

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-520648

(P2018-520648A)

(43) 公表日 平成30年8月2日 (2018. 8. 2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 O	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 Z N A	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 106 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-559075 (P2017-559075)	(71) 出願人	515045617
(86) (22) 出願日	平成28年5月12日 (2016. 5. 12)		シアトル チルドレンズ ホスピタル,
(85) 翻訳文提出日	平成30年1月10日 (2018. 1. 10)		ディービーイー シアトル チルドレンズ
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/032153		リサーチ インスティテュート
(87) 国際公開番号	W02016/183345		アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 1
(87) 国際公開日	平成28年11月17日 (2016. 11. 17)		, シアトル, 9 ティーエイチ アベニ
(31) 優先権主張番号	62/161, 104		ュー 1 9 0 0
(32) 優先日	平成27年5月13日 (2015. 5. 13)	(74) 代理人	100077012
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 岩谷 龍
		(72) 発明者	シャーレンバーク, アンドリュー
			アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 7
			7 シアトル, エヌダブリュー ノークロ
			ス ウェイ 1 2 2 2

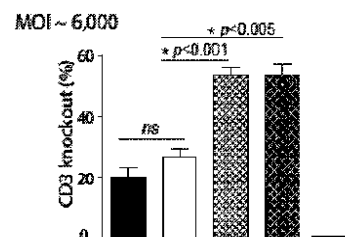
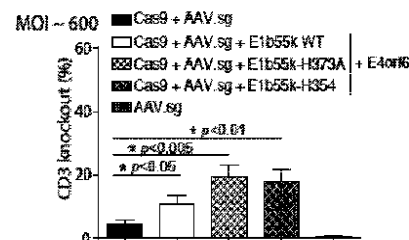
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 初代細胞におけるエンドヌクレアーゼに基づいた遺伝子編集の向上

(57) 【要約】

ヌクレアーゼに基づくゲノム編集のためのシステム、およびゲノム編集のための該システムを使用する方法を開示する。さらに、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を使用して、CRISPR/Cas9に基づくゲノム編集に必要なガイドRNAをヘルパータンパク質の存在下において発現させ、毒性を最小限に抑えつつ、初代ヒト細胞においてCas9を介した遺伝子編集の効率を上昇させる方法を開示する。

FIG. 4B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞中の少なくとも 1 つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、
1 つ以上の CRISPR ガイド RNA をコードする第 1 の核酸配列または複数の核酸配列のセット；

Cas9 タンパク質、または Cas9 タンパク質をコードする第 2 の核酸配列；

第 1 のアデノウイルスタンパク質をコードする第 3 の核酸配列；および

第 2 のアデノウイルスタンパク質をコードする第 4 の核酸配列

を含み、

1 つ以上の CRISPR ガイド RNA が、細胞中の少なくとも 1 つの標的遺伝子に相補的である
こと、および

第 1 の核酸配列または複数の核酸配列のセットが、1 つ以上のベクターに含まれていてもよいが、必ずしも 1 つ以上のベクターに含まれている必要はないこと
を特徴とするシステム。

【請求項 2】

前記細胞が真核細胞である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 3】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 または 2 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 5】

前記細胞が初代細胞である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 6】

前記細胞が形質転換細胞ではない、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 7】

前記細胞が、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 8】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 9】

前記ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項 8 に記載のシステム。

【請求項 10】

前記 AAV ベクターが自己相補型ベクターである、請求項 8 または 9 に記載のシステム。

【請求項 11】

前記 AAV ベクターが一本鎖ベクターである、請求項 8 または 9 に記載のシステム。

【請求項 12】

前記 AAV ベクターが、自己相補型ベクターと一本鎖ベクターの組み合わせである、請求項 8 または 9 に記載のシステム。

【請求項 13】

Cas9 タンパク質をコードする第 2 の核酸が mRNA である、請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 14】

Cas9 タンパク質をコードする第 2 の核酸配列が、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項 1 ～ 13 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 15】

Cas9 タンパク質が化膿レンサ球菌 (S. pyogenes) に由来するものである、請求項 1 ～ 14 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 16】

第 1 のアデノウイルスタンパク質をコードする第 3 の核酸が mRNA である、請求項 1 ～ 1

10

20

30

40

50

5 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 17】

第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸が、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項1～16のいずれかに記載のシステム。

【請求項 18】

第1のアデノウイルスタンパク質が血清型5型のAAVに由来するものである、請求項1～17のいずれかに記載のシステム。

【請求項 19】

第1のアデノウイルスタンパク質が野生型のE4ORF6である、請求項1～18のいずれかに記載のシステム。

【請求項 20】

野生型のE4ORF6の配列が配列番号3で示される配列である、請求項19に記載のシステム。

【請求項 21】

第1のアデノウイルスタンパク質が変異型のE4ORF6である、請求項1～18のいずれかに記載のシステム。

【請求項 22】

変異型のE4ORF6タンパク質がAXA変異体である、請求項1～17および21のいずれかに記載のシステム。

【請求項 23】

AXA変異体の配列が配列番号23で示される配列である、請求項22に記載のシステム。

【請求項 24】

第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸がmRNAである、請求項1～15のいずれかに記載のシステム。

【請求項 25】

第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸が、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項1～15および24のいずれかに記載のシステム。

【請求項 26】

第2のアデノウイルスタンパク質が血清型5型のAAVに由来するものである、請求項1～15および25のいずれかに記載のシステム。

【請求項 27】

第2のアデノウイルスタンパク質が野生型のE1B55Kである、請求項1～15および26のいずれかに記載のシステム。

【請求項 28】

野生型のE1B55Kの配列が配列番号1で示される配列である、請求項27に記載のシステム。

【請求項 29】

第2のアデノウイルスタンパク質が変異型のE1B55Kである、請求項1～15および26のいずれかに記載のシステム。

【請求項 30】

変異型のE1B55KがH373A変異体である、請求項29に記載のシステム。

【請求項 31】

H373A変異体の配列が配列番号2で示される配列である、請求項30に記載のシステム。

【請求項 32】

変異型のE1B55KがH354変異体である、請求項29に記載のシステム。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

H354変異体の配列が配列番号 4 で示される配列である、請求項 3 2 に記載のシステム。

【請求項 3 4】

変異型のE1B55KがR240A変異体である、請求項 2 9 に記載のシステム。

【請求項 3 5】

R240A変異体の配列が配列番号 2 2 で示される配列である、請求項 3 4 に記載のシステム。

【請求項 3 6】

第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列、第 3 の核酸配列および第 4 の核酸配列が、ヒト細胞などの真核細胞において作動可能な調節エレメントに作動可能に連結されている、請求項 1 ~ 3 5 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 3 7】

1 つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする第 1 の核酸配列が、調節エレメントに作動可能に連結されている、請求項 1 ~ 3 6 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 3 8】

1 つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする第 1 の核酸配列が、U6プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 ~ 3 7 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 3 9】

第 1 の核酸配列が 2 つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする場合、各ガイドRNAがそれぞれの調節エレメントに作動可能に連結されている、請求項 1 ~ 3 8 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 4 0】

CRISPRガイドRNAをコードする第 1 の核酸配列が構成的に発現される、請求項 1 ~ 3 9 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 4 1】

CRISPRガイドRNAをコードする第 1 の核酸配列が一過性に発現される、請求項 1 ~ 3 9 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 4 2】

TCR 遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列が、配列番号 5、配列番号 1 5、配列番号 1 6 および配列番号 1 7 で示される配列である、請求項 1 ~ 4 1 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 4 3】

PD1遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列が配列番号 1 8 で示される配列であり、TLGIT遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列が配列番号 1 9 で示される配列であり、Lag3遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列が配列番号 2 0 で示される配列であり、Tim3遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列が配列番号 2 1 で示される配列である、請求項 1 ~ 4 2 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 4 4】

遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、またはこれらの両方に使用することができる、請求項 1 ~ 4 3 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 4 5】

第 1 の核酸配列または複数の核酸配列のセットと、Cas9タンパク質、またはCas9タンパク質をコードする第 2 の核酸配列との代わりに、第 5 の核酸配列と第 6 の核酸配列とを使用し、第 5 の核酸配列がTALENヌクレアーゼのleftコンポーネントをコードするmRNAを含み、第 6 の核酸配列がTALENヌクレアーゼのrightコンポーネントをコードするmRNAを含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4 6】

細胞中の少なくとも 1 つの標的遺伝子を編集する方法であって、

細胞中の少なくとも 1 つの標的遺伝子に相補的である 1 つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする第 1 の核酸配列または複数の核酸配列のセットを細胞に導入すること；

Cas9タンパク質、またはCas9タンパク質をコードする第 2 の核酸配列を前記細胞に導入

10

20

30

40

50

すること；

第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列を前記細胞に導入すること；および

第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を前記細胞に導入すること

を含む方法。

【請求項47】

前記細胞が真核細胞である、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項46または47に記載の方法。

10

【請求項49】

前記細胞がヒト細胞である、請求項46～48のいずれかに記載の方法。

【請求項50】

前記細胞が初代細胞である、請求項46～49のいずれかに記載の方法。

【請求項51】

前記細胞が形質転換細胞ではない、請求項46～50のいずれかに記載の方法。

【請求項52】

前記細胞が、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である、請求項46～51のいずれかに記載の方法。

20

【請求項53】

1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列または複数の核酸配列のセットが、1つ以上のベクターに含まれていてもよいが、必ずしも1つ以上のベクターに含まれている必要はないことを特徴とする、請求項46～52のいずれかに記載の方法。

【請求項54】

前記ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

前記AAVベクターが自己相補型ベクターである、請求項53または54に記載の方法。

【請求項56】

前記AAVベクターが一本鎖ベクターである、請求項53または54に記載の方法。

30

【請求項57】

前記AAVベクターが、自己相補型ベクターと一本鎖ベクターの組み合わせである、請求項53または54に記載の方法。

【請求項58】

第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列がmRNAである、請求項46～57のいずれかに記載の方法。

【請求項59】

前記mRNAが、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項46～58のいずれかに記載の方法。

【請求項60】

Cas9タンパク質が化膿レンサ球菌(*S. pyogenes*)に由来するものである、請求項46～59のいずれかに記載の方法。

40

【請求項61】

第1のアデノウイルスタンパク質が血清型5型のAAVに由来するものである、請求項46～60のいずれかに記載の方法。

【請求項62】

第1のアデノウイルスタンパク質が野生型のE4ORF6である、請求項46～61のいずれかに記載の方法。

【請求項63】

野生型のE4ORF6の配列が配列番号3で示される配列である、請求項62に記載の方法。

50

【請求項 6 4】

第 1 のアデノウイルスタンパク質が変異型の E4ORF6 である、請求項 4 6 ~ 6 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 5】

変異型の E4ORF6 タンパク質が AXA 変異体である、請求項 4 6 ~ 6 1 および 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

AXA 変異体の配列が配列番号 2 3 で示される配列である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

第 2 のアデノウイルスタンパク質が血清型 5 型の AAV に由来するものである、請求項 4 6 ~ 6 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 8】

第 2 のアデノウイルスタンパク質が野生型の E1B55K である、請求項 4 6 ~ 6 0 および 6 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 9】

野生型の E1B55K の配列が配列番号 1 で示される配列である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

第 2 のアデノウイルスタンパク質が変異型の E1B55K である、請求項 4 6 ~ 7 0 および 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

変異型の E1B55K が H373A 変異体である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

H373A 変異体の配列が配列番号 2 で示される配列である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

変異型の E1B55K が H354 変異体である、請求項 4 6 ~ 7 0 および 6 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 4】

H354 変異体の配列が配列番号 4 で示される配列である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

変異型の E1B55K が R240A 変異体である、請求項 4 6 ~ 7 0 および 6 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 6】

R240A 変異体の配列が配列番号 2 2 で示される配列である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

E4ORF6 バリエーションのいずれか 1 つを、E1B55K バリエーションのいずれか 1 つと組み合わせて使用することができる、請求項 4 6 ~ 7 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 8】

同時にノックアウトされる遺伝子の数が 2 ~ 1 0 である、請求項 4 6 ~ 7 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 9】

同時にノックアウトされる遺伝子の数が 2 ~ 5 である、請求項 4 6 ~ 7 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 0】

mRNA の量が 0 . 0 1 μ g ~ 1 μ g である、請求項 4 6 ~ 7 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 1】

変異率が 1 . 5 倍 ~ 9 倍高い、請求項 4 6 ~ 8 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 2】

TCR 遺伝子を標的とする CRISPR ガイド RNA 配列が、配列番号 5、配列番号 1 5、配列番号 1 6 および配列番号 1 7 で示される配列である、請求項 4 6 ~ 8 1 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8 3】

PD1遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列が配列番号 1 8 で示される配列であり、TIGIT遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列が配列番号 1 9 で示される配列であり、Lag3遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列が配列番号 2 0 で示される配列であり、Tim3遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列が配列番号 2 1 で示される配列である、請求項 4 6 ~ 8 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 4】

第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列、第 3 の核酸配列および第 4 の核酸配列が、一過性に細胞に導入される、請求項 4 6 ~ 8 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 5】

第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列、第 3 の核酸配列および第 4 の核酸配列が、恒常的に細胞に導入されない、請求項 4 6 ~ 8 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 6】

第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列、第 3 の核酸配列および第 4 の核酸配列を細胞に導入しても、細胞の形質転換が起こらない、請求項 4 6 ~ 8 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 7】

標的遺伝子が目的の遺伝子である、請求項 1 ~ 4 5 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 8 8】

標的遺伝子が目的の遺伝子である、請求項 4 6 ~ 8 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 9】

第 3 の核酸配列および第 4 の核酸配列がAAVベクターに含まれている、前記請求項のいずれかに記載のシステムまたは方法。

【請求項 9 0】

第 2 の核酸配列を先に細胞に導入し、次いで、第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列および第 3 の核酸配列を含むAAVベクターを前記細胞に導入する、請求項 4 6 ~ 8 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 1】

第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列および第 3 の核酸配列を含むAAVベクターを先に細胞に導入し、次いで第 2 の核酸配列を前記細胞に導入する、請求項 4 6 ~ 8 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 2】

第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列および第 3 の核酸配列を含むAAVベクターと、第 2 の核酸配列とを同時に細胞に共送達および共導入する、請求項 4 6 ~ 8 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 3】

遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、またはこれらの両方に使用することができる、請求項 4 6 ~ 9 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 4】

第 1 の核酸配列または複数の核酸配列のセットと、Cas9タンパク質、またはCas9タンパク質をコードする第 2 の核酸配列との代わりに、第 5 の核酸配列と第 6 の核酸配列とを使用し、第 5 の核酸配列がTALENヌクレアーゼのleftコンポーネントをコードするmRNAを含み、第 6 の核酸配列がTALENヌクレアーゼのrightコンポーネントをコードするmRNAを含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 9 5】

細胞中の少なくとも 1 つの標的遺伝子を編集する方法であって、請求項 1 ~ 4 5 のいずれかに記載のシステムを細胞に導入することを含む方法。

【請求項 9 6】

対象の疾患および / または病態を治療、緩和および / または抑制する方法であって、請求項 1 ~ 4 5 のいずれかに記載のシステムを疾患および / または病態を有する対象に提供することを含む方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権および関連出願の相互参照

本出願は、2015年5月13日に提出された米国仮出願62/161,104の優先権の利益を主張するものであり、この出願は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の参照

本願は電子形式の配列表とともに提出されたものである。この配列表は、SCRI_094WO_SEQLIST.txtのファイル名で2016年5月11日に作成され、2016年5月11日に最終更新された72,184バイトのファイルとして提供されたものである。 10

【0003】

本明細書による開示の態様は、概して、エンドヌクレアーゼに基づく遺伝子編集システムおよび遺伝子編集方法に関連する。本明細書による開示の態様のいくつかは、CRISPR/Cas9遺伝子編集システムに関連する。

【背景技術】

【0004】

エンドヌクレアーゼに基づくシステムは、生物医学研究の重要な遺伝子編集ツールとして急速な発展を遂げ、遺伝子破壊および/または遺伝子ターゲティングを目的とした使用が様々な培養細胞およびモデル生物系において実証されている。 20

【0005】

エンドヌクレアーゼに基づく遺伝子編集システムによって、これまでに例のない精度、効率および柔軟性を持って科学者らの手によりゲノムを編集することが可能となった。エンドヌクレアーゼに基づく遺伝子編集方法としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、TALエフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ(MegaTALなど)およびCRISPR/Cas9を含む(ただしこれらに限定されない)システムがある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本開示は、初代細胞にCRISPR/Cas9を適用する方法をいくつか提供する。該方法では、mRNAを用いてCas9を発現させ、これと同時に、別のmRNAを用いて2種のアデノウイルスタンパク質、すなわちE4ORF6とE1B55KのH373A変異体またはH354変異体とを一過性に発現させる。野生型E4ORF6タンパク質および野生型E1B55Kタンパク質は、細胞に侵入したAAVベクターからの発現不良を低減するが、野生型のE1B55Kタンパク質またはE4ORF6タンパク質を使用した場合、DNA修復に関与する重要なタンパク質複合体(MRN複合体として知られている)が無効化され、その結果、切断されたDNAを修復することができなくなり、細胞周期の停止や高い毒性が誘導される。したがって、これらの野生型タンパク質を使用する代わりに、MRN複合体を無効化することのない変異型のE1B55Kを使用する。E4ORF6および変異型のE1B55Kの組み合わせとCas9とを共発現させることによって、DNA修復能を全く損なうことなく、細胞侵入後のAAVからの発現の制限を十分に緩和することができる。この方法を利用し、かつ、Cas9によるターゲティングに必要なガイドRNAをAAVベクターによって発現させることによって、毒性を最小限に抑え、Cas9を介した遺伝子編集効率を大幅に向上させることができる。 30 40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本明細書で提供されるシステムの実施形態のいくつかは、遺伝子破壊に有用なさらなるツールを提供するためのエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態は、たとえば、エンドヌクレアーゼとCRISPR/Cas9システムとを使用して、標的遺伝子の不活化効率を上昇させるためのシステムおよびその方法に関する。さらなる実施形態は、治療目的、農業目的および/またはその他の商業的に有用な目的のために、本明細書に記載のシステムの 50

1つ以上を使用して標的遺伝子を不活化することに関する。さらなる別の実施形態は、不活化された標的遺伝子を有する自己由来初代細胞および/または非自己由来初代細胞の製造、ならびに治療目的および/またはその他の商業的目的のためのこれらの細胞の使用に関する。

【0008】

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列；Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸配列；第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列；および第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を含み、CRISPRガイドRNAが細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であること、および第1の核酸配列がベクター中に含まれていることを特徴とするシステムが提供される。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は真核細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は哺乳動物細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞はヒト細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は初代細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は形質転換細胞ではない。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。

10

【0009】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ベクターはウイルスベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質をコードする第2の核酸配列は、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントは、化膿レンサ球菌(*S. pyogenes*)に由来するものである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記mRNAは、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質はE4ORF6である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸は、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は変異型のE1B55Kである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列は、ヒト細胞などの真核細胞において作動可能な調節エレメントに連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列は、調節エレメントに作動可能に連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする前記核酸配列は、プロモーター(たとえばU6プロモーター)に作動可能に連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列は構成的に発現される。

20

30

40

【0010】

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法であって、前記細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であるCRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列を含む第1のベクターを細胞に導入すること；Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸配列を前記細胞に導入すること；第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列を前記細胞に導入すること；および第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を前記細胞

50

に導入することを含む方法が提供される。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は真核細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は哺乳動物細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞はヒト細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は初代細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は形質転換細胞ではない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。

【0011】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列を含む第1のベクターは、ウイルスベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列はmRNAである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記mRNAは、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントは、化膿レンサ球菌(*S. pyogenes*)に由来するものである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質はE4ORF6である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は変異型のE1B55Kである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAは目的の標的遺伝子に相補的である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAは目的の標的遺伝子に相補的である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列は、一過性に前記細胞に導入される。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列は、恒常的に前記細胞に導入されない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列を前記細胞に導入しても、細胞の形質転換は起こらない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、標的遺伝子は目的の遺伝子として選択または特定されたものである。前記方法および/または前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2の核酸配列、第3の核酸配列または第4の核酸配列はベクターに組み込んで提供される。いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法は、本明細書に記載のシステムの実施形態のいずれかを細胞に導入することによって実施される。

【0012】

いくつかの実施形態において、対象の疾患および/または病態を治療、緩和または抑制する方法は、疾患および/または病態を有する対象に、本明細書に記載のシステムの実施形態のいずれかを提供することによって実施される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】TCR座位を標的とするために使用したmRNAおよびAAVベクター構築物の模式図を示す。

【0014】

【図1B】遺伝子編集により誘導されたTCR座位における挿入と欠失(indel)をT7アッセイで検出した結果を示す。

【0015】

【図1C】トランスフェクションの24時間後の発現に対する様々な用量のCas9-T2A-mCherry mRNAの効果を示す。

【0016】

【図1D】TCRノックアウトに対してAAVの用量を増加させたときの効果を示す。

【0017】

【図1E】T細胞においてガイドを発現させるためのAAVとして一本鎖(ss)AAVを用いてTCRをノックアウトした場合と自己相補型(sc)AAVを用いてTCRをノックアウトした場

10

20

30

40

50

合の比較に関するフローサイトメトリーのデータを示す。

【0018】

【図2A】細胞に侵入したAAVからの遺伝子発現の制限の緩和に関するデータを示す。

【0019】

【図2B】AAV6を介した遺伝子発現に対するE4ORF6タンパク質とE1B55Kタンパク質の併用の効果を、自己相補型AAV6を使用した場合と一本鎖AAV6を使用した場合とで比較したデータを示す。

【0020】

【図2C】MRNの不活性化に関するデータと、細胞に侵入したAAVからの発現の制限がMRN不活性化の効果によって緩和されることを示したデータを示す。

10

【0021】

【図3A】AAVにより誘導されるGFP発現に対するE4ORF6と変異型E1B55Kの併用の効果を示す。

【0022】

【図3B】AAVによる形質導入に対するE4ORF6とE1B55K-H373の共発現の効果を示す。

【0023】

【図3C】AAVによる形質導入に対する効果を、変異型E1B55Kと変異型E4ORF6とで比較した結果を示す。

【0024】

【図3D】AAVにより誘導されるGFP発現に対する効果を、変異型E1B55Kと変異型E4ORF6とで比較した結果を示す。

20

【0025】

【図4A - 4C】アデノウイルスのE4ORF6タンパク質とE1B55Kタンパク質とを併用して実施した、CRISPRを介した初代ヒトT細胞の遺伝子ノックアウトに関連するデータを示す。

【0026】

【図5A - 5C】indelスペクトラムに対するE4ORF6とE1B55K MRN不活性化能欠損変異体の併用の効果に関連するデータを示す。

【0027】

【図6】AAVによる非相同挿入に対するE4ORF6タンパク質とE1B55Kタンパク質の併用の効果を示す。

30

【0028】

【図7A - 7B】mRNA/AAVの送達を利用してCRISPR/Cas9を介したゲノム編集を行うことによって、複数のゲノム部位においてノックアウトが達成されることに関連するデータを示す。

【0029】

【図8A - 8D】E4ORF6とE1B55K H373Aとを共発現させた初代ヒトT細胞にCas9 mRNA/AAVガイドを送達することによって、CRISPRを介したダブルノックアウトを実施した結果に関連するデータを示す。

【0030】

【図9】E4ORF6とE1B55K H373Aとを共発現させた初代ヒトT細胞にCas9 mRNA/AAVガイドを送達することによって、CRISPRを介した3つ以上の遺伝子のノックアウトを実施した結果に関連するデータを示す。

40

【0031】

【図10A - 10C】変異型E1B55K (E4ORF6とE1B55K) を使用したことによって、CRISPRを介した標的ノックインの効率が向上したことに関連するデータを示す。

【0032】

【図11】CRISPR-Cas9を介したCCR5座位への遺伝子ノックインを短い相同アームを使用して実施した相同組換え修復 (HDR) に対するE4ORF6とE1B55K H373Aの共導入またはE4ORF6とE1B55K H354の共導入の効果に関連するデータを示す。

【0033】

50

【図 1 2 A - 1 2 C】CRISPR-Cas9を介したTCR座位への遺伝子ノックインを短い相同アームを使用して実施した相同組換え修復（HDR）に対するE4ORF6とE1B55K H354の共導入の効果に関連するデータを示す。

【0 0 3 4】

【図 1 3 A - 1 3 B】E4ORF6とE1B55K H373Aとを共発現させたゲノム編集初代T細胞において、表面マーカーの表現型とCa²⁺シグナル伝達とを評価した結果に関連するデータを示す。

【0 0 3 5】

【図 1 4 A - 1 4 B】多重CRISPR編集を実施した後の細胞の核型分析に関連するデータを示す。

10

【0 0 3 6】

【図 1 5 A - 1 5 C】E4ORF6とE1B55K H373Aの共導入またはE4ORF6とE1B55K H354の共導入と、CRISPR-Cas9による切断とを用いた相同組換え修復（HDR）の分子レベルでの確認に関連するデータを示す。

【0 0 3 7】

【図 1 6 A】CRISPR/Cas9システムを利用したTCRノックアウトの作製において使用したガイドRNAのポリヌクレオチド配列の一例、すなわち、ガイド1（配列番号15）、ガイド2（配列番号16）、ガイド3（配列番号17）およびガイド4（配列番号5）を示す。

【0 0 3 8】

【図 1 6 B】ガイドRNAとしてガイド1～ガイド4を使用した場合の、ドナー1由来の初代T細胞におけるmRNAからのCas9-mCherryの発現の効率を比較したフローサイトメトリーのデータを示す。

20

【0 0 3 9】

【図 1 6 C】ガイドRNAとしてガイド1～ガイド4を使用した場合の、ドナー1由来の初代T細胞におけるTCRノックアウトの作製効率を比較したフローサイトメトリーのデータを示す。

【0 0 4 0】

【図 1 6 D】Cas9 / ガイド試料を様々な量で使用した場合の、ドナー1由来の初代T細胞におけるCas9-mCherryの発現量を比較したフローサイトメトリーのデータを示す。

【0 0 4 1】

【図 1 6 E】ガイドRNAとしてガイド4を含む試料を様々な量で使用した場合の、ドナー1由来の初代T細胞におけるTCRノックアウトの作製効率を比較したフローサイトメトリーのデータを示す。

30

【0 0 4 2】

【図 1 6 F】ガイドRNAとしてガイド4を含むCas9 / ガイド試料を様々な量で使用した場合の、ドナー2由来の初代T細胞におけるCas9-mCherryの発現量を比較したフローサイトメトリーのデータを示す。

【0 0 4 3】

【図 1 6 G】ガイドRNAとしてガイド4を含む試料を様々な量で使用した場合の、ドナー2由来の初代T細胞におけるTCRノックアウトの作製効率を比較したフローサイトメトリーのデータを示す。

40

【0 0 4 4】

【図 1 6 H】ガイドRNAとしてガイド1～ガイド4を使用した場合の、Jurkat T細胞におけるmRNAからのCas9-mCherryの発現の効率を比較したフローサイトメトリーのデータを示す。

【0 0 4 5】

【図 1 6 I】ガイドRNAとしてガイド1～ガイド4を使用した場合の、Jurkat T細胞におけるTCRノックアウトの作製効率を比較したフローサイトメトリーのデータを示す。

【0 0 4 6】

【図 1 7】アデノウイルスの野生型E1B55Kタンパク質の一例としてのタンパク質配列（配

50

列番号 1) を示す。

【 0 0 4 7 】

【 図 1 8 】 アデノウイルスのE1B55Kの多型の一つであるH373A変異タンパク質の一例としてのタンパク質配列 (配列番号 2) を示す。変異は下線を引いた太字で示す。

【 0 0 4 8 】

【 図 1 9 】 アデノウイルスの野生型E4ORF6タンパク質の一例としてのタンパク質配列 (配列番号 3) を示す。

【 0 0 4 9 】

【 図 2 0 】 アデノウイルスのE1B55K H354変異タンパク質の一例としてのタンパク質配列 (配列番号 4) を示す。変異 / 挿入は下線を引いた太字で示す。

10

【 0 0 5 0 】

【 図 2 1 】 CRISPRガイドRNAとしてガイド 1 (G 1)、ガイド 2 (G 2)、ガイド 3 (G 3) またはガイド 4 (G 4) を使用したTCR ノックアウトの作製に関するフローサイトメトリーのデータを示す。

【 0 0 5 1 】

【 図 2 2 】 化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) に由来するCas9タンパク質のdCas9バリエーションの一例としてのタンパク質配列 (配列番号 6) を示す。

【 0 0 5 2 】

【 図 2 3 】 化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) に由来するCas9-SPバリエーションの一例としてのヌクレオチド配列 (配列番号 7) を示す。

20

【 0 0 5 3 】

【 図 2 4 】 化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) に由来するCas9-SPm4バリエーションの一例としてのヌクレオチド配列 (配列番号 8) を示す。

【 0 0 5 4 】

【 図 2 5 】 ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) に由来するCas9-ST1バリエーションの一例としてのヌクレオチド配列 (配列番号 9) を示す。

【 0 0 5 5 】

【 図 2 6 】 ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) に由来するCas9-ST1m4バリエーションの一例としてのヌクレオチド配列 (配列番号 1 0) を示す。

【 0 0 5 6 】

【 図 2 7 】 髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) に由来するCas9-NMバリエーションの一例としてのヌクレオチド配列 (配列番号 1 1) を示す。

30

【 0 0 5 7 】

【 図 2 8 】 髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) に由来するCas9-NMm4バリエーションの一例としてのヌクレオチド配列 (配列番号 1 2) を示す。

【 0 0 5 8 】

【 図 2 9 】 トレポネーマ・デンティコラ (*Treponema denticola*) に由来するCas9-TDバリエーションの一例としてのヌクレオチド配列 (配列番号 1 3) を示す。

【 0 0 5 9 】

【 図 3 0 】 トレポネーマ・デンティコラ (*Treponema denticola*) に由来するCas9-TDm4バリエーションの一例としてのヌクレオチド配列 (配列番号 1 4) を示す。

40

【 0 0 6 0 】

【 図 3 1 】 PD1ガイドRNAポリヌクレオチド配列 (配列番号 1 8) の一例、TIGITガイドRNAポリヌクレオチド配列 (配列番号 1 9) の一例、Lag3ガイドRNAポリヌクレオチド配列 (配列番号 2 0) の一例およびTim3ガイドRNAポリヌクレオチド配列 (配列番号 2 1) の一例を示す。

【 0 0 6 1 】

【 図 3 2 A 】 CCR5座位における相同組換え修復 (HDR) に対するTALENの効果を示す。

【 0 0 6 2 】

【 図 3 2 B 】 CD40L座位における相同組換え修復 (HDR) に対するTALENの効果を示す。

50

【 0 0 6 3 】

【図 3 3】アデノウイルスのE1B55Kタンパク質のR240A変異体の一例としてのヌクレオチド配列（配列番号 2 2）を示す。

【 0 0 6 4 】

【図 3 4】アデノウイルスのE4ORF6タンパク質のAXA変異体の一例としてのヌクレオチド配列（配列番号 2 3）を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態において、ヌクレアーゼに基づく遺伝子編集システムおよび遺伝子編集方法が提供される。ヌクレアーゼに基づく遺伝子編集アプローチとしては、ZFN、TAL EN、メガヌクレアーゼ（たとえばMegaTAL）、CRISPR/Cas9などのヌクレアーゼを含むシステムが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 6 6 】

本明細書で提供される遺伝子編集システムおよび遺伝子編集方法は、遺伝子破壊および/または遺伝子ターゲティングなどの（ただしこれらに限定されない）、ヌクレアーゼに基づく任意の遺伝子編集アプローチに適用することができる。たとえば、本開示の態様は、CRISPR/Cas9に基づく遺伝子編集に関する。いくつかの実施形態においては、Cas9ヌクレアーゼを介した遺伝子編集の効率を向上させる。

【 0 0 6 7 】

CRISPR/Cas9を遺伝子編集に適用する際の重要な点の 1 つとして、様々な細胞種においてガイドRNAを効率よく発現できるシステムが必要であることが挙げられる。ガイドRNAの発現に重要なシステムは、アデノ随伴ウイルスベクター（AAV）の使用に基づく。AAVベクターは、広範な種類の初代細胞に対して形質導入を行うことができる。

20

【 0 0 6 8 】

しかしながら、様々な種類の細胞において、AAVベクターは細胞に侵入した後に細胞からの制限を受けることから、AAVからの導入遺伝子（ガイドRNAなど）の発現の効率が非常に低くなる。したがって、形質導入におけるAAVベクターの有用性が大幅に損なわれてしまう。これを踏まえ、初代細胞におけるCRISPR/Cas9システムの適用可能性を大幅に向上・拡大させるアプローチが企図される。

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態において、Cas9に基づく方法は、Cas9ターゲティングに必要なガイドRNAをアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）から発現させることによって、毒性を最小限に抑え、遺伝子編集効率を向上させることができる。

30

【 0 0 7 0 】

CRISPR/Cas9およびそれに関連したプログラム可能なエンドヌクレアーゼシステムは、生物医学研究の重要な遺伝子編集ツールとして急速な発展を遂げ、遺伝子破壊および/または遺伝子ターゲティングにおいての使用が様々な培養細胞およびモデル生物系において実証されている。新たな部位を標的とするようにCas9ヌクレアーゼを再プログラムできるという柔軟性は、生物医学研究におけるゲノム編集にとって大きな利点の 1 つであるが、研究用の遺伝子編集方法を治療目的で初代ヒト細胞の編集にそのまま拡大適用するには、実用に際していくつかの問題がある。

40

【 0 0 7 1 】

実用化に際しての問題のいくつかとしては、所望の遺伝子編集がなされた細胞を特定し、それを濃縮する状況が限られていること；長期間にわたり、かつ/またはインビボにおいてヌクレアーゼを発現させると安全性に問題が出たり、免疫反応を惹起したりするため、一過性（たとえば数日間だけ）のヌクレアーゼの送達が必要であること；ならびに、初代細胞は、細胞質内のDNAの存在を検出し、抗ウイルスシグナルやアポトーシス促進シグナルを発生するという強固な能力を備えていることから、ヌクレアーゼや組換えテンプレートを送達するためのベクターシステムが制限を受けてしまうことが挙げられる。

【 0 0 7 2 】

50

このように、実用化に際して様々な問題があることから、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）およびメガヌクレアーゼを利用した治療的な遺伝子編集戦略は、ヌクレアーゼを確実に一過性発現させるための送達方法に焦点が当てられており、特に、mRNAのトランスフェクションと、ウイルスベクターを使用した組換えテンプレートの送達とに注力して研究がなされている。これと同じ理由から、近年、mRNAに基づくCRISPRコンポーネントの発現は、Cas9 mRNAまたはCas9タンパク質と、野生型ガイドRNAまたは分解耐性ガイドRNAとをエレクトロポレーションによって送達することによって、遺伝子破壊を目的としたヒト初代細胞に拡大適用されている。

【0073】

RNAまたはタンパク質の送達やRNAに基づくヌクレアーゼの送達による個々の遺伝子の破壊は直接的な方法である。これに対して、遺伝子ターゲティングを利用したCRISPRに基づく遺伝子編集を行うには、Cas9、ガイドRNAおよび組換えテンプレートからなる3つのコンポーネントを効率的に送達することが必要とされる。

【0074】

いくつかの実施形態において、血清型5型のアデノウイルスに由来する2種のタンパク質E4ORF6およびE1B55KのパリアントとCas9とをmRNAのエレクトロポレーションによって発現させることを利用した、エレクトロポレーション/形質導入によるCRISPR/Cas9遺伝子編集のための共送達方法が提供され、この方法によって、AAVによる初代細胞への形質導入効率および遺伝子編集効率を一過性に向上させることができる。

【0075】

いくつかの実施形態において、臨床移行に適した細胞培養/製造プロトコルを用いて、初代ヒトT細胞において効率よく遺伝子破壊および相同組換え遺伝子ターゲティングを行うための、前記方法の使用が提供される。

【0076】

用語の定義

以下の説明において、様々な用語を広い意味で使用する。以下の用語の定義は、本発明の実施形態の理解を容易にするために提供される。

【0077】

本明細書において「1つの（aまたはan）」は、1つまたは1つ以上を意味してもよい。

【0078】

本明細書において「約」は、特定の値が、この値を決定するために用いられた方法に本質的に付随する誤差の変動または実験間での変動を含むことを示す。

【0079】

本明細書において「核酸」または「核酸分子」は、ポリヌクレオチドを指し、たとえば、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により得られたフラグメント、ならびにライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用およびエキソヌクレアーゼ作用のいずれかにより得られたフラグメントなどが挙げられる。核酸分子は、天然のヌクレオチドモノマー（DNA、RNAなど）、または天然のヌクレオチドの類似体（たとえば、天然のヌクレオチドのエナンチオマー）からなるモノマー、またはこれらの組み合わせから構成されていてもよい。修飾ヌクレオチドは、糖部分および/またはピリミジン塩基部分もしくはプリン塩基部分に修飾を有していてもよい。糖部分の修飾としては、たとえば、ハロゲン、アルキル基、アミンおよびアジド基による1つ以上のヒドロキシル基の置換が挙げられ、糖部分はエーテル化またはエステル化されていてもよい。さらに、糖部分全体が、立体構造的に類似の構造や電子的に類似の構造と置換されていてもよく、このような構造として、たとえば、アザ糖および炭素環式糖類似体が挙げられる。修飾塩基部分としては、アルキル化プリン、アルキル化ピリミジン、アシル化プリン、アシル化ピリミジン、またはその他の公知の複素環置換が挙げられる。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合またはこれと似た結合により連結することができる。ホスホジエステル結合と似た結合としては、ホスホロチオエート結合、ホスホ

10

20

30

40

50

ロジチオエート結合、ホスホロセレノエート結合、ホスホロジセレノエート結合、ホスホロアニロチオエート (phosphoroanilothioate) 結合、ホスホロアニリデート (phosphoranilidate) 結合、ホスホロアミデート結合などが挙げられる。「核酸分子」は、いわゆる「ペプチド核酸」も包含し、これは、ポリアミド主鎖に付加された天然の核酸塩基または修飾核酸塩基を含む。核酸は、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。CRISPR/Cas9システムの基本的なコンポーネントは、標的遺伝子、ガイドRNAおよびCas9エンドヌクレアーゼまたはその誘導体もしくはフラグメントを含む。遺伝子編集にCRISPR/Cas9を適用する際の重要な点の1つとして、様々な細胞種にガイドRNAを効率よく送達できるシステムが必要であることが挙げられる。このようなシステムは、たとえば、インビトロで作製されたガイドRNA (インビトロ転写または化学合成により作製されたガイドRNA) を核酸として送達することを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードする核酸は、2' O - メチル塩基などの修飾塩基を組み込むことによってヌクレアーゼ耐性が付与されている。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のCRISPR/Cas9システムは、Cas9ヌクレアーゼまたはその誘導体もしくは機能性フラグメントをコードするポリヌクレオチド (たとえば、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13または配列番号14) に所望の長さのポリ (T) テールまたはポリ (A) テールが付加されており、このポリヌクレオチドは本明細書に記載の教示に従って調製される。本明細書に記載のCRISPR/Cas9システムには、たとえば、1つ以上の修飾塩基 (たとえば本明細書に記載の修飾塩基のいずれか1つ以上) を含むガイドRNAが含まれる。

10

20

【0080】

本明細書に記載の実施形態において有用な典型的なガイドRNAは、本明細書に記載の1つ以上の修飾塩基を含んでいてもよく、これらのガイドRNAを配列番号5、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20および配列番号21に示す。さらに、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを使用することによって、広範囲な初代細胞において形質導入を行うことができるため、ガイドRNAを発現させるための、本願において重要なシステムではAAVベクターを使用している。AAVベクターは感染症を引き起こすことがなく、また、ゲノムに組み込まれないことが知られている。したがって、AAVベクターは、安全かつ効果的に使用できるという利点がある。

【0081】

「相補的である」とは、相補的配列が、参照としてのポリヌクレオチド配列の全体またはその1つ以上の部分と相同であることを指す。たとえば、ヌクレオチド配列「CAT TAG」は、参照配列「CAT TAG」と対応し、参照配列「GTAATC」と相補的である。

30

【0082】

「プロモーター」は、構造遺伝子の転写を誘導するヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態において、プロモーターは遺伝子の5'末端の非コード領域に位置し、構造遺伝子の転写開始点の近傍にある。転写開始において機能するプロモーター配列の要素は、コンセンサスヌクレオチド配列により特徴付けられることが多い。プロモーター配列の要素としては、RNAポリメラーゼ結合部位、TATA配列、CAAT配列、分化特異的要素 (DSE; McGehee et al., Mol. Endocrinol. 7:551 (1993); この文献は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)、環状AMP応答要素 (CRE)、血清応答要素 (SRE; Treisman, Seminars in Cancer Biol. 1:47 (1990); この文献は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)、グルココルチコイド応答要素 (GRE)、および他の転写因子に対する結合部位が挙げられ、該転写因子としては、たとえば、CRE/ATF (O'Reilly et al., J. Biol. Chem. 267:19938 (1992))、AP2 (Ye et al., J. Biol. Chem. 269:25728 (1994))、SP1、cAMP応答要素結合タンパク質 (CREB; Loeken, Gene Expr. 3:253 (1993)) および8量体因子 (概要は、Watson et al., eds., Molecular Biology of the Gene, 4th ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987) およびLemaigre and Rousseau, Biochem. J. 303:1 (1994) (これらの文献はいずれも引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)) を参照されたい) が挙げられる。

40

50

本明細書において、プロモーターは、構成的に活性であってもよく、抑制可能であってもよく、誘導可能であってもよい。プロモーターが誘導可能なプロモーターである場合、転写率は誘導剤に応答して上昇する。これに対して、プロモーターが構成的プロモーターである場合、転写率は誘導剤による調節を受けない。また、抑制可能なプロモーターも公知である。いくつかの実施形態において、調節エレメントは非翻訳領域であってもよい。いくつかの実施形態において、非翻訳領域は5'非翻訳領域である。いくつかの実施形態において、非翻訳領域は3'非翻訳領域である。いくつかの実施形態において、5'非翻訳領域または3'非翻訳領域が使用される。いくつかの実施形態において、5'非翻訳領域と3'非翻訳領域の両方が使用される。当業者であれば、本発明の実施形態における「非翻訳領域」の意味を容易に理解できるであろう。

10

【0083】

「調節エレメント」は、コアプロモーターの活性を調節するヌクレオチド配列である。たとえば、調節エレメントは、特定の細胞、組織または細胞小器官において特異的または選択的に転写可能な細胞因子と結合するヌクレオチド配列を含んでいてもよい。このような調節エレメントは、通常、「細胞特異的」、「組織特異的」または「細胞小器官特異的」に発現される遺伝子と関連している。いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列；Cas9タンパク質をコードする第2の核酸配列；第1のアデノウイルススタンパク質をコードする第3の核酸配列；および第2のアデノウイルススタンパク質をコードする第4の核酸配列を含み、CRISPRガイドRNAが、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であること、および第1の核酸配列がベクター中に含まれていることを特徴とするシステムが提供される。いくつかの実施形態において、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列は、ヒト細胞などの真核細胞において作動可能な調節エレメントに連結されている。

20

【0084】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合により連結されたアミノ酸残基のポリマーであり、天然由来のものと、合成されたものとを含む。約10アミノ酸残基未満のポリペプチドは、一般に「ペプチド」と呼ばれる。ポリペプチドはタンパク質と見なすこともできる。

【0085】

「タンパク質」は、1つ以上のポリペプチド鎖を含む巨大分子である。タンパク質は、糖鎖などの非ペプチド成分をさらに含んでいてもよい。タンパク質への糖鎖やその他の非ペプチド性置換基の付加は、該タンパク質を産生する細胞によってなされてもよく、このような非ペプチド性置換基の付加は細胞種によって様々に異なる。本明細書において、タンパク質は、そのアミノ酸主鎖の構造で定義され、糖鎖などの置換基については規定されないが、このような置換基がタンパク質中に含まれていてもよい。いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列；Cas9タンパク質をコードする第2の核酸配列；第1のアデノウイルススタンパク質をコードする第3の核酸配列；および第2のアデノウイルススタンパク質をコードする第4の核酸配列を含み、CRISPRガイドRNAが、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であること、および第1の核酸配列がベクター中に含まれていることを特徴とするシステムが提供される。

30

40

【0086】

本明細書において「一過性トランスフェクション」は、宿主細胞のゲノムに外来核酸が通常組み込まれない方法を利用して、宿主細胞に1つまたは複数の外来核酸を導入することを指す。いくつかの実施形態において、前記核酸はRNAである。いくつかの実施形態において、前記核酸はDNAである。いくつかの実施形態において、前記核酸がRNAである場合、該RNAは、一過性トランスフェクションの対象となる細胞のゲノムに通常組み込まれることはない。いくつかの実施形態において、前記核酸がDNAである場合、該DNAは、一過性トランスフェクションの対象となる細胞のゲノムに組み込まれる場合もある。

【0087】

50

「宿主細胞」は、本発明の実施形態によるCas9 mRNA / AAVガイドRNAが導入される細胞、および本明細書に記載のシステムが提供される細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞であってもよく、真核細胞であってもよい。宿主細胞として使用される原核細胞としては、大腸菌、窒素固定細菌、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス・アルバス (*Staphylococcus albus*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、バチルス・チューリゲンシス (*Bacillus thuringiensis*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、マイコプラズマ、およびシアノバクテリアが挙げられるが、これらに限定されない。宿主細胞として使用される真核細胞としては、原生動物細胞、真菌細胞、藻類細胞、植物細胞、昆虫細胞、両生類細胞、鳥類細胞および哺乳動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、前記細胞が真核細胞であることを特徴とするシステムが提供される。いくつかの実施形態において、前記細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は形質転換細胞ではない。いくつかの実施形態において、前記細胞は初代リンパ球である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。

10

20

【0088】

「遺伝子発現」は遺伝子産物の生合成を指す。たとえば、構造遺伝子の場合、遺伝子発現は、構造遺伝子のmRNAへの転写と、mRNAからの1つ以上のポリペプチドの翻訳を伴う。

【0089】

「エンドヌクレアーゼ」は、ポリヌクレオチド鎖内部のホスホジエステル結合を切断する酵素を指す。ポリヌクレオチドは、二本鎖DNA (dsDNA)、一本鎖DNA (ssDNA)、RNA、DNAとRNAの二本鎖ハイブリッド、合成DNA (たとえば、A、C、G、T以外の塩基を含むもの) のいずれであってもよい。エンドヌクレアーゼは、対称的な位置でポリヌクレオチドを切断して「平滑」末端を生じるものや、少しずれた位置でポリヌクレオチドを切断して突出部位を生じるものがあり、この突出部位は「粘着末端」とも呼ばれる。本明細書に記載の方法および組成物は、エンドヌクレアーゼにより生じた切断部位に使用することができる。本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかにおいて、該システムは、エンドヌクレアーゼ (Cas9、TALEN、MegaTALなど) をコードする核酸、またはエンドヌクレアーゼドメイン (Cas9、TALEN、MegaTAL、それらの1つ以上の部分など) を含む融合タンパク質をさらに提供することができる。本発明はこれらの例示に限定されず、その他のエンドヌクレアーゼ、その他のエンドヌクレアーゼを含むシステムおよび方法の他の実施形態、これらの典型的な実施形態の変更および改良も、過度な実験を行うことなく実施することができる。このような変更および改良はいずれも本発明の教示の範囲に含まれる。

30

【0090】

「TALエフェクターヌクレアーゼ (TALEN)」は、ヌクレアーゼドメインと融合されたTALEエフェクタードメインを含むヌクレアーゼを指す。植物病原菌であるキサントモナス (*Xanthomonas*) 属から単離されたTALエフェクターのDNA結合ドメインが報告されている (Boch et al., (2009) Science 29 Oct. 2009 (10.1126/science.117881) および Moscou and Bogdanove, (2009) Science 29 Oct. 2009 (10.1126/science.1178817) を参照されたい; これらの文献はいずれも引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。これらのDNA結合ドメインは、遺伝子操作によって、所望の標的に結合させたり、あるいは、ヌクレアーゼドメイン (たとえばFokIヌクレアーゼドメインなど) と融合させてTALエフェクタードメイン-ヌクレアーゼ融合タンパク質を得ることができる。本明細書に記載の方法およびシステムは、TALエフェクターヌクレアーゼにより生成された切断部位に使用することができる。本明細書で提供されるシステムの実施形態のいくつかにおいて、該システムは

40

50

、TALENヌクレアーゼ、またはTALENヌクレアーゼをコードするベクターもしくは核酸をさらに含んでいてもよい。本明細書で提供される方法の実施形態のいくつかにおいて、該方法は、TALENヌクレアーゼなどのヌクレアーゼを提供することをさらに含んでいてもよい。

【0091】

MegaTALは、DNAを標的とする2種の酵素を組み合わせることで誘導されたものである。メガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼとも呼ばれる）は、DNA認識能とヌクレアーゼ機能を同一ドメインに併せ持つという利点を有する単鎖ペプチドである。本明細書で提供されるシステムの実施形態のいくつかにおいて、該システムは、MegaTALヌクレアーゼ、またはMegaTALヌクレアーゼをコードするベクターもしくは核酸をさらに含んでいてもよい。本明細書で提供される方法の実施形態のいくつかにおいて、該方法は、MegaTALヌクレアーゼ、またはMegaTALヌクレアーゼをコードするベクターもしくは核酸を提供することをさらに含んでいてもよい。

10

【0092】

Cas9（CRISPR関連タンパク質9）は、化膿レンサ球菌（*Streptococcus pyogenes*）などのCRISPR（Clustered Regularly Interspersed Palindromic Repeats）獲得免疫系と関連するRNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼ酵素である。化膿レンサ球菌は、Cas9を利用して、侵入してきたバクテリオファージDNAやプラスミドDNAなどの外来性DNAを記憶し、同じ外来性DNAが再侵入してくると、この再侵入してきた外来性DNAを解読して切断する。Cas9による外来性DNAの解読は、外来性DNAを解体して、ガイドRNAに存在する20bpのスペーサー領域と相補的かどうかを確認することによって行われる。DNAの基質がガイドRNAと相補的である場合、Cas9は侵入してきたDNAを切断する。

20

【0093】

CRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）は、短い反復塩基配列を含む原核生物由来DNAセグメントである。過去に遭遇した細菌ウイルスやプラスミドから獲得した「スペーサーDNA」と呼ばれる短いセグメントが各反復配列の後ろに挿入されている。CRISPR/Casシステムは、あらゆる生命において遺伝子編集（特定の遺伝子配列の付加、破壊または変更）や遺伝子調節に使われてきた。Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントと適切なガイドRNAとを細胞に送達することによって、生物のゲノムを所望とする任意の位置で切断することができる。CRISPRを用いて、特定の集団全体のゲノムを改変することが可能なRNA誘導型編集遺伝子を構築することが可能である。いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列；Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸配列；第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列；および第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を含み、CRISPRガイドRNAが、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であること、および第1の核酸配列がベクター中に含まれていることを特徴とするシステムが提供される。本明細書に記載の実施形態において有用な典型的なガイドRNAは、1つ以上の修飾塩基を含んでいてもよく、これらのガイドRNAを配列番号5、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20および/または配列番号21に示す。

30

40

【0094】

いくつかの実施形態において、化学的に修飾されたガイドRNAを使用することが企図される。化学的に修飾されたガイドRNAは、ヒト初代細胞においてCRISPR-Casゲノム編集を実施する際に使用されている（Hendel, A. et al., Nat Biotechnol. 2015 Sep; 33(9):985-9）。ガイドRNAの化学的修飾は、ヌクレアーゼ耐性を付与するものであってもよい。ヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼであってもよく、エキソヌクレアーゼであってもよく、これらの両方であってもよい。化学的修飾のいくつかとしては、2'-フルオロ、2'-O-メチル、ホスホロチオエートジチオール3'-3'末端結合、2'-アミノ-dA、5'-メチル-dC、C-5プロピニル-C、C-5プロピニル-U、モルホリノなどが挙

50

げられるが、これらに限定されない。本発明はこれらの例示に限定されず、その他の化学修飾、これらの典型的な化学修飾の別法および変法も本発明に含まれる。

【0095】

「エキソヌクレアーゼ」は、ポリヌクレオチド鎖の末端からホスホジエステル結合を切断する酵素を指し、この酵素は、加水分解反応を利用して3'末端または5'末端からホスホジエステル結合を切断する。ポリヌクレオチドは、二本鎖DNA(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、RNA、DNAとRNAの二本鎖ハイブリッド、合成DNA(たとえば、A、C、G、T以外の塩基を含むもの)のいずれであってもよい。「5'エキソヌクレアーゼ」は、5'末端からホスホジエステル結合を切断するエキソヌクレアーゼを指す。「3'エキソヌクレアーゼ」は、3'末端からホスホジエステル結合を切断するエキソヌクレアーゼを指す。エキソヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼによって切断されたポリヌクレオチド鎖の末端からホスホジエステル結合を切断してもよく、あるいは、剪断(たとえば、微細針に通過させる操作、加熱、超音波処理、ミニビーズを用いた破碎、噴霧化)、放射線照射、紫外線照射、活性酸素暴露、化学的加水分解、化学療法剤の使用などのその他の化学的方法または物理的方法によって切断されたポリヌクレオチド鎖の末端からホスホジエステル結合を切断してもよい。エキソヌクレアーゼは、平滑末端または粘着末端からホスホジエステル結合を切断してもよい。3'-エキソヌクレアーゼとして、大腸菌エキソヌクレアーゼIおよび大腸菌エキソヌクレアーゼIIIの2種が一般的に使用されており、これらのエキソヌクレアーゼは、一本鎖を3'末端から分解するエキソヌクレアーゼ活性を有する。3'-エキソヌクレアーゼとしては他にも、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ(NDK)類であるNDK1(NM23-H1)、NDK5、NDK7およびNDK8(Yoon J-H, et al., Characterization of the 3' to 5' exonuclease activity found in human nucleoside diphosphate kinase 1 (NDK1) and several of its homologues. (Biochemistry 2005:44(48):15774-15786.) ; WRN(Ahn, B., et al., Regulation of WRN helicase activity in human base excision repair. J. Biol. Chem. 2004, 279:53465-53474); ならびにThree prime repair exonuclease 2(Trex2)(Mazur, D. J., Perrino, F. W., Excision of 3' termini by the Trex1 and TREX2 3' 5' exonucleases. Characterization of the recombinant proteins. J. Biol. Chem. 2001, 276:17022-17029; これらの文献はいずれも引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)が挙げられる。5'-3'エキソヌクレアーゼとして、大腸菌エキソヌクレアーゼVIIおよびT7遺伝子6エキソヌクレアーゼの2種が一般的に使用されており、一本鎖を分解するエキソヌクレアーゼ活性が5%保持されている。エキソヌクレアーゼは、大腸菌などの原核生物に由来するエキソヌクレアーゼであってもよく、あるいは酵母、線虫、マウス、ヒトなどの真核生物に由来するエキソヌクレアーゼであってもよい。本明細書で提供されるシステムの実施形態のいくつかにおいて、該システムは、エキソヌクレアーゼ、またはエキソヌクレアーゼをコードするベクターもしくは核酸をさらに含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、エキソヌクレアーゼはTrex2である。本明細書で提供される方法の実施形態のいくつかにおいて、該方法は、Trex2などのエキソヌクレアーゼ、またはエキソヌクレアーゼをコードするベクターもしくは核酸を提供することをさらに含んでいてもよい。

【0096】

「切断」は、共有結合で形成されたポリヌクレオチドバックボーンの切断を指す。切断は、様々な方法によって開始することができ、たとえば、ホスホジエステル結合を酵素的加水分解または化学的加水分解することによって開始することができるが、切断を開始する方法はこれらに限定されない。一本鎖切断および二本鎖切断の両方が可能であり、二本鎖切断は、別個の2本の一本鎖が切断された結果として生じる。二本鎖DNA、RNAまたはDNA/RNAハイブリッドが切断されると、平滑末端または突出末端が生じうる。

【0097】

「原核」細胞は真のヌクレアーゼを持たない。原核細胞としては、細菌(たとえば、シアノバクテリア、ラクトバチルス・アシドフィルス(Lactobacillus acidophilus)、窒素固定細菌、ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)、ビフィズス菌(Bifidob

acterium)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、炭疽菌 (*Bacillus anthrax*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、スタフィロコッカス・ニューモニエ (*Staphylococcus pneumoniae*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) および大腸菌) ならびに古細菌 (たとえば、クレン古細菌 (*Crenarchaeota*)、ユリ古細菌 (*Euryarchaeota*) およびコル古細菌 (*Korarchaeota*)) が挙げられる。本明細書に記載のCas9タンパク質は、原核細胞に由来するタンパク質である。

【0098】

「真核」細胞としては、藻類細胞、真菌細胞 (酵母など)、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞およびヒト細胞 (T細胞など) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0099】

本明細書において「対象」は、非ヒト霊長類やヒトなどの、動物界に属するあらゆる生物を含む。いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列; Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸配列; 第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列; および第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を含み、CRISPRガイドRNAが、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であること、および第1の核酸配列がベクター中に含まれていることを特徴とするシステムが提供される。いくつかの実施形態において、編集された遺伝子を含む細胞は、この細胞を必要とする対象に送達される。

20

【0100】

メガヌクレアーゼとしても知られているホーミングエンドヌクレアーゼは、その切断部位が大きい (たとえば14bpよりも大きい) ことから、ゲノムDNA中において高い特異性で二本鎖を切断することができる配列特異的エンドヌクレアーゼである。標的部位に対するホーミングエンドヌクレアーゼの特異性により、DNAを正確にターゲティングして切断を誘導することができるが、ホーミングエンドヌクレアーゼの切断部位が見出されることは少なく、標的遺伝子において天然に存在する切断部位を見出せる可能性も低い。本明細書で提供されるシステムの実施形態のいくつかにおいて、該システムは、メガヌクレアーゼ、またはメガヌクレアーゼをコードするベクターもしくは核酸をさらに含んでもよい。本明細書で提供される方法の実施形態のいくつかにおいて、該方法は、メガヌクレアーゼ、またはメガヌクレアーゼをコードするベクターもしくは核酸を提供することをさらに含んでもよい。

30

【0101】

別の種類の人工エンドヌクレアーゼとして、遺伝子組換えされたメガヌクレアーゼが挙げられる。遺伝子組換えホーミングエンドヌクレアーゼは、既存のホーミングエンドヌクレアーゼの特異性を改変することによって作製される。一方法では、天然のホーミングエンドヌクレアーゼのアミノ酸配列を様々に変更し、得られた遺伝子組換えホーミングエンドヌクレアーゼをスクリーニングして、標的結合部位を切断する機能性タンパク質として機能するものを選択する。別の方法では、遺伝子組換え技術を使用して、2種のホーミングエンドヌクレアーゼの認識部位を組み合わせ、それぞれのホーミングエンドヌクレアーゼから半分ずつ由来する新たな認識部位を作製することによって、キメラ型ホーミングエンドヌクレアーゼを作製する。本明細書で提供されるシステムの実施形態のいくつかにおいて、該システムは、遺伝子組換えされたメガヌクレアーゼ、または遺伝子組換えされたメガヌクレアーゼをコードするベクターもしくは核酸をさらに含んでもよい。

40

【0102】

切断部位を見出すことが難しいエンドヌクレアーゼを用いた標的化DNA二本鎖切断は、非相同性末端結合DNA修復経路を利用することによって、様々な細胞種における遺伝子破壊に適用することができる。しかしながら、エンドヌクレアーゼによって化学的にきれいに切断されたDNAは、正確に修復されることが多いため、標的遺伝子破壊の効率はそれほど高くない。本明細書に記載の実施形態のいくつかは、エンドヌクレアーゼにより誘

50

導された部位特異的DNA二本鎖切断の不正確な修復によって生じる標的遺伝子破壊の効率を向上させる方法に関する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のシステムは、末端プロセシング酵素を併用したことによって、標的遺伝子破壊の効率が向上した部位特異的エンドヌクレアーゼをさらに含んでいてもよい。酵素の併用は、たとえば、物理的作用、空間的作用および/または時間的作用によるものであってもよい。

【0103】

特定の理論に縛られるものではないが、「エラーを生じやすい」非相同末端結合（NHEJ）によって切断部位に挿入および欠失を作製することができることから、NHEJにより切断された二本鎖DNAの解離を利用することによって、標的遺伝子破壊および標的遺伝子ノックアウトを行うことができる。NHEJはいくつかの副経路を介して起こり、どの副経路を介するかによって得られる変異が異なる。古典的NHEJ経路（cNHEJ）は、KU/DNA-PKcs/Lig4/XRCC4複合体を必要とし、最小限のプロセシングを経て末端を再結合する。設計されたエンドヌクレアーゼプラットフォーム（ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）およびホーミングエンドヌクレアーゼ（HE））によるDNA切断では、いずれも、特別な前処理を必要とせず容易に連結することが可能な、化学的にきれいに切断された突出部位が得られるため、このような切断部位を利用することによって、cNHEJ経路を介した正確な修復を行うことができる。古典的NHEJ経路による切断後にDNAが解離しなかったり、DNAの解離に失敗した場合、他のNHEJ経路（altNHEJ）を使用することができるが、これらの経路ではかなり変異が起こりやすい。

10

20

【0104】

特定の理論に縛られるものではないが、切断されたDNA二本鎖を末端プロセシング酵素によって修飾することによって、altNHEJ経路を介したDNA修復を誘導してもよい。また、末端プロセシング酵素の種類を変えることによって、様々な別の機構を介して破壊効率を向上させてもよい。たとえば、3'突出部位に露出されたホスホジエステル結合を特異的に加水分解するエキソヌクレアーゼであるTrex2は、切断部位に欠失変異を導入するDNA修復を誘導する。これに対して、テンプレート非依存性ポリメラーゼであるターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（TdT）は、ヌクレオチド塩基の付加を促進して連結前にDNA末端を変化させ、切断部位に挿入変異を導入するDNA修復を誘導すると予想される。したがって、当業者であれば、本明細書で提供されるシステムまたは方法のいずれかにおいて、様々な活性を有する末端プロセシング酵素を使用することによって所望の遺伝子組換えを行うことができるであろう。また、当業者であれば、様々な末端プロセシング酵素を使用して相乗作用を得ることによって、効果を最大まで高めたり、ユニークな効果を得ることができるであろう。

30

【0105】

本明細書に記載の実施形態のいくつかによって、末端プロセシング酵素を併用したエンドヌクレアーゼで切断されたDNAを連結することができ、遺伝子編集に起因する毒性を宿主に及ぼすことなく、様々な細胞種および生物種において標的破壊効率を向上させることができる。これらの利点は、少なくとも以下の点において重要である。

1) 二本鎖切断（DSB）は細胞周期チェックポイントを作動させて細胞分裂を停止させ、切断された二本鎖が解離するまで停止を継続するが、「持続的な切断」（切断と正確な修復との周期的な繰り返し）が起こった場合、細胞分裂は停止されたままとなり、アポトーシスが誘導される可能性がある。

40

2) 遺伝子組換えを実施する場合、エンドヌクレアーゼを一過性に送達することが多く、限られた短い期間においてのみ、切断を行うのに十分な酵素濃度が達成される。

3) 持続的な切断によって転座が起こりうる。末端プロセシング酵素を組み合わせることでエンドヌクレアーゼを使用することによって、持続的な切断の発生を防ぎ、大規模な染色体の再編の発生を抑えることができ、ひいては、エンドヌクレアーゼの誘導による標的破壊の安全性を向上させることができる。

4) 末端プロセシング酵素と組み合わせることによって、選択した2種のエンドヌクレアーゼによる変異誘導率がそれぞれの標的において5倍高くなり、これら2種のエンドヌク

50

レアーゼの標的の同時破壊では変異誘導率が2.5倍高くなることが本明細書に記載のデータから示された。このことから、1回の変異誘導によって複数の変更を遺伝子に加え、たとえば、複数のアレルのノックアウトや多重ノックアウトを行うことができると考えられる。

【0106】

本明細書に記載のシステムは、宿主細胞に送達するための、エンドヌクレアーゼ、末端プロセッシング酵素、ならびに/またはエンドヌクレアーゼ活性および末端プロセッシング活性を有する融合タンパク質をさらに含んでもよい。本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかにおいて、該システムは、エンドヌクレアーゼ活性および/または末端プロセッシング活性を有する1つ以上のポリペプチドなどのタンパク質をさらに含んでもよく、このポリペプチドは細胞に直接送達されてもよい。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼ、末端プロセッシング酵素、ならびに/またはエンドヌクレアーゼ活性および末端プロセッシング活性を有する融合タンパク質の1つ以上をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを宿主細胞に送達することによって、エンドヌクレアーゼ、末端プロセッシング酵素、ならびに/またはエンドヌクレアーゼ活性および末端プロセッシング活性を有する融合タンパク質を宿主細胞において発現させることができる。いくつかの実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドはDNA発現ベクターである。いくつかの実施形態において、1つ以上のポリヌクレオチドはRNA発現ベクターである。いくつかの実施形態において、トランススプライシング、ポリペプチドの切断および/またはポリペプチドの連結が、細胞における1つ以上のタンパク質の発現に関与していてもよい。

【0107】

本明細書に記載のシステムおよび方法は、遺伝子のコード配列の標的破壊に有用であり、いくつかの実施形態においては遺伝子ノックアウトに有用である。本明細書に記載の組成物および方法による標的切断を行うことによって、非コード配列（たとえば、プロモーター、エンハンサー、イニシエーター、ターミネーター、スプライス部位などの調節配列）を改変することができ、これによって遺伝子産物の発現量を変化させることができる。このような方法は、たとえば、生物学的研究、生物工学的応用（農作物の遺伝子組換えなど）、治療用途、機能ゲノミクス、および/またはターゲットバリデーション研究に使用することができる。

【0108】

本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかは、1つ以上の末端プロセッシング酵素を併用した1つ以上の部位特異的エンドヌクレアーゼ活性と組み合わせられる。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼおよび末端プロセッシング酵素は、前記システムにおいて別々のタンパク質として提供される。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼおよび末端プロセッシング酵素は、細胞において共発現される。別々のタンパク質として提供されたエンドヌクレアーゼおよび末端プロセッシング酵素がポリヌクレオチドによる送達を介して発現される場合、エンドヌクレアーゼおよび末端プロセッシング酵素はそれぞれ別々のポリヌクレオチドによってコードされていてもよく、あるいは単一のポリヌクレオチドによってコードされていてもよい。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼおよび末端プロセッシング酵素は、単一のポリヌクレオチドにコードされており、単一のプロモーターの誘導によって発現される。いくつかの実施形態において、T2A配列を介してエンドヌクレアーゼと末端プロセッシング酵素とを連結させることによって、2種の別々のタンパク質を1回の翻訳によって生成させることができる。いくつかの実施形態において、別のリンカー配列を使用することができる。別の実施形態において、単一のポリヌクレオチドは、内部リボソーム導入配列（IRES）により隔てられたエンドヌクレアーゼおよび末端プロセッシング酵素をコードする。

【0109】

本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかは、I-Anil、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-Csml、I-PanI、I-PanII、I-PanMI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-LtrI、I-GpiI、I-GZeI、I-OnuI、I-HjeMI、I-TevI、I-TevIIおよびI-TevIII

からなる群から選択されるエンドヌクレアーゼと、Trex2、Trex1、膜貫膜ドメインを持たないTrex1、Apollo、Artemis、DNA2、Exo1、ExoT、ExoIII、Fen1、Fan1、Mre11、Rad2、Rad9、TdT（ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ）、PNKP、RecE、RecJ、RecQ、ラムダエキソヌクレアーゼ、Sox、ワクシニアウイルスDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼIII、エキソヌクレアーゼVII、NDK1、NDK5、NDK7、NDK8、WRN、T7遺伝子6エキソヌクレアーゼ、トリ骨髄芽球症ウイルス組み込みタンパク質（IN）、Bloom、Antarctic Phosphatase、アルカリホスファターゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ（PNK）、ApeI、マングベーンヌクレアーゼ、Hex1、TTRAP（TDP2）、Sgs1、Sae2、CtIP、Pol μ 、Pol δ 、MUS81、EME1、EME2、SLX1、SLX4およびUL-12からなる群から選択される1つ以上のDNA末端プロセシング酵素とを前記システムと組み合わせることを含む。いくつかの実施形態において、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびDNA末端プロセシング酵素は、融合タンパク質として提供される。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼおよびDNA末端プロセシング酵素は、別々のタンパク質として提供される。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼおよびDNA末端プロセシング酵素は、宿主細胞において共発現される。

10

【0110】

いくつかの実施形態は、Trex2、Trex1、膜貫膜ドメインを持たないTrex1、Apollo、Artemis、DNA2、Exo1、ExoT、ExoIII、Fen1、Fan1、Mre11、Rad2、Rad9、TdT（ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ）、PNKP、RecE、RecJ、RecQ、ラムダエキソヌクレアーゼ、Sox、ワクシニアウイルスDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼIII、エキソヌクレアーゼVII、NDK1、NDK5、NDK7、NDK8、WRN、T7遺伝子6エキソヌクレアーゼ、トリ骨髄芽球症ウイルス組み込みタンパク質（IN）、Bloom、Antarctic Phosphatase、アルカリホスファターゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ（PNK）、ApeI、マングベーンヌクレアーゼ、Hex1、TTRAP（TDP2）、Sgs1、Sae2、CtIP、Pol μ 、Pol δ 、MUS81、EME1、EME2、SLX1、SLX4およびUL-12からなる群から選択されるDNA末端プロセシング酵素と本明細書に記載のシステムとを組み合わせることに関する。本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかにおいて、複数の末端プロセシング酵素は、別々のタンパク質として提供される。本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかにおいて、複数の末端プロセシング酵素は宿主細胞において共発現される。

20

【0111】

いくつかの実施形態において、I-AniI、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-PanII、I-PanMI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-LtrI、I-Gpil、I-GZel、I-OnuI、I-HjeMI、I-TevI、I-TevIIおよびI-TevIIIからなる群から選択される1つ以上の部位特異的ホーミングエンドヌクレアーゼの活性と、Artemis、Trex1、Flapエンドヌクレアーゼ、ターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ、Trex2、ワクシニアウイルスDNAポリメラーゼ、Mre11、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼIII、NDK1、NDK5、NDK7、NDK8、およびWRNからなる群から選択される1つ以上のDNA末端プロセシング酵素の活性とを組み合わせる。いくつかの実施形態において、ホーミングエンドヌクレアーゼおよびDNA末端プロセシング酵素は、融合タンパク質として提供される。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼおよびDNA末端プロセシング酵素は、別々のタンパク質として提供される。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼおよびDNA末端プロセシング酵素は、宿主細胞において共発現される。

30

40

【0112】

本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかは、エンドヌクレアーゼドメインおよび末端プロセシングドメインまたはそれらの1つ以上の部分を含む異種融合タンパク質をさらに含む。いくつかの実施形態は、エンドヌクレアーゼ活性および末端プロセシング活性を有する融合タンパク質をコードする異種融合構築物に関する。また、本発明の実施形態は、前記異種融合構築物をさらに含むシステムおよび方法、ならびにエンドヌクレアーゼ活性および末端プロセシング活性を有する融合タンパク質の製造方法および該融合タンパク質を含む組成物に関する。一実施形態において、エンドヌクレアーゼドメインは、組

50

換え手段によって末端プロセシングドメインと組み合わされている（たとえば、前記融合タンパク質は、エンドヌクレアーゼの全体またはその1つ以上の部分をコードするポリヌクレオチドと、末端プロセシング酵素の全体またはその1つ以上の部分をコードするポリヌクレオチドとをインフレームに連結させた核酸を翻訳することによって作製される）。別の実施形態において、前記融合タンパク質のエンドヌクレアーゼドメインおよび末端プロセシングドメインは化学的に連結されている。この化学結合は、たとえば、BS3（ビス[スルホスクシンイミジル]スベレート）などの二官能性リンカー分子を用いることによって形成することができる。

【0113】

本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかは、エンドヌクレアーゼドメインおよびエキソヌクレアーゼドメインを含むタンパク質をさらに含み、該タンパク質は、そのままタンパク質として、あるいはエンドヌクレアーゼドメインおよびエキソヌクレアーゼドメインを含む融合タンパク質をコードするベクターまたは核酸として提供される。いくつかの実施形態において、前記融合タンパク質は、ホーミングエンドヌクレアーゼのフラグメントまたはバリエーションの少なくとも1つと、エキソヌクレアーゼ（たとえば3'エキソヌクレアーゼ）のフラグメントまたはバリエーションの少なくとも1つとを含み、これらは遺伝子接合または化学的結合を介して互いに連結されている。いくつかの実施形態において、3'エキソヌクレアーゼは、Trex2の単量体、二量体またはそのバリエーションである。別の実施形態において、前記融合タンパク質は、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼのフラグメントまたはバリエーションの少なくとも1つと、5'エキソヌクレアーゼのフラグメントまたはバリエーションの少なくとも1つとを含み、これらは遺伝子接合または化学的結合を介して互いに連結されている。融合タンパク質の一部に由来するエンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ/エキソヌクレアーゼ融合タンパク質の「一部」、「領域」、「ドメイン」または「部分」とも呼ばれる。いくつかの実施形態において、エキソヌクレアーゼドメインは、Trexまたはその1つ以上の部分を含む。

【0114】

エンドヌクレアーゼと末端プロセシング酵素の融合タンパク質は、エンドヌクレアーゼドメインと末端プロセシング酵素ドメインの間にリンカーペプチドを含んでいてもよく、このリンカーペプチドの挿入によって、これらのドメイン間の物理的距離を大きくすることができ、その結果、エンドヌクレアーゼドメインが標的に最も近づきやすくなり、たとえば標的配列と結合することが容易となる。前記リンカーペプチドは、所望の機能に応じて、リンカーペプチドの柔軟性または剛直性がさらに増すように選択されたアミノ酸から構成されていてもよい。前記リンカー配列は、プロテアーゼによって切断可能であるか、あるいは化学的に切断可能であり、切断によって、エンドヌクレアーゼ部分と末端プロセシング酵素部分とが別々に生じる。前記リンカーに含まれる酵素切断部位としては、エンテロキナーゼ、第Xa因子、トリプシン、コラゲナーゼ、トロンビンなどのタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）によって切断される部位が挙げられる。いくつかの実施形態において、前記プロテアーゼは、宿主により天然に生成されるものであってもよく、または外来的に導入されたものであってもよい。あるいは、前記リンカーに含まれる切断部位は、選択された化学物質への暴露によって切断される部位であってもよく、このような化学物質として、たとえば臭化シアン、ヒドロキシルアミン、低pHなどが挙げられる。任意で含まれる前記リンカー配列は、切断部位を提供すること以外を目的として導入されてもよい。前記リンカー配列は、エンドヌクレアーゼドメインが標的配列を認識して切断することができ、かつ末端プロセシングドメインが切断部位に露出したDNA末端を修飾することができるように、エンドヌクレアーゼ部分を末端プロセシング酵素部分に対して効果的な位置に配置できるものであるべきである。また、前記リンカーは、エンドヌクレアーゼドメインと末端プロセシングドメインの間で立体障害が起こらないような十分な長さの単純なアミノ酸配列であってもよい。さらに、前記リンカー配列は翻訳後修飾を提供するものであってもよく、翻訳後修飾としては、たとえば、リン酸化部位、ビオチン化部位、硫酸化部位、カルボキシル化部位などが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの

10

20

30

40

50

実施形態において、本明細書に記載のシステムは、エンドヌクレアーゼと末端プロセッシングタンパク質の融合タンパク質をさらに含んでもよい。

【0115】

いくつかの実施形態において、前記リンカー配列は、4～30個のアミノ酸、さらに好ましくは8～22個のアミノ酸を含む。すなわち、前記リンカー配列は、4～30個のアミノ酸で構成されていてもよく、たとえば、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上、16個以上、17個以上、18個以上、19個以上、20個以上、21個以上、22個以上、23個以上、24個以上、25個以上、26個以上、27個以上、28個以上、29個以上、または30個以上のアミノ酸で構成されていてもよく、これらの長さのいずれか2つによって定義される範囲にある長さのアミノ酸で構成されていてもよい。いくつかの実施形態において、前記生物活性ペプチドが望ましくない立体配座に固定されないように、前記リンカー配列は柔軟性を有する。前記リンカーは、柔軟性を得るため、グリシン、アラニン、セリンなどの、小さい側鎖を有するアミノ酸から主に構成されていてもよい。いくつかの実施形態において、前記リンカー配列の約80%以上または約90%以上が、グリシン残基、アラニン残基またはセリン残基で構成されており、特にグリシン残基およびセリン残基で構成されている。いくつかの実施形態において、融合タンパク質の末端プロセッシングドメインとエンドヌクレアーゼドメインは、G4Sリンカーペプチドを介して隔てられている。別の実施形態において、T2Aリンカー配列を介して連結したことによって、2種の別々のタンパク質を1回の翻訳で生成させることができる。適切なリンカー配列は、実験に基づいて容易に選択することができる。また、リンカー配列の適切なサイズおよび配列についても、慣用のコンピュータモデリング技術により決定することができる。

10

20

【0116】

前記融合タンパク質を細胞に直接送達するか、あるいは前記融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを細胞に送達して該ポリヌクレオチドを転写させ、転写物を翻訳させる、融合タンパク質を生成させることによって、細胞において融合タンパク質を発現させることができる。さらに、トランススプライシング、ポリペプチドの切断およびポリペプチドの連結を利用して、細胞においてタンパク質を発現させてもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを細胞に送達する方法は、当技術分野においてよく知られている。

30

【0117】

本明細書に記載のエンドヌクレアーゼ、末端プロセッシング酵素および融合タンパク質をコードする様々なDNA分子を構築することによって、選択されたタンパク質またはペプチドを細胞に提供してもよい。当技術分野でよく知られているように、エンドヌクレアーゼ、末端プロセッシング酵素および融合タンパク質をコードする様々なDNA分子のコドンを用いて別のコドンに変更することによって、選択された宿主細胞における発現を最適化してもよい。

【0118】

本明細書に記載のエンドヌクレアーゼ、末端プロセッシング酵素および融合タンパク質をコードする様々なRNA分子を構築することによって、選択されたタンパク質またはペプチドを細胞に提供してもよい。当技術分野でよく知られているように、エンドヌクレアーゼ、末端プロセッシング酵素および融合タンパク質をコードする様々なRNA分子のコドンを用いて別のコドンに変更することによって、選択された宿主細胞における発現を最適化してもよい。いくつかの実施形態において、前記RNAは、50個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、または500個のアデノシン残基が共有結合で連結されたポリ(A)テールを含んでもよく、前記値のいずれか2つによって定義される範囲にある残基数のポリ(A)テールを含んでもよい。

40

【0119】

本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかは、部位特異的エンドヌクレアーゼおよび末端プロセッシング酵素を同時に発現させるためのベクターまたは核酸をさらに含み、

50

これによって、標的遺伝子破壊の効率を最大で約70倍高め、標的部位を含む細胞集団において72時間未満で実質的に100%の変異導入率を達成することができる。

【0120】

本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかにおいて、有効量のエンドヌクレアーゼおよび有効量の末端プロセシング酵素、または有効量の融合タンパク質を細胞に送達するためのさらなるベクターまたは核酸が提供され、これらのタンパク質の有効量は、細胞と該タンパク質を接触させることにより細胞に直接送達されるか、あるいは発現構築物から該タンパク質を一過性に発現させることによって送達される。細胞に送達されるこのようなシステムの実施形態では、細胞分裂が数回行われることによって、ヌクレアーゼの濃度が活性レベル以下に低減される。

10

【0121】

本明細書で提供されるシステムおよび方法の実施形態のいくつかにおいて、末端プロセシング酵素ドメインを部位特異的DNA結合ドメインに物理的に連結することによってDNA末端プロセシング酵素に部位特異性を付与するための融合タンパク質がさらに提供される。いくつかの実施形態において、末端プロセシング酵素ドメインは、リンカーペプチドを介してDNA結合ドメインに連結される。リンカーペプチドの組成および構造は特に限定されず、いくつかの実施形態において、リンカーは、化学的または酵素的に切断可能であってもよい。リンカーペプチドは、柔軟なものであってもよく、剛直なものであってもよく、約4~30個のアミノ酸を含んでいてもよい。別の実施形態において、末端プロセシング酵素ドメインは、DNA結合ドメインに化学的に融合されている。特定の理論に縛られるものではないが、部位特異的DNA結合ドメインに末端プロセシング酵素を連結させることによって末端プロセシング酵素に部位特異性を付与すると、部位特異性を付与していない末端プロセシング酵素を使用した場合と比べて、エキソヌクレアーゼ活性などの非特異的な末端プロセシング活性に伴う毒性が低下され、エンドヌクレアーゼ活性による切断によって露出した二本鎖DNA末端を効率的に修飾するのに必要な末端プロセシング酵素の有効量を低減することができる。いくつかの実施形態において、末端プロセシング酵素は、ホーミングエンドヌクレアーゼに連結される。別の実施形態において、末端プロセシング酵素は、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼに連結される。いくつかの実施形態において、末端プロセシング酵素ドメインは、ホーミングエンドヌクレアーゼまたはジンクフィンガーエンドヌクレアーゼの切断部位に隣接したDNA配列に結合するジンクフィンガーDNA結合ドメインに連結される。

20

30

【0122】

前記システムおよび前記方法の実施形態のいくつかは、本明細書で提供されるシステムを使用した遺伝子ロックアウトの効率を向上させるために、CRISPR/Cas9システムの活性と1つ以上の部位特異的エンドヌクレアーゼとTrex2とを組み合わせることに関する。Trex2は、単量体または二量体として提供されてもよい。Trex2酵素は、3'突出部位に露出されたホスホジエステル結合を特異的に加水分解する。ホーミングエンドヌクレアーゼが、Trex2エキソヌクレアーゼ活性に対して感受性を示す3'突出部位を形成することができるのに対して、FokI切断ドメインを利用するジンクフィンガーヌクレアーゼは、二本鎖DNAを切断して5'突出部位を形成する。ホーミングエンドヌクレアーゼおよびジンクフィンガーヌクレアーゼによる切断部位での変異率はベースラインレベルである。Trex2とホーミングエンドヌクレアーゼとを共発現させることによって、変異率が約70倍になった。Trex2とジンクフィンガーエンドヌクレアーゼとを共発現させることによって、変異率に効果が見られた。前記方法の実施形態のいくつかは、エキソヌクレアーゼであるTrex2を共発現させた本明細書に記載のシステムを提供することに関する。

40

【0123】

本明細書において、「Ad5アデノウイルスタンパク質」、「Ad5ウイルスタンパク質」または「Ad5タンパク質」は、血清型5型のアデノウイルスにコードされるタンパク質を指す。Ad5アデノウイルスタンパク質としては、E4ORF6およびE1B55Kが挙げられるが、これらに限定されない。野生型E1B55Kタンパク質の一例としてのタンパク質配列を図17(配

50

列番号 1) に示す。野生型E4ORF6タンパク質の一例としてのタンパク質配列を図 19 (配列番号 3) に示す。いくつかの実施形態において、変異型のAd5タンパク質を使用する。変異型のAd5タンパク質としては、E1B55KのH373A変異体およびE1B55KのH354変異体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、Ad5は、2 種以上のAd5ウイルスタンパク質の組み合わせを指す。いくつかの実施形態において、Ad5は、2 種以上の野生型Ad5ウイルスタンパク質の組み合わせを指す。いくつかの実施形態において、Ad5は、少なくとも 1 種が野生型の、2 種以上のAd5ウイルスタンパク質の組み合わせを指す。いくつかの実施形態において、Ad5は、少なくとも 1 種が変異型の、2 種以上のAd5ウイルスタンパク質の組み合わせを指す。いくつかの実施形態において、Ad5^{wt} は、1 種以上の野生型Ad5ウイルスタンパク質を指す。いくつかの実施形態において、Ad5^{MRN} は、MRN複合体を無効化しない 1 種以上の変異型Ad5ウイルスタンパク質を指す。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 種のAd5ウイルスタンパク質をヌクレアーゼと組み合わせて使用するか、あるいはヌクレアーゼと組み合わせずに使用する。いくつかの実施形態において、ヌクレアーゼはエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼは、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントである。いくつかの実施形態において、ヌクレアーゼはエキソヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、エキソヌクレアーゼはTrex2である。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 種のAd5ウイルスタンパク質を、2 種以上のヌクレアーゼと組み合わせて使用する。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 種のAd5ウイルスタンパク質を、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントおよびTrex2と組み合わせて使用する。

10

20

【0124】

発現ベクター

発現構築物は、当技術分野で公知の方法を使用して容易に設計することができる。核酸発現ベクターとしては、組換えウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、プラスミド、細菌人工染色体、酵母人工染色体、ヒト人工染色体、ミニサークルDNA、エピソーム、cDNA、RNA、およびPCR産物が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、核酸発現ベクターは、単一のペプチド（たとえば、エンドヌクレアーゼ、末端プロセッシング酵素、またはエンドヌクレアーゼ活性および末端プロセッシング活性を有する融合タンパク質）をコードする。いくつかの実施形態において、核酸発現ベクターは、1 つ以上のエンドヌクレアーゼおよび 1 つ以上の末端プロセッシング酵素をコードする単一のポリシストロン性発現カセットを含む。本明細書に記載のシステムの実施形態のいくつかにおいて、2 A ペプチド配列または別の自己切断配列を介して互いに連結された、1 つ以上のエンドヌクレアーゼおよび 1 つ以上の末端プロセッシング酵素が提供される。いくつかの実施形態において、前記核酸発現ベクターは、DNA発現ベクターである。いくつかの実施形態において、前記核酸発現ベクターは、RNA発現ベクターである。いくつかの実施形態において、前記発現ベクターはウイルスベクターである。本明細書で提供されるシステムの実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである。

30

【0125】

いくつかの実施形態において、核酸発現ベクターは 1 つ以上の選択マーカーをさらに含み、1 つ以上の選択マーカーをさらに導入することによって、1 つまたは複数の前記エンドヌクレアーゼ、1 つまたは複数の前記末端プロセッシング酵素、ならびに / またはエンドヌクレアーゼ活性および末端プロセッシング活性を有する 1 つまたは複数の前記融合タンパク質を導入し発現させた宿主細胞の特定または選択が容易になる。選択マーカーとしては、蛍光タンパク質をコードする遺伝子（たとえば、EGFP、DS-Red、YFP、およびCFP）；選択剤に対する耐性を付与するタンパク質をコードする遺伝子（たとえば、PuroR遺伝子、ZeoR遺伝子、HygroR遺伝子、neoR遺伝子、およびブラストサイジン耐性遺伝子）が挙げられるが、これらに限定されない。場合によっては、前記選択マーカーは、蛍光リポーターおよび選択マーカーを含む。

40

【0126】

50

いくつかの実施形態において、DNA発現ベクターは、1つまたは複数のエンドヌクレアーゼ、1つまたは複数の末端プロセシング酵素、ならびに/またはエンドヌクレアーゼ活性および末端プロセシング活性を有する1つまたは複数の融合タンパク質の発現を誘導することができるプロモーターを含む。プロモーターとしては、レトロウイルスのLTRエレメント；CMV、HSV1-TK、SV40、EF-1、 α -アクチンなどの構成的プロモーター；Tetオペレーターエレメントを含む誘導性プロモーターなどの誘導性プロモーター；および組織特異的プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。適切な細菌性プロモーターおよび真核細胞プロモーターは当技術分野において公知であり、たとえば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 2001)；Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990)；およびCurrent Protocols in Molecular Biology (2010)に記載されており、これらの文献はいずれも引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。植物プロモーターとしては、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) のユビキチン3 (ubi-3) から得られたプロモーター配列が挙げられるが、これに限定されない。

10

【0127】

いくつかの実施形態において、1つ以上のエンドヌクレアーゼ、1つ以上の末端プロセシング酵素、ならびに/またはエンドヌクレアーゼ活性および末端プロセシング活性もしくはエキソヌクレアーゼ活性を有する1つ以上の融合タンパク質をコードする核酸を、本明細書で提供されるシステムのベクターおよび核酸とともに、真核細胞の形質転換のためのベクターにクローニングする。いくつかの実施形態において、様々なエンドヌクレアーゼおよび様々な末端プロセシング酵素をコードする複数の核酸を同じベクターにクローニングする。この場合、様々なエンドヌクレアーゼまたは様々な末端プロセシング酵素をコードする各核酸を、T2A、自己切断配列、プロテアーゼ切断部位またはIRES配列を介して隔てもよい。ベクターは、原核生物ベクター（たとえばプラスミド）、シャトルベクター、昆虫ベクター、真核生物ベクター（本明細書に記載の植物ベクターなど）のいずれであってもよい。前記ヌクレアーゼおよび前記融合タンパク質の発現は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターの制御下で行われてもよい。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、Trexをコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターに含まれる遺伝子および/または核酸は、ヒト細胞などの哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、前記ベクターはmRNAである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードするmRNAである。いくつかの実施形態において、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする前記核酸は、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントは、化膿レンサ球菌 (*S. pyogenes*) に由来するものであるか、またはその他の生物に由来する別のCas9タンパク質から作製されたコンセンサス配列である。

20

30

【0128】

エンドヌクレアーゼ活性および/もしくは末端プロセシング活性を有するポリペプチド、ならびに/またはエンドヌクレアーゼ活性および/もしくは末端プロセシング活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本明細書に記載の好適な核酸送達方法もしくはタンパク質送達方法、または当業者に公知の好適な核酸送達方法もしくはタンパク質送達方法を使用して宿主細胞に導入してもよい。本明細書に記載のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、インビトロにおいて培養細胞に送達することができ、また、インサイチューにおいて組織および生物の全身に送達することもできる。本発明の実施形態によるポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、化学的方法、生物学的方法または物理的方法を使用して宿主細胞に導入することができる。化学的方法、生物学的方法または物理的方法としては、エレクトロポレーション、ソノポレーション、遺伝子銃の使用、リポトランスフェクション、リン酸カルシウムトランスフェクション、デンドリマーの使用、マ

40

50

イクロインジェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、ウイルスベクター（アデノウイルスベクター、AAVベクター、レトロウイルスベクターなど）の使用、およびグループリボザイムが挙げられるが、これらに限定されない。

【0129】

AAVベクターに対する免疫応答

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、遺伝子療法に基づく遺伝性疾患の治療に広く使用されている。しかし、AAVベクターは免疫応答を引き起こすため、その治療有効性が低くなることがある。これと同様に、CRISPR/Cas9に基づく（または1つ以上の他のヌクレアーゼに基づく）ゲノム編集で使用するAAVベクターが免疫応答を引き起こすと、遺伝子ターゲティングの有効性が低くなると考えられる。

10

【0130】

いくつかの実施形態において、CRISPR/Cas9に基づく（および/または1つ以上の他のヌクレアーゼに基づく）ゲノム編集に使用されるAAVベクターは、免疫原性が低減されている。いくつかの実施形態において、CRISPR/Cas9に基づく（および/または1つ以上の他のヌクレアーゼに基づく）ゲノム編集に使用されるAAVベクターは、免疫原性がない。いくつかの実施形態において、AAVベクターは免疫原性が低減されているため、AAVベクターに対して耐性が生じる可能性は最小限まで抑えられている。いくつかの実施形態において、AAVベクターは免疫原性がないため、AAVベクターに対して耐性が生じる可能性はない。

【0131】

20

生物

本明細書に記載の実施形態は、遺伝子の編集が所望される真核生物であればどのようなものにでも適用できる。真核生物としては、藻類、植物、動物（たとえば、マウス、ラット、霊長類、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマなどの哺乳動物）、魚類、および昆虫が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記生物から単離された細胞は、本明細書の記載に従って遺伝子修飾が施される。いくつかの実施形態において、遺伝子修飾が施された細胞は、生殖能を有する成熟生物へと成長する。真核細胞（たとえば、藻類細胞、酵母細胞、植物細胞、真菌細胞、魚類細胞、鳥類細胞および哺乳動物細胞）を使用することもできる。1つ以上のさらなる遺伝子修飾を含む生物から得られた細胞を使用することもできる。

30

【0132】

哺乳動物細胞としては、目的とする生物に由来する任意の細胞または細胞株が挙げられ、たとえば、卵母細胞、体細胞、K562細胞、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞、HEP-G2細胞、BaF-3細胞、シュナイダー細胞、COS細胞（SV40 T抗原を発現するサル腎細胞）、CV-1細胞、HuTu80細胞、NTERA2細胞、NB4細胞、HL-60細胞およびHeLa細胞、293細胞、および骨髓腫細胞（たとえばSP2細胞またはNS0細胞）などが挙げられる。末梢血単核球（PBMC）またはT細胞を使用することもでき、同様に、胚性幹細胞および成体幹細胞を使用することもできる。たとえば、使用可能な幹細胞としては、胚性幹細胞（ES）、人工多能性幹細胞（iPSC）、間葉系幹細胞、造血幹細胞、筋肉幹細胞、皮膚幹細胞、脂肪由来幹細胞、および神経幹細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列；Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸配列；第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列；および第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を含み、CRISPRガイドRNAが、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であること、および第1の核酸配列がベクター中に含まれていることを特徴とするシステムが提供される。いくつかの実施形態において、前記細胞は真核細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はヒト細胞などの哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は形質転換細胞ではない。いくつかの実施形態において、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリ

40

50

ア細胞、筋細胞または腸細胞である。

【0133】

標的となる植物および植物細胞としては、単子葉植物および双子葉植物が挙げられ、たとえば、穀類植物（たとえば、コムギ、トウモロコシ、イネ、キビ、オオムギ）、果実植物（たとえば、トマト、リンゴ、西洋ナシ、イチゴ、オレンジ）、飼料植物（たとえば、アルファルファ）、根菜植物（たとえば、ニンジン、ジャガイモ、テンサイ、ヤムイモ）、葉菜植物（たとえば、レタス、ホウレンソウ）などの農業植物；顕花植物（たとえば、ペチュニア、バラ、キク）；針葉樹およびマツ類（たとえば、マツ、モミ、トウヒ）；ファイトレメディエーションで使用される植物（たとえば、重金属蓄積植物）；油料植物（たとえば、ヒマワリ、アブラナ）および実験目的で使用される植物（たとえば、シロイヌナズナ）が挙げられるが、これらに限定されない。したがって、本明細書で開示された前記方法および前記組成物は、広範囲の植物に使用することができ、たとえば、アスパラガス属（*Asparagus*）、カラスムギ属（*Avena*）、アブラナ属（*Brassica*）、ミカン属（*Citrus*）、スイカ属（*Citrullus*）、トウガラシ属（*Capsicum*）、カボチャ属（*Cucurbita*）、ニンジン属（*Daucus*）、ムカシヨモギ属（*Erigeron*）、ダイズ属（*Glycine*）、ワタ属（*Gossypium*）、オオムギ属（*Hordeum*）、アキノノゲシ属（*Lactuca*）、ドクムギ属（*Lolium*）、トマト属（*Lycopersicon*）、リンゴ属（*Malus*）、イモノキ属（*Manihot*）、タバコ属（*Nicotiana*）、オオアラセイトウ属（*Orychophragmus*）、イネ属（*Oryza*）、ワニナシ属（*Persea*）、インゲンマメ属（*Phaseolus*）、エンドウ属（*Pisum*）、ナシ属（*Pyrus*）、サクラ属（*Prunus*）、ダイコン属（*Raphanus*）、ライムギ属（*Secale*）、ナス属（*Solanum*）、モロコシ属（*Sorghum*）、コムギ属（*Triticum*）、ブドウ属（*Vitis*）、ササゲ属（*Vigna*）、およびトウモロコシ属（*Zea*）の植物種などに使用することができるが、これらに限定されない。「植物細胞」は、単離された植物細胞だけでなく、植物全体、または種子、カルス、葉、根などの植物の部分の1つ以上も包含する。また、本発明の開示は、本明細書に記載の植物の種子も包含する。本発明の開示は、前記植物の子孫、クローン、細胞株または細胞をさらに包含する。

10

20

【0134】

遺伝子組換えホモ接合生物の作製

エンドヌクレアーゼをコードする1つ以上のベクターまたは核酸を含むシステムが導入された細胞において、このシステムを、エンドヌクレアーゼ活性および末端プロセッシング活性を有する1つ以上の融合タンパク質とともに共発現させ、部位特異的切断を分析する。このような遺伝子組換え細胞は、シーケンシング、PCR分析、サザンブロッティングなどの、当業者に知られている任意の適切な方法を用いて特定することができる。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼの標的部位全体を含むアンプリコンは、PCRにより得られる。

30

【0135】

医薬組成物および投与

本明細書で提供されるシステムまたは方法により製造された細胞は、DNA配列の標的切断および治療的処置または予防的処置を目的として、患者に直接投与することができ、たとえば、がん、虚血、糖尿病性網膜症、黄斑変性、関節リウマチ、乾癬、HIV感染症、鎌状赤血球貧血、アルツハイマー病、筋ジストロフィー、神経変性疾患、血管疾患、嚢胞性線維症、脳卒中、高IgE症候群または血友病を治療、抑制または緩和することを目的として患者に直接投与することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムによって細胞が製造される。いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法であって、前記細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であるCRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列を含む第1のベクターを細胞に導入すること；Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸配列を前記細胞に導入すること；第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列を前記細胞に導入すること；および第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を前記細胞に導入することを含む方法が提供される。いくつか

40

50

の実施形態において、前記方法によって製造された細胞が提供される。いくつかの実施形態において、前記細胞を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の組成物は、疾患（たとえば、がん、虚血、糖尿病性網膜症、黄斑変性、関節リウマチ、乾癬、HIV感染症、鎌状赤血球貧血、アルツハイマー病、筋ジストロフィー、神経変性疾患、血管疾患、嚢胞性線維症、脳卒中、高IgE症候群、血友病）を治療、予防、緩和または抑制する方法において使用することができ、あるいは、がん、虚血、糖尿病性網膜症、黄斑変性、関節リウマチ、乾癬、HIV感染症、鎌状赤血球貧血、アルツハイマー病、筋ジストロフィー、神経変性疾患、血管疾患、嚢胞性線維症、脳卒中、高IgE症候群、血友病などの疾患に伴う病態または症状を緩和する方法において使用することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の細胞または組成物を投与することによって、軟骨形成不全症、偽性軟骨形成不全症、多発性骨端異形成症、軟骨異形成症、骨形成不全症、マルファン症候群、多指症、遺伝性運動感覚性ニューロパチーI型およびII型（シャルコー・マリー・トゥース病）、筋強直性ジストロフィー、神経線維腫症などの常染色体優性遺伝疾患を治療、予防、緩和または抑制することができ、あるいは、軟骨形成不全症、偽性軟骨形成不全症、多発性骨端異形成症、軟骨異形成症、骨形成不全症、マルファン症候群、多指症、遺伝性運動感覚性ニューロパチーI型およびII型（シャルコー・マリー・トゥース病）、筋強直性ジストロフィー、ならびに/または神経線維腫症などの常染色体優性遺伝疾患に伴う病態または症状を緩和することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される細胞または組成物を投与することによって、遺伝子の制御異常により引き起こされた疾患を治療、予防、緩和または抑制することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される細胞または組成物を投与することによって、BCL-2、Bcl-XL、FLIPなどに異常が見られるがんを治療、予防、緩和または抑制することができ、あるいはBCL-2、Bcl-XL、FLIPなどに異常が見られるがんに伴う病態または症状を緩和することができる。

10

20

30

40

50

【0136】

本明細書で提供される細胞を含む組成物は、任意の適切な方法で投与され、また、いくつかの実施形態においては、薬学的に許容される担体とともに投与される。上述のタンパク質またはポリヌクレオチドの好適な投与方法は利用可能であり、当業者であれば、このような投与方法を熟知しているであろう。また、特定の組成物を投与するために2つ以上の経路を使用することができるが、特定の経路が別の経路よりも即時性および有効性に優れている場合も多い。

【0137】

薬学的に許容される担体は、投与される特定の組成物およびその組成物を投与するための特定の方法などにも応じて選択される。したがって、医薬組成物を好適な製剤として様々な処方することができる（たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciencesを参照されたい）。

【0138】

静脈内経路、筋肉内経路、皮内経路、皮下経路などの非経口投与に適した製剤としては、水性または非水性の滅菌等張注射液剤が挙げられ、該注射液剤は、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および対象となるレシピエントの血液と等張にするための溶質を含んでいてもよい。前記非経口投与に適した製剤としては、さらに、水性または非水性の滅菌懸濁剤が挙げられ、該滅菌懸濁剤は、懸濁化剤、可溶化剤、粘稠化剤、安定剤および保存剤を含んでいてもよい。本明細書で開示された組成物は、たとえば、点滴静注投与、経口投与、局所投与、腹腔内投与、膀胱内投与または鞘内投与することができる。前記組成物製剤は、アンプルやバイアルなどの密閉容器で提供される単位用量形態または複数用量形態であってもよい。注射液剤および懸濁剤は、上述されたような、滅菌された散剤、顆粒剤、および錠剤から調製することができる。

【0139】

いくつかの実施形態においては、非経口投与経路、皮下投与経路、関節内投与経路、気管支内投与経路、腹腔内投与経路、関節包内投与経路、軟骨内投与経路、腔内投与経路、

体腔内投与経路、小脳内投与経路、脳室内投与経路、結腸内投与経路、頸管内投与経路、胃内投与経路、肝内投与経路、心筋内投与経路、骨内投与経路、骨盤内投与経路、心膜内投与経路、腹膜内投与経路、胸膜内投与経路、前立腺内投与経路、肺内投与経路、直腸内投与経路、腎内投与経路、網膜内投与経路、脊髄内投与経路、滑液包内投与経路、胸腔内投与経路、子宮内投与経路、膀胱内投与経路、病巣内投与経路、ボーラス投与、経膈投与経路、直腸投与経路、頰側投与経路、舌下投与経路、鼻腔内投与経路または経皮投与経路の1つ以上が企図される。いくつかの実施態様において、投与される組成物は、前記経路の1つ以上を介した送達に適するように製剤化することができる。

【0140】

別の実施形態

RNA誘導型エンドヌクレアーゼ（RGEN）技術は、標的ゲノム座位において効率よく編集を行うのに非常に有用であると考えられる。いくつかの実施形態においては、第一世代のspCas9のmRNAおよびアデノ随伴ウイルス（AAV）のmRNAを送達してガイドRNAの発現を誘導することによって、遺伝子編集のための化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）由来Cas9の使用を初代ヒト細胞（初代ヒトT細胞など）において評価している。いくつかの実施形態において、第一世代のspCas9のmRNAおよびアデノ随伴ウイルス（AAV）のmRNAを送達してガイドRNAの発現を誘導したspCas9遺伝子編集を行うことによって、TCR 座位において最大で30%の標的遺伝子破壊率が達成される。いくつかの実験では、様々なmRNA用量でCas9を使用し、様々なMOIでAAVを使用することによって、用量に応じた編集効率を評価したところ、編集効率は主としてAAVによる誘導を介したガイドRNAの発現により制限されているということが実証された。いくつかの実験では、編集効率をさらに高めるためにいくつかのアプローチを評価したところ、選択された細胞集団において低いMOIのAAVでも最大で90%のTCR 破壊効率が得られる方法を開発することができた。いくつかの実験の結果から、Cas9-mRNA/AAVガイドを使用した方法を適用することによって、初代ヒトT細胞において効率的に複数の遺伝子を個々に破壊できることが実証され、この結果、CRISPR/Cas9技術の使用によって効率が上昇した革新的な方法を開発することができた。

【0141】

CRISPR/Cas9システムの基本的なコンポーネントは、標的遺伝子、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）、ガイドRNA、およびCas9エンドヌクレアーゼを含む。CRISPR/Cas9を遺伝子編集に適用する際の重要な点の1つとして、様々な細胞種にガイドRNAを効率よく送達できるシステムが必要であることが挙げられる。このようなシステムは、たとえば、インビトロで作製されたガイドRNA（インビトロ転写または化学合成により作製されたガイドRNA）を核酸として送達することを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記核酸は、修飾塩基を組み込むことによってヌクレアーゼ耐性を付与することができる。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを使用することによって、広範囲な初代細胞において形質導入を行うことができるため、ガイドRNAを発現するための重要なシステムではAAVベクターが使用される。AAVベクターは感染症を引き起こすことがなく、また、ゲノムに組み込まれないことが知られている。したがって、AAVベクターは、安全かつ効果的に使用できるという利点がある。

【0142】

いくつかの実施形態において、AAVベクターを使用して、遺伝子編集のためのCRISPR/Cas9システムの1つ以上のコンポーネントを送達する。いくつかの実施形態において、AAVベクターを使用して、初代細胞における遺伝子編集のためのCRISPR/Cas9システムの1つ以上のコンポーネントを送達する。いくつかの実施形態において、AAVベクターを使用して、遺伝子編集のためのCRISPRガイドRNAを送達する。いくつかの実施形態において、AAVベクターを使用して、初代細胞における遺伝子編集のためのCRISPRガイドRNAを送達する。いくつかの実施形態において、初代細胞は、宿主ドナーから直接得られた細胞であり、形質転換されておらず、がん性でもないため、宿主の体外で無限に増殖することはできない。

【0143】

様々な種類の細胞において、AAVベクターは細胞に侵入した後または細胞に送達された後に細胞からの制限を受ける。これによって、AAVからの導入遺伝子（ガイドRNAなど）の発現効率が非常に低くなり、上述の用途におけるAAVベクターの有用性が大幅に損なわれてしまう。特定のアデノウイルスタンパク質は、AAVおよびAAVベクターの発現および複製を促進する。具体的には、いくつかの実施形態において、E4ORF6およびE1B55Kは、AAVベクターの作製においてヘルパータンパク質として使用され、かつ/またはガイドRNAをコードするAAVベクターの複製においてヘルパータンパク質として使用される。

【0144】

過去の研究では、野生型E1B55Kタンパク質または野生型E4ORF6タンパク質を使用することによって、DNA修復に関与する重要なタンパク質複合体（MRN複合体として知られている）を無効化することができることが示されている。MRN複合体の無効化によって細胞周期が停止し、DNA切断が修復されなくなるため、高い毒性がもたらされる。一方、E1B55KのH373A変異体やE1B55KのH354変異体はいずれも、MRN複合体を無効化しないということがわかってきた。このため、細胞においてAAVを複製するために変異型Adタンパク質を用いた場合、DNA修復機構を全く損なうことなく、安全性および有効性を向上させることができる。したがって、いくつかの実施形態において、野生型E1B55KとE1B55Kタンパク質のH373A変異体とを組み合わせ使用して使用する。いくつかの実施形態において、野生型E4ORF6とE1B55Kタンパク質のH354変異体とを組み合わせ使用して使用する。いくつかの実施形態において、野生型E4ORF6とE1B55Kタンパク質のH373A変異体とを併用しても、MRN複合体は無効化されない。いくつかの実施形態において、野生型E4ORF6とE1B55Kタンパク質のH354変異体とを併用しても、MRN複合体は無効化されない。いくつかの実施形態において、野生型E4ORF6とE1B55Kタンパク質のH373A変異体とを併用しても、細胞周期が停止することはない。いくつかの実施形態において、野生型E4ORF6とE1B55Kタンパク質のH354変異体とを併用しても、細胞周期が停止することはない。いくつかの実施形態において、野生型E4ORF6とE1B55Kタンパク質のH373A変異体とを併用しても、DNA切断修復の欠損によって毒性がもたらされることはない。いくつかの実施形態において、野生型E4ORF6とE1B55Kタンパク質のH354変異体とを併用しても、DNA切断修復の欠損によって毒性がもたらされることはない。

【0145】

いくつかの実験において、AAVを介した形質導入に変異型アデノウイルスタンパク質を使用すると、野生型アデノウイルスタンパク質を使用した場合と比べて初代細胞への形質導入効率が低下した。しかしながら、変異型アデノウイルスタンパク質を使用すると、CRISPR/Cas9に基づく遺伝子編集効率が劇的に向上した。いくつかの実施形態において、この遺伝子編集効率の向上は、AAVベクターからのgRNAの発現が増強されたことに起因すると考えられる。いくつかの実施形態において、上記の遺伝子編集効率の向上は、細胞のDNA修復環境が変化して、CRISPRにより作製された二本鎖切断の変異原性修復が促進されたことに起因すると考えられる。いくつかの実施形態において、上記の遺伝子編集効率の向上は、AAVベクターからのgRNAの発現が増強されたことと、細胞のDNA修復環境が変化して、CRISPRにより作製された二本鎖切断の変異原性修復が促進されたことの両方に起因すると考えられる。

【0146】

いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K-H373A変異体とを共発現させることによって、DNA修復能を全く損なうことなく、細胞侵入後のAAVからの発現の制限を十分に緩和することができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K-H354変異体とを共発現させることによって、DNA修復能を全く損なうことなく、細胞侵入後のAAVからの発現の制限を十分に緩和することができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K-H373Aとを共発現させることによって、遺伝子編集効率を大幅に向上させることができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K-H354とを共発現させることによって、遺伝子編集効率を大幅に向上させることができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K-H373Aとを共発現させることによって、CRISPR/Cas9を介した遺伝子編集効率を大幅に向上させることができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K-H354とを共

発現させることによって、CRISPR/Cas9を介した遺伝子編集効率を大幅に向上させることができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K-H373Aとを共発現させることによって、初代細胞において遺伝子編集効率を大幅に向上させることができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K-H354とを共発現させることによって、初代細胞において遺伝子編集効率を大幅に向上させることができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K-H373Aとを共発現させることによって、初代細胞においてCRISPR/Cas9を介した遺伝子編集効率を大幅に向上させることができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K-H354とを共発現させることによって、初代細胞においてCRISPR/Cas9を介した遺伝子編集効率を大幅に向上させることができる。

【0147】

10

いくつかの実施形態において、AAV-mRNAスプリットシステムを用いた、初代細胞にCRISPR/Cas9を導入するためのシステムが提供される。前記スプリットシステムのいくつかの実施形態において、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントとアデノウイルスタンパク質とをmRNAから一過性に発現させ、gRNAをAAVから恒常的に発現させる。いくつかの実施形態において、前記スプリットシステムを使用することによって、初代ヒト細胞における遺伝子編集効率が上昇した。

【0148】

いくつかの実施形態は、AAVベクターを使用して、初代細胞にCRISPRガイドRNAを導入する方法に関する。さらなる実施形態は、mRNAにコードされたCas9またはその誘導体もしくはフラグメントを初代細胞に導入する方法に関する。いくつかの実施形態において、融合タンパク質としてmRNAにコードされたCas9またはその誘導体もしくはフラグメントを初代細胞に導入する方法が提供される。いくつかの実施形態において、Cas9はC末端において蛍光色素と融合されている。いくつかの実施形態において、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントはN末端において蛍光色素と融合されている。いくつかの実施形態において、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントは蛍光色素と融合されており、自己切断配列（T2A配列など）によって蛍光色素とは隔てられている。いくつかの実施形態において、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントはNLSと融合されている。いくつかの実施形態において、NLSは、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントのN末端に融合されている。いくつかの実施形態において、NLSは、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントのC末端に融合されている。いくつかの実施形態において、NLSは、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントのN末端およびC末端に融合されている。いくつかの実施形態において、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントはmCherry蛍光色素が付加されている。

20

30

【0149】

いくつかの実施形態において、前記mRNAはポリAテールを含む。いくつかの実施形態において、ポリAテールの付加によってmRNAが安定化する。いくつかの実施形態において、ポリAテールの長さは、100塩基対以上、125塩基対以上、150塩基対以上、175塩基対以上、200塩基対以上、225塩基対以上、250塩基対以上、275塩基対以上、300塩基対以上、325塩基対以上、350塩基対以上、375塩基対以上、400塩基対以上、425塩基対以上、450塩基対以上、475塩基対以上、500塩基対以上のいずれかであり、または前記長さのいずれか2つによって定義される範囲にある長さである。いくつかの実施形態において、前記mRNAはベクターにコードされている。いくつかの実施形態において、前記mRNAはインビトロ転写によって前記ベクターから発現される。いくつかの実施形態において、前記mRNAは、ヌクレアーゼ、ヘリカーゼおよび/またはアデノウイルスタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、前記mRNAはCas9またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする。いくつかの実施形態において、前記mRNAはMegaTALまたはTALENをコードする。いくつかの実施形態において、前記mRNAはE4ORF6をコードする。いくつかの実施形態において、前記mRNAはE1B55Kをコードする。いくつかの実施形態において、前記mRNAはE1B55K H373Aをコードする。いくつかの実施形態において、前記mRNAはE1B55K H354をコードする。いくつかの実施形態において、前記m

40

50

RNAはTrex2をコードする。

【 0 1 5 0 】

いくつかの実施形態において、Cas9タンパク質とともにアデノウイルスタンパク質を発現させることが望ましい。初代ヒト細胞において、Cas9もしくはその誘導体もしくはフラグメント、TALENまたはMegaTALをコードし、かつポリ A テールを持つ複数のmRNAを効率よく共発現させることができる。前記ポリ A テールの長さは、1 0 0 塩基対以上、1 2 5 塩基対以上、1 5 0 塩基対以上、1 7 5 塩基対以上、2 0 0 塩基対以上、2 2 5 塩基対以上、2 5 0 塩基対以上、2 7 5 塩基対以上、3 0 0 塩基対以上、3 2 5 塩基対以上、3 5 0 塩基対以上、3 7 5 塩基対以上、4 0 0 塩基対以上、4 2 5 塩基対以上、4 5 0 塩基対以上、4 7 5 塩基対以上、5 0 0 塩基対以上のいずれかであり、または前記長さのいずれか2つによって定義される範囲にある長さである。いくつかの実施形態において、前記mRNAを使用して、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントを発現させる。いくつかの実施形態において、前記mRNAを使用して、野生型のアデノウイルスタンパク質を発現させる。いくつかの実施形態において、前記mRNAを使用して、変異型のアデノウイルスタンパク質を発現させる。いくつかの実施形態において、AAVを使用してガイドRNAを発現させる。いくつかの実施形態は、mRNAにコードされたアデノウイルスタンパク質を初代細胞に導入する方法に関する。いくつかの実施形態において、mRNAを使用して、アデノウイルスタンパク質である野生型E4ORF6を導入する。いくつかの実施形態において、mRNAを使用して、アデノウイルスタンパク質であるE1B55K H373A変異体を導入する。いくつかの実施形態において、mRNAを使用して、アデノウイルスタンパク質であるE1B55K H354変異体を導入する。いくつかの実施形態において、複数の別々のmRNAを使用して、野生型E4ORF6とE1B55K H373A変異体とを導入する。いくつかの実施形態において、複数の別々のmRNAを使用して、野生型E4ORF6とE1B55K H354変異体とを導入する。いくつかの実施形態において、mRNAはベクターに組み込まれている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAを含むAAVと、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントおよびE4ORF6およびE1B55K H373A変異体をコードするmRNAとを同時に導入するか、またはガイドRNAを含むAAVと、Cas9およびE4ORF6およびE1B55K H354変異体をコードするmRNAとを同時に導入する。いくつかの実施形態において、ガイドRNAを含むAAVと、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントおよびE4ORF6およびE1B55K H373A変異体をコードするmRNAとを順次に導入するか、またはガイドRNAを含むAAVと、Cas9およびE4ORF6およびE1B55K H354変異体をコードするmRNAとを順次に導入する。いくつかの実施形態において、ガイドRNAを含むAAVと、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントおよびE4ORF6およびE1B55K H373A変異体をコードするmRNAとが同時に同じ細胞中に存在するか、またはガイドRNAを含むAAVと、Cas9およびE4ORF6およびE1B55K H354をコードするmRNAとが同時に同じ細胞中に存在する。いくつかの実施形態において、mRNAを使用して、野生型のアデノウイルスタンパク質を一過性に発現させる。いくつかの実施形態において、mRNAを使用して、変異型のアデノウイルスタンパク質を一過性に発現させる。いくつかの実施形態において、mRNAを使用して、Cas9またはその誘導体またはフラグメント、野生型のアデノウイルスタンパク質および変異型のアデノウイルスタンパク質を一過性に同時に発現させる。いくつかの実施形態において、ガイドRNAは易分解性である。したがって、いくつかの実施形態においては、AAVを使用してガイドRNAを恒常的に発現させる。いくつかの実施形態において、ガイドRNAを含むAAVと、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントおよびE4ORF6およびE1B55K H373A変異体をコードするmRNAとが一過性に存在するか、またはガイドRNAを含むAAVと、Cas9およびE4ORF6およびE1B55K H354をコードするmRNAとが一過性に存在する。いくつかの実施形態において、ガイドRNAを含むAAVと、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントおよびE4ORF6およびE1B55K H373A変異体をコードするmRNAとが恒常的には存在しないか、またはガイドRNAを含むAAVと、Cas9およびE4ORF6およびE1B55K H354をコードするmRNAとが恒常的には存在しない。

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態において、E4ORF6およびE1B55K-H373Aの組み合わせと、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントとを共発現させることによって、DNA修復能を全く損な

10

20

30

40

50

うことなく、細胞侵入後のAAVからの発現の制限を十分に緩和することができる。この方法を利用し、これと同時に、Cas9によるターゲティングに必要なガイドRNAをAAVベクターから発現させることによって、毒性を最小限に抑え、Cas9を介した遺伝子編集効率を大幅に向上させることができる。これによって、AAVベクターの使用から通常予測される結果に反して、初代細胞におけるCRISPR/Cas9システムの適用可能性を大幅に向上・拡大させることができる。

【0152】

いくつかの実施形態において、初代細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させるための、アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、初代T細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させるための、アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、Jurkat T細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させるための、アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、mRNAとAAVとを併用した方法を利用して初代細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させるための、アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、mRNAとAAVとを併用した方法を利用して初代T細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させるための、アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、mRNAとAAVとを併用した方法を利用してJurkat T細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させるための、アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、CRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させるための、変異型アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、初代細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させるための、変異型アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、初代T細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させるための、変異型アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、Jurkat T細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させるための、変異型アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。

【0153】

いくつかの実施形態において、初代T細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させ、かつ相同組換え効率を向上させるための、アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、mRNAとAAVとを併用した方法を利用して初代T細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させ、かつ相同組換え効率を向上させるための、アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、CRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させ、かつ相同組換え効率を向上させるための、変異型アデノウイルスタンパク質の使用が提供される。いくつかの実施形態において、前記変異型アデノウイルスタンパク質は、初代T細胞においてCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率を向上させ、かつ相同組換え効率を向上させる。

【0154】

本発明の技術の適用は、初代ヒト細胞に限られない。いくつかの実施形態において、非ヒト配列を標的とするシステム、たとえば、病原生物を標的とするシステムが提供される。いくつかの実施形態において、非ヒト配列を標的とする方法、たとえば、病原生物を標的とする方法が提供される。いくつかの実施形態において、疾患を標的とするシステムが提供される。いくつかの実施形態において、疾患を標的とする方法が提供される。いくつかの実施形態において、前記疾患は、病原生物により引き起こされる感染性疾患であってもよい。いくつかの実施形態において、前記疾患は非感染性疾患であってもよい。

【0155】

非相同性末端結合（NHEJ）経路を介して二本鎖DNA切断の修復を行うと変異が起こらないことが多い。NHEJ経路により修復されたエンドヌクレアーゼ誘導性切断の大部分は、正確に再連結され、元のDNA配列に復元される。NHEJとは異なり、相同組換え修復（HDR）で

10

20

30

40

50

は、修復テンプレートが必要とされ、この経路を介した修復は不正確であり、切断部位において、DNA塩基の欠失および挿入、転座やテロメアの融合などの変異が起こることがある。

【0156】

いくつかの実施形態において、Cas9-mRNA/AAVガイドシステムを使用することによって、非相同性末端結合（NHEJ）の効率が上昇する。したがって、Cas9-mRNA/AAVガイドシステムの実施形態のいくつかでは、細胞中に修復テンプレートを導入する。いくつかの実施形態において、前記修復テンプレートはRNAである。いくつかの実施形態において、前記修復テンプレートはDNAである。いくつかの実施形態において、Cas9-mRNA/AAVガイドシステムを使用して相同組換え修復（HDR）を誘導し、変異率を上昇させる。いくつかの実施形態において、修復テンプレートを使用せずに、別のヌクレアーゼを用いたmRNA-AAVシステムを実施する。いくつかの実施形態において、修復テンプレートを使用せずに、別のヌクレアーゼを用いたmRNA-AAVシステムを実施することによって、非相同性末端結合（NHEJ）を起こさせる。いくつかの実施形態において、前記システムはヌクレアーゼをさらに含み、該ヌクレアーゼはMegaTALである。

10

【0157】

さらなる好ましい実施形態

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列；Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸配列；第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列；および第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を含み、CRISPRガイドRNAが、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であること、および第1の核酸配列がベクター中に含まれていることを特徴とするシステムが提供される。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は真核細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はヒト細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は初代細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は形質転換細胞ではない。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ベクターはウイルスベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸は、mRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸配列は、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントは、化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）に由来するものである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記mRNAは、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質はE4ORF6である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸は、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は変異型のE1B55Kである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は、配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4

20

30

40

50

の核酸配列は、ヒト細胞などの真核細胞において作動可能な調節エレメントに連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列は、調節エレメントに作動可能に連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする前記核酸配列は、U6プロモーターに作動可能に連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする前記核酸配列は構成的に発現される。

【0158】

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法であって、前記細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であるCRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列を含む第1のベクターを細胞に導入すること；Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸配列を前記細胞に導入すること；第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列を前記細胞に導入すること；および第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を前記細胞に導入することを含む方法が提供される。

10

【0159】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は真核細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は哺乳動物細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞はヒト細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は初代細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は形質転換細胞ではない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列を含む第1のベクターは、ウイルスベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列はmRNAである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記mRNAは、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントは、化膿レンサ球菌(*S. pyogenes*)に由来するものである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質はE4ORF6である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は変異型のE1B55Kである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は、配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む。

20

30

【0160】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAは、目的の遺伝子に相補的なガイドRNAであればどのようなものであってもよい。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAは目的の標的遺伝子に相補的である。目的とする標的遺伝子の例のいくつかとしては、TCR、PD-1、Tim3、Lag3、TIGITまたはHBBが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0161】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、TCRを標的とするCRISPRガイドRNA配列は、配列番号15、配列番号16、配列番号17または配列番号5で示される配列を含む。これらの配列を図16Aに示す。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、PD1を標的とするガイドのポリヌクレオチド配列の一例は、配列番号18に示される配列を含み、TIGITを標的とするガイドのポリヌクレオチド配列の一例は、配列番号19に示される配列を含み、Lag3を標的とするガイドのポリヌクレオチド配列の一例は、配列番号20に示される配列を含み、Tim3を標的とするガイドのポリヌクレオチド配列の一例は、配列番号21に示される配列を含む。これらの配列を図31に示す。

50

【0162】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列は、恒常的に前記細胞に導入されない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列を前記細胞に導入しても、細胞の形質転換は起こらない。前記方法および/または前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2の核酸配列、第3の核酸配列または第4の核酸配列はベクターに組み込んで提供される。いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法であって、本明細書に記載のシステムの実施形態のいずれかを細胞に導入することを含む方法が提供される。

【0163】

いくつかの実施形態において、対象の疾患および/または病態を治療、緩和または抑制する方法であって、疾患および/または病態を有し、これらの治療、緩和または抑制を必要とする対象に、本明細書に記載のシステムの実施形態のいずれかを提供することを含む方法が提供される。前記疾患および/または病態の例のいくつかとしては、鎌状赤血球症、高コレステロール血症、がん、自己免疫疾患、遺伝性代謝異常症、および免疫不全疾患または遺伝疾患（たとえば、対照のヒトゲノムと比較して細胞のゲノムに変化が起きていることから遺伝子産物に機能障害が生じたことを原因とする疾患）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0164】

さらなる実施形態

さらなる実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、Cas9タンパク質をコードする核酸；単独で、または別のタンパク質とともに、細胞中の少なくとも1つのユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変することができる少なくとも1つのタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸；および細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的である1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクターを含むシステムが提供され、前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記システムは、相同遺伝子ターゲティングのための核酸テンプレートを含むベクターをさらに含む。

【0165】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントと、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変する前記タンパク質は、同じ核酸上にコードされている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントと、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変する前記タンパク質は、2つ以上の核酸上にコードされている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は真核細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は哺乳動物細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞はヒト細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は初代細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は形質転換細胞ではない。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、1つまたは複数のガイドRNAをコードする前記ベクターはウイルスベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。いくつかの実施形態において、前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。

【0166】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする前記核酸はmRNAであり、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする第2の核酸もmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質をコードする前記核酸配列は、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントは、化膿レンサ球菌（S.py

10

20

30

40

50

ogenes) に由来するものである。

【0167】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質のいずれかをコードする1つまたは複数の前記核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質をコードする1つ以上の前記mRNAは、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質のうちの1つは、任意の血清型のアデノウイルスに由来するアデノウイルスタンパク質E4ORF6である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質のうちの1つは、任意の血清型のアデノウイルスのE1B55Kである。

10

【0168】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質のうちの1つは変異型のE1B55Kであり、この変異体は、野生型のE1B55Kタンパク質と比較して1つ以上のアミノ酸が置換または付加されており、これによって、細胞中のユビキチンリガーゼの基質特異性を改変する能力が、野生型のE1B55Kタンパク質のものとは異なっている。

20

【0169】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質のうちの1つは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。

【0170】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質のうちの1つは、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む。

【0171】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、上述した各核酸配列は、ヒト細胞などの真核細胞において作動可能な調節エレメントに連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする前記核酸配列は、調節エレメントに作動可能に連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする前記核酸配列は、U6プロモーターに作動可能に連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする前記核酸配列は構成的に発現される。いくつかの実施形態において、CRISPRガイドRNAをコードする前記核酸配列は、U6プロモーターに作動可能に連結されており、構成的に発現される。

30

【0172】

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法であって、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする核酸配列を前記細胞に導入すること；ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を前記細胞に導入すること；および前記細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であるCRISPRガイドRNAをコードする少なくとも1つの核酸配列を含むベクターを前記細胞に導入することを含む方法が提供され、前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記システムは、相同遺伝子ターゲティングのための核酸テンプレートを含むベクターを前記細胞に導入することをさらに含む。

40

【0173】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は真核細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は哺乳動物細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞はヒト細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記

50

細胞は初代細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は形質転換細胞ではない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記エンドヌクレアーゼをコードする第1の核酸配列を含む前記ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、Cas9はウイルスベクターにコードされている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAはウイルスベクターにコードされている。いくつかの実施形態において、Cas9とガイドRNAは、同じウイルスベクターにコードされている。いくつかの実施形態において、同じウイルスベクターにコードされたCas9とガイドRNAは、mRNAにコードされた1つ以上のAd5タンパク質と組み合わせて使用される。

10

【0174】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする前記核酸配列を含む前記ベクターは、ウイルスベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントをコードする核酸、および/またはユビキチンリガーゼの基質特異性を改変するタンパク質をコードする核酸は、mRNAである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記mRNAは、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。

20

【0175】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質またはその誘導体もしくはフラグメントは、化膿レンサ球菌(*S. pyogenes*)に由来するものである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変する前記タンパク質は、任意の血清型のアデノウイルスのE4ORF6である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変する前記タンパク質は、任意の血清型のアデノウイルスのE1B55Kである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は、配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0176】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAは、目的の遺伝子に相補的なガイドRNAであればどのようなものであってもよい。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAは目的の標的遺伝子に相補的である。目的とする標的遺伝子の例のいくつかとしては、TCR、TCR、PD-1、Tim3、Lag3、TIGITまたはHBBが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0177】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、TCRを標的とするCRISPRガイドRNA配列の一例は、配列番号15、配列番号16、配列番号17または配列番号5で示される配列を含む。これらの配列を図16Aに示す。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ポリヌクレオチド配列は、PD1を標的とするガイド(配列番号18)、TIGITを標的とするガイド(配列番号19)、Lag3を標的とするガイド(配列番号20)またはTim3を標的とするガイド(配列番号21)の一例を含む。これらの配列を図31に示す。

40

【0178】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、上述した各核酸配列は、一過性に前記細胞に導入される。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、上述した各核酸配列は、恒常的に前記細胞に導入されない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、上述した各核酸配列を前記細胞に導入しても、恒常的な細胞の形質転換は起こらない。

【0179】

本明細書に記載のシステムまたは方法の実施形態のいずれかにおいて、第2の核酸配列、第3の核酸配列または第4の核酸配列は、ベクターに組み込んで提供される。

50

【0180】

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法であって、本明細書に記載のシステムの実施形態のいずれかを細胞に導入することを含む方法が提供される。

【0181】

いくつかの実施形態において、対象の疾患および/または病態を治療、緩和または抑制する方法であって、疾患および/または病態を有し、これらの治療、緩和または抑制を必要とする対象に、本明細書に記載のシステムの実施形態のいずれかを提供することを含む方法が提供される。前記疾患および/または病態の例のいくつかとしては、鎌状赤血球症、高コレステロール血症、がん、自己免疫疾患、遺伝性代謝異常症、および免疫不全疾患または遺伝疾患（たとえば、対照のヒトゲノムと比較して細胞のゲノムに変化が起きていることから遺伝子産物に機能障害が生じたことを原因とする疾患）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0182】

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、細胞中の少なくとも1つの配列を標的とするエンドヌクレアーゼタンパク質をコードする核酸；および単独で、または別のタンパク質とともに、細胞中の少なくとも1つのユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変することができる少なくとも1つのタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸を含み、さらに、相同遺伝子ターゲティングのための核酸テンプレートを含むベクターを含んでいてもよいシステムが提供される。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ヌクレアーゼタンパク質と、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変する前記タンパク質は、同じ核酸上にコードされている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ヌクレアーゼタンパク質と、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変する前記タンパク質は、2つ以上の核酸上にコードされている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、相同遺伝子ターゲティングのための核酸テンプレートはDNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、相同遺伝子ターゲティングのための核酸テンプレートはRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は真核細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は哺乳動物細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞はヒト細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は初代細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は形質転換細胞ではない。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ベクターはウイルスベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。

20

30

【0183】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9ヌクレアーゼまたはその誘導体もしくはフラグメントをコードする前記核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ヌクレアーゼをコードする前記核酸配列は、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変する前記タンパク質のいずれかをコードする1つまたは複数の核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質をコードする1つ以上のmRNAは、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。

40

【0184】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質は、任意の血清型のアデノウイ

50

ルスに由来するアデノウイルスタンパク質E4ORF6である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質は、任意の血清型のアデノウイルスのE1B55Kである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質は変異型のE1B55Kであり、この変異体は、野生型のE1B55Kタンパク質と比較して1つ以上のアミノ酸が変化しており、これによって、細胞中のユビキチンリガーゼの基質特異性を改変する能力が、野生型のE1B55Kタンパク質のものとは異なっている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変するタンパク質は、1つ以上のウイルスタンパク質である。

10

20

30

40

50

【0185】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記エンドヌクレアーゼRNAをコードする前記核酸配列は、調節エレメントに作動可能に連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記エンドヌクレアーゼRNAをコードする前記核酸配列は、U6プロモーターに作動可能に連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記エンドヌクレアーゼRNAをコードする前記核酸配列は構成的に発現される。いくつかの実施形態において、前記エンドヌクレアーゼRNAをコードする前記核酸配列は、U6プロモーターに作動可能に連結されており、構成的に発現される。

【0186】

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法であって、エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を細胞に導入すること；およびユビキチンリガーゼ酵素またはユビキチンリガーゼ酵素複合体の基質特異性を改変するタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列を前記細胞に導入することを含む方法が提供され、前記方法は、前記細胞中の少なくとも1つのゲノム配列を相同遺伝子ターゲティングすることができる核酸テンプレートを前記細胞に導入することをさらに含んでいてもよい。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、相同遺伝子ターゲティングのための核酸テンプレートはDNAである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、相同遺伝子ターゲティングのための核酸テンプレートはRNAである。

【0187】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は真核細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は哺乳動物細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞はヒト細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は初代細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は形質転換細胞ではない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記エンドヌクレアーゼをコードする第1の核酸配列を含む前記ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントは、ウイルスベクターにコードされている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAはウイルスベクターにコードされている。いくつかの実施形態において、Cas9またはその誘導体もしくはフラグメントとガイドRNAは、同じウイルスベクターにコードされている。いくつかの実施形態において、同じウイルスベクターにコードされたCas9またはその誘導体もしくはフラグメントとガイドRNAは、mRNAにコードされた1つ以上のAd5タンパク質と組み合わせて使用される。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ヌクレアーゼをコードする

核酸、および／またはユビキチンリガーゼの基質特異性を改変するタンパク質をコードする核酸は、mRNAである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記mRNAは、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記エンドヌクレアーゼタンパク質は、メガヌクレアーゼ、TALEN、ジソクフィンガーヌクレアーゼまたはMegaTALである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変するタンパク質のうちの1つは、任意の血清型のアデノウイルスのE4ORF6である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変するタンパク質のうちの1つは、任意の血清型のアデノウイルスのE1B55Kである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変するタンパク質のうちの1つは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、ユビキチンリガーゼの基質特異性を改変するタンパク質のうちの1つは、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ヌクレアーゼは目的の遺伝子を標的とする。目的とする標的遺伝子の例のいくつかとしては、TCR、TCR、PD-1、Tim3、Lag3、TIGITまたはHBBが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0188】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、上述した各核酸配列は、一過性に前記細胞に導入される。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、上述した各核酸配列は、恒常的に前記細胞に導入されない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、上述した各核酸配列を前記細胞に導入しても、細胞の形質転換は起こらない。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、相同遺伝子ターゲティングの対象となる標的遺伝子は目的の遺伝子である。目的とする標的遺伝子の例のいくつかとしては、TCR、TCR、PD-1、Tim3、Lag3、TIGITまたはHBBが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載のシステムのいずれかまたは本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態のいくつかにおいて、前記核酸配列はベクターに組み込んで提供される。いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法であって、本明細書に記載のシステムの実施形態のいずれかを細胞に導入することを含む方法が提供される。

【0189】

いくつかの実施形態において、対象の疾患および／または病態を治療、緩和または抑制する方法は、疾患および／または病態を有し、これらの治療、緩和または抑制を必要とする対象に、本明細書に記載のシステムの実施形態のいずれかを提供することを含む。前記疾患および／または病態の例のいくつかとしては、鎌状赤血球症、高コレステロール血症、がん、自己免疫疾患、遺伝性代謝異常症、および免疫不全疾患または遺伝疾患（たとえば、対照のヒトゲノムと比較して細胞のゲノムに変化が起きていることから遺伝子産物に機能障害が生じたことを原因とする疾患）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0190】

当業者であれば、上述の説明を参照して、現時点で最良の形態だと考えられる本発明の態様を実施および使用することができるであろう。また、当業者であれば、本明細書に記載された特定の実施形態、方法および実施例の変更、組み合わせおよび等価物を容易かつ十分に理解するであろう。したがって、本発明の実施形態は、本明細書に記載の実施形態、方法および実施例に限定すべきではなく、本発明の実施形態の範囲および基本思想に含まれるあらゆる実施形態および方法によってその範囲が決まるものである。後述する実施例は、説明を目的として示したものであり、本発明を限定するものとして解釈されるべきでない。

【0191】

さらなる別の実施形態

本明細書に記載のCas9の態様は、本明細書に記載のシステムおよび／または方法のあらゆる実施形態において使用することができる。Cas9の態様のいくつかは以下の文献で開示されており、これらの文献は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる（Gilbert et al, Cell, Jul 18, 154(2): 442-451, 2013; Hilton et al, Nat Biotechnol. Apr 6, d

oi: 10.1038/nbt.3199, 2015 ; Qi et al, Cell, Feb 28; 152(5): 1173-1183, 2013 ; Esvelt et al, Nature Methods 10, 1116-1121, 2013 ; Zetsche et al, Nature Biotechnology, 33, 139-142, 2015 ; これらの文献はいずれも引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。RNA、DNAおよびタンパク質をゲノム標的領域に共局在させるCas9の能力によって、Cas9システムを使用した際の細胞の構成、調節および挙動に対し、かつてないレベルでの制御が可能となる(Maliら)。

【0192】

化膿レンサ球菌 (*S. pyogenes*) に由来するCas9のCRISPR関連触媒活性失活型バリエーション (dCas9またはヌクレアーゼ活性欠損型null Cas9) を使用して、RNA誘導型DNAターゲティングを行うことができる (Gilbertら ; この文献は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。調節タンパク質のエフェクタードメイン (たとえば、転写活性化因子 (以下、転写活性化ドメインと呼ぶ) または転写抑制因子 (以下、転写抑制ドメインと呼ぶ)) にdCas9を融合させると、ヒト細胞および酵母細胞において安定かつ効率的に転写の制御を行うことができる (Gilbertら ; この文献は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。dCas9の部位特異的送達、ガイドRNAによる誘導のみによってなされる (Gilbertら)。CRISPR干渉法 (CRISPRi) による転写抑制では、dCas9が転写抑制ドメインに結合することによって、真核細胞 (Gilbertら ; この文献は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる) や大腸菌 (Qiら ; この文献は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる) における遺伝子発現を強固かつ特異的に沈黙させることができる。

【0193】

したがって、いくつかの実施形態においては、二本鎖DNA切断を誘導することのない触媒活性失活型Cas9 (dCas9) を使用する。いくつかの実施形態において、dCas9は転写活性化ドメインに融合されている。いくつかの実施形態において、dCas9は転写抑制ドメインに融合されている。いくつかの実施形態において、dCas9 - 転写活性化ドメイン融合タンパク質はmRNAにコードされる。いくつかの実施形態において、dCas9 - 転写抑制ドメイン融合タンパク質はmRNAにコードされる。いくつかの実施形態において、dCas9 - 転写活性化ドメイン融合タンパク質をコードするmRNAは、ガイドRNAをコードするAAVベクターと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態において、dCas9 - 転写抑制ドメイン融合タンパク質をコードするmRNAは、ガイドRNAをコードするAAVベクターと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態において、dCas9 - 転写活性化ドメイン融合タンパク質をコードするmRNAは、Ad5タンパク質をコードするmRNAおよびガイドRNAをコードするAAVベクターと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態において、dCas9 - 転写抑制ドメイン融合タンパク質をコードするmRNAは、Ad5タンパク質をコードするmRNAおよびガイドRNAをコードするAAVベクターと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態において、dCas9 - 転写活性化ドメイン融合タンパク質によって転写が活性化される。いくつかの実施形態において、dCas9 - 転写抑制ドメイン融合タンパク質によって転写が抑制される。いくつかの実施形態において、dCas9 - 転写活性化ドメイン融合タンパク質による転写の活性化は、1つ以上のAd5タンパク質によってさらに増強される。いくつかの実施形態において、dCas9 - 転写抑制ドメイン融合タンパク質による転写の抑制は、1つ以上のAd5タンパク質によってさらに増強される。

【0194】

ヒトアセチルトランスフェラーゼの触媒コアとdCas9とからなる融合タンパク質によって、ヒストンH3がアセチル化され、プロモーターと近位および遠位のエンハンサーからの標的遺伝子の転写活性化が増強される (Hiltonら ; この文献は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)。したがって、いくつかの実施形態においては、ヒストン修飾酵素の機能性触媒ドメインにdCas9を融合させる。いくつかの実施形態において、機能性触媒ドメイン、たとえばヒストンアセチルトランスフェラーゼの触媒コアにdCas9を融合させる。いくつかの実施形態において、ヒストンデアセチラーゼの機能性触媒ドメインにdCas9を融合させる。いくつかの実施形態において、ヒストンメチルトランスフェラーゼの機能性触媒ドメインにdCas9を融合させる。いくつかの実施形態において、ヒストン修飾

酵素の機能性触媒ドメインに融合されたdCas9は、転写を活性化することができる。いくつかの実施形態において、ヒストン修飾酵素の機能性触媒ドメインに融合されたdCas9は、転写を抑制することができる。

【0195】

完全にオルソゴナルな（互いに独立した）一連のCas9タンパク質を使用したことによって、細菌およびヒト細胞において標的遺伝子の調節と編集とを同時かつ独立して行うことができたことが報告されている（Esveltら）。いくつかの実施形態において、Cas9バリエーションの種類によって、認識されるPAMバリエーションの種類が異なる（Kleinstiverら）。PAMは、Cas9の標的となるDNA配列の直後に位置するDNA配列である。したがって、いくつかの実施形態において、Cas9は化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）に由来するものである。いくつかの実施形態において、化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）由来のCas9バリエーションは、NGGプロトスペーサーPAMを認識することができる。いくつかの実施形態において、化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）由来のCas9バリエーションは、NGG配列を含まないPAMを認識することができる。いくつかの実施形態において、Cas9バリエーションは、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）に由来するものであってもよい。いくつかの実施形態において、Cas9バリエーションは、ストレプトコッカス・サーモフィラス（*Streptococcus thermophiles*）に由来するものであってもよい。いくつかの実施形態において、Cas9バリエーションは、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）に由来するものであってもよい。いくつかの実施形態において、Cas9バリエーションは、トレポネーマ・デンティコラ（*Treponema denticola*）に由来するものであってもよい。いくつかの実施形態において、Cas9の配列は、本明細書に記載の生物のうちの2種以上に由来するCas9コンセンサス配列であってよく、たとえば、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）とストレプトコッカス・サーモフィラス（*Streptococcus thermophiles*）に由来するCas9コンセンサス配列であってよい。いくつかの実施形態において、Cas9の配列は、本明細書に記載の生物のいずれかに由来するものであってもよく、本明細書に記載したその他の生物のいずれかにおける発現のためにコドン最適化されていてもよい。

【0196】

Cas9の望ましい実施形態の例として、化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）由来のCas9およびそのバリエーションが挙げられる。いくつかの実施形態において、Cas9は化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）に由来するものであってもよい。いくつかの実施形態において、Cas9は、化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）に由来するCas9のバリエーションであってよい。いくつかの実施形態において、Cas9は、化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）に由来するCas9のオーソログであってよい。いくつかの実施形態において、Cas9は、化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）に由来するCas9のオーソログのバリエーションであってよい。いくつかの実施形態において、Cas9は触媒活性を持たない。いくつかの実施形態において、dCas9は変異を有しているため活性を持たない。いくつかの実施形態において、dCas9は、タンパク質配列中にD10A変異とH841A変異を有しているため活性を持たない。

【0197】

誘導可能なゲノム編集および転写調節のためのCas9モジュール構造が報告されている。この構造では、Cas9がN末端側のモジュールとC末端側のモジュールに分割されており、各Cas9モジュールは、触媒活性を持つ二量体化ドメインとして機能し、互いに融合して二量体を形成する。それぞれが二量体化ドメインとして機能するこれら2つのCas9モジュールは、小分子（たとえば薬物）の作用により結合し、二本鎖切断能を有する機能性Cas9が形成されることが報告されている（Zetscheら；この文献は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）。したがって、いくつかの実施形態において、Cas9のN末端フラグメントが使用される。いくつかの実施形態において、Cas9のC末端フラグメントが使用される。いくつかの実施形態において、Cas9のN末端フラグメントとCas9のC末端フラグメントとを組み合わせ使用して使用する。いくつかの実施形態において、Cas9のN末端フラグメントを、二量体化ドメインに融合させる。いくつかの実施形態において、Cas9のC末端フラグメントを、二量体化ドメインに融合させる。いくつかの実施形態において、前記2つの二

量体化ドメインは、二量体を形成する。いくつかの実施形態において、前記2つの二量体化ドメインは、二量体を形成しない。いくつかの実施形態において、前記2つの二量体化ドメインは、薬物などの小分子の存在下において二量体を形成する。いくつかの実施形態において、前記2つの二量体化ドメインは、薬物などの小分子の存在下において二量体を形成しない。いくつかの実施形態において、前記2つの二量体化ドメインは、薬物などの小分子の非存在下において二量体を形成する。いくつかの実施形態において、前記2つの二量体化ドメインは、薬物などの小分子の非存在下において二量体を形成しない。いくつかの実施形態において、前記2つの二量体化ドメインが二量体を形成することによって、Cas9のN末端フラグメントとC末端フラグメントとが近接した位置に配置される。いくつかの実施形態において、前記2つのCas9フラグメントが近接した位置に配置されると、標的ゲノム座位において二本鎖DNAが切断される。Cas9のN末端フラグメントの望ましい実施形態において、Cas9のN末端フラグメントは、たとえば、1～203番目のアミノ酸残基、1～256番目のアミノ酸残基、1～311番目のアミノ酸残基、1～535番目のアミノ酸残基、1～573番目のアミノ酸残基、1～714番目のアミノ酸残基、1～1004番目のアミノ酸残基、1～1055番目のアミノ酸残基、1～1115番目のアミノ酸残基、1～1153番目のアミノ酸残基または1～1246番目のアミノ酸残基からなるCas9フラグメントであってもよい。Cas9のC末端フラグメントの望ましい実施形態において、Cas9のC末端フラグメントは、たとえば、204～1368番目のアミノ酸残基、257～1368番目のアミノ酸残基、312～1368番目のアミノ酸残基、536～1368番目のアミノ酸残基、574～1368番目のアミノ酸残基、715～1368番目のアミノ酸残基、1005～1368番目のアミノ酸残基、1056～1368番目のアミノ酸残基、1116～1368番目のアミノ酸残基、1154～1368番目のアミノ酸残基または1247～1368番目のアミノ酸残基からなるCas9フラグメントであってもよい。

【0198】

初代ヒトT細胞におけるエンドヌクレアーゼに基づく遺伝子編集

RNA誘導型エンドヌクレアーゼを将来的に様々な治療用途で使用するためには、この方法による遺伝子ターゲティングの効率を向上させる必要があると考えられる。これを実現するためには、相同組換え修復が容易に行われるように改変された初代細胞に3種のコンポーネント、すなわちエンドヌクレアーゼ、ガイドRNAおよび組換えテンプレートを送達し、それによって遺伝子組換えを目的とした遺伝子破壊および/または遺伝子ターゲティングを行うことのできる方法を開発する必要がある。

【0199】

たとえば、CRISPR/Cas9およびこれに関連するRNA誘導型エンドヌクレアーゼを将来的に様々な治療用途で使用するためには、この方法による遺伝子ターゲティングの効率を向上させる必要があると考えられる。これを実現するためには、相同組換え修復が容易に行われるように改変された初代細胞に3種のコンポーネント、すなわちCas9、ガイドRNAおよび組換えテンプレートを送達できる方法を開発する必要がある。したがって、いくつかの実施形態において、mRNA/AAV共送達を利用した初代ヒトT細胞におけるCRISPR遺伝子編集が企図される。

【0200】

いくつかの実施形態において、アデノウイルス由来の「ヘルパー」タンパク質である変異型のE4ORF6およびE1B55Kを使用した、CRISPR/Cas9を介した初代ヒトT細胞における高効率な遺伝子編集が提供される。

【0201】

いくつかの実施形態において、エレクトロポレーション/形質導入を介した共送達方法であって、mRNAを使用して、アデノウイルス由来のヘルパータンパク質である変異型のE4ORF6およびE1B55KとともにCas9を発現させる方法が提供される。いくつかの実施形態において、アデノウイルス由来のヘルパータンパク質である変異型のE4ORF6およびE1B55Kを使用することによって、AAVを介した形質導入に対する標的細胞の許容性と遺伝子編集効率

とを一過性に向上させることができる。

【0202】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法を使用することによって、一般的な細胞の1つ以上の座位および／または同時に複数の座位において効率的な遺伝子破壊を行うことができる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法を使用することによって、一般的な細胞の1つ以上の座位および／または同時に複数の座位において効率的な相同遺伝子ターゲティングを行うことができる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法を使用することによって、一般的な細胞の1つ以上の座位および／または同時に複数の座位において効率的な遺伝子破壊および相同遺伝子ターゲティングを行うこ

10

【0203】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法を使用することによって、初代細胞の1つ以上の座位および／または同時に複数の座位において効率的な遺伝子破壊を行うことができる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法を使用することによって、初代細胞の1つ以上の座位および／または同時に複数の座位において効率的な相同遺伝子ターゲティングを行うことができる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法を使用することによって、初代細胞の1つ以上の座位および／または同時に複数の座位において効率的な遺伝子破壊および相同遺伝子ターゲティングを行うことができる。

20

【0204】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法を使用することによって、初代T細胞の1つ以上の座位および／または同時に複数の座位において効率的な遺伝子破壊を行うことができる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法を使用することによって、初代T細胞の1つ以上の座位および／または同時に複数の座位において効率的な相同遺伝子ターゲティングを行うことができる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法を使用することによって、初代T細胞の1つ以上の座位および／または同時に複数の座位において効率的な遺伝子破壊および相同遺伝子ターゲティングを行うことができる。

30

【0205】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法を使用することによって、一般的なヒト細胞の1つ以上の座位および／または同時に複数の座位において効率的な遺伝子破壊および／または相同遺伝子ターゲティングを行うことができ、このことから、本明細書で提供されるシステムおよび／または方法は、翻訳遺伝子編集に広く適用可能であると考えられる。たとえば、いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法を使用することによって、初代ヒトT細胞の複数の座位において効率的な遺伝子破壊および／または相同遺伝子ターゲティングを行うことができ、このことから、本明細書で提供される方法は、翻訳遺伝子編集に広く適用可能であると考えられる。

40

【0206】

好ましい実施形態

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステムであって、1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列または複数の核酸配列のセット；Cas9タンパク質、またはCas9タンパク質をコードする第2の核酸配列；第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列；および第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を含み、1つ以上のCRISPRガイドRNAが、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的であること、および第1の核酸配列または複数の核酸配列のセットが、1つ以上のベクターに含まれていてもよいが、必ずしも1つ以上のベクターに含まれている必要はないことを特徴とするシステムが提供される。

【0207】

50

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は真核細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は哺乳動物細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞はヒト細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は初代細胞である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は形質転換細胞ではない。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。

【0208】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ベクターはウイルスベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記AAVベクターは自己相補型ベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記AAVベクターは一本鎖ベクターである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記AAVベクターは、自己相補型ベクターと一本鎖ベクターの組み合わせである。

10

【0209】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質をコードする第2の核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質をコードする第2の核酸配列は、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。

【0210】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質は、化膿レンサ球菌 (*S. pyogenes*) に由来するものである。

20

【0211】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸は、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質は血清型5型のAAVに由来するものである。

【0212】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質は野生型のE4ORF6である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、野生型のE4ORF6の配列は配列番号3で示される。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質は変異型のE4ORF6である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、変異型のE4ORF6タンパク質はAXA変異体である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、AXA変異体は配列番号23で示される。

30

【0213】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸はmRNAである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸は、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は血清型5型のAAVに由来するものである。

40

【0214】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は野生型のE1B55Kである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、野生型のE1B55Kの配列は配列番号1で示される。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は変異型のE1B55Kである。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、変異型のE1B55KはH373A変異体である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、H373A変異体の配列は配列番号2で示される。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、変異型のE1B55KはH354変異体である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、H354変異体の配列は配列番号4で示される。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、

50

変異型のE1B55KはR240A変異体である。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、R240A変異体の配列は配列番号22で示される。

【0215】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列は、ヒト細胞などの真核細胞において作動可能な調節エレメントに作動可能に連結されている。

【0216】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列は、調節エレメントに作動可能に連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列は、U6プロモーターに作動可能に連結されている。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列が2つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする場合、各ガイドRNAはそれぞれ別の調節エレメントに作動可能に連結されている。

10

【0217】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列は構成的に発現される。前記システムの実施形態のいくつかにおいて、CRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列は一過性に発現される。

【0218】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、TCR遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列は、配列番号5、配列番号15、配列番号16および/または配列番号17で示される。

20

【0219】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、PD1遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列は配列番号18で示され、TIGIT遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列は配列番号19で示され、Lag3遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列は配列番号20で示され、Tim3遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列は配列番号21で示される。

【0220】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記システムは、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、またはこれらの両方に使用することができる。

【0221】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列または複数の核酸配列のセットと、Cas9タンパク質、またはCas9タンパク質をコードする第2の核酸配列との代わりに、第5の核酸配列と第6の核酸配列とを使用し、第5の核酸配列はTALENヌクレアーゼのleftコンポーネントをコードするmRNAを含み、第6の核酸配列はTALENヌクレアーゼのrightコンポーネントをコードするmRNAを含む。

30

【0222】

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法であって、前記細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的である1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列または複数の核酸配列のセットを細胞に導入すること；Cas9タンパク質、またはCas9タンパク質をコードする第2の核酸配列を前記細胞に導入すること；第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列を前記細胞に導入すること；および第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列を前記細胞に導入することを含む方法が提供される。

40

【0223】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は真核細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は哺乳動物細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞はヒト細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は初代細胞である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は形質転換細胞ではない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞または腸細胞である。

50

【0224】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ベクターは、1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列または複数の核酸配列のセットを含み、1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする第1の核酸配列または複数の核酸配列のセットは、1つ以上のベクターに含まれていてもよいが、必ずしも1つ以上のベクターに含まれている必要はない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記AAVベクターは自己相補型ベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記AAVベクターは一本鎖ベクターである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記AAVベクターは、自己相補型ベクターと一本鎖ベクターの組み合わせである。

10

【0225】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列はmRNAである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記mRNAは、ヒト細胞などの真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。

【0226】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、Cas9タンパク質は、化膿レンサ球菌(*S. pyogenes*)に由来するものである。

【0227】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質は血清型5型のAAVに由来するものである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質は野生型のE4ORF6である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、野生型のE4ORF6の配列は配列番号3で示される。

20

【0228】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1のアデノウイルスタンパク質は変異型のE4ORF6である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、変異型のE4ORF6タンパク質はAXA変異体である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、AXA変異体の配列は配列番号23で示される。

【0229】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は血清型5型のAAVに由来するものである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は野生型のE1B55Kである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、野生型のE1B55Kの配列は配列番号1で示される。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2のアデノウイルスタンパク質は変異型のE1B55Kである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、変異型のE1B55KはH373A変異体である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、H373A変異体の配列は配列番号2で示される。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、変異型のE1B55KはH354変異体である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、H354変異体の配列は配列番号4で示される。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、変異型のE1B55KはR240A変異体である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、R240A変異体の配列は配列番号22で示される。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、E4ORF6バリエーションのいずれか1つは、E1B55Kバリエーションのいずれか1つと組み合わせて使用することができる。

30

40

【0230】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、同時にノックアウトされる遺伝子の数は2~10である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、同時にノックアウトされる遺伝子の数は2~5である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、mRNAの用量は0.01 μg~1 μgである。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、変異率は1.5倍~9倍高い。

【0231】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、TCR 遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列は、配列番号5、配列番号15、配列番号16および/または配列番号17で示される

50

。

【0232】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、PD1遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列は配列番号18で示され、TIGIT遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列は配列番号19で示され、Lag3遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列は配列番号20で示され、Tim3遺伝子を標的とするCRISPRガイドRNA配列は配列番号21で示される。

【0233】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列は、一過性に前記細胞に導入される。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列は、恒常的に前記細胞に導入されない。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列を前記細胞に導入しても、細胞の形質転換は起こらない。

【0234】

前記システムの実施形態のいくつかにおいて、前記標的遺伝子は目的の遺伝子である。前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記標的遺伝子は目的の遺伝子である。

【0235】

本明細書に記載の前記システムおよび/または前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第3の核酸配列および第4の核酸配列は前記AAVベクターに含まれている。

【0236】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第2の核酸配列を先に細胞に導入し、次いで、第1の核酸配列、第2の核酸配列および第3の核酸配列を含むAAVベクターを前記細胞に導入する。

【0237】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列および第3の核酸配列を含むAAVベクターを先に細胞に導入し、次いで第2の核酸配列を前記細胞に導入する。

【0238】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列、第2の核酸配列および第3の核酸配列を含むAAVベクターと、第2の核酸配列とを同時に細胞に共送達および共導入する。

【0239】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、前記システムは、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、またはこれらの両方に使用することができる。

【0240】

前記方法の実施形態のいくつかにおいて、第1の核酸配列または複数の核酸配列のセットと、Cas9タンパク質、またはCas9タンパク質をコードする第2の核酸配列との代わりに、第5の核酸配列と第6の核酸配列とを使用し、第5の核酸配列がTALENヌクレアーゼのleftコンポーネントをコードするmRNAを含み、第6の核酸配列がTALENヌクレアーゼのrightコンポーネントをコードするmRNAを含む。

【0241】

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集する方法は、本明細書に記載のシステムの実施形態のいずれかを細胞に導入することを含む。

【0242】

いくつかの実施形態において、対象の疾患および/または病態を治療、緩和および/または抑制する方法は、疾患および/または病態を有する対象に、本明細書に記載のシステムの実施形態のいずれかを提供することを含む。

【0243】

いくつかの実施形態において、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子を編集するためのシステム、および該システムをゲノム編集に使用する方法が企図される。いくつかの実施

10

20

30

40

50

形態において、標的遺伝子は目的の遺伝子であり、この遺伝子は編集または遺伝子破壊することができる。いくつかの実施形態において、前記細胞は初代T細胞である。

【0244】

いくつかの実施形態において、前記システムは、1つ以上のガイドRNAをコードする第1の核酸配列と、エンドヌクレアーゼタンパク質をコードする第2の核酸配列とを含む。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼは、本明細書で開示されたエンドヌクレアーゼおよび/またはそのバリエーションのいずれであってもよく、これらのエンドヌクレアーゼおよび/またはそのバリエーションの改変も本明細書による開示の範囲に含まれる。いくつかの実施形態において、第2の核酸はmRNAであり、本明細書で開示されたエンドヌクレアーゼタンパク質のいずれかをコードするものである。いくつかの実施形態において、10
エンドヌクレアーゼタンパク質をコードする第2の核酸配列は、真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のガイドRNAは、細胞中の少なくとも1つの標的遺伝子に相補的である。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のガイドRNAはベクターに組み込んで提供される。いくつかの実施形態において、前記ベクターはウイルスベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。いくつかの実施形態において、前記AAVベクターは、自己相補型ベクター、一本鎖ベクター、または自己相補型ベクターと一本鎖ベクターの組み合わせのいずれであってもよい。

【0245】

様々な種類の細胞において、AAVベクターは細胞に侵入した後に細胞からの制限を受けることから、AAVからの導入遺伝子(ガイドRNAなど)の発現効率が非常に低くなる。このため、さらなる核酸配列として、細胞に侵入したAAVベクターに対する制限を抑制するタンパク質が提供される。したがって、いくつかの実施形態において、前記システムは、第1のアデノウイルスタンパク質をコードする第3の核酸配列と、第2のアデノウイルスタンパク質をコードする第4の核酸配列とを含む。いくつかの実施形態において、第3核酸および第4の核酸はmRNAであり、真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、これらの核酸配列は、任意の順序で順次に細胞に導入してもよく、あるいは、同時に細胞に導入してもよい。

【0246】

いくつかの実施形態において、第1のアデノウイルスタンパク質および第2のアデノウイルスタンパク質は、血清型5型のAAVに由来するものである。いくつかの実施形態において、第1のアデノウイルスタンパク質は、野生型のE4ORF6またはE4ORF6のAXA変異体である。いくつかの実施形態において、第2のアデノウイルスタンパク質は、野生型E1B55K、E1B55KのH373A変異体、E1B55KのH354変異体、またはE1B55KのR240A変異体である。これらの変異タンパク質は、野生型タンパク質と比べて、細胞に侵入したAAVベクターに対する制限を抑制する効率はそれほど高くないが、遺伝子ターゲティングの増強においては比較的効率が低い。

【0247】

いくつかの実施形態において、第1の核酸配列、第2の核酸配列、第3の核酸配列および第4の核酸配列は、真核細胞において作動可能な調節エレメントに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、第1の核酸配列は、1つ以上のガイドRNAをコードすることができ、各ガイドRNAはそれぞれ別の調節エレメントに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードする第1の核酸配列は、細胞において一過性に発現される。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のガイドRNA配列は、TCR 遺伝子、PD1遺伝子、TIGIT遺伝子、Lag3遺伝子および/またはTim3遺伝子に相補的である。いくつかの実施形態において、前記システムは、目的の遺伝子に相同な核酸配列領域をさらに含む。

【0248】

いくつかの実施形態において、上述したコンポーネントを含む前記システムは、初代T細胞に導入される。目的の遺伝子に相同な核酸配列領域によって、エンドヌクレアーゼに

10

20

30

40

50

基づく前記システムを特定の遺伝子にターゲティングすることができる。特定の遺伝子をターゲティングすることによって、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックインまたはこれらの両方が可能となる。

【0249】

遺伝子ターゲティングの結果をフローサイトメトリーで評価するか、シーケンシングで評価するか、あるいはこれらの両方を使用して評価するかは、遺伝子ターゲティング方法の特性（ノックアウトまたはノックイン）によって決まる。たとえば、細胞表面発現タンパク質をコードする目的遺伝子をノックアウトすることを目的として前記システムを使用する場合、フローサイトメトリーを使用して、該タンパク質の細胞表面発現の抑制および/または欠損を確認することができる。あるいは、細胞内発現タンパク質をコードする目的遺伝子をノックアウトすることを目的として前記システムを使用する場合、フローサイトメトリーを使用して、該タンパク質の細胞内発現の抑制および/または欠損を確認することができる。あるいは、ノックインを目的として前記システムを使用する場合、たとえば、細胞表面発現タンパク質をコードする目的遺伝子に抗原由来ドミナントエピトープをノックインすることを目的として前記システムを使用する場合、フローサイトメトリーを使用して、該ドミナントエピトープの細胞表面発現を確認することができる。あるいは、ノックインを目的として前記システムを使用する場合、たとえば、細胞内発現タンパク質をコードする目的遺伝子に抗原由来ドミナントエピトープをノックインすることを目的として前記システムを使用する場合、フローサイトメトリーを使用して、該ドミナントエピトープの細胞内発現を確認することができる。また、上述した場合のいずれにおいても、所望の遺伝子ターゲティングがなされたかどうかを確認するために、ゲノムDNAのDNAシーケンシングを行うことができる。いくつかの実施形態において、ノックアウト、ノックインまたはこれらの両方を行うために同時にターゲティングすることができる遺伝子の数は、2～5つであってもよい。

【0250】

いくつかの実施形態において、遺伝子ターゲティングにより目的遺伝子が改変されたT細胞は、セルソーティングまたはその他の細胞濃縮法によって濃縮される。濃縮された細胞を使用して、対象の疾患および/または病態を治療、緩和および/または抑制しようとする場合、濃縮された細胞を対象に投与する。たとえば、いくつかの実施形態において、対象は、体内のT細胞が「疲弊した」ためになんらかの疾患および/または病態に陥っている可能性があり、したがって、このような疾患および/または病態から1つ以上の抗原を取り除いても効果的ではない。

【0251】

1つ以上の「疲弊」マーカー（たとえば、PD1、TIGIT、Lag3およびTim3）をターゲティングすることによって、「疲弊した」状態のT細胞を回復させることができる。いくつかの実施形態において、ターゲティングされたT細胞は、（たとえば静脈内経路を介して）対象に投与される。経過観察検査を対象に行って、ターゲティングされたT細胞の状態を確認し、対象の疾患および/または病態に対する該T細胞の効果を評価する。たとえば、いくつかの実施形態において、ターゲティングされたT細胞を投与した後、様々な時間間隔で対象から血液を採取する。いくつかの実施形態において、検査を行い、たとえば、投与したT細胞からのサイトカイン（たとえば、IL-2、TNF）の分泌を評価することによって、投与したT細胞が活性化されたかどうかを確認する。いくつかの実施形態において、ターゲティングされたT細胞を投与することによって、疾患および/または病態に対する効果が得られたかどうかを確認するために検査を行うこともできる。

【0252】

ヒトに対して使用される本明細書に記載のシステムおよび/または方法はいずれも、愛玩動物または商業目的で飼育される動物の1以上に対しても提供することができる。愛玩動物としては、イヌ、ネコ、モルモット、マウス、ラット、ウサギまたはハムスターを挙げることができるが、これらに限定されない。商業目的で飼育される動物としては、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ブタ、サルまたはゾウを挙げることができるが、これらに限定されない

。

【0253】

図面を参照しながら、CRISPR遺伝子編集を実施する具体的な方法を示した非限定的な実施例のいくつかを以下に詳細に説明する。本発明はこれらの実施例に限定されず、その他のエンドヌクレアーゼ、その他のエンドヌクレアーゼを含む他のシステムおよび他の方法、これらの典型的なシステムおよび方法の変更および改良はいずれも、過度な実験を行うことなく実施することができる。このような変更および改良はいずれも本発明の教示の範囲に含まれる。

【実施例】

【0254】

実施例1：mRNA/AAV送達方法によって初代ヒトT細胞においてCas9を介した遺伝子破壊が誘導される

10

いくつかの実施形態において、mRNA/AAV共送達を利用した初代ヒトT細胞におけるCRISPR遺伝子編集が提供される。

【0255】

AAV6由来のカプシドをベースとしたAAVベクターは、ヒト初代T細胞およびCD34⁺細胞への形質導入を十分効率的に行うことができ、TALENや他のヌクレアーゼの触媒作用による相同組換えのテンプレートとすることができる。したがって、Cas9の誘導による遺伝子ターゲットングを目的としたガイドRNAの一過性発現および組換えテンプレートの送達を実施するための、安全で効果的なベクターとしてAAVベクターを使用できると仮定した。

20

【0256】

いくつかの実施形態において、使用する細胞は、初代リンパ球、CD34⁺幹細胞、肝細胞、心筋細胞、神経細胞、グリア細胞、筋細胞、腸細胞のいずれであってもよく、これらに限定されない。

【0257】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAの一過性発現の持続時間は1分間～1週間であってもよく、前記値のいずれか2つによって定義される範囲にある時間であってもよい。

【0258】

いくつかの実施形態において、組換えテンプレートの大きさは0.05 kb～1 kbの範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、相同アームの長さは、0.05 kb、0.075 kb、0.1 kb、0.15 kb、0.2 kb、0.25 kb、0.3 kb、0.35 kb、0.4 kb、0.45 kb、0.5 kb、0.55 kb、0.6 kb、0.65 kb、0.7 kb、0.75 kb、0.8 kb、0.85 kb、0.9 kb、0.95、1 kbのいずれであってもよく、前記値のいずれか2つによって定義される範囲にある長さであってもよい。

30

【0259】

本明細書に記載の一連の実験および他のヌクレアーゼを使用した本発明者らの過去の経験から、mRNAエレクトロポレーション工程を最初に行うことによって、最も確実に実験を進めることができることがわかった。したがって、いくつかの実験においては、mRNAエレクトロポレーションを先に行い、次いでAAVによる形質導入を行う方法を標準的な方法として採用した。好ましい実施形態のいくつかにおいては、AAVによる形質導入の前にmRNAエレクトロポレーションを行う。

40

【0260】

いくつかの実験において、mRNAエレクトロポレーションによってspCas9を発現させ、かつAAVベクターを使用してガイドRNAを送達するmRNA/AAV送達方法の性能を評価するため、U6プロモーターにより発現が制御されるガイドRNAカセットとMNDプロモーターにより発現が制御されるGFPカセット（AAVによる形質導入の効率のモニタリングに使用）を含むAAV構築物を作製した。

【0261】

50

図1Aの上のパネルは、mRNAの作製を目的として、実験室で作製した様々なバックボーンにクローニングしたmCherry構築物またはCas9-T2A-mCherry構築物の模式図を示す。図1Aの中央および下のパネルは、TCRのゲノム座位におけるガイドRNAの位置を示す模式図を示す。自己相補型AAVベクターバックボーンおよび一本鎖AAVベクターバックボーンをガイドの発現に使用した。

【0262】

いくつかの実施形態において、単一のmRNAまたは複数のmRNAを使用して、1つ以上のヌクレアーゼを送達することができる。いくつかの実施形態において、単一のmRNAまたは複数のmRNAを使用して、1～5つのヌクレアーゼを送達することができる。いくつかの実施形態において、単一のmRNAまたは複数のmRNAを使用して、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのヌクレアーゼを送達することができる。

10

【0263】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のヌクレアーゼ、1つまたは複数のガイドRNA、1つまたは複数のヘルパータンパク質、1つまたは複数の相同領域を含むテンプレート、およびAAVに必要とされうる1つまたは複数のその他のコンポーネントを送達することが企図される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のヌクレアーゼ、1つまたは複数のガイドRNA、1つまたは複数のヘルパータンパク質、1つまたは複数の相同領域を含むテンプレート、ならびにmRNAおよびAAVに必要とされうる1つまたは複数のその他のコンポーネントのいずれか1つを送達することが企図される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のヌクレアーゼ、1つまたは複数のガイドRNA、1つまたは複数のヘルパータンパク質、1つまたは複数の相同領域を含むテンプレート、ならびにmRNAおよびAAVに必要とされうる1つまたは複数のその他のコンポーネントのいずれか2つを送達することが企図される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のヌクレアーゼ、1つまたは複数のガイドRNA、1つまたは複数のヘルパータンパク質、1つまたは複数の相同領域を含むテンプレート、ならびにmRNAおよびAAVに必要とされうる1つまたは複数のその他のコンポーネントのいずれか3つを送達することが企図される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のヌクレアーゼ、1つまたは複数のガイドRNA、1つまたは複数のヘルパータンパク質、1つまたは複数の相同領域を含むテンプレート、ならびにmRNAおよびAAVに必要とされうる1つまたは複数のその他のコンポーネントのいずれか4つを送達することが企図される。いくつかの実施形態において、mRNAを使用して、1つまたは複数のヌクレアーゼ、1つまたは複数のガイドRNA、1つまたは複数のヘルパータンパク質、および1つまたは複数の相同領域を含むテンプレートを送達することが企図される。

20

30

【0264】

いくつかの実施形態において、単一のmRNAまたは複数のmRNAを使用して、1つ以上のレポーターを送達することができる。いくつかの実施形態において、単一のmRNAまたは複数のmRNAを使用して、1～5つのレポーターを送達することができる。いくつかの実施形態において、単一のmRNAまたは複数のmRNAを使用して、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのレポーターを送達することができる。

【0265】

40

いくつかの実施形態において、AAVによる形質導入を使用して、1つ以上のレポーターを送達することができる。いくつかの実施形態において、AAVによる形質導入を使用して、1～5つのレポーターを送達することができる。いくつかの実施形態において、AAVによる形質導入を使用して、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのレポーターを送達することができる。

【0266】

いくつかの実施形態において、単一のmRNAまたは複数のmRNAを使用して、1つ以上のヌクレアーゼと1つ以上のレポーターを送達することができる。いくつかの実施形態において、単一のmRNAまたは複数のmRNAを使用して、1～5つのヌクレアーゼと1～5つのレポーターを送達することができる。いくつかの実施形態において、単一のmRNAまたは複数の

50

mRNAを使用して、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのヌクレアーゼと1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのレポーターを送達することができる。

【0267】

いくつかの実験において、AAVによる形質導入によってガイドを送達する前または送達した後に、Cas9 mRNA (Cas9-T2A-mCherry融合mRNA) のエレクトロポレーションを試験したところ、2種のガイドを使用したいいくつかのプロトコルにおいてTCR 遺伝子の定常領域がCas9によって適度に効率よく切断された。

【0268】

いくつかの実施形態において、AAVによる形質導入を使用して、1つ以上のガイドRNAを送達することができる。いくつかの実施形態において、AAVによる形質導入を使用して、1～5つのガイドRNAを送達することができる。いくつかの実施形態において、AAVによる形質導入を使用して、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのガイドRNAを送達することができる。

【0269】

いくつかの実施形態において、化学的に修飾されたガイドRNAを使用することが企図される。いくつかの実施形態において、化学的に修飾された複数のガイドRNAを別々のRNAとして提供することができる。したがって、いくつかの実施形態において、1つ以上の目的の標的遺伝子に対して1つ以上のガイドRNAが設計される場合、各ガイドRNAは、化学的に修飾された別々のガイドRNAとして提供される。たとえば、目的とする10個の別々の標的遺伝子に対して10個のガイドRNAを使用する場合、各ガイドRNAは化学的に修飾されたガイドRNAであり、各ガイドRNAは他のガイドRNAとは別個のRNA分子であり、他のガイドRNAとは異なる特徴を有する。いくつかの実施形態においては、10種のガイドRNAを同時または任意の順序で順次に細胞に導入することができる。

【0270】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAとあらかじめ複合体化されたCas9タンパク質をアデノウイルスタンパク質と併用する場合、ガイドRNAは化学的に修飾されたガイドRNAとして提供され、さらに、1つ以上の目的の標的遺伝子に対して1つ以上のガイドRNAが設計される場合、各ガイドRNAは、化学的に修飾された別々のガイドRNAとして提供される。

【0271】

したがって、いくつかの実施形態において、AAVによる形質導入の前にmRNAエレクトロポレーションを行ってもよい。いくつかの実施形態においては、AAVによる形質導入の後にmRNAエレクトロポレーションを行ってもよい。いくつかの実施形態においては、mRNAとAAVを共送達してもよい。

【0272】

いくつかの実験において、初代ヒトT細胞においてCas9 mRNAのトランスフェクションを最適化するため、Neonエレクトロポレーションシステムを使用して、様々な濃度のCas9-T2A-mCherry mRNAをCD4⁺T細胞にトランスフェクトした後、最初の24時間は30℃で培養し、次いで37℃に移した。図に示した量のCas9-T2A-mCherry mRNAをエレクトロポレーションで導入してから24時間後にT細胞のフローサイトメトリー分析を行った(図1C)。mCherry陽性細胞のパーセンテージを図1Cに示す。

【0273】

いくつかの実験において、初代ヒトT細胞においてAAVガイドの用量を分析するため、Cas9-T2A-mCherry mRNA 1 μgをCD4⁺T細胞にトランスフェクトした。エレクトロポレーションの2時間後に、TCR ガイドを発現するAAVをMOI=600またはMOI=6000(培養物の量の1%および10%にそれぞれ相当する)の濃度で使用して細胞への形質導入を行った。最初の24時間は30℃で細胞を培養し、次いで37℃に移し、実験中は37℃のまま維持した。エレクトロポレーション/形質導入の7日後に、TCR 遺伝子のノックアウトの指標として、細胞表面CD3の発現の欠失をフローサイトメトリーで分析した(図1D)。

【0274】

いくつかの実験において、mRNA/AAVを用いた形質導入プロトコルを使用して、Cas9 mRNAの用量範囲およびAAVガイドの用量範囲を評価し（図1Cおよび図1D）、Cas9による切断効率が最大となり、かつ毒性が最小となる用量範囲を決定した。いくつかの実験では、mRNAの用量は（本発明者らの標準的なエレクトロポレーション条件において1 μ gの用量で）飽和に達したと見られた。いくつかの実施形態において、mRNAの用量は0.05 ~ 3 μ gの範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、mRNAの用量は、0.05 μ g、0.1 μ g、0.15 μ g、0.2 μ g、0.25 μ g、0.3 μ g、0.35 μ g、0.4 μ g、0.45 μ g、0.5 μ g、0.55 μ g、0.6 μ g、0.65 μ g、0.7 μ g、0.75 μ g、0.8 μ g、0.85 μ g、0.9 μ g、0.95 μ g、1 μ g、1.25 μ g、1.5 μ g、1.75 μ g、2 μ g、2.25 μ g、2.5 μ g、2.75、3 μ gのいずれであってもよく、前記用量のいずれか2つによって定義される範囲にある用量であってもよい。

10

【0275】

いくつかの実験において、最大耐用量（MOI）を下回る用量において、AAVによるノックアウト効率の用量依存的な上昇が観察された。いくつかの実施形態において、AAVの用量は60 ~ 60,000の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、AAVの用量は、60、125、250、500、1,000、2,000、4,000、8,000、16,000、30,000、60,000のいずれであってもよく、前記用量のいずれか2つによって定義される範囲にある用量であってもよい。

20

【0276】

いくつかの実験において、Cas9/AAV.sgRNAを送達した初代ヒトT細胞においてT7エンドヌクレアーゼI（T7EI）切断アッセイを行うため、エレクトロポレーションによってCas9 mRNAを初代CD4⁺T細胞に導入し、その2時間後にAAV.sgRNAによる形質導入を行った。エレクトロポレーション/形質導入の10日後に、ゲノムDNAを細胞から単離し、T7エンドヌクレアーゼアッセイを実施した（図1B）。矢印は、予想された位置においてT7EIによって切断されたDNAバンドを示す（図1B）。

【0277】

いくつかの実験において、T7アッセイの結果、TCR 内の予測された標的部位周辺にアンプリコンが見られたことから、Cas9による切断はindelの形成として検出された（図1B）。また、いくつかの実験では、細胞表面TCR/CD3複合体の発現の欠失がフローサイトメトリーによって検出された（TCR/CD3複合体の発現には機能的なTCR 鎖の発現が必要とされる）（図1D）。

30

【0278】

いくつかの実験では、T7エンドヌクレアーゼIアッセイによって、TCR 座位の切断効率とCCR5座位の切断効率は同程度であったことが示された。

【0279】

いくつかの実験において、一本鎖AAVベクター（ssAAV）と自己相補型AAVベクター（scAAV）を比較した（図1E）。図1EのsgTCR はシングルガイドTCR を示す。いくつかの実験において、scAAVを用いたTCR ノックアウトとssAAV-GFPを用いたTCR ノックアウトとをフローサイトメトリーにより比較した。コントロールmCherryタンパク質またはCas9-T2A-mCherryタンパク質をコードするmRNAをエレクトロポレーションによって初代T細胞に導入して3時間静置した後、ガイドRNAの発現を誘導するAAVによる形質導入を行った。最初の24時間は30 で細胞を培養し、次いで37 に移した。エレクトロポレーション/形質導入の24時間後および96時間後に、mCherryおよびGFPの発現をフローサイトメトリーで検出することによって細胞を分析し、エレクトロポレーション/形質導入の7日後に細胞表面のCD3の発現を分析した。

40

【0280】

いくつかの実験において、細胞表面CD3の欠失を分析することによってCas9の標的切断効率を評価したところ、自己相補型AAVを使用した場合と一本鎖AAVを使用した場合との間で有意差は見られなかった（図1E）。したがって、いくつかの実験において、Cas9-mRN

50

Aとガイド-AAVとを併用することによって、初代細胞において効率的なTCRノックアウトが誘導され、また、自己相補型ガイドRNAおよび一本鎖ガイドRNAのいずれを用いた場合でも、CD3ノックアウトの効率は同程度であった。

【0281】

したがって、いくつかの実施形態において、AAVベクターは一本鎖AAVベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、AAVベクターは自己相補型AAVベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、AAVベクターは一本鎖AAVベクターと自己相補型AAVベクターの組み合わせであってもよい。

【0282】

実施例2：血清型5型のアデノウイルスのE4ORF6ヘルパータンパク質およびE1B55Kヘルパータンパク質は、AAVを介した形質導入に対する初代ヒトT細胞の許容性を向上させる

いくつかの実施形態において、アデノウイルスのE4ORF6タンパク質とE1B55Kタンパク質の併用により細胞侵入後のAAVに対する制限機構を緩和させることによって、初代ヒトT細胞におけるAAVを介した遺伝子発現が増強される。

【0283】

本発明者らが先に行った分析において、Cas9の切断効率がAAVの用量に依存することが示されたことから、T細胞においてmRNA/AAV法を実施するにあたり、AAVの形質導入効率が重要な制限要因となっていることが示唆された。多くの種類のヒト細胞において、AAVによる形質導入は、細胞への侵入段階では、細胞表面に発現された受容体に対するカプシドの結合特性によって制限され、細胞に侵入した後は別の複数のメカニズムによって制限されていることが知られている。細胞に侵入したAAVからの発現に対する制限要因としては、DNA損傷応答タンパク質によるゲノムのコンカテマー化、細胞周期DNA損傷チェックポイントの活性化、アポトーシス促進性DNA損傷シグナル伝達などが挙げられ、これらの制限要因は、プラスミドに基づいた発現系を用いて様々な血清型のアデノウイルスからE4ORF6タンパク質およびE1B55Kタンパク質を形質転換培養細胞において発現させることによって、効果的に緩和することができる。

【0284】

したがって、いくつかの実施形態において、E4ORF6タンパク質およびE1B55Kタンパク質は複数の血清型のアデノウイルスに由来するものであってもよい。いくつかの実施形態において、アデノウイルスの血清型は、Ad1、Ad2、Ad3、Ad4、Ad5、Ad6、Ad7のいずれであってもよい。さらに別の血清型であってもよく、これらの別の血清型も本発明による開示の範囲内である。いくつかの実施形態において、E4ORF6タンパク質およびE1B55Kタンパク質は同じ血清型のアデノウイルスに由来するものであってもよい。いくつかの実施形態において、E4ORF6は1つの血清型のアデノウイルスに由来するものであり、かつE1B55Kは別の血清型のアデノウイルスに由来するものであってもよい。

【0285】

DNAプラスミドに基づいた発現は初代T細胞に傷害を与えることから、いくつかの実験において、血清型5型のアデノウイルスのE4ORF6 mRNAおよびE1B55K mRNAをエレクトロポレーションにより導入することによって、細胞侵入後のAAVからの発現の制限を初代T細胞において一過性に緩和できるかどうかを評価した(図2)。

【0286】

いくつかの実験において、細胞に侵入したAAVに対する制限をE4ORF6とE1B55Kの併用により緩和し、次いでAAVを介したGFPの発現を評価した。血清型5型のアデノウイルスのE4ORF6およびE1B55KをそれぞれコードするmRNA(各0.33 μg)をエレクトロポレーションによって初代CD4⁺T細胞に導入して2~4時間静置した後、GFPの発現を誘導するAAVによる形質導入を行った。図に示した時間にわたって細胞を培養した後(図2A、左パネル)、細胞を回収し、フローサイトメトリーによりGFPの発現を分析した。さらに、左パネルに記載したプロトコルと同様にして、図に示したようにE4ORF6 mRNAおよびE1B55K mRNAをトランスフェクトし、AAVによる形質導入を行った後、細胞集団を増殖させた(図2A、右パネル)。

10

20

30

40

50

【0287】

いくつかの実験において、mRNAの導入により初代T細胞において（各タンパク質の単独発現（データ示さず）ではなく）E4ORF6およびE1B55Kを共発現させると、細胞増殖率を低下させることなく（図2A、右パネル）、プロモーター/GFPカセットをコードするAAVベクターによる発現誘導によって、GFPの平均蛍光強度（MFI）が4 log上昇し、GFPの発現が8倍上昇した（図2A、左パネル）。

【0288】

いくつかの実験形態において、GFP（または1つ以上のその他のレポーター）のMFIの上昇は、2 log ~ 8 logの範囲であってもよい。いくつかの実験形態において、GFP（または1つ以上のその他のレポーター）のMFIの上昇は、2 log、3 log、4 log、5 log、6 log、7 log、8 logのいずれであってもよく、前記値のいずれか2つによって定義される範囲にある増加率であってもよい。

10

【0289】

いくつかの実験形態において、GFP（または1つ以上のその他のレポーター）の発現の上昇は、2倍 ~ 16倍の範囲であってもよい。いくつかの実験形態において、GFP（または1つ以上のその他のレポーター）の発現の上昇は、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍のいずれであってもよく、前記値のいずれか2つによって定義される範囲にある倍率であってもよい。

【0290】

いくつかの実験において、AAV6を介した遺伝子発現に対するE4ORF6タンパク質とE1B55Kタンパク質の併用の効果を、自己相補型AAV6を使用した場合と一本鎖AAV6を使用した場合とで比較した。E4ORF6タンパク質およびE1B55Kタンパク質をそれぞれコードするmRNA（各0.33 μg）をエレクトロポレーションによって初代CD4⁺T細胞に導入して2 ~ 4時間静置した後、GFPの発現を誘導する一本鎖AAV6または自己相補型AAV6（各ウイルスのMOI = 2×10^4 ）による形質導入を行った（図2B）。図に示した期間にわたって細胞を培養した後、細胞を回収し、フローサイトメトリーによりGFPの発現を分析した（図2B）。

20

【0291】

いくつかの実験において、自己相補型AAVを使用したのか、一本鎖AAVを使用したのかに関わらず、同等の増強効果が観察されたことから（図2B）、E4ORF6-E1B55K複合体が、初代ヒトT細胞において、第2のDNA鎖の合成の開始とは関係なく、細胞侵入後のAAVからの発現の制限を緩和する強力な能力を発揮することが示唆された。したがって、いくつかの実験形態において、AAVベクターは一本鎖AAVベクターであってもよい。いくつかの実験形態において、AAVベクターは自己相補型AAVベクターであってもよい。いくつかの実験形態において、AAVベクターは一本鎖AAVベクターと自己相補型AAVベクターの組み合わせであってもよい。

30

【0292】

実施例3：AAVによる初代ヒトT細胞への形質導入は、細胞侵入後に主にMRN複合体による制限を受ける

いくつかの実験において、AAVによって誘導されるGFPの発現に対するE4ORF6と変異型E1B55Kの併用の効果を評価した。

40

【0293】

E4ORF6タンパク質とE1B55Kタンパク質とを併用することによって、培養細胞モデルにおいてAAVを介した発現を増強できることが知られているが、この増強効果は、Mre11/Rad51/NBS1 DNA修復複合体（MRN）を標的として、これを分解する該タンパク質の能力に左右されることが報告されている。E4ORF6タンパク質とE1B55Kタンパク質の併用によってMRN複合体が分解されると、核内に侵入してきたAAVゲノムが核内認識および核内サイレンシングを回避することが可能となる。

【0294】

いくつかの実験において、同じ機構を初代ヒトT細胞でも使用できるかどうかを調べる

50

ため、AAVの誘導による遺伝子発現のみを行った場合、野生型E4ORF6タンパク質と野生型E1B55Kタンパク質とを一過性に発現させ、次いでAAVの誘導による遺伝子発現を行った場合、E4ORF6とE1B55K-H373A変異体とを一過性に発現させ、次いでAAVの誘導による遺伝子発現を行った場合、およびE4ORF6とE1B55K-H354変異体とを一過性に発現させ、次いでAAVの誘導による遺伝子発現を行った場合を比較した(図2C)。使用した変異体はいずれも、MRNの分解を誘導する能力の大半が失われているが、野生型E4ORF6と野生型E1B55Kとの併用により得られるその他の機能は完全に維持されているものである。

【0295】

いくつかの実験において、Cas9-2A-mCherryをコードするmRNA(1 µg)と、図示したRNA用量の、E4ORF6タンパク質(野生型)およびE1B55Kタンパク質(野生型)または変異型E1B55K(図参照)をそれぞれコードするmRNAとをエレクトロポレーションによって初代CD4⁺T細胞に導入して2~4時間静置した後、TCRガイドおよびGFPの発現を誘導するssAAVによる形質導入を行った(図2C)。E4ORF6 mRNAの用量は、各点に示したE1B55K RNAの用量と同じとした(図2C)。細胞を2日間培養した後、細胞を回収し、フローサイトメトリーによりGFP MFIを分析した。さらに図3も参照すると、GFPの発現は、E4ORF6-E1B55K H373A変異体複合体の触媒作用によって2~3倍上昇したが、これは野生型E4ORF6-E1B55K複合体の触媒作用によるGFPの発現と同じスケールでは判別できなかった。

【0296】

いくつかの実験において、GFP MFIでの評価によれば、細胞侵入後のAAVからの発現の制限の緩和において、変異型のE1B55Kは、E4ORF6と併用した野生型のE1B55Kよりも著しく効率が悪く、その効果は用量依存的であった。したがって、MRN分解性E1B55Kの前記変異体を使用して、細胞侵入後のAAVからの発現の制限を完全に解除するためには、MRNの不活性化が必要であることがいくつかの実験により示された(図2C)。

【0297】

いくつかの実験において、以下の実験を繰り返し行った。まず、Cas9-2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA(1 µg)と、E4ORF6および野生型E1B55Kまたは変異型E1B55K(図参照)をそれぞれコードするmRNA(各0.03 µg)をエレクトロポレーションによって初代CD4⁺またはCD3⁺ヒトT細胞に導入して2~4時間静置した後、ガイドの発現およびGFPを誘導するAAVによる形質導入を行った。図に示した時間にわたって細胞を培養した後、細胞を回収し、フローサイトメトリーにより分析してGFPの発現および平均蛍光強度(MFI)を定量した。図3Aおよび図3Bは独立した実験(n=5~6)の結果を示す。

【0298】

いくつかの実験において、E1B55K-H373A変異体を使用して、小スケール分析による繰り返し実験を行ったところ、E4ORF6とE1B55K-H373Aとを共発現させたことによって、GFPの発現が、E4ORF6とE1B55Kの非発現下と比べて有意に上昇した(96時間後において1.58 ± 0.09倍)。この結果は、細胞に侵入したAAVによる形質導入または発現に対する制限を緩和する能力が、E1B55K-H373Aにいくらか残っていることと一致する(図3Aおよび図3B)。

【0299】

いくつかの実験において、別の2種の変異体、すなわち、p53の分解に対するE1B55Kの触媒能が破壊されているE1B55K R240A(配列番号22;図33)、およびE1B55Kと低効率で結合して概して低機能性のE4ORF6-E1B55K複合体を生じるE4ORF6 AXA(配列番号23;図34)を使用することによって、他の公知のE4ORF6とE1B55Kとを併用した場合であっても、細胞侵入後のAAV形質導入に対する制限を緩和するという機能的役割がT細胞において発揮されるかどうかを評価した。いくつかの実施形態において、E4ORF6 AXA変異体(配列番号23;図34)には、2種の多型(R243AおよびL245A)が存在する。

【0300】

これらの変異体は、MRN複合体に対して完全な分解能(R240A)または部分的な分解能(AXA)を発揮する。また、これらの変異体は、T細胞に侵入したAAVからの発現を制限するMRNに対して重要な役割を果たしており、このことと一致して、AAVを用いてT細胞に形質導

入されたGFPの発現に対して完全な増強能 (R240A) または部分的な増強能 (AXA ; データ示さず) を保持していた (図 3 C および図 3 D)。さらに、いくつかの実験では、図 3 に示したように、高用量 (0 . 3 3 μ g) の mRNA をエレクトロポレーションによって導入することにより AXA と E1B55K とを共発現させた場合においては AAV ベクターからの GFP の発現を増強することができたが、その 1 0 分の 1 の用量では GFP の発現を増強できなかった。

【 0 3 0 1 】

したがって、いくつかの実施形態において、野生型および変異型の E4ORF6 タンパク質と野生型および変異型の E1B55K タンパク質との様々な組み合わせの使用が企図される。たとえば、いくつかの実施形態において、様々な形態の E4ORF6 タンパク質 (たとえば、野生型または AXA 変異体) のいずれか 1 つを、様々な形態の E1B55K タンパク質 (たとえば、野生型、H373A 変異体、H354 変異体、R240A 変異体など) のいずれか 1 つと組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態において、野生型および変異型の E4ORF6 と野生型および変異型の E1B55K の様々な組み合わせは、別々の mRNA から送達されてもよい。いくつかの実施形態において、野生型および変異型の E4ORF6 と野生型および変異型の E1B55K の様々な組み合わせは、単一の mRNA から送達されてもよい。

10

【 0 3 0 2 】

実施例 4 : E4ORF6 と E1B55K-H373A 変異体の共発現および E4ORF6 と E1B55K-H354 変異体の共発現によって、初代ヒト T 細胞における CRISPR を介した ノックアウトの効率が向上する

いくつかの実験において、アデノウイルスの E4ORF6 タンパク質と E1B55K タンパク質とを併用して、CRISPR を介した初代ヒト T 細胞の遺伝子 ノックアウトの効率の向上を評価した。

20

【 0 3 0 3 】

本研究において実施した先の分析において、E4ORF6 タンパク質と E1B55K タンパク質の併用によって、AAV の誘導による GFP の発現が増強されたことから、AAV ゲノムに組み込まれ、pol III によって転写される U6 プロモーター / ガイド RNA カセットからのガイド RNA の発現量および / または発現持続時間も、E4ORF6 タンパク質と E1B55K タンパク質の一過性共発現によって向上し、ひいては、mRNA / AAV システムを使用した Cas9 媒介性遺伝子破壊の効率が上昇する可能性があるかと仮定した。

【 0 3 0 4 】

いくつかの実験において、野生型の E4ORF6 タンパク質および E1B55K タンパク質をそれぞれコードする mRNA ならびに Cas9 をエレクトロポレーションにより導入する工程と、TCR ガイド RNA および プロモーター / GFP 発現 カセットをコードする AAV ベクターを用いて細胞への形質導入を行う工程とを含む mRNA / AAV 共送達 プロトコルを使用して、野生型の E4ORF6 タンパク質および E1B55K タンパク質を共発現させ、上記仮説を試験した。同様に、AAV により誘導される GFP 発現に対する E4ORF6 と変異型 E1B55K の併用の効果も評価した。

30

【 0 3 0 5 】

いくつかの実験において、図 2 に示した分析から予想されたように、野生型の E4ORF6 タンパク質および E1B55K タンパク質を共発現させることによって、TCR ガイド / GFP AAV からの GFP の発現が顕著に上昇した。

【 0 3 0 6 】

いくつかの実験において、AAV からの発現が顕著に上昇していたにもかかわらず、TCR の ノックアウト 効率はわずかにしか上昇せず (図 4 A)、低用量の AAV ベクターにおいてもわずかにしか上昇しなかった (図 4 B、上パネル)。

40

【 0 3 0 7 】

いくつかの実験において、Cas9 を発現させなかった場合には見られなかった明らかな毒性が観察された (CD3⁺ 細胞数が安定せず、CD3⁺ 細胞が経時的に消失した)。いくつかの実験において、Cas9-T2A-mCherry タンパク質をコードする mRNA (1 μ g) と、高用量または低用量 (0 . 3 3 μ g または 0 . 0 3 μ g) (図参照) の、野生型 E4ORF6 タンパク質および野生型 E1B55K タンパク質または図に示した変異体をそれぞれコードする mRNA とをエレクトロポレーションによって初代 CD4⁺ ヒト T 細胞または初代 CD3⁺ ヒト T 細胞に導入して 2 ~ 4

50

時間静置した後、TCR ガイドの発現を誘導するAAVによる形質導入を行った。細胞を培養し、図に示した時間点においてフローサイトメトリーによりTCR /CD3の発現を分析した (図 5 A)。

【 0 3 0 8 】

いくつかの実験において、E4ORF6-E1B55K複合体に起因する特異的な生化学的活性が遺伝子編集に及ぼす影響についての情報を得るため、H373A変異体、H354変異体、R240A変異体およびAXA変異体を発現させ、TCR のノックアウト効率を様々な条件で比較した (図 4)。

【 0 3 0 9 】

いくつかの実験において、Cas9-T2A-mCherryをコードするmRNA (1 μ g) と、E4ORF6 (野生型) および / またはE1B55K (野生型) および / または図に示した変異体をそれぞれコードするmRNA (それぞれ 0 . 3 3 μ g または 0 . 0 3 μ g) とをエレクトロポレーションによって初代CD4⁺T細胞に導入して2 ~ 4 時間静置した後、TCR ガイドの発現を誘導するAAVによる形質導入を行い、その代表的な実験結果に関連するデータを示した (図 4 A) 。細胞を培養した後、回収し、エレクトロポレーション / 形質導入後の図に示した時間点においてフローサイトメトリーによってCD3の発現を分析した。図 4 A の上のパネルは、CD3のノックアウト効率の定量を示す。図 4 A の下のパネルは、エレクトロポレーション / 形質導入の7日後に行った実験の代表的なフローサイトメトリープロットを示す。

【 0 3 1 0 】

いくつかの実験形態において、mRNA/AAVを用いたCRISPRコンポーネントの送達による遺伝子ノックアウトの効率は、変異型のE1B55Kによって向上する。予想されたとおり (すなわち図 2 C に示されたように) 、E4ORF6とE1B55K-H373A変異体またはE1B55K-H354変異体とを共発現させたことによるGFP発現への効果は非常にわずかであったが、予想外にも、毒性やCD3⁺細胞の欠失を伴わずに、TCR のノックアウト効率が大幅に上昇したことが確認された (図 4 A および図 5 A) 。

【 0 3 1 1 】

いくつかの実験において、これらの変異型E1B55Kは、細胞に形質導入した後のAAVからの遺伝子発現に対する制限を完全に解除する能力は有していないものの、mRNA/AAVを用いた送達方法によって達成される遺伝子ノックアウトの効率を全体的に顕著に向上させるのに十分な活性を保持していた。これは、いくつかの実験においてE4ORF6とE1B55K R240A変異体を共発現させて得られた結果から裏付けられた。いくつかの実験においては、野生型E4ORF6と野生型E1B55Kの共発現よりも毒性が増強されるとともに、CD3のノックアウト効率が著しく低下した (図 4 A および図 4 C) 。p53に対する不活性化能はR240Aでは欠損しており、H373A変異体およびH354変異体では保持されているが、いくつかの実験においては、このp53の不活性化が、H373AおよびH354のノックアウト効率向上特性に寄与していることがわかった。

【 0 3 1 2 】

いくつかの実験において、Cas9-T2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA (1 μ g) と、野生型E4ORF6タンパク質および野生型E1B55Kタンパク質または図に示した変異型E1B55KをそれぞれコードするmRNAとをエレクトロポレーションによって初代CD4⁺T細胞に導入して2 ~ 4 時間静置した後、TCR ガイドの発現を誘導するAAVによる形質導入を行ったところ、mRNA/AAV送達を利用して遺伝子編集されたT細胞は正常な増殖動態を示すことがわかった。図に示した期間にわたって細胞を培養し、培養期間中に細胞の一部を採取し、細胞増殖を定量するために細胞をカウントした。図 4 C の左のパネルは、E4ORF6と変異型E1B55Kとを低用量 (0 . 0 3 μ g) でエレクトロポレーションによって導入し、高用量のAAV (MOI = 約 6 0 0 0) を用いて形質導入を行った結果を示す。図 4 C の右のパネルは、E4ORF6 RNAとE1B55K-R240A RNAとを低用量または高用量 (0 . 3 3 μ g) でエレクトロポレーションによって導入し、低用量または高用量のAAVを用いて形質導入を行った結果を示す。

【 0 3 1 3 】

10

20

30

40

50

いくつかの実験でのH373A変異体を使用した用量 / 反応試験において、0.04 μ g 未満までmRNAの用量を減らしても、TCR のノックアウト効率に対する向上効果がほぼ完全に維持されていたことから、H373A変異体およびH354変異体はCas9媒介性遺伝子破壊に対して非常に強力な効果を発揮することが示された (図5B)。いくつかの実施形態において、mRNAの用量は0.01 μ g ~ 1 μ gであってもよい。いくつかの実施形態において、mRNAの用量は、0.01 μ g、0.02 μ g、0.03 μ g、0.04 μ g、0.05 μ g、0.06 μ g、0.07 μ g、0.08 μ g、0.09 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g、0.3 μ g、0.4 μ g、0.5 μ g、0.6 μ g、0.7 μ g、0.8 μ g、0.9 μ g、1 μ gのいずれであってもよく、前記用量のいずれか2つによって定義される範囲にある用量であってもよい。

10

【0314】

いくつかの実験において、Cas9-T2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA (1 μ g) と、図に示した用量の、E4ORF6およびE1B55K H373AをそれぞれコードするmRNAとをエレクトロポレーションによって初代CD4⁺ヒトT細胞に導入して2~4時間静置し、TCR ガイドの発現を誘導するAAVによる形質導入を行った後、この初代CD4⁺ヒトT細胞をフローサイトメトリーによって分析した。その代表的なフローサイトメトリープロットを図5Bに示した。細胞は1週間にわたって培養した後、回収し、フローサイトメトリーによりTCR / CD3の発現を分析した (図5B)。

【0315】

いくつかの実験において、CRISPRを介したノックアウトに対するE4ORF6とE1B55K MRN不活性化能欠損変異体の併用の効果を評価した (図4B)。いくつかの実験において、2つの濃度 (MOI) のAAVを用いて実施した独立した実験 (n = 3 ~ 4) の定量化を行った。いくつかの実験において、初代ヒトCD4⁺T細胞または初代ヒトCD3⁺T細胞を使用した実験データでは、エレクトロポレーション / 形質導入の7日後におけるCD3染色を定量化したところ、E1B55K H373A変異体およびE1B55K H354変異体はいずれも、CRISPRを介したTCR ノックアウト効率を顕著に上昇させることが示された (図4B)。したがって、いくつかの実施形態において、E4ORF6と変異型E1B55Kの併用によってTCRノックアウト効率が向上する。

20

【0316】

いくつかの実施形態において、indelスペクトラムに対するE4ORF6とE1B55K MRN不活性化能欠損変異体の併用の効果を評価した。Cas9-T2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA (1 μ g) と、E4ORF6およびE1B55K H373AまたはH354をそれぞれコードするmRNA (0.03 μ g) とをエレクトロポレーションによって初代CD4⁺ヒトT細胞に導入して2~4時間静置した後、TCR ガイドの発現を誘導するAAVによる形質導入を行った。細胞を1週間培養した後、回収し、ゲノムDNAを単離し、TCR を取り囲む領域をPCRで増幅し、ベクターにクローニングし、サンガーシーケンシングを使用して分析した (図5C)。

30

【0317】

いくつかの実験において、E4ORF6-E1B55K H373A変異体複合体またはE4ORF6-E1B55K H354変異体複合体を使用したCas9媒介性遺伝子破壊によって誘導されたindelスペクトルのアンプリコンシーケンシングを実施したところ、いずれのE4ORF6-E1B55K変異体複合体を使用した場合でも、予測されたとおり変異率の上昇が示され、また、予想されたCas9切断部位全体にわたって、最大で150bpの大きな欠失の増加が見られた (図5C)。いくつかの実験において、変異率は1.5倍~10倍高くなった。いくつかの実験において、変異率は、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍または10倍高くなり、前記値のいずれか2つによって定義される範囲にある倍率で高くなった。

40

【0318】

実施例5：E4ORF6とE1B55K H373A変異体の併用およびE4ORF6とE1B55K H354変異体の併用は、初代ヒトT細胞においてCRISPR/Cas9を介した相同組換え効率を向上させる

mRNA/AAV共送達法により可能となる遺伝子破壊の効率は、E4ORF6とE1B55K H373A変異体

50

の併用またはE4ORF6とE1B55K H354変異体の併用によって得られる生化学的活性および生化学的能力によって向上することから、E4ORF6とE1B55K H373A変異体の併用およびE4ORF6とE1B55K H354変異体の併用は、相同組換え遺伝子ターゲティングの効率に対しても同様に向上効果を発揮すると仮定した。この仮説を試験するため、Cas9をコードするmRNAと、E4ORF6および野生型E1B55KまたはH373A変異体またはH354変異体をそれぞれコードするmRNAとをエレクトロポレーションによって初代ヒトT細胞に導入した後、様々なAAVベクターを別々に用いて細胞に形質導入することによってガイドRNAの発現と組換えテンプレートの送達を行った（図10）。

【0319】

いくつかの実施形態において、1つ以上のガイドRNAを別々のAAVベクターに組み込んで提供してもよい。いくつかの実施形態において、相同組換えのための1つ以上のテンプレートを別々のAAVベクターに組み込んで提供してもよい。いくつかの実施形態において、相同組換えのための1つ以上のガイドRNAおよび1つ以上のテンプレートを同じAAVベクターに組み込んで提供してもよい。いくつかの実施形態において、特定の標的遺伝子を相同組換えするための1つ以上のガイドRNAおよびテンプレートは、別々のAAVベクターに組み込んで提供してもよい。いくつかの実施形態において、特定の標的遺伝子を相同組換えするための1つ以上のガイドRNAおよびテンプレートは、同じAAVベクターに組み込んで提供してもよい。

【0320】

MaxCyte GTまたはNeonシステムを使用したエレクトロポレーションによって、Cas9-2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA（1 μ g）と、野生型E4ORF6タンパク質および野生型E1B55Kタンパク質または図に示した変異型E1B55KをそれぞれコードするmRNA（各0.03 μ g）とを初代CD4⁺T細胞または初代CD3⁺T細胞に導入して2～4時間静置した後、CCR5ガイドの発現とCCR5座位用のターゲティングテンプレートとを誘導する様々なAAVを別々に用いて形質導入を行った（図15）。細胞を培養した後、細胞を回収し、フローサイトメトリーによりBFPの発現を分析した。エレクトロポレーション/形質導入の3週間後に、フローサイトメトリーによって、図示した遺伝子操作を分析した。独立した実験（n = 5～6）における代表的なフローサイトメトリープロットを示す（図10A）。

【0321】

いくつかの実験において、エレクトロポレーション/形質導入の3週間後に独立した実験（n = 5～6）を行い、ノックインの頻度（BFP⁺細胞）をベースライン（Cas9 + ガイド + ドナー）に対するfold change（倍率変化）として求めた（図10B）。

【0322】

これらの実験において、Cas9を単独使用した場合、Cas9と2種のAAVのそれぞれを組み合わせた場合のいずれにおいても、17.6 \pm 4.0%の効率でCCR5座位にプロモーター-BFPカセットが組み込まれた。いくつかの実験において、本研究において様々なE4ORF6-E1B55K複合体を使用することによって観察された結果と一致して、野生型E4ORF6-E1B55K複合体は、H373A変異体またはH354変異体を使用した場合や、Ad5タンパク質を使用しなかった場合と比較して、初期のBFPの発現を大幅に増強したことが観察された（図6、上パネル）。

【0323】

いくつかの実験において、E4ORF6およびE1B55K-H354の組み合わせまたはE4ORF6およびE1B55K-H373Aの組み合わせとCRISPR/Cas9とを併用することによって、相同組換え修復（HDR）におけるfold changeが有意に上昇した（図10B）。いくつかの実験では、遺伝子ノックアウトに対して発揮された各変異複合体の効果と同様に、各変異複合体を発現させることによって組換えゲノム編集の効率が有意に上昇し（図10Aおよび図10B）、相同組換え修復効率が1.8倍高くなった（H373Aを使用した場合はBFP⁺が31.2 \pm 5.7%上昇し、H354を使用した場合はBFP⁺が30.8 \pm 1.8%上昇した）。

【0324】

いくつかの実施形態において、相同組換え修復効率は、E4ORF6およびE1B55K-H354の組

10

20

30

40

50

み合わせまたはE4ORF6およびE1B55K-H373Aの組み合わせとCRISPR/Cas9とを併用することによって、野生型E4ORF6タンパク質と野生型E1B55Kタンパク質の組み合わせを使用した場合と比べて1.5～3.5倍高くなりうる。いくつかの実施形態において、相同組換え修復効率は、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍、3倍、3.25倍または3.5倍高くすることができ、前記値のいずれか2つによって定義される範囲にある倍率高くすることができる。

【0325】

したがって、いくつかの実施形態において、変異型のE1B55Kタンパク質を使用することによって、標的ノックイン効率を向上させることができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6と変異型E1B55Kとを併用することによって標的CRISPRノックイン効率を向上させることができる。いくつかの実施形態において、mRNA/AAV共送達により達成されるCRISPRを介した組換えの効率は、E4ORF6とE1B55K H373A変異体の併用およびE4ORF6とE1B55K H354変異体の併用によって向上する。

10

【0326】

mRNA/AAVを使用したCRISPRを介した組換えにより編集されたT細胞が正常な増殖動態を示したかどうか調べるため、コントロールタンパク質またはCas9-2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA (1 µg) と、野生型E4ORF6および野生型E1B55Kまたは上記変異型E1B55KをそれぞれコードするmRNA (各0.03 µg) とをエレクトロポレーションによって初代T細胞に導入して2～4時間静置した後、CCR5ガイドの発現とAAV CCR5 BFPテンプレート誘導するAAVによる形質導入を行った。図に示した期間にわたって細胞を培養し、細胞を回収し、細胞増殖を定量するために細胞をカウントした(図10C)。

20

【0327】

(野生型であるか変異型であるかに関わらず) E4ORF6-E1B55K複合体を発現させても、相同組換え遺伝子ターゲティングを受けたT細胞の増殖率は影響を受けなかったことは重要である(図10C)。

【0328】

実施例6：E4ORF6タンパク質と変異型E1B55Kタンパク質の併用は、AAVによる非相同挿入効率を向上しない

いくつかの実験において、Cas9-2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA (1 µg) と、野生型E4ORF6タンパク質および野生型E1B55Kタンパク質または図に示した変異型E1B55KをそれぞれコードするmRNA (各0.03 µg) とをエレクトロポレーションによって初代CD3⁺T細胞または初代CD4⁺T細胞に導入して2～4時間静置した後、CCR5ガイドの発現を誘導するAAVと相同アームに挟まれていないプロモーター-GFPカセットを含むAAVとによる形質導入を行った。図に示した期間にわたって細胞を培養した後、細胞を回収し、フローサイトメトリーによりGFPの発現を分析した。96時間後に検出されるGFP蛍光は、主としてエピソームAAVゲノムからの発現を反映する。3週間後に検出されるGFP蛍光は、エピソームとして核内に留まっているAAVゲノムと染色体に組み込まれたAAVゲノムの両方からの発現を反映する。独立した実験(n=5～6)の結果を示す(図6)。

30

【0329】

いくつかの実験では、相同アームを持たないAAVを用いて初代T細胞においてCas9誘導性二本鎖切断を行うと挿入効率が低くなることが示された。この結果を示した代表的なフローサイトメトリープロットを図6に示す。

40

【0330】

上記ガイドを発現するAAVとCCR5相同アームを持たないプロモーター/蛍光色素カセットを含むAAVとをCas9とともに共送達した後、蛍光色素の発現率を長期にわたって評価した結果からわかったように、(野生型であるか変異型であるかに関わらず) E4ORF6-E1B55K複合体を発現させても、AAVを用いた非相同組込みの効率に影響を与えなかったことは重要である(図6、上パネル)。

【0331】

したがって、いくつかの実施形態において、野生型E4ORF6タンパク質と野生型E1B55Kタ

50

ンパク質の併用は、AAVを用いたCRISPRノックアウトの標的部位における非特異的組込みの効率をやや向上させるが、変異タンパク質ではこのような向上効果は見られない。

【0332】

実施例7：E4ORF6と変異型E1B55Kの併用はTCR以外の座位におけるCRISPRシングルノックアウトの効率も向上させる

いくつかの実験において、他のゲノムを標的としたCRISPR/Cas9遺伝子破壊の効率に対して、E4ORF6-E1B55K H373A変異複合体およびE4ORF6-E1B55K H354変異複合体が与える影響を評価した。いくつかの実験において、複数のガイドRNAを作製し、4種の翻訳関連ヒト表面タンパク質標的、すなわち、T細胞に発現する抑制性チェックポイントタンパク質であるPD-1、TIGIT、LAG-3およびTim3を標的として、作製したガイドRNAの検証を行った。PD1を標的とするガイドRNAは配列番号18（図31）で表され、TIGITを標的とするガイドRNAは配列番号19（図31）で表され、LAG-3を標的とするガイドRNAは配列番号20（図31）で表され、Tim3を標的とするガイドRNAは配列番号21（図31）で表される。いくつかの実験において、形質導入/発現をモニタリングするため、AAVベクターバックボーンのMND-GFPカセットの上流に位置するU6ガイド発現カセットに1つ以上の上記ガイドRNAを組み込んでAAVベクターにパッケージングした。

10

【0333】

MaxCyte GTシステムを使用して、Cas9-2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA（1 μ g）と、E4ORF6タンパク質およびE1B55K-H373Aタンパク質をそれぞれコードするmRNA（各0.03 μ g）とをエレクトロポレーションによって初代ヒトCD3⁺T細胞に導入して2～4時間静置し、図に示した表面タンパク質を標的とするガイドの発現を誘導するAAVによる形質導入を行った。細胞を培養して増殖させた。初期刺激の9～12日後、Dyna1 CD3/CD28ビーズを使用して48時間にわたって細胞を再刺激し、細胞を回収して、図に示した表面タンパク質の発現をフローサイトメトリーによって分析し、アンブリコンシーケンシングによってノックアウトを評価した。mRNA/AAV共送達を利用して遺伝子編集されたT細胞において、標的とした表面チェックポイントタンパク質が欠失していたことが代表的なフローサイトメトリープロットから示された。独立した遺伝子編集実験（n = 3～5）のデータを示す。代表的なフローサイトメトリーデータを図7Aに示す。

20

【0334】

いくつかの実験において、フローサイトメトリーによるノックアウト分析は、表面タンパク質の発現誘導の欠損率（%）より評価した。独立した遺伝子編集実験（n = 3～5）のデータを示す（図7B）。フローサイトメトリーによる遺伝子ノックアウト分析およびゲノム標的部位からのアンブリコンシーケンシング分析における定量結果と要約データを図7Bに示す。

30

【0335】

したがって、いくつかの実施形態において、ゲノム標的部位からのアンブリコンシーケンシング分析によってノックアウト効率を評価することができる。いくつかの実施形態において、（標的遺伝子によってコードされるタンパク質が細胞表面に発現される場合）フローサイトメトリーによってノックアウト効率を評価することができる。したがって、いくつかの実施形態において、ゲノム標的部位からのアンブリコンシーケンシング分析と、（標的遺伝子によってコードされるタンパク質が細胞表面に発現される場合）フローサイトメトリーによる表面発現分析とによってノックアウト効率を評価することができる。

40

【0336】

いくつかの実験において、MaxCyte GTエレクトロポレーションシステムに基づいて増殖/製造をスケールアップしたところ、E4ORF6およびE1B55K H373A変異体の組み合わせと上記AAVベクターとを併用することによって、製造されたヒトT細胞集団における各標的遺伝子のおおよその破壊効率は、PD-1の目標切断部位におけるindel発生率として約71.6 \pm 2.7%、TIGITの目標切断部位におけるindel発生率として約59.1 \pm 14.8%、LAG-3の目標切断部位におけるindel発生率として約59.2 \pm 8.5%、Tim3の目標切断部位におけるindel発生率として約66.1 \pm 14.3%となったことが、配列分析（PD-

50

1、TIGIT、Tim3) またはフローサイトメトリー (LAG-3) からわかった。

【0337】

したがって、いくつかの実施形態において、mRNA/AAV送達によってCRISPR/Cas9を介したゲノム編集を行うことによって、複数のゲノム部位において効率的なノックアウトを達成することができる。

【0338】

さらに、これらの実験から見出された2つ目の重要な点として、特定のガイドRNAの活性が比較的低い場合、E4ORF6-E1B55K H373A変異複合体が遺伝子破壊効率に与える影響は特に顕著であったことが挙げられる。たとえば、選択したガイドRNAを用いたPD-1座位およびTIGIT座位でのノックアウト効率は、E4ORF6とE1B55Kを共発現させなかった場合は、それぞれわずか36.4 ± 10.9%および40.4 ± 3.6%に留まったが、E4ORF6とE1B55K H373Aを共発現させた場合は上記ノックアウト効率の2倍となった。いくつかの実験において、ノックアウト効率はシーケンシングによって評価した。

【0339】

したがって、いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K H373Aの共発現の特に顕著な特徴として、低活性のガイドRNAを「レスキュー」できることが挙げられる。言い換えれば、いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K H373Aを共発現させることによって、低活性ガイドRNAの活性を増強することができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6タンパク質とE1B55Kタンパク質を共発現させても、高活性のガイドRNAの効果は、低活性ガイドRNAと比べてそれほど効果的には増強されない。

【0340】

いくつかの実施形態において、低活性のガイドRNAによる導入効率はわずか5%~30%である。いくつかの実施形態において、低活性のガイドRNAによる導入効果は、わずか5%、10%、15%、20%、25%もしくは30%に留まるか、または前記値のいずれか2つによって定義される範囲内に留まる。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K H373Aを共発現させることによって、低活性ガイドRNAの活性が5%~150%増強される。いくつかの実施形態において、E4ORF6とE1B55K H373Aを共発現させることによって、低活性ガイドRNAの活性が、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%もしくは150%増強されるか、または前記値のいずれか2つによって定義される範囲にあるパーセンテージで増強される。

【0341】

実施例8：初代ヒトT細胞においてE4ORF6とE1B55K H373A変異体を共発現させることによってCRISPRを介した2つの遺伝子の多重ノックアウトの効率が向上する

本研究の様々な分析に基づき、単一のAAVベクターを使用して複数のガイドを送達することによって効率的に多重ノックアウトを行うことができると仮定した。いくつかの実施形態において、単一のAAVベクターを使用して、1つ以上のガイドを送達することができる。いくつかの実施形態において、単一のAAVベクターを使用して、1~5つのガイドを送達することができる。いくつかの実施形態において、単一のAAVベクターを使用して、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのガイドを送達することができる。いくつかの実施形態において、単一のAAVベクターを使用して、1つのガイドが送達される。いくつかの実施形態において、複数の別々のAAVベクターを使用して、複数の別々のガイドが送達される。

【0342】

いくつかの実験において、MaxCyte GTシステムを使用して、Cas9-2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA (1 μg) と、E4ORF6タンパク質およびE1B55K-H373Aタンパク質をそれぞれコードするmRNA (各0.03 μg) とをエレクトロポレーションによって初代ヒトCD3⁺T細胞に導入して2~4時間静置した後、形質導入効率をモニタリングするためのGFPの発現とTim3およびTCR それぞれに対するガイドの発現とを誘導するAAVによる形質導入

を行った。細胞を培養して増殖させた。エレクトロポレーション / 形質導入の 7 日後に、細胞を CD3 染色して TCR のノックアウトを評価した。初期刺激の 3 週間後、PMA / イオノマイシンで細胞を 3 ~ 4 時間再刺激し、次いで 48 時間かけて細胞を刺激から回復させ、細胞を回収し、Tim3 の発現をフローサイトメトリーによって分析した (図 8) 。

【 0 3 4 3 】

いくつかの実験において、上記のシングルガイド AAV ベクターと同じ構成を利用して、各ガイドがそれぞれの U6 プロモーターによって誘導されるデュアルガイド Tim3 / TCR ベクターを構築した。各ガイドを誘導する U6 プロモーターを含み、Tim3 および TCR それぞれに対するガイド RNA を発現する多重 AAV ベクターの模式図を図 8 A に示す。いくつかの実験において、E4ORF6 と E1B55K-H373A の組み合わせまたは Cas9 単独を MaxCyte エレクトロポレーションによって導入し、Tim3 シングルガイドを含む AAV または Tim3 / TCR デュアルガイドを含む AAV を用いて、AAV による形質導入を行った後、TCR および Tim3 のノックアウトを分析した。

10

【 0 3 4 4 】

エレクトロポレーション / 形質導入の 7 日後に行った、CD3 染色による TCR ノックアウトのフローサイトメトリー分析の代表的な結果を図 8 B に示す。初期刺激の 3 週間後に行った、TCR ノックアウトおよび Tim3 ノックアウトのフローサイトメトリー分析の代表的な結果を図 8 C に示す。いくつかの実験において、TCR を介さずに Tim3 の表面発現をアップレギュレートするため、PMA (10 ng / mL) / イオノマイシン (1 μ g / mL) を使用して細胞を 3 ~ 4 時間刺激し、その後 48 時間静置した。

20

【 0 3 4 5 】

いくつかの実験において、PMA / イオノマイシン処理の存在下または非存在下のコントロール細胞 (AAV 処理のみ) と、Tim3 をノックアウトした PMA / イオノマイシン刺激細胞と、Tim3 および TCR をノックアウトした PMA / イオノマイシン刺激細胞とを比較することによって、PMA / イオノマイシン刺激の存在下または非存在下での Tim3 のアップレギュレーションを評価した。TCR シグナル伝達能を有する細胞と、TCR シグナル伝達を欠損している細胞との間では差がなかったことから、PMA / イオノマイシン刺激はこの経路とは無関係であることが示唆された。図 8 D において、非染色細胞は透けた灰色で示す。

【 0 3 4 6 】

いくつかの実験においては、E4ORF6 および E1B55K-H373A の組み合わせと Cas9 とを共トランスフェクトすることによって、ノックアウト効率が上昇するとともに、単一の AAV を使用して両方の標的遺伝子をノックアウトすることができた。

30

【 0 3 4 7 】

いくつかの実験では、Tim3 シングルガイド AAV とデュアル Tim3 ガイド / TCR ガイド AAV との間でノックアウト効率に有意差は見られなかった。さらに、いくつかの実験において、Tim3⁺ 細胞の大部分は CD3⁺ 細胞であった (つまり TCR⁺ であった) 。このことは、ガイドの発現が誘導されて 1 つの標的遺伝子が切断されるように十分効率よく形質導入された細胞であれば、さらに別の標的遺伝子に対するガイドも高発現するはずであるという予想した結果と一致している。

【 0 3 4 8 】

したがって、いくつかの実施形態において、E4ORF6 と E1B55K-H373A を共発現させた初代ヒト T 細胞に Cas9 mRNA / AAV ガイドを送達することによって、CRISPR を介した効率的な多重ノックアウトを行うことができる。いくつかの実施形態において、E4ORF6 と変異型 E1B55K の併用は、CRISPR を介した 2 つ以上の遺伝子の多重ノックアウトの効率を向上させる。いくつかの実施形態において、E4ORF6 と変異型 E1B55K の併用は、CRISPR を介した 2 つの遺伝子の多重ノックアウトの効率を向上させる。

40

【 0 3 4 9 】

実施例 9 : 初代ヒト T 細胞において E4ORF6 と E1B55K-H373A 変異体を発現させることによって CRISPR を介した 5 つの遺伝子の多重ノックアウトの効率が向上する

いくつかの実験において、5 つの遺伝子の多重ノックアウトを行った。いくつかの実験

50

において、分析を行う前に、細胞を3週間培養して増殖させた。刺激しなかった細胞では細胞表面タンパク質の有意な発現は見られなかった。1条件あたり100万個の細胞を使用して、PMA (10 ng/mL) とイオノマイシン (1 µg/mL) とで刺激し、チェックポイントタンパク質の表面発現をアップレギュレートした。PMA/イオノマイシンを培地に加えて3時間培養した後、細胞をPBSで4回洗浄し、完全培地中で48時間かけて細胞を刺激から回復させ、図に示した細胞表面タンパク質 (CD3、PD1、Tim3、Lag3およびTIGIT) を染色して遺伝子ノックアウトを測定した。

【0350】

データを図9に示す。上のパネルは、Cas9 RNAとAAVガイド構築物のみを導入した細胞のデータを示す。下のパネルは、Cas9 RNAとAAVガイド構築物に加え、エレクトロポレーションの際にE4ORF6 RNAおよびE1B55K-H373A RNAを導入した細胞のデータを示す。

10

【0351】

いくつかの実験において、5つの遺伝子を同時に多重欠失させることができた。したがって、いくつかの実施形態において、本発明の開示による方法を使用して、少なくとも2つの遺伝子を欠失させることができる。いくつかの実施形態において、本発明の開示による方法を使用して、少なくとも5つの遺伝子を欠失させることができる。いくつかの実施形態において、本発明の開示による方法を使用して、1~10個の遺伝子を欠失させることができる。いくつかの実施形態において、本発明の開示による方法を使用して、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個の遺伝子を欠失させることができる。いくつかの実施形態において、本発明の開示による方法を使用して、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個または少なくとも10個の遺伝子を欠失させることができる。

20

【0352】

いくつかの実施形態において、AAVによる形質導入によって、1つ以上の遺伝子を標的とする1つ以上のガイドRNAを送達することができる。いくつかの実施形態において、AAVによる形質導入によって、1~10個の遺伝子を標的とする1~5個のガイドRNAを送達することができる。いくつかの実施形態において、AAVによる形質導入によって、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個の遺伝子を標的とする1個、2個、3個、4個または5個のガイドRNAを送達することができる。

30

【0353】

実施例10：CRISPR-Cas9を介したCCR5座位への遺伝子ノックインを短い相同アームを使用して実施した場合、E4ORF6とE1B55K H373Aの組み合わせをさらに導入することによって相同組換え修復がレスキューされる

いくつかの実験において、短い相同アームを持つテンプレートを使用したCRISPR/Cas9による低効率の相同組換え修復ノックインに対する、Ad5タンパク質 (2種の変異型E1B55K (H373AまたはH354) のいずれかとE4ORF6との併用) の導入の効果を評価した。

【0354】

いくつかの実験において、Cas9 RNAと、CCR5遺伝子に対するガイドを発現するAAVと、様々な長さの相同アーム (0.8 kb、0.5 kbまたは0.25 kb) を持つGFPノックイン構築物を含むAAVドナーと、E4ORF6およびE1B55K H354変異タンパク質またはH373A変異タンパク質をそれぞれ発現するRNAとで初代ヒトT細胞を処理した実験 (n = 2 ~ 5) を行い、その定量化を行った。実験結果を図11に示す。エレクトロポレーションおよび形質導入を行った3週間後、0.8 kbの相同アームを含むAAVドナーを用いたCRISPR-Cas9をベースラインとし、ベースラインからの変化に基づいて相同組換え修復におけるfold changeを算出した。

40

【0355】

いくつかの実施形態において、相同アームの長さは0.05 kb ~ 1 kbの範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、相同アームの長さは、0.05 kb、0.075 kb、0.1 kb、0.15 kb、0.2 kb、0.25 kb、0.3 kb、0.35

50

k b、0.4 k b、0.45 k b、0.5 k b、0.55 k b、0.6 k b、0.65 k b、0.7 k b、0.75 k b、0.8 k b、0.85 k b、0.9 k b、0.95 k b、1 k bのいずれであってもよく、前記長さのいずれか2つによって定義される範囲にある長さであってもよい。

【0356】

いくつかの実施形態において、図11に示したように、短い相同アームを使用したことによって低効率となった相同組換え修復は、E4ORF6タンパク質およびE1B55K H373Aタンパク質をさらに導入することによって有意にレスキューされる。CCR5座位のデータを示す。

【0357】

いくつかの実施形態において、短い相同アームを持つテンプレートを使用したことによって低効率となったCRISPR/Cas9を介した相同組換え修復ノックインは、Ad5タンパク質（2種の変異体E1B55K（H373AまたはH354）のいずれかとE4ORF6との併用）をさらに導入することによってレスキューすることができる。いくつかの実施形態において、相同組換え修復におけるfold changeは50%～150%の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、相同組換え修復におけるfold changeは、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%のいずれであってもよく、前記値のいずれか2つによって定義される範囲にあるパーセンテージであってもよい。

【0358】

実施例11：CRISPR-Cas9を介したTCR座位への遺伝子ノックインを短い相同アームを使用して実施した場合、E4ORF6とE1B55K H373Aの組み合わせをさらに導入することによって相同組換え修復がレスキューされる

いくつかの実験において、CRISPR-Cas9を介したTCR座位への遺伝子ノックインを短い相同アームを使用して実施した相同組換え修復（HDR）に対するE4ORF6とE1B55K H354の共導入の効果を評価した。

【0359】

いくつかの実験において、 1×10^6 個のT細胞をCD3/CD28ビーズで48時間刺激し、グラフの凡例に示したタンパク質をコードするRNAの組み合わせをエレクトロポレーションによって導入した（図12A）。Cas9 mRNAの用量は1.0 μ gとした。各Ad5タンパク質の用量は0.1 μ gとした（E4ORF6の用量は0.1 μ gとし、E1B55K H354変異体の用量は0.1 μ gとした）。修復テンプレートおよびガイドをコードするAAVは、イオジキサノールで濃縮してウイルスプレップとし、培養物の10%の量で使用した。

【0360】

いくつかの実験において、H354変異体を使用することによって、TCR座位へのノックイン効率が上昇した（図12A）。図12Bの棒グラフにおいて、非相同性末端結合（NHEJ）の効率を赤色で、相同組換え（HR）の効率を青色で示す。いくつかの実施形態において、H354変異体を使用することによって、切断されたDNA鎖の相同組換え修復アッセイによる修復効率（%）が大幅に上昇した。

【0361】

いくつかの実験において、エレクトロポレーションの4日後に早くも相同組換え修復が観察された（図12C）。いくつかの実験では、H354変異体を使用することによって、非相同性末端結合を顕著に増加させずに、相同組換え修復を増加することができた。いくつかの実験では、テンプレートを使用した場合、H354変異体を使用することによって、非相同性末端結合を顕著に増加させずに、相同組換え修復を増加することができた。

【0362】

実施例12：E4ORF6とE1B55K H373Aを共発現するゲノム編集初代T細胞は通常の表面マーカーの表現型を示す

いくつかの実験において、E4ORF6とE1B55K H373A変異体とを発現させたことによって、ゲノム編集の過程でT細胞の表現型またはシグナル伝達特性に悪影響が出たかどうかを評

10

20

30

40

50

価するため、ゲノム編集の2週間後に、複数の表面マーカーの発現と、PHAで誘導したカルシウムシグナル伝達の測定結果とを評価した。

【0363】

いくつかの実験において、図に示したように(図13A)、Cas9-2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA(1 µg)と、E4ORF6タンパク質およびE1B55K H373Aタンパク質をそれぞれコードするmRNA(各0.03 µg)とをエレクトロポレーションによって初代CD4⁺ヒトT細胞に導入し、TCR ガイドの発現を誘導するAAVによる形質導入を行った後、この初代CD4⁺T細胞をフローサイトメトリーによって分析した。その代表的なフローサイトメトリープロットを示す(図13A)。細胞を培養し、エレクトロポレーション/形質導入の16~20日後に、フローサイトメトリーによって表面タンパク質マーカーを評価した。独立した実験(n=2)の結果を示す(図13A)。

10

【0364】

mRNA/AAV共送達を利用してゲノム編集したT細胞においてナイーブT細胞集団とメモリーT細胞集団の細胞表面マーカーをフローサイトメトリーによって評価したところ、通常の表面マーカーの表現型が示され、ゲノム編集した集団とゲノム編集していない集団との間で差は見られなかった(図13A)。

【0365】

実施例13：mRNA/AAV共送達によってTCRが欠損したT細胞はTCRシグナル伝達が欠損している

いくつかの実験において、Cas9-T2A-mCherryタンパク質をコードするmRNA(1 µg)と、E4ORF6およびE1B55K H373AをそれぞれコードするmRNA(各0.03 µg)とをエレクトロポレーションによって初代CD4⁺T細胞に導入して2時間静置した後、TCR ガイドの発現を誘導するAAVによる形質導入を行った。エレクトロポレーション/形質導入の9日後、CD3マイクロビーズ(ミルテニールバイオテック)を使用してCD3⁺細胞を精製し、再度培養した。細胞を10日間増殖させた後、細胞を回収してHanksカルシウムシグナル伝達バッファーに再懸濁し、100 µM Indoカルシウム指示色素を加えて30分間インキュベートし、抗CD3で刺激したカルシウムシグナル伝達をフローサイトメトリーによって分析した。細胞は、200 µg/mL PHAを使用して刺激した。1条件あたり500万個の細胞を使用した(図13B)。

20

【0366】

いくつかの実験において、TCR 遺伝子の編集を行ったT細胞は、細胞表面TCRが欠失していたことから、細胞表面TCRを有する細胞と比べて、PHA刺激に応答してCa²⁺を移動させる能力が欠失していたことが示された(図13B)。したがって、いくつかの実施形態において、E4ORF6と変異型E1B55Kとを併用してTCRをノックアウトしたT細胞は、Ca²⁺シグナル伝達が欠損していた。

30

【0367】

実施例14：CRISPRによって多重ゲノム編集を行った細胞は正常な核型を示す

二本鎖切断を複数箇所で同時に誘導することによって転座が起こりうる可能性があるため、いくつかの実験において、細胞遺伝子編集に関連した転座を公平に検出するための方法として核型分析を行った。各条件において20個のメタフェーズを観察したが、大きな異常は見られなかった(図14)。

40

【0368】

いくつかの実験において、E4ORF6およびE1B55K-H373Aを併用してCRISPR/Cas9編集した細胞をGTW(ギムザ-トリプシン-ライト)染色しGバンド分析したところ、正常な表現型が示された(図14)。PMA/イオノマイシンを使用して細胞を3~4時間刺激し、72時間かけて細胞を刺激から回復させた。すべて試料からメタフェーズを作製した。20個のメタフェーズを作製し、Gバンド法による核型分析を1試料ずつ行って分析した。いくつかの実験において、いずれの試料からも異常は検出されなかった(図14)。

【0369】

いくつかの実験において、Tim3およびTCR それぞれに対するガイドを発現するAAVとCa

50

s9 (1 μ g) とで処理した細胞が正常な核型を示すことを示した代表的な写真を示す (図 1 4 A) 。ノックアウトの頻度は、図 8 B および図 8 C から確認することができる。

【 0 3 7 0 】

Tim3およびTCR それぞれに対するガイドを発現するAAVと、E4ORF6 RNAおよびE1B55K-H373A RNA (各 0 . 0 3 μ g) と、Cas9 (1 μ g) とで処理した細胞が正常な核型を示すことを示した代表的な写真を示す (図 1 4 A) 。ノックアウトの頻度は、図 8 B および図 8 C から確認することができる。

【 0 3 7 1 】

核型分析を行うため、いくつかの実験において、PMA / イオノマイシンで細胞を刺激した後、1 試料あたり約 20×10^6 個の細胞を核型分析に供し、各試料からメタフェーズを得ることができた。核型分析の結果から得られたデータを表 1 に示す。

【 表 1 】

試料	バンドレベル	分析した 分裂中期細胞	異常検出の有無 (Y/N)
未処理	400～450	20	N
AAV.sgTim3.GFP	300～450	20	N
AAV.sgTim3.sg.TCR α .GFP	300～400	20	N
Cas9 のみ	300～550	20	N
Cas9 + AAV.sgTim3.GFP	300～450	20	N
Cas9 + AAV.sgTim3.sg.TCR α .GFP	450～650	20	N
Cas9 + E4ORF6-E1B55K-H373A + AAV.sgTim3.GFP	300～400	20	N
Cas9 + E4ORF6-E1B55K-H373A + AAV.sgTim3.sg.TCR α .GFP	300～450	20	N

【 0 3 7 2 】

いくつかの実験において、表に示した精度で核型分析した 20 個のメタフェーズのいずれにおいても識別可能な異常は検出されず、転座率が 5 % 未満であることが示されたことから、遺伝子をダブルノックアウトした細胞では、概して大規模な再編 / 核型異常は認められないことがわかった。

【 0 3 7 3 】

実施例 1 5 : E4ORF6およびE1B55K H373Aの共導入またはE4ORF6およびE1B55K H354の共導入と、CRISPR-Cas9による切断とを用いた相同組換え修復が正確であることの分子レベルでの確認

シームレスな相同組換え修復がなされたことを確認するため、図に示した 2 つの接合部にわたってシーケンシングすることによって、相同組換え修復の分子的特性を評価した (図 1 5) 。相同アームとBFPインサートを持つドナーテンプレートの模式図を示す。図 1 5 A に、プライマー結合部位と、相同組換え修復によって得られるアンブリコン (1 . 3 k b) とを示す。プライマーを使用して得られたPCRの結果を示す代表的なアガロースゲルの写真を図 1 5 A に示す。図 1 0 のデータを得た実験で使用した細胞を用いて行った独立したPCR実験 (n = 3) の結果を示す。図 1 5 B に示した各PCR産物を精製し、ベクターにクローニングし、シーケンシングした。図 1 5 A に示した 3 ' 相同アームの上流領域

(1) および下流領域(2)に位置する接合部において導入が正確であったことを示す代表的なアンプリコンを示す。意図しない不正確な接合部を含むクローンは検出されず、また、AAV由来のITR配列を含むクローンも検出されなかった。

【0374】

したがって、E4ORF6およびE1B55K H373Aの共導入またはE4ORF6およびE1B55K H354の共導入とCRISPR-Cas9による切断とを用いた相同組換え修復が正確であったことが確認されたことから、いくつかの実施形態において、標的とする組込みはシームレスに組み込まれることがわかる。

【0375】

実施例16：TCRノックアウトの作製における様々なガイドRNAの比較

いくつかの実験において、CRISPR-Cas9システムを使用してTCRのノックアウトを行った。ヒトのTCR 座位は第14番染色体NG_001332.2に相当する。TCR 遺伝子内の位置は1,071,537~1,071,809に相当する。

【0376】

いくつかの実験において、ガイド1(配列番号15;図16A)、ガイド2(配列番号16;図16A)、ガイド3(配列番号17;図16A)およびガイド4(配列番号5;図16A)の4種のガイドRNAを使用した。

【0377】

いくつかの実験において、Cas9-mCherry mRNAを初代T細胞にトランスフェクトし、AAVガイドによる形質導入を行った。4種の実験から得たデータを図16B~図16Iに示す。

【0378】

いくつかの実験において、ガイドRNAとしてガイド1~ガイド4を使用した場合の、ドナー1由来の初代T細胞におけるTCRノックアウトの効率を比較した。ドナー1由来の初代T細胞における24時間後のCas9-mCherryの発現は、どのガイドRNA配列を使用したのかに関係なく、同程度であった(図16B)。AAVガイドRNAはいずれも同じMOIで使用した。コントロールは図16Bの上のパネルに示す。

【0379】

いくつかの実験において、ガイドRNAとしてガイド1~ガイド4を使用した場合の、ドナー1由来の初代T細胞におけるTCRノックアウトの効率を比較したところ、ガイド4(図16A)によるノックアウト効率が最も高かった(90%)(図16C)。168時間後に抗CD3-Alexa488抗体を使用してフローサイトメトリー分析を行った。コントロールは図16Cの上のパネルに示す。さらに、図21のデータに示すように、TCR のノックアウトにおいても、ガイド4が最も高効率であった。

【0380】

いくつかの実験において、Cas9/ガイド試料を様々な量で使用した場合の、ドナー1由来の初代T細胞における24時間後のCas9-mCherryの発現量を比較したところ、Cas9-mCherry発現細胞のパーセンテージは、Cas9/ガイド試料を10 μ L使用した場合(87.2%)や15 μ L使用した場合(85.1%)と比較して、20 μ L使用した場合においてわずかに高かった(96.4%)(図16D)。コントロールは図16Dの上のパネルに示す。

【0381】

いくつかの実験において、ガイド4を含む試料を様々な量で使用した場合の、ドナー1由来の初代T細胞におけるTCRノックアウトの効率を比較したところ、20 μ Lの量において最も高い効率が得られた(91.9%)。ガイド4を含む試料を10 μ L使用した場合の効率は73.2%であり、15 μ L使用した場合の効率は78.2%であった(図16E)。168時間後に抗CD3-Alexa488抗体を使用してフローサイトメトリー分析を行った。コントロールは図16Eの上のパネルに示す。

【0382】

いくつかの実験において、Cas9/ガイド試料を様々な量で使用した場合の、ドナー2由

10

20

30

40

50

来の初代T細胞における24時間後のCas9-mCherryの発現量を比較したところ、試料の量を5 μ Lとした場合(91%)、10 μ Lとした場合(90.2%)、20 μ Lとした場合(90.8%)のいずれにおいても、Cas9-mCherry発現細胞のパーセンテージは同程度であった(図16F)。

【0383】

いくつかの実験において、ガイドRNAとしてガイド4を含む試料を様々な量で使用した場合の、ドナー2由来の初代T細胞におけるTCRノックアウトの効率を比較したところ、20 μ Lの量において最も高い効率を得られた(68.4%)。ガイド4を含む試料を5 μ L使用した場合の効率は30.7%であり、10 μ L使用した場合の効率は38.4%であった(図16G)。168時間後に抗CD3-Alexa488抗体を使用してフローサイトメトリ分析を行った。コントロールは図16Gの上のパネルに示す。

10

【0384】

いくつかの実験において、Jurkat T細胞における24時間後のCas9-mCherryの発現は、どのガイドRNA配列を使用したのかに関わらず、同程度であった(図16H、下パネル)。Cas9-mCherryの発現はガイド1を使用した場合に最も低かった。AAVガイドRNAはいずれも同じMOIで使用した。コントロールは図16Hの上のパネルに示す。

【0385】

いくつかの実験において、ガイドRNAとしてガイド1～ガイド4を使用した場合の、Jurkat T細胞におけるTCRノックアウトの効率を比較したところ、ガイド4(図16A)によるノックアウト効率が最も高かった(83.3%)(図16I、下パネル)。168時間後に抗CD3-Alexa488抗体を使用してフローサイトメトリ分析を行った。コントロールは図16Iの上のパネルに示す。

20

【0386】

実施例17: TCR CRISPRガイドRNAとしてガイド4を使用したCRISPR/Cas9システム

いくつかの実験において、凍結保存された単離初代ヒトCD4⁺T細胞を解凍し、抗生物質を含まない培地中においてサイトカイン(IL-2、IL-7およびIL-15)の存在下、CD3/CD28 Dynabeads(ライフテクノロジーズ)を用いて細胞を60時間刺激した。次いでビーズを除去し、10 μ LのNeonチップを使用して1条件あたり4.5 $\times 10^5$ 個の細胞をエレクトロポレーションに供し(エレクトロポレーション後の細胞数: 3 $\times 10^5$ 個)、エレクトロポレーションの3時間後にAAVを加えた。Cas9 RNAの使用量は1試料あたり1.5 μ g(エレクトロポレーション後の量: 1 μ g)とし、ガイド特異的AAVの添加量は1試料あたりMOI = 1.33 $\times 10^4$ とした。エレクトロポレーション後、96ウェルプレートにおいて、サイトカインを含む培地200 μ L中に細胞を播種し、30のCO₂インキュベーター内において24時間静置し、その後37のCO₂インキュベーターに移した。

30

【0387】

エレクトロポレーションの24時間後、BD LSRIIを使用して、Cas9-mCherryの発現について細胞を分析し、次いで、72時間後、96時間後および168時間後に、mCherryの発現と、CD3-Alexa488抗体(Biolegend)によりTCRノックアウトとを分析した。実験を通して電圧は一定とした。

【0388】

いくつかの実験において、TCR CRISPRガイドRNAとしてガイド4を使用した場合、TCRノックアウトの効率が最も高かったことがデータから示された(図16B～図16I)。

40

【0389】

実施例18: 初代ヒトT細胞におけるCRISPRを介した遺伝子ノックアウトの効率の向上

プログラム可能なCRISPR/Cas9エンドヌクレアーゼシステムを用いた翻訳には、初代細胞においてCas9タンパク質とガイドRNAとを十分なレベルで同時に一過性発現させることによって、高レベルのヌクレアーゼ活性をオンターゲットで発現させる必要があるという制限があった。いくつかの実施形態において、初代ヒトT細胞においてCRISPRを介した遺伝子編集を高効率に行うためのmRNA/AAVスプリットベクターシステムが提供される。この

50

方法では、mRNAを使用して、Cas9と、血清型 5 型のアデノウイルスのE4ORF6タンパク質およびE1B55Kタンパク質とを発現させるが、これらのタンパク質を発現させることによって、ガイドRNAを発現させるためのAAVによる形質導入をT細胞が受け入れやすくなる。いくつかの実施形態において、この方法を使用することによって、T細胞受容体 サブユニット遺伝子（翻訳に関連する標的）が最大で 60 % の効率で破壊され、この方法で編集されたT細胞集団は、親集団とは異なる表現型を呈する。いくつかの実施形態において、この方法は、TREX2エキソヌクレアーゼを用いたmRNAに基づく発現方法と組み合わせることによって、さらに高い効率での編集が可能となる。このように、スプリットベクター法は柔軟性と潜在的可能性を持ち合わせている。ヒトT細胞においてAd5^{wt} タンパク質を一過性発現させることによって、AAVを介した形質導入の効率が上昇する。Ad5^{wt} タンパク質を一過性発現させることによって、ssAAV6またはscAAV6を使用したAAV媒介性形質導入の効率が上昇する。初代ヒトT細胞においてAd5^{MRN} タンパク質を一過性発現させることによって、CRISPRを介したノックアウトの効率が上昇する。

10

20

30

40

50

【0390】

実施例 19：TALENを用いた相同組換え修復率の上昇

いくつかの実験において、Neonトランスフェクションシステム（ライフテクノロジーズ）を使用し、E4ORF6 mRNAおよびE1B55K-H373A mRNAを添加してもしくは添加せずに、またはE1B55K-H354 mRNAを添加してもしくは添加せずに（各 0.03 μg）、CCR5 TALEN mRNA（図 3 2 A）のペアまたはCD40L TALEN mRNA（図 3 2 B）のペアを片方ずつ 0.5 μg の量でエレクトロポレーションすることによって初代ヒトCD4⁺T細胞に導入した。エレクトロポレーションの直後から細胞を 30 で 24 時間培養し、次いで 37 に戻して培養を継続した。エレクトロポレーションの 2 時間後、ドナーテンプレートを含むAAV6を培養物の量に対して 10 % の量で加え、細胞に形質導入した。エレクトロポレーション / 形質導入の 3 週間後、LSRIIフローサイトメーター（BDバイオサイエンス）を使用して、ドナーテンプレート（GFP⁺）のノックインについて細胞を分析した。

【0391】

いくつかの実験において、変異型Ad5とTALENを併用することによって、2つの座位における遺伝子ターゲティングが増強された。すなわち、いくつかの実験において、変異型Ad5とTALENを併用することによって、CCR5座位（図 3 2 A）およびCD40L（図 3 2 B）における遺伝子ターゲティングが増強された。

【0392】

いくつかの実施形態において、TALENを使用してターゲティングすることができる遺伝子の数は 1 ~ 10 個である。いくつかの実施形態において、TALENを使用してターゲティングすることができる遺伝子の数は、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個のいずれであってもよく、前記数のいずれか 2 つによって定義される範囲にある数であってもよい。

【0393】

実施例 20：エンドヌクレアーゼに基づくゲノム編集

本明細書において、細胞中の少なくとも 1 つの標的遺伝子を編集するためのシステム、および該システムをゲノム編集に使用する方法が企図される。標的遺伝子は目的の遺伝子であり、この遺伝子は編集または遺伝子破壊することができる。前記細胞は初代T細胞である。

【0394】

前記システムは、1 つ以上のガイドRNAをコードする第 1 の核酸配列と、エンドヌクレアーゼタンパク質をコードする第 2 の核酸配列とを含む。エンドヌクレアーゼは、本明細書で開示されたエンドヌクレアーゼおよび / またはそのバリエーションのいずれであってもよく、これらのエンドヌクレアーゼおよび / またはそのバリエーションの改変も本明細書による開示の範囲に含まれる。第 2 の核酸はmRNAであり、本明細書で開示されたエンドヌクレアーゼタンパク質のいずれかをコードするものである。エンドヌクレアーゼタンパク質をコードする第 2 の核酸配列は、真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。前

記 1 つ以上のガイドRNAは、細胞中の少なくとも 1 つの標的遺伝子に相補的である。前記 1 つ以上のガイドRNAはベクターに組み込んで提供される。前記ベクターはウイルスベクターであってもよい。前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである。前記 AAV ベクターは、自己相補型ベクター、一本鎖ベクター、または自己相補型ベクターと一本鎖ベクターの組み合わせのいずれであってもよい。

【 0 3 9 5 】

様々な種類の細胞において、AAVベクターは細胞に侵入した後に細胞からの制限を受けることから、AAVからの導入遺伝子 (ガイドRNAなど) の発現効率が非常に低くなる。このため、さらなる核酸配列として、細胞に侵入した AAV ベクターに対する制限を抑制するタンパク質が提供される。したがって、前記システムは、第 1 のアデノウイルスタンパク質をコードする第 3 の核酸配列と、第 2 のアデノウイルスタンパク質をコードする第 4 の核酸配列とを含む。第 3 核酸および第 4 の核酸は mRNA であり、真核細胞における発現のためにコドン最適化されている。これらの核酸配列は、任意の順序で順次に細胞に導入してもよく、あるいは同時に細胞に導入してもよい。

10

【 0 3 9 6 】

第 1 のアデノウイルスタンパク質および第 2 のアデノウイルスタンパク質は、血清型 5 型の AAV に由来するものである。第 1 のアデノウイルスタンパク質は、野生型 E4ORF6 または E4ORF6 の AXA 変異体である。第 2 のアデノウイルスタンパク質は、野生型 E1B55K、E1B55K の H373A 変異体、E1B55K の H354 変異体、または E1B55K の R240A 変異体である。これらの変異タンパク質は、野生型タンパク質と比べて、細胞に侵入した AAV ベクターに対する制限を抑制する効率はそれほど高くないが、遺伝子ターゲティングの増強においては比較的効率が低い。

20

【 0 3 9 7 】

第 1 の核酸配列、第 2 の核酸配列、第 3 の核酸配列および第 4 の核酸配列は、真核細胞において作動可能な調節エレメントに作動可能に連結されている。第 1 の核酸配列は、1 つ以上のガイドRNAをコードすることができ、各ガイドRNAはそれぞれ別の調節エレメントに作動可能に連結されている。ガイドRNAをコードする第 1 の核酸配列は、細胞において一過性に発現される。前記 1 つ以上のガイドRNA配列は、TCR 遺伝子、PD1 遺伝子、TIGIT 遺伝子、Lag3 遺伝子および / または Tim3 遺伝子に相補的である。前記システムは、目的の遺伝子に相同な核酸配列領域をさらに含む。

30

【 0 3 9 8 】

上述したコンポーネントを含む前記システムは、初代 T 細胞に導入される。目的の遺伝子に相同な核酸配列領域によって、エンドヌクレアーゼに基づく前記システムを特定の遺伝子にターゲティングすることができる。特定の遺伝子をターゲティングすることによって、遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックインまたはこれらの両方が可能となる。

【 0 3 9 9 】

遺伝子ターゲティングの結果をフローサイトメトリーで評価するか、シーケンシングで評価するか、あるいはこれらの両方を使用して評価するかは、遺伝子ターゲティング方法の特性 (ノックアウトまたはノックイン) によって決まる。たとえば、細胞表面発現タンパク質をコードする目的遺伝子をノックアウトすることを目的として前記システムを使用する場合、フローサイトメトリーを使用して、該タンパク質の細胞表面発現の抑制および / または欠損を確認することができる。あるいは、細胞内発現タンパク質をコードする目的遺伝子をノックアウトすることを目的として前記システムを使用する場合、フローサイトメトリーを使用して、該タンパク質の細胞内発現の抑制および / または欠損を確認することができる。あるいは、ノックインを目的として前記システムを使用する場合、たとえば、細胞表面発現タンパク質をコードする目的遺伝子に抗原由来ドミナントエピトープをノックインすることを目的として前記システムを使用する場合、フローサイトメトリーを使用して、該ドミナントエピトープの細胞表面発現を確認することができる。あるいは、ノックインを目的として前記システムを使用する場合、たとえば、細胞内発現タンパク質をコードする目的遺伝子に抗原由来ドミナントエピトープをノックインすることを目的と

40

50

して前記システムを使用する場合、フローサイトメトリーを使用して、該ドミナントエピソードの細胞内発現を確認することができる。また、上述した場合のいずれにおいても、所望の遺伝子ターゲティングがなされたかどうかを確認するために、ゲノムDNAのDNAシーケンシングを行うことができる。ノックアウト、ノックインまたはこれらの両方を行うために同時にターゲティングすることができる遺伝子の数は、2～5つであってもよい。

【0400】

遺伝子ターゲティングにより目的遺伝子が改変されたT細胞は、セルソーティングまたはその他の細胞濃縮法によって濃縮される。濃縮された細胞を使用して、対象の疾患および/または病態を治療、緩和および/または抑制しようとする場合、濃縮された細胞を対象に投与する。たとえば、対象は、体内のT細胞が「疲弊した」ためになんらかの疾患および/または病態に陥っている可能性があり、したがって、このような疾患および/または病態から1つ以上の抗原を取り除いても効果的ではない。

10

【0401】

1つ以上の「疲弊」マーカー（たとえば、PD1、TIGIT、Lag3およびTim3）をターゲティングすることによって、「疲弊した」状態のT細胞を回復させることができる。ターゲティングされたT細胞は、（たとえば静脈内経路を介して）対象に投与される。経過観察検査を対象に行って、ターゲティングされたT細胞の状態を確認し、対象の疾患および/または病態に対する該T細胞の効果を評価する。たとえば、ターゲティングされたT細胞を投与した後、様々な時間間隔で対象から血液を採取する。検査を行い、たとえば、投与したT細胞からのサイトカイン（たとえば、IL-2、TNF）の分泌を評価することによって、投与したT細胞が活性化されたかどうかを確認する。また、ターゲティングされたT細胞を投与することによって、疾患および/または病態に対する効果が得られたかどうかを確認するために検査を行うこともできる。

20

【0402】

実施例21：材料と方法

DNA構築物

Cas9をAddgene社（プラスミド#41815）から入手し、PCRで増幅し、pWNYバックボーン（pUC57を一部変更して実験室で作製したもの）、ならびにpEVL200およびpEVL300（200残基または300残基のアミノ酸でコードされるポリAテールを含む直鎖状mRNAベクター）にクローニングした。各ベクターは、N末端およびC末端に1つずつ配置された2つの核移行シグナル（NLS）とT7プロモーターとを含んでいた。pEVLベクターにクローニングする前に、Cas9のBsaI部位を欠損させ、アミノ酸配列は変更しなかった。mCherryは、3'末端にT2Aペプチドを有するCas9に連結した。5'末端に配置された1つのNLSとT7プロモーターとを含むmCherryのみのコントロールも、pWNYおよびpEVL200にクローニングすることによって作製した。E4ORF6遺伝子およびE1B55K遺伝子は合成遺伝子（Integrated DNA Technologies（IDT））として入手し、pWNYのT7プロモーターの下流にクローニングした。変異型E1B55Kは、部位特異的突然変異誘発（QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit、アジレント）を使用して作製した。

30

【0403】

シングルガイドRNA（sgRNA）を導入するためのAAV構築物の設計、クローニングおよび発現

40

TCR、PD-1、TIGIT、Lag3、Tim3およびCCR5の定常領域を標的とするガイドは、オンライン上のCRISPR設計ツールを使用して設計した（<http://crispr.mit.edu>およびブロード研究所のsgRNA designer（<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgRNA-design>））。次いで、DNA受託合成サービス（Integrated DNA Technologies）を利用して、ガイドをgblockとして作製した。標準的なクローン技術を使用して、gblockをscAAV6構築物またはssAAV6-GFP構築物にクローニングした。

【0404】

ガイドが「G」で始まらない場合は、（T7プロモーターの発現に必要な）「GG」または（U6プロモーターの発現に必要な）「G」をガイドの前に挿入して、gblockをscAAV6構

50

築物またはssAAV-GFP構築物にクローニングした。U6プロモーターを含むガイドのいくつかは「GG」を有していたが、「GG」を有するものでも「G」を有するものでも編集効率はほとんど変わらなかった。ITRを確認した後、これらの構築物を使用してAAV6を作製した。

【0405】

いくつかの実験において、標的ガイドとして、以下のガイド配列を有するガイドを使用した。

TCR を標的とするガイド：ACAAAACTGTGCTAGACATG (配列番号 16)

PD1を標的とするガイド：GCCCACGACACCAACCACCA (配列番号 18)

TIGITを標的とするガイド：TCTTCCCTAGGAATGATGAC (配列番号 19)

Lag3を標的とするガイド：GCGGTCCCTGAGGTGCACCG (配列番号 20)

Tim3を標的とするガイド：AGAAGTGAATACAGAGCGG (配列番号 21)

【0406】

組換えAAV6ベクターの作製

各AAVストックは、AAVベクター、血清型ヘルパープラスミド、およびアデノウイルスヘルパー (HGT1-Adeno) プラスミドをHEK293T細胞にトリプルトランスフェクションすることによって作製した。48時間後にトランスフェクト細胞を回収し、凍結解凍して細胞を溶解し、ベンゾナーゼで処理し、イオジキサノール密度勾配に供して精製した。各ウイルスストックの力価は、AAVゲノムをqPCRで分析することによって測定し、 $10^{1.0} \sim 10^{1.2} / \text{ml}$ の範囲であることを確認した。

【0407】

mRNAの作製

DNAテンプレートをユニークな制限酵素で線状化し、線状化したプラスミドをQiaQuick PCR purification kit (キアゲン) を使用して精製した。市販キット (mMessage mMachine T7 Ultra; AmbionまたはT7 mScript Standard RNA production system; CellScript) を使用し、メーカーのプロトコルをわずかに変更して、mRNAをインビトロ転写した。すなわち、2.5～3時間インキュベートしてインビトロ転写反応を行い、DNaseで1時間処理を行った。必要であれば、ポリ(A)テールの付加を1時間かけて行い、RNeasy (キアゲン) を使用してmRNAを精製した。

【0408】

エレクトロポレーションおよび形質導入による初代ヒトT細胞のトランスフェクション

CD4⁺またはCD3⁺単離キット (ミルテニールバイオテック) を使用して、凍結PBMCからT細胞を得た。すなわち、氷冷DNase Iバッファー (PBS、5mM MgCl₂、20Kunitz Units/ml DNase I (EMDミリポア)) を滴下して加えてPBMCを解凍し、遠心分離し、少量のIL-15 (0.1ng/ml) を添加したT細胞用培地 (RPMI、20%FBS、1%HEPES、1%L-グルタミン) 中で一晩静置した。翌日、メーカーの説明書に従ってT細胞を単離し、生細胞の密度が 1×10^6 個/ml となるように、精製したT細胞をT細胞増殖培地 (5ng/ml IL-2および1ng/ml IL-15を添加した培地) 中に再懸濁し、細胞とビーズの比率が 1 : 1 となるようにCD3/CD28ビーズ (DynaIビーズ、ライフテクノロジー) を使用して細胞を72時間刺激した。その後、ビーズを除去し、T細胞増殖培地中で細胞を0.5～2時間静置した。次いで、Neonトランスフェクションシステム (図1、図2、図4) またはMaxCyte GT (図3) を使用してエレクトロポレーションを行うことによって、以下のようにmRNAを細胞に導入した。PBSで細胞を2回洗浄し、 4.5×10^7 個/ml (Neon) または 1.25×10^8 個/ml (MaxCyte) の密度でNeonバッファーTまたはMaxCyteバッファーに細胞を再懸濁した。混合後、エレクトロポレーションによって (Neonの条件: 1400V、10ms、3パルス、10μlチップ; MaxCyteの条件は、初代T細胞への導入を行うための、メーカー指定の条件に従った) mRNAを細胞に導入し、トランスフェクション後、直ちに、96ウェルプレート中のあらかじめ温めておいたT細胞増殖培地 200μL 中に細胞を移した。細胞を直ちに30℃でインキュベートし、エレクトロポレーションから2～4時間後にAAVを培養物に加え、30℃でのインキュベーションをさらに20時間行った。特段の記載がない限り、

AAVの力価 ($MOI = \text{約 } 1 \times 10^4 \sim 5$) に関係なく、最終培養物の量に対して10%の量のAAVドナーを加えた。次いで、得られた遺伝子編集細胞を標準的な条件(37)においてT細胞増殖培地中で培養して増殖させ、必要に応じて2~3日ごとに培地を補充しながら約 1×10^6 個/mLの密度に維持した。

【0409】

フローサイトメトリーおよび抗体

LSRIIフローサイトメーター(BDバイオサイエンス)を使用して、ノックアウト(TCR、PD-1、TIGIT、Lag3およびTim3)の分析と相同組換え修復(BFP)の分析を行い、FlowJoソフトウェア(TreeStar)を使用してデータを分析した。特に記載がない限り、抗体はいずれもBiolegend社から入手した。表面マーカーのノックアウトを評価するため、蛍光色素標識抗体、すなわち、CD3-Alexa 488、CD3-PerCPy5.5またはCD3-APCクローンHIT3a; PD1-APCクローンeh12.2H7; TIGIT-Alexa 700クローン741182(Novus Biologicals); Tim3-APC-Cy7クローンF38-2E2; およびLag3-FITCクローン3DS223H(eBioscience)を使用して細胞を標識した。CD4染色またはCD8染色は、CD4-BFP(クローンOKT4)またはCD8-BFP(RP A-T8)を使用して行った。T細胞疲弊マーカーの表面発現をアップレギュレートするため、初期刺激の9~12日後に、CD3/CD28ビーズを使用してT細胞を48時間刺激した。ただし、TCRが存在しない場合は、PMA/イオノマイシンを使用して刺激を行った(下記参照)。細胞を洗浄し、LSRIIを使用して前方散乱光および側方散乱光を検出することによって生細胞をゲーティングして細胞を得て、下流の分析を行った。

10

20

【0410】

PMA/イオノマイシンによる刺激

48ウェルまたは24ウェルのプレートに 1×10^6 個の密度で細胞を播種した。 10 ng/mL PMA(シグマ)および $1 \mu\text{g/mL}$ イオノマイシン(シグマ)を培地に加え、3~4時間インキュベートし、2%FBSを添加したPBSで細胞を3~4回洗浄し、新鮮培地に再播種した。フローサイトメトリーを行う前に、48時間かけて細胞を刺激から回復させた。核型分析を行う場合は、72時間かけて細胞を刺激から回復させた。

【0411】

核型分析

T-25フラスコにおいて、1試料あたり $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 個の密度で細胞を増殖させた。各試料をPMA/イオノマイシンで3~4時間刺激し、サイトカインを添加した完全培地中で72時間静置した。核型分析は、研究試験としてワシントン大学のCytogenetics and Genomics Laboratoryにおいて行った。標準的なGバンド法(GTW染色)による染色体分析を1試料あたり20個の細胞に対して行った。

30

【0412】

T7エンドヌクレアーゼI(T7EI)アッセイ

Cas9およびsgRNAを用いたTCR座位の切断効率およびCCR5座位の切断効率は、T7EIアッセイを使用して評価した。標的としたゲノム座位は、メーカーの説明書に従って、Accuprime Pfx DNAポリメラーゼまたはHifi Platinum Taq DNAポリメラーゼ(ライフテクノロジーズ)を使用して増幅した。400ngの精製産物(Qiaquick PCR clean-up kit、キアゲン)を変性させ、T7EI(ニュー・イングランド・バイオラボ)を使用して37で30分間かけて消化し、1~2%アガロースゲル上で分析した(図2B)。

40

【0413】

カルシウムシグナル伝達の分析

1試料あたり 5×10^6 個の細胞を使用した。(Ca^{2+} および Mg^{2+} を添加した) HBSS (Thermo Fisher) で細胞を洗浄し、HBSS中において $30 \mu\text{M}$ Indo-1 AM (Molecular Probes、ライフテクノロジーズ) を細胞に負荷し、37で30分間インキュベートし、2回洗浄し、バッファー中に再懸濁した。ベースラインの流束を30秒間測定した後、T細胞を刺激するため $200 \mu\text{g/mL}$ PHAで細胞を刺激し、5分間にわたってデータを収集した。

【0414】

50

統計分析

Prism 6 (GraphPad Software) を使用して統計分析を行った。特に記載がない限り、平均値 \pm S E M でデータを示す。統計的有意差の検定は、対応のないスチューデントの両側 t 検定を使用して行い、等しくない標準偏差に対してはウェルチの補正を適宜行った。

【0415】

いくつかの実施形態において、mRNA/AAV共送達法を使用することによって、初代ヒトT細胞においてCRISPR/Cas9ヌクレアーゼ技術が実施され、このmRNA/AAV共送達法においては、mRNAを使用してCas9の発現が誘導され、AAVベクターを使用してガイドRNAの発現および/または組換えテンプレートの送達が行われる。

【0416】

mRNA/AAV共送達法の開発初期段階において、この方法の有効性は、AAVを介した形質導入によって大きな制限を受けることが示された。これを踏まえ、いくつかの実施形態においては、アデノウイルス由来のE4ORF6ヘルパータンパク質およびE1B55Kヘルパータンパク質またはこれらの変異体をmRNAから共発現させ、これによって、効率的な遺伝子編集を容易とする細胞内DNA修復環境を維持しつつ、かつ細胞侵入後のAAVからの遺伝子発現の制限の解除を可能とする生化学的活性の組み合わせを同定できるかどうかを評価する。

【0417】

いくつかの実験において、CRISPR-Cas9を介した遺伝子破壊の効率と相同組換え遺伝子ターゲティングの効率の大幅な向上を助けるというユニークな能力を持つものとして、E4ORF6-E1B55K H373AおよびE4ORF6-E1B55K H354の2種の変異体が同定された。

【0418】

血清型4型アデノウイルスのE4ORF6-E1B55K複合体は、DNAリガーゼIV活性を抑制することから、培養細胞モデルにおいてCRISPRを介した(遺伝子破壊ではない)遺伝子ターゲティングを増強し、ひいては、非相同末端結合修復活性の低下を増強する。

【0419】

したがって、いくつかの実施形態において、mRNA/AAV共送達と血清型5型アデノウイルスのE4ORF6-E1B55K複合体の発現とを組み合わせることによって、DNAリガーゼIV活性が抑制され、それと同時に、細胞侵入後のAAV形質導入の制限が緩和され、その結果、遺伝子ターゲティング効率に対して相乗効果が発揮される可能性があると考えられた。

【0420】

いくつかの実験において、野生型E4ORF6-E1B55K複合体を一過性発現させることによって、AAV誘導性遺伝子発現に対する制限を非常に効果的に緩和することができたが、初代ヒトT細胞における遺伝子破壊効率または遺伝子ターゲティング効率はごくわずかに上昇しなかった。これに対して、いくつかの実験において、AAV誘導性遺伝子発現を増強する能力はそれほど高くないE4ORF6-E1B55K H373A変異体またはE4ORF6-E1B55K H354変異体を発現させたところ、遺伝子破壊効率および遺伝子ターゲティング効率がいずれも大幅に向上した。

【0421】

H373A変異体およびH354変異体のAAV誘導性遺伝子発現に対する効果はそれほど高くはなく(たとえば図3)、ガイドRNAの発現量および発現持続時間もそれほど上昇しないと予測されるが、このことが、遺伝子破壊および遺伝子ターゲティングを増強する能力に寄与していると考えられる。これらの変異体には様々な生化学的活性が残されていることから、これらの変異体を使用することによって、利用されていないAAVゲノムの様々な部分を相同組換え修復に関与させ、ひいては、遺伝子ターゲティングの効率を上昇させることができると考えられる。

【0422】

一方、遺伝子破壊と遺伝子ターゲティング効率とを向上させる能力が、野生型のE1B55Kよりもこれらの変異体の方が高い理由として、以下の2つの公知の生化学的活性が主に関与していると考えられる。すなわち、1) 上記変異体はMRN依存性のDNA損傷シグナル伝達(様々な形態の相同組換えDNA修復による二本鎖切断・解離を促進する機能を有する)を

10

20

30

40

50

維持しており、2) p53依存性のDNA損傷シグナル伝達(DNA二本鎖切断に応答して細胞をG1期で停止させる機能を有する)を制限している。したがって、いくつかの実施形態において、上記複合体を発現しているT細胞では、Cas9の誘導による二本鎖切断の大部分がS期に移行してから起こると予測され、S期において切断された二本鎖は、組換えテンプレートが存在しない場合は変異原性の代替的末端連結(alternative end joining)によって修復され、組換えテンプレートが提供されている場合は相同組換え修復によって修復されることが考えられる。

【0423】

いくつかの実験において、血清型5型アデノウイルスの「ヘルパー」タンパク質であるE4ORF6-E1B55K H373A変異体およびE4ORF6-E1B55K H354変異体は、初代ヒトT細胞におけるCas9を介した遺伝子編集の効率を向上させる能力を有していると同定された。したがって、いくつかの実施形態において、本研究の結果を考え合わせると、E4ORF6-E1B55K-H373Aは、様々な種類の遺伝子編集方法において最も一貫した活性を示したことから、CRISPR/Cas9遺伝子編集の効率を向上させるための汎用ツールを求めている研究者にとって最も良い選択肢になることが示唆された。

【0424】

上記ヘルパータンパク質の生化学的活性を調べた結果、該タンパク質の遺伝子編集効率に対する向上効果は、該タンパク質がS期におけるDNA二本鎖切断の修復を促進する作用を有していることによるものであることが示唆された。したがって、いくつかの実施形態において、上記ヘルパータンパク質は、初代ヒト細胞において相同組換えゲノム編集の効率を向上させる方法に広く適用可能であると考えられる。いくつかの実施形態において、上記ヘルパータンパク質は、別のヌクレアーゼプラットフォームを使用したものも含む、初代ヒト細胞において相同組換えゲノム編集の効率を向上させる方法として広く適用可能であると考えられる。いくつかの実施形態において、上記ヘルパータンパク質は、AAV以外のウイルステンプレートの送達を利用したものも含む、初代ヒト細胞において相同組換えゲノム編集の効率を向上させる方法に広く適用可能であると考えられる。

【0425】

さらに、様々なヒトウイルスに由来するアクセサリタンパク質は、細胞内DNA障害反応および修復機構に関与する様々なコンポーネントを無効化または改変する能力を有することから、上記ヘルパータンパク質は、ヒトゲノム工学のツールとして使用可能な生化学的活性を数多く備えていると言える。

【0426】

したがって、いくつかの実施形態において、細胞内DNA障害反応および/または修復機構に関与する様々なコンポーネントを無効化および/または改変する能力を有するヒト(および/または哺乳動物)ウイルスに由来するアクセサリタンパク質の使用も、本明細書で提供されるCRISPR/Cas9システムにおいて企図される。いくつかの実施形態において、そのようなタンパク質は、ヒトゲノム工学のツールとして使用可能な生化学的活性を数多く備えていることが企図される。

【0427】

上述の説明および実施例は、本発明の特定の実施形態を詳述したものである。上述の記述がどれほど詳しいものであったとしても、本発明を様々な方法で実施してもよいことは容易に理解され、また、本発明は、添付の請求項およびその同等物の記載に従って解釈すべきものである。本発明の教示を典型的な実施形態として述べたが、当業者であれば、過度の実験を行うことなく、上述した典型的な実施形態の様々な変更や修正も可能であることを容易に理解するであろう。このような変更や修正はいずれも本明細書による教示の範囲に含まれる。

【0428】

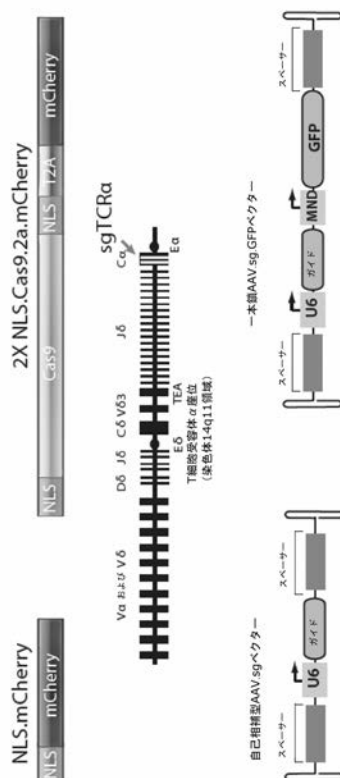
上記実施例は、本発明の開示による教示をよりわかりやすく説明するために示したものであり、本明細書に記載の教示の範囲をなんら限定するものではない。特許文献、特許出願、研究論文、教科書などの、本明細書において引用された引用文献はいずれも、特段の

記載がなくとも、引用によりその全体が本明細書に組み込まれるものとする。

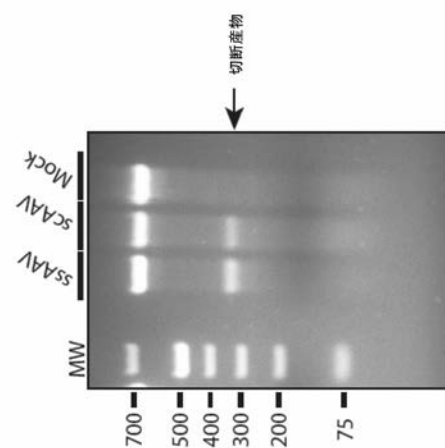
【 0 4 2 9 】

上記開示は、当業者による本発明の実施に十分なものであるとする。上述の説明および実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態を詳述したものであり、発明者らによって企図された最良の形態を示したものである。用語の定義、用語の使用、記載の技術など（ただしこれらに限定されない）について、本明細書に組み込まれた文献やその同等物の1つ以上が本願の記載と異なっていたり、本願の記載を否定するものである場合、本願の内容が優先されるものとする。

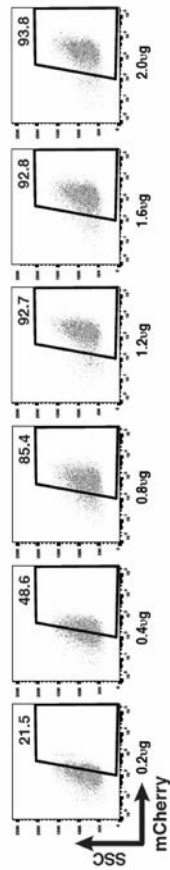
【 図 0 1 A 】



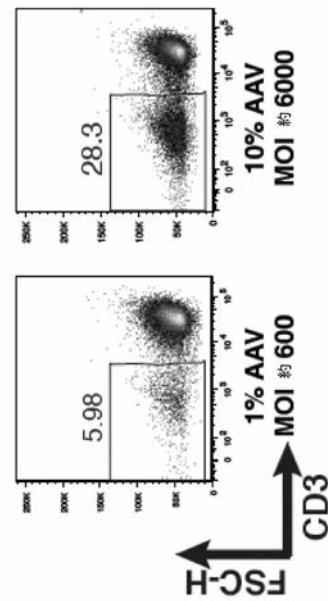
【 図 0 1 B 】



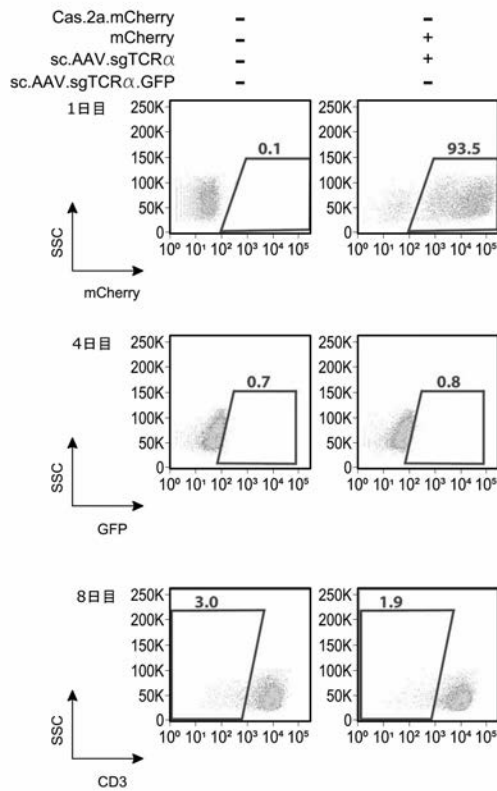
【図 01C】



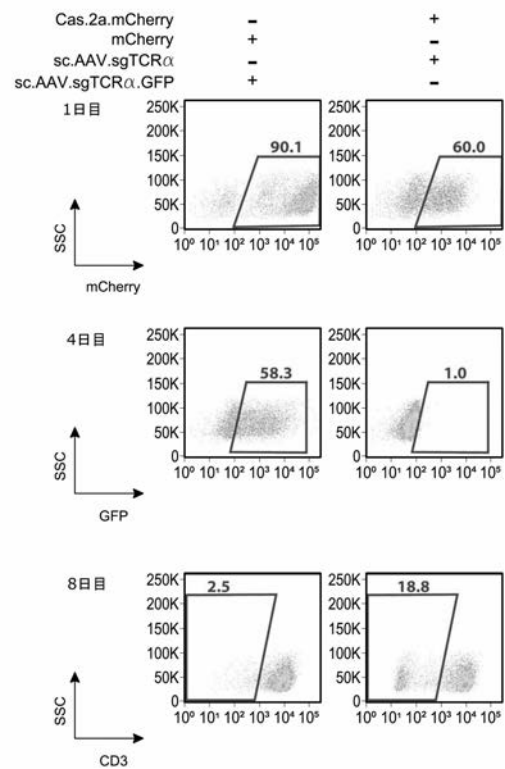
【図 01D】



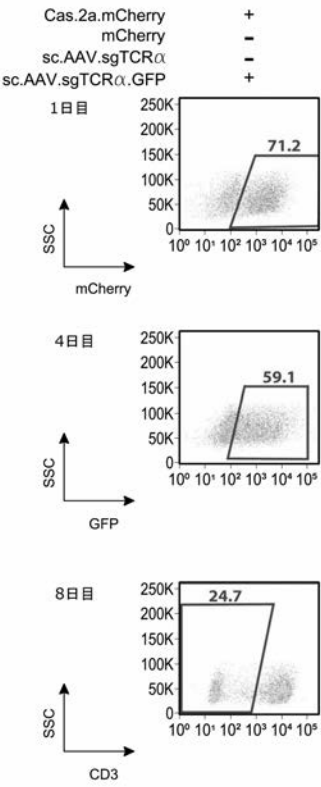
【図 01E - 1】



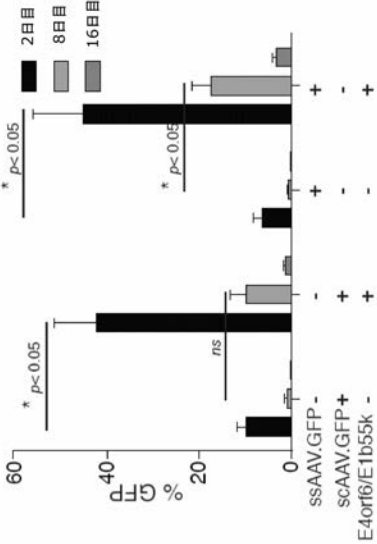
【図 01E - 2】



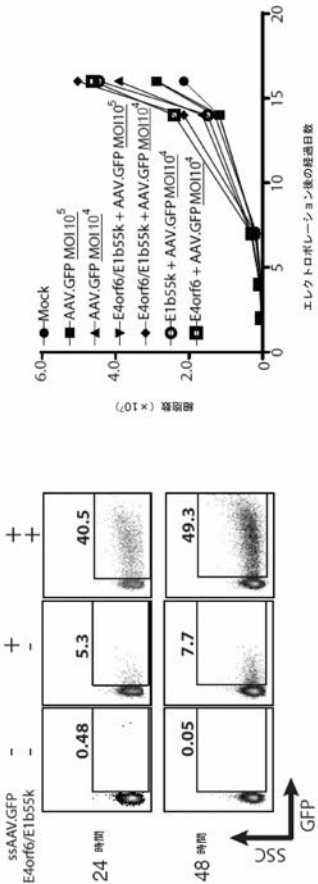
【 図 0 1 E - 3 】



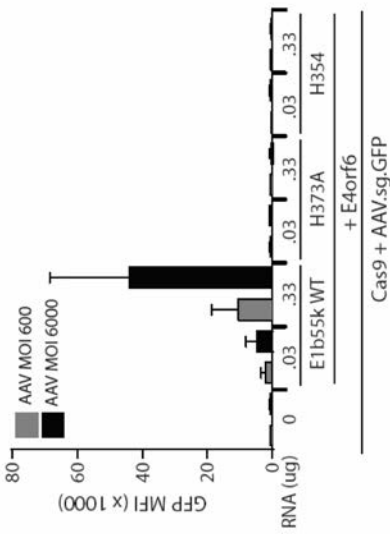
【 図 0 2 B 】



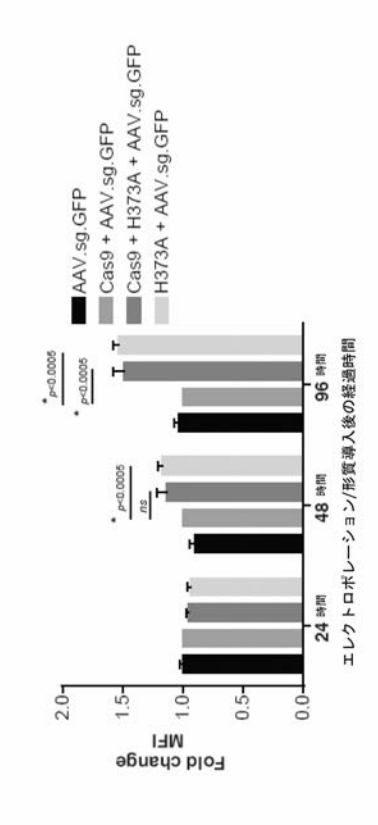
【 図 0 2 A 】



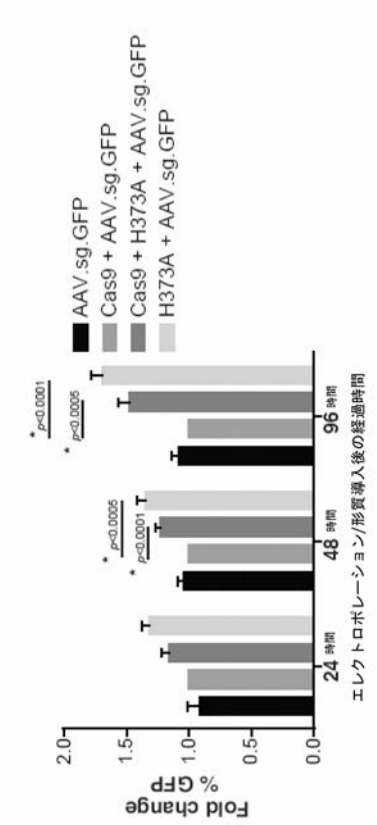
【 図 0 2 C 】



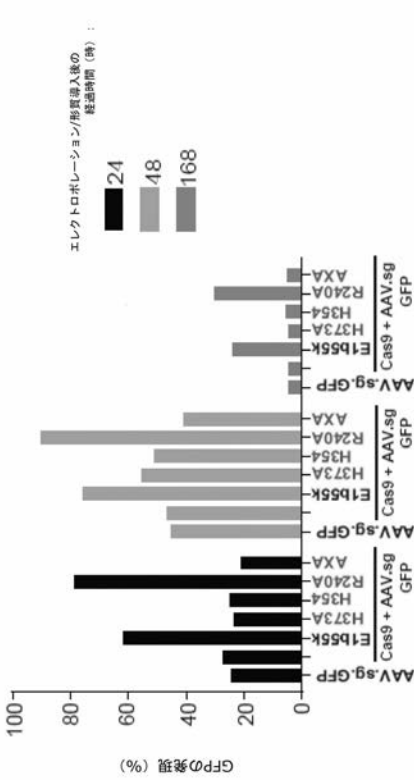
【図 0 3 A】



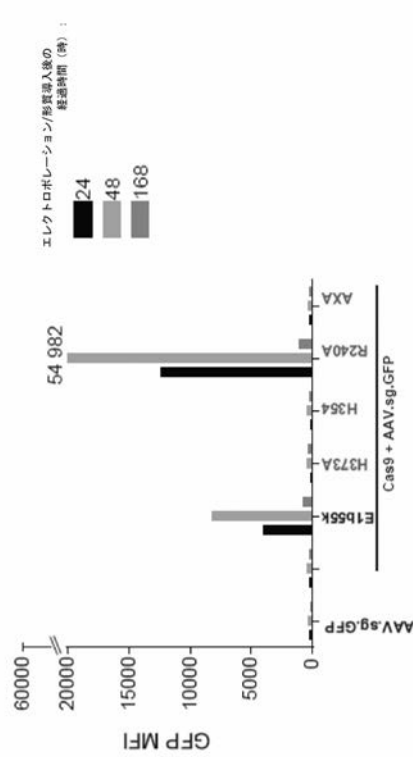
【図 0 3 B】



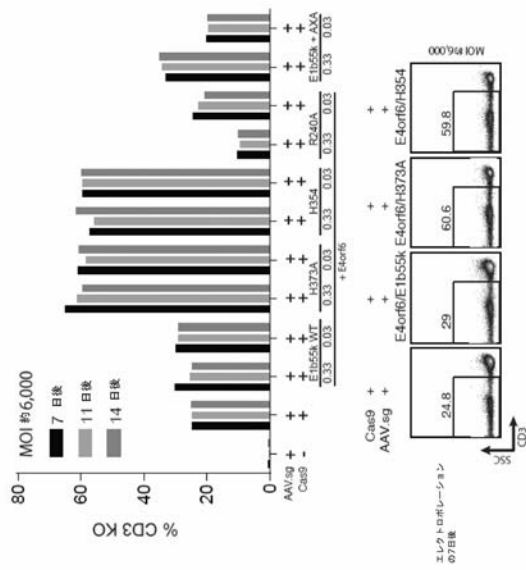
【図 0 3 C】



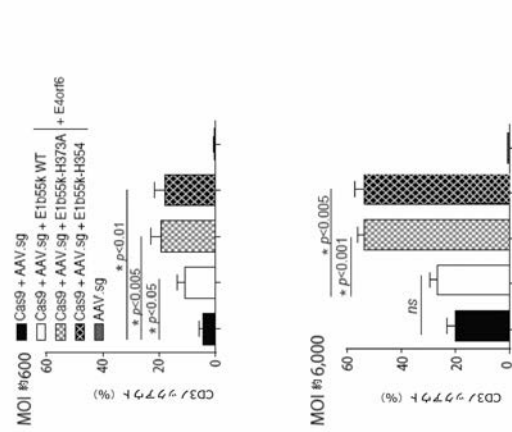
【図 0 3 D】



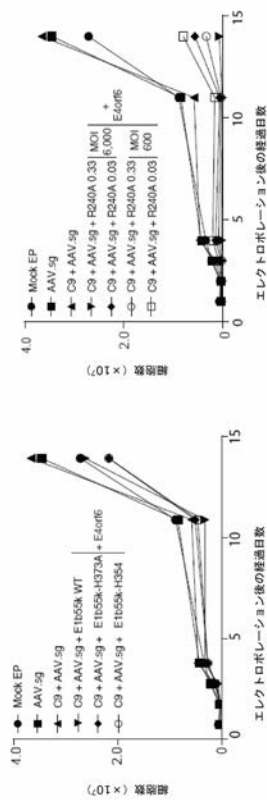
【 図 0 4 A 】



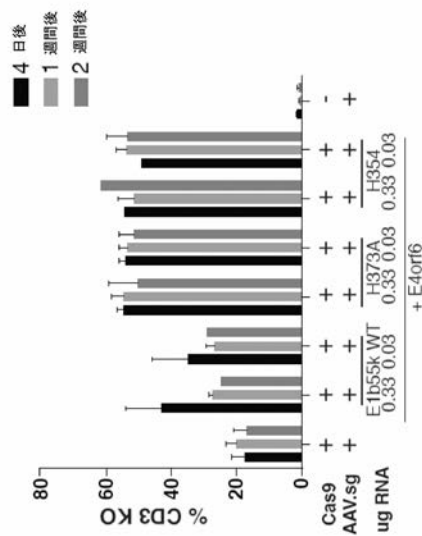
【 図 0 4 B 】



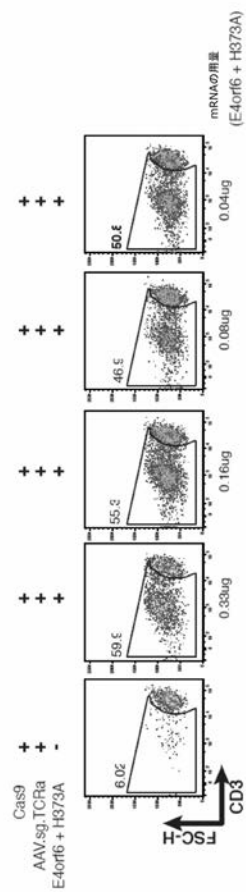
【 図 0 4 C 】



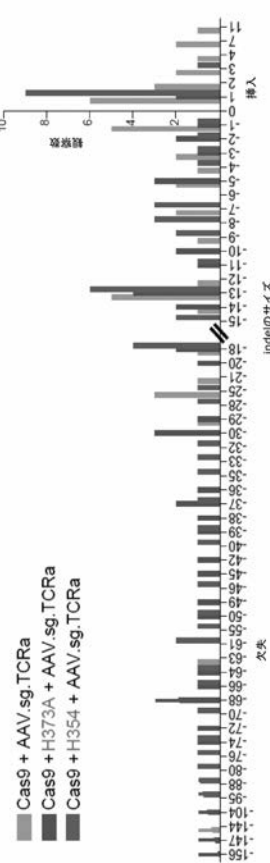
【 図 0 5 A 】



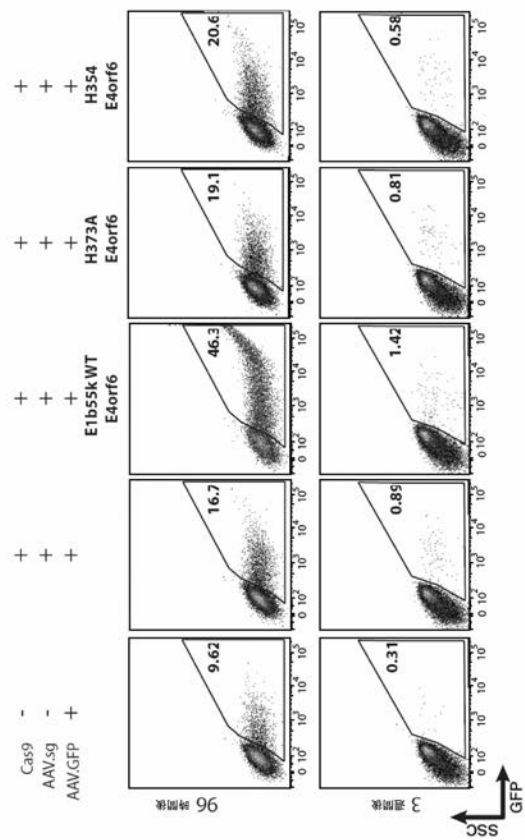
【図 0 5 B】



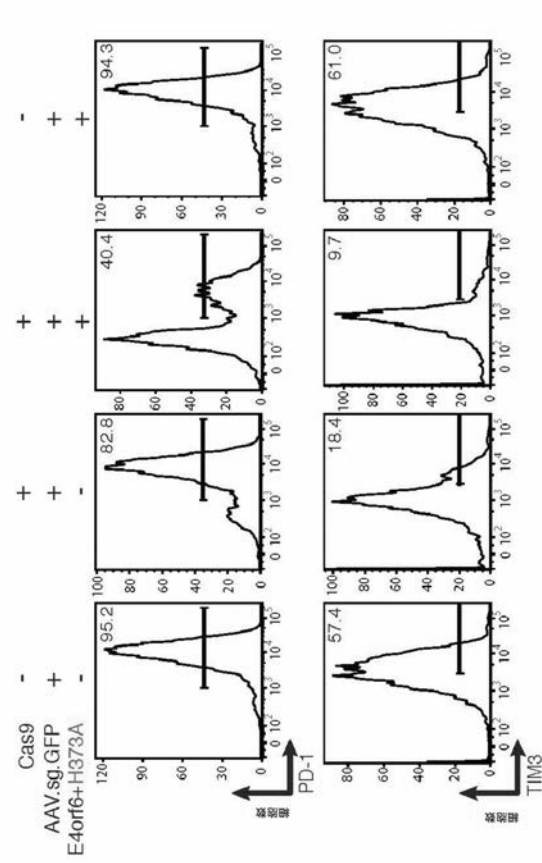
【図 0 5 C】



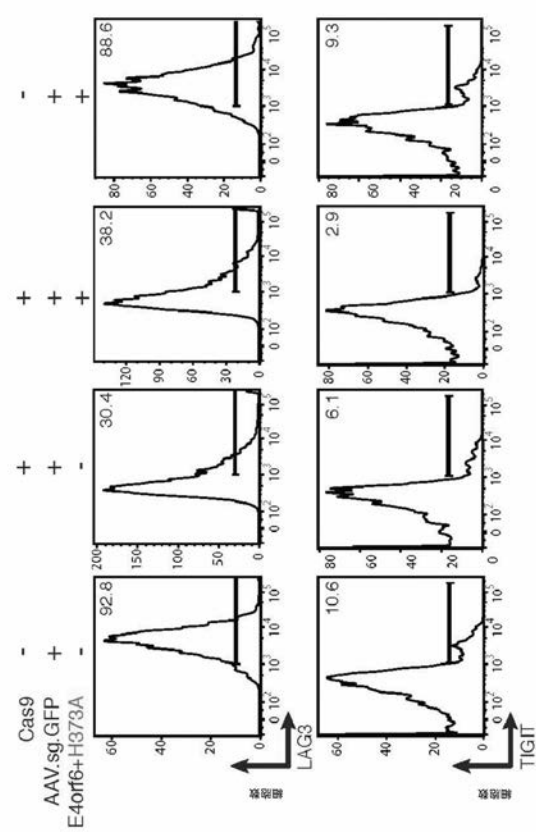
【図 0 6】



【図 0 7 A - 1】



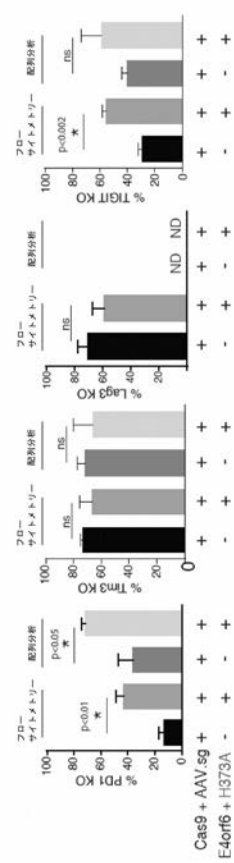
【図 07 A - 2】



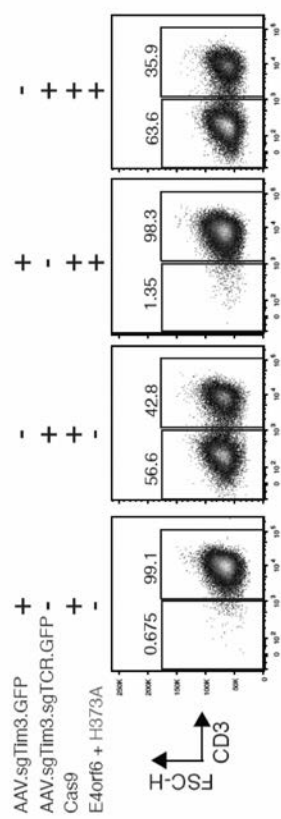
【図 08 A】



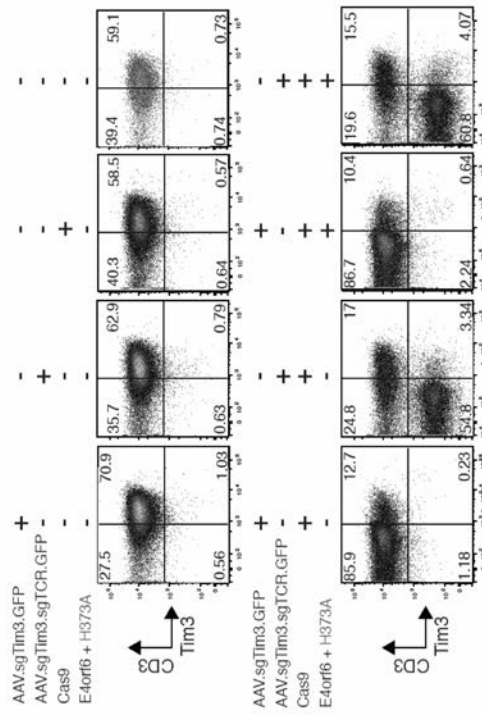
【図 07 B】



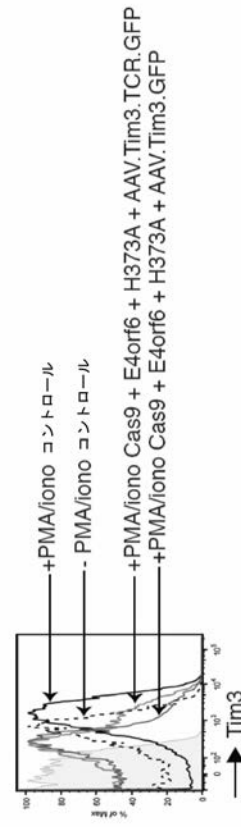
【図 08 B】



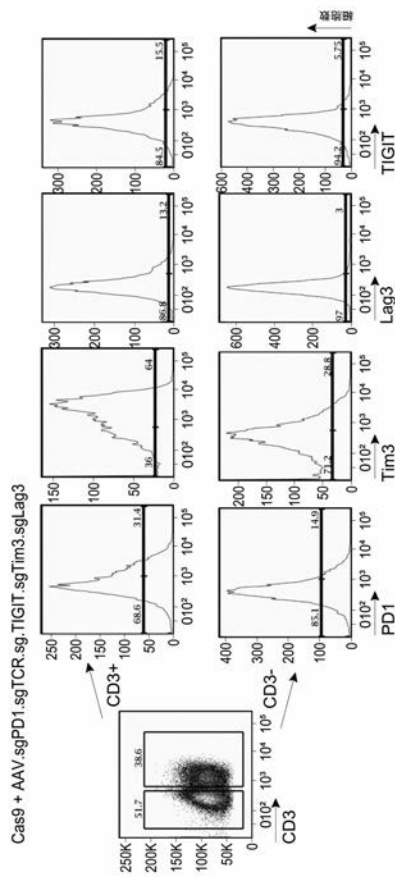
【図 08C】



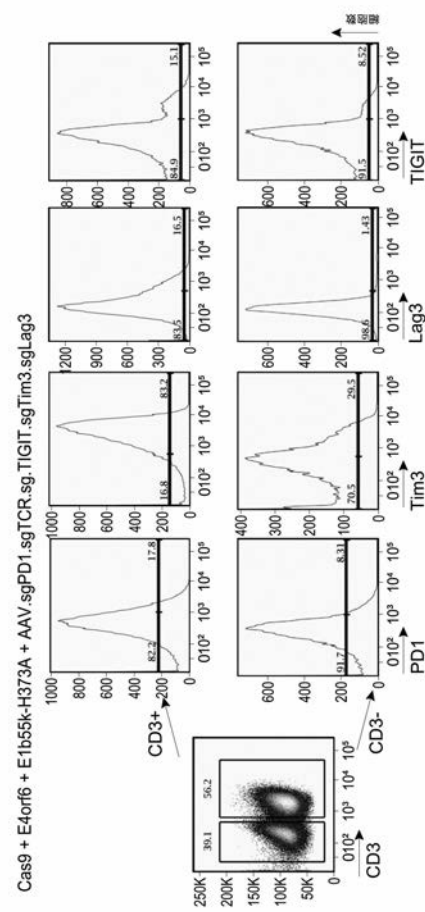
【図 08D】



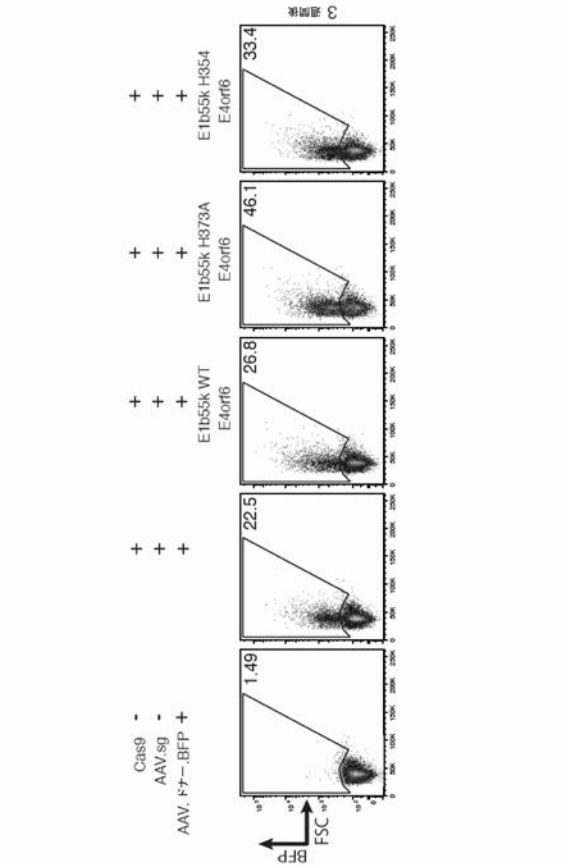
【図 09 - 1】



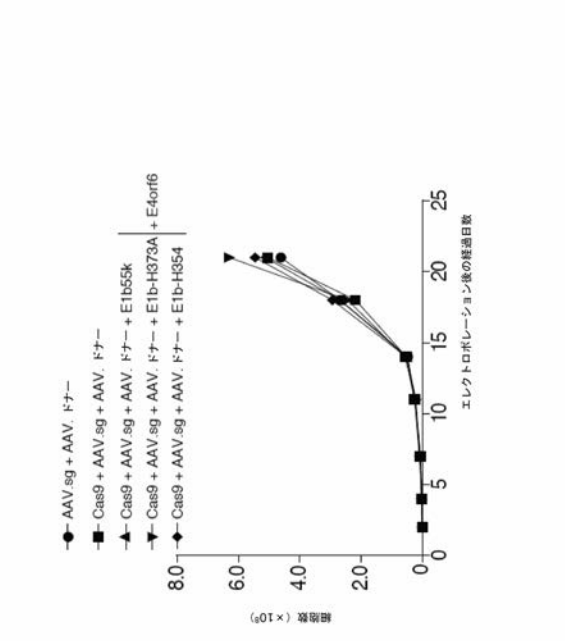
【図 09 - 2】



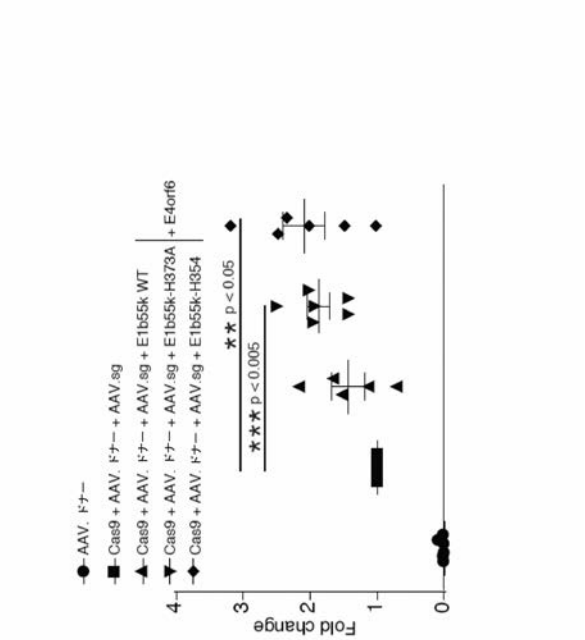
【図 10 A】



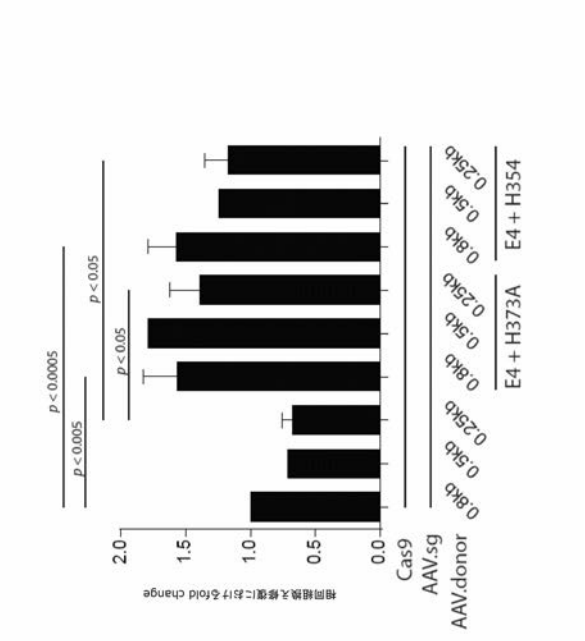
【図 10 C】



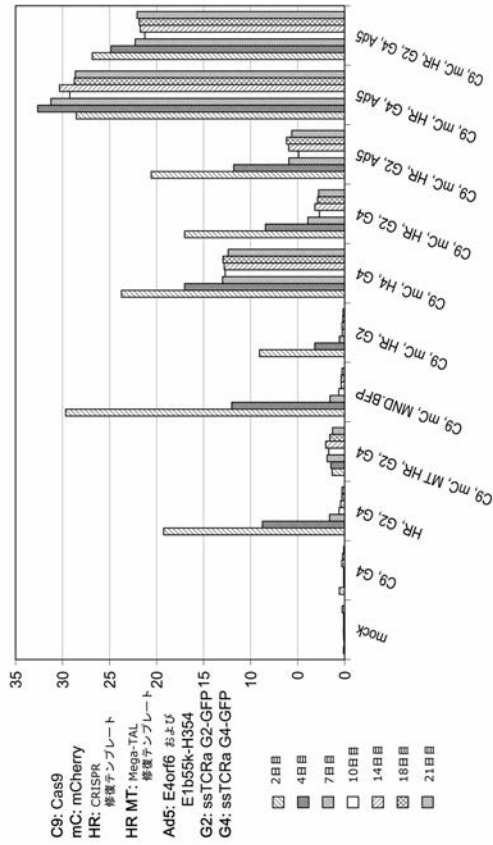
【図 10 B】



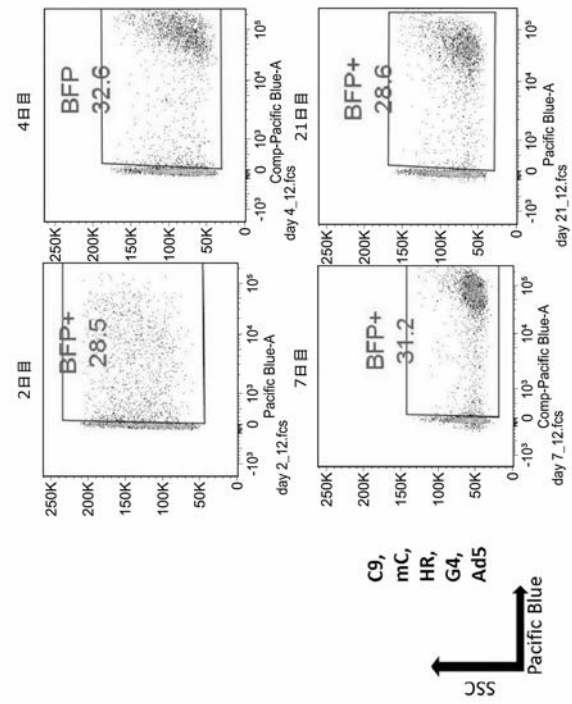
【図 11】



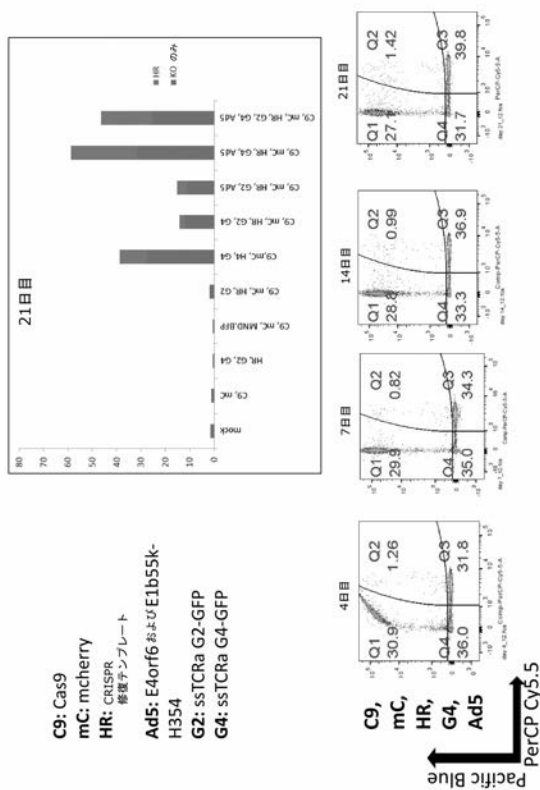
【図 1 2 A - 1】



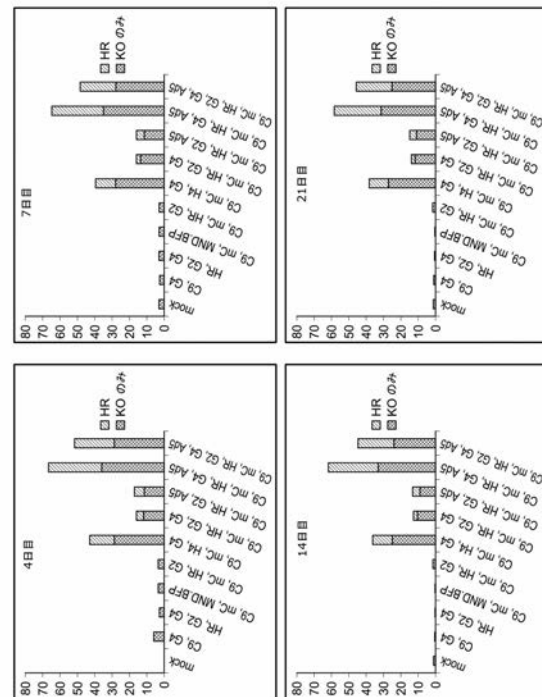
【図 1 2 A - 2】



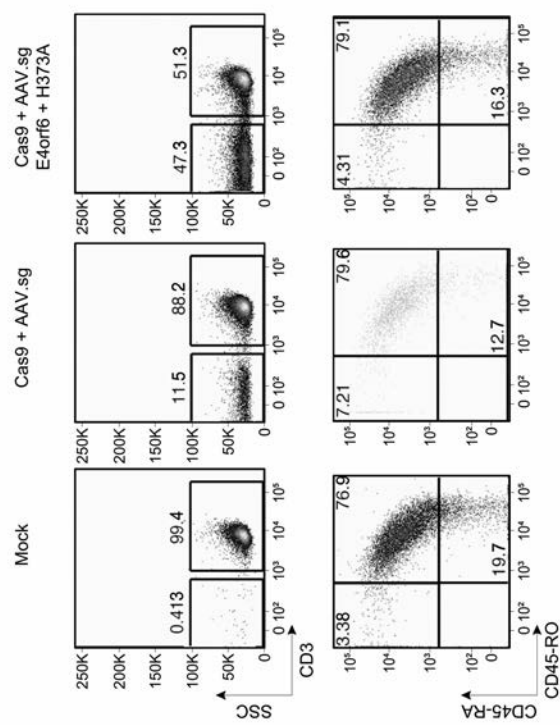
【図 1 2 B】



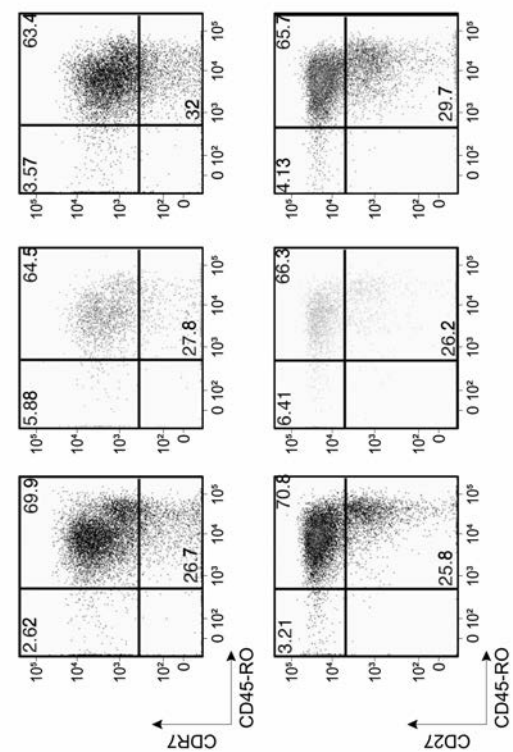
【図 1 2 C】



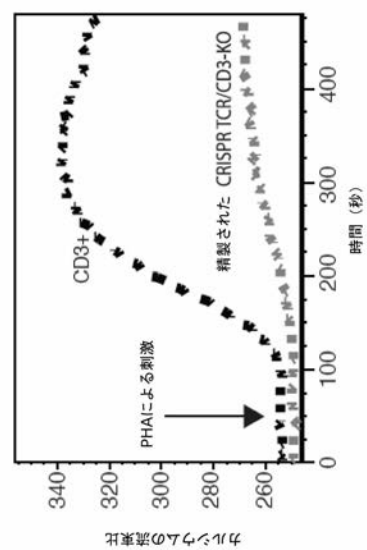
【 図 1 3 A - 1 】



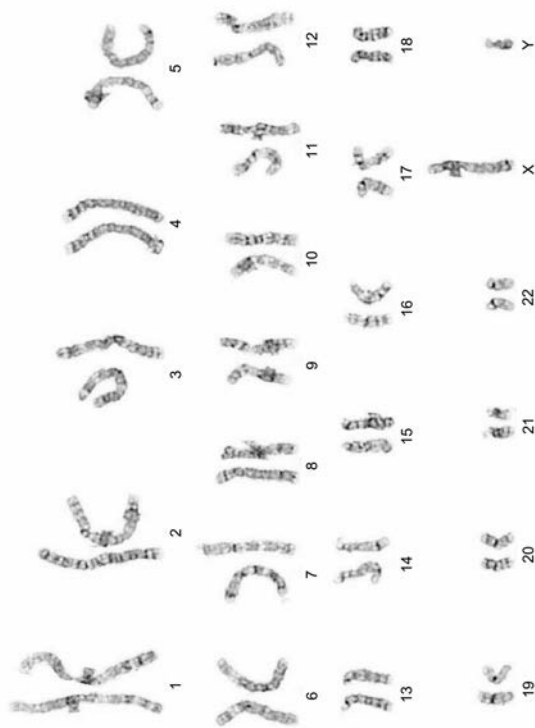
【 図 1 3 A - 2 】



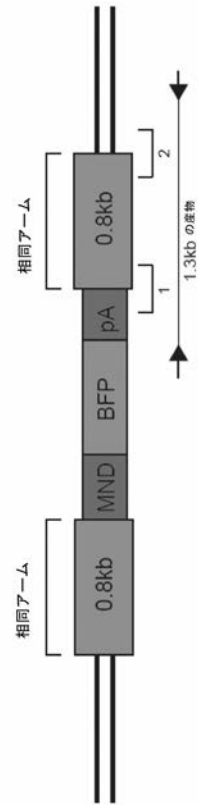
【 図 1 3 B 】



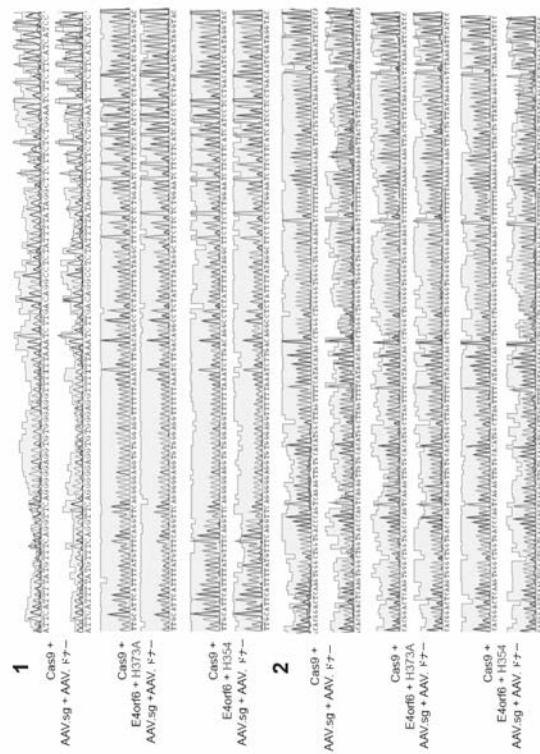
【 図 1 4 A 】



【 図 1 5 A 】



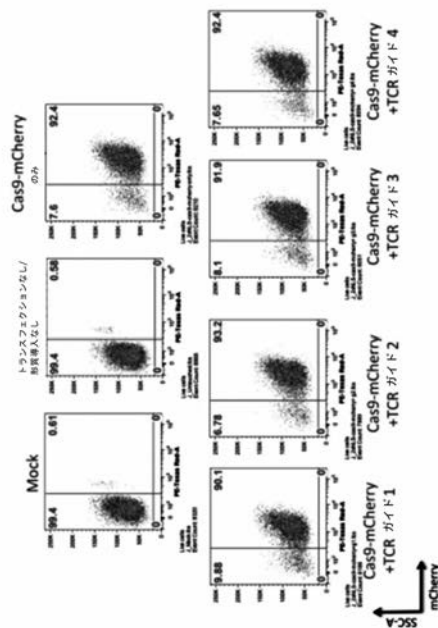
【 ㊦ 1 5 C 】



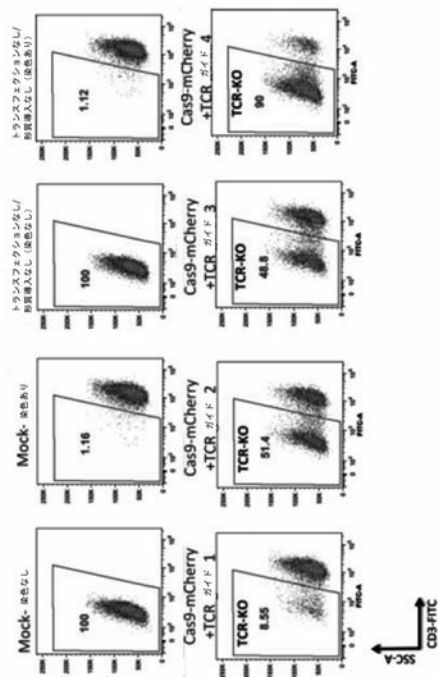
【図 16 A】

AACAAATGTGTCAAAAAGTA (配列番号 15)
 ACAAACCTGTGCTAGACATG (配列番号 16)
 TGTGCTAGACATGAGGTCTA (配列番号 17)
 TCAAGAGCAACAGTGCTG (配列番号 5)

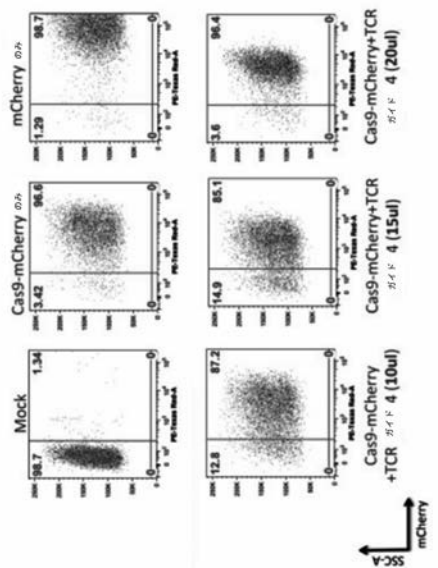
【図 16 B】



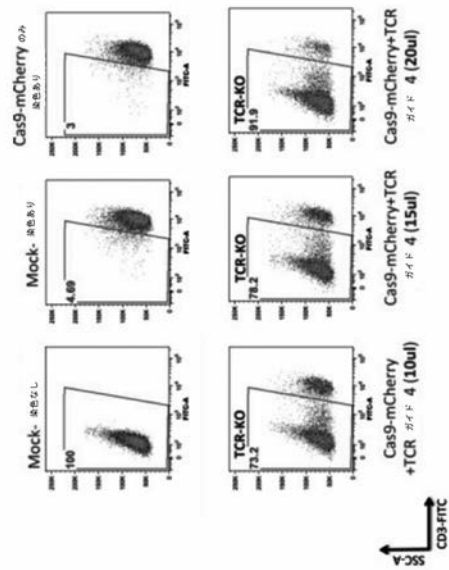
【図 16 C】



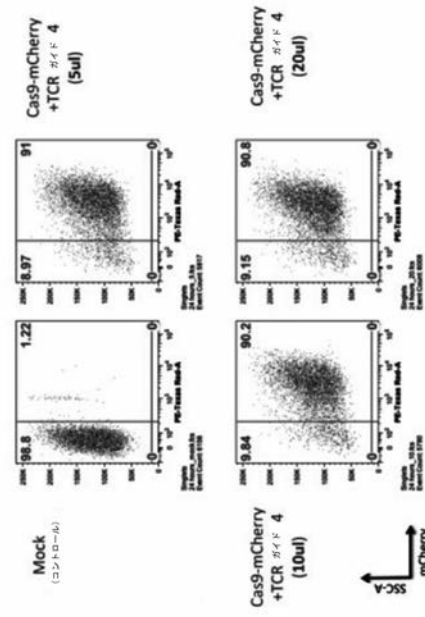
【図 16 D】



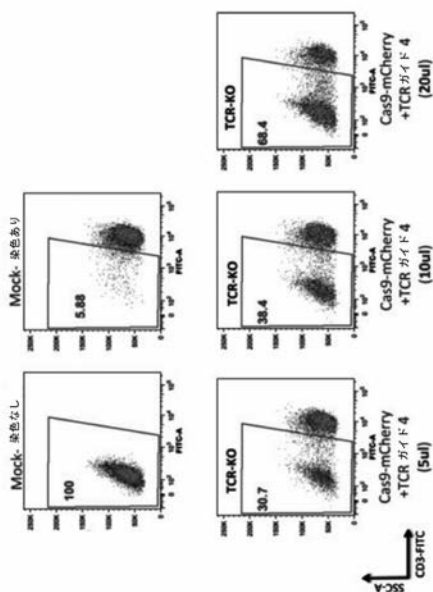
【図 16 E】



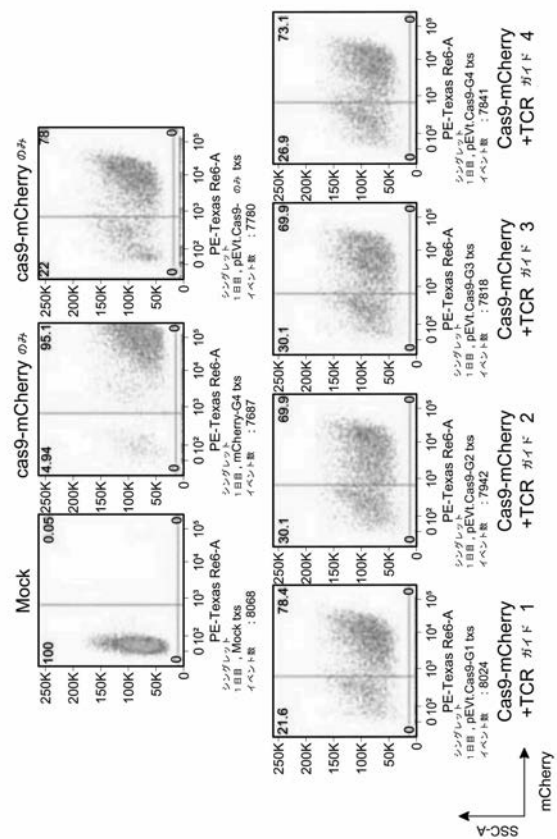
【図 16 F】



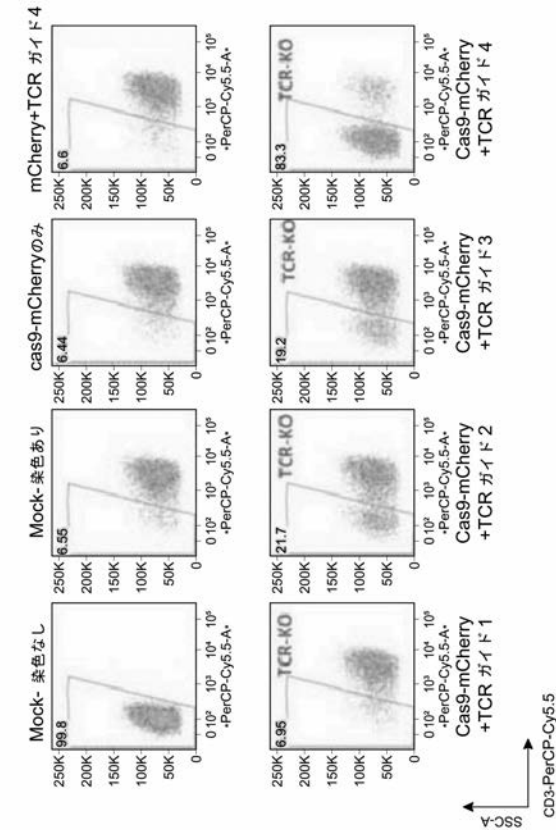
【図 16 G】



【図 16 H】



【図 16 I】



【図 18】

MERNPSERGVPAGFSGHASVESGCETQESPATVVFRRPGDNTDGGAAAAAGGSQAAAAAGAE
MEPESRPGSGMNVVQVAELYPRLRLITITDGGQGLGVKRGACAEATEARNLAFSLMTRHRP
ECITFQQIKDNCANELDLAQKYSIEQLTTYWLQPGDDFEEAIRVYAKVALRPDCKYKISKLVNIRNC
CYISGNGAEVEIDEDRVAFRCSMINMWPVGLMGDGVVIMNVFRFTGPNFSGTVFLANTNLILHG
VSFYGFNNTCVAWTDVVRGCAFYCCWKGVCPRKSRASIKKCLFERCTLGILSEGNSRVRHNVA
SDGCGFMLVKSVAVIKHNMVCGNCDERASQMLTCSGNGCHLLKTI~~AV~~ASHSRKAWPVFEHNILT
RCSLHLGNRRGVFLPYQCNLSTHTKILLEPESMSKVNLNGVDFDMMTKIWKVLYRYDETRTRCRPCEC
GGKHIRNQPVMLDVTEELRPHDLVLACTRAEFGSSDEDTD (配列番号 2)

【図 17】

MERNPSERGVPAGFSGHASVESGCETQESPATVVFRRPGDNTDGGAAAAAGGSQAAAAAGAE
PMEPESRPGSGMNVVQVAELYPRLRLITITDGGQGLGVKRGACAEATEARNLAFSLMTRH
RPECITFQQIKDNCANELDLAQKYSIEQLTTYWLQPGDDFEEAIRVYAKVALRPDCKYKISKLVNIR
NCCYISGNGAEVEIDEDRVAFRCSMINMWPVGLMGDGVVIMNVFRFTGPNFSGTVFLANTNLIL
LHGVSYGFNNTCVAWTDVVRGCAFYCCWKGVCPRKSRASIKKCLFERCTLGILSEGNSRVR
HNVASDCGFMVKSVAVIKHNMVCGNCDERASQMLTCSGNGCHLLKTIHVASHSRKAWPVFE
HNILTRCSLHLGNRRGVFLPYQCNLSTHTKILLEPESMSKVNLNGVDFDMMTKIWKVLYRYDETRTRC
RPCECGGKHIRNQPVMLDVTEELRPHDLVLACTRAEFGSSDEDTD (配列番号 1)

【図 19】

MTTSGVPFGMTLRTSRSLSRRTPYSRDRLPPFETETRATILEDHPLPECNLTMTMHNVSVRGLPC
SVGFTLIQEWVVPWDMVLTREELVLRKCMHVCLCCANIDIMTSMMIHGYESWALHCHCSPGS
LQCIAGGQVLASWFRMVVDGAMFNQRFIWIYREVYVNYNMPKEVMFMSSVFMGRHLIYLRW
YDGHVGSVPAMSFYSALHCGILNNVVLCCSYCADLSEIRVRCARRTRRLMLRAVRIIAEETTA
MLYSCRTERRRQCFIRALLQHHRRPILMHDYDSTPM (配列番号 3)

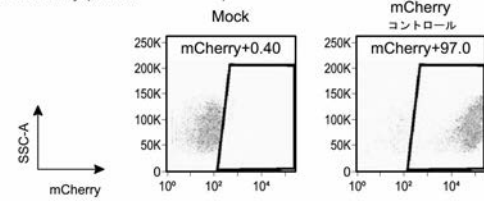
【 図 2 0 】

MERNPSRGVPAGFSGHASVESGCTQESPATVFRPPGDN TDGAAAAAGGSQAAAAAGAE
 MEPESRPGSGMNVVQAEVPELRILITEDGGQLKGVKRGACATEEARNLAFSLMTRHRP
 ECITFQIKDNCANELDLAQYSEQLTYYWLPQDDDFEAIKVALRDPCKYKSKLVNIRNC
 CYSNGAEVEIDTEDRAFRCSMINMWPGVLGMDGVIMNVFTGPNFSGTVFLANTLILHG
 VSYGFNNTCVAEAWTDVVRGCAFYCCWKGVCPRKSRASIKCLFCRCTLGILSEGNRSVRHNVA
 SDGCFMLVKSVAIVKHNHNVCGNCDRAGIPASQMLTCSNGCHLLKTIHVASHSKAWPVFEH
 NILTRCSLHLGNRRGVFLPYQCNLSHTKILLEPESMSKVNLVGDMTKIWKVLYRYDETRCRP
 CECGGKHIRNQPVMLDVTEELRPDHLVLACTRAEFGSDEDTD (配列番号 4)

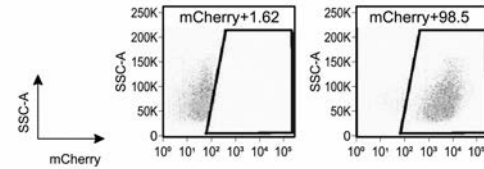
【 図 2 1 - 1 】

TCR α CRISPRガイド#4を使用したTCR- α KO (ノックアウト) が最も効率が低い

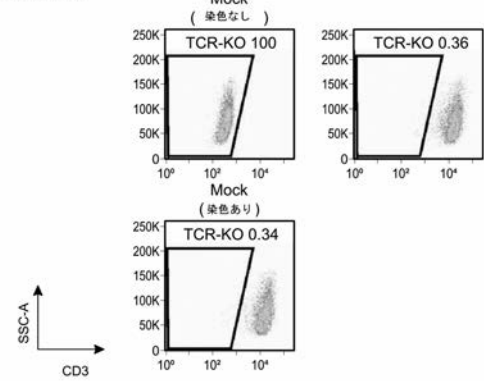
1日目 mCherry (mRNA トランスフェクション)



7日目 mCherry (mRNA トランスフェクション)



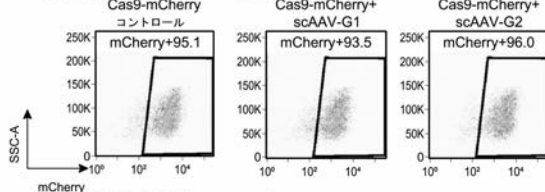
7日目 TCR-KO



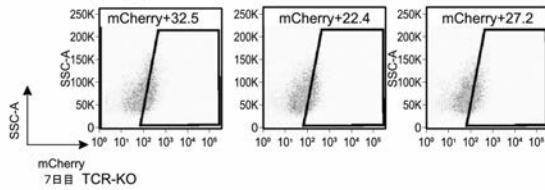
【 図 2 1 - 2 】

TCR α CRISPRガイド#4を使用したTCR- α KO (ノックアウト) が最も効率が低い

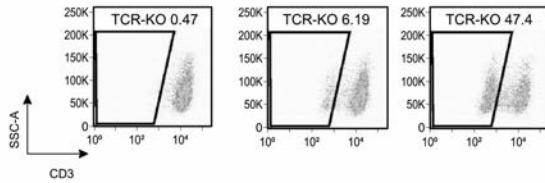
1日目 mCherry (mRNA トランスフェクション)



7日目 mCherry (mRNA トランスフェクション)



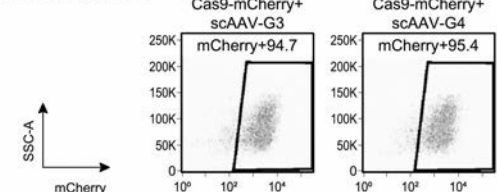
7日目 TCR-KO



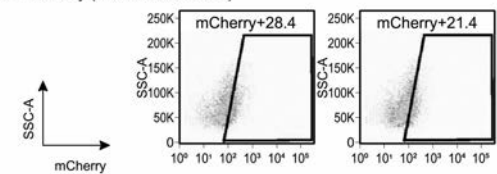
【 図 2 1 - 3 】

TCR α CRISPRガイド#4を使用したTCR- α KO (ノックアウト) が最も効率が低い

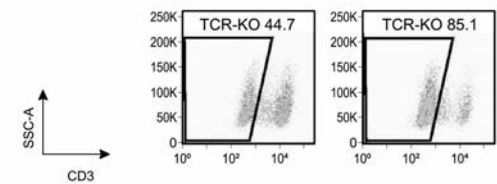
1日目 mCherry (mRNA トランスフェクション)



7日目 mCherry (mRNA トランスフェクション)



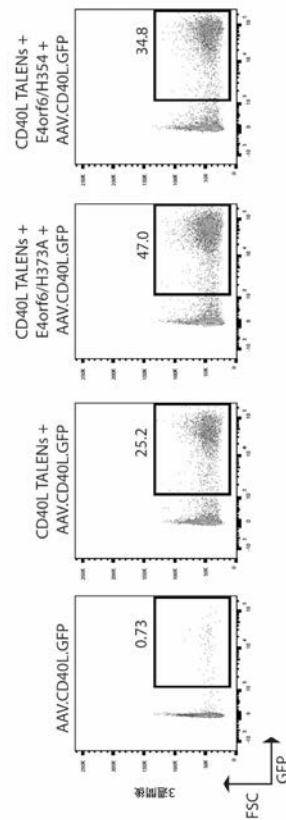
7日目 TCR-KO



【 図 3 1 】

GCCACGACACCAACCACCA (配列番号	18)
TCTTCCTAGGAATGATGAC (配列番号	19)
GCGGTCCCTGAGGTGCACCG (配列番号	20)
AGAA GTGGAATACAGAGCGG (配列番号	21)

【 ㄨ 3 2 B 】



【 図 3 4 】

[illegible]

2018520648000001 . app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/032153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 48/00; C12N 15/64; C12N 15/85 (2016.01) CPC - A61K 48/00; A61K 48/0066; C12N 15/8509; C12N 15/907; C12N 2750/14143 (2016.05) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC - A61K 48/00; C12N 15/64; C12N 15/85 CPC - A61K 48/00; A61K 48/0066; C12N 15/8509; C12N 15/907; C12N 2750/14143 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/93.71; 424/93.7; 435/369; 435/455; 435/254.11 (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar Search terms used: mammalian genome editing crispr/cas9 talen adenovirus gene replacement "guide RNA" nuclease inassigne: childrens		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/0110762 A1 (SANGAMO BIOSCIENCES, INC.) 23 April 2015 (23.04.2015) entire document	1-3, 45-48, 94
A	GAJ et al. "ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-Based Methods for Genome Engineering," Trends in Biotechnology, 31 July 2013 (31.07.2013), Vol. 31, Pgs. 397-405. entire document	1-3, 45-48, 94
A	US 2014/0273226 A1 (SYSTEM BIOSCIENCES, LLC) 18 September 2014 (18.09.2014) entire document	1-3, 45-48, 94
A	WO 2015/031775 A1 (TEMPLE UNIVERSITY OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 05 March 2015 (05.03.2015) entire document	1-3, 45-48, 94
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 July 2016		Date of mailing of the international search report 19 AUG 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/032153

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-44, 49-93, 95, 96
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
A 6 1 K 38/50 (2006.01)	A 6 1 K 38/50	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	

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

(72) 発明者 ローリングス, デイヴィッド
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 1 2 シアトル, イー バレー ストリート 1 4 2 9

(72) 発明者 ジェンセン, マイケル, シー.
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 1 0 ベインブリッジ アイランド, プレザント ビーチ
 ドライブ エヌイー 4 1 8 7

(72) 発明者 グヴィヤズダ, カミラ
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 1 5 シアトル, ラヴェンナ アヴェニュー エヌイー
 8 8 2 7

(72) 発明者 グリアー, アレクサンドラ
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 1 5 シアトル, ラヴェンナ アヴェニュー エヌイー
 8 8 2 7

F ターム (参考) 4C084 AA13 BA44 CA04 DC22 DC50 ZB211
 4C087 AA01 AA10 BC83 CA12 ZB21