植され、そこでそれらは継続的な、そしておそらくは永続的な、治療用抗体の分泌を提供する。

【 0 0 0 9 】

様々な態様において、本発明は、B細胞の集団を、アポトーシス阻害剤を含む培地中で培養することによって、培養中の初代ヒトB細胞の集団の生存率を増加させる方法を提供する。集団の生存率は、アポトーシス阻害剤の非存在下で培養されるB細胞集団と比較して少なくとも10%増加する。

【 0 0 1 0 】

更なる態様において、本発明は、初代ヒトB細胞の集団を取得し、1種以上の活性化剤及び1種以上のアポトーシス阻害剤を含む培地において初代ヒトB細胞の集団を培養し、目的の遺伝子を挿入する又は欠失させることによって初代ヒトB細胞の集団をゲノム的に改変してB細胞のゲノム編集された集団を作製する、初代ヒトB細胞の集団のゲノムを編集する方法を提供する。任意選択で、方法は、B細胞をCD40アゴニスト、例えばCD40Lと共に培養することを更に含む。

10

【 0 0 1 1 】

アポトーシス阻害剤は、カスパーゼ阻害剤である。例えば、カスパーゼ阻害剤は、Q-VD-OPHである。

【 0 0 1 2 】

本発明は、1つ以上のゲノム改変を含む単離されたヒトB細胞を提供する。リンパ球は、(i)規定された対象とするタンパク質を発現するか、又は(ii)1種以上の内在性タンパク質を発現しない。リンパ球は(i)その内在性B細胞受容体を発現しなくてもよく、且つ(ii)規定された治療用モノクローナル抗体を分泌し得る。

20

【 0 0 1 3 】

ゲノム改変は、ヌクレアーゼ、例えば、操作されたヌクレアーゼ、CRISPRヌクレアーゼ(例えば、Casヌクレアーゼ、Cpf1ヌクレアーゼ、Cmrヌクレアーゼ、Csfヌクレアーゼ、Csmヌクレアーゼ、Csnヌクレアーゼ、Csyヌクレアーゼ、C2c1ヌクレアーゼ、C2c3ヌクレアーゼ、若しくはC2c3ヌクレアーゼ)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、又は転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼを使用して達成することができ、ヌクレアーゼは、B細胞へとヌクレオフェクション(nucleofection)によってトランスフェクトされてよい。

30

【 0 0 1 4 】

治療用モノクローナル抗体は、TNF-、IGHE、IL-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6R、IL-9、IL-12、IL-13、IL-17A、IL-20、IL-22、IL-23、IL-25、BAFT、RANKL、インテグリン-4、IL-6R、VEGF-A、VEGFR1、VEGFR2、EGFR、HER2、HER3、CA125、インテグリン-4-7、インテグリン-7-7、インターフェロン-受容体、CXCR4、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD56、CD70、CD74、CD79B、CD80、CD125、CD137、CD140a、CD147、CD152、CD154、CD200、CD221、CCR4、CCR5、gp120、アンジオポエチン3、PCSK9、HNGF、HGF、GD2、GD3、C5、FAP、ICAM-1、LFA-1、インターフェロン-、インターフェロン-、インターフェロン-、誘導タンパク質、SLAMF7、HHGFR、TWEAK受容体、NRP1、EpCAM、CEA、CEA関連抗原メソテリン(mesothelin)、MUC1、IGF-1R、TRAIL-R2、DR5、DLL4、VWF、MCP-1、-アミロイド、ホスファチジルセリン、アカゲザル因子、CCL11、NARP-1、RTN4、ACVR2B、SOST、NOGO-A、スクレロスチン、炭疽菌、トリインフルエンザ、インフルエンザA赤血球凝集素、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、呼吸器多核体ウイルス、狂犬病ウイルス糖タンパク質、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、結核、エボラ、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、SARS、MERS、マラリア、RSV、HPV、HSV、TGF-、TGF-RI、NGF、LTA、AOC3、ITGA2、GM-CSF、GM-CSF受容体、oxLDL、LOXL2、RON、KIR2D、PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、BTLA、エピシアリン、ミオスタチン、又

40

50

はHTV-1に対して特異的であり得る。

【0015】

実施形態は、本発明によって作製される単離したヒトB細胞に由来するリンパ球、及び単離したヒトB細胞に由来するリンパ球の集団を含む。

【0016】

実施形態は、第1の態様の単離したヒトB細胞集団を含む医薬組成物、及び該医薬組成物を対象に投与することを含む、免疫療法の方法である。

【0017】

本発明の別の態様は、対象に対する免疫療法のためのB細胞を調製する方法を含む。方法は、(a)内在性B細胞受容体をコードする遺伝子を欠失させることによってB細胞の集団をゲノム的に改変すること、及び任意選択で(b)治療用モノクローナル抗体をコードする遺伝子を挿入することを含む。B細胞の集団は、遺伝子改変の前に増殖及び/又は活性化(例えばIL-4によって)することができる。集団は少なくとも $1 \times 10^6$ 個のB細胞を含み得る。ゲノム改変は、ヌクレアーゼ、例えば、操作されたヌクレアーゼ、CRISPRヌクレアーゼ(例えば、Casヌクレアーゼ、Cpf1ヌクレアーゼ、Cmrヌクレアーゼ、Csfヌクレアーゼ、Csmヌクレアーゼ、Csnヌクレアーゼ、Csyヌクレアーゼ、C2c1ヌクレアーゼ、C2c3ヌクレアーゼ、若しくはC2c3ヌクレアーゼ)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、又は転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼを使用して達成することができ、ヌクレアーゼは、B細胞へとヌクレオフェクションによってトランスフェクトされてよい。ゲノム改変は、Cas9-gRNAリボ核タンパク質複合体を用いて達成することができる。gRNAは、免疫グロブリン座位に特異的であり得る。B細胞の集団は、遺伝子改変の後に活性化(例えばIL-4によって)することができる。

10

【0018】

実施形態は、治療用モノクローナル抗体を発現するゲノム的に改変されたB細胞の単離した集団を含み、したがって、治療用モノクローナル抗体を発現するゲノム的に改変されたB細胞の集団は単離される。

【0019】

実施形態は、治療用モノクローナル抗体を発現するゲノム的に改変されたB細胞の集団を、自家又は同種異系の産物のいずれかとして対象に投与することを更に含む。

【0020】

30

実施形態は、上述の方法によって調製されるゲノム的に改変されたB細胞の集団、及び治療用モノクローナル抗体を発現するゲノム的に改変されたB細胞の集団を投与することを含む対象を治療する方法を含む。

【0021】

本発明の更なる態様は、初代ヒトB細胞の集団のゲノムを編集する方法を提供する。方法は、(a)初代ヒトB細胞の集団を取得すること、並びに(b)目的の遺伝子を挿入する及び/又は欠失させることによって活性化B細胞の集団をゲノム的に改変することを含む。方法は、細胞に相同組換え修復(HDR)テンプレートをトランスフェクトすることを更に含み得る。方法は、ステップ(b)の前に、初代ヒトB細胞の集団を、サイトカイン(例えばIL-4)によって活性化し(例えば少なくとも3日間)、活性化B細胞の集団を作製することを更に含み得る。ゲノム改変は、ヌクレアーゼ、例えば、操作されたヌクレアーゼ、CRISPRヌクレアーゼ(例えば、Casヌクレアーゼ、Cpf1ヌクレアーゼ、Cmrヌクレアーゼ、Csfヌクレアーゼ、Csmヌクレアーゼ、Csnヌクレアーゼ、Csyヌクレアーゼ、C2c1ヌクレアーゼ、C2c3ヌクレアーゼ、若しくはC2c3ヌクレアーゼ)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、又は転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼを使用して達成することができ、ヌクレアーゼは、B細胞へとヌクレオフェクションによってトランスフェクトされてよい。ゲノム改変は、活性化B細胞の集団にCas9タンパク質、及び目的の遺伝子に特異的な配列を有するsgRNAをトランスフェクションすることによって達成することができ、B細胞のゲノム改変された集団を作製する。方法は、ゲノム編集されたB細胞の集団をサイトカイン(例えばIL-4)によって再活性化することを更に含み得る。集団は少なくとも $1 \times 10^6$ 個のB細胞を含み

40

50

得る。

【0022】

実施形態は、上述の方法によって作製されるゲノム編集されたB細胞の集団、及びゲノム編集されたB細胞の集団(例えば自家又は同種異系)を投与することを含む対象を治療する方法を含む。

【0023】

上述の態様又は実施形態のいずれにおいても、目的の遺伝子は、免疫グロブリン遺伝子座位(locus)、抗原提示を増強するタンパク質をコードする遺伝子、抗原提示を抑制するタンパク質をコードする遺伝子、抗体保持又は分泌に関連する配列、サイトカインをコードする遺伝子、メモリーB細胞への分化を促進する遺伝子、形質細胞への分化を促進する遺伝子、B細胞のリンパ系器官への輸送を促進する遺伝子、又は抗体を翻訳後修飾できる酵素をコードする遺伝子であり得る。

10

【0024】

別途定義されない限り、本明細書において使用される技術用語及び科学用語は、本発明の所属する技術分野における当業者によって一般に理解されるのと同一の意味を有する。本明細書において記載されているものと類似又は同等の方法及び物質を本発明の実施において使用することができるが、好適な方法及び物質を以下に記載する。本明細書において言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりその全体が明示的に組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優位となるであろう。更に、本明細書において記載される物質、方法、及び例は、例示にすぎず、限定を意図しない。

20

【0025】

上述の態様又は実施形態はいずれも、任意の他の態様又は実施形態と組み合わせることができる。

【0026】

本発明の他の特徴及び利点は、詳細な説明、図面、及び特許請求の範囲から明らかになり、それらに包含されるであろう。

【0027】

特許又は出願ファイルは、カラーで作成される少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含むこの特許又は特許出願公開のコピーは、請求及び必要な手数料の支払いにより庁によって提供されるであろう。

30

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1A】免疫グロブリン重鎖座位における再構成を描写する略図である。免疫グロブリン重鎖の可変領域は、可変(VH)、多様性(DH)、及び結合部(JH)遺伝子セグメントの構成要素からV(D)J組換えにより組み立てられる。再構成のプロセスは、再構成遺伝子セグメントに隣接するDNA中の組換えシグナル配列の、組換え活性化遺伝子1(RAG1)-RAG2複合体によって実施される切断を含む。DNA末端の結合は、Ku70、Ku80、ARTEMIS、X線修復交差補完タンパク質4(XRCC4)、DNAリガーゼIV、及びDNA依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニット(DNA-PKcs)を含む非相同末端結合(NHEJ)タンパク質を必要とする。座位にわたる転写は、再構成されたVDJセグメント(青い矢印)上流のプロモーターによって駆動され、それは、μ重鎖の合成を促進する。次いでこれは、VJ再構成に続いて生じる軽鎖と会合し、これによって、B細胞の細胞表面に提示されるIgM分子を形成する。続いて、重鎖の定常領域(CH)を、一連の下流の定常領域遺伝子と交換するプロセスである、クラススイッチ組換え(CSR)によって第2のアイソタイプが作製される(IgEに対するCSRが示される)。酵素である活性化誘導シチジンデアミナーゼ(AID)を必要とする欠失組換え反応は、定常領域遺伝子に先行するスイッチ(S)領域におけるDNA切断の発生を含み、DNAの修復が後に続く。これは、再構成CH座位、及びエピソーム環としての介在配列の欠失をもたらす。サイトカインは、CH遺伝子を介して転写を刺激し(赤い矢印)、B細胞がスイッチする免疫グロブリンのアイソタイプを決定する。重鎖及び軽鎖の再構成された可変領域はまた、体細胞超変異(SHM)のプロセスを介する高頻度の点変異を経る(示されない)。Eμ及

40

50

び3'制御領域(3'RR)エンハンサーは、それぞれV(D)J組換え及びCSRに影響を及ぼす。

【図1B】CRISPR/Casシステムの細菌免疫免疫防御を描写する略図である。

【図1C】CRISPR/Casシステムを用いるヒトB細胞受容体のゲノム編集を描写する略図である。

【図2】Cas9-gRNA送達法を描写する略図である。

【図3】T2A部位を含むGFPとCas9のバイシストロニックコンストラクトを有する様々なCas9ベクターの略図である。選択されるベクターは異なるプロモーターを有する。

【図4A】末梢血単核球(PBMC)の、eGFPコンストラクト又はGFP-Cas9コンストラクトによるヌクレオフェクションの有効性を描写する一連のグラフである。

【図4B】図4Aの続きを示す。

【図4C】図4Bの続きを示す。

【図4D】図4Cの続きを示す。

【図5A】図5A及び図5Bは、PBMCの、eGFPコンストラクト、GFP-Cas9コンストラクト、又はDNAを有さない条件によるヌクレオフェクション、及び結果としてのヌクレオフェクションプロセスに続く細胞の生存率に対する有効性を描写する一連のグラフである。

【図5B】図5Bは、PBMCのヌクレオフェクションに続く細胞の生存率及びGFPを発現するPBMCのパーセンテージのグラフを描写する。

【図6】マーカー発現(CD19)に基づくB細胞の単離、eGFPのDNA、eGFPのmRNA、DNAを有さない条件によるトランスフェクション、及びトランスフェクトしない条件に続く単離したB細胞の生存率、並びにトランスフェクション条件に基づくDNAを発現するトランスフェクトされた細胞のパーセンテージを実証する一連のグラフである。

【図7A】B細胞のeGFPコンストラクト、GFP-Cas9コンストラクト、DNAを有さない条件によるヌクレオフェクション、及びトランスフェクトしない条件に続く生存率及びeGFP陽性であるB細胞のパーセンテージを示す一連のグラフである。これらの実験に対する変動として、様々なヌクレオフェクションプログラム、U-015、U-017、及びV-015[Lonza社]が評価された(図7A及び図7B)。

【図7B】図7Aの続きを示す。

【図7C】DNAコンストラクトの選択された濃度における、特定のDNAコンストラクトのB細胞へのヌクレオフェクションの生存率に対する影響を評価するために、特定の濃度の様々な種類のDNAコンストラクトが、単離したB細胞にヌクレオフェクト(nucleofect)された(図7C)。

【図7D】同様の実験を細胞株Ramos及びU266によって実施した(図7D)。

【図8A】ヌクレオフェクション前又は後のいずれかにおけるIL-4又はIL4/IL21/CD40Lの存在での単離したB細胞の培養の際の細胞の生存率及びGFPを発現する細胞のパーセンテージを描写する一連のグラフである。

【図8B】図8Aの続きを示す。

【図9A】ヌクレオフェクトした細胞の生存率及び/又はeGFP発現に対する様々な条件の影響を描写する一連のグラフである。図9Aは、初代B細胞のトランスフェクションの最適化を描写する一連のグラフである。図9Aのグラフは、引用されたベクターコンストラクトによるトランスフェクションに続くGFPの発現又は細胞の生存率を描写する。

【図9B】図9Bは、様々な濃度のグラフに描写されるDNAによってヌクレオフェクトされたB細胞の生存率及びeGFP発現を描写する一連のグラフである。

【図9C】図9Cは、7-AAD染色によって示されるときの細胞生存率、及びGFP陽性B細胞の量に対するサイトカイン(すなわち、トランスフェクション前又は後のIL4又はIL4/IL21/CD40)の添加の影響を描写する一連のグラフである。

【図10】IL4又はIL4/IL21/CD40の存在における、様々なDNAコンストラクトによるヌクレオフェクションに続く生存率及びGFP又はCas9を発現する細胞のパーセンテージを描写する一連のグラフである。

【図11A】DNAコンストラクトによるヌクレオフェクションに続く、細胞の生存率及びGFPを発現する細胞のパーセンテージに対する様々な細胞単離法の影響を描写する一連の

10

20

30

40

50

グラフである。試験された単離法は、Magnetic Cell Isolation and Separation(MACS(登録商標))及びRosetteSep(登録商標)であった。

【図11B】図11Aの続きを示す。

【図12A】Neon(登録商標)トランスフェクション装置を用いる様々なトランスフェクションの条件下でのB細胞の細胞生存率及びGFPを発現する細胞のパーセンテージを描写する一連のグラフである。

【図12B】図12Aの続きを示す。

【図13A】様々なAmaxa(登録商標)プログラム(V-015、V-016、V-017)によるヌクレオフェクションに続くB細胞生存率及びGFPを発現するB細胞のパーセンテージを描写する一連のグラフである。

10

【図13B】様々なAmaxa(登録商標)プログラム(V-015、V-016、V-017)によるヌクレオフェクションに続くPMBCの生存率及びGFPを発現するPMBCのパーセンテージを描写する一連のグラフである。

【図14A】照射したCD40Lを発現する3T3細胞と共に培養したB細胞における、細胞生存率、GFP又はGFP-Cas9を発現する細胞のパーセンテージを描写する一連のグラフである。

【図14B】図14Aの続きを示す。

【図15A】照射したCD40Lを発現する3T3細胞と共に培養したB細胞における、細胞生存率、GFP又はGFP-Cas9を発現する細胞のパーセンテージを描写する一連のグラフである。

20

【図15B】図15Aの続きを示す。

【図15C】照射したCD40Lを発現する3T3細胞と共に培養したB細胞株U266における、細胞生存率、GFP又はGFP-Cas9を発現する細胞のパーセンテージを描写する一連のグラフである。

【図16-1】実施したB細胞ヌクレオフェクションアッセイの要約を提示する一連のグラフである。

【図16-2】図16-1の続きを示す。

【図17】Cas9/gRNA送達とCas9のDNA、mRNA、又はタンパク質との比較を示す一連のゲルである。

【図18A-1】Cas9をコードするDNAコンストラクトをトランスフェクトされた初代B細胞のTIDE解析を描写する一連のグラフである。

【図18A-2】図18A-1の続きを示す。

30

【図18B-1】図18A-2の続きを示す。

【図18B-2】図18B-1の続きを示す。

【図18C-1】Cas9をコードするRNAコンストラクトをトランスフェクトされた初代B細胞のTIDE解析を描写する一連のグラフである。

【図18C-2】図18C-1の続きを示す。

【図18D-1】図18C-2の続きを示す。

【図18D-2】図18D-1の続きを示す。

【図18E-1】Cas9タンパク質をトランスフェクトされた初代B細胞のTIDE解析を描写する一連のグラフである。

【図18E-2】図18E-1の続きを示す。

40

【図18F-1】図18E-2の続きを示す。

【図18F-2】図18F-1の続きを示す。

【図19】Cas9リボ核タンパク質を用いるノックイン初代ヒトB細胞の生成を図示する略図である。

【図20A-1】ヒトB細胞におけるCas9 RNPによるCXCR4の標的化を描写する略図及び一連のグラフである。データは、B細胞におけるCXCR4の発現が、gCXCR4と複合体化したCas9 RNPによる標的化の後に70%まで低減することを示す。

【図20A-2】図20A-1の続きを示す。

【図20B】図20A-2の続きを示す。

【図20C】図20Bの続きを示す。

50

【図21A】Cas9 RNPによるCXCR4座位へのHDRテンプレートの挿入を描写する一連のゲルである。

【図21B】NHEJ阻害剤Scr7の添加によるHDR効率の増強を描写する一連のゲルである。

【図21C】ヒトB細胞株におけるCXCR4切断及びHDRを描写する一連のゲルである。

【図21D】図21Cの続きを示す。

【図21E】図21Dの続きを示す。

【図21F】活性化ヒト初代B細胞におけるゲノム編集の確認(T7E1アッセイによる)を描写する一連のグラフである。図21F～Hは、サイトカインとアゴニストの様々な組合せの初代ヒトB細胞を活性化する能力を描写する一連のグラフである。

10

【図21G】図21Fの続きを示す。

【図21H-1】図21Gの続きを示す。

【図21H-2】図21H-1の続きを示す。

【図21I】活性化ヒト初代B細胞におけるゲノム編集の確認(T7E1アッセイによる)を描写する一連のゲルである。RNPはリボ核タンパク質である。

【図21J】図21I-2の続きを示す。

【図21K】図21Jの続きを示す。

【図21L】図21Kの続きを示す。

【図22A】Cas9 RNPによるヒトB細胞受容体座位の標的化を実証する一連のゲルである。図22Aは、4つの特異的な切断座位を増幅するためのプライマー配列を決定するためのアッセイを描写する一連のゲルである。

20

【図22B】図22B及び図22Cは、ヒトB細胞受容体(BCR)座位を標的化するgRNAの同定を描写する一連のゲルである。

【図22C】図22Bの続きを示す。

【図22D】図22Dは、ヒトBCR座位を標的化する選択されたgRNA(IGH)の組合せを描写する一連のゲルである。

【図22E】図22Eは、ヒトBCR座位を標的化する選択されたgRNA(IGK)の組合せを描写する一連のゲルである。

【図23A】HRテンプレートのリストを示す。HRテンプレート1)～8)は、それぞれ配列番号17～配列番号24に対応する。

30

【図23B】図23Aの続きを示す。

【図23C】図23Bの続きを示す。

【図24A】ヒトB細胞株又は初代ヒトB細胞のBCR座位へのHRによる制限部位又はエピトープタグの導入を描写する一連のゲルである。

【図24B】図24Aの続きを示す。

【図24C】図24Bの続きを示す。

【図24D】図24Cの続きを示す。

【図24E】図24Dの続きを示す。

【図24F】図24Eの続きを示す。

【図24G】図24Fの続きを示す。

40

【図24H】図24Gの続きを示す。

【図24I】図24Hの続きを示す。

【図25A-1】初代ヒトB細胞のBCR座位へのFLAG及びHAタグの導入を描写する一連のグラフである。図25Aは、トランスフェクション前に5日間の活性化、及びトランスフェクション後に6日間の活性化を有する初代ヒトB細胞におけるBCR座位へのFLAG及びHAのタグの導入を描写する一連のフローサイトメトリーのグラフである。

【図25A-2】図25A-1の続きを示す。

【図25B】図25Bは、FLAGの発現が、IGHV及びIGHV/JへのFLAG/HAコンストラクトの挿入後に5～6倍以上増加したこと、HAの発現が、IGKV及びIGKV/JへのFLAG/HAコンストラクトの挿入後に、2～7倍超増加したことを示す棒グラフである。図25Bはまた、FL

50

AG/HA二重陽性細胞の存在を示し、それらの存在は、IGHV及びIGKVへの挿入、並びにIGHV/J及びIGKV/Jへの挿入後に、1~2倍超増加する。定量化のために使用される染色の全ては、トランسفェクトしていない対照(コントロール)(ctrl)に対して正規化された。

【図26A】B細胞株内のCXCR4座位における相同組換え(HR)の確認を示すMiSeqデータを描写する一連のグラフである。NHEJは、非相同末端結合を表す。

【図26B】初代ヒトB細胞内のCXCR4座位における相同組換え(HR)の確認を示すMiSeqデータを描写する一連のグラフである。

【図26C】CXCR4座位におけるHRのMiSeqの結果を要約する表である。

【図27A】B細胞株-Ramos内のBCR座位における相同組換え(HR)の確認を示すMiSeqデータを描写する一連のグラフである。NHEJは、非相同末端結合を意味する。

10

【図27B】B細胞株-Raji内のBCR座位における相同組換え(HR)の確認を示すMiSeqデータを描写する一連のグラフである。

【図27C】図27Bの続きを示す。

【図27D】初代ヒトB細胞内のBCR座位における相同組換え(HR)の確認を示すMiSeqデータを描写する一連のグラフである。

【図27E】BCR座位におけるHRのMiSeqの結果を要約する表である(及び、試料IDのRI-20、BI-20のガイドである)。

【図28】トランسفェクション前に活性化されている初代ヒトB細胞の生存率を確認する棒グラフであり、それはHRを達成するのに必要であることが示されている。

【図29】RNPトランسفェクション後の初代B細胞の生存率を決定するためのアッセイの結果を描写するグラフである。

20

【図30】図30A~図30Bは、初代B細胞における相同組換えに続くモデルエピトープタグ発現の検出を描写する一連の棒グラフである。図30Aは、CXCR4モデル座位への挿入後のFLAGタグの発現を描写する棒グラフである。挿入されたエピトープタグは、内在性プロモーターによって制御されるとき、初代ヒトB細胞のCXCR4座位から自然に発現され得る。図30Bは、示された構成要素によるトランسفェクションに続く細胞の生存率を描写する。Cas9/gRNA RNPは、1つ又は3つのFLAGエピトープの繰り返しをコードするHDRテンプレートと共にコトランسفェクトされる。最初の2つの試料(トランسفェクトなし又はHDRテンプレートなし)は、陰性対照として機能する。

【図31】図31A~Cは、ナノボディをコードする配列が、初代B細胞の重鎖剤に挿入できること、及びDNAテンプレートの量が上昇すると共に挿入効率が増加することを描写する。汎カスパーゼ阻害剤Q-VD-OPH(「OPH」)は、細胞の生存率を増加させるために含められる。図31Aは、BCRのIGHVへのナノボディ配列の挿入を描写する一連のゲルである。

30

図31Bは、BCRのIGHVへのナノボディ配列の挿入に続く細胞の生存率を描写する一連の棒グラフである。図31Cは、BCRのIGHVへのナノボディ配列の挿入を描写し、図31A中のゲル状で泳動されたPCRにおいて使用されたプライマーの位置を示す、略図であり、1つのプライマーがゲノムに対して特異的であり、他方がインサートに対して特異的であるので、ナノボディコンストラクトが挿入された場合にのみアンプリコンが検出され得る。

【図32】図32A~図32Bは、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする配列が、初代ヒトB細胞の重鎖及び軽鎖の座位へと挿入され得ることを描写する。図32Aは、BCRのIGHVへの重鎖配列の挿入を描写する一連のゲル及び略図である。図32Bは、BCRのIGKVへの軽鎖配列の挿入を描写する一連のゲル及び略図である。10 μMのOPH濃度は、2 μMと比べて挿入効率を増加させる。

40

【図33】図33A~33Bは、直鎖化プラスミドHDRテンプレート(「テンプレートlin」)が環状プラスミドHDRテンプレート(「テンプレート」)よりも効率的に挿入されることを描写する。図33Aは、BCRのIGHV及びIGKVへの、ナノボディ、重鎖(「HC」)、又は軽鎖(「LC」)をコードする直鎖化プラスミドHDRテンプレートの挿入を描写する一連のゲルである。本明細書において記載される実験において使用される重鎖及び軽鎖のコンストラクトはまた、IgG定常領域(「IgG-Fc」)をコードする。図33Bは、BCRのIGHV及びIGKVへの直鎖化プラスミドHDRテンプレートの挿入に続く細胞の生存率を描写する一連の棒グラ

50

フである。

【図34】抗体の配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入を描写する一連の棒グラフである。図34Aは、ナノボディの発現を描写する一連の棒グラフである。図34Bは、抗体の発現を描写する一連のグラフである。FLAGエピトープをナノボディ及び重鎖(HC)に融合し、HAエピトープを軽鎖(LC)に融合する。図34Cは、ナノボディ又は抗体の挿入に続く細胞の生存率を描写する一連のグラフである。

【図35】ナノボディ又は抗体の配列のBCRのIGHV及び/又はIGKVへの挿入に続くタンパク質の発現を描写する一連のフローサイトメトリーのグラフである。FLAG又はHAに特異的な抗体は、これらのエピトープを含むコンストラクトを発現する細胞を検出するのに使用される。編集効率が中程度であるが、明らかなシフトが観察される。

【図36A】ナノボディ又は抗体の配列のBCRのIGHV及び/又はIGKVへの挿入を描写する第2のフローサイトメトリー実験に続く一連のグラフである。図36Aは、ナノボディの発現を描写する一連の棒グラフである。

【図36B】図36Bは、IGHV及びIGKVへの挿入に続く抗体の発現を描写する一連の棒グラフである。

【図36C】図36Cは、ナノボディ及び抗体の配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入に続く細胞の生存率及び純度を描写する一連の棒グラフである。UTはトランスフェクトしていないものである。

【図37-1】第2の実験における、抗体の配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入を描写する一連のフローサイトメトリーのグラフである。

【図37-2】図37-1の続きを示す。

【図38A】ナノボディ又は抗体の配列のBCRのIGHV及び/又はIGKVへの挿入を描写する第3のフローサイトメトリー実験に続く一連のグラフである。図38Aは、ナノボディの発現を描写する一連の棒グラフである。

【図38B】図38Bは、IGHV及びIGKVへの挿入に続く抗体の発現を描写する一連の棒グラフである。

【図38C】図38Cは、ナノボディ及び抗体の配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入に続く細胞の生存率及び純度を描写する一連の棒グラフである。UTはトランスフェクトしていないものである。

【図39-1】第3の実験における、抗体の配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入を描写する一連のフローサイトメトリーのグラフである。

【図39-2】図39-1の続きを示す。

【図40-1】抗体の配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入に続くフローサイトメトリーのデータを描写する一連のグラフである。図40Aは、抗体の発現を描写する一連の棒グラフである。

【図40-2】図40Bは、IGHV及びIGKVへの挿入に続くHV(FLAG)のフローサイトメトリーのプロットである。図40Cは、IGHV及びIGKVへの挿入に続くKV(HA)のフローサイトメトリーのプロットである。

【図40-3】図40Dは、抗体の配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入に続く細胞の生存率及び純度を描写する一連の棒グラフである。UTはトランスフェクトしていないものである。これらは、後に続くmRNAレベルにおける発現の分析のためにmRNAが採取された試料と同一のものである。

【図41】ナノボディの配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入並びにナノボディのフローの統計発現を描写する一連のグラフである。

【図42】フローサイトメトリーによって検出されるFLAG/HA二重陽性細胞の定量化に基づく、抗体の配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入を描写する一連のグラフである。

【図43】フローサイトメトリーによって検出されるFLAG又はHAの単一陽性細胞の定量化に基づく、抗体の配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入を描写する一連のグラフである。

【図44】重鎖と軽鎖とが、別の試料中で個別に標的化されたときの、FLAG又はHAの定

10

20

30

40

50

量化に基づく、抗体の配列のBCRのIGHV及びIGKVへの挿入を描写する一連のグラフである。

【図45】所望の特異性を有する抗体の分泌を導く、初代ヒトB細胞の重鎖及び軽鎖の座位へのモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする配列の挿入を描写する一連のグラフである。B細胞は、Cas9/gRNA RNP、及び、定常領域と共にアダリムマブ(抗TNF )の重鎖又は軽鎖をコードするプラスミドHDRテンプレートをエレクトロポレーションされた。RNPは、IGHV及びIGKV座位を標的化するgRNAと共に組換えCas9タンパク質をインキュベートすることによって調製された。ELISAは、B細胞培養からの上清と共にインキュベートする前にプレートを組換えTNF でコーティングして実施された。次いで、ユーロピウムで標識されたヒトIgGに対する二次抗体をプレートに添加して、蛍光プレートリーダーを用いて分析した。UTはトランスフェクトしていないものである(陰性対照)。3つの独立したドナー由来の試料が示される。

【図46】初代ヒトB細胞の重鎖及び軽鎖の座位へのモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする配列の挿入がmRNAの発現を導くことを描写する一連のゲルである。B細胞は、Cas9/gRNA RNP、及び、定常領域と共にアダリムマブ(抗TNF )の重鎖又は軽鎖をコードするプラスミドHDRテンプレートをエレクトロポレーションされた。RNPは、IGHV及びIGKV座位を標的化するgRNAと共に組換えCas9タンパク質をインキュベートすることによって調製された。mRNAを採取し、逆転写をインサートに特異的なリバースプライマーを用いて実施した。RT-PCRを、このcDNAについて実施し、2つの異なるプライマー対を用いて、予想されるサイズのアンプリコンをゲル電気泳動によって検出した。両方の場合において、1つのプライマーは生殖系列に特異的であり、他のプライマーはインサートに特異的である。UTはトランスフェクトしていないものである(陰性対照)。

【図47】汎カスパーゼ阻害剤Q-VD-OPH(「OPH」)をIL-4活性化細胞の培養条件に対して添加してそれらの生存率を増加させることの効果を描写する一連のグラフである。OPHのいくつかの濃度を試験した。エレクトロポレーションの5日後にフローサイトメトリーを実施した。

【図48】いくつかの濃度のOPHを試験する第2の実験におけるIL-4活性化細胞の増加した生存率を描写する一連のグラフである。この実験はCas9 RNP及びHDRテンプレートのエレクトロポレーションを更に含んだ。

【図49】キット活性化細胞の生存率に対するOPH濃度の影響の試験である第1の実験を描寫する一連のグラフである。キットはIL-4に加えてCD40のアゴニストを含む。Cas9 RNPのエレクトロポレーション前に細胞を4日間活性化し、エレクトロポレーションの5日後にフローサイトメトリーを実施した。

【図50】キット活性化細胞の生存率に対するOPH濃度の影響の試験である第2の実験を描寫する一連のグラフである。キットはIL-4に加えてCD40のアゴニストを含む。Cas9 RNP及びHDRテンプレートのエレクトロポレーションの4日前に細胞を活性化し、エレクトロポレーションの5日後にフローサイトメトリーを実施した。

【図51】キット活性化細胞の生存率に対するOPH濃度の影響の試験である第3の実験を描寫する一連のグラフである。キットはIL-4に加えてCD40のアゴニストを含む。Cas9 RNP及びHDRテンプレートのエレクトロポレーション前に細胞を4日間活性化し、エレクトロポレーションの4日後にフローサイトメトリーを実施した。

【図52-1】エレクトロポレーション後にアポトーシスの阻害剤がB細胞の生存率を増加させることを描寫する一連のグラフである。UTはトランスフェクトしていないものである。EPCは、エレクトロポレーションの対照である(RNP又はHDRテンプレートを全く添加しない)。

【図52-2】図52-1の続きを示す。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明は、B細胞のゲノム編集のための方法又は組成物を提供する。B細胞は、目的の遺伝子の1つ以上を欠失及び/又は挿入するよう編集できる。欠失させることとは、遺伝子が

10

20

30

40

50

機能的に不活性であるように遺伝子の少なくとも一部を欠失させることを意味する。更に、本発明は、目的の遺伝子を転写的に抑制又は活性化する組成物及び方法を提供する。

【0030】

驚くべきことに、カスパーゼ阻害剤の添加が、ゲノム編集されたB細胞のトランスフェクション効率と生存率との両方を増加させることが発見された。

【0031】

欠失、挿入、又は改変され得る遺伝子は、免疫グロブリン遺伝子、抗原提示を増強するタンパク質をコードする遺伝子、抗原提示を抑制するタンパク質をコードする遺伝子、抗体保持又は分泌に関連する配列を含む遺伝子座位、サイトカインをコードする遺伝子、メモリーB細胞への分化を促進する遺伝子、形質細胞への分化を促進する遺伝子、B細胞のリンパ系器官(例えば、リンパ節、脾臓、骨髄)への輸送を促進する遺伝子、及び抗体を翻訳後修飾できる酵素をコードする遺伝子を含む。

10

【0032】

B細胞は、B細胞の特異性又はB細胞の機能を改変するために編集できる。

【0033】

いくつかの態様において、本発明の組成物及び方法は、内在性のB細胞受容体(BCR)を発現しないB細胞を作製するための使用である。B細胞は更に、外来性のBCRを挿入して、対象とする標的に対して特異的な抗体及び/又はB細胞を作製するように改変することもできる。外来的に産生されるモノクローナル抗体による現在の治療は、定期的な注射を必要とし、これは、典型的には、患者が医療施設へと移動することを必要とし、且つ/又は再発性の罹患を生じる。更に、そのような外来的に産生されるモノクローナル抗体は、非常に効果である。対照的に、本発明は、患者への移植後に、安定的に標的特異的治療用抗体を產生する標的特異的B細胞を調製する方法を提供する。外来的に産生される抗体の安定的な產生は、注射間におけるときに、血清抗体濃度が(標的抗原の一定レベルに対して)比較的一定に維持され、変動しないので、より良好な臨床成績をもたらし得る。更に、いくつかの市販の治療用抗体は、非ヒト部分を含み、したがって中和するか、又は有害でさえある、免疫応答を生じる可能性がある。治療用抗体は、本発明の方法によって、ヒト細胞により内在的に產生されるので、抗体の翻訳後修飾は完全にヒトのものであり、したがって、有害な免疫作用は全く予測されない。

20

【0034】

30

他の態様において、本発明の組成物及び方法は、B細胞によって通常発現されないタンパク質を発現するB細胞を作製するのに使用される。

【0035】

代替的に、本発明の組成物及び方法は、B細胞によって通常発現されるタンパク質を発現しないB細胞を作製するのに使用される。

【0036】

更なる態様において、本発明の組成物及び方法は、改変された機能を有するB細胞を作製するのに使用される。改変された機能は、抗原提示細胞としてのB細胞の機能を改善若しくは妨げること(すなわち、ワクチン若しくは寛容のために)、B細胞の炎症性表現型を改変すること(すなわち、炎症誘発性若しくは抗炎症性)、B細胞の分化経路を限定すること、又はB細胞の局在化を限定することを含むが、これらに限定されないものを意味する。更に、B細胞受容体の膜貫通ドメインは、非形質B細胞から形質様抗体分泌細胞へと転換するために破壊できる。

40

【0037】

B細胞の機能は、天然のB細胞受容体のレパートリーを改変して、又はそれを改変せずに、改変することができる。特異性よりも機能を改変することは、自己免疫疾患を有する対象において寛容を生じる方法において有用であり得る。グリコシリ化のような翻訳後修飾を操作することは、そのような用途に対して特に有用であり得る。

【0038】

本発明は、初代ヒトB細胞の成功裏のゲノム編集の最初の実証である。ゲノム改変B細胞

50

の成功裏の治療的適用を得るために、初代B細胞の生存率を維持するトランスフェクションの条件を確立することは重要であった。特に、生存率と機能とを保持する最適なトランスフェクション条件が確立されるべきであった。B細胞の使用は、他の細胞型と比較していくつかの独特的の困難を提示し、したがって、多くの最適化が必要であった。

#### 【 0 0 3 9 】

例えば、培養条件は、培養容器、細胞濃度、培地(補充成分を含む)及びサイトカインに関する最適化された。初代B細胞の生存率を維持するために最適化されたこれらの培養条件は、細胞が活性化及び/又はトランスフェクトされたときに改変するべきであった。トランスフェクションは、細胞数、Cas9:gRNA比、エレクトロポレーション装置、ヌクレオフェクションプログラム、及び回復ステップについて最適化された。迅速で極度に穏やかな操作は生存率にとって極めて重要であった。生存率は、培地にアポトーシスの阻害剤(例えばカスパーーゼ阻害剤)を含めることによって更に増強された。

#### 【 0 0 4 0 】

特定の実施形態において、本発明の方法は、患者由来のB細胞の内在性B細胞受容体(BCR)をコードする配列を、規定された治療用モノクローナル抗体をコードする配列で置き換えるためにゲノム編集の使用を採用する。BCRの軽鎖及び重鎖の可変領域を編集し、生じるゲノム改変B細胞を単離する。生じるゲノム改変B細胞を対象に投与する。B細胞は、メモリー細胞及び長寿命の形質細胞に分化し得るので、結果として、長期間、潜在的には、患者の生存期間中、抗原提示細胞の集団が残存する。

#### 【 0 0 4 1 】

したがって、本発明は、外来性DNA、DNA結合タンパク質のようなヌクレアーゼ酵素、及びヌクレアーゼ酵素をB細胞内の特異的なDNA配列へと局在化させるガイドRNAの使用に関する方法を提供する。内在性DNAの切断に続き、外来性DNAは、相同組換えを介してその部位に組み込まれる。

#### 【 0 0 4 2 】

好ましくは、DNAは、IGHV3-23及びIGHJ6、並びにIGKV3-20及びIGKJ5において、及び、その近辺で切断されるであろう。更なる、対象とする座位は、IGHV1-69、IGHV3-30、IGHJ4、IGKV1-39、及びIGKJ4を含む。より詳細には、DNAは、chr2p12:88,856,000とchr2p12:90,236,000との間(IGKC及びIGKV座位、NC\_000002.12染色体2、レファレンスGRCh38.p2、プライマリアセンブリ、遺伝子ID:50802を含む)、並びにchr14q32.33:105,565,000とchr14q32.33:106,881,000との間(IGHG4及びIGHV座位、NC\_000014.9染色体14、レファレンスGRCh38.p2、プライマリアセンブリ、遺伝子ID:3492を含む)で切断されるであろう。任意選択で、DNAはchr22q11.222,025,000とchr22q11.222,925,000との間(IGLC及びIGLV座位、遺伝子ID:3535を含む)で切断されるであろう。

#### 【 0 0 4 3 】

様々な実施形態において、標的遺伝子の転写の誘導性の発現若しくは抑制を介するもの、又は細胞死の誘導を介して永続的なものを含めて、治療用抗体の產生をオン又はオフにすることができる誘導可能な安全性スイッチが含まれる。好適な安全性スイッチは、当該技術分野において公知であり、例えば誘導性カスパーーゼ9を含む。

#### 【 0 0 4 4 】

##### 治療用モノクローナル抗体

本発明の方法によって作製されるB細胞は、治療用モノクローナル抗体を分泌するよう操作されている。治療用モノクローナル抗体は、当該技術分野において周知であり、例えば、3F8、8H9、アバゴボマブ(Abagovomab)、アブシキシマブ(Abciximab)、アブリルマブ(Abrilumab)、アクトクスマブ(Actoxumab)アダリムマブ(Adalimumab)、アデカツムマブ(Adecatumumab)、アデュカヌマブ(Aducanumab)、アフェリモマブ(Afelimomab)、アフツズマブ(Afutuzumab)、アラシズマブペゴール(Alacizumab pegol)、ALD518、アレムツズマブ(Alemtuzumab)、アリロクマブ(Alirocumab)、アルツモマブペント酸(Altumomab pentetate)、アマツキシマブ(Amatuximab)、アナツモマブマフェ

10

20

30

40

50

ナトクス(Anatumomab mafenatox)、アニフロルマブ(Anifrolumab)、アンルキンズマブ(Anrukinezumab)(=IMA-638)、アポリズマブ(Apolizumab)、アルシツモマブ(Arcitumomab)、アセリズマブ(Aselizumab)、アチヌマブ(Atinumab)、アツリズマブ(Atlizumab)(=トシリズマブ)、アトロリムマブ(Atorolimumab)、バピネウズマブ(Bapineuzumab)、バシリキシマブ(Basiliximab)、バビツキシマブ(Bavituximab)、ベクツモマブ(Bectumomab)、ベリムマブ(Belimumab)、ベンラリズマブ(Benralizumab)、ベルチリムマブ(Bertilimumab)、ベシレソマブ(Besilesomab)、ベバシズマブ(Bevacizumab)、ベズロトクスマブ(Bezlotoxumab)、ビシロマブ(Biciromab)、ビマグルマブ(Bimagrumab)、ビバツズマブメルタンシン(Bivatuzumab mertansine)、ブリナツモマブ(Blinatumomab)、ブロソズマブ(Blosozumab)、ブレンツキシマブベドチン(Brentuximab vedotin)、ブリアキヌマブ(Briakinumab)、ブロダルマブ(Brodalumab)、カナキヌマブ(Canakinumab)、カンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)、カンツズマブラブタンシン(Cantuzumab ravtansine)、カプラシズマブ(Caplacizumab)、カプロマブペンデチド(Capromab pentetide)、カルルマブ(Carlumab)、カツマキソマブ(Catumaxomab)、CC49、cBR96-ドキソルビシン(doxorubicin)免疫コンジュゲート、セデリズマブ(Cedelizumab)、セルトリズマブペゴール(Certolizumab pegol)、セツキシマブ(Cetuximab)、Ch.14.18、シタツズマブボガトクス(Citatumab bogatox)、シクスツムマブ(Cixutumumab)、クラザキズマブ(Clazakizumab)、クレノリキシマブ(Clenoliximab)、クリバツズマブテトラキセタン(Clivatuzumab tetraxetan)、コナツムマブ(Conatumab)、コンシズマブ(Concizumab)、クレネズマブ(Crenezumab)、CR6261、ダセツズマブ(Dacetuzumab)、ダクリズマブ(Daclizumab)、ダロツズマブ(Dalotuzumab)、ダラツムマブ(Daratumumab)、デムシズマブ(Demcizumab)、デノスマブ(Denosumab)、デツモマブ(Detumomab)、ジヌツキシマブ(Dinutuximab)、ジリダブマブ(Diridavumab)、ドルリモマブアリトクス(Dorlimomab aritox)、ドロジツマブ(Drozitumab)、デュリゴツマブ(Duligotumab)、デュピルマブ(Dupilumab)、デュシギツマブ(Dusigatumab)、エクロメキシマブ(Ecromeximab)、エクリズマブ(Eculizumab)、エドバコマブ(Edobacomab)、エドレコロマブ(Edrecolomab)、エファリズマブ(Efalizumab)、エフングマブ(Efungumab)、エルデルマブ(Eldeleumab)、エロツズマブ(Elotuzumab)、エルシリモマブ(Elsilimomab)、エミベツズマブ(Emibetuzumab)、エナバツズマブ(Enavatuzumab)、エンホルツマブベドチン(Enfortumab vedotin)、エンリモマブペゴール(Enlimomab pegol)、エノキズマブ(Enokizumab)、エノチクマブ(Enoticumab)、エンシツキシマブ(Ensituximab)、エピツモマブシツキセタン(Epitumomab cituxetan)、エプラツズマブ(Epratuzumab)、エルリズマブ(Erlizumab)、エルツマキソマブ(Ertumaxomab)、エタラシズマブ(Etaracizumab)、エトロリズマブ(Etolizumab)、エビナクマブ(Evinacumab)、エボロクマブ(Evolocumab)、エキスピビルマブ(Exbivirumab)、ファノレソマブ(Fanolesomab)、ファラリモマブ(Faralimomab)、ファルレツズマブ(Farletuzumab)、ファシヌマブ(Fasinumab)、FBTA05、フェルビズマブ(Felvizumab)、フェザキヌマブ(Fezakinumab)、フィクラツズマブ(Ficlatuzumab)、フィギツムマブ(Figitumumab)、フランボツマブ(Flanvotumab)、フレチクマブ(Fletikumab)、フォントリズマブ(Fontolizumab)、フォラルマブ(Foralumab)、フォラビルマブ(Foravirumab)、フレソリムマブ(Fresolimumab)、フルラヌマブ(Fulranumab)、フツキシマブ(Futuximab)、ガリキシマブ(Galiximab)、ガニツマブ(Ganitumab)、ガンテネルマブ(Gantenerumab)、ガビリモマブ(Gavilimomab)、ゲムツズマブオゾガマイシン(Gemtuzumab ozogamicin)、ゲボキズマブ(Gevokizumab)、ギレンツキシマブ(Girentuximab)、グレムバツムマブベドチン(Glembatumumab vedotin)、ゴリムマブ(Golimumab)、ゴミリキシマブ(Gomiliximab)、グセルクマブ(Guselkumab)、イバリズマブ(Ibalizumab)、イブリツモマブチウキセタン(Ibritumomab tiuxetan)、イクルクマブ(Icrucumab)、イゴボマブ(Igovomab)、IMAB362、イムシロマブ(Imciromab)、イムガツズマブ(Imgatuzumab)、インクラクマブ(Inclacumab)、インダツキシマブラブタンシン(Indatuximab ravtansine)、インフリキシマブ(Infliximab)、インテツムマブ(Intetumumab)、イノリモマブ(

10

20

30

40

50

ブ(Inolimumab)、イノツズマブオゾガマイシン(Notuzumab ozogamicin)、イピリムマブ(Ipilimumab)、イラツムマブ(Iratumumab)、イトリズマブ(Itolizumab)、イキセキズマブ(Ikekizumab)、ケリキシマブ(Keliximab)、ラベツズマブ(Labetuzumab)、ラムプロリズマブ(Lambrolizumab)、ラムパリズマブ(Lampalizumab)、レブリキズマブ(Lebrikizumab)、レマレスマブ(Lemalesomab)、レルデリムマブ(Lerdelimumab)、レキサツムマブ(Lexatumumab)、リビビルマブ(Libivirumab)、リファスツズマブペトシン(Lifastuzumab vedotin)、リゲリズマブ(Ligelizumab)、リンツズマブ(Lintuzumab)、リリルマブ(Lirilumab)、ロデルシズマブ(Lodelcizumab)、ロルボツズマブメルタンシン(Lorvotuzumab mertansine)、ルカツムマブ(Lucatumumab)、ルリズマブペゴール(Lulizumab pegol)、ルミリキシマブ(Lumiliximab)、マパツムマブ(Mapatumumab)、マルゲツキシマブ(Margetuximab)、マスリモマブ(Maslimomab)、マブリリムマブ(Mavrilimumab)、マツズマブ(Matuzumab)、メポリズマブ(Mepolizumab)、メテリムマブ(Metelimumab)、ミラツズマブ(Milatuzumab)、ミンレツモマブ(Minretumomab)、ミツモマブ(Mitumomab)、モガムリズマブ(Mogamulizumab)、モロリムマブ(Morolimumab)、モタビズマブ(Motavizumab)、モキセツモマブパストクス(Moxetumomab pasudotox)、ムロモナブ-CD3(Muromonab-CD3)、ナコロマブタフェナトクス(Nacolomab tafenatox)、ナミルマブ(Namilumab)、ナブツモマブエスタフェナトクス(Naptumomab estafenatox)、ナルナツマブ(Narnatumab)、ナタリズマブ(Natalizumab)、ネバクマブ(Nebacumab)、ネシツムマブ(Necitumumab)、ネレリモマブ(Nerelimumab)、ネスバクマブ(Nesvacumab)、ニモツズマブ(Nimotuzumab)、ニボルマブ(Nivolumab)、ノフェツモマブメルペンタン(Nofetumomab merpentan)、オビルトキサキシマブ(Obiltoxaximab)、オカラツズマブ(Ocaratuzumab)、オクレリズマブ(Ocrelizumab)、オデュリモマブ(Odulimumab)、オファツムマブ(Ofatumumab)、オララツマブ(Olaratumab)、オロキズマブ(Olokizumab)、オマリズマブ(Omalizumab)、オナルツズマブ(Onartuzumab)、オンツキシズマブ(Onuxizumab)、オポルツズマブモナトクス(Oportuzumab monatox)、オレゴボマブ(Oregovomab)、オルチクマブ(Orticumab)、オテリキシズマブ(Otelixizumab)、オトレルツズマブ(Otlertuzumab)、オキセルマブ(Oxelumab)、オザネズマブ(Ozanezumab)、オゾラリズマブ(Ozoralizumab)、パギバキシマブ(Pagibaximab)、パリビズマブ(Palivizumab)、パニツムマブ(Panitumumab)、パンコマブ(Pankomab)、パノバクマブ(Panobacumab)、パルサツズマブ(Parsatuzumab)、パスコリズマブ(Pascolizumab)、パテクリズマブ(Pateclizumab)、パトリツマブ(Patritumab)、ペムプロリズマブ(Pmbrolizumab)、ペムツモマブ(Pemtumomab)、ペラキズマブ(Perakizumab)、ペルツズマブ(Pertuzumab)、ペキセリズマブ(Pexelizumab)、ピジリズマブ(Pidilizumab)、ピナツズマブベドチン(Pinatuzumab vedotin)、ピンツモマブ(Pintumomab)、プラクルマブ(Placulumab)、ポラツズマブベドチン(Polatuzumab vedotin)、ポネズマブ(Ponezumab)、プリリキシマブ(Priliximab)、プリトキサキシマブ(Pritoxaximab)、プリツムマブ(Pritumumab)、PRO140、クイリズマブ(Quilizumab)、ラコツモマブ(Racotumomab)、ラドレツマブ(Radretumab)、ラフィビルマブ(Rafivirumab)、ラムシルマブ(Ramucirumab)、ラニビズマブ(Ranibizumab)、ラキシバクマブ(Raxibacumab)、レガビルマブ(Regavirumab)、レスリズマブ(Reslizumab)、リロツムマブ(Rilotumumab)、リツキシマブ(Rituximab)、ロバツムマブ(Robatumumab)、ロレデュマブ(Roledumab)、ロモソズマブ(Romosozumab)、ロンタリズマブ(Rontalizumab)、ロベリズマブ(Rovelizumab)、ルプリズマブ(Ruplizumab)、サマリズマブ(Samalizumab)、サリルマブ(Sarilumab)、サツモマブペンドチド(Satumomab pendetide)、セクキヌマブ(Secukinumab)、セリバンツマブ(Seribantumab)、セトキサキシマブ(Setoxaximab)、セビルマブ(Sevirovumab)、シブロツズマブ(Sibrotuzumab)、SGN-CD19A、SGN-CD33A、シファリムマブ(Sifalimumab)、シルツキシマブ(Siltuximab)、シムツズマブ(Simtuzumab)、シプリリズマブ(Siplizumab)、シルクマブ(Sirukumab)、ソフィツズマブベドチン(Sofituzumab vedotin)、ソラネズマブ(Solanezumab)、ソリトマブ(Solitomab)、ソネプシズマブ(Sonepcizumab)、ソンツズマブ(Sontuzumab)、ス

タムルマブ(Stamulumab)、スレソマブ(Sulesomab)、スピズマブ(Suvizumab)、タバルマブ(Tabalumab)、タカツズマブテトラキセタン(Tacatuzumab tetraxetan)、タドシズマブ(Tadocizumab)、タリズマブ(Talizumab)、タネズマブ(Tanezumab)、タプリツモマブパプトクス(Taplitumomab paptox)、タレキシツマブ(Tarextumab)、テフィバズマブ(Tefibazumab)、テリモマブアリトクス(Telimumab aritox)、テナツモマブ(Tenatumomab)、テネリキシマブ(Teneliximab)、テプリズマブ(Teplizumab)、テプロツムマブ(Teprotumumab)、TGN1412、チシリムマブ(Ticilimumab)(=トレメリムマブ(tremelimumab))、チルドラキズマブ(Tildrakizumab)、チガツズマブ(Tigatuzumab)、TNX-650、トシリズマブ(Tocilizumab)(=アツリズマブ(atlizumab))、トラリズマブ(Toralizumab)、トシツモマブ(Tositumomab)、トベツマブ(Tovetumab)トロロキヌマブ(Tralokinumab)、トラスツズマブ(Trastuzumab)、TRBS07、トレガリズマブ(Tregalizumab)、トレメリムマブ(Tremelimumab)、ツコツズマブセルモロイキン(Tucotuzumab celmoleukin)、ツビルマブ(Tuvirumab)、ウブリツキシマブ(Ublituximab)、ウレルマブ(Urelumab)、ウルトキサズマブ(Urtoxazumab)、ウステキヌマブ(Ustekinumab)、バンチクツマブ(Vantictumab)、バパリキシマブ(Vapaliximab)、バルリルマブ(Varlilumab)、バテリズマブ(Vatelizumab)、ベドリズマブ(Vedolizumab)、ベルツズマブ(Veltuzumab)、ベパリモマブ(Vepalimumab)、ベセンクマブ(Vesencumab)、ビシリズマブ(Visilizumab)、ボロシキシマブ(Volociximab)、ボルセツズマブマフォドチン(Vorsetuzumab mafodotin)、ボツムマブ(Votumumab)、ザルツムマブ(Zalutumumab)、ザノリムマブ(Zanolimumab)、ザツキシマブ(Zatuximab)、ジラリムマブ(Ziralimumab)、及びゾリモマブ(Zolimomab)を含む。  
10

#### 【0045】

治療用抗体は、TNF- $\alpha$ 、IGHE、IL-1、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6R、IL-9、IL-12、IL-13、IL-17A、IL-20、IL-22、IL-23、IL-25、BAFF、RANKL、インテグリン-4、IL-6R、VEGF-A、VEGFR1、VEGFR2、EGFR、HER2、HER3、CA125、インテグリン-4、7、インテグリン-7、7、インターフェロン- $\gamma$ 受容体、CXCR4、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD56、CD70、CD74、CD79B、CD80、CD125、CD137、CD140a、CD147、CD152、CD154、CD200、CD221、CCR4、CCR5、gp120、アンジオポエチン3、PCSK9、HNGF、HGF、GD2、GD3、C5、FAP、ICAM-1、LFA-1、インターフェロン- $\beta$ 、インターフェロン- $\gamma$ 、インターフェロン- $\gamma$ 誘導タンパク質、SLAMF7、HHGFR、TWEAK受容体、NRP1、EpCAM、CEA、CEA関連抗原メソメリソ(mesomelin)、MUC1、IGF-1R、TRAIL-R2、DR5、DLL4、VWF、MCP-1、 $\alpha$ -アミロイド、ホスファチジルセリン、アカゲザル因子、CCL11、CXCR4NARP-1、RTN4、ACVR2B、SOST、NOGO-A、スクレロスチン、炭疽菌、トリインフルエンザ、インフルエンザA赤血球凝集素、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、呼吸器多核体ウイルス、狂犬病ウイルス糖タンパク質、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、結核、エボラ、黄色ブドウ球菌、SARS、MERS、RSV、マラリア、HPV、HSV、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$  RI、NGF、LTA、AOC3、ITGA2、GM-CSF、GM-CSF受容体、oxLDL、LOXL2、RON、KIR2D、PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、BTLA、エピシアリン、ミオスタチン、又はHIV-1に対して特異的であり得る。  
30

#### 【0046】

##### 遺伝子編集

遺伝子編集、又はゲノム編集は、ヌクレアーゼを用いて、DNAが挿入、置換、又はゲノムから除去される遺伝子操作の1つの型である。ヌクレアーゼは人工的に操作されてもよい。代替的に、ヌクレアーゼは天然に見られるものであってもよい。ヌクレアーゼは、ゲノム内の所望の位置において特異的な二重鎖切断(DSB)を発生する。続いて、細胞の内在性の修復メカニズムが、相同組換え(HR)及び非相同末端結合(NHEJ)のような天然のプロセスによって、誘導された切断を修復する。ヌクレアーゼは、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR(例  
40

えばCRISPR/Casシステム)、及び操作されたメガヌクレアーゼに再操作されたホーミングエンドヌクレアーゼを含む。CRISPRヌクレアーゼは、例えば、Casヌクレアーゼ、Cpf1ヌクレアーゼ、Cmrヌクレアーゼ、Csfヌクレアーゼ、Csmヌクレアーゼ、Csnヌクレアーゼ、Csyヌクレアーゼ、C2c1ヌクレアーゼ、C2c3ヌクレアーゼ、及びC2c3ヌクレアーゼを含む。

#### 【0047】

##### DNA結合ドメイン

本明細書に記載されるのは、B細胞の遺伝子のいずれかの標的部位に特異的に結合するDNA結合ドメインを含む組成物である。好ましい実施形態において、遺伝子は、免疫グロブリン遺伝子、抗原提示を増強するタンパク質をコードする遺伝子、抗原提示を抑制するタンパク質をコードする遺伝子、抗体保持又は分泌に関連する配列を含む遺伝子座位、サイトカインをコードする遺伝子、メモリーB細胞への分化を促進する遺伝子、形質細胞への分化を促進する遺伝子、又はB細胞のリンパ系器官(例えば、リンパ節、脾臓、骨髄)への輸送を促進する遺伝子である。

10

#### 【0048】

任意のDNA結合ドメインが、本明細書に開示される組成物及び方法において使用できる。

#### 【0049】

ある実施形態において、DNA結合ドメインはジンクフィンガータンパク質を含む。好ましくは、ジンクフィンガータンパク質は、選択された標的部位に結合するよう操作された非天然のものである。例えば、Beerii等、(2002)Nature Biotechnol.20:135～141頁、Pabo等、(2001)Ann. Rev. Biochem.70:313～340頁、Isalan等、(2001)Nature Biotechnol.19:656～660頁、Segal等、(2001)Curr. Opin. Biotechnol.12:632～637頁、Choo等、(2000)Curr. Opin. Struct Biol.10:411～416頁、米国特許第6,453,242号、米国特許第6,534,261号、米国特許第6,599,692号、米国特許第6,503,717号、米国特許第6,689,558号、米国特許第7,030,215号、米国特許第6,794,136号、米国特許第7,067,317号、米国特許第7,262,054号、米国特許第7,070,934号、米国特許第7,361,635号、米国特許第7,253,273号、及び米国特許出願公開第2005/0064474号、米国特許出願公開第2007/0218528号、米国特許出願公開第2005/0267061号を参照でき、全ては参考によりそれらの全てが本明細書に組み込まれる。

20

#### 【0050】

操作されたジンクフィンガー結合ドメインは天然のジンクフィンガータンパク質(ZFP)と比べて新規の結合特異性を有することができる。操作する方法は、合理的な設計及び様々な型の選択を含むが、これらに限定されない。合理的な設計は、例えば、トリプレット(又はクアドルプレット(quadruplet))ヌクレオチド配列と、個別のジンクフィンガーアミノ酸配列とを含み、各々のトリプレット又はクアドルプレットヌクレオチド配列が特定のトリプレット又はクアドルプレット配列に結合するジンクフィンガーの1つ以上のアミノ酸配列と関連付けられているデータベースを用いることを含む。例えば、参考によりその全てが本明細書に組み込まれる米国特許第6,453,242号及び米国特許第6,534,261号を参照できる。

30

#### 【0051】

ファージディスプレイ及びツーハイブリッドシステムを含む例示的な選択方法は、米国特許第5,789,538号、米国特許第5,925,523号、米国特許第6,007,988号、米国特許第6,013,453号、米国特許第6,410,248号、米国特許第6,140,466号、米国特許第6,200,759号、及び米国特許第6,242,568号、並びにWO98/37186、WO98/53057、WO00/27878、WO01/88197及びGB 2,338,237に開示される。更に、ジンクフィンガー結合ドメインの結合特異性を増強することは、例えば、米国特許第6,794,136号に記載されている。

40

#### 【0052】

更に、これら及び他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメイン及び/又

50

は多指のジンクフィンガータンパク質は、例えば、5以上のアミノ酸長のリンクマーを含む任意の好適なリンクマー配列を用いて共に連結してもよい。例えば、6つ以上のアミノ酸長の例示的なリンクマー配列について、米国特許第6,479,626号、米国特許第6,903,185号、及び米国特許第7,153,949号をも参照できる。本明細書において記載されるタンパク質は、タンパク質の個別のジンクフィンガー間の好適なリンクマーの任意の組合せを含み得る。更に、ジンクフィンガー結合ドメインの結合特異性を増強することは、例えば、米国特許第6,794,136号に記載されている。

#### 【0053】

##### 標的部位の選択

ZFP並びに融合タンパク質(及びそれをコードするポリヌクレオチド)の設計及び構築の方法は、当業者に公知であり、米国特許第6,140,0815号、米国特許第789,538号、米国特許第6,453,242号、米国特許第6,534,261号、米国特許第5,925,523号、米国特許第6,007,988号、米国特許第6,013,453号、米国特許第6,200,759号、WO95/19431、WO96/06166、WO98/53057、WO98/54311、WO00/27878、WO01/60970、WO01/88197、WO02/099084、WO98/53058、WO98/53059、WO98/53060、WO02/016536、及びWO03/016496に詳述される。

10

#### 【0054】

ある実施形態において、DNA結合ドメインは、HLA遺伝子又はHLA調節遺伝子における標的部位に(配列特異的な様式で)結合する操作されたジンクフィンガータンパク質であり、HLAの発現をモジュレートする。ZFPは、対象とする特異的なハロタイプに選択的に結合できる。米国の住民において同定されたHLAのハロタイプ及びそれらの異なる人種による頻度についてについての議論は、参照により本明細書に組み込まれるMaiers等、(2007)Human Immunology 68:779～788頁を参照できる。

20

#### 【0055】

いくつかの実施形態において、DNA結合ドメインはヌクレアーゼに由来し得る。例えば、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-Csml、I-PanI、I-SceII、I-Ciel、I-TevI、I-TevII、及びI-TevIIIのようなホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼの認識配列は、公知である。米国特許第5,420,032号、米国特許第6,833,252号、Belfort等、(1997)Nucleic Acids Res. 25:3379～3388頁、Dujon等、(1989)Gene 82:115～118頁、Perler等、(1994)Nucleic Acids Res. 22:1125～1127頁、Jasin(1996)Trends Genet 12:224～228頁、Gimble等、(1996)J. Mol. Biol. 263:163～180頁、Argast等、(1998)J. Mol. Biol. 280:345～353頁、及びNew England Biolabs社のカタログもまた参照できる。更に、ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼのDNA結合特異性は、非天然標的部位に結合するよう操作できる。例えば、Chevalier等、(2002)Molec. Cell 10:895～905頁、Epinat等、(2003)Nucleic Acids Res. 31:2952～2962頁、Ashworth等、(2006)Nature 441:656～659頁、Paques等、(2007)Current Gene Therapy 7:49～66頁、米国特許出願公開20070117128を参照できる。

30

#### 【0056】

他の実施形態において、DNA結合ドメインは、植物の病原体であるキサントモナス(Boc'h等、(2009)Science 326:1509～1512頁、並びにMoscou及びBogdanove(2009)Science 326:1501頁を参照できる)並びにラルストニア(Heuer等、(2007)Applied and Environmental Microbiology 73(13):4379～4384頁、米国特許出願第20110301073号及び米国特許出願第20110145940号を参照できる)に由来するものと同様のTALエフェクターからの操作されたドメインを含む。キサントモナス属の植物の病原体細菌は、重要な作物植物において多くの疾患を引き起こすことが知られる。キサントモナスの病原性は、保存されたIII型分泌(T3S)システムに依存し、それは25を超える異なるエフェクタータンパク質を植物細胞に注入することができる。これらの注入されるタンパク質のうちで、転写活性化因子様エフェクター(TALE)は、植物の転写活性化因子を模倣し、植物のトランスクリプトープを操作する(Kay等、(2007)Science 318:648～651頁)。これらのタン

40

50

10 パク質はDNA結合ドメイン及び転写活性化ドメインを含む。最もよく特徴づけられたTALEの1つは、*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*由来のAvrBs3である(Bonas等、(1989)Mol Gen Genet 218:127～136頁及びWO2010079430を参照できる)。TALEは、タンデムリピートの一か所に集められたドメインを含み、各々のリピートは約34のアミノ酸を含み、これは、これらのタンパク質のDNA結合特異性に重要である。更に、それらは、核局在化配列及び酸性転写活性化ドメインを含む(総説について、Schomack S等、(2006)J Plant Physiol 163(3):256～272頁を参照できる)。更に、植物病原性細菌である*Ralstonia solanacearum*において、*R. solanacearum* biovar 1株GMI1000及びbiovar 4株RS1000におけるbrg11及びhpx17と設計された2つの遺伝子が、キサントモナスのAvrBs3ファミリーと相同であることが見出された(Heuer等、(2007)Appl and Envir Micro 73(13):4379～4384頁を参照できる)。これらの遺伝子は、互いのヌクレオチド配列において98.9%同一であるが、hpx17のリピートドメインにおける1,575bpの欠失において異なる。しかしながら、両方の遺伝子産物は、キサントモナスのAvrBs3ファミリータンパク質と40%未満の配列同一性を有する。

#### 【0057】

更に、これら及び他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメイン及び/又は多指のジンクフィンガータンパク質若しくはTALEは、例えば、5以上のアミノ酸長のリンカーを含む任意の好適なリンカー配列を用いて共に連結してもよい。6以上のアミノ酸長の例示的なリンカー配列について、米国特許第6,479,626号、米国特許第6,903,185号、及び米国特許第7,153,949号をも参照できる。本明細書において記載されるタンパク質は、タンパク質の個別のジンクフィンガー間の好適なリンカーの任意の組合せを含み得る。更に、ジンクフィンガー結合ドメインの結合特異性を増強することは、例えば、米国特許第6,794,136号に記載されている。

#### 【0058】

##### 融合タンパク質

ある実施形態において、融合タンパク質はDNA結合ドメイン及び切断(ヌクレアーゼ)ドメインを含む。それ自体として、遺伝子改変は、ヌクレアーゼ、例えば操作されたヌクレアーゼを用いて達成することができる。操作されたヌクレアーゼの技術は、天然のDNA結合タンパク質の操作に基づく。例えば、改変されたDNA結合特異性を有するホーミングエンドヌクレアーゼの操作が記載されている。Chames等、(2005)Nucleic Acids Res 33(20):e178、Arnould等、(2006)J. Mol. Biol. 355:443～458頁。更に、ZFPの操作もまた記載されている。例えば、米国特許第6,534,261号、米国特許第6,607,882号、米国特許第6,824,978号、米国特許第6,979,539号、米国特許第6,933,113号、米国特許第7,163,824号、及び米国特許第7,013,219号を参照できる。

#### 【0059】

好ましい実施形態において、ヌクレアーゼはCRISPR/Casシステムを含む。システムのRNA構成要素をコードするCRISPR(クラスター化等間隔短鎖回分リピート)座位、及びタンパク質をコードするCas(CRISPR関連)座位(Jansen等、2002.Mol. Microbiol. 43:1565～1575頁、Makarova等、2002.Nucleic Acids Res. 30:482～496頁、Makarova等、2006.Biol. Direct 1: 7、Haft等、2005.PLoS Comput Biol. 1:e60)は、CRISPR/Casヌクレアーゼシステムの遺伝子配列を形成する。微生物の宿主内のCRISPR座位は、CRISPR関連(Cas)遺伝子、及びCRISPR媒介性核酸切断の特異性をプログラムすることができる非コードのRNA要素の組合せを含む。

#### 【0060】

II型CRISPRは、最もよく特徴づけられた系の1つであり、4つの連続ステップにおいて標的化DNA二重鎖切断を実施する。第1に、2つの非コードRNA、pre-crRNAアレイ及びtracrRNAがCRISPR座位より転写される。第2に、tracrRNAがpre-crRNAのリピート領域にハイブリダイズして、個別のスペーサー配列を含む成熟crRNAへのpre-crRNAの加工を媒介する。第3に、成熟crRNA:tracrRNA複合体は、cRNA上のスペーサーと標的DNA上の、標的認識のための追加で必要とされるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に続くブ

10

20

30

40

50

ロトスペーサーとの間のWatson-Crick塩基対形成を介してCas9を標的DNAに誘導する。最終的に、Cas9は、標的DNAの切断を媒介してプロトスペーサー内に二重鎖切断を生成する。CRISPR/Casシステムの活性は3つのステップを含む:(i)「適応」と呼ばれるプロセスにおける、将来の攻撃を防ぐための外来DNA配列のCRISPRアレイへの挿入、(ii)関連するタンパク質の発現並びにアレイの発現及び加工、後に続く(iii)外来核酸とのRNA媒介性の干渉。したがって、細菌細胞内において、いくつかのいわゆる「Cas」タンパク質は、CRISPR/Casシステムの自然の機能に関与し、外来DNAの挿入のような機能において役割を果たす。

#### 【0061】

ある実施形態において、Casタンパク質は、天然のCasタンパク質の「機能性誘導体」であってよい。天然の配列のポリペプチドの「機能性誘導体」は、天然の配列のポリペプチドと共に定性的な生物学的特性を有する化合物である。「機能性誘導体」は、天然の配列の断片並びに天然の配列のポリペプチドの及びその断片の誘導体を含むがこれらに限定されないが、但し、それらが対応する天然の配列のポリペプチドと共に生物活性を有するという条件である。本明細書において期待される生物活性は、DNA基質を断片に加水分解させる機能性誘導体の能力である。用語「誘導体」は、ポリペプチドアミノ酸配列バリアントと共有結合修飾の両方、並びにそれらの融合を包含する。Casポリペプチド又はそれらの断片の好適な誘導体は、Casタンパク質又はそれらの断片の変異、融合、共有結合修飾を含むが、これらに限定されない。Casタンパク質又はそれらの断片を含むCasタンパク質、並びにCasタンパク質又はそれらの断片の誘導体は、細胞から取得可能であるか、若しくはインビトロで作製し得るか、又はこれら2つの手順の組合せによって取得可能である。細胞は、天然でCasタンパク質を産生する細胞であり得るか、又は、天然でCasタンパク質を産生し、内在性Casタンパク質を高い発現レベルで産生するか、若しくは、外来性で導入された、内在性Casと同一であるか、若しくは異なるCasをコードする核酸からCasタンパク質を産生するように遺伝子操作されている細胞であり得る。いくつかの場合において、細胞は天然でCasタンパク質を産生せず、Casタンパク質を産生するよう遺伝子操作される。

#### 【0062】

方法はまた、シングルガイドRNA(sgRNA)を細胞又は生物へと導入することを含む。ガイドRNA(sgRNA)は、標的の染色体DNAに相補的である核酸配列を含む。sgRNAは、例えば、crRNA配列(標的DNA配列に相補的)及び共通のtracrRNA配列を含むか、又はcrRNA-tracrRNAハイブリッドとして含む、操作された一本鎖ガイドRNAであり得る。sgRNAは、DNA(適切なプロモーターを伴う)として、インビトロ転写されたRNAとして、又は合成RNAとして細胞又は生物へと導入できる。

#### 【0063】

更に、ZFP及び/又はTALEは、ヌクレアーゼドメインへと融合されてZFN及びTALEN、すなわち操作された(ZFP又はTALE)DNA結合ドメインを介して、対象とする核酸標的を認識することができ、且つヌクレアーゼ活性によってDNA結合部位近辺でDNAの切断を引き起こすことができる機能的存在を生じるようにされてきている。例えば、Kim等、(1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(3):1156~1160頁を参照できる。最近、そのようなヌクレアーゼが、様々な生物においてゲノム改変のために使用されてきている。例えば、米国特許出願公開第20030232410号、米国特許出願公開第20050208489号、米国特許出願公開第20050026157号、米国特許出願公開第20050064474号、米国特許出願公開第20060188987号、米国特許出願公開第20060063231、及び国際特許出願公開WO07/014,275を参照できる。

#### 【0064】

したがって、本明細書において記載される方法及び組成物は、広く適用可能であり、任意の対象とするヌクレアーゼを含み得る。ヌクレアーゼの非限定的な例は、メガヌクレアーゼ、TALEN、及びジンクフィンガーヌクレアーゼを含む。ヌクレアーゼは、異種性のDNA結合及び切断ドメイン(例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、異種性切断ドメイン

10

20

30

40

50

を有するメガヌクレアーゼDNA結合ドメイン)を含み得るか、又は代替的に、天然のヌクレアーゼのDNA結合ドメインが、選択された標的部位に結合するよう改変され得る(例えば、同族の結合部位とは異なる部位に結合するよう操作されているメガヌクレアーゼ)。

#### 【 0 0 6 5 】

本明細書において記載されるヌクレアーゼのいずれにおいても、ヌクレアーゼは操作されたTALE DNA結合ドメイン及びヌクレアーゼドメイン(例えば、エンドヌクレアーゼ及び/又はメガヌクレアーゼドメイン)を含み得、TALENとも呼ばれる。これらの、使用者の選択した標的配列との堅固な部位特異的相互作用のためのTALENタンパク質を操作するための方法及び組成物は、公開されている(例えば米国特許第8,586,526号を参照できる)。いくつかの実施形態において、TALENはエンドヌクレアーゼ(例えばFold)切断ドメイン又は切断ハーフ-ドメインを含む。他の実施形態において、TALEヌクレアーゼはメガTALである。これらのメガTALヌクレアーゼは、TALE DNA結合ドメイン及びメガヌクレアーゼ切断ドメインを含む融合タンパク質である。メガヌクレアーゼ切断ドメインは、モノマーとして活性であり、活性にダイマー化を必要としない。(Boissel等、(2013)Nucl Acid Res: 1 ~ 13頁、doi: 10.1093/nar/gkt1224を参照できる)更に、ヌクレアーゼドメインはまた、DNA結合機能を示し得る。

#### 【 0 0 6 6 】

なお更なる実施形態において、ヌクレアーゼは、コンパクトTALEN(cTALEN)を含む。これらは、TALE DNA結合ドメインをTevIヌクレアーゼドメインに連結する一本鎖融合タンパク質である。融合タンパク質は、TevIヌクレアーゼドメインに対してTALE DNA結合ドメインが局在化する場所に応じて、TALE領域によって局在化されるニッカーゼとしてか、又は二本鎖切断を生じるかのいずれかとして機能することができる(Beurdeley等、(2013)Nat Comm: 1 ~ 8頁 DOI: 10.1038/ncomms2782を参照できる)。追加のTALE N(例えば1つ以上のTALEN(cTALEN若しくはFokI-TALEN)と1つ以上のメガ-TAL)、又は他のDNA切断酵素と組み合わせて任意のTALENを使用することができる。

#### 【 0 0 6 7 】

ある実施形態において、ヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ(ホーミングエンドヌクレアーゼ)又は、切断活性を示すそれらの部分を含む。天然のメガヌクレアーゼは、15 ~ 40塩基対の切断部位を認識し、通常4つのファミリー:LAGLIDADG(配列番号1)ファミリー、GIGY-YIGファミリー、His-Cystボックスファミリー、及びHNHファミリーに分類される。例示的なホーミングエンドヌクレアーゼは、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-Ppol、I-SceIII、I-Crel、I-TevI、I-TevII、及びI-TevIIを含む。それらの認識配列は公知である。米国特許第5,420,032号、米国特許第6,833,252号、Belfort等、(1997)Nucleic Acids Res. 25:3379 ~ 3388頁、Dujon等、(1989)Gene 82:115 ~ 118頁、Perler等、(1994)Nucleic Acids Res. 22:1125 ~ 1127頁、Jasin(1996)Trends Genet 12:224 ~ 228頁、Gimble等、(1996)J. Mol. Biol. 263:163 ~ 180頁、Argast等、(1998)J. Mol. Biol. 280:345 ~ 353頁、及びNew England Biolabs社のカタログもまた参照できる。

#### 【 0 0 6 8 】

当初はLAGLIDADG(配列番号1)ファミリーである天然のメガヌクレアーゼに由来するDNA結合ドメインは、植物、酵母、ショウジョウバエ、哺乳動物細胞、及びマウスにおいて部位特異的ゲノム改変を促進するために使用されているが、このアプローチは、メガヌクレアーゼ認識配列を保存する相同遺伝子の改変(Monet等、(1999)Biochem Biophysics. Res. Common. 255:88 ~ 93頁)、又は認識配列が導入されている予め操作されたゲノム(Route等、(1994)Mol. Cell. Biol. 14:8096 ~ 106頁、Chilton等、(2003)Plant Physiology. 133:956 ~ 65頁、Puchta等、(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5055 ~ 60頁、Rong等、(2002)Genes Dev. 16:1568 ~ 81頁、Gouble等、(2006)J. Gene Med. 8(5):616 ~ 622頁)のいずれかに限定されている。したがって、メガヌクレアーゼを操作して、医学的又は生物科学的に関連する部位において新規の結合特異性を示すようにするための努力がなされてきている(Porteus等、(2005)Nat Biotechnol. 23:967 ~ 7

10

20

30

40

50

3頁、Sussman等、(2004)J. Mol. Biol. 342:31～41頁、Epinat等、(2003)Nucleic Acids Res. 31: 2952～62頁、Chevalier等、(2002)Molec. Cell 10:895～905頁、Epinat等、(2003)Nucleic Acids Res. 31:2952～2962頁、Ashworth等、(2006)Nature 441:656～659頁、Paques等、(2007)Current Gene Therapy 7:49～66頁、米国特許出願公開第20070117128号、米国特許出願公開第20060206949号、米国特許出願公開第20060153826号、米国特許出願公開第20060078552号、及び米国特許出願公開第20040002092号)。更に、メガヌクレアーゼ由来の天然又は操作されたDNA結合ドメインは、異種性のヌクレアーゼ由来の切断ドメインと作動可能に連結することができ(例えば、FokI)、且つ/又はメガヌクレアーゼ由来の切断ドメインは、異種性のDNA結合ドメインと作動可能に連結することができる(例えば、ZFP若しくはTALE)。

10

#### 【0069】

他の実施形態において、ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)又はTALE DNA結合ドメイン-ヌクレアーゼ融合(TALEN)である。ZFN及びTALENは、選択された標的部位に結合するよう操作されているDNA結合ドメイン(ジンクフィンガータンパク質又はTALE DNA結合ドメイン)と、切断ドメイン又は切断ハーフ-ドメイン(例えば、本明細書において記載されるような制限及び/又はメガヌクレアーゼ由来)とを含む。

#### 【0070】

上に詳述されるように、ジンクフィンガー結合ドメイン及びTALE DNA結合ドメインは、選択した配列に結合するよう操作できる。例えば、Beerli等、(2002)Nature Biotechnol. 20:135～141頁、Pabo等、(2001)Ann. Rev. Biochem. 70:313～340頁、Isalan等、(2001)Nature Biotechnol. 19:656～660頁、Segal等、(2001)Curr. Opin. Biotechnol. 12:632～637頁、Choo等、(2000)Curr. Opin. Struct Biol. 10:411～416頁を参照できる。操作されたジンクフィンガー結合ドメイン又はTALEタンパク質は、天然のタンパク質と比べて新規の結合特異性を有することができる。操作する方法は、合理的な設計及び様々な型の選択を含むが、これらに限定されない。合理的な設計は、例えば、トリプレット(又はクアドルプレット)ヌクレオチド配列と、個別のジンクフィンガー又はTALEのアミノ酸配列とを含み、各々のトリプレット又はクアドルプレットヌクレオチド配列が特定のトリプレット又はクアドルプレット配列に結合するジンクフィンガー又はTALEリピート単位の1つ以上のアミノ酸配列と関連付けられているデータベースを用いることを含む。例えば、参照によりその全てが本明細書に組み込まれる米国特許第6,453,242号及び米国特許第6,534,261号を参照できる。

20

#### 【0071】

標的部位の選択並びに融合タンパク質(及びそれをコードするポリヌクレオチド)の設計及び構築の方法は、当業者に公知であり、参照によりそれらの全てが本明細書に組み込まれる米国特許第7,888,121号及び米国特許第8,409,861号に詳述される。

#### 【0072】

更に、これら及び他の参考文献に開示されるように、ジンクフィンガードメイン、TALE、及び/又は多指のジンクフィンガータンパク質は、例えば、5以上のアミノ酸長のリンカーを含む任意の好適なリンカー配列を用いて共に連結してもよい。(例えば、TGEKP(配列番号3)、TGGQRP(配列番号4)、TGQKP(配列番号5)、及び/又はTGSQKP(配列番号6))。例えば、6以上のアミノ酸長の例示的なリンカー配列について、米国特許第6,479,626号、米国特許第6,903,185号、及び米国特許第7,153,949号を参照できる。本明細書において記載されるタンパク質は、タンパク質の個別のジンクフィンガー間の好適なリンカーの任意の組合せを含み得る。米国仮出願第61/343,729号をも参照できる。

40

#### 【0073】

したがって、ZFN、TALEN及び/又はメガヌクレアーゼのようなヌクレアーゼは、任意のDNA結合ドメイン及び任意のヌクレアーゼ(切断)ドメイン(切断ドメイン、切断ハーフ-ドメイン)を含み得る。上述のように、切断ドメインはDNA結合ドメインに対して異種性であり得、例えば、ジンクフィンガー又はTALエフェクターのDNA結合ドメイン及び切断ドメインはヌクレアーゼ由来であるか、メガヌクレアーゼDNA結合ドメイン及び切断ドメイ

50

ンが異なるヌクレアーゼ由来である。異種性の切断ドメインは任意のエンドヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼから取得できる。切断部位が由来し得る例示的なエンドヌクレアーゼは、制限エンドヌクレアーゼ及びホーミングエンドヌクレアーゼを含むが、これらに限定されない。例えば、2002～2003年カタログ、New England Biolabs社, Beverly, Mass. 及びBelfort等、(1997)Nucleic Acids Res. 25:3379～3388頁を参照できる。DNAを切断する更なる酵素は公知である(例えば、S1ヌクレアーゼ、マンゴビーンヌクレアーゼ、胰臍DNase I、ミクロコッカルヌクレアーゼ、酵母HOエンドヌクレアーゼ、Lin n等、(編集)Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993をも参照できる)。これらの酵素(又はそれらの機能性断片)の1つ以上を、切断ドメイン及び切断ハーフ-ドメインの源として使用できる。

10

#### 【0074】

同様に、切断ハーフ-ドメインは、任意のヌクレアーゼ又はそれらの部分に由来し得、上述するように、切断活性のためにダイマー化を必要とする。一般的に、融合タンパク質が切断ハーフ-ドメインを含む場合、2つの融合タンパク質が切断に必要とされる。代替的に、2つの切断ハーフ-ドメインを含む単一のタンパク質を使用できる。2つの切断ハーフ-ドメインは、同一のエンドヌクレアーゼ(又はそれらの機能性断片)に由来し得るか、又は各々の切断ハーフ-ドメインが、異なるエンドヌクレアーゼ(又はそれらの機能性断片)に由来し得る。更に、2つの融合タンパク質について、互いに対する標的部位が好ましい配置とし、その結果、それらのそれぞれの標的部位に対する2つの融合タンパク質の結合が、切断ハーフ-ドメインを、例えばダイマー化によって機能性切断ドメインを形成することができる互いに対する空間的配向に位置させる。したがって、ある実施形態において、標的部位の近端は、5～8ヌクレオチド、又は15～18ヌクレオチド離れている。しかしながら、任意の整数のヌクレオチド又はヌクレオチド対が、2つの標的部位の間に介在できる(例えば2～50以上のヌクレオチド対)。一般的に、切断部位は標的部位間にある。

20

#### 【0075】

制限エンドヌクレアーゼ(制限酵素)は、多くの種に存在し、DNAに対する配列特異的な結合(認識部位におおいて)及び結合部位で又はその近辺でのDNAの切断が可能である。ある制限酵素(例えば、IIS型)は、認識部位から離れた部位でDNAを切断し、分離可能な結合及び切断ドメインを有する。例えば、IIS型酵素Fok Iは、その1つの鎖上で認識部位から9ヌクレオチドの位置、及び他方の鎖上で認識部位から13ヌクレオチドの位置でのDNAの二重鎖切断を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号、米国特許第5,436,150号、及び米国特許第5,487,994号、並びにLi等、(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275～4279頁、Li等、(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764～2768頁、Kim等、(1994a)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883～887頁、Kim等、(1994b)J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982を参照できる。したがって、一実施形態において、融合タンパク質は、少なくとも1つのIIS型制限酵素由来の切断ドメイン(又は切断ハーフ-ドメイン)と1つ以上のジンクフィンガー結合ドメインとを含み、それらは操作されていてもされなくてよい。

30

#### 【0076】

切断ドメインが結合ドメインから分離可能である例示的なIIS型制限酵素は、Fok Iである。この特定の酵素は、Bitinaite等、(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10,570～10,575に記載されるように、ダイマーとして活性である。したがって、本開示のために、開示される融合タンパク質に使用されるFok I酵素の部分は、切断ハーフ-ドメインであると考えられる。したがって、ジンクフィンガー-Fok I融合を用いる標的化二重鎖切断及び/又は細胞配列の標的化置き換えのために、各々がFok I切断ハーフ-ドメインを含む2つの融合タンパク質を、触媒的に活性な切断ドメインを再構成するのに使用できる。代替的に、ジンクフィンガー結合ドメインと2つのFok I切断ハーフ-ドメインを含む単一のポリペプチド分子をも使用することができる。ジンクフィンガー-Fok I融合を用いる標的化切断及び標的化配列変動のパラメーターは、本開示のいづこかに提示される。

40

#### 【0077】

50

切断ドメイン又は切断ハーフ-ドメインは、切断活性を保持するか、又は、多量体化(例えばダイマー化)して機能的な切断ドメインを生じる能力を保持する、タンパク質の任意の部分であり得る。

#### 【 0 0 7 8 】

例示的なHIS型制限酵素は、その全てが本明細書に組み込まれる国際特許出願公開WO07/014,275に記載される。更なる制限酵素はまた、分離可能な結合及び切断ドメインを含み、それらは本開示によって企図されている。例えば、Roberts等、(2003)Nucleic Acids Res. 31:418 ~ 420頁を参照できる。

#### 【 0 0 7 9 】

ある実施形態において、切断ドメインは、例えば全ての開示が参照によりその全てが本明細書に組み込まれる、米国特許第7,914,796号、米国特許第8,034,598号、及び米国特許第8,623,618号、並びに米国特許出願公開第20110201055号に記載されるような、ホモダイマー化を最小化又は阻止する1つ以上の操作された切断ハーフ-ドメイン(ダイマー化ドメイン変異とも呼ばれる)を含む。Fok Iの446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537、及び538の位置のアミノ酸残基は、全てFok I切断ハーフ-ドメインのダイマー化に影響を与える標的である。

#### 【 0 0 8 0 】

本明細書において記載される操作された切断ハーフ-ドメインは、米国特許第7,914,796号、米国特許第8,034,598号、及び米国特許第8,623,618号、並びに米国特許出願公開第20110201055号に記載されるような任意の好適な方法を用いて、例えば野生型切断ハーフ-ドメイン(Fok I)の部位特異的変異誘発によって調製することができる。

#### 【 0 0 8 1 】

代替的に、ヌクレアーゼは、いわゆる「分割酵素」技術(例えば、米国特許出願公開第20090068164号を参照できる)を用いて核酸標的部位においてインビボで組み立てられ得る。そのような分割酵素の構成要素は、別個の発現コンストラクト上で発現することができるか、又は個別の構成要素が例えば自己切断2Aペプチド又はIRES配列によって分離されている1つのオープンリーディングフレーム中で連結することができるかのいずれかである。構成要素は、個別のジンクフィンガー結合ドメイン又はメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであり得る。

#### 【 0 0 8 2 】

ヌクレアーゼは、使用前に、例えばWO2009/042163及び20090068164において記載されるような、酵母に基づいた染色体システムにおいて活性についてスクリーニングすることができる。ヌクレアーゼ発現コンストラクトは、当該技術分野において公知の方法を用いて容易に設計できる。例えば、米国特許出願公開第20030232410号、米国特許出願公開第20050208489号、米国特許出願公開第20050026157号、米国特許出願公開第20050064474号、米国特許出願公開第20060188987号、米国特許出願公開第20060063231号、及び、国際特許出願公開WO07/014,275を参照できる。ヌクレアーゼの発現は、構成的プロモーター又は誘導可能なプロモーター、例えばラフィノース及び/又はガラクトースの存在下で活性化(脱抑制化)され、グルコースの存在下で抑制化されるガラクトキナーゼプロモーターの制御下であり得る。

#### 【 0 0 8 3 】

送達

本明細書において記載されるようなDNA結合ドメインを含むタンパク質の送達方法は、例えば、米国特許第6,453,242号、米国特許第6,503,717号、米国特許第6,534,261号、米国特許第6,599,692号、米国特許第6,607,882号、米国特許第6,689,558号、米国特許第6,824,978号、米国特許第6,933,113号、米国特許第6,979,539号、米国特許第7,013,219号、及び米国特許第7,163,824号に記載され、その全ての開示は、参照によりそれらの全てが本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 0 8 4 】

本明細書において記載されるようなDNA結合ドメイン及びこれらのDNA結合ドメインを

10

20

30

40

50

含む融合タンパク質は、1つ以上のDNA結合タンパク質をコードする配列を含むベクターを用いて送達できる。更に、追加の核酸(例えば、ドナー及び/又は非古典的HLAタンパク質をコードする配列)もまたこれらのベクターを介して送達できる。プラスミドベクター、線状化コンストラクト、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、及びアデノ随伴ウイルスベクター等を含むが、これらに限定されない任意のベクター系を使用することができる。米国特許第6,534,261号、米国特許第6,607,882号、米国特許第6,824,978号、米国特許第6,933,113号、米国特許第6,979,539号、米国特許第7,013,219号及び米国特許第7,163,824号をも参照でき、参照によりこれらの全てが本明細書に組み込まれる。更に、これらのベクターの任意のものが、1つ以上のDNA結合タンパク質コード配列及び/又は適切な追加の核酸を含み得ることは明らかであろう。したがって、本明細書において記載されるような1つ以上のDNA結合タンパク質が細胞に導入され、追加のDNAが適切であるとき、それらは同一のベクター又は別個のベクター上で運搬され得る。複数のコンストラクトが使用されるとき、各々のベクターは、1つ又は複数のDNA結合タンパク質をコードする配列、及び所望なら追加の核酸を含み得る。

#### 【0085】

従来のウイルス及び非ウイルスに基づいた遺伝子導入方法を使用して、操作されたDNA結合タンパク質をコードする核酸を細胞(例えば哺乳動物細胞)及び標的組織に導入することができ、所望なら追加の核酸配列を共導入することができる。そのような方法はまた、インビトロで細胞に(例えばDNA結合タンパク質、ドナー、及び/又は非古典的HLAタンパク質をコードする)核酸を投与するのに使用できる。ある実施形態において、核酸は、インビオ又はエクスピオでの遺伝子療法の使用のために投与される。

#### 【0086】

非ウイルスベクター送達系は、DNAプラスミド、ネイキッド(naked)核酸、リポソーム若しくはポリマーのような送達ビヒクル複合体化された核酸、又はリボ核タンパク質を含む。

#### 【0087】

ウイルスベクター送達系は、DNA及びRNAウイルスを含み、それらは、細胞への送達後にエピソームであるか、又はゲノムに組み込まれる。遺伝子療法の手順の総説については、Anderson、Science 256:808～813頁(1992)、Nabel及びFeigner、TIBTECH 11:211～217頁(1993)、Mitani及びCaskey、TIBTECH 11:162～166頁(1993)、Dillon、TIBTECH 11:167～175頁(1993)、Miller、Nature 357:455～460頁(1992)、Van Brunt、Biotechnology 6(10):1149～1154頁(1988)、Vigne、Restorative Neurology and Neuroscience 8:35～36頁(1995)、Kremer及びPerricaudet、British Medical Bulletin 51(I):31～44頁(1995)、Haddada等、in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohm(編集)(1995)、及びYu等、Gene Therapy 1:13～26頁(1994)を参照できる。

#### 【0088】

非ウイルス送達の方法は、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、リポフェクション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン又は脂質:核酸複合体、ネイキッドDNA、mRNA、リボ核タンパク質、人工ビロロン、及びDNAの剤増強取り込みを含む。例えばSonitron 2000システム(Rich-Mar社)を用いるソノポレーション(sonoporation)もまた送達に使用することができる。好ましい実施形態において、1つ以上の核酸がmRNAとして送達される。翻訳効率及び/又はmRNAの安定性を増加させるためのキャップ化mRNAの使用もまた好ましい。ARCA(抗リバースキャップ類似体(anti-reverse cap analog))キャップ又はそれらのバリアントが特に好ましい。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,074,596号及び米国特許第8,153,773号を参照できる。

#### 【0089】

より好ましくは、DNA結合ドメインを含むタンパク質は、リボ核タンパク質(RNP)とし

10

20

30

40

50

て送達される。RNPは、ヌクレアーゼとgRNAのようなDNA結合ドメインとを含む。好ましくは、RNPはCas9-gRNAである。

【0090】

追加の例示的な核酸送達系は、Lonza社(Cologne, Germany)、Amaxa Biosystems社(Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc.社(Rockville, Md.)、BTX Molecular Delivery Systems社(Holliston, Mass.)及びCopernicus Therapeutics Inc社によって提供されるものを含む(例えば米国特許第6,008,336号を参照できる)。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、米国特許第4,946,787号、及び米国特許第4,897,355号に記載され、リポフェクション試薬は市販される(例えば、Transfectam(商標)、Lipofectin(商標)、及びLipofectamine(商標)RNAiMAX)。有効なポリヌクレオチドの受容体認識リポフェクションに好適なカチオン性及び中性の脂質は、Feignerのもの、WO91/17424、WO91/16024を含む。送達は、細胞(エクスピボ投与)に対してなされるか、又は組織(インビボ投与)を標的化することができる。

【0091】

免疫脂質複合体のような標的化リポソームを含む脂質:核酸複合体の調製は、当業者に周知である(例えば、Crystal, Science 270:404 ~ 410頁(1995)、Blaese等、Cancer Gene Ther 2:291 ~ 297頁(1995)、Behr等、Bioconjugate Chem 5:382 ~ 389頁(1994)、Remy等、Bioconjugate Chem 5:647 ~ 654頁(1994)、Gao等、Gene Therapy 2:710 ~ 722頁(1995)、Ahmad等、Cancer Res. 52:4817 ~ 4820頁(1992)、米国特許第4,186,183号、米国特許第4,217,344号、米国特許第4,235,871号、米国特許第4,261,975号、米国特許第4,485,054号、米国特許第4,501,728号、米国特許第4,774,085号、米国特許第4,837,028号、及び米国特許第4,946,787号を参照できる)。

【0092】

操作されたDNA結合タンパク質をコードする核酸及び/又は所望なら他のドナーの送達のためのRNA又はDNAウイルスに基づく系の使用は、ウイルスを特異的な細胞へと標的化すること及びウイルスのペイロードを核酸へと輸送することの高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは、患者へと直接的に投与することができる(インビボ)か、又はそれらはインビトロにおいて細胞を直接処理することに使用でき、改変された細胞を患者へと投与することができる(エクスピボ)。核酸の送達のための従来のウイルスに基づく系は、遺伝子導入のための、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアベクター、及びヘルペス単純ウイルスベクターを含むが、これらに限定されない。宿主ゲノムへの組込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、及びアデノ随伴ウイルスの遺伝子導入法において可能であり、しばしば挿入された導入遺伝子の長期間の発現をもたらす。更に、高い形質導入効率は、多くの異なる細胞型及び標的組織において観察されている。

【0093】

レトロウイルスの志向性は、外来性のエンベロープタンパク質を組み込むことによって改変でき、感染可能性のある標的細胞の標的集団を拡張する。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入又は感染することができ、通常、高いウイルス力価を生じるレトロウイルスベクターである。レトロウイルス遺伝子導入系の選択は標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、6 ~ 10kbまでの外来配列をパッケージングする能力を有するシス作用性の長い末端反復LTRからなる。最小限のシス作用性LTRは、ベクターの複製及びパッケージングに十分であり、次いで、これらは、治療用遺伝子を標的細胞に組み込んで、永続的な導入遺伝子発現を提供するのに使用できる。広く使用されるレトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、シミアン免疫不全ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、及びそれらの組合せに基づくものを含む(例えば、Buchscher等、J. Virol. 66:2731 ~ 2739頁(1992)、Johann等、J. Virol. 66:1635 ~ 1640頁(1992)、Sommerfelt等、Virol. 176:58 ~ 59頁(1990)、Wilson等、J. Virol. 63:2374 ~ 2378頁(1989)、Miller等、J. Virol. 65:2220 ~ 2224頁(1991)、PCT/US94/05700を参照できる)。

10

20

30

40

50

## 【0094】

一過性の発現が好ましい用途において、アデノウイルスに基づく系が使用できる。アデノウイルスに基づくベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターによって、高い力価及び高いレベルの発現が得られている。このベクターは、比較的単純なシステムにおいて大量に産生することができる。アデノ隨伴ウイルス(「AAV」)ベクターもまた、例えば、核酸及びペプチドのインビトロ産生において、並びにインビボ及びエクスピボ遺伝子療法手順のために細胞に標的核酸を形質導入するのに使用される(例えば、West等、*Virology* 160:38 ~ 47頁(1987)、米国特許第4,797,368号、WO93/24641、Kotin、*Human Gene Therapy* 5:793 ~ 801頁(1994)、Muzychka、*J. Clin. Invest.* 94:1351(1994)を参照できる)。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5,173,414号、Tratschin等、*Mol. Cell. Biol.* 5:3251 ~ 3260頁(1985)、Tratschin等、*Mol. Cell. Biol.* 4:2072 ~ 2081頁(1984)、Hermonat及びMuzychka、*PNAS* 81:6466 ~ 6470頁(1984)、並びにSamulski等、*J. Virol.* 63:3822 ~ 3828頁(1989)を含む、多くの刊行物に記載されている。

10

## 【0095】

臨床治験において、遺伝子導入のために少なくとも6つのウイルスベクターによるアプローチが現在利用可能であり、それらは、ヘルパー細胞株に挿入して形質導入因子を生成する遺伝子による欠損ベクターの補完を含むアプローチを利用する。

## 【0096】

pLASN及びMFG-Sは、臨床治験において使用されてきているレトロウイルスベクターの例である(Dunbar等、*Blood* 85:3048 ~ 305頁(1995)、Kohn等、*Nat. Med.* 1:1017 ~ 102頁(1995)、Malech等、*PNAS* 94:22 12133 ~ 12138頁(1997))。PA317/pLASNは、遺伝子療法の治験において使用された最初の治療用ベクターであった(Blaese等、*Science* 270:475 ~ 480頁(1995))。50%以上の形質導入効率は、MFG-Sパッケージングされたベクターにおいて観察されている。(Ellem等、*Immunol Immunother.* 44(1):10 ~ 20頁(1997)、Dranoff等、*Hum. Gene Ther.* 1:111 ~ 2頁(1997))

20

## 【0097】

組換えアデノ隨伴ウイルスベクター(rAAV)は、欠損及び非病原性のパルボウイルスアデノ隨伴2型ウイルスに基づく、有望な代替的な遺伝子送達系である。全てのベクターは、導入遺伝子発現カセットに隣接する末端逆位配列によって、AAV 145のみを保持するプラスミドから誘導される。効率的な遺伝子導入、及び形質導入された細胞のゲノムへの組込みによる安定的な導入遺伝子の送達は、このベクター系の重要な特徴である。(Wagner等、*Lancet* 351:9117 1702 ~ 3頁(1998)、Keams等、*Gene Ther.* 9:748 ~ 55頁(1996))。AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV8.2、AAV9及びAAVrh10並びにAAV2/8、AAV2/5、及びAAV2/6のような偽型AAVを含む、他のAAVの血清型もまた本発明と共に使用することができる。

30

## 【0098】

複製欠損組換えアデノウイルスベクター(Ad)は、高い力価で作製することができ、多くの異なる細胞型に容易に感染することができる。多くのアデノウイルスベクターは、導入遺伝子が、Ad E1a、E1b、及び/又はE3遺伝子を置き換えるように操作され、その後、複製欠損ベクターが、トランスで欠損遺伝子機能を補充するヒト293細胞において増殖する。Adベクターは、インビボにおいて、肝臓、腎臓、及び筋肉において見出されるもののような、非分裂の分化細胞を含む、複数の型の組織形質導入することができる。従来のAdベクターは、大きな担持能を有する。臨床治験におけるAdベクターの使用例は、筋肉内注射による抗腫瘍免疫化のためのポリヌクレオチド療法を含んだ(Sterman等、*Hum. Gene Ther.* 7:1083 ~ 9頁(1998))。臨床治験における遺伝子導入のためのアデノウイルスベクターの使用の更なる例は、Rosenecker等、*Infection* 24:1 5 ~ 10頁(1996)、Sterman等、*Hum. Gene Ther.* 9:7 1083 ~ 1089頁(1998)、Welsh等、*Hum. Gene Ther.* 2:2 05 ~ 18頁(1995)、Alvarez等、*Hum. Gene Ther.* 5:597 ~ 613頁(1997)、Topf等、*Gene Ther.* 5:507 ~ 513頁(1998)、Sterman等、*Hum. Gene Ther.* 7:1083 ~ 1089頁

40

50

(1998)を含む。

【0099】

パッケージング細胞は、宿主細胞に感染することができるウイルス粒子を形成するのに使用される。そのような細胞は、アデノウイルスをパッケージングする293細胞、レトロウイルスをパッケージングするpsi.2細胞又はPA317細胞を含む。遺伝子療法において使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージングする産生細胞株によって生成される。ベクターは典型的には、パッケージング及び後に続く宿主への組込み(適用可能の場合)に必要な最小限のウイルス配列を含み、他のウイルス配列は、発現すべきタンパク質をコードする発現カセットによって置き換えられている。失われたウイルス機能は、パッケージング細胞株によってトランスで供給される。例えば、遺伝子療法において使用されるAAVベクターは、パッケージング及び宿主ゲノムへの組込みに必要とされるAAVゲノムに由来する末端逆位配列(LTR)配列のみを持つ。ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子、すなわちrep及びcapをコードするが、LTR配列を欠くヘルパープラスミドを含む細胞株にパッケージングされる。細胞株はヘルパーとしてのアデノウイルスにもまた感染する。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製及びヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、LTR配列を欠くことにより、多くの量がパッケージングされることはない。アデノウイルスによる混入は、例えば、アデノウイルスがAAVよりも感受性であるところの加熱処理によって低減できる。

10

【0100】

B細胞の遺伝子編集

20

本発明は、B細胞の遺伝子編集の方法を提供する。

【0101】

いくつかの態様において、B細胞は、細胞がその内在性(すなわち天然で再構成された)B細胞受容体(BCR)を発現しないように編集される。

【0102】

いくつかの態様において、B細胞は、B細胞の内在性B細胞受容体(BCR)を、規定された治療用モノクローナル抗体の配列で置き換えるために編集される。BCRの軽鎖及び重鎖の可変領域は編集されるであろう。例えば、IGHV、IGHD、IGHJ、IGHC、IGKV、IGKJ、IGKC、IGLV、IGLJ、IGLC、又はそれらの任意の組合せが編集される。いくつかの好ましい実施形態において、B細胞受容体は、IGHV、IGKVにおいて、及びIGHV/J領域にわたって編集される。いくつかの実施形態において、複数のB細胞受容体領域が、改変のために共標的化される。例えば、IgHV及びIgHJ、若しくはIgHV及びIgKV、又はそれらの任意の組合せが共標的化される。いくつかの実施形態において、複数のB細胞受容体座位における改変又は編集が可能である。いくつかの実施形態において、B細胞受容体は、V/J断片にわたるゲノム挿入のために標的化できる。

30

【0103】

他の態様において、B細胞は、目的の遺伝子を発現するか、又は発現しないかのいずれかとなるように編集される。更なる態様において、B細胞は、転写的に抑制であるか、又は目的の遺伝子を活性化するように改変される。

【0104】

例えば、B細胞は、B細胞の機能を改変するように、編集又は改変される。改変された機能とは、抗原提示細胞としてのB細胞の機能を改善若しくは妨げること(すなわち、ワクチン若しくは寛容のために)、B細胞の炎症性表現型を改変すること(すなわち、炎症誘発性若しくは抗炎症性)、B細胞の分化経路を限定すること、又はB細胞の局在化を限定することを含むが、これらに限定されないものを意味する。更に、B細胞の膜貫通ドメインは、非形質B細胞から形質様抗体分泌細胞へと転換するために破壊できる。

40

【0105】

B細胞の機能は、天然のB細胞受容体のレパートリーを改変して、又はそれを改変せずに、改変することができる。特異性よりも機能を改変することは、自己免疫疾患を有する対象において寛容を生じる方法において有用である。

50

## 【0106】

B細胞は、最初に、対象の試料からB細胞を単離することによって編集される。試料は、例えば、血液、骨髄、又は組織試料である。例えば、B細胞は、末梢血単核球(PBMC)、骨髄、又は脾臓から単離される。

## 【0107】

B細胞は、当該技術分野において公知の任意の方法によって単離される。例えば、B細胞は、フローサイトメトリー、磁気細胞単離及び細胞分離(MACS)、RosetteSep、又は抗体パンニングによって単離される。十分な純度、生存率、及び収率で単離されたB細胞集団をもたらすために、1つ以上の単離技術を利用できる。

## 【0108】

好ましくは、B細胞はMACSによって単離される。より好ましくは、B細胞はRosetteSepによって単離される。

## 【0109】

単離されたB細胞の純度は、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%以上である。単離されたB細胞は、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%以上の生存率である。

## 【0110】

任意選択で、単離後に、遺伝子編集のために十分な数の細胞を得るために培養中でB細胞を増殖させる。いくつかの実施形態において、B細胞は、RPMI+10%のFBS、1%のP/S、1%のHEPES、1%のL-グルタミン中で培養される。B細胞は、約0.5及び $10 \times 10^6$ 細胞/mLの密度で、又はそれらの間の密度で培養される。好ましくは、B細胞は、約2及び $4 \times 10^6$ 細胞/mLで、又はそれらの間で培養される。

20

## 【0111】

いくつかの実施形態において、B細胞は、サイトカインを含む細胞培地中で培養される。サイトカインは、例えば、IL-1様、IL-1<sup>+</sup>、IL-1<sup>-</sup>、IL-1RA、IL-18、共通鎖(CD132)、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、共通鎖(CD131)、IL-3、IL-5、GM-CSF、IL-6様、IL-6、IL-11、G-CSF、IL-12、LIF、OSM、IL-10様、IL-10、IL-20、IL-21、IL-14、IL-16、IL-17、IFN-<sup>+</sup>、IFN-<sup>-</sup>、IFN-<sup>-</sup>、CD154、LT-<sup>+</sup>、TNF-<sup>+</sup>、TNF-<sup>-</sup>、4-1BBL、APRIL、CD70、CD153、CD178、GITRL、LIGHT、OX40L、TALL-1、TRAIL、TWEAK、TRANCE、TGF-1、TGF-2、TGF-3、Epo、Tpo、Flt-3L、SCF、M-CSF、CD40、又はそれらの任意の組合せである。Toll様受容体アゴニストもまた使用できる。好ましくは、サイトカインはIL-4、IL-2、CD40L、又はそれらの任意の組合せである。

30

## 【0112】

B細胞は、トランスフェクション前及び/又は後に活性化できる。予期しないことに、初代ヒトB細胞における相同組換え(すなわち、遺伝子が挿入される場合)が、トランスフェクション前の活性化を必要とすることが発見された。更に、トランスフェクション後の再活性化もまた、相同組換えを改善し得る。驚くべきことに、細胞がトランスフェクション前に活性化されていなかった場合、トランスフェクションの直後の(及び5日間連続してでさえ)活性化は、相同組換えを得ることはなかった。活性化は、非相同末端結合(NHEJ)(すなわち、遺伝子が欠失する場合)には、絶対的な要件ではなかった。

40

## 【0113】

好ましくは、B細胞は、トランスフェクション前に活性化される。より好ましくは、B細胞は、トランスフェクション前と後に活性化される。

## 【0114】

B細胞は、約1~10日間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10日間、サイトカインを含む細胞培地で培養することによって活性化できる。好ましくは、B細胞は、約3~5日間、サイトカインを含む細胞培地で培養される。

## 【0115】

サイトカインは、例えば、IL-1様、IL-1<sup>+</sup>、IL-1<sup>-</sup>、IL-1RA、IL-18、共通鎖(CD1

50

32)、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-15、共通 鎮(CD131)、IL-3、IL-5、GM-CSF、IL-6様、IL-6、IL-11、G-CSF、IL-12、LIF、OSM、IL-10様、IL-10、IL-20、IL-21、IL-14、IL-16、IL-17、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、CD154、LT- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、4-1BBL、APRIL、CD70、CD153、CD178、GITRL、LIGHT、OX40L、TALL-1、TRAIL、TWEAK、TRANCE、TGF- $\alpha$ 1、TGF- $\alpha$ 2、TGF- $\beta$ 3、Epo、Tpo、Flt-3L、SCF、M-CSF、CD40、又はそれらの任意の組合せである。Toll様受容体アゴニストもまた使用できる。好ましくは、サイトカインはIL-4、IL-2、CD40L、又はそれらの任意の組合せである。

#### 【0116】

好ましくは、B細胞は、トランスフェクション前に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10日間以上、活性化される。最も好ましくは、B細胞は、少なくとも3日間以上、活性化される。例えば、B細胞は、トランスフェクション前に3、4、5日間以上、活性化される。好ましくは、B細胞は、トランスフェクション後、約1、2、3、4、5日間以上、再活性化される。最も好ましくは、B細胞は、トランスフェクション前にIL-4によって活性化される。更に、B細胞は、トランスフェクション後に、IL-4によって更に処理され得る。好ましくは、B細胞は、B細胞増殖キットによって活性化される。

10

#### 【0117】

サイトカインは約1ng/ml及び20ng/mlの濃度で、又はそれらの間の濃度である。B細胞活性化のためのサイトカインの濃度は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20ng/mlである。好ましい実施形態において、サイトカインの濃度は約5ng/mlである。

20

#### 【0118】

いくつかの実施形態において、B細胞は、トランスフェクション前に、CD40L $^+$ 細胞(例えば3T3細胞)で共培養される。B細胞は、トランスフェクション前に、少なくとも12、24、36、48、又は72時間共培養される。

#### 【0119】

非活性化初代B細胞のための好ましい培養条件は、15mlバイオリアクターチューブ(トランスフェクション前)及びFACSチューブ(トランスフェクション後)内で、ペニシリン、ストレプトマイシン、L-グルタミン、及びHEPES並びに5ng/mlのIL-4( $\beta$ -MEを含まない)を補充したRPMIで $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/mlで培養することを含む。

30

#### 【0120】

活性化初代B細胞の好ましい培養は、静置したT25フラスコ(標準的なインキュベーター内)又は100mlのErlenmeyer(凝集を阻止し、それによって細胞を荒々しく再懸濁する必要を避ける振とうインキュベーター)内で、5 $\mu$ lの各々のExpander/ml(CellXVivoヒトB細胞増殖キット、R&D Systems社)を補充した培地で培養することを含む。

#### 【0121】

B細胞は、外来性DNA、DNA結合タンパク質のようなヌクレアーゼ酵素、及びヌクレアーゼ酵素をB細胞内の特異的なDNA配列へと局在化させるガイドRNA(gRNA)の使用によって編集される。ヌクレアーゼ及びgRNAは、上述されるような当該技術分野において公知の方法によってB細胞へと送達(すなわち、トランスフェクション)される。好ましくは、B細胞はヌクレオフェクションによってトランスフェクトされる。最も好ましくは、B細胞は、Cas9のようなエンドヌクレアーゼタンパク質、又はCas9がgRNAと予め複合化されているリボ核タンパク質複合体をトランスフェクトされる。

40

#### 【0122】

B細胞の生存率及びトランスフェクションの効率は、トランスフェクトされる細胞の数に依存して増加する。例えば、最適な生存率及び効率のために、少なくとも $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ 個の細胞がトランスフェクトされる。好ましくは、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個のB細胞がトランスフェクトされる。最も好ましくは、少なくとも約 $1 \times 10^6$ から $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個までのB細胞がトランスフェクトされる。

#### 【0123】

50

B細胞は、ヌクレオフェクション装置の使用によるヌクレオフェクションによってトランسفェクトされる。任意のヌクレオフェクション装置を使用でき、例えば、MaxCyte、Neon(登録商標)、又はAmaxa(登録商標)、好ましくはAmaxa(登録商標)Nucleofectorが使用される。任意のAmaxa(登録商標)Nucleofectorプログラムが使用される。好ましくは、プログラムV-015、U-015、又はV-015が使用される。最も好ましくは、プログラムV-015が使用される。

【0124】

好ましいヌクレオフェクション条件は、プログラムV-015でAmaxa Nucleofector装置を用いる、human B cell nucleofector kit(Lonza社)でのCas9 RNP(室温で20分間予め複合体化された10 μgのCas9+20 μgのgRNA)のトランسفェクションを含み、キュベットに培地を添加した後、培養チューブに移動する前にインキュベーター内のキュベット中に細胞を少なくとも30分間放置する。

【0125】

B細胞は、ヌクレアーゼ並びにDNA、mRNA、及び/又はタンパク質としてのガイドRNA、すなわちリボ核タンパク質をトランسفェクトされる。好ましくは、B細胞は、Cas9-g RNAリボ核タンパク質をトランسفェクトされる。

【0126】

驚くべきことに、且つ予期しなかったことに、リボ核タンパク質を用いる遺伝子編集(挿入又は欠失)が、最も効率的であることが発見された。

【0127】

B細胞の生存率及びトランسفェクションの効率は、B細胞をアポトーシス阻害剤を含む培地で培養することによって増加する。

【0128】

驚くべきことに、且つ予期しなかったことに、トランسفェクション中及び/又はトランسفェクション後にアポトーシス阻害剤を培地に添加するとき、遺伝子編集(挿入又は欠失)が、より効率であることが発見された。アポトーシス阻害剤は、初代ヒトB細胞において、相同組換え(すなわち、遺伝子が挿入される場合)の効率を増加させた。更に、アポトーシス阻害剤はまた、トランسفェクトされた初代B細胞の生存率を増加させた。いくつかの態様において、B細胞の生存率が大幅に増加し、アポトーシスは低減した。

【0129】

アポトーシスの阻害剤はカスパーーゼ阻害剤を含む。アポトーシスの他の阻害剤は、例えば、アポトーシスタンパク質阻害因子(IAP)、細胞のアポトーシスタンパク質阻害因子-1(cellular inhibitor of apoptosis protein-1 ; cIAP)、バキュロウイルスIAPの反復構造を含むタンパク質3(cIAP2)、バキュロウイルスIAPの反復構造を含むタンパク質6、及びバキュロウイルスIAPの反復構造を含むタンパク質1(NAIP)を含む。

【0130】

いくつかの実施形態において、カスパーーゼ阻害剤は、カスパーーゼの誘導型及び/又は実行型のカスパーーゼの両方を阻害する。いくつかの実施形態において、カスパーーゼ阻害剤は、カスパーーゼ2、カスパーーゼ8及びカスパーーゼ9、カスパーーゼ3、カスパーーゼ6、及びカスパーーゼ7を阻害する。いくつかの実施形態において、カスパーーゼ阻害剤は、汎カスパーーゼ阻害剤Z-VAD-OPHを含む。いくつかの態様において、アポトーシスの低減はB細胞の生存率を増加させる。

【0131】

アポトーシス阻害剤は、約1 μM及び50 μMの濃度であるか、又はそれらの間の濃度である。アポトーシス阻害剤の濃度は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20 μMである。

【0132】

いくつかの実施形態において、アポトーシス阻害剤によるアポトーシスの低減は、B細胞の生存率を、全ての端点を含めて、少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%以上増

10

20

30

40

50

加させる。いくつかの実施形態において、汎カスパーゼ阻害剤Z-VD-OPHを含むカスパーゼ阻害剤は、B細胞の生存率を、全ての端点を含めて、少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%以上増加させる。生存率の増加は、アポトーシスの阻害剤の非存在下で培養したB細胞の生存率と比較することによって決定される。

【0133】

任意選択で、DNAプラスミドはプロモーターを有する。例示的なプロモーターは、EF-1a(EFS)プロモーター又はCbhプロモーターを含む。好ましくは、プロモーターは、EF-1aプロモーターである。

【0134】

任意選択で、プラスミドは、1つ以上の様々な制御配列を含む。制御配列は、例えば、イニシエーター、プロモーター因子、シグナルペプチド、及びポリアデニル化シグナルである。

【0135】

DNAは、当該技術分野において公知の任意の方法によって調製及び単離される。例えば、DNAは、Maxiprep、Midiprep、又はMiniprepの使用によって調製される。好ましくは、DNAコンストラクトは、non-endofree MaxiprepのようなMaxiprepの使用によって単離される。

【0136】

DNAは、約1μg及び10μgのDNAの濃度であるか、又はそれらの間の濃度でトランスフェクトされる。DNAの濃度は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10μgである。好ましくはDNAの濃度は5μgである。

【0137】

より好ましくは、B細胞は、ヌクレアーゼタンパク質とガイドRNA、例えばシングルガイドRNA(sgRNA)との複合体であるリボ核タンパク質(RNP)をトランスフェクトされる。最も好ましくは、B細胞は、Cas9 RNPをトランスフェクトされる。sgRNAは、任意の遺伝子座位を標的化するよう操作できる。別の態様において、sgRNAは任意の免疫グロブリン遺伝子座位を標的化する。

【0138】

例えば、sgRNAは、IGHV3-23(のすぐ上流)のgRNA:GAAAACACCTGAAAATCCCC(配列番号7)、IGHJ6(のすぐ下流)のgRNA:GTCCTCGGGGCATGTTCCGA(配列番号8)、IGKV3-20(のすぐ上流)のgRNA:TTAGGACCCAGAGGGAACCA(配列番号9)、若しくはIGKJ4(内の)gRNA:CTGTGGCTCACTTCGGCGG(配列番号10)、又はそれらの任意の組合せを含み得る。

【0139】

他の例示的なsgRNA配列は以下を含む。

【0140】

gIGHV:(IGHV3-23)TGAACAGAGAGAACTCACCA(配列番号11)

【0141】

gIGHJ:(IGHJ6)GGTCCTCGGGGCATGTTCCG(配列番号12)

【0142】

gIGKV:(IGKV3-20)GCTGCTCAGTTAGGACCCAG(配列番号13)

【0143】

gIGKJ:(IGKJ5)GGGCATTTAAGATTTGCCAT(配列番号14)

【0144】

いくつかの態様において、B細胞は、Cas9及びsgRNAに加えて相同組換え修復(HDR)テンプレートをトランスフェクトされる。例示的なHDRテンプレートは、例えば図23に示される。

【0145】

任意選択で、対象への投与前に、ゲノム編集されたB細胞の集団は、作製中に使用され

10

20

30

40

50

た成分、例えば、細胞培養成分、DNA、RNA、リボ核タンパク質を含まず、マイコプラスマ、エンドトキシン、及び微生物の混入を実質的に含まない。好ましくは、ゲノム編集されたB細胞の集団は、10、5、3、2、又は1CFU/スワブ未満を有する。最も好ましくは、ゲノム編集されたB細胞の集団は、0CFU/スワブを有する。ゲノム編集されたB細胞の集団のエンドトキシンレベルは、20EU/mL未満、10EU/mL未満、又は5EU/mL未満である。ゲノム編集されたB細胞の集団の生存率は、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%以上である。

【0146】

ゲノム編集されたB細胞は、ゲノム編集プロセスの直後(例えば、抗原発見スクリーニング法において、又は治療法において)、又は短期間の培養期間後に、使用される。

10

【0147】

ゲノム編集されたB細胞は、臨床使用前に照射することができる。照射は、免疫エフェクター細胞の活性を促進するサイトカインの発現を誘導する。

【0148】

適用

開示された組成物及び方法は、B細胞受容体の発現、特異性、及び/又は機能性のモジュレートが望まれる任意の適用に使用することができる。好ましくは、本発明の組成物及び方法は、免疫療法に使用される。

【0149】

B細胞は、自家又は同種異系であり得る。

20

【0150】

具体的に、モノクローナル抗体療法は、例えば、癌、自己免疫疾患、移植拒絶反応、骨粗しょう症、黄斑変性、多発性硬化症、病原体、又は循環器疾患の治療に使用される。

【0151】

いくつかの態様において、本発明は、初代ヒトB細胞における相同組換えを提供する。いくつかの実施形態において、初代ヒトB細胞における相同組換えは、規定されたゲノム座位における特異的な配列の挿入をもたらす。一態様において、配列はモデルエピトープタグをコードする。いくつかの実施形態において、モデルエピトープタグは、C-X-Cケモカイン受容体型を含むモデル座位に挿入され得、且つ/又はそこから発現され得る。いくつかの実施形態において、C-X-Cケモカイン受容体型は、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、及びCXCR7から選択される。いくつかの態様において、モデルエピトープタグは、B細胞受容体(BCR)を含むモデル座位に挿入され得、且つ/又はそこから発現され得る。いくつかの態様において、抗体をコードする配列は、内在性重鎖及び/又は内在性軽鎖のゲノム座位に挿入される。例えば、IGHV、IGHD、IGHJ、IGHC、IGKV、IGKJ、IGKC、IGLV、IGLJ、IGLC、又はそれらの任意の組合せである。いくつかの実施形態において、抗体をコードする配列は、モノクローナル抗体のナノボディ並びに/又はモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖である。

30

【0152】

定義

本明細書において使用する用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、限定することを意図するものではないということも理解されるべきである。本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用されるとき、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかに他を示していない限り、複数の言及対象を含む。したがって、例えば、「細胞(a cell)」への言及は、2つ以上の細胞の組合せ、又は細胞培養全体を含み、「ポリヌクレオチド(a polynucleotide)」への言及は、現実問題として、多数のコピーのそのポリヌクレオチドを含む。特に述べられていないか、又は文脈から明らかでない限り、本明細書において使用されるとき、用語「又は(or)」は、両立的であると理解されるべきである。本明細書及び以下の本明細書の残りの部分において定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明の所属する技術分野における当業者によって一般に理解されるのと同一の意味を有する。

40

50

## 【0153】

特に述べられていないか、又は文脈から明らかでない限り、本明細書において使用されるとき、用語「約」は、当該技術分野において通常の許容範囲内、例えば、平均の2標準偏差内であると理解されるべきである。「約」は、述べられた値の、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、又は0.01%内として理解することができる。文脈から他が明らかでない限り、本明細書において提示される数値は、用語「約」によって修飾される。

## 【0154】

本明細書において使用されるとき、「DNA結合タンパク質部分」は、特定のDNA配列に特異的に結合することができる、DNA結合タンパク質のセグメント、又はポリペプチドである。結合は、特定のDNA配列部位に対して特異的である。DNA結合タンパク質部分は、DNA結合タンパク質の短縮セグメント又はDNA結合タンパク質の断片を含み得る。

10

## 【0155】

本明細書において使用されるとき、用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「オリゴマー」、「オリゴ」、又は同等の用語は、ヌクレオチド塩基モノマーのポリマー配列を含む分子を指し、モノマーの配列はポリヌクレオチドを定義する。ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸(DNA)を作製するデオキシリボヌクレオチドのポリマー及びリボ核酸(RNA)を作製するリボヌクレオチドのポリマーを含み得る。ポリヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖であり得る。一本鎖であるとき、ポリヌクレオチドは、遺伝子のセンス鎖又はアンチセンス鎖に対応し得る。一本鎖ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの相補的部分とハイブリダイズして、ホモ二本鎖又はヘテロ二本鎖であり得る二本鎖を形成できる。

20

## 【0156】

ポリヌクレオチドの長さは、いかなる点においても限定されない。ヌクレオチド間の結合は、ヌクレオチド間型ホスホジエステル結合、又は任意の他の型の結合であり得る。ポリヌクレオチドは、インビボ(細胞内)又はインビトロ(無細胞系内)のいずれかで生物学的手段(例えば、酵素的)によって作製できる。ポリヌクレオチドは、無酵素系を用いて化学合成できる。ポリヌクレオチドは、酵素的に伸長できるか、又は酵素的に伸長できない。

## 【0157】

通例では、ポリマーに組み込まれるヌクレオチドモノマーが、1つのモノヌクレオチドのペントース環の5'ホスフェートが、その近隣の3'酸素(ヒドロキシル)に、ホスホジエステル結合を介して一方向で結合する様式で結合されるので、3'-5'ホスホジエステル結合によって形成されるポリヌクレオチド(天然のポリヌクレオチドを含む)は、5'端及び3'端を有すると言われる。したがって、ポリヌクレオチド分子の5'端は、一般的に、ヌクレオチドのペントース環の5'位の遊離ホスフェート基を有し、一方でポリヌクレオチド分子の3'端は、ペントース環の3'位の遊離ヒドロキシル基を有する。ポリヌクレオチド分子内で、他の位置に対して5'に置かれている位置は、「上流」に位置すると言われ、他の位置に対して3'の位置は、「下流」であると言われる。この用語は、テンプレート鎖に沿って5'から3'への様式で、ポリメラーゼが進み、ポリヌクレオチド鎖を伸長するという事実を反映する。他が示されない限り、ポリヌクレオチド配列が表されるときはいつでも、ヌクレオチドは、左から右へ5'から3'への方向であると理解されるであろう。

30

## 【0158】

本明細書において使用されるとき、用語「ポリヌクレオチド」が天然のポリヌクレオチド構造、天然のヌクレオチド配列、天然の骨格、又は天然のヌクレオチド間結合に限定されることは意図されない。当業者は、本発明における使用を見出す、多種多様なポリヌクレオチド類似体、非天然ヌクレオチド、非天然ホスホジエステル結合、及びヌクレオチド間類似体についてよく知っている。

40

## 【0159】

本明細書において使用されるとき、表現「ヌクレオチド配列」、「ポリヌクレオチドの配列」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド配列」、及び同等又は類似の語句は、ヌクレ

50

オチドポリマー中のヌクレオチドモノマーの順番を指す。通例では、ヌクレオチド配列は、典型的には5'か3'の方向で書かれる。他が示されない限り、本発明の特定のポリヌクレオチド配列は、任意選択で、明示的に示される配列に加えて相補的な配列を包含する。

#### 【0160】

本明細書において使用されるとき、用語「遺伝子」は、一般的に、天然又は組換えの様式で作動可能に連結されるときに、いくらかの産物又は機能を提供する、ポリヌクレオチド要素の組合せを指す。用語「遺伝子」は、広く解釈されるべきであり、遺伝子のmRNA、cDNA、cRNA、及びゲノムDNAの形態を包含し得る。いくらかの使用において、用語「遺伝子」は、5'及び3'の非翻訳領域(5'-UTR及び3'UTR)、エクソン、及びイントロンを含む転写された配列を包含する。いくつかの遺伝子において、転写された領域は、ポリペプチドをコードする「オープンリーディングフレーム」含むであろう。用語のいくらかの使用において、「遺伝子」は、ポリペプチドをコードするのに必要なコード配列(例えば、「オープンリーディングフレーム」又は「コード配列」)のみを含む。いくつかの態様において、遺伝子はポリペプチドをコードせず、例えばリボソームRNA遺伝子(rRNA)、及びトランスクアーアRNA(tRNA)遺伝子である。いくつかの態様において、用語「遺伝子」は、転写された配列のみならず、更に上流及び下流の制御領域、エンハンサー及びプロモーターを含む非転写領域をも更に含む。用語「遺伝子」は、遺伝子のmRNA、cDNA、及びゲノム形態を包含する。

#### 【0161】

いくつかの態様において、遺伝子のゲノム形態又はゲノムクローンは、転写されたmRNAの配列及び転写物の外側にある他の非転写配列を含む。mRNA転写単位の外側にある制御領域は、5'又は3'隣接配列と呼ばれる。遺伝子の機能的ゲノム形態は、転写の制御に必要であり、しばしば十分である制御因子を典型的に含む。用語「プロモーター」は、一般的に、正しい転写開始をもたらすのに十分な、転写開始部位の典型的に5'側であるが、排他的ではないDNA領域を記述するのに使用される。いくつかの態様において、「プロモーター」は、強力な若しくは上昇したレベルの転写に必要であるか、又は誘導性の転写をもたらす、他のシス作用性の制御因子をも含む。いくつかの実施形態において、プロモーターは構成的に活性であり、代替的な実施形態において、プロモーターは、条件的に活性である(例えば、転写が特定の生理的条件下においてのみ開始される)。

#### 【0162】

一般的に、用語「制御因子」は、核酸配列の発現のある側面を制御する任意のシス作用性の遺伝的要素を指す。いくらかの使用において、用語「プロモーター」は、転写を開始するのに最低必要な配列を本質的に含む。いくらかの使用において、用語「プロモーター」は、転写を開始する配列を含み、更に、それぞれ「エンハンサー因子」及び「リプレッサー因子」と一般的に呼ばれる、転写を上方制御又は下方制御できる配列をも含む。

#### 【0163】

プロモーター及びエンハンサーを含む特定のDNA制御因子は、一般的にあるクラスの生物内においてのみ機能する。例えば、細菌ゲノム由来の制御因子は、真核生物内において一般的に機能しない。しかしながら、より近縁な生物由来の制御因子は、交差した機能性をしばしば示す。例えば、ヒトのような特定の哺乳動物生物由来のDNA制御因子は、多くの場合、マウスのような他の哺乳動物種において機能するであろう。更に、多くの種を超えて機能するであろう組換え遺伝子の設計において、例えば、マウス宿主細胞とヒト宿主細胞を含む全ての哺乳動物細胞においてのように、種を超えて機能することが知られている多くの型の制御因子に関するコンセンサス配列が存在する。

#### 【0164】

本明細書において使用されるとき、表現「作動可能な組合せ」、「作動可能な順番」、「作動可能に連結」、「作動可能に結合」、及び同様の語句は、核酸に関連して使用されるとき、互いに機能性の関係で配置される核酸配列の作動可能な連結を指す。例えば、作動可能に連結したプロモーター、エンハンサー因子、オープンリーディングフレーム、5'及び3'UTR、並びに終止配列は、RNA分子の正確な産生をもたらす。いくつかの態様にお

10

20

30

40

50

いて、作動可能に連結した核酸因子は、オープンリーディングフレームの転写、及び最終的にポリペプチドの产生(すなわち、オープンリーディングフレームの発現)をもたらす。

【0165】

本明細書において使用されるとき、用語「ゲノム」は、生物(ウイルスを含む)が所持する全遺伝子情報又は遺伝物質、すなわち生物又はウイルスの全遺伝要素を指す。ゲノムは一般的に、生物の染色体内の遺伝的物質の全てを指し、更に、娘細胞に安定的に伝達される染色体外の遺伝的情報(例えば、ミトコンドリアゲノム)をも指す。ゲノムは、RNA又はDNAを含み得る。ゲノムは線状(哺乳動物)又は環状(細菌)であり得る。ゲノム物質は、典型的には、染色体のような分離した単位に存在する。

【0166】

本明細書において使用されるとき、「ポリペプチド」は、典型的には共有ペプチド結合であるが排他的ではなく結合される、任意の長さのアミノ酸(天然若しくは非天然、又はそれらの組合せ)の任意のポリマーである。ポリペプチドは、任意の源に由来し得、例えば天然ポリペプチド、組換え分子遺伝学技術によって產生されるポリペプチド、細胞由来のポリペプチド、又は無細胞系において酵素的に產生されるポリペプチドである。ポリペプチドはまた、化学(非酵素的)合成法を用いて产生できる。ポリペプチドは、ポリマー中のアミノ酸配列によって特徴づけられる。本明細書において使用されるとき、用語「タンパク質」は、ポリペプチドと同義である。用語「ペプチド」は、典型的には、小さいポリペプチドを指し、典型的にはタンパク質より小さい。他が述べられない限り、ポリペプチドは、任意の特定の生物活性を有するもの又は有さないものに限定されない。

10

【0167】

本明細書において使用されるとき、表現「コドン使用」、又は「コドンバイアス」、又は「好みしいコドン使用」、又はそのようなものは、一態様において、タンパク質をコードするDNA又はRNA(ここで、多くのアミノ酸は1つ以上のコドンによってコードされる能力を有する)において単一のアミノ酸をコードする同義のコドンのうちでの任意の1つのコドンの発生頻度における相違を指す。別の態様において、「コドン使用バイアス」は、2つの種間の、各々の種が示すコドンバイアスにおける相違をも指し得る。異なる生物は、しばしば異なるコドンバイアスを示し、これは、それらの生物のコード配列中で同義のコドンのうちからの好まれるコドンへの選好性である。

20

【0168】

本明細書において使用されるとき、用語「ベクター」、「ビヒクル」、「コンストラクト」、「テンプレート」、及び「プラスミド」は、任意の組換えポリヌクレオチド分子に関連して使用され、それは、增幅でき、核酸セグメントを1つの生物から別の生物へと移すのに使用できる。ベクターは、一般的に、ベクター増幅及び操作を媒介する部分(例えば、1つ以上の複製起点、薬剤又は抗生剤耐性を与える遺伝子、多重クローニング部位、クローニングされた遺伝子の発現を可能にする作動可能に連結されたプロモーター/エンハンサー因子等)を含む。ベクターは、一般的に、しばしばバクテリオファージ又は植物若しくは動物のウイルスに由来する組換え核酸分子である。プラスミド及びコスミドは、2つのそのような組換えベクターを指す。「クローニングベクター」又は「シャトルベクター」又は「サブクローニングベクター」は、サブクローニング工程を促進する作動可能に連結した部分(例えば、複数の制限エンドヌクレアーゼ標的配列を含む多重クローニング部位)を含む。核酸ベクターは、ベクターの型又は用途の型に応じて、線状分子又は環状形態であってよい。いくつかの環状核酸ベクターは、細胞への送達の前に意図的に線状化され得る。ベクターはまた、使用されるプライマーにコードされる追加の配列を末端に含み得る線状コンストラクトを生成するためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のテンプレートとして機能することもできる。そのようなコンストラクトはまた、細胞に送達することができる。

30

【0169】

本明細書において使用されるとき、用語「発現ベクター」は、特定の宿主生物において所望の遺伝子(例えばタンパク質をコードする遺伝子)の発現を促進及び最適化する作動可能に連結されたポリヌクレオチド因子を含む組換えベクターを指す(例えば、細菌発現ベク

40

50

ター又は哺乳動物発現ベクター)。遺伝子発現を促進するポリヌクレオチド配列は、例えば、プロモーター、エンハンサー、転写終止配列、及びリボゾーム結合部位を含み得る。

#### 【0170】

本明細書において使用されるとき、用語「宿主細胞」は、異種性の核酸を含む任意の細胞を指す。異種性の核酸は、シャトルベクター若しくは発現ベクターのようなベクター、又は線状DNAテンプレート、又はインビトロ転写されたRNAであり得る。いくつかの態様において、宿主細胞はベクター上にコードされる遺伝子の発現を駆動することができる。いくつかの態様において、宿主細胞は、ベクターの複製及び増殖を助ける。宿主細胞は、*E. coli*のような細菌細胞、又は哺乳動物細胞(例えば、ヒト細胞若しくはマウス細胞)であつてよい。好適な宿主細胞(好適なマウス細胞のような)は、安定的に組み込まれた細胞株を作製するのに使用されるとき、その細胞株は、完全なトランスジェニック生物を作製するのに使用できる。

10

#### 【0171】

ベクター/コンストラクト又は他の核酸(インビトロ転写されたRNA等)を、細菌細胞及び哺乳動物細胞のような宿主細胞に送達する方法(すなわち、手段)は、当業者に周知であり、本明細書において詳細には提供されない。宿主細胞への核酸送達の任意の方法が本発明との使用を見出す。

#### 【0172】

例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)のような細菌細胞へのベクター又は他の核酸分子の送達方法(形質転換と呼ばれる)は、日常的であり、エレクトロポレーション法、及びCaCl<sub>2</sub>のような二価のカチオンによって予め処理されることによってコンピテントにされている*E. coli*細胞の形質転換を含む。

20

#### 【0173】

培養中の哺乳動物細胞へのベクター又は他の核酸(RNA等)の送達方法(トランスフェクションと呼ばれる)は日常的であり、多くのトランスフェクション法が本発明との使用を見出す。これらは、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、Transfectamine(登録商標)(Life Technologies(商標)社)及びTransFectin(商標)(Bio-Rad Laboratories社)のような脂質に基づく方法(リポソーム又はリポプレックス)、例えばDEAE-デキストランを用いるカチオン性ポリマートランスフェクション、直接核酸注入、遺伝子銃粒子注入、操作されたウイルスキャリアを用いるウイルス形質導入(形質導入と呼ばれ、例えば操作された単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、シンドビスウイルスを用いる)及びソノポレーションを含むが、これらに限定されない。これら的方法の任意のものは本発明との使用を見出す。用語トランスフェクション及びヌクレオフェクションは、本明細書において交換可能に使用される。

30

#### 【0174】

本明細書において使用されるとき、核酸又はポリヌクレオチドに関連した用語「組換え」は、物質(例えば、組換え核酸、遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド等)が、ヒトの介入によって改変されていることを示す。一般的に、組換え分子の一部の構成は天然の構成ではなく、或いは、組換えポリヌクレオチド又はポリペプチドの一次配列は、何らかの方法で操作されている。天然のヌクレオチド配列は、それらが起源とする天然の場所(例えば染色体)から取り出される場合、又はそれらが組換えDNAコンストラクトから転写される場合、組換えポリヌクレオチドとなる。遺伝子のオープンリーディングフレームは、そのヌクレオチド配列が、その天然の環境から取り出されて任意の型の核酸ベクターにクローニングされるか(たとえORFが天然の遺伝子と同一のヌクレオチド配列を有していたとしても)PCRテンプレートになる場合、組換え分子である。組換え分子、特に組換え核酸を作製するためのプロトコール及び試薬は、当業者に周知である。いくつかの実施形態において、用語「組換え細胞株」は、組換え核酸、すなわち宿主細胞にとって天然ではない核酸を含む任意の細胞株を指す。

40

#### 【0175】

本明細書において使用されるとき、ポリヌクレオチド又はポリペプチドに適用されるよ

50

うな用語「異種性」又は「外来性」は、再構成されているか又は生物系に人工的に供給される、天然の構成(例えば、配列、ゲノムの位置、又は一部の配置に関連して)中に存在し得ないか又は特定の生物系にとって天然ではない分子を指す。これらの用語は、天然の源以外の源を起源とする関連した物質を指すか、又は非天然(non-natural)又は非天然(non-native)の構成、遺伝的位置、若しくは一部の配置を有する分子を指す。用語「外来性」及び「異種性」は、しばしば、「組換え」と交換可能に使用される。

#### 【0176】

本明細書において使用されるとき、用語「天然」又は「内在性」は、調査中に天然の生物系、細胞、組織、種、又は染色体に見出される分子を指し、及び、操作される、特定の生物系、細胞、組織、種、又は染色体内に見出される配列を指す。「天然」又は「内在性」の遺伝子は、一般的には、通常は天然(例えば、核染色体、ミトコンドリア染色体、又はクロロプラスト染色体)において関連しているヌクレオチド配列以外のヌクレオチド配列を含まない遺伝子である。内在性遺伝子、転写物、又はポリペプチドは、その天然の座位によってコードされ、細胞に人工的に供給されていない。

10

#### 【0177】

本明細書において使用されるとき、用語「マーカー」は、最も一般的に、細胞に存在するとき(例えば発現するとき)、細胞をそのマーカーを含むものとして可視化又は同定する特質又は表現型をもたらす、生物学的特徴又は形質を指す。様々なマーカーの型が一般的に使用され、例えば、例えばlacZ補充(β-ガラクトシダーゼ)のような発色現象又は例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)若しくはGFP融合タンパク質、RFP、BFPの発現のような蛍光のような目に見えるマーカー、選別可能なマーカー、表現型マーカー(増殖効率、細胞形態、コロニー色若しくはコロニー形態、温度感受性)、栄養要求性マーカー(増殖要件)、抗生剤感受性及び耐性、抗原感受性によって区別可能な生体分子のような分子マーカー(例えば、血液型抗原及び組織適合性マーカー)、細胞表面マーカー(例えば、H2KK)、酵素マーカー、並びに、例えば制限断片長多型(RFLP)、一塩基多型(SNP)、及び他の増幅可能な遺伝的多型のような核酸マーカーであり得る。

20

#### 【0178】

本明細書において使用されるとき、表現「選別可能なマーカー」又は「スクリーニングマーカー」又は「陽性選択マーカー」は、細胞に存在するとき、それらの細胞を、選別可能なマーカーの形質を発現しない他の細胞から選別又は隔離することを可能にする特質又は表現型をもたらすマーカーを指す。様々な遺伝子を選別可能なマーカーとして使用でき、例えば、薬物耐性又は栄養要求性をコードする遺伝子は広く知られている。例えば、カナマイシン(ネオマイシン)耐性は、細菌のカナマイシン耐性(例えば、酵素ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII)をコードする遺伝子を担持するプラスミドを取り込んでいる細菌を選別するための形質として使用できる。トランスフェクトされていない細胞は、培養をネオマイシン又は同様の抗生剤によって処理するとき、最終的に死滅するであろう。

30

#### 【0179】

同様のメカニズムを、ネオマイシン耐性をコードする遺伝子(neo選別可能なマーカーである2つのアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子のいずれか1つ)を担持するベクターを含むトランスフェクトされた哺乳動物細胞を選別するのにも使用できる。選別プロセスは、安定的にトランスフェクトされた哺乳動物細胞株を確立するのに使用できる。ジェネテシン(G418)は、トランスフェクトされた遺伝的物質の安定的に組み込まれたコピーを含む哺乳動物細胞を選別するのに一般的に使用される。

40

#### 【0180】

本明細書において使用されるとき、表現「陰性選別」又は「陰性スクリーニングマーカー」は、存在するとき(例えば、発現される、活性化される、又はそのようなもの)、選別される特性又は形質を含まない細胞の同定を(例えば、特性又は形質を有する細胞と比較して)可能にするようなマーカーを指す。

#### 【0181】

多種多様な陽性及び陰性の選別可能なマーカーが、原核生物及び真核生物における使用

50

に関して公知であり、細菌及び哺乳動物の細胞におけるプラスミド選別のための選別可能なマーカーツールが広く利用可能である。細菌の選別システムは、例えば、アンピシリン耐性(ラクタマーゼ)、クロラムフェニコール耐性、カナマイシン耐性(アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ)、及びテトラサイクリン耐性を含むが、これらに限定されない。哺乳動物選別マーカーシステムは、例えば、ネオマイシン/G418(ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII)、メトトレキサート耐性(ジヒドロ葉酸レダクターゼ、DHFR)、ハイグロマイシン-B耐性(ハイグロマイシン-Bホスホトランスフェラーゼ)、及びブластサイジン耐性(ブластサイジンSデアミナーゼ)を含むが、これらに限定されない。

#### 【0182】

本明細書において使用されるとき、用語「レポーター」は、一般的に、対象とする系の所望の構成要素を可視化、定量化、又は同定するために使用できる部分、化合物、又は他の構成要素を指す。レポーターは、一般的に、しかしながら非排他的に、レポータータンパク質をコードする遺伝子である。例えば、「レポーター遺伝子」は、細胞内で発現するとき、細胞の可視化若しくは同定を可能にするか、又は組換え遺伝子の発現の定量化を可能にする遺伝子である。例えば、レポーター遺伝子は、例えば、その活性を定量化できる酵素、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)又はホタルルシフェラーゼタンパク質のようなタンパク質をコードできる。レポーターはまた、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)、又は増強GFP(EGFP)、青色蛍光タンパク質(BFP及び誘導体)、シアン蛍光タンパク質(CFP及び他の誘導体)、黄色蛍光タンパク質(YFP及び他の誘導体)、赤色蛍光タンパク質(RFP及び他の誘導体)を含む、GFPの組換えバリエントのいずれかのような蛍光タンパク質を含む。

10

#### 【0183】

本明細書において使用されるとき、タンパク質のタグとして使用されるときの用語「タグ」は、一般的に他のタンパク質のオープンリーディングフレームに遺伝子的に融合され、それによって組換え融合タンパク質を作製するペプチド配列を指す。理想的には、融合されたタグは、それが融合されたより大きなタンパク質の天然の生物活性又は機能と干渉しない。タンパク質タグは、例えば、融合タンパク質の精製、検出、又は可視化を促進するためのタグを含むが、これらに限定されないが、様々な目的のために使用される。いくつかのペプチドタグは、標的特異的タンパク質分解(例えばTEVによる)によるよう、化学物質によって、又は酵素的手段によって除去可能である。

20

#### 【0184】

使用に応じて、用語「マーカー」、「レポーター」、及び「タグ」は、定義において重複することができ、同一のタンパク質又はポリペプチドを、異なる用途において、マーカー、レポーター、又はタグとして使用することができる。いくつかのシナリオにおいて、ポリペプチドは、全て同一の組換え遺伝子又はタンパク質中で、レポーター及び/又はタグ及び/又はマーカーとして同時に機能することができる。

30

#### 【0185】

本明細書において使用されるとき、用語「原核生物」は、モネラ界に属する生物(原核生物とも呼ばれる)を指し、一般的に、それらの单細胞の組織、出芽又は分裂による無性生殖、膜結合核又は他の膜結合オルガネラの欠如、環状染色体、オペロンの存在、イントロン、メッセージキャッピング、及びポリAのmRNAの欠如、特徴的なリボソーム構造、並びに他の生化学的特徴によって真核生物と区別できる。原核生物は、原核生物は、真正細菌(「真菌」と古細菌(しばしば「古細菌」と呼ばれる)の亜界を含む。

40

#### 【0186】

本明細書において使用されるとき、用語「細菌」又は「細菌の」は、原核生物の真正細菌を指し、よく定義された多くの形態学的及び生化学的な基準に基づいて古細菌から区別可能である。

#### 【0187】

本明細書において使用されるとき、用語「真核生物」は、真核生物界に属する生物(典型的に多細胞組織)を指し、一般的に、膜結合核及び他の膜結合オルガネラの存在、線状遺伝

50

物質(すなわち線状染色体)、オペロンの非存在、イントロン、メッセージキャッシング、及びポリAのmRNAの存在、特徴的なリボソーム構造、並びに他の生化学的特徴によって原核生物と区別できる。

【0188】

本明細書において使用されるとき、用語「哺乳動物」又は「哺乳動物の」は、毛の所有、3つの中耳骨、メスの乳腺、脳の新皮質、及び多くが生きている若い個体を出生することによって、爬虫類及び鳥類と区別可能な内温性の有羊膜類である真核細胞生物の群を指す。哺乳類の最も大きな群である、有胎盤哺乳類(真獣下綱)は、妊娠中に子孫に給餌する胎盤を有する。有胎盤哺乳類は、(マウス及びラットを含む)げっ歯目、並びに(ヒトを含む)靈長目を含む。

10

【0189】

本発明の文脈における「対象」は、好ましくは哺乳類動物である。哺乳動物はヒト、非ヒト靈長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、又はウシであり得るが、これらの例に限定されない。

【0190】

本明細書において使用されるとき、用語「コードする」は、ポリマー巨大分子中の情報が、第1の分子と異なる第2の分子の產生を指示するのに使用されるような、任意のプロセスを広く指す。第2の分子は、第1の分子の化学的性質と異なる化学構造を有し得る。

20

【0191】

例えば、いくつかの態様において、用語「コードする」は、二本鎖DNA分子の1本の鎖が、DNA依存性DNAポリメラーゼによって新規に合成される相補的姉妹鎖をコードするテンプレートとして使用される半保存的なDNA複製のプロセスを記載する。他の態様において、DNA分子は、RNA分子をコードすることができる(例えば、DNA依存性RNAポリメラーゼ酵素を使用する転写プロセスによって)。同様に、RNA分子は、翻訳のプロセス内におけるように、ポリペプチドをコードすることができる。翻訳のプロセスを記載するのに使用されるとき、用語「コードする」はまた、アミノ酸をコードするトリプレットコドンにまで拡張する。他の態様において、RNA分子は、例えば、RNA依存性DNAポリメラーゼ酵素を組み込む逆転写プロセスによって、DNA分子をコードすることができる。別の態様において、DNA分子は、ポリペプチドをコードすることができ、その場合において使用されるとき、「コードする」は、転写と翻訳の両方のプロセスを組み込むと理解される。

30

【0192】

本明細書において使用されるとき、用語「～に由来する」は、第1の構成要素(例えば第1の分子)、又は第1の構成要素からの情報が、異なる第2の構成要素(例えば、第1の分子と異なる第2の分子)を単離、誘導又は作製するのに使用されるプロセスを指す。例えば、本発明の哺乳動物コドン最適化Cas9ポリヌクレオチドは、野生型Cas9タンパク質のアミノ酸配列に由来する。同様に、Cas9の単一変異のニッカーゼ及びCas9の二重変異のヌル-ヌクレアーゼを含む本発明のバリエントの哺乳動物コドン最適化Cas9ポリヌクレオチドは、野生型哺乳動物コドン最適化Cas9タンパク質をコードするポリヌクレオチドに由来する。

【0193】

本明細書において使用されるとき、表現「バリエント」は、第2の組成物(例えば、第2の分子、「親」分子とも呼ばれる)に関連する第1の組成物(例えば、第1の分子)を指す。バリエント分子は、親分子に由来することがあり、単離することができ、基づくことがあり、又はそれに相同なことがある。例えば、Cas9の単一変異のニッカーゼ及びCas9の二重変異のヌル-ヌクレアーゼを含む哺乳動物コドン最適化Cas9(hspCas9)の変異形態は、哺乳動物コドン最適化野生型Cas9(hspCas9)のバリエントである。用語バリエントは、ポリヌクレオチド又はポリペプチドのいずれかを記載するのに使用できる。

40

【0194】

ポリヌクレオチドに適用されるとき、バリエント分子は、元の親分子と完全なヌクレオチド配列同一性を有し得、又は代替的に、親分子と100%未満のヌクレオチド配列同一性を有し得る。例えば、遺伝子ヌクレオチド配列のバリエントは、元のヌクレオチド配列と

50

比較して、ヌクレオチド配列において、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%以上同一である第2のヌクレオチド配列であり得る。ポリヌクレオチドバリアントはまた、親のポリヌクレオチド全体を含むポリヌクレオチドをも含み、追加の融合ヌクレオチド配列をも更に含む。ポリヌクレオチドバリアントはまた、親のポリヌクレオチドの部分又はサブ配列であるポリヌクレオチドをも含み、例えば、本明細書において開示されるポリヌクレオチドの独自のサブ配列(例えば、標準的な配列比較及びアラインメント技術によって決定される)もまた、本発明によって包含される。

#### 【0195】

別の態様において、ポリヌクレオチドバリアントは、親のヌクレオチド配列に対して小規模、些末又は重要でない変化を含むヌクレオチド配列を含む。例えば、小規模、些末又は重要でない変化は、(i)対応するポリペプチドのアミノ酸配列を変更しない、(ii)ポリヌクレオチドの、タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム外に起こる、(iii)対応するアミノ酸配列に影響を与える欠失若しくは挿入をもたらすが、ポリペプチドの生物活性に少しだけ影響を与えるか、若しくは全く影響を与えない、及び/又は(iv)化学的に類似するアミノ酸とのアミノ酸の置換をもたらす、ヌクレオチド配列に対する変化を含む。ポリヌクレオチドがタンパク質をコードしない場合(例えば、tRNA、又はcrRNA、又はtracrRNA、又はsgRNA)において、そのポリヌクレオチドのバリアントは、ポリヌクレオチドの機能の喪失をもたらさないヌクレオチドの変化を含み得る。別の態様において、機能的に同一のヌクレオチド配列をもたらす開示されたヌクレオチド配列の保存的バリアントは、本発明に包含される。当業者は、開示されたヌクレオチド配列の多くのバリアントが本発明に包含されることを理解するであろう。

#### 【0196】

バリアントポリペプチドもまた開示される。タンパク質に適用されるとき、バリアントポリペプチドは、元の親ポリペプチドと完全なアミノ酸配列同一性を有し得、又は代替的に、親タンパク質と100%未満のアミノ酸配列同一性を有し得る。例えば、アミノ酸配列のバリアントは、元のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列において、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%以上同一である第2のアミノ酸配列であり得る。

#### 【0197】

ポリペプチドバリアントは、親のポリペプチド全体を含むポリペプチドを含み、追加の融合アミノ酸配列を更に含む。ポリペプチドバリアントはまた、親のポリペプチドの部分又はサブ配列であるポリペプチドをも含み、例えば、本明細書において開示されるポリペプチドの独自のサブ配列(例えば、標準的な配列比較及びアラインメント技術によって決定される)もまた、本発明によって包含される。

#### 【0198】

別の態様において、ポリペプチドバリアントは、親のアミノ酸配列に対して小規模、些末又は重要でない変化を含むポリペプチドを含む。例えば、小規模、些末又は重要でない変化は、ポリペプチドの生物活性に少しだけ影響を与えるか、又は全く影響を与える、機能的に同一なポリペプチドをもたらし、非機能性ペプチド配列の付加を含む、アミノ酸変化(置換、欠失、及び挿入を含む)を含む。他の態様において、本発明のバリアントポリペプチドは、親分子の生物活性を変更し、例えば、Cas9ポリペプチドの変異バリアントは、改変されたヌクレアーゼ活性を有するか、又はヌクレアーゼ活性を喪失している。当業者は、開示されたポリペプチドの多くのバリアントが本発明に包含されることを理解するであろう。

#### 【0199】

いくつかの態様において、本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチドのバリアントは、ヌクレオチド又はアミノ酸の位置の小さいパーセンテージ、例えば、典型的には約10%未満、5%未満、4%未満、2%未満、又は1%未満を改変、付加、又は欠失するバリアント分子を含み得る。

#### 【0200】

10

20

30

40

50

本明細書において使用されるとき、ヌクレオチド又はアミノ酸の配列における用語「保存的置換」は、(i)トリプレットコドンコードの冗長性のためにアミノ酸配列に対応する変化を全くもたらさないか、又は(ii)元の親アミノ酸の化学的に類似の構造を有するアミノ酸による置換をもたらすかのいずれかのヌクレオチド配列における変化を指す。機能的に類似するアミノ酸を提示する保存的置換の表は、当該技術分野において周知であり、ここでは、1つのアミノ酸残基が、類似の化学的特性(例えば、芳香族側鎖又は正に荷電した側鎖)を有する別のアミノ酸残基によって置換され、したがって生じるポリペプチド分子の機能的特性を実質的に変化させない。

#### 【0201】

以下は、類似の化学的特性を含む天然アミノ酸の分類はであり、ここで、群内の置換は、「保存的」アミノ酸置換である。これらの天然アミノ酸が異なる機能的特性が考慮されるときには、異なる分類に配置することができるので、以下に示すこの分類は厳格ではない。非極性及び/又は脂肪族側鎖を有するアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、及びプロリンを含む。極性非荷電側鎖を有するアミノ酸は、セリン、スレオニン、システイン、メチオニン、アスパラギン、及びグルタミンを含む。芳香族側鎖を有するアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンを含む。正に荷電した側鎖を有するアミノ酸は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンを含む。負に荷電した側鎖を有するアミノ酸は、アスパラギン酸及びグルタミン酸を含む。

10

#### 【0202】

本明細書において使用されるとき、2つ以上の核酸又はポリペプチドの文脈での用語「同一」又は「%同一」は、同じ(「同一」)であるか、又は、配列比較アルゴリズム(例えば、BLASTアラインメント、若しくは当業者に公知の任意の他のアルゴリズムによって)、若しくは代替的に目視検査を使用して測定されるときに、第2の分子との最大の一致のために比較され、アラインメントされるときの、同一であるアミノ酸残基若しくはヌクレオチドの具体的なパーセンテージ(「%同一」)を有する2つ以上の配列又はサブ配列を指す。

20

#### 【0203】

2つの核酸又はポリペプチドの文脈における語句「実質的に同一」は、配列比較アルゴリズム又は目視検査を使用して最大の一致のために比較され、アラインメントされるときに、少なくとも、約60%、約70%、約80%、約90%、約90～95%、約95%、約98%、約99%以上のヌクレオチド又はアミノ酸残基の同一性を有する、2つ以上の配列又はサブ配列を指す。そのような「実質的に同一」な配列は、典型的には、実際の祖先への言及なく「相同である」とみなされる。好ましくは、ヌクレオチド間の「実質的に同一」は、少なくとも約50ヌクレオチド長、少なくとも約100ヌクレオチド長、少なくとも約200ヌクレオチド長、少なくとも約300ヌクレオチド長、又は少なくとも約500ヌクレオチド長のポリヌクレオチドの領域にわたって存在し、最も好ましくは、ポリヌクレオチドの完全長にわたって存在する。好ましくは、ポリペプチド間の「実質的に同一」は、少なくとも約50アミノ酸残基の長さの領域にわたって、より好ましくは少なくとも約100アミノ酸残基の領域にわたって存在し、最も好ましくは、配列はそれらの完全長にわたって同一である。

30

#### 【0204】

2つのポリペプチドの文脈における語句「配列類似性」は、2つ以上の配列又はサブ配列間の関連性の度合いを指す。そのような配列は、典型的にはいくらかの度合いのアミノ酸配列同一性を有し、更に、アミノ酸非同一性が存在し、機能的に関連するアミノ酸の群内でのいくらかのパーセンテージの置換が存在する。例えば、ポリペプチドにおけるセリンのスレオニンによる置換(ミスアラインメント)は、配列類似性である(しかしながら同一性ではない)。

40

#### 【0205】

本明細書において使用されるとき、用語「相同」は、2つ以上のアミノ酸配列が共通の祖先タンパク質又はアミノ酸配列から、天然又は人工的に由来するとき、それらの2つ以上のアミノ酸配列を指す。同様に、ヌクレオチド配列は、それらが共通の祖先核酸から、天然又は人工的に由来するとき、相同である。タンパク質における相同性は、一般的に、

50

2つ以上のタンパク質間のアミノ酸配列同一性及び配列類似性から推測される。相同性を確立するのに有用である、配列間の同一性及び/又は類似性の正確なパーセンテージは、問題の核酸及びタンパク質によって変動するが、25%もの少ない配列類似性が、相同性を確立するために日常的に使用される。例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は99%以上のようなより高いレベルの配列類似性もまた相同性を確立するのに使用できる。配列類似性のパーセンテージを決定する方法(例えば、デフォルトのパラメーターを利用するBLASTP及びBLASTN)は、一般的に利用可能である。

#### 【0206】

本明細書において使用されるとき、用語「部分」、「サブ配列」、「セグメント」、若しくは「断片」、又は類似の用語は、それが由来する完全な配列よりも小さい、より大きな配列(例えば、ヌクレオチドサブ配列、又はアミノ酸サブ配列)の任意の部分を指す。サブ配列の最小限の長さは、一般的に、最小限の長さが意図した機能の観点から有用であり得るということを除いては限定されない。サブ配列は、親分子の任意の部分に由来し得る。いくつかの態様において、部分又はサブ配列は、より大きな分子の重要な特徴若しくは生物活性を保持するか、又は親分子の特定の機能的なドメイン、例えば、DNA結合ドメイン若しくは転写活性ドメインに対応する。ポリヌクレオチドの部分は、例えば、少なくとも5、10、15、20、25、30、40、50、75、100、150、200、300、又は500以上のヌクレオチド長の任意の長さであり得る。

#### 【0207】

本明細書において使用されるとき、用語「キット」は、プロセス、方法、アッセイ、分析、又は試料の操作を促進する物品の組合せに言及して使用される。キットは、キットの使用方法を説明する書面の取扱説明書(例えば、本発明の方法を説明する取扱説明書)、方法に必要な化学試薬又は酵素、プライマー及びプローブ、並びに任意の他の構成要素を含み得る。

#### 【0208】

「単離した」細胞の集団は、天然に及び/又は作製中に関連する細胞及び物質を「実質的に含まない」。「実質的に含まない」又は「実質的に純粋」とは、少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、更により好ましくは少なくとも90%の集団が、所望の細胞型であることを意味する。

#### 【実施例】

#### 【0209】

(実施例1)

##### 実験的アプローチ

Cas9は、例示の目的のために列挙されるが、他のCRISPRシステム(例えば、Cpf1又は*Staphylococcus aureus*のCas9)を、使用して同一の目的を達成することができる。そのようなシステムは、異なる基質特異性を有し得、そのため、アプローチは同一のままであるが、gRNA配列及びゲノムの標的部位は異なり得る。

#### 【0210】

1)ヒトB細胞の単離(例えば、Miltenyi社、B Cell Isolation Kit II、130-091-151)

#### 【0211】

2)ヌクレオフェクションの実施(Lonza社、Human B Cell Nucleofector Kit)、

a. 細胞数及びmRNA/プラスミド/sgRNA濃度を変動させることによりhAAVS1又はCXCR4切断を最適化する、

i. Cas9-2A-GFP又はCas9+GFP改変mRNA及び有効なhAAVS1標的化gRNA FACSによってGFP陽性細胞をソートして、ヌクレオフェクトされた細胞を濃縮できる

ii. DNAを分析する(MiSeq又はSurveyor/T7E1アッセイ)

iii. フローサイトメトリーによる表面CXCR4の喪失の検査

b. sgRNAをスクリーニングして、重鎖及び軽鎖において対象とする座位を切断するsgRNAを同定する:公的に利用可能なソフトウェアにより予想される配列を試験する

i. 各々のヌクレオフェクション実験(例えば $2 \times 10^6$ 個のB細胞)において、4つの標的

10

20

30

40

50

部位(重鎖及び軽鎖の上流及び下流=4)の各々に対して予測された1つのsgRNAをトランسفェクトする 各々の座位のPCR増幅に続いてT7E1及び/又はMiSeqを実施して、各々の部位に対して予測されたsgRNAのうちで最適な切断因子を検証する

c. 相同組換え(HR)ドナーテンプレート挿入を最適化する

i. Cas9のmRNA/プラスミド/タンパク質、sgRNA、及びドナーテンプレート(相同腕に隣接されるエピトープタグ又は公知の治療用モノクローナル抗体の組換え重鎖及び軽鎖をコードする)の量を変動させる

1. ドナーテンプレートはPAM のNGGをNNG又はNGNで置き換えて(同義変異が最も望ましい)テンプレートの切断を防ぐべきである

2. インサートは、規定されたコードされる免疫グロブリン定常領域に続いて、新規のmRNAへとスプライスされる任意の下流配列の発現を防ぐ終止コドンをコードすべきである

ii. Cas9-2A-GFP若しくはCas9+GFPの変改mRNA、又は組換えCas9(+GFP)タンパク質若しくは組換えCas9/GFP融合タンパク質、及び相同組換え(HR)ドナーテンプレート(線状であり得るか、又はテンプレート末端に適合する突出末端の生成のためにテンプレート末端に共通の制限部位を含めることによって連結して環状偽ベクターとすることができる単一のテンプレート中に重鎖と軽鎖の両方、及びそれらの相同腕を含み得る)、又は従来のドナーベクター(例えば、CFP+両方のHRテンプレート)

1. B細胞が、B細胞受容体(BCR)からの持続性のシグナル伝達なしで生存可能な場合、機能性HRの最適化は、重鎖及び軽鎖の座位に、2つの蛍光レポーター(例えば、EGFP、mCherry)又はエピトープタグを挿入することによって達成できる

2. Lonza社(Nucleofectorの製造者)に従って、4つのsgRNAは、各々の細胞に全て導入し(コトランسفェクションを確かにするために共通のベクター上のGibson組み立てをもなし得る)、4つの関連するsgRNAを含むRNPのカクテルの送達は、大部分の細胞の4つの座位への標的化を同様に可能にすべきである

iii. Cas9/GFP、4つのsgRNA、及び2つのHRインサート(重鎖及び軽鎖、各々がその両端で500bpを超える相同腕によって隣接される)をヒトB細胞にスクリオフェクトする、GFP陽性細胞をソーティングし、ゲノムDNAを単離し、MiSeqに供する

#### 【0212】

3) 挿入部位の境界をまたがるHR PCRを確認して、特異的な挿入の存在を確認する(スクリオフェクション前のB細胞集団由来のゲノムDNAは陰性対照として使用されるであろう)

- 細胞をクローニングして、接合部をまたがるサンガーシーケンシングを実施する
- 単離してクローニングされたB細胞上でRFLPを実施することもできる(異種性のレパートリーのために、RFLPはおそらく陰性対照では機能しない)

#### 【0213】

4) モノクローナル抗体の機能的な置き換えを確認する: 蛍光標識されるか、ビオチン化された組換え標的タンパク質(又は標的抗原を発現する細胞)を用いてフローサイトメトリーを実施する

a. RNPカクテル(4つのsgRNA)、及び2つのHRインサート(重鎖及び軽鎖、各々がその両端で500bpを超える相同腕によって隣接される)をヒトB細胞にスクリオフェクトする

b. 蛍光標識されたベイト(bait)に結合するCD19陽性B細胞を、FACSによって単離する(ベイトへの結合は、所望のゲノム変更、すなわちベイトに対する規定された特異性を有する挿入されたBCRを有するB細胞に限定される)

i. 考慮から除外されるであろう望ましくないオフターゲットゲノム変更を有する細胞を同定するために、いくつかのクローンに対するディープシーケンシングを実施する

ii. 所望のB細胞クローンを、長寿命の形質細胞への分化を促進し、高レベルの免疫グロブリンの分泌を促進するXBP-1をコードするmRNAによってスクリオフェクトできる

iii. (同種異系の適用のために、関連するHLA座位を変異又は除去するためにゲノム編集を実施する。起こり得るNK細胞媒介性細胞傷害性をアンタゴナイズするのに必要であるので、CD48をコードするDNAをセーフハーバー(safe-harbor)座位(例えば、Rosa26)に

10

20

30

40

50

挿入できる。

【0214】

(実施例2)

例示的なsgRNA

IGHV3-23(のすぐ上流の)gRNA:

GAAAACACCTGAAAATCCCA(配列番号7)

【0215】

IGHJ6(のすぐ下流の)gRNA: GTCCTCGGGGCATGTTCCGA(配列番号8)

【0216】

IGKV3-20(のすぐ上流の)gRNA: TTAGGACCCAGAGGGAACCA(配列番号9)

10

【0217】

IGKJ4(内の)gRNA: CTGTGGCTCACTTCGGCGG(配列番号10)

【0218】

(実施例3)

抗TNF インサート配列

例としてアダリムマブを使用する。

【0219】

ワールドワイドウェブ([www\)](http://www/imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7860)

【0220】

重鎖(VDJ-IGHG1)(配列番号15)

20

【0221】

【化1】

atggagttcgccctgagctggctgttcctggggccatccctgaagggcgtcagtgcgaggtgcagctggfgg  
 agagcggccggccgtgtcagccggcagaaggcctgagactgagctgcgcgcgccagcggcgtcaccttcgacgactac  
 gcatgcactgggtgagacaggccccggcaaggccctggagtggtgagcgcacatcgttggaaacagcggccacatcga  
 ctacccgcacagcgtggagggcagattcaccatcgcagagacaacgccaagaacagcgcctgtacctgcagatgaacagcct  
 gagagccgaggacaccgcgtgtactactgcgcacaggtgagctacccgcacccgcagcgcctggactactggggcca  
 gggcacccctggtgaccgtgagcagcgcaccaaggccccagcgtgtcccccctggccccccagcagcaagagcacca  
 gggccggcaccgcgcctggctgcctggtaaggactacttccccgagccgtgaccgtgagctggaaacagcggcc  
 ctgaccagcggcgtgcacaccctccccgcgcgtgcagagcagcggcgtacagcgcgtgagcagcgtggaccgtgc  
 cagcgcctggcaccctggcaccatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaagggtggag  
 cccaaaggatgc

30

【0222】

40

50

【化 2】

gacaagacccacacctggcccccccgagctgcgtggcggcccccagcgtgtccctgtcccc  
cccaagcccaaggacaccctgtatgcacgagaaccccccggagggtacacctgcgtggggacgtgagccacgaggacccc  
gagggtgaagtcaactgttacgtggacggcgtggagggtgcacaacgccaagaccaagcccaaggaggaggcagtacaacag  
cacctacagagtggtgagcgtctgaccgtgcaccaggactggctgaacggcaaggaggatacaagtgcaggtgagcaa  
caaggcccgtcccccacatcgagaagaccatcgcaaggccaaggccagcccaaggagagccccagggtglacacccctgc  
cccccaagcagagacgagctgaccaagaaccagggtgagcctgacccctgcgttgaagggttctaccccagcgcacatcgccgt  
ggagtgggagagcaacggccagcccaagaacaactacaagaccaccccccgtgcgtggacagcgcacggcagcttcttct  
glacagcaagctgaccgtggacaagagcagatggcagcaggcaacgtgtcagctgcagcgtatgcacgaggccctgca  
caaccactacacccagaagagcctgagcccccggcaag gactacaaagacgtatgcacgaggccctgca  
tga

10

【 0 2 2 3 】

輕鎖(VJ-1GKC)(配列番号16)

【 0 2 2 4 】

【化 3】

20

atggacatgagagtgcgcgcgcagctgctgggcctgcgtctgtggcgtgcgcacaccagatgcgcacatc  
cagatgacccagagccccagcagcctgagcgccagcgtggcgacagagtgaccatcacctgcagagccgcaggcat  
cagaaactacctggccttgttaccagcagaagccccgcgaaggcccccaagctgtgtatcacgcgcgcagcacccctgcagag  
cgccgcgtgcgcgcagcagatcagcggcagcggcagcggcaccgacttaccctgaccatcagcagcctgcagcccgaggacgt  
ggccaccctactactgcgcaggatacaacagagccccctacaccctgcgcgcaggcaccatcagggatcaaggtggagatcaag

30

( 0 2 2 5 )

【化 4】

agaaccgtggccgcccccagcggtgtcaatctccccccagcgacgagcagctgaagagcggcaccggccaggcggtgtgcgtcaacaacttctaccccgagagaggccaagggtcgagtggaaagggtggacaacgcctgcagagcggcaa  
cagccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcaccctacagccgtggcaccctgaccctgagcaaggcc  
gactacgagaaggcacaagggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggccgtggcagccccgtgaccaagagctcaacaga  
ggcgagtgctaccctatacgatgttccagattacgcgttga

40

( 0 2 2 6 )

イニシエーター、プロモーター因子、シグナルペプチド、及びポリアデニル化シグナルのような制御配列を必要に応じてインサートに含めることができる。

〔 0 2 2 7 〕

#### (寒施例4)

CXCR4座位におけるB細胞編集

この実施例において提示されるデータは、CXCR4が、Cas9-gRNA RNPの送達に続いて（しかしながらCas9をコードするDNA又はmRNAの送達には続かない）ヒトB細胞において

50

遺伝子改変の対象となり得ることを実証する。例えば、CXCR4座位は、3つの細胞株(Ramos、Raji、及びU266)(図21C及び図21E)並びに初代B細胞(図17、図18、図20)においてゲノム切断の標的であった(T7E1切断アッセイで実証されたように)。

#### 【0228】

データは、CXCR4座位の標的化の効率を、初代B細胞におけるタンパク質切断に続く、タンパク質の顕著な低減/喪失によって実証する(図20A)。

#### 【0229】

更に、ゲノム挿入は、HindIII制限酵素消化アッセイによって実証され、HindIII消化が陽性であった試料は、CXCR4座位にHDRテンプレートの挿入を有したが、一方で、陰性である試料は、HDRテンプレートの挿入を有さなかった。これは、3つのB細胞株、Ramos、Raji、及びU266において実証された(図21D及び図21E)。

10

#### 【0230】

Schumann等(「Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins.」、Proc Natl Acad Sci U S A. 2015年8月18日、112(33):10437~42頁)に記載されるgCXCR4骨格は、「gCXCR4 PNAS」に従い、そのように呼ばれる特定のアッセイにおいて使用される。

#### 【0231】

Cas9 RNP(しばしばHindIII制限部位を含んだドナーHDRテンプレートと共に)をトランスクレクトされている、単離したヒトB細胞におけるCXCR4の標的化の決定に使用されたアッセイは、CXCR4タンパク質のフローサイトメトリー、HindIII制限消化、TIDE分析、及びMiSEQ分析を含んだ。これらのアッセイのワークフローを図19に図式的に示す。これらのアッセイからのデータは、Schumann等によって記載されるgCXCR4骨格と複合体化したCas9 RNPで標的化した後、B細胞上のCXCR4発現が70%まで低減することを示す(図20A)。gCXCR4-1及びgCXCR4-2が、異なるgCXCR4骨格を用いる異なるgCXCR4の調製物であることは留意すべきである。データは、全ての3つのgCXCR4コンストラクトがT7E1アッセイにおいて切断を示すこと、及びSchumann等によって記載されるgCXCR4骨格が最も効率的であることを更に示す(フローサイトメトリーの結果と一致する)(図20)。G/C対照(G7C SNPによるPCR産物)が、T7E1アッセイの陽性対照であることは留意すべきである。図20Bにおけるアステリスクは、未特定のバンドである。これらの標的化実験からのデータは、以下を示す: CXCR4座位におけるCas9 RNPによる切断は安定的に再現可能である、1:5のCas9/gCXCR4の比は、最も効率的である、トランスクレクション後の培地交換(MC)は、切断効率を増加させない、異なるスクレオフェクション(U-015)プロセラムはわずかに切断効率を低下させる、及びより少ないCas9もまた機能する(効率はわずかに減少する)(図20C)。

20

#### 【0232】

Cas9 RNPによるCXCR4座位における切断は、図21A及び図21Bに提示されるゲルに描寫される。これらのアッセイからのデータは、以下を示す: 別のオリゴ(gCXCR4 PNAS2)から合成されたgCXCR4 PNASもまた機能するが、わずかに切断効率を低減すること、100pmolのHDRテンプレートが最も効率をもたらすこと、及びScr7処理は切断効率を増加させるらしいこと。挿入率(MiSeqによって決定される、図26B)が1%未満であり、このアッセイの検出限界より低いので、HDRを介したHindIIIの制限部位の導入を検出するための分解能をゲルが欠いていることは留意すべきである。初代ヒトB細胞における相同組換え(HR)が、特定の座位における特定のgRNA(例えばB細胞受容体IGHV、図27D)について、一桁(約2%)増加し得ることは留意すべきである。

30

#### 【0233】

実施されたアッセイはまた、細胞株における切断効率が、初代B細胞におけるものよりも非常に高いことを明らかにする(図21C)。二重鎖HDRテンプレート(HDR ds)+1 μMのScr7は、一本鎖HDRテンプレート(HDR ss)よりも良好な切断効率をもたらす(図21C)。しかしながら、データはまた、一本鎖HDRテンプレート(HDR ss)+1 μMのScr7は、二本鎖HDRテンプレート(HDR ds)よりも良好なHR効率をもたらす(図21D)。Ramos細胞株にお

40

50

いて、U266細胞株よりも高いHRの効率がまた存在し(図21D)、前者がより高い増殖速度を有するためである。興味深いことに、Scr7を有さない一本鎖HDRテンプレートは、Raji細胞について、最高のHRの効率をもたらす(図21E)。細胞は、相同組換えを達成するために増殖する必要がある。初代B細胞は、従来の培養方法においては、堅固に増殖しなかつたが、これは観察された相同組換えの欠如を説明し得る。

#### 【0234】

48時間後に、とりわけCD23、CD69、及びKi67の発現を評価することによって活性化を確認するアッセイを含む他のアッセイを実施した(図21F)。後続のアッセイはまた、ヒトB細胞増殖キット(CelIXVivo(登録商標)、R&D systems社)の使用を含んだ。これらのデータは、B細胞増殖キットが、5日間の培地のmL当たり5μLの各々のキットの増殖因子のCD23及びCD69の最高レベル、及び最高の増殖速度をもたらしたことを示す(図21G)。続くアッセイについて、B細胞増殖キットが使用された。CXCR4 HDRは、活性化された初代ヒトB細胞において評価された(図21H～図21K)。これらのアッセイについて、細胞は、3日間、BX5で活性化され、トランスフェクトされ、更なる3日間活性化された(図21I)。HRは、HindIII消化によって検出できなかった(上に説明した通り、HRはMiSeqによって確認された)。トランスフェクション前に、ドナー1細胞は3日間活性化され、ドナー2細胞は2日間活性化され、それらの両方はトランスフェクション後に3日間更に活性化された(図21J)。HRは、HindIII消化によって検出できなかった。HR効率を増加させようとして、トランスフェクション前及び後に様々な活性化条件を試すことを含め、他の実験も実施された。これらの実験の条件は以下のようである：

#### 【0235】

1)5日間のキット活性化-トランスフェクション-3日間のキット活性化

#### 【0236】

2)5日間のキット活性化-トランスフェクション-3日間のIL-4(完全なキットの代わり)

#### 【0237】

3)3日間のキット活性化-トランスフェクション-5日間のキット活性化

#### 【0238】

4)3日間のキット活性化-トランスフェクション-5日間のIL-4(完全なキットの代わり)

#### 【0239】

5)3日間のIL-4(完全なキットの代わり)-トランスフェクション-5日間のキット活性化。

#### 【0240】

上述の条件2及び3とHDRテンプレートを用いるこの実験のために2つの異なるドナーが使用され、ドナー1について低下した切断効率がもたらされた(図21K)。HDRは、これらの試験条件のいずれにおいてもHindIII消化によって検出されない。上述の条件4及びHDRテンプレートの使用は、ドナー2について低下した切断効率をもたらす(図21L)。HDRは、この試験条件のいずれにおいてもHindIII消化によって検出されない。これに対する1つの説明は、消化は、HDRのHindIII消化を解明するのに十分な感度を持たないということである。以下に提示するMiSeqデータはこの結論を裏付ける。

#### 【0241】

相同組換えが達成されているかどうかを確認するためにMiSeqを用いた一連の実験が実施された。MiSeq分析は、その全てが参照により本明細書に組み込まれる、Guell等、「Genome Editing Assessment using CRISPR Genome Analyzer (CRISPR-GA)」、Bioinformatics 30(20):2968～2970頁に記載される方法に従って実施された。MiSeqデータは、Raji及びRamos細胞株が、制限酵素(Res)[R4、R5、R13]によって認識される配列及びコードするペプチド[R10、R14]の挿入によって証明されるように、重鎖と軽鎖の座位の両方において、複数の座位が同時に標的化されるときにおいてさえ[R5、R15、R18、B5]、相同組換え(HR)を達成するよう成功裏に処理されたことを実証する。(図27A～図27D)CXCR4座位へのゲノム挿入は、3つの細胞株、Ramos、Raji、及びU266において、並びに単離された初代B細胞において、MiSeqアッセイの使用により決定された。(図26A及び図26B)これらのB細胞株を用いるアッセイからのデータ(図26A)は、自然に増殖する

10

20

30

40

50

細胞株において細胞の活性化は必要ないことを示す。初代ヒトB細胞を用いるアッセイについて(図26B)、B細胞は、トランスフェクション前の5日間、及びトランスフェクション後の5日間活性化された。ある態様において、初代B細胞は、トランスフェクション前に活性化される必要があった(最低限3日間必要とされるように見える)。トランスフェクション前の5日間の活性化、及び後に続くトランスフェクション後の追加の3日間の活性化は、最も良く機能するように見える(2人のドナー間で0.33%平均、これは、3つのトランスフェクトしていない対照における0.01%のバックグラウンドよりもかなり上であった)。これらのデータは、上述のゲル上の観察可能なバンドの欠如は、HRの真の欠如又は非存在よりもむしろ、ゲルに基づくアッセイの限界のある検出の感度によるものであることを更に示す。

#### 【0242】

10

更に、初代B細胞は、複数の座位が同時にタグ化される[B15]ときでさえ、制限酵素(RE)によって認識される配列の挿入[それぞれB15及びB13、図27D～図27E、これら2つの座位への導入のためのHindIII部位を含むHDRテンプレートの配列(1、5)は図23A～図23Bを参照]によって証明されるように、重鎖と軽鎖の座位の両方において、HRを達成した。ペプチドエピトープタグをコードする配列の挿入に続く機能的なタンパク質の翻訳は、フローサイトメトリーのデータによって実証されるように、挿入部位から達成された(図25A～図25B)。

#### 【0243】

20

データは、初代ヒトB細胞内のCXCR座位における切断が、Casタンパク質(RNP)のトランスフェクションの際にのみ成功するが、Cas9をコードするDNA又はmRNAは、T7E1アッセイ(図17)及びTIDE分析(図18A～図18F)において検出できるゲノム切断をもたらさないことを示す。更に、データは、核酸(図5～図14)と比べてタンパク質(図28)において増加した生存率を更に示す。

#### 【0244】

30

Cas9をコードするDNAは、バックグラウンド(陰性対照)を超える編集を与えない(図18A及び図18B)。Cas9をコードするRNAは、バックグラウンド(陰性対照)を超える編集を与えない(図18C及び図18D)。一方で、Cas9タンパク質は編集を与える(図18E及び図18F)。図18A～図18Fに提示されるデータはTIDE分析を実施することによって得られるグラフであることに注意されたい。TIDE分析を実施するために使用された方法は、その内容の全てが参照により本明細書に組み込まれる、Brinkman等、2014「Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition」、Nucleic Acids Research, 42(22)に提示される。

#### 【0245】

40

更に、初代ヒトB細胞における相同組換えに続くモデルエピトープタグの発現は、検出できる。B細胞は、Cas9/gRNAリボ核タンパク質(RNP)及び1×又は3×FLAGペプチド(DYKDDDDK)をコードする相同組換え修復(HDR)テンプレートによってエレクトロポレーションされた。RNPは、CXCR4座位を標的化するgRNAと共に組換えCas9タンパク質をインキュベートすることによって調製された。陰性対照として、いくつかの細胞は、トランスフェクトせずに残され、他はHDRテンプレートなしでトランスフェクトされた。ゲノム編集の効率はむしろ中程度ではあるが、これらのデータは、フローサイトメトリー分析によって証明されるように、挿入されたエピトープタグが、内在性プロモーターにより自然に発現できることを示す。B細胞の生存率は、各々の処理群について提示される(図30A～図30B)。

#### 【0246】

(実施例5)

B細胞受容体座位におけるB細胞編集

この実施例において提示されるデータは、B細胞の座位のゲノム切断/標的化を実証する(図22B～図22E)。データは、T7E1切断アッセイの使用により、ゲノム切断が、試験された2つのB細胞株、Raji及びRamos(図24A～図24F)並びに単離された初代B細胞(図22B～図22E)のB細胞受容体座位において起こることを示す。切断座位の増幅のために選択され

50

たプライマーは図22Aに示される。

【0247】

図24A及び図24Gに提示されるデータはまた、B細胞の複数の受容体座位におけるゲノム挿入が、Raji内で、IGHVで(IGHVの共標的化を含む)、及び、IGHV/J領域にわたるかたちで(HindIII制限酵素消化アッセイによってアッセイされるように)達成されたことを実証し、これは、抗体の可変断片全体を置き換える能力を実証する(図24A及び図24G)。RamosのB細胞株内で、データは、IGHV/J領域にわたる標的化を含め、IGHVを標的化できることを示す(図24C)。データは、また選択されたIGHV/IGHJ又はIGKV/IGKJのgRNAの組合せがヒトB細胞受容体(BCR)座位を標的化することを実証する(すなわち、1-3/2-2(IGHV/IGHJ)標的化は図22D、図24C、図24E、及び図24Gに示され、3-1/4-6(IGKV/IGKJ)標的化は、図22E及び図24Eに示される)。2つのRNPの同時のトランスフェクション(異なる座位を標的化)は、以前に観察された切断効率を損なわず、いくつかの場合においてそれを向上することさえできた(図24C)。

【0248】

4つの特異的な切断座位を増幅するプライマー対が決定された(図22A)。ヒトBCR座位を標的化するgRNAもまた決定された(図22B～図22C)。

【0249】

リボ核タンパク質(RNP)のトランスフェクション後の初代ヒトB細胞の生存率もまた評価された(図29)。これらの実験からのデータは、B細胞の生存率は、トランスフェクション手順において使用されるB細胞の密度が $2 \times 10^6$ と $5 \times 10^6$ の間であるとき、感知できるほど変化しないことを示す。更に、RNPトランスフェクションは、 $2 \times 10^6$ 細胞で実施でき、一方でDNAトランスフェクションは、同様の生存率を維持するために $1 \times 10^7$ 細胞が必要である。生存率は、通常、トランスフェクション後わずか2日間で大幅に生存率が低下するDNAトランスフェクションと比較して、トランスフェクション後2日～5日で低下しない。これらの観察は、相同組換えが起こるようにするために、トランスフェクション後の時間が必要であり、少なくとも3日間が好ましいように思われる所以、注目に値する。

【0250】

BCR編集のための選択されたgRNA配列は以下を含む:

【0251】

gIGHV:(IGHV3-23)GAAAACACCTGAAAATCCCA(配列番号7)

【0252】

gIGHJ:(IGHJ6)GTCCTCGGGGCATGTTCCGA(配列番号8)

【0253】

gIGKV:(IGKV3-20):TTAGGACCCAGAGGGAACCA(配列番号9)

【0254】

gIGKJ:(IGKJ4)CTGTGGCTCACTTTCGGCGG(配列番号10)

【0255】

ヒトB細胞のBCR座位への制限部位及びエピトープタグの導入は、以下を含んだ(図23Cに列挙されるように)。

【0256】

標的化:

- 1)HindIIIのIGHVへの導入:gRNA1-3、HDRテンプレート1
- 2)FLAGタグのIGHVへの導入:gRNA1-3、HDRテンプレート2
- 3)HindIIIのIGHV/Jへの導入:gRNA1-3及び2-2、HDRテンプレート3
- 4)FLAGタグのIGHV/Jへの導入:gRNA1-3及び2-2、HDRテンプレート4
- 5)HindIIIのIGKVへの導入:gRNA3-1、HDRテンプレート5
- 6)HAタグのIGKVへの導入:gRNA3-1、HDRテンプレート6
- 7)HindIIIのIGKV/Jへの導入:gRNA3-1及び4-6、HDRテンプレート7
- 8)HAタグのIGKV/Jへの導入:gRNA3-1及び4-6、HDRテンプレート8
- 9)HindIIIのIGHV及びIGKVへの:1)+5)

10

20

30

40

50

- 10) FLAGのIGHV及びHAのIGKVへの:2)+6)
- 11) HindIIIのIGHV/J及びIGKV/Jへの:3)+7)
- 12) FLAGのIGHV/J及びHAのIGKV/Jへの:4)+8)

#### 【 0 2 5 7 】

データは、B細胞受容体がV/Jにわたるゲノム挿入について標的化されることを更に実証し、これは、抗体可変断片全体を置き換える能力についての概念実証を助ける。これは、HindIII挿入部位の挿入によってRaji細胞株において、及び正しいサイズのPCRアンプリコン(すなわち、実施されたPCR反応において使用される伸長時間によって増幅できない距離をもってプライマー結合部位間を隔てる大きな天然の介在配列を置き換える挿入の非存在下では、アンプリコンが観察されない)によって初代B細胞において実証される(図24A～図24F)。図24は、HindIII部位のIGHV及びIGKVへの挿入(図24A及び図24G)、並びにIGHV/Jへの挿入(図24C、図24E、及び図24G)、並びにIGKV/Jへの挿入(図24G)を示す。サンガーシーケンシングは、アンプリコンがV/J領域に及ぶことを確かめた。データは、トランسفエクション前の5日間の活性化及びトランسفエクション後の5日間の活性化における初代ヒトB細胞において、V/Jにわたる挿入を確認する。

#### 【 0 2 5 8 】

データは、またゲノム挿入が達成されたことを、初代ヒトB細胞における単一細胞解像度におけるフローサイトメトリーでの重鎖と軽鎖の両方の座位からの独立したタンパク質の発現(すなわち、IgHにおけるFLAGペプチド、及びIgKにおけるHAペプチド)によって実証した(図25A及び図25B)。

#### 【 0 2 5 9 】

データは、複数の座位(例えば、IgHV+IgHJ、IgHV+IgKV)が、いずれの座位における効率の損失なしで同時に標的化できることを確認する。[H=重鎖、K=軽鎖]

#### 【 0 2 6 0 】

MiSeqデータは、B細胞株、Ramos(図27A)、Raji(図27B及び図27C)及び初代B細胞(図27D)でのBCR座位における相同組換え(HR)を確認する。これらのアッセイは、自然に増殖する細胞株は活性化を必要としないことを実証する。HRテンプレート1(すなわちHRテンプレートIGH1)は、成功裏にIGHV座位に挿入された(図27A)。HRテンプレート5(すなわちHRテンプレートIGK1)及び1(すなわちHRテンプレートIGH1)は、成功裏にIGKV及びIGHV座位にそれぞれ挿入された(図27B)。ペプチドをコードする、HRテンプレート2(すなわちHRテンプレートIGH2)及び6(すなわちHRテンプレートIGK2)は、成功裏にIGHV及びIGKV座位にそれぞれ挿入された(図27C)。それぞれ制限部位を含み、ペプチドをコードする、HRテンプレート1(すなわちHRテンプレートIGH1)及び6(すなわちHRテンプレートIGK2)は、複数の座位が標的化されたときでさえ、成功裏に挿入された[R15、R18](図27C)。制限部位を含む、HRテンプレート5(すなわちHRテンプレートIGK1)及び1(すなわちHRテンプレートIGH1)は、成功裏にIGKV及びIGHV座位にそれぞれ挿入された(図27D)。これは、複数の座位が標的化されたときでさえ当てはまる[B15](図27D)。

#### 【 0 2 6 1 】

(実施例6)

#### トランسفエクションの最適化

B細胞及びPBMCのトランسفエクションの最適な条件を確立するために様々な条件がアッセイされた(図3～図16)。アッセイされた変数は、トランسفエクション効率に対する細胞密度の影響(図3～図5)、トランسفエクションの型(すなわち、使用されるヌクレオフェクションプログラムの最適化)(図6、図7、図12、及び図13)、トランسفエクトされるDNAコンストラクトは切断されたか、又は無傷であったか(図7C)、細胞が、トランسفエクション前又は後にIL4又はIL4/IL21/CD40Lの存在下で培養されるかどうか(図8～図10、図14)、トランسفエクションに使用されるDNAコンストラクトの濃度(図9A、図15A、図15B)、並びに使用された細胞単離の種類(すなわちMAC又はRosetteSep単離)(図11)を含んだ。異なるプロモーターを有する様々なCas9ベクターの、細胞の生存率及びGFPを発現する細胞の能力に対する影響を確かめるために他のアッセイが使用された(図9A)。こ

10

20

30

40

50

これらのデータは、ベクター番号63592(EFSプロモーター)が番号48138(Cbhプロモーター)よりも高いGFP発現をもたらすことを実証する。これらのデータは、プラスミドのトランسفエクションよりもmRNAのトランسفエクションで細胞の生存率が高いこと、及びトランسفエクション後1日と2日との間でのGFP発現に大きな差異がないことを更に実証する。

#### 【0262】

##### 細胞生存率

データは、PMBCにおける生存率及びeGFPトランسفエクションの効率が、細胞数を増加させる(すなわち、細胞数を $1 \times 10^6$ 個から $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個にまで)ことによって増強できることを示す(図5A)。DNAコンストラクトのトランسفエクションにおける細胞濃度の影響に関する他の観察は、PBMCにおけるGFP-Cas9トランسفエクションの効率ではなく、生存率が細胞数の増加によって増強できること(図5A)、Cas9トランسفエクション後に生存率が最低であり、経時的にわずかに減少すること(図5B)、及びGFP発現が48時間後に低下すること(図5B)を示す。

10

#### 【0263】

プラスミドDNAによるトランسفエクションの効率をmRNAによるものと比べて比較するアッセイは、プラスミドDNAがmRNAによるものよりも高いGFP発現効率をもたらすことを示す(図6)。

#### 【0264】

##### ヌクレオフェクション

試験された様々なヌクレオフェクションプログラムのうち、ヌクレオフェクションプログラムV-015が、最も高い細胞生存率と、最も低いトランسفエクション対照(DNAの添加なし)におけるバックグラウンドをもたらし、eGFP及びCas9に対する最も高いトランسفエクション効率をもたらす(図7A～図7D)。これらのアッセイからの他の観察は、通常のDNAプレップが、エンドフリー(「EF」)プレップよりも良好に機能(すなわちCas9とEFを比較する)し、線状化DNAがプラスミドDNAよりも良好に機能し(すなわち、切断されたCas9とCas9を比較する)、GFPのmRNAは量が多いと良好に機能するが、なおも低い効率を有する(すなわちmGFP10 μg、20 μg)こと、MaxCyte装置によるトランسفエクションが機能しない、並びに生存率が異なる条件によって大きく影響を受けないこと(すなわち、mRNAトランسفエクション及びエンドフリープレップについてわずかに高い)を示す(図7A～図7D)。細胞株のトランسفエクションを用いるアッセイは、U266/eGFPについての高いトランسفエクション効率が存在すること、U266において初代B細胞よりもCas9トランسفエクションが良好に機能すること、トランسفエクションされたU266細胞について高い生存率が存在すること、Ramos細胞株においてGFPのmRNA(mGFOP)を除いて不十分な効率が存在すること、トランسفエクション後のRamos細胞株において不十分な生存率が存在することを示す(図7D)。

20

30

#### 【0265】

##### サイトカインの存在でのB細胞の培養

初代B細胞トランسفエクションの様々な最適化が実施された(図8～図10)。これらの最適化実験からのデータは、トランسفエクション後のIL-4/IL-21/CD40Lによる細胞の培養は、eGFP及びCas9トランسفエクション効率を増加させることを示す(図8B)。異なるプロモーターを有する様々なCas9ベクターもまたアッセイされた。これらの結果は、ベクター番号63592(EFSプロモーター)が番号48138(Cbhプロモーター)よりも良好に機能し、自己合成GFP及びCas9のmRNA+/-5meCは、Trilink社より購入したGFPのmRNAと比べて機能せず、mRNAトランسفエクションで生存率がより高いこと、及びトランسفエクション後1日目と2日目の発現の間に検知できるような差異が存在しないことを示す(図9A～図9B)。アッセイ中で使用されるDNAの量における変化は、5 μgが2 μgよりも良好に機能するが、生存率が大きく低下することを示した(図9B)。

40

#### 【0266】

トランسفエクション1週間前のB細胞活性化は、IL-4がIL-4/IL-21/抗CD40アゴニス

50

ト(「aCD40」)よりも高いトランスフェクション効率をもたらし、細胞の生存率が低下すること、及び1週間の活性化は長すぎること(すなわち、細胞は過剰刺激され、死に始める)を示す(図10)。

【0267】

CD40L発現線維芽細胞との共培養による単離したB細胞の活性化の影響も評価された(図14A及び図14B)。これらのアッセイに対して、トランスフェクション前の24、48、又は72時間、B細胞は照射された3T3細胞と共に、共培養された。これらのアッセイからのデータは、CD40L陽性3T3細胞はGFPトランスフェクション効率に対して抑制的であること、Cas9発現の効率増加が存在すること、及び3T3細胞との共培養の後のトランスフェクションについて生存率が増加することを示す。これらと同一のアッセイは、全PBMCについて繰り返された(図14B)。これらの実験からのデータは、CD40L陽性細胞の存在は、GFP又はCas9のいずれについてもトランスフェクション効率を増加させないこと、及び3T3細胞との共培養の後で細胞の生存率が増加することを示す。

10

【0268】

細胞単離

細胞が単離された方法に依存するトランスフェクションに対する影響もまた評価された(図11A及び図11B)。2つの単離方法が評価された:MACS及びRosetteSep。これらのアッセイから得られたデータは、RosetteSepによって単離されたB細胞においてより高いトランスフェクション効率が存在することを示す。MACS単離細胞について、サイト間処理は導入遺伝子発現を低下させ、一方で、RosetteSep単離細胞において、サイトカインは、一方のドナー(ドナーA)からの細胞のトランスフェクションに正の影響を有するが、別のドナー(ドナーB)からの細胞には効果を有さなかった(図11A及び図11B)。

20

【0269】

核酸のヌクレオフェクションに対する複数の変数の効果

実施された他のアッセイは、B細胞の活性化、使用されるB細胞の量、及びトランスフェクトされるDNAコンストラクトの濃度の影響を決定した(図15A～図15C)。これらのアッセイについて、異なる量のB細胞が3T3細胞上に播種され、24時間及び48時間共培養され、様々な濃度のDNAコンストラクトによるトランスフェクションが後に続く。これらのアッセイからのデータはより多い細胞数、より長い細胞活性化、及びより高いDNA濃度の各々が、GFPとCas9の両方のトランスフェクションに対して正の影響を有したが、トランスフェクション効率は低かったことを示す。細胞生存率は、B細胞が3T3細胞と予め培養されていたときにヌクレオフェクション後にわずかながらも減少した。実施された他のアッセイは、より高いB細胞数が、5 μgのCas9プラスミドと組み合わされたとき、最も良く機能したことを示した(図15B)。

30

【0270】

まとめると、これらの実験からのデータは以下に要約される。

【0271】

ヌクレオフェクション後の回復工程が生存率に重要である。

【0272】

細胞数:  $1 \times 10^6$  個から  $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  個まで増加した。

40

【0273】

DNAプレップ: 通常のMaxiprepはエンドフリーMaxiprepより良好に機能する。

【0274】

DNA量: 2 μgから5 μgに増加させる。

【0275】

mRNA対プラスミドDNA: プラスミドDNAはmRNAよりも良好に機能する。

【0276】

環状化対線状化プラスミドDNA: 線状化DNAは環状化DNAよりも高いトランスフェクション効率をもたらすように見える。

【0277】

50

線状化プラスミドHDRテンプレートは、環状プラスミドHDRテンプレートよりも効率的に挿入される。B細胞は、Cas9/gRNA RNP及び、定常領域と共にナノボディ、又はアダリムマブ(抗TNF )の重鎖若しくは軽鎖をコードするプラスミドHDRテンプレートをエレクトロポレーションされた。RNPは、IGHV及びIGKV座位を標的化するgRNAと共に組換えCas9タンパク質をインキュベートすることによって調製された。陰性対照として、いくつかの細胞は、トランスフェクトせずに残され、他はHDRテンプレートなしでトランスフェクトされた。生殖系列に特異的なフォワードプライマーとインサートに特異的なリバースプライマーを用いて、PCRが、単離したゲノムDNAに対して実施され、予測されたサイズのアンプリコンは、ゲル電気泳動によって検出された。B細胞の生存率は、各々の処理群について提示される。(図33A～図33B)

10

## 【0278】

異なるプロモーター:EF-1aプロモーターが最も良く機能する。

## 【0279】

スクレオフェクションプログラム:V-015が最も良く機能する。

## 【0280】

エレクトロポレーション装置:Amaxaは、Cas9\_2A\_GFPをコードする核酸のエレクトロポレーションに続いてGFP発現をもたらす唯一のものである。

## 【0281】

活性化:トランスフェクション前及び後の5ng/mlのIL-4は最良の結果をもたらす。

## 【0282】

20

## (実施例7)

## B細胞単離及び培養

B細胞は、ヒト臍帯血から取得されたPBMCから、Ficoll法によって単離された。

## 【0283】

Magnetic Cell Isolation and Separation(MACS)について、B細胞は、Miltenyi社からの試薬を用いる陰性選別によりパニングした。単離されたB細胞の純度は約95%であり、80%～90%の生存率であった。LSカラムが、LSカラムと比べるとき、より多い量の細胞をもたらした(約2倍多い)。

## 【0284】

RosetteSep単離(抗体カクテル-幹細胞によるB細胞パニングに基づく)は、MACSの使用を介するよりも約4倍多い細胞をもたらし、約90%の純度で約95%の生存率であった。

30

## 【0285】

単離されたB細胞は、RPMI+10%のFBS、1%のP/S、1%のHEPES、1%のL-グルタミン中で $2 \sim 4 \times 10^6$ 細胞/mlの密度で培養された。ある条件において、また補充成分が添加された。IL-4なしで生存率がより高いこと、及びIL-4の存在下で細胞はより高い生存率で更により長く培養できたことが注目された。

## 【0286】

## (実施例8)

## 抗体挿入、mRNA発現、抗体産生、及び抗体特異性の評価

$2 \times 10^6$ 個の初代ヒトB細胞が、試験ごとに使用された。細胞は、新しい鎖骨血からRosetteSep B cells Enrichment Cocktail(StemCell Technologies社)によって単離され、エレクトロポレーション前に、組換えIL-4(BioLegend社)によって1日間活性化されたか、又はCellXVivo Human B Cell Expansion Kit(R&D Systems社)によって3～4日間活性化された。記載されるようにエレクトロポレーション(15μgのCas9、20μgのgRNA、及び100pmolの一本鎖HDRテンプレート又は3μgの二本鎖HDRテンプレート)を実施した後に、細胞を活性化成分並びに1μMのScr-7及び10μMのZ-VD-OPH(キノリン-Val-Asp-ジフルオロフェノキシメチルケトン、「OPH」)と共に5又は6日間培養した。活性化成分及びOPHは、製造者の仕様書に従って溶解し、細胞を培養のためにフローサイトメトリーチューブに移す直前に培地中に添加した。更なる5又は6日間の培養の後、細胞の生存率をZombie NIR(BioLegend社)染色を用いるフローサイトメトリーによって確認した。

40

50

## 【0287】

初代ヒトB細胞の重鎖座位へのナノボディをコードする配列の挿入、又は初代ヒトB細胞の重鎖及び軽鎖の座位へのモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする配列の挿入が抗体の產生を導く。B細胞は、Cas9/gRNA RNP、及び、定常領域と共に、オゾラリズマブ、又はアダリムマブ(抗TNF )の重鎖若しくは軽鎖をコードするプラスミドHDRテンプレートをエレクトロポレーションされた。RNPは、IGHV及びIGKV座位を標的化するgRNAと共に組換えCas9タンパク質をインキュベートすることによって調製された。重鎖(HC)及び軽鎖(LC)コンストラクトは、それぞれFLAG及びHAタグを含み、フローサイトメトリーについて確立された試薬による追跡を可能にした。ナノボディコンストラクトはまた、FLAGタグを含んだ。生存率及び純度を示す。UTはトランスフェクトしていないものである(陰性対照)。初代ヒトB細胞の重鎖及び軽鎖の座位へのモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする配列の挿入は、所望の特異性を有する抗体の分泌を導く。B細胞は、Cas9/gRNA RNP、及び、定常領域と共にアダリムマブ(抗TNF )の重鎖又は軽鎖をコードするプラスミドHDRテンプレートをエレクトロポレーションされた。RNPは、IGHV及びIGKV座位を標的化するgRNAと共に組換えCas9タンパク質をインキュベートすることによって調製された。ELISAは、B細胞培養からの上清と共にインキュベートする前にプレートを組換えTNF でコーティングして実施された。次いで、ユーロピウムで標識されたヒトIgGに対する二次抗体をプレートに添加して、蛍光プレートリーダーを用いて分析した。UTはトランスフェクトしていないものである(陰性対照)。3つの独立したドナー由来の試料が示される。

10

## 【0288】

初代ヒトB細胞の重鎖及び軽鎖の座位へのモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする配列の挿入は、mRNAの発現を導く。B細胞は、Cas9/gRNA RNP、及び、定常領域と共にアダリムマブ(抗TNF )の重鎖又は軽鎖をコードするプラスミドHDRテンプレートをエレクトロポレーションされた。RNPは、IGHV及びIGKV座位を標的化するgRNAと共に組換えCas9タンパク質をインキュベートすることによって調製された。mRNAを採取し、逆転写をインサートに特異的なリバースプライマーを用いて実施した。RT-PCRを、このcDNAについて実施し、2つの異なるプライマー対を用いて、予想されるサイズのアンプリコンをゲル電気泳動によって検出した。両方の場合において、1つのプライマーは生殖系列に特異的であり、他のプライマーはインサートに特異的である。UTはトランスフェクトしていないものである(陰性対照)。(図31～図46)

20

## 【0289】

## (実施例9)

## B細胞編集効率及び生存率に対する汎カスパーゼ阻害剤Q-VD-OPH(OPH)の評価

エレクトロポレーション後にB細胞の生存率を増加させることは、実施例8に提示されるデータ(ナノボディ又は抗体をコードする配列の挿入及びそれらの発現の確認)を生じるのに必要とされた。この実施例は、エレクトロポレーション後にB細胞の生存率を大幅に増加させるための汎カスパーゼ阻害剤Q-VD-OPH(「OPH」)の同定及びそれらの最適な濃度の定義を記載し、それは実施例8に記載される実験の前に実施された。これらの実験のために、 $2 \times 10^6$ 個の初代ヒトB細胞が、試験ごとに使用された。細胞は、新しい鎖骨血からRosetteSep B cells Enrichment Cocktail(StemCell Technologies社)によって単離され、エレクトロポレーション前に、組換えIL-4(BioLegend社)によって1日間活性化されたか、又はCellXVivo Human B Cell Expansion Kit(R&D Systems社)によって3～4日間活性化された。記載されるようにエレクトロポレーション(15 μgのCas9、20 μgのgRNA、及び100pmolの一本鎖HDRテンプレート又は3 μgの二本鎖HDRテンプレート)を実施した後に、細胞をそれぞれの活性化成分及び異なるOPH濃度で培養した。活性化成分及びOPHは、製造者の仕様書に従って溶解し、細胞を培養のためにフローサイトメトリーチューブに移す直前に培地中に添加した。更なる5又は6日間の培養の後、細胞の生存率をZombie NIR(BioLegend社)染色を用いるフローサイトメトリーによって確認した(図47～図52)。

30

40

50

## 【0290】

IL-4活性化細胞に対して様々な濃度のOPH濃度を試験する第1の実験において、UT、Cas9+gRNA、Cas9+gRNA OPH 2 μM(DMSO=0.05%)、Cas9+gRNA OPH 4 μM(DMSO=0.1%)、及びCas9+gRNA OPH 10 μM(DMSO=0.1%)を試験した。細胞は、試験当たり、 $2 \times 10^6$ 細胞の密度で播種された。10 μgのCas9がトランスクレプトされた。B細胞は(-1)日に単離され、細胞のエレクトロポレーションは(0)日に実施され、フローサイトメトリー評価は(5)日に実施された。細胞の生存率は、OPHの濃度の増加に続いて大幅に増加した。図47Bに示されるように、細胞の生存率は、10 μMのOPHによる処理に続いて約100%増加した。

## 【0291】

10

IL-4活性化B細胞に対してOPH濃度を試験する第2の実験において、以下の条件が評価された:UT、Cas9+gRNA+GFP断片 1 μg、Cas9+gRNA+GFP断片 1 μg OPH 2 μM(DMSO=0.02%)、Cas9+gRNA+GFP断片 1 μg OPH 4 μM(DMSO=0.04%)、Cas9+gRNA+GFP断片 1 μg OPH 10 μM(DMSO=0.1%)、Cas9+gRNA+GFP断片 1 μg OPH 20 μM(DMSO=0.2%)。細胞は、試験当たり、 $2 \times 10^6$ 細胞の密度で播種された。10 μgのCas9がトランスクレプトされた。B細胞は(-1)日に単離され、細胞のエレクトロポレーションは(0)日に実施され、フローサイトメトリー評価は(5)日に実施された。細胞の生存率は、OPHの濃度の増加に続いて大幅に増加した。図48Cに示されるように、細胞の生存率は、10 μMのOPHによる処理に続いて約100%増加した(OPHを含まないものに対して)。

## 【0292】

20

キット(IL-4+CD40L)活性化B細胞に対してOPHの濃度を試験する第1の実験において、以下の条件が評価された:

## 【0293】

UT、Cas9+gRNA、Cas9+gRNA OPH 2 μM(DMSO=0.05%)、Cas9+gRNA OPH 4 μM(DMSO=0.1%)、Cas9+gRNA OPH 10 μM(DMSO=0.1%)。細胞は、試験当たり、 $2 \times 10^6$ 細胞の密度で播種された。10 μgのCas9がトランスクレプトされた。B細胞は(-1)日に単離され、細胞のエレクトロポレーションは(0)日に実施され、フローサイトメトリー評価は(5)日に実施された。図49Cに示されるように、細胞の生存率は、10 μMのOPHによる処理に続いて約100%増加した(OPHを含まないものに対して)。

## 【0294】

30

様々な濃度のOPHを有するキット活性化B細胞のエレクトロポレーションを試験する第2の実験において、以下の条件が評価された:トランスクレプトされない(UT)、Cas9 10 μg+gRNA+1 μg GFP断片、Cas9 10 μg+gRNA+1 μg GFP断片 OPH 2 μM(DMSO=0.02%)、Cas9 10 μg+gRNA+1 μg GFP断片 OPH 4 μM(DMSO=0.04%)、Cas9 10 μg+gRNA+1 μg GFP断片 OPH 10 μM(DMSO=0.1%)、Cas9 10 μg+gRNA+1 μg GFP断片 OPH 20 μM(DMSO=0.2%)。細胞は、試験当たり、 $2 \times 10^6$ 細胞の密度で播種された。B細胞は(-5)日に単離され、(-4)日に活性化された。細胞のエレクトロポレーションは(0)日に実施され、フローサイトメトリーは(5)日に実施された。細胞の生存率は、OPHの濃度の増加に続いて大幅に増加した。図50Cに示されるように、細胞の生存率は、10 μMのOPHによる処理に続いて約200%大幅に増加した(OPHを含まないものに対して)。

## 【0295】

40

様々な濃度のOPHを有するキット活性化B細胞のエレクトロポレーションを試験する第3の実験において、以下の条件が評価された:トランスクレプトされない(UT)、Cas9 15 μg+gRNA-CXCR4 20 μg+HRテンプレート1<sup>FLAG</sup> 100pmol OPH 0 μM、Cas9 15 μg+gRNA-CXCR4 20 μg+HRテンプレート1<sup>FLAG</sup> 100pmol OPH 2 μM、Cas9 15 μg+gRNA-CXCR4 20 μg+HRテンプレート1<sup>FLAG</sup> 100pmol OPH 5 μM、Cas9 15 μg+gRNA-CXCR4 20 μg+HRテンプレート1<sup>FLAG</sup> 100pmol OPH 10 μM、Cas9 15 μg+gRNA-CXCR4 20 μg+HRテンプレート1<sup>FLAG</sup> 100pmol OPH 10 μM+SCR7 1 μM、Cas9 15 μg+gRNA-CXCR4 20 μg+HRテンプレート1<sup>FLAG</sup> 100pmol OPH 20 μM、Cas9 10 μg+gRNA-IGHV 20 μg+ナノボディテンプレート 3 μg OPH 2 μM、Cas9 10

50

$\mu\text{g} + \text{gRNA-IGHV}$  20  $\mu\text{g} + \text{ナノボディテンプレート}$  3  $\mu\text{g}$  OPH 10  $\mu\text{M}$ 。細胞は、試験当たり、 $1.8 \times 10^6$ 細胞の密度で播種された。15  $\mu\text{g}$ のCas9がトランスフェクトされた。DMSO濃度は0.1%であった。細胞のエレクトロポレーションは(0)日に実施され、フローサイトメトリー評価は(4)日に実施された。図51及び図52に示されるように、アポトーシス阻害剤は、エレクトロポレーション後にB細胞の生存率を大幅に増加させる。

#### 【0296】

更に、初代ヒトB細胞の重鎖座位に、ナノボディをコードする配列が挿入され得る。B細胞は、Cas9/gRNAリボ核タンパク質(RNP)及びオゾラリズマブ(抗TNFaナノボディ)をコードするプラスミドHDRテンプレートによってエレクトロポレーションされた。RNPは、IGHV座位を標的化するgRNAと共に組換えCas9タンパク質をインキュベートすることによって調製された。陰性対照として、いくつかの細胞は、トランスフェクトせずに残され、他はHDRテンプレートなしでトランスフェクトされた。生殖系列に特異的なフォワードプライマーとインサートに特異的なリバースプライマーを用いて、PCRが、単離したゲノムDNAに対して実施され、予測されたサイズのアンプリコンは、ゲル電気泳動によって検出された。挿入効率は、テンプレートの量の増加に伴って増加し、OPH処理に続いてB細胞生存率は増加した(図31A～図C)。

10

#### 【0297】

更に、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする配列が、初代ヒトB細胞の重鎖及び軽鎖の座位へと挿入され得る。B細胞は、Cas9/gRNA RNP、及び、定常領域と共にアダリムマブ(抗TNF $\alpha$ )の重鎖又は軽鎖をコードするプラスミドHDRテンプレートをエレクトロポレーションされた。RNPは、IGHV及びIGKV座位を標的化するgRNAと共に組換えCas9タンパク質をインキュベートすることによって調製された。陰性対照として、いくつかの細胞は、トランスフェクトせずに残され、他はHDRテンプレートなしでトランスフェクトされた。生殖系列に特異的なフォワードプライマーとインサートに特異的なリバースプライマーを用いて、PCRが、単離したゲノムDNAに対して実施され、予測されたサイズのアンプリコンは、ゲル電気泳動によって検出された。挿入効率は、Z-VD-OPH(「OPH」)の増加した量に伴って増加し、10  $\mu\text{M}$ のOPH濃度は、2  $\mu\text{M}$ と比べて相同組換えを増加させる(図32A～図C)。

20

#### 【0298】

##### 他の実施形態

30

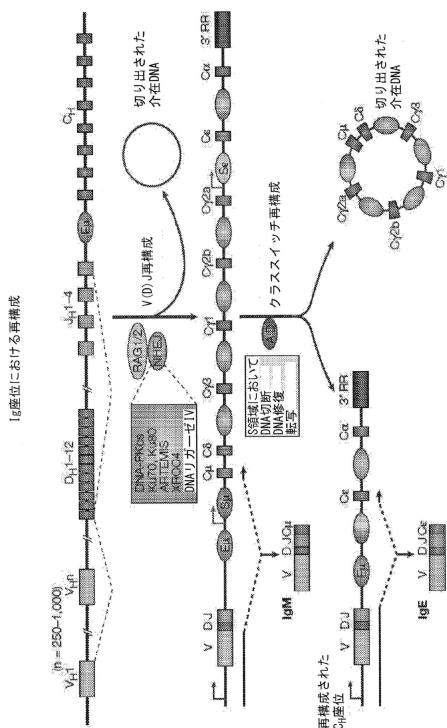
本発明は、それらの詳細な説明と共に記載されてきたが、上述の説明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を例示することを意図し、それを限定することを意図しない。他の態様、利点、及び改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内にある。

40

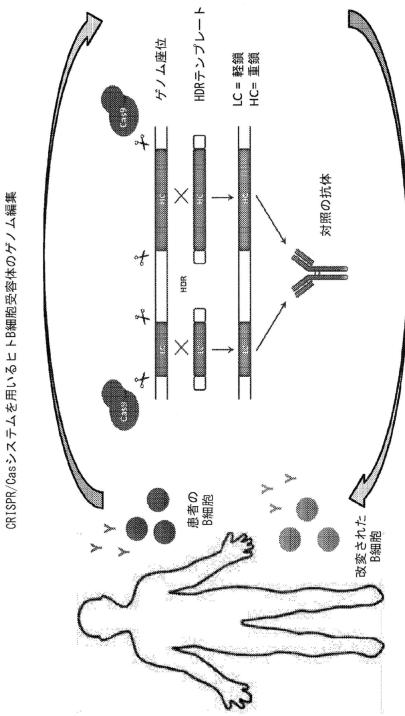
50

【四面】

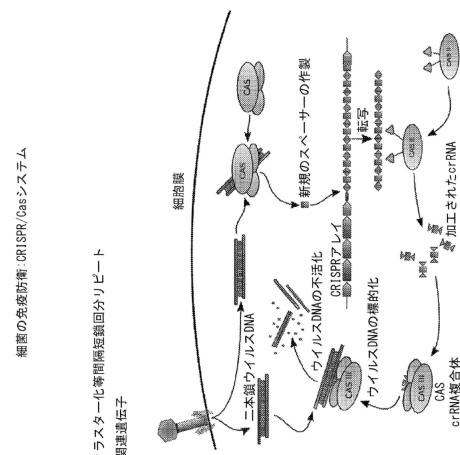
### 【図 1 A】



### 【図1C】



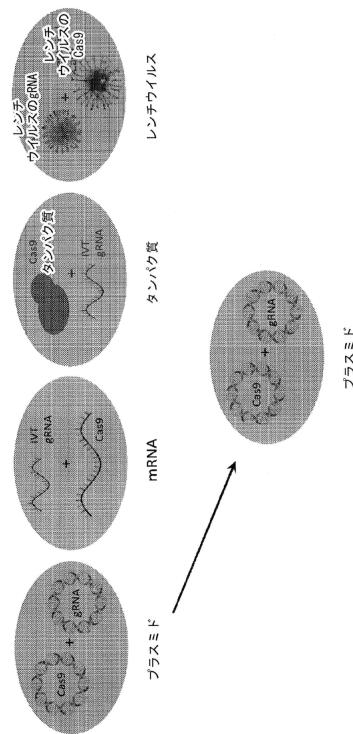
### 【図1B】



細菌の免疫防衛: CRISPR/Casシステム

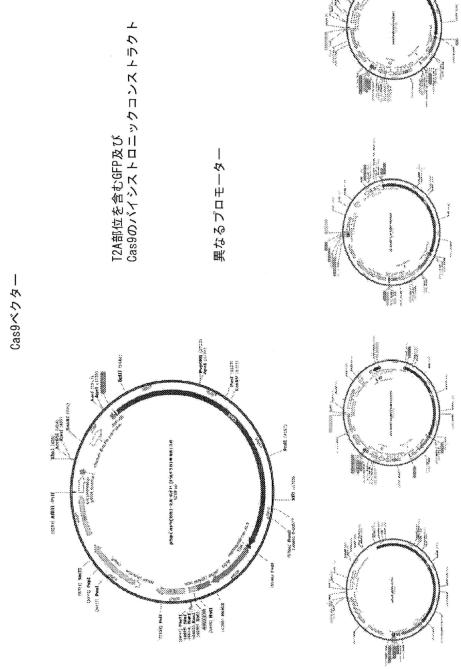
CRISPR = クラスター化等間隔短鎖回分リピート  
Cas = CRISPR関連蛋白質

【図2】

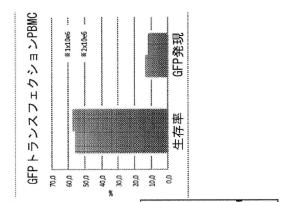


한국의 문화재

【図3】

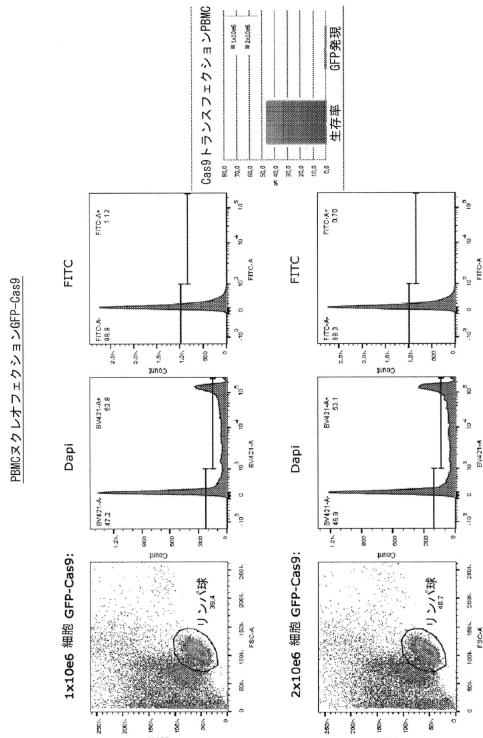


【図4 A】

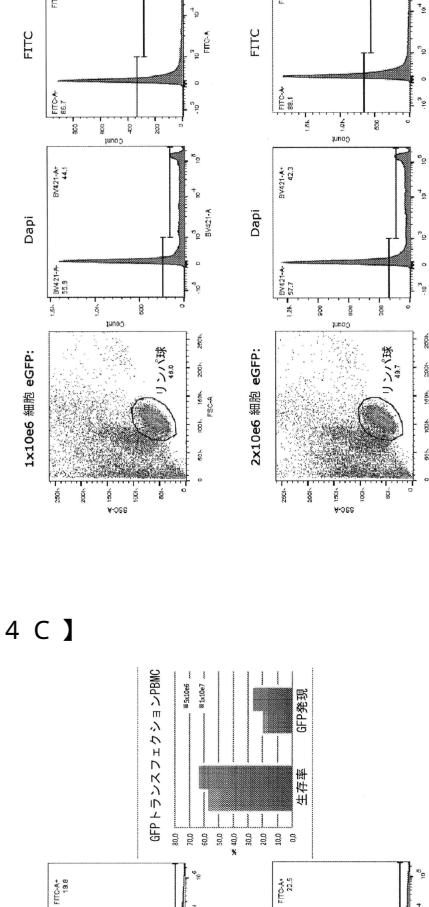


10

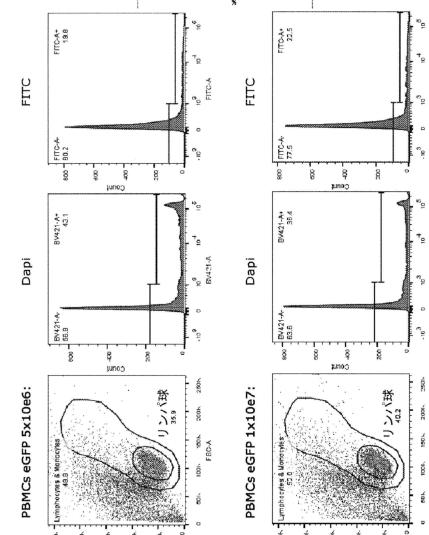
【図4 B】



【図4 C】



20

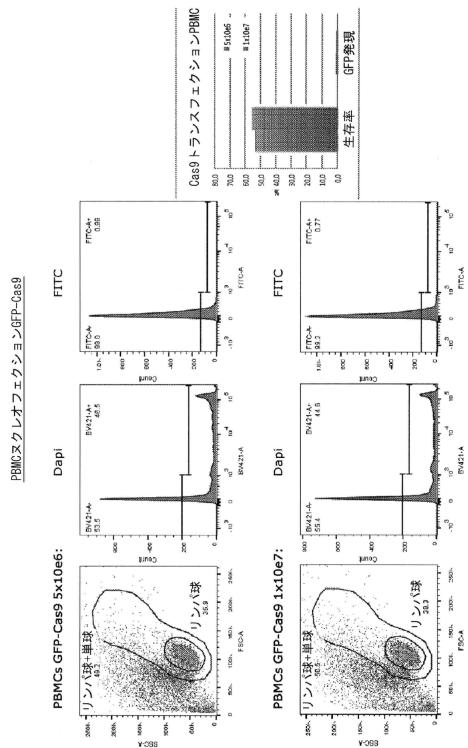


30

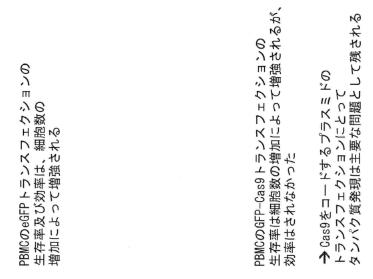
40

50

【図 4 D】



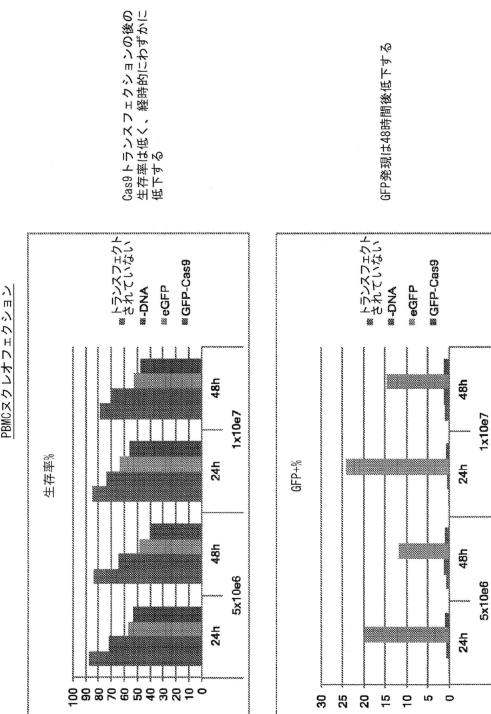
【図 5 A】



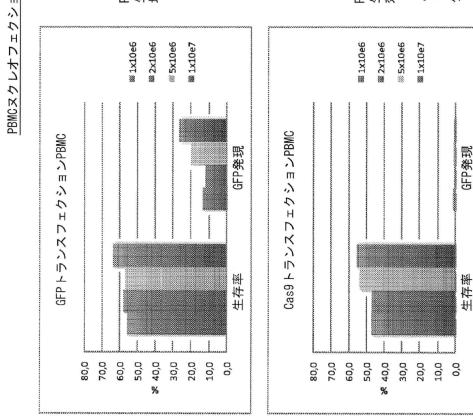
PBMCのGFPトランスクレオフェクションの生存率は細胞数の増加によって強調される。

→ Cas9をコードするプラスミドのトランスクレオフェクションによって得られるトランスクレオフェクションは主要な問題として扱われる。

【図 5 B】



【図 6】



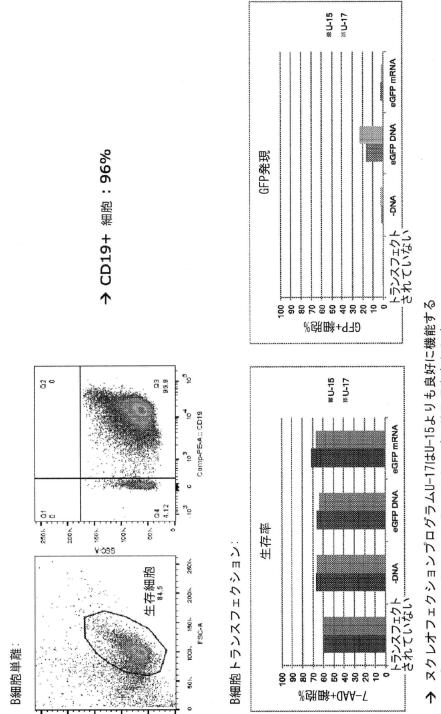
PBMCのGFPトランスクレオフェクションの生存率は細胞数の増加によって強調される。

10

20

30

40

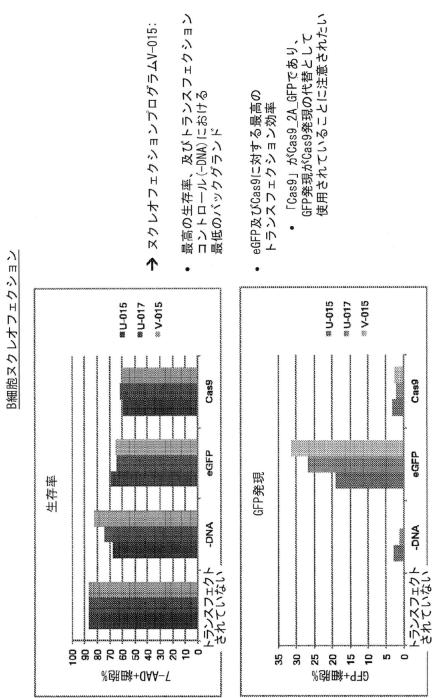


PBMCのGFPトランスクレオフェクションの生存率は細胞数の増加によって強調される。

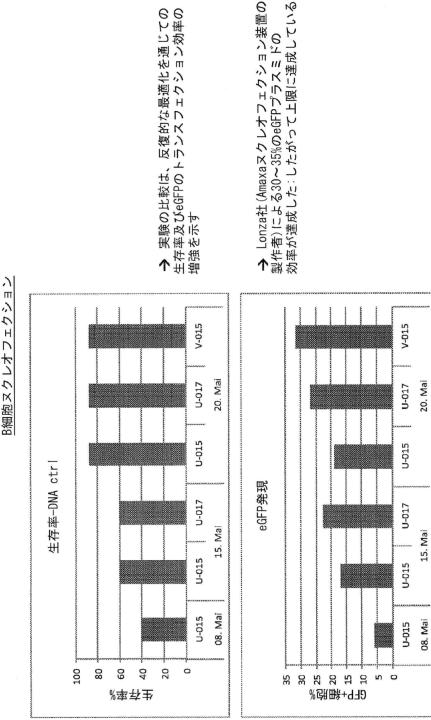
→ Cas9をコードするプラスミドのトランスクレオフェクションは主要な問題として扱われる。

50

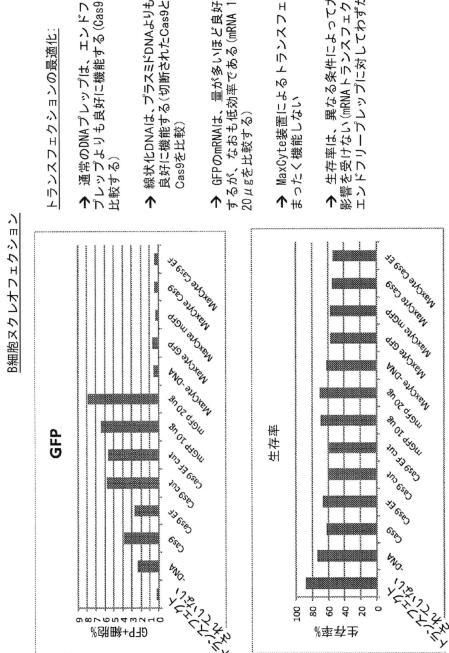
### 【図7A】



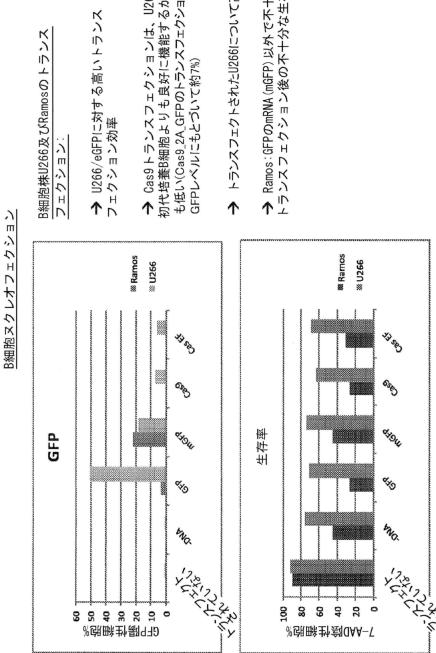
【図7B】



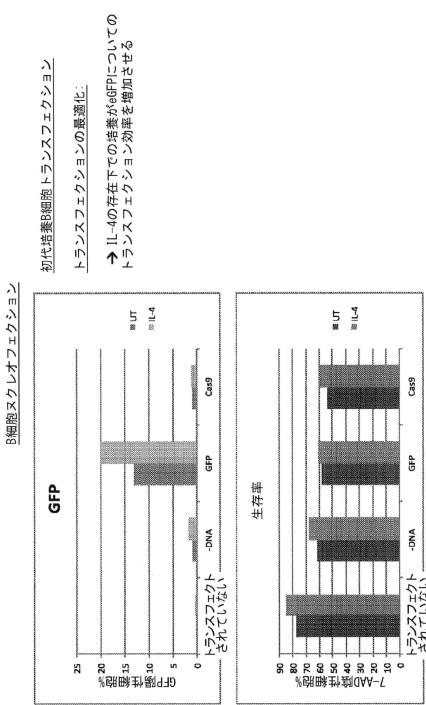
【図7C】



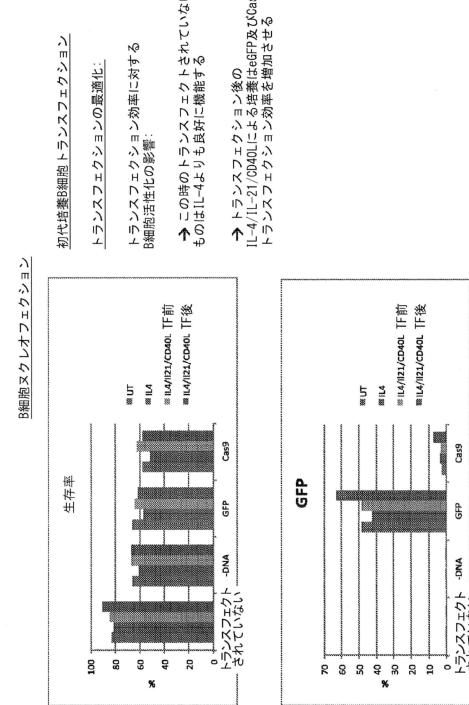
【図7D】



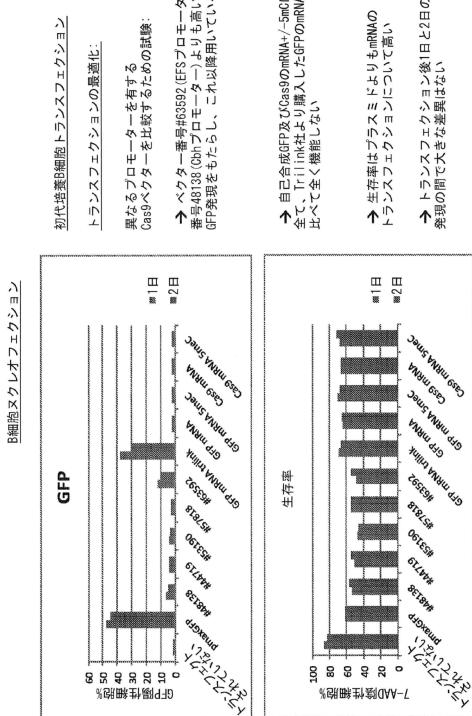
【図 8 A】



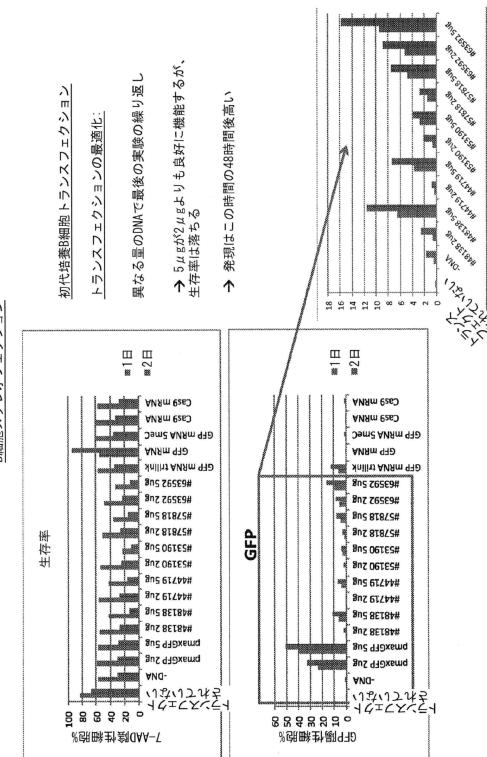
【図 8 B】



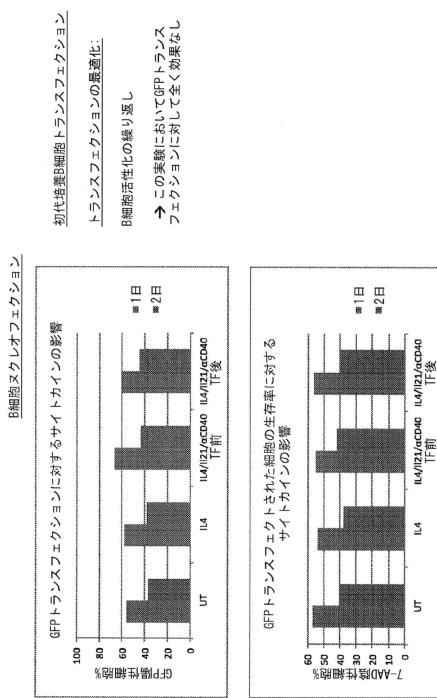
【図 9 A】



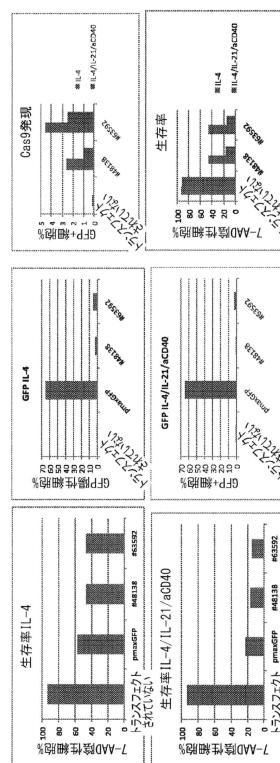
【図9B】



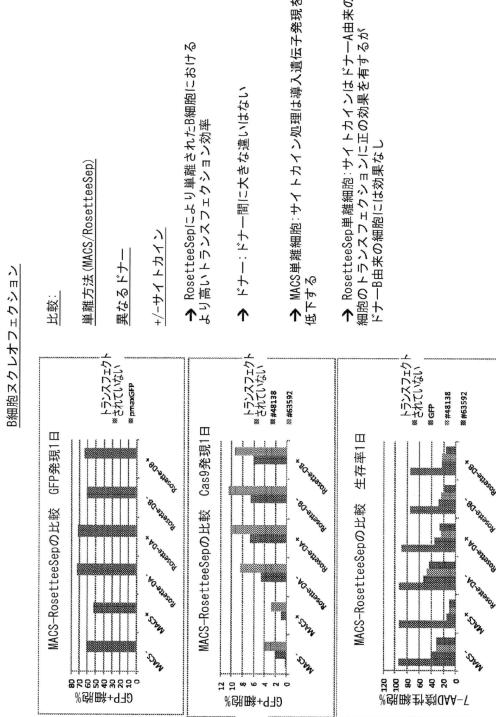
【図 9 C】



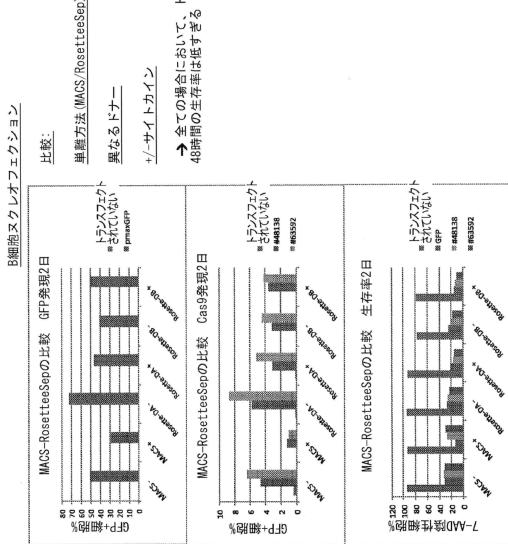
【図 10】



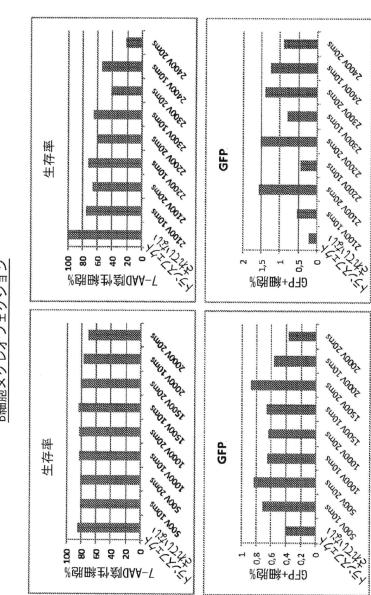
【図 11 A】



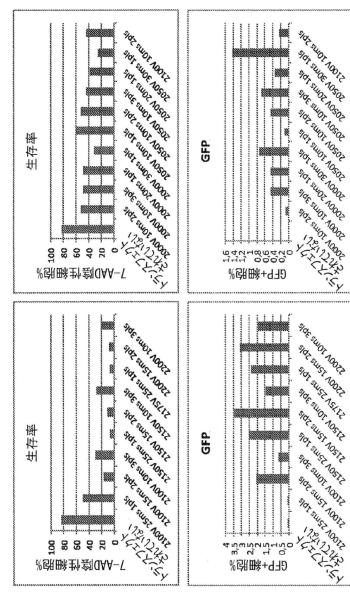
【図 11 B】



【図 1 2 A】

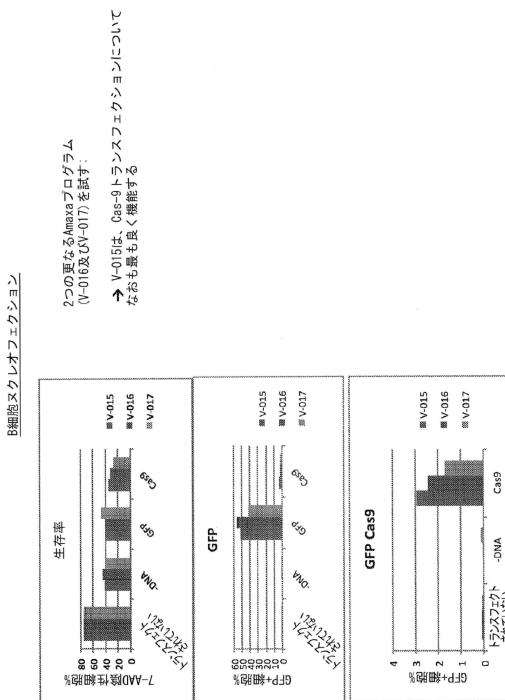


【図 1 2 B】

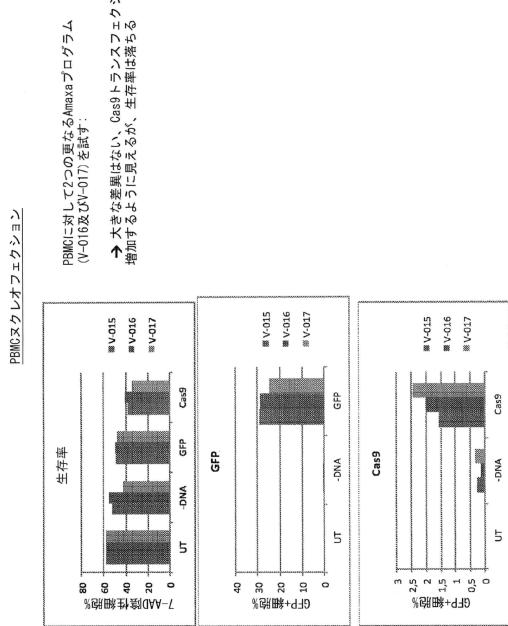


Neon トランスクレオフェクション装置を試す  
→ Casベクター番号63529によるヒト血液細胞の最適化プロトコールに従う  
→ トランスクレオフェクションなし

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】

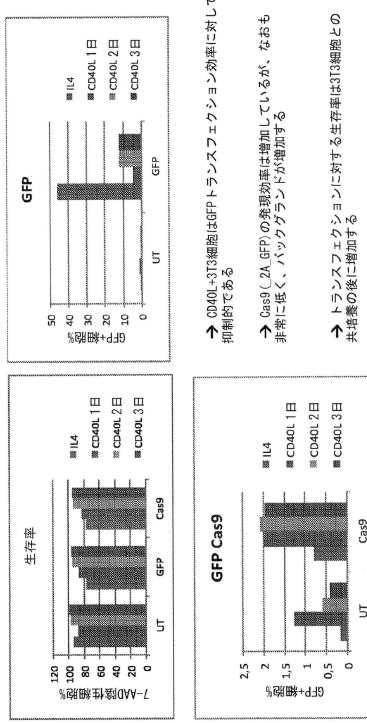


Neon トランスクレオフェクション装置 (V-016)によるヒト血液細胞の最適化プロトコールに従う  
→ Cas9ベクター番号63529によるヒト血液細胞の最適化プロトコールに従う  
→ トランスクレオフェクションなし

【図 14 A】

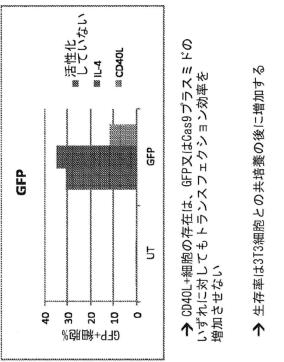
## B細胞スクレオフェクション

CD40L発現細胞(未細胞化)による活性化:  
スクレオフェクション前のB細胞の放射線照射3T3細胞比の24時間、48時間、又は72時間の共培養



→ CD40L+3T3細胞はGFPトランスクレクション効率に対して抑制的である  
→ Cas9 10μgの生存率は増加するが、なおも非常に低く、バックグラウンドが増加する  
→ トランスクレクションに対する生存率は3T3細胞比の共培養の後に増加する

【図 14 B】

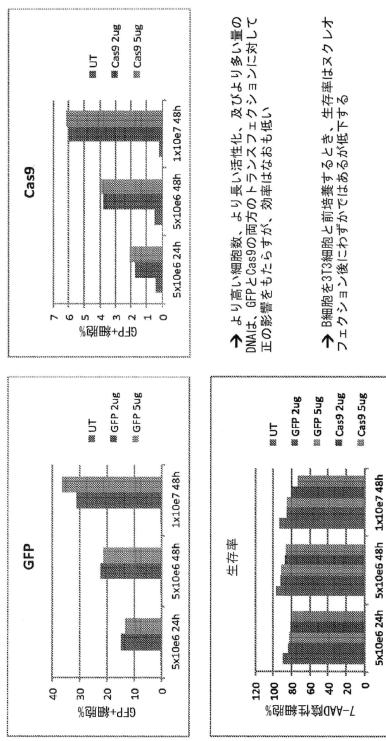


→ CD40L+3T3細胞はGFPトランスクレクション効率に対して抑制的である  
→ Cas9 10μgの生存率は増加するが、なおも非常に低く、バックグラウンドが増加する  
→ トランスクレクションに対する生存率は3T3細胞比の共培養の後に増加する

【図 15 A】

## B細胞スクレオフェクション

3T3細胞上への異なるB細胞数の播種、24時間又は48時間の共培養、及び異なる量のDNAによるトランスクレクション

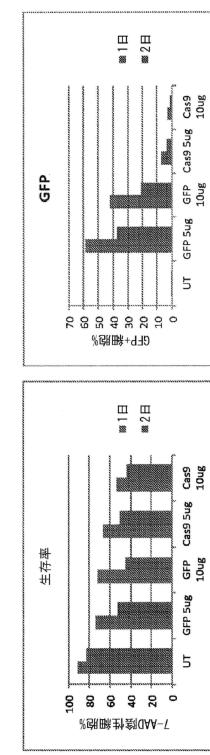


→ より高い細胞数、より長い活性化、及びより多い量のDNAは、GFPとCas9の両方のトランスクレクションに対しての影響をもたらすが、効率はなおも低い  
→ B細胞を3T3細胞と同時接するとき、生存率はスクレオフェクション後にわずかではあるが低下する  
→ B細胞を11-4で再び活性化する

【図 15 B】

## B細胞スクレオフェクション

全PBCにに対して繰り返される実験:  
スクレオフェクション前のB細胞の放射線照射3T3細胞との24時間の共培養

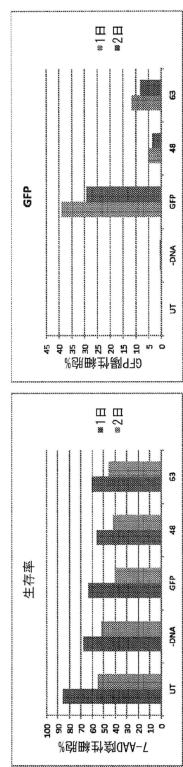


より多い量のDNAでより多い細胞数(1×10^6)を試す  
(B細胞を11-4で再び活性化する)

→ 5μgのCas9プラスミドと組み合わせたより多い細胞数が最善で機能する

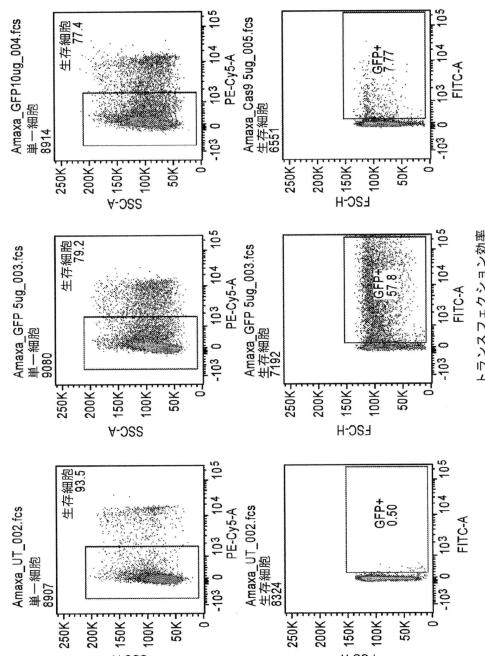
【図 15 C】

B細胞スクリオフェクション  
初代培養細胞の代わりにU266癌細胞株のスクレオフェクションを繰り返す  
5 μgのGFP/Cas9ラムスミトキサン5×10<sup>6</sup>



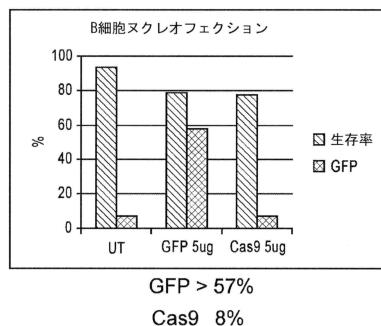
→これらの細胞においてCas9のトランスフェクション効率はなおも低い  
→初代培養細胞の代替に意味がない

【図 16 - 1】



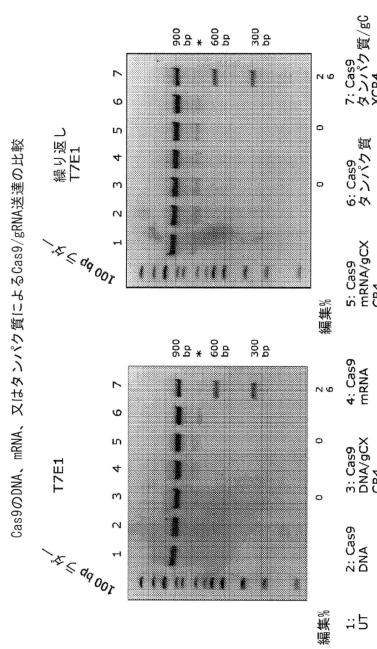
トランスフェクション効率

【図 16 - 2】



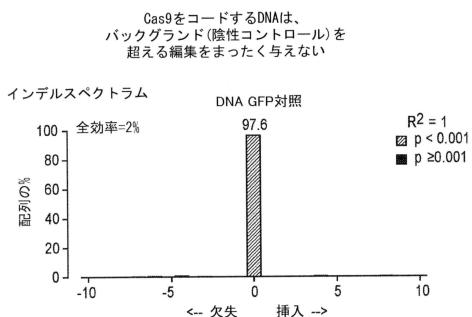
GFP > 57%  
Cas9 8%

【図 17】

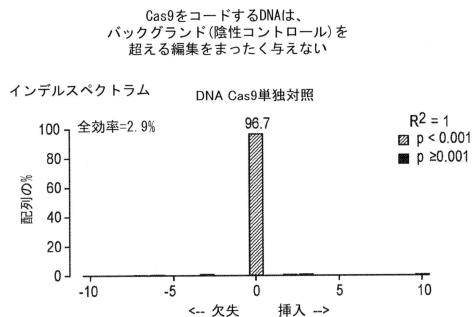


→ Cas9のタンパク質の送達のみがXCR4座位置における効率的な切断をもたらす

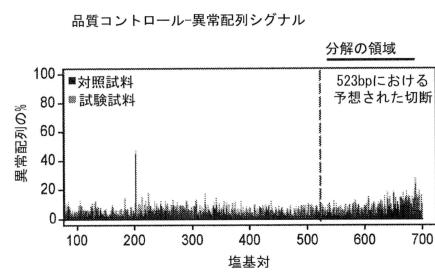
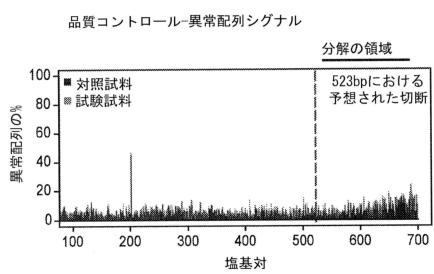
【図 18 A - 1】



【図 18 A - 2】

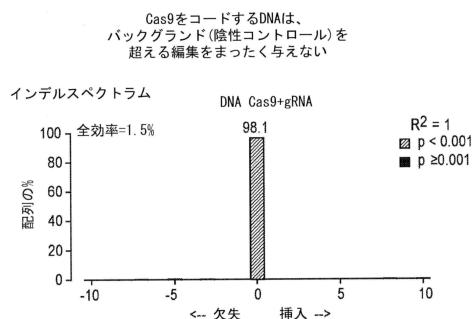


10

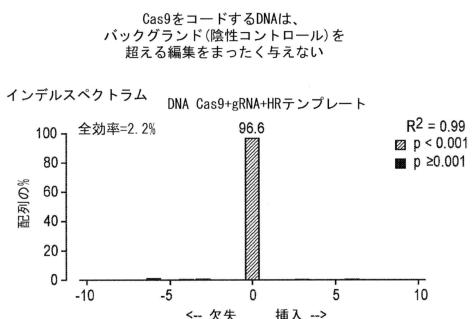


20

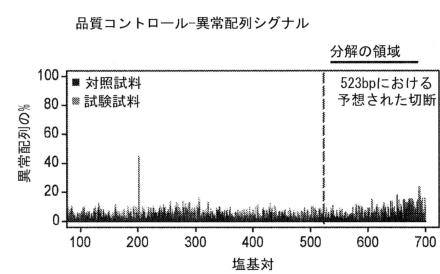
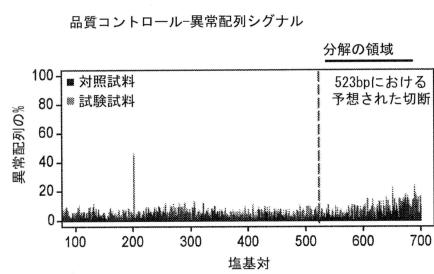
【図 18 B - 1】



【図 18 B - 2】



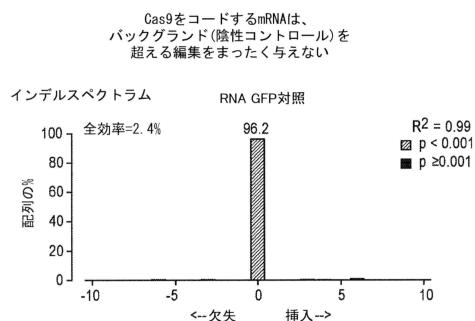
30



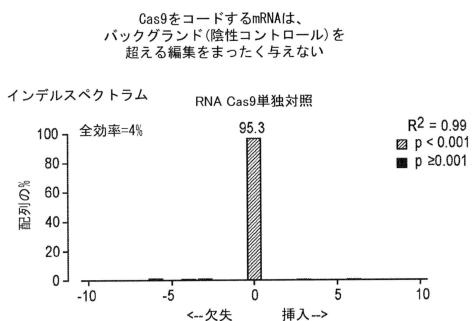
40

50

【図 18 C - 1】



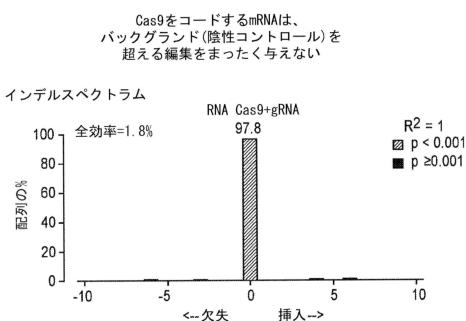
【図 18 C - 2】



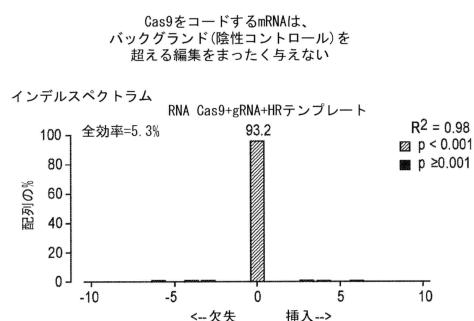
10

20

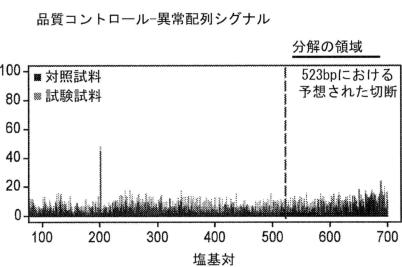
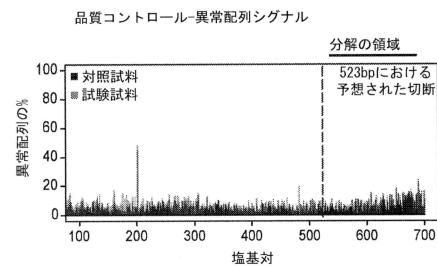
【図 18 D - 1】



【図 18 D - 2】



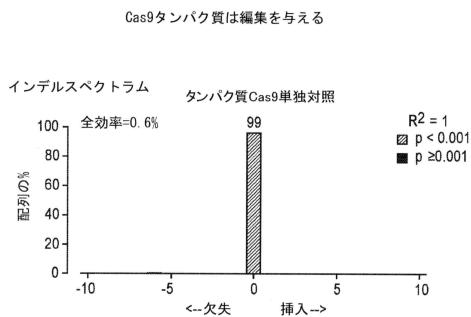
30



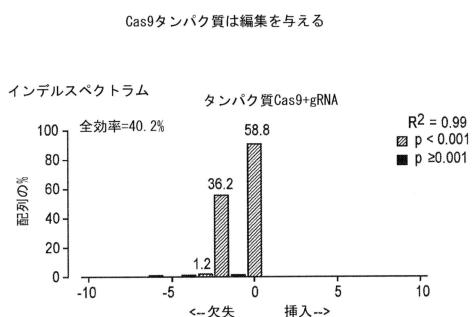
40

50

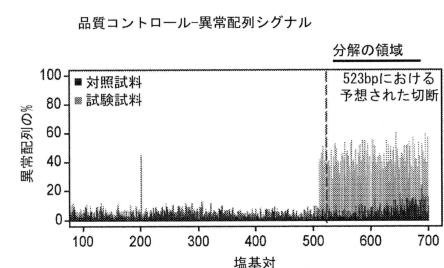
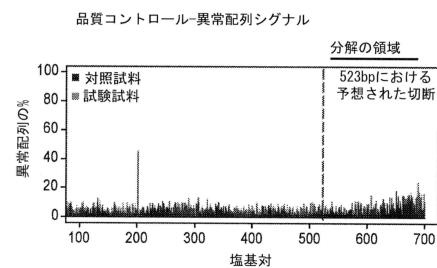
【図 18 E - 1】



【図 18 E - 2】

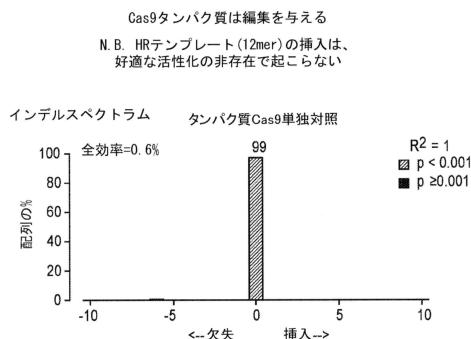


10

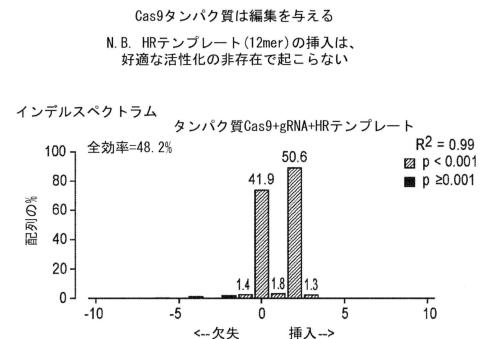


20

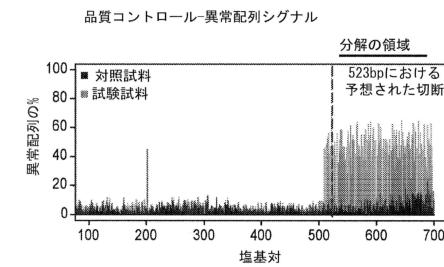
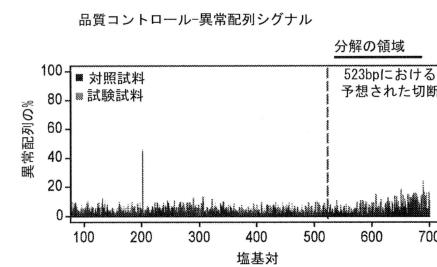
【図 18 F - 1】



【図 18 F - 2】



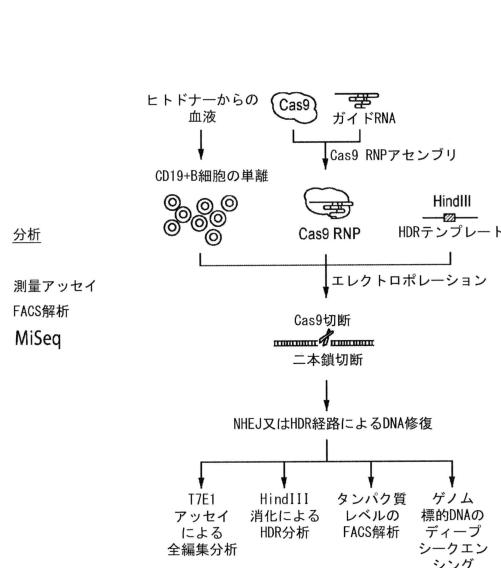
30



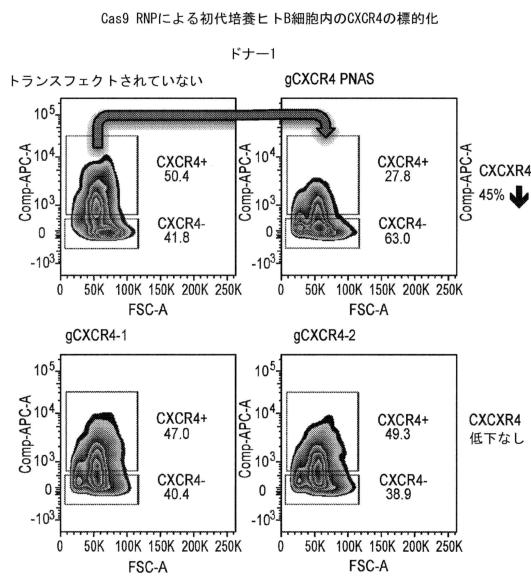
40

50

【図19】



【図20A-1】



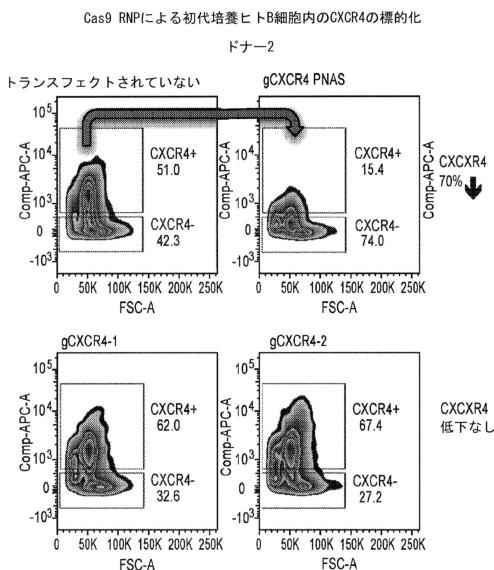
10

▷ B細胞におけるCXCR4発現は、PNASの論文（「gCXCR4 PNAS」）に報告されるgCXCR4骨格と複合体化したCas9 RNPによる標的化の後に70%にまで低下する！

gCXCR4-1及びgCXCR4-2:異なるgRNA骨格を用いた異なるgCXCR4調製物

20

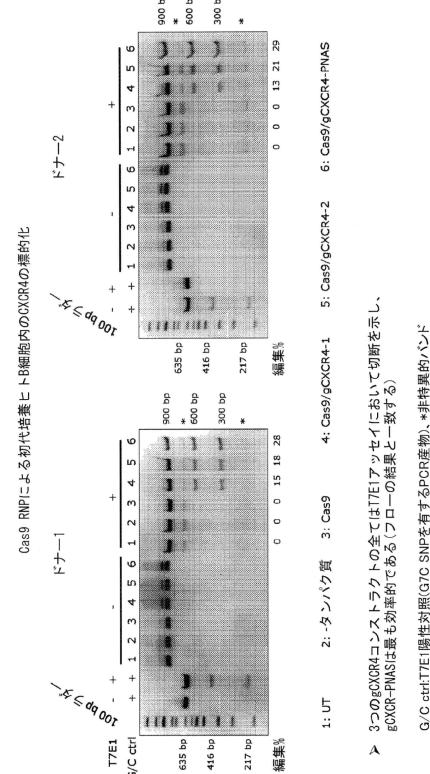
【図20A-2】



▷ B細胞におけるCXCR4発現は、PNASの論文（「gCXCR4 PNAS」）に報告されるgCXCR4骨格と複合体化したCas9 RNPによる標的化の後に70%にまで低下する！

gCXCR4-1及びgCXCR4-2:異なるgRNA骨格を用いた異なるgCXCR4調製物

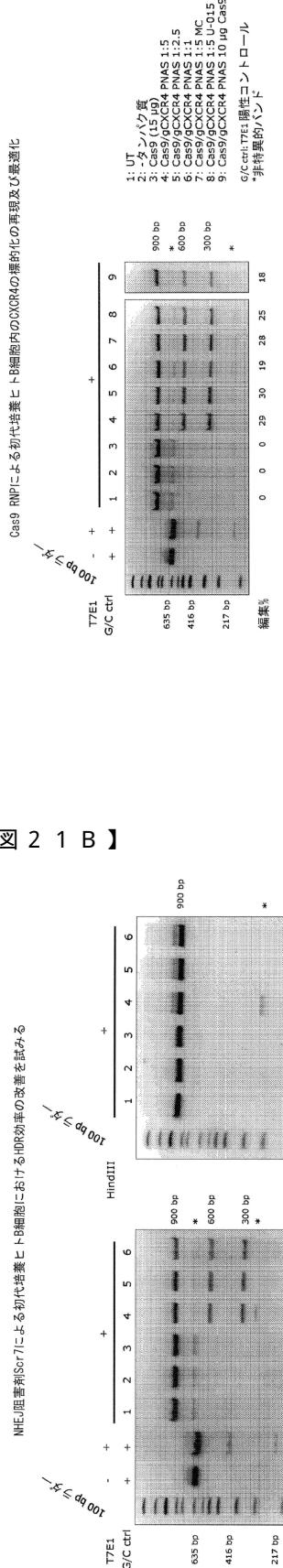
30



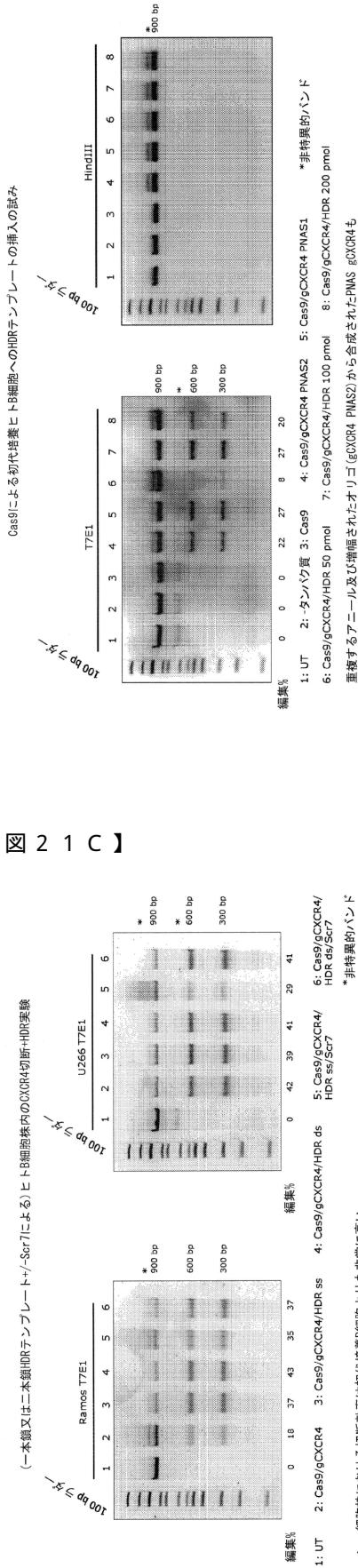
40

50

【図20c】



## 【図21A】



HEJ阻害剤[Scr7]による初代培養ヒトB細胞におけるHDR効率の改善を試みる

1: UTR	2: -タヌイケ質	3: Cas9	4: Cas9/gCXR4	5: Cas9/gCXCR
--------	-----------	---------	---------------	---------------

- ▶ CX4座席におけるCas1による切断は安定して再現可能である
- ▶ Cas1/CXR4は1:1.5及び1:2.5は最も効率的である
- ▶ ドラムセルフショーン後の培地交換(M0)は切断効率を増加させない
- ▶ 異なるムスクレフィンケーション(M0)とプロモーターは切断効率を上げかに低下させない
- ▶ 少ないCas9(100 fm)でもまた機能する(1.2%が1低下した効率がながらも)

Cas9による初代培養ヒトB細胞へのHDRテンプレートの挿入の試み

10

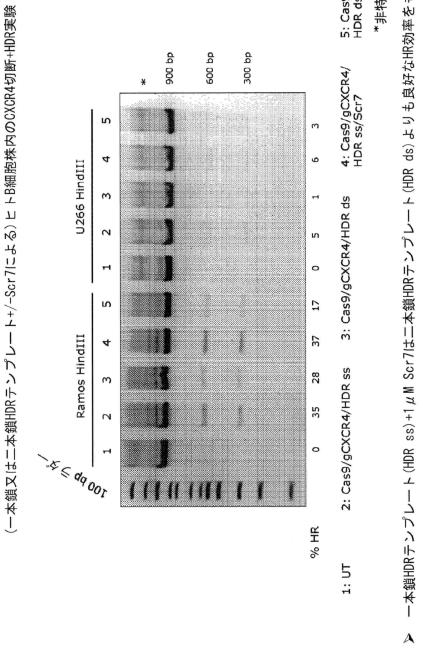
20

30

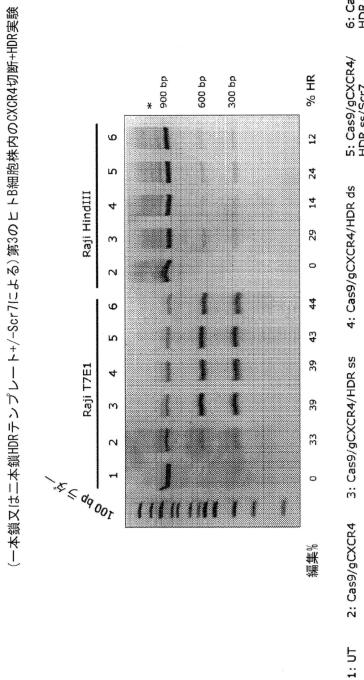
40

50

【図 2 1 D】



【図 2 1 E】

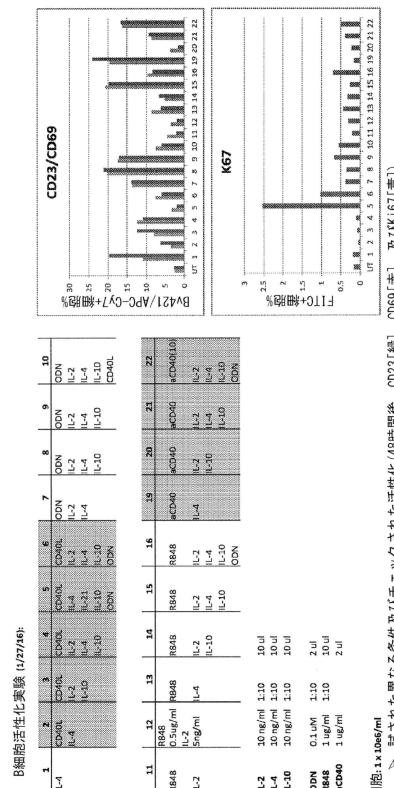


➤ HDR細胞 (0266よりも高い増殖速度を有する)におけるより高いHR効率

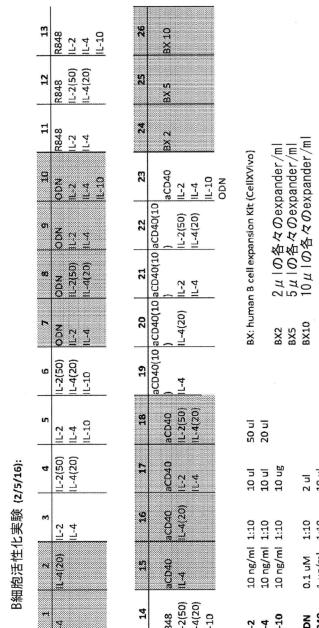
➤ 一本鎖HDRテンプレート (HDR ss) +  $\mu$ M Scr7は二本鎖HDRテンプレート (HDR ds) よりも良好なHR効率をもたらす

➤ 一本鎖HDRテンプレート (HDR ss) +  $\mu$ M Scr7は活性化条件をもたらす

【図 2 1 F】



【図 2 1 G】



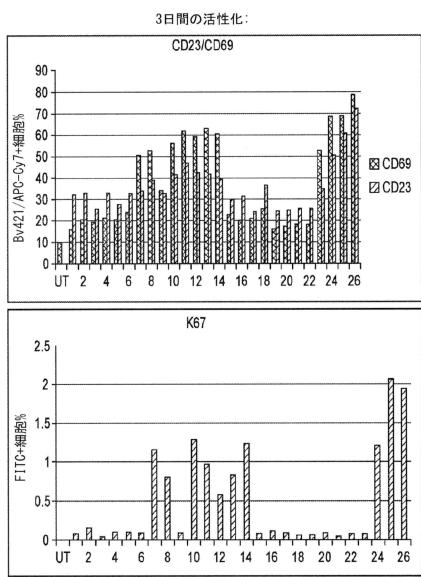
➤ HDR細胞 (0266よりも高い増殖速度を有する)におけるより高いHR効率

➤ 一本鎖HDRテンプレート (Scr7) はRaji細胞で切断及びHRの最高の効率をもたらす

➤ 細胞は相同組換換えを達成するために増殖する必要がある

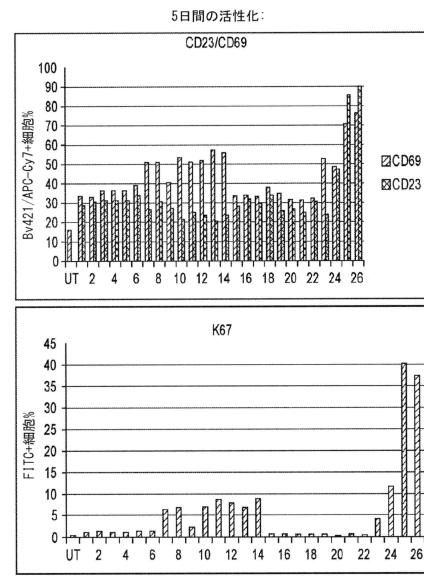
➤ 本発明者らの初代培養細胞は、從来の培養法において増殖堅固ではなく、これは親譜されたHRの次卵を説明し得る一本発明者らは活性化条件を見つけるべきである

### 【図21H-1】



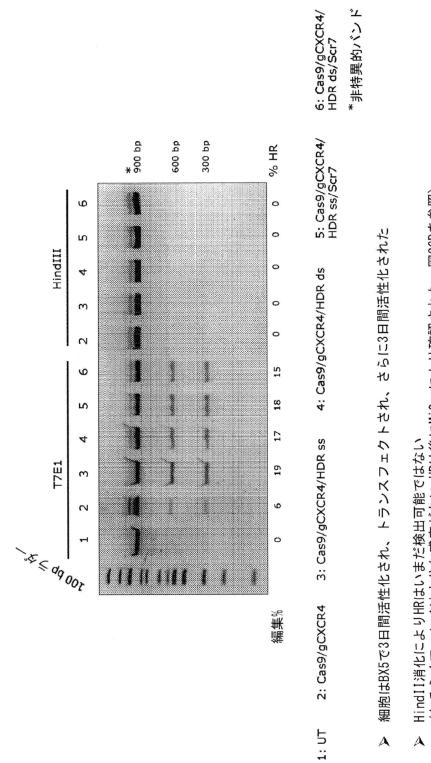
- ▶ B細胞増殖キットは、培地中の各々5μlのキットのexpander/mlを5日間で、最高のCD23及びCD69シグナルと最大の増殖速度(Ki67)をもたらす
- ▶ このキットとこの濃度で次に進む

### 【図21H-2】

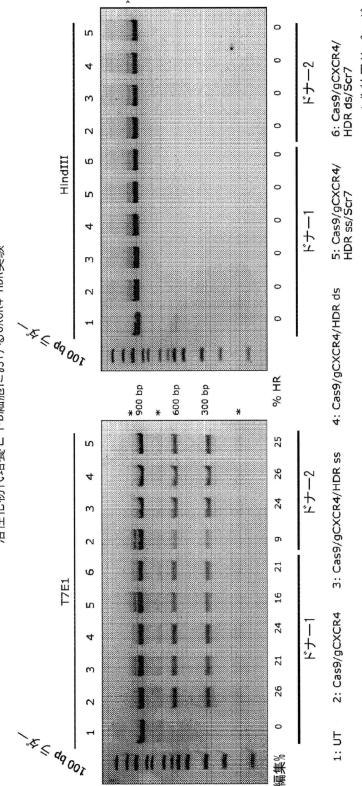


- ▶ B細胞増殖キットは、培地中の各々5μlのキットのexpander/mlを5日間で、最高のCD23及びCD69シグナルと最大の増殖速度(Ki67)をもたらす
- ▶ このキットとこの濃度で次に進む

【図21】

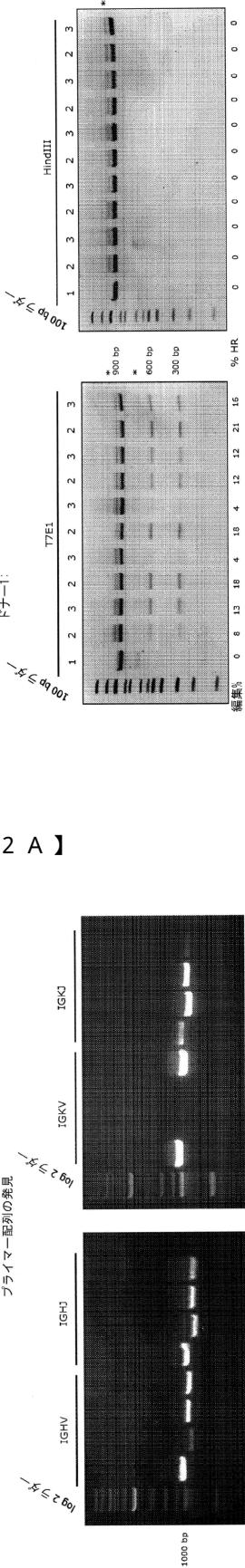


## 【図21】



【図 2 1 K】

活性化初代培養ヒトB細胞におけるCXCR4 HDR実験  
4つの特異的な切断座点(重鎖及び錠鎖の5'及び3')を増幅するための  
プライマーセットの発見



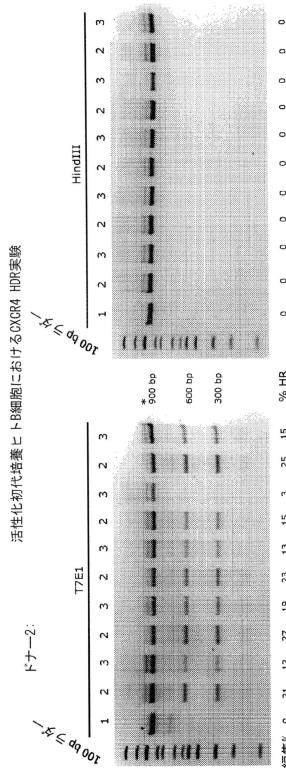
IGHV1 (1050 bp, Tm = 72°C)  
IGHJ1 (1050 bp, Tm = 72°C)  
IGKV1 (1050 bp, Tm = 72°C)  
IGKJ1 (1050 bp, Tm = 65°C)

選択されたプライマーリー(4つの異なる組み合わせのうちで):

▶ 選択されたプライマーリー(4つの異なる組み合わせのうちで):

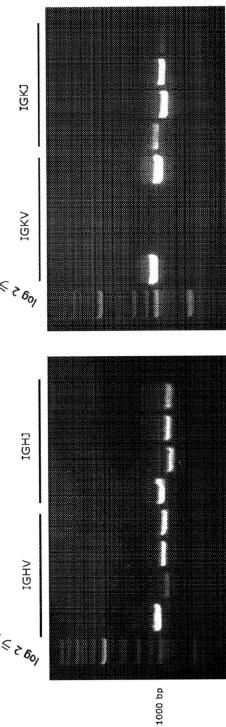
条件2及び3+HDRテンプレートはドナーで低下した切断効率をもたらす  
▶ 試験された全ての条件においてHindIII消化によりHRはいまだ検出不可能ではない  
(おそらくアッセイは十分な感度がない一例は後にMiSeqにより確認された、図26Bを参照)

【図 2 1 L】



[000220-000224]に  
記載されている  
活性化条件1~5)  
条件2及び3+HDRテンプレートはドナーで低下した切断効率をもたらす  
▶ 試験された全ての条件においてHindIII消化によりHRはいまだ検出不可能ではない  
(おそらくアッセイは十分な感度がない一例は後にMiSeqにより確認された、図26Bを参照)

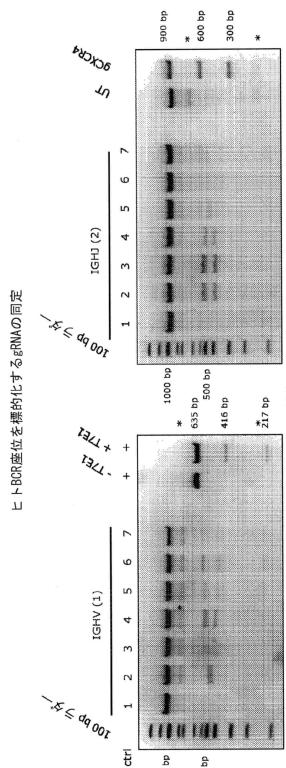
【図 2 2 A】



IGHV1 (2) (1050 bp, Tm = 72°C)  
IGHJ1 (1050 bp, Tm = 72°C)  
IGKV1 (1050 bp, Tm = 72°C)  
IGKJ1 (1050 bp, Tm = 65°C)

選択されたgRNA座位置を標的化するgRNAの同定

▶ 選択されたgRNA座位置を標的化するgRNAの同定

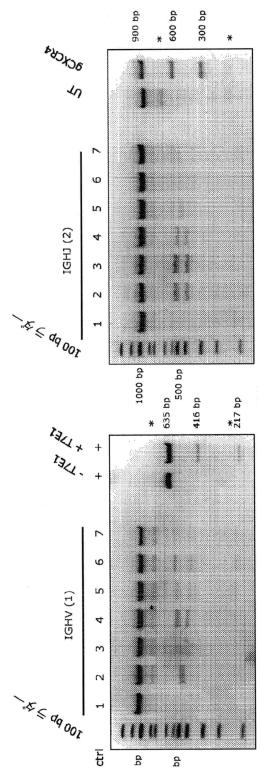


選択されたgRNA 1 GHV: 1-1 (510/540 bp)  
1-3 (474/576 bp)  
1-4 (455/559 bp)  
1-5 (447/603 bp)

選択されたgRNA 1 GHV: 2-1 (478/572 bp)  
2-2 (479/571 bp)  
2-3 (492/558 bp)  
2-4 (522/558 bp)

活性化初代培養ヒトB細胞におけるCXCR4 HDR実験

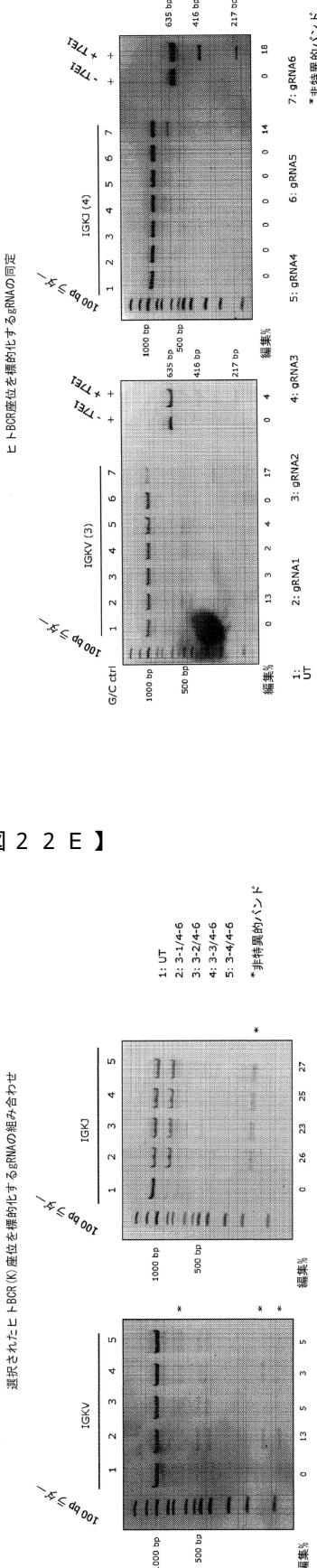
【図 2 2 B】



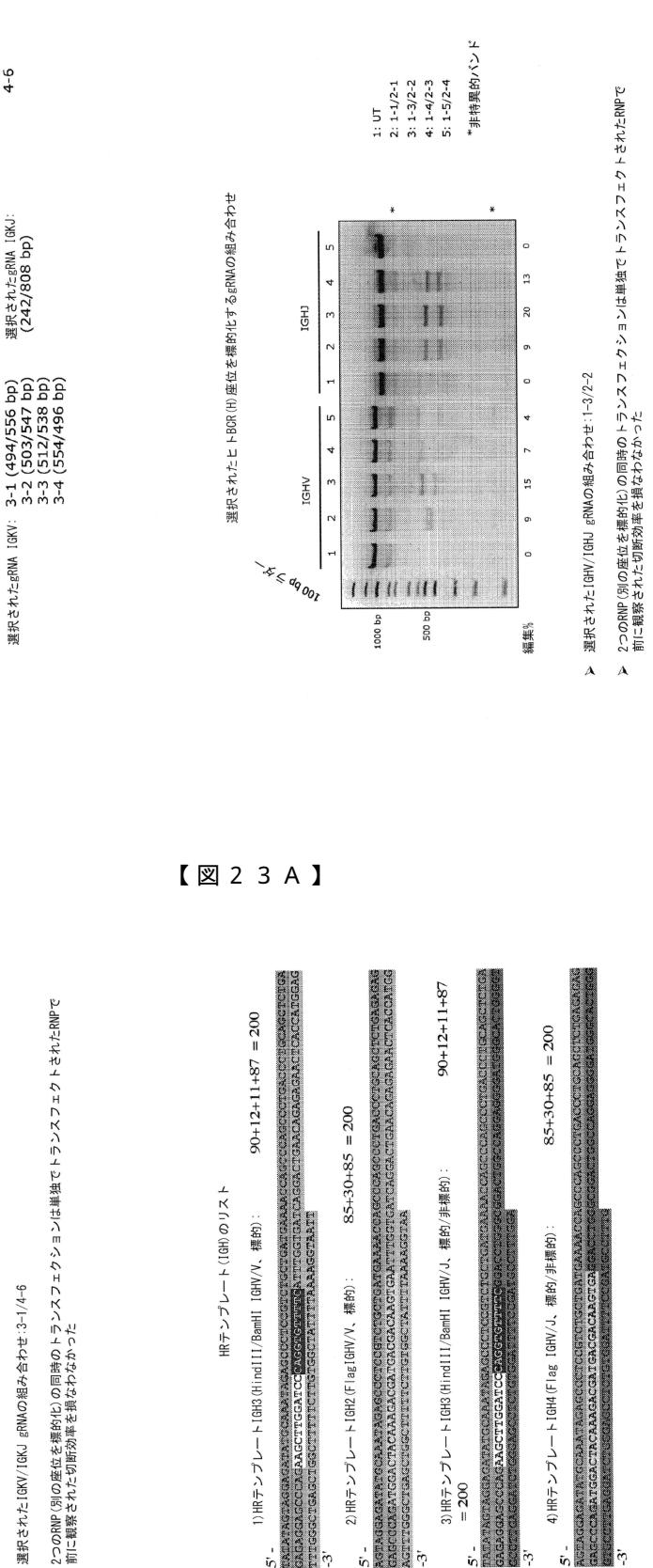
選択されたgRNA 1 GHV: 1-1 (510/540 bp)  
1-3 (474/576 bp)  
1-4 (455/559 bp)  
1-5 (447/603 bp)

選択されたgRNA 1 GHV: 2-1 (478/572 bp)  
2-2 (479/571 bp)  
2-3 (492/558 bp)  
2-4 (522/558 bp)

【図22c】



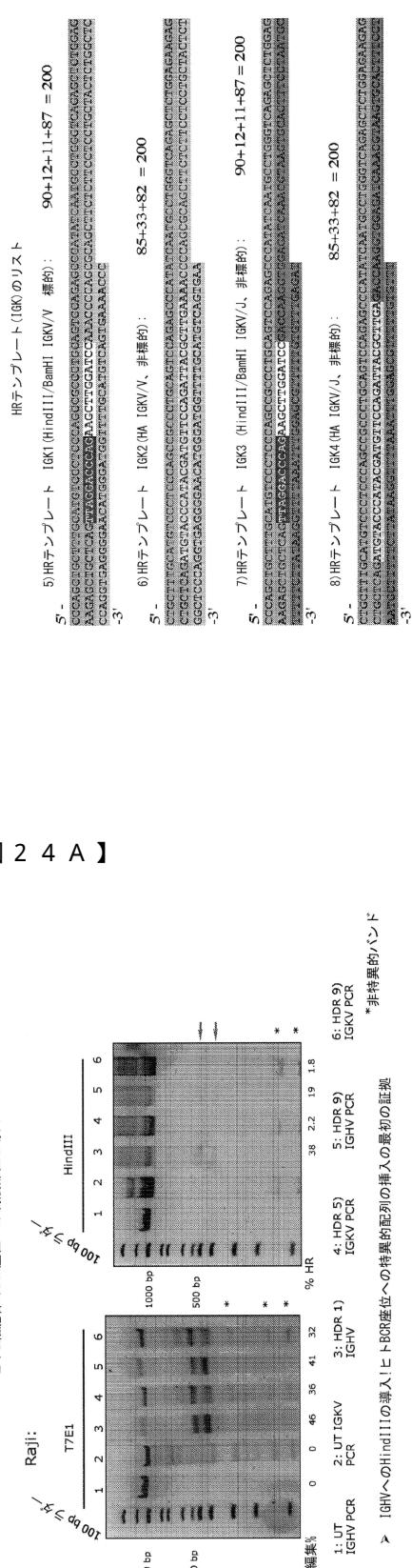
## 【図22D】



## 【図22E】

## 【図23A】

【図23B】



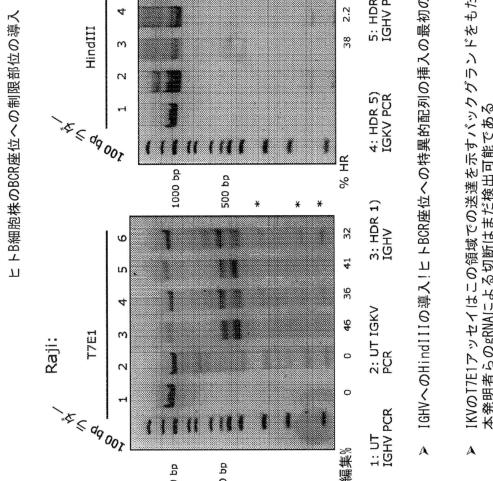
### 【図23C】

## ヒトB細胞のBCR座位への制限部位及びエピトープタグの導入

## 標的化：

- 1) HindIIIのIGHVへの導入: gRNA1-3、HDRテンプレート1
- 2) FLAGタグのIGHVへの導入: gRNA1-3、HDRテンプレート2
- 3) HindIIIのIGHV/Jへの導入: gRNA1-3及び2-2、HDRテンプレート3
- 4) FLAGタグのIGHV/Jへの導入: gRNA1-3及び2-2、HDRテンプレート4
- 5) HindIIIのIGKVへの導入: gRNA3-1、HDRテンプレート5
- 6) HAタグのIGKVへの導入: gRNA3-1、HDRテンプレート6
- 7) HindIIIのIGKV/Jへの導入: gRNA3-1及び4-6、HDRテンプレート7
- 8) HAタグのIGKV/Jへの導入: gRNAs-1及び4-6、HDRテンプレート8
- 9) HindIIIのIGHV及びIGKVへの導入: 1(+5)
- 10) FLAGのIGHV及びHAのIGKVへの導入: 2(+6)
- 11) HindIIIのIGHV/J及びIGKV/Jへの導入: 3(+7)
- 12) FLAGのIGHV/J及びHAのIGKV/Jへの導入: 4(+8)

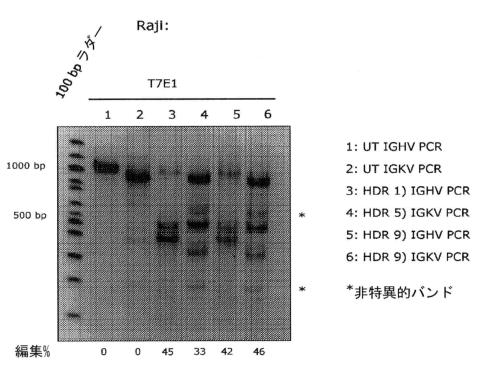
【図24A】



【 図 2 4 B 】

### IGKVのPCRとT7E1アッセイの繰り返し

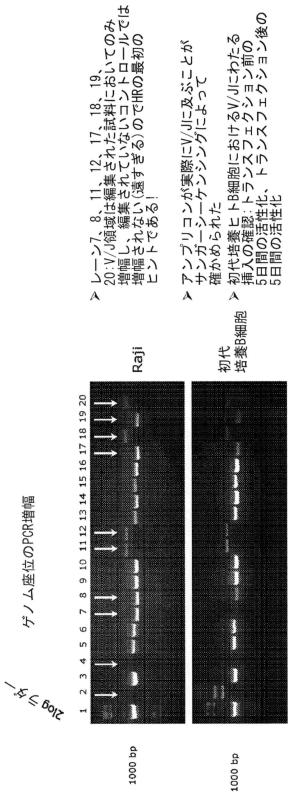
30



➤ IGKVの結果が確かめられた

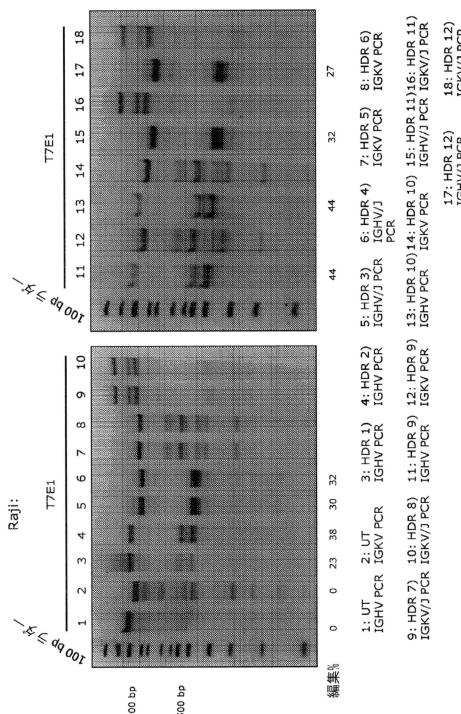
【 図 2 4 C 】

ヒトB細胞株のBCR座位への制限部位の導入



【図24F】

トB細胞株のBCR座位への制限部位及びエピトープタグの導入



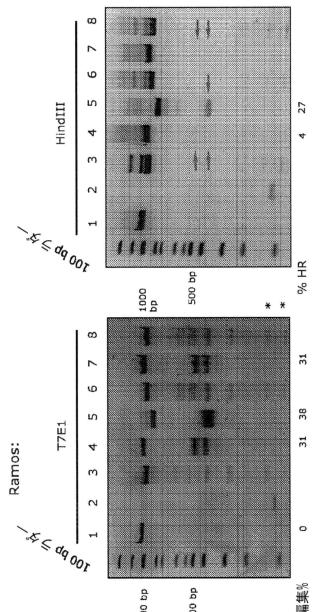
【図24D】

- ▲ Ramos細胞のiGIV及びiGIV- $\Delta$ へのHindIIIの導入/繰り返し導入されていないiGIV- $\Delta$ は増幅できなかつたので、HR効率は、トランスクレプトされていないiGIV- $\Delta$ に基づいて計算された)
- ▲ iGIV及びiGIV- $\Delta$ における性本質の判断があるが、iGIVVはないとされ、明らかに性本質不明の個体があるが、iGIVVはによって悪性化された部位を含まない方法によって腫瘍形成されている)

➤ 注意:IGKVはこのgIGKVIによって標的化されない

【図24E】

ヒトB細胞のBCR座位への制限部位及びエピトープタグの導入



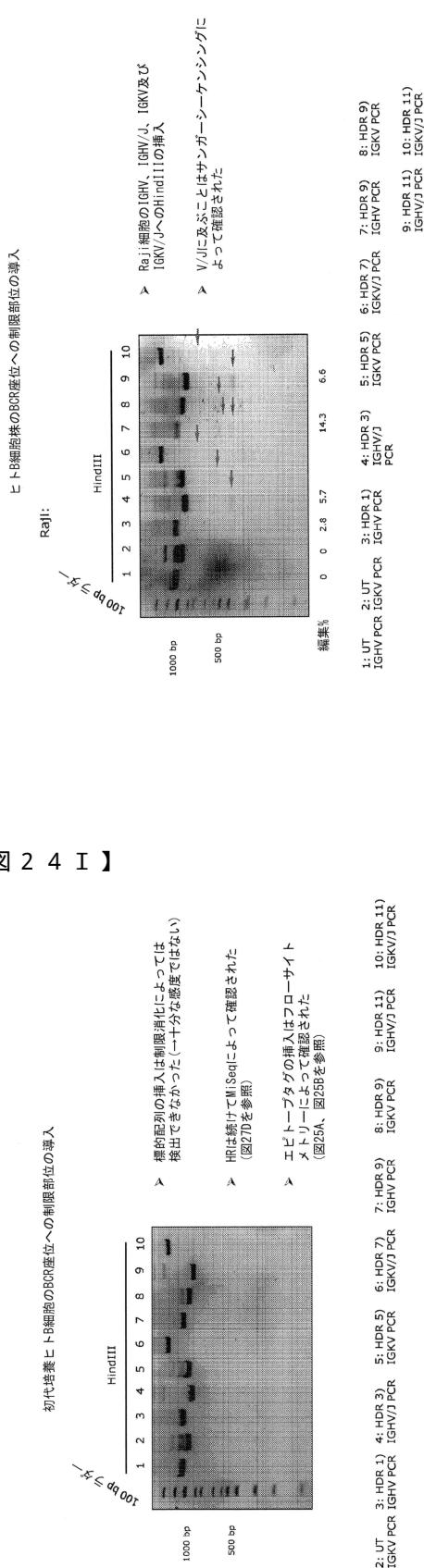
(それは明らかにものはや本発明者らの方法によって標的化された部位を含まない方法によって再構成されている)

トS細胞株のBGR座位への制限部位及びトーブタグの導入

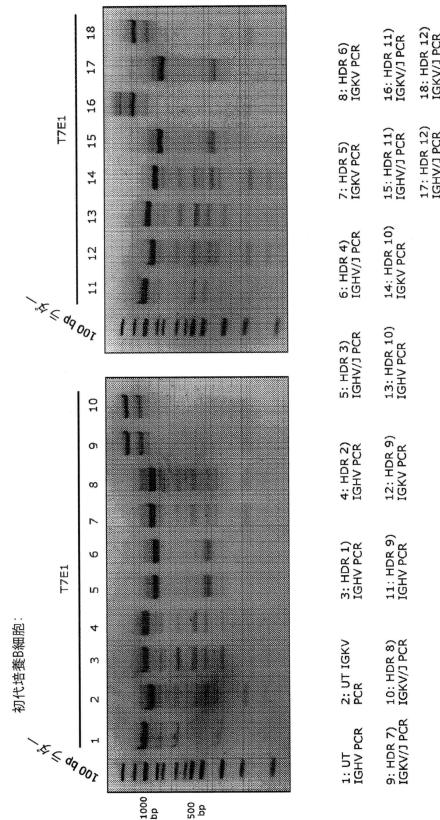
1: UT IGHV PCR  
 2: UT IGKV PCR  
 3: HDR 1) IGHV PCR  
 4: HDR 3) IGKV/J PCR  
 5: HDR 5) IGKV PCR  
 6: HDR 9) IGHV PCR  
 7: HDR 9) IGKV PCR

➤ 注意:IGKVはこのgIGKVIによって標的化されない

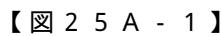
【図24G】



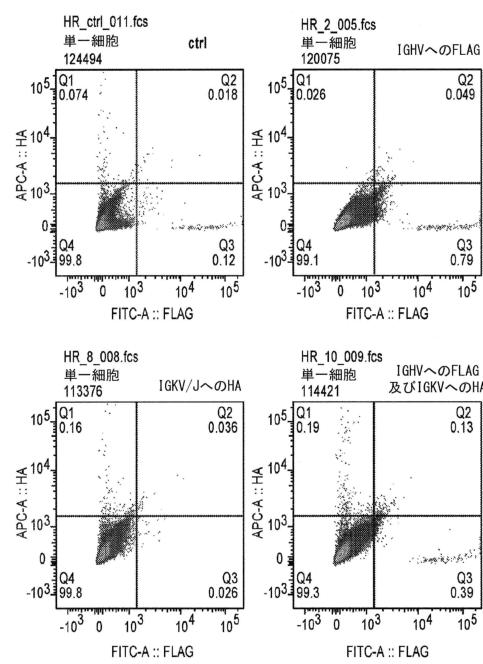
## 【図24H】



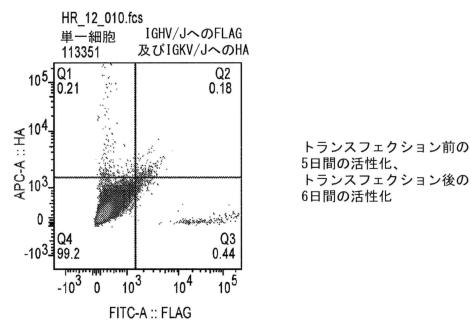
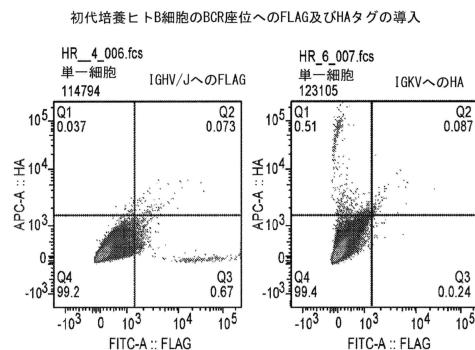
### 【図24-I】



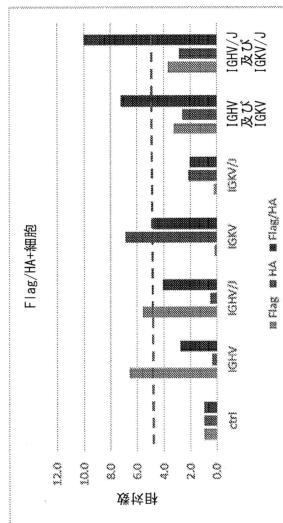
### 初代培養ヒトB細胞のBCR座位へのFLAG及びHAタグの導入



【図 25 A - 2】

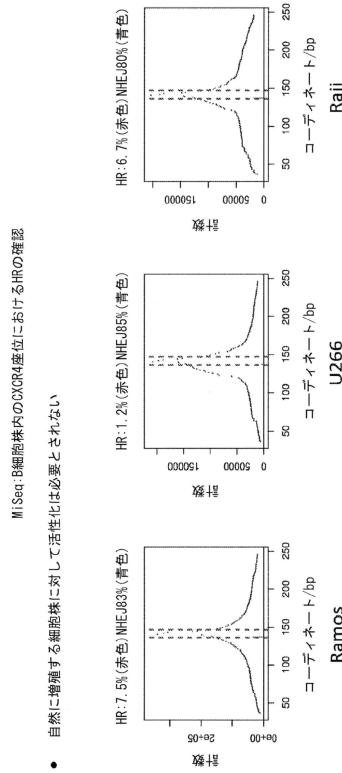


【図 25 B】



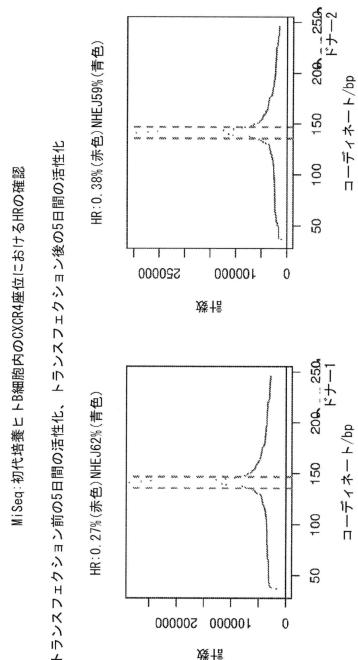
FLAG発現はIGHV及びIGHV/Jへの導入の後5~6倍を超えて増加する  
HA発現はIGKV及びIGKV/Jへの導入の後2~7倍を超えて増加する  
FLAG/HA-陽性細胞(紫色のバー)は、單一染色でバックグラウンドシグナルを有するが、IGHV及びIGKV並びにIGHV/J及びIGKV/Jへの導入の後に1~2倍を超えて増加する(赤い点線の上)  
染色はトランスフェクトされていない対照、ctrlに対して標準化された

【図 26 A】



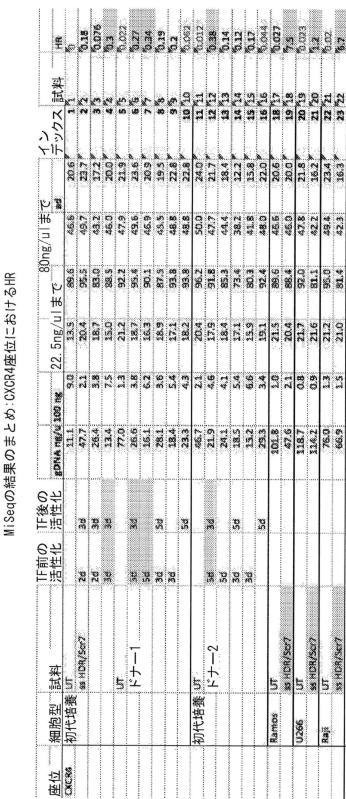
- これらの値は、各々のトランスフェクトされていないコントロールに対する0.02%のバックグラウンドを十分に上回る

【図 26 B】

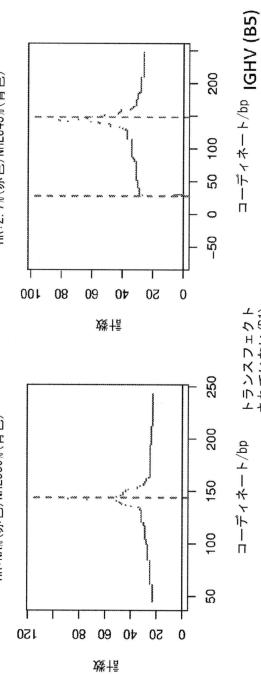


- トランスフェクション前の5日間の活性化、トランスフェクション後の5日間の活性化

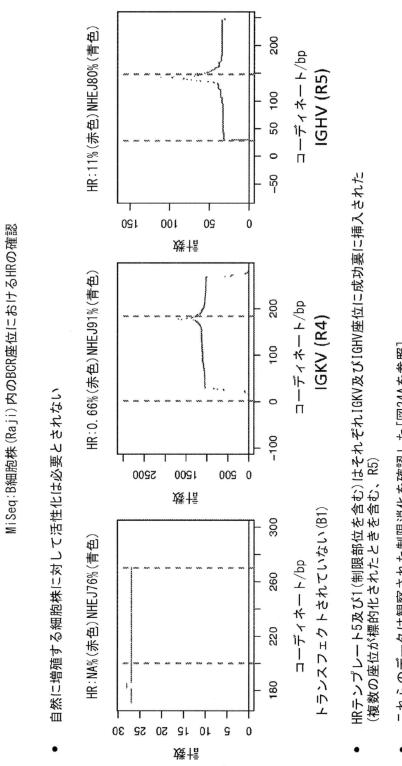
【図26C】



【図27A】



【図27B】



【図27C】

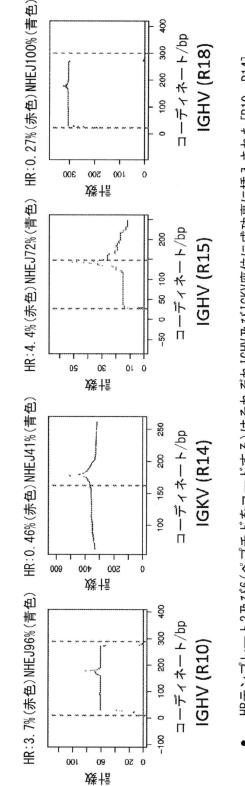
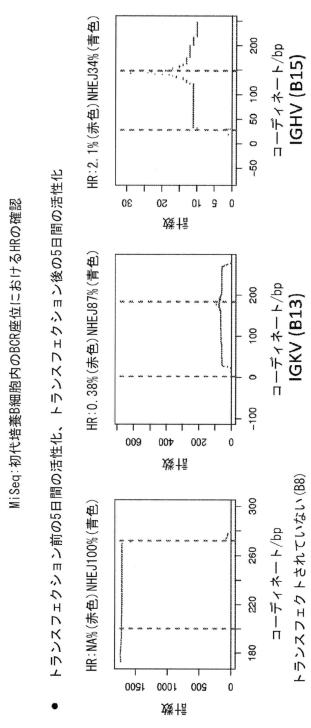


Figure 1 consists of two line graphs, (A) and (B), showing the effect of various reagents on the proliferation of fibroblast-like cells over time (0 to 240 hours). The y-axis represents proliferation, and the x-axis represents time in hours.

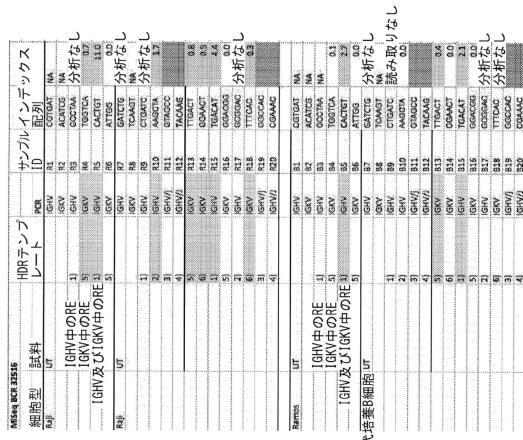
Graph (A) compares NHE (96% red), NHE (41% yellow), and NHE (0.4% blue). The proliferation curve for NHE (96% red) shows a sharp increase starting around 120 hours, with a peak between 180 and 240 hours. The curves for NHE (41% yellow) and NHE (0.4% blue) show a similar trend but at a lower level of proliferation.

Graph (B) compares GRH (10) and GRH (14). The proliferation curve for GRH (14) shows a sharp increase starting around 120 hours, with a peak between 180 and 240 hours. The curve for GRH (10) shows a similar trend but at a lower level of proliferation.

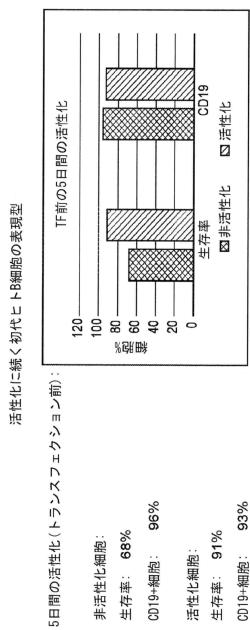
【図27D】



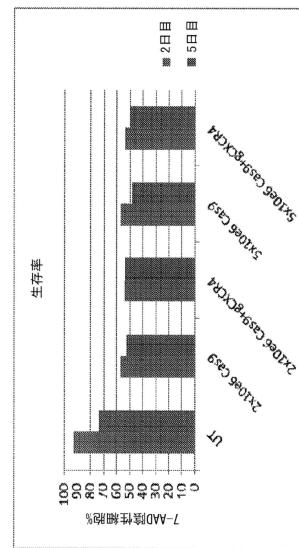
【図27E】



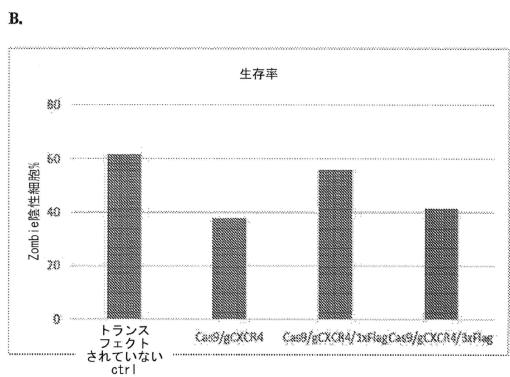
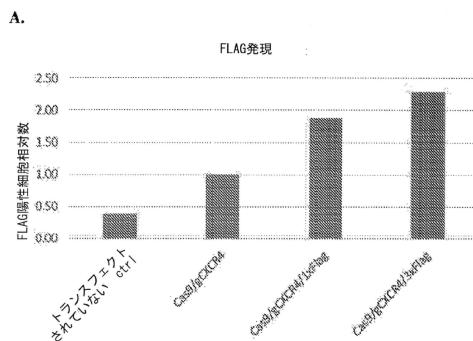
【図28】



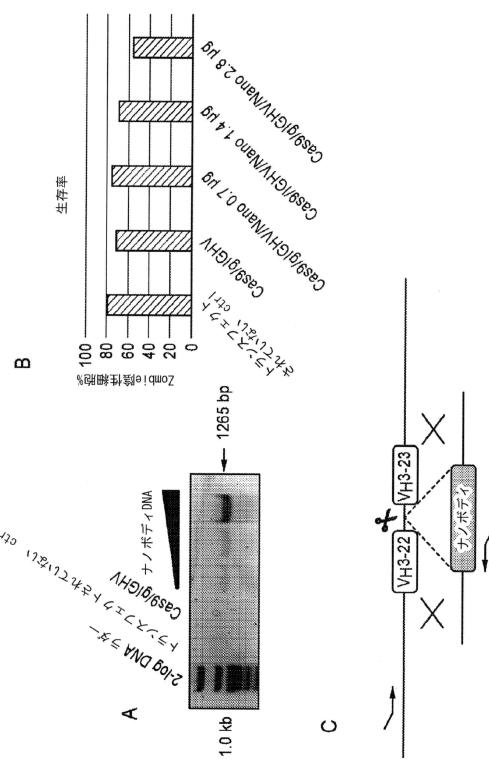
【図29】



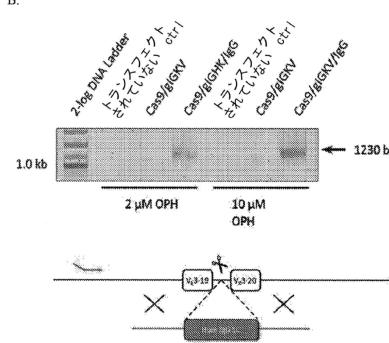
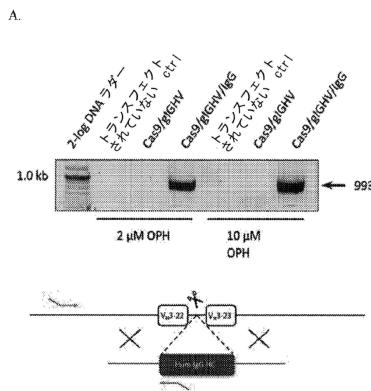
【図30】



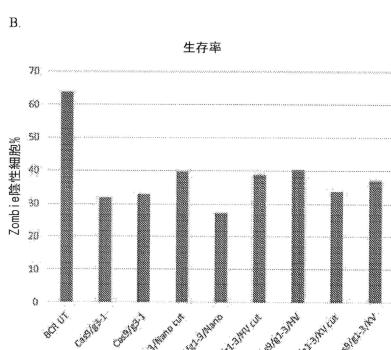
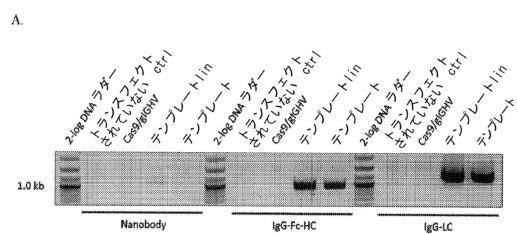
【図31】



【図32】



【図33】



10

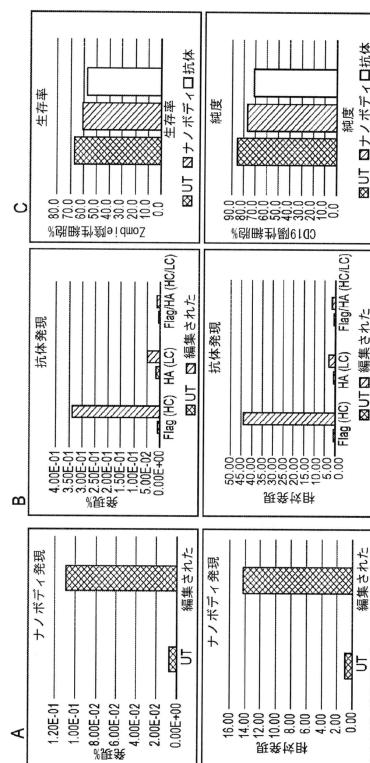
20

30

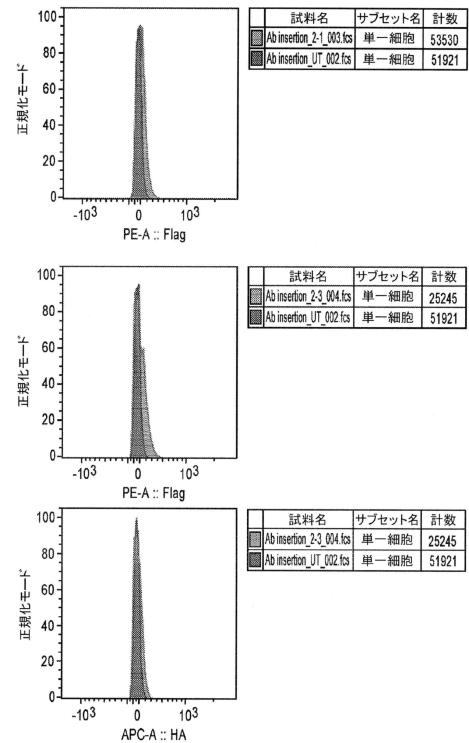
40

50

【図 3 4】



【図 3 5】



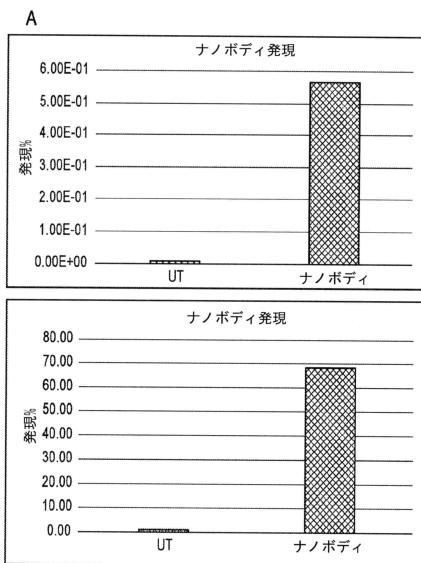
10

20

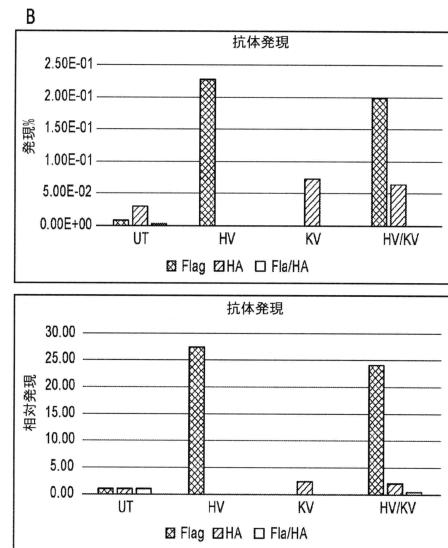
30

40

【図 3 6 A】

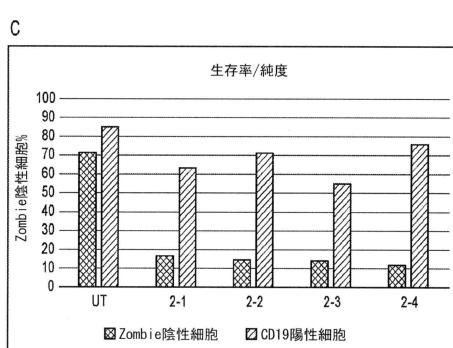


【図 3 6 B】

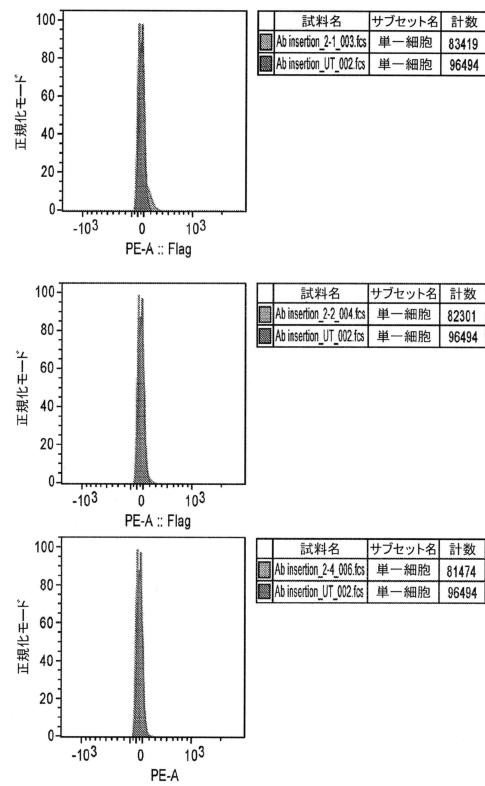


50

【図 3 6 C】



【図 3 7 - 1】



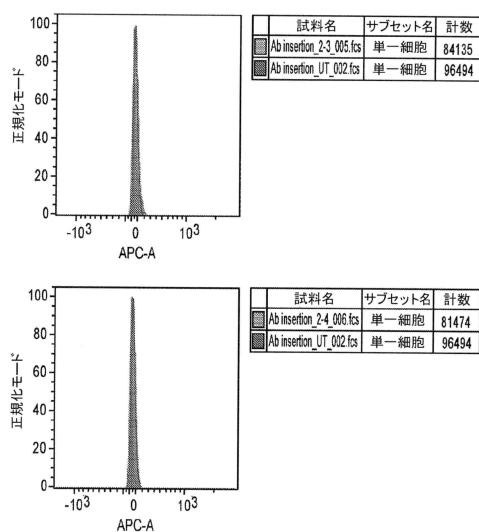
10

20

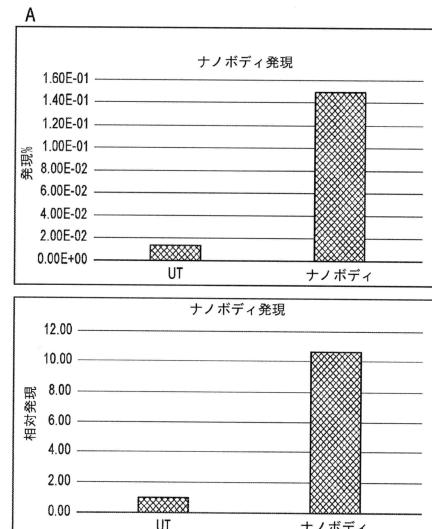
30

40

【図 3 7 - 2】

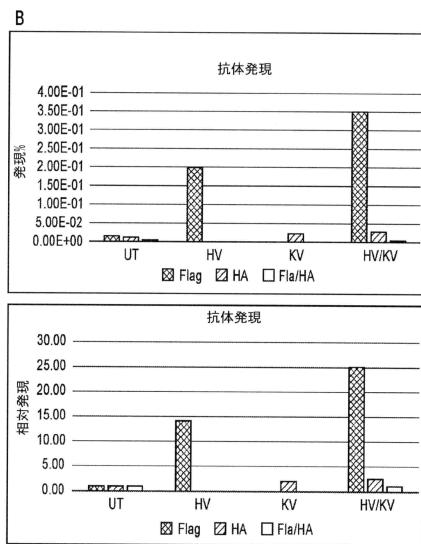


【図 3 8 A】

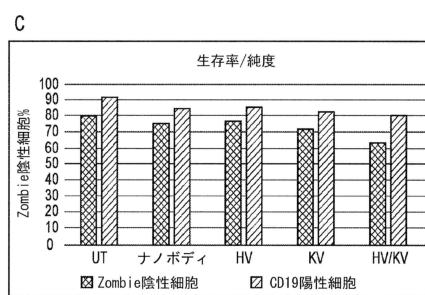


50

【図 3 8 B】

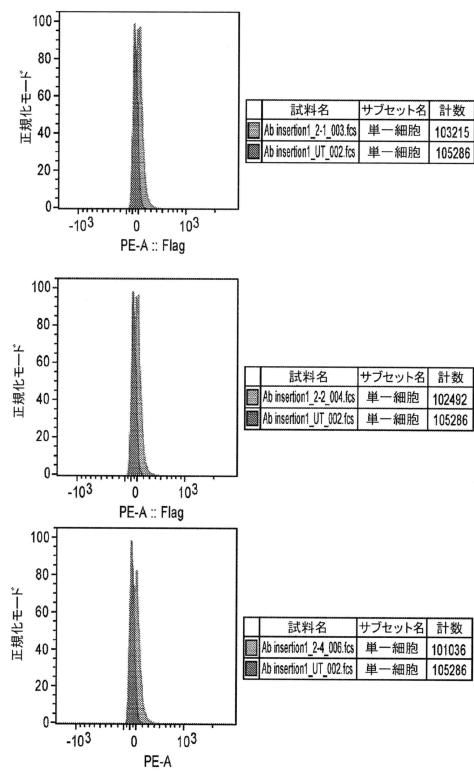


【図 3 8 C】

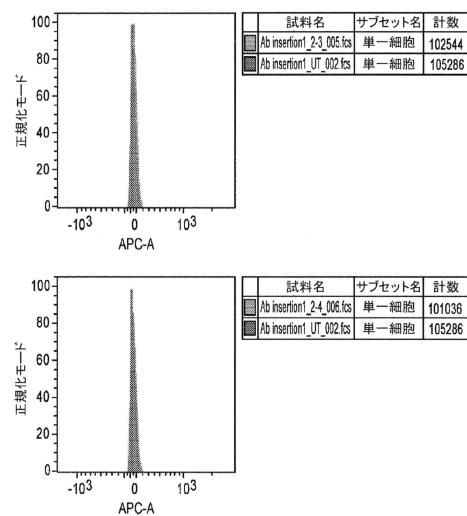


10

【図 3 9 - 1】



【図 3 9 - 2】



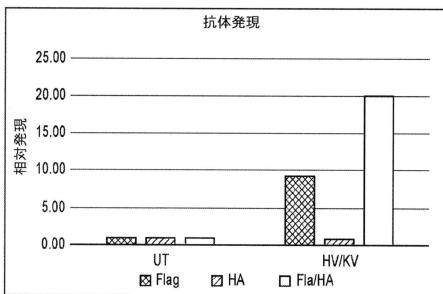
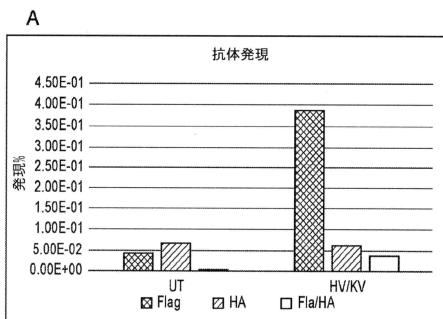
20

30

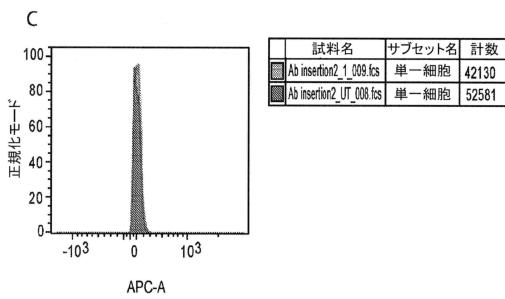
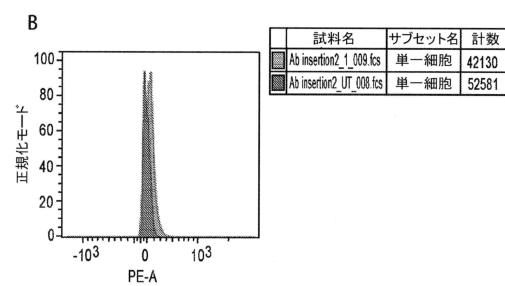
40

50

【図 4 0 - 1】



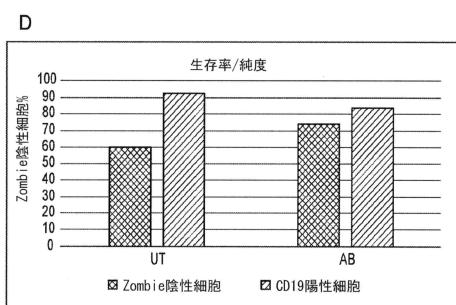
【図 4 0 - 2】



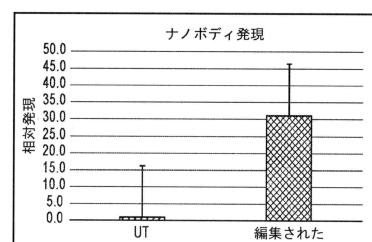
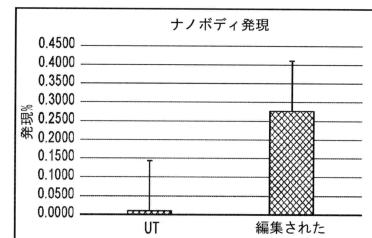
10

20

【図 4 0 - 3】



【図 4 1】

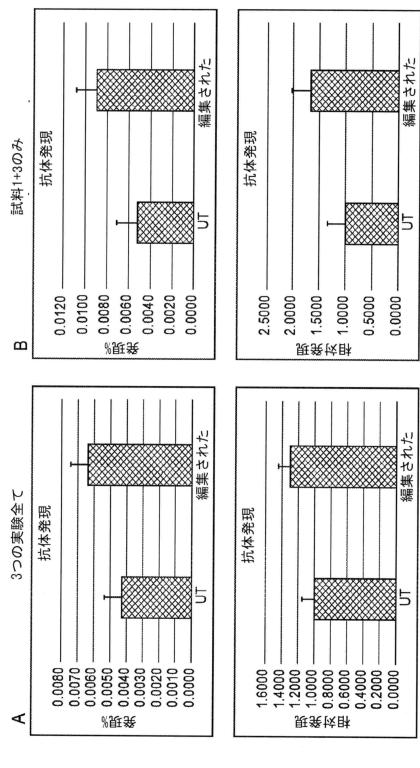


30

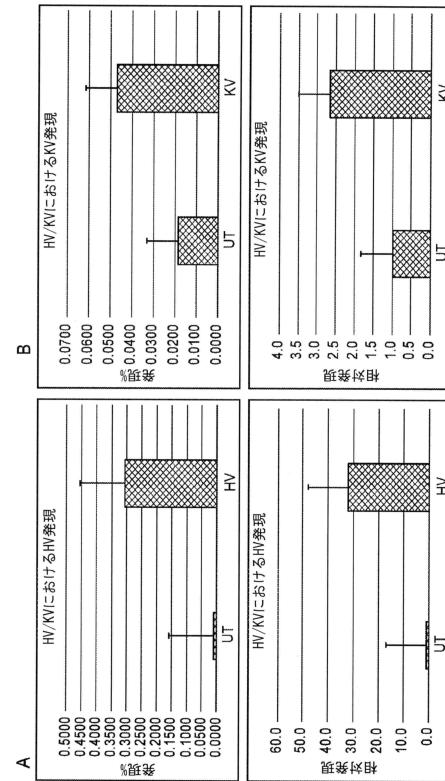
40

50

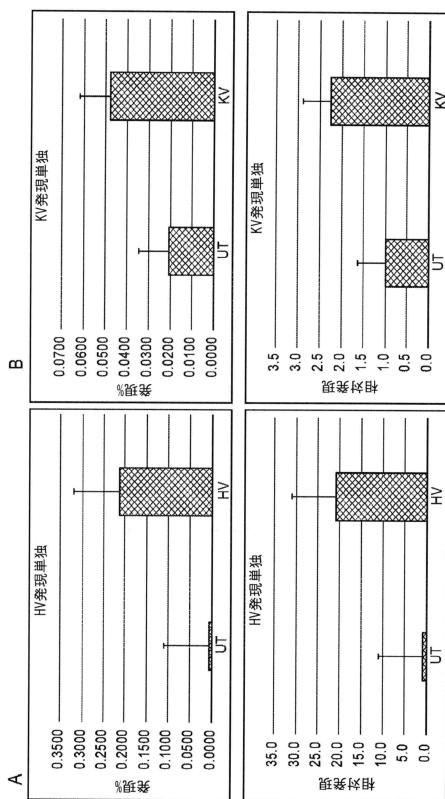
【図 4 2】



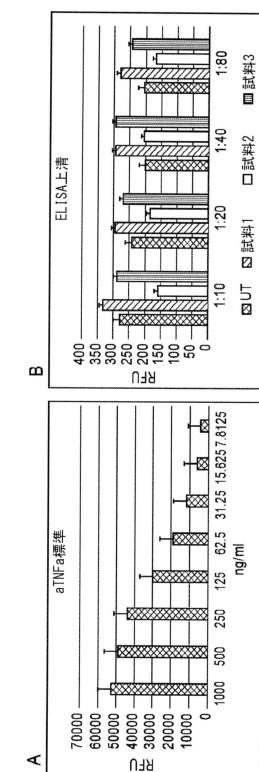
【図 4 3】



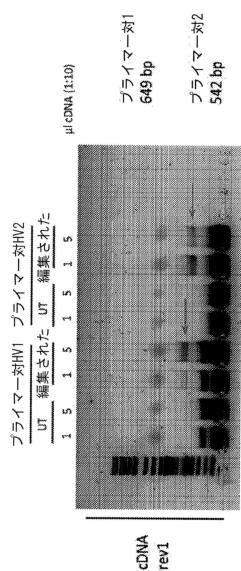
【図 4 4】



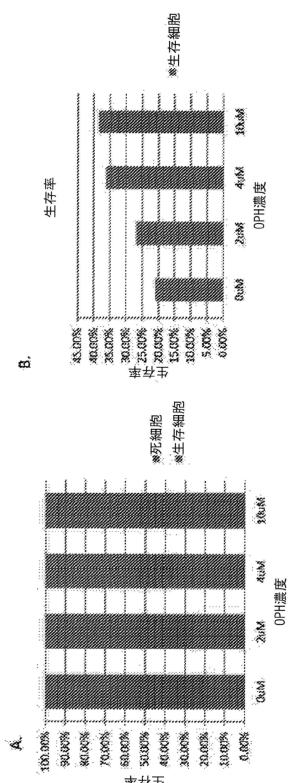
【図 4 5】



【図46】



【図47】



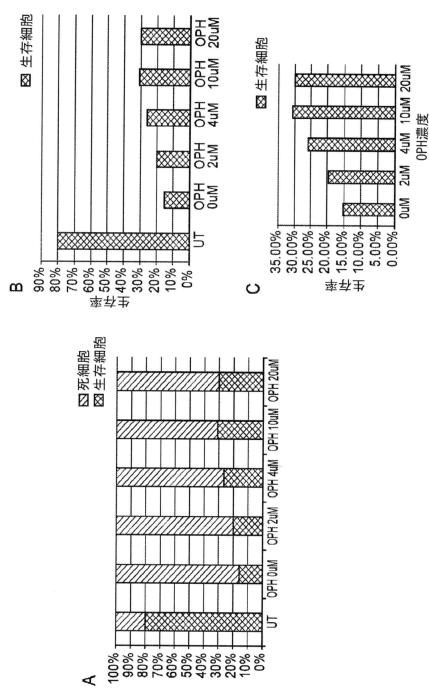
10

20

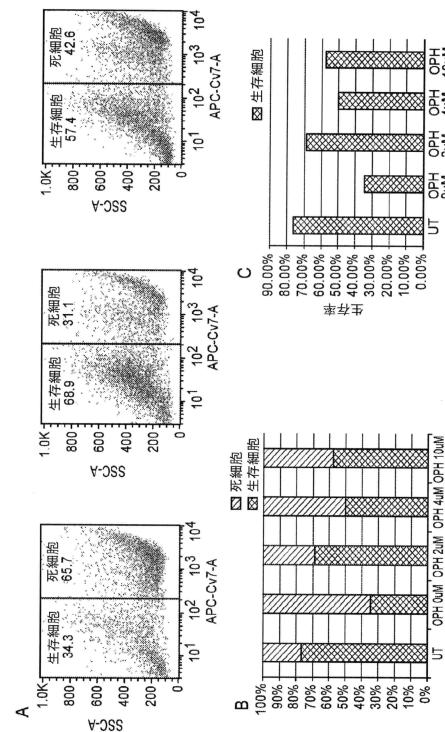
30

40

【図48】

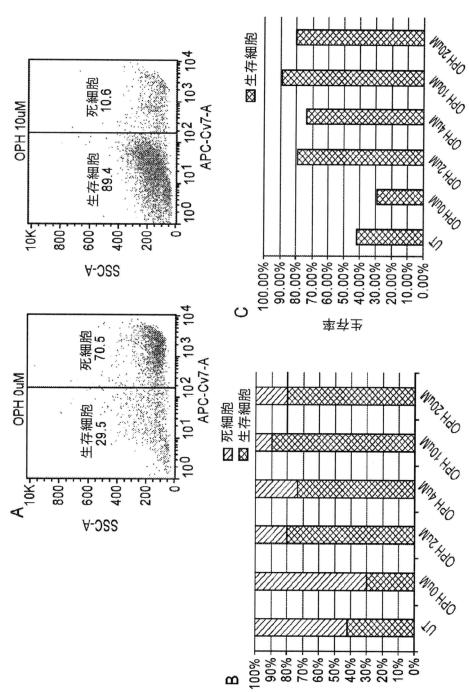


【図49】

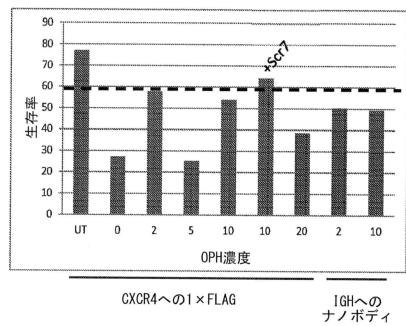


50

【図 5 0】



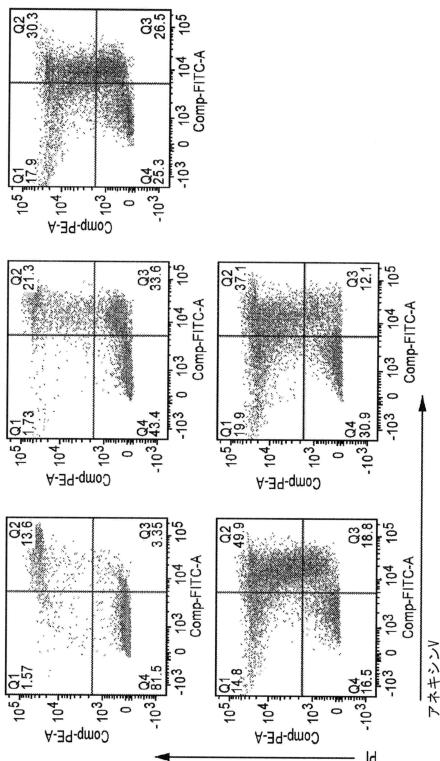
【図 5 1】



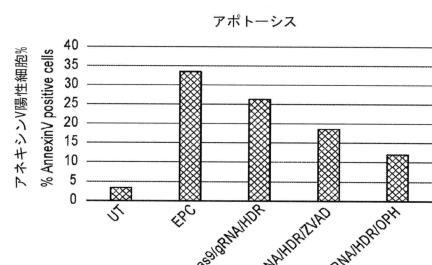
10

20

【図 5 2 - 1】



【図 5 2 - 2】



30

40

50

【配列表】

0007515254000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F	I
A 6 1 P	27/02	(2006.01)
A 6 1 P	31/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/02	(2006.01)
A 6 1 P	37/06	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 1 2 N	15/13	(2006.01)
C 1 2 N	15/19	(2006.01)
A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	37/06	
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/09	1 0 0
C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/19	
C 1 2 N	15/19	

米国(US)

(31)優先権主張番号 15/161,213

(32)優先日 平成28年5月21日(2016.5.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

ストリート・20・ビー712

(72)発明者 ヴェラ・グレイナー

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02446・ブルックライン・オーバーン・ストリート・3  
7

合議体

審判長 福井 悟

審判官 中村 浩

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第2014/152832(WO, A1)

米国特許出願公開第2013/0164277(US, A1)

特表2013-511258(JP, A)

Molecular Therapy, 2015, Vol. 23, No. 11, pp. 17  
34-1747

BLOOD, 2009, Vol. 114, Num. 25, pp. 5173-5174

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N

C12P

MEDLINE / BIOSIS / EMBASE / Caplus (STN)

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)