

第28回 日本遺伝子細胞治療学会学術集会
Corporate Seminar V

EmendoBioにおける ゲノム編集治療の開発

MAKING ANY GENE TARGETABLE

- 発表者は、EmendoBioの親会社であるアンジェス株式会社の従業員である。
- 発表内容には、演者の個人的な見解が含まれている。

EmendoBioのご紹介

人員

- 2016年、ワイズマン研究所出身の研究者により設立
- 従業員数: ~100名 (主にR&D要員)

How can we advance CRISPR from a revolutionary research tool to a level of precision and efficiency that will enable us to target ANY genetic disease?



DUAL OMNI™
TECHNOLOGY PLATFORMS

- ✓ 新規ヌクレアーゼの探索技術
- ✓ ヌクレアーゼの最適化技術



EXTREME PRECISION GENE EDITING

- ✓ 安全性
 - オフターゲット効果の排除
- ✓ 適用範囲の拡大 (顕性遺伝性疾患)
 - アレル特異的編集
 - 新たな編集戦略
- ✓ 臨床応用の実現性
 - 既存のヌクレアーゼとは異なる多くの新規ヌクレアーゼパネル

ELANE関連重症先天性好中球減少症 (SCN)

- 好中球の分化・成熟不全 (<500 cells/mL) により感染症を反復

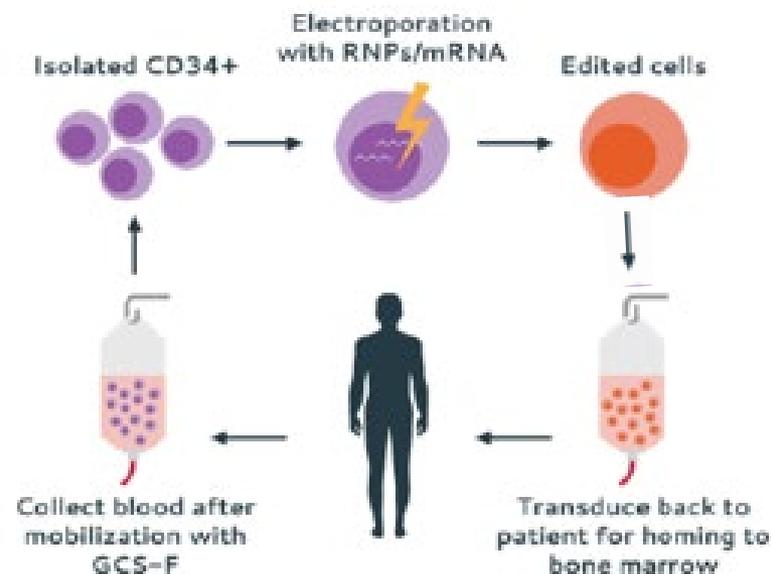
- ELANE: 好中球エラスターゼ遺伝子
- タンパク質の立体構造の異常により細胞外分泌機構を障害し、好中球への分化・成熟が阻害される。
 - 毒性機能の獲得 (dominant negative mutation)
 - 常染色体顕性遺伝性疾患
 - 正常遺伝子の導入では治療できない
 - 毒性機能獲得遺伝子の破壊 (正常アレルは温存)
- 発生率: 1/250,000 (全世界で16,000例)

- 既存の治療法

- 感染症対策 (抗菌剤投与)
- 生涯に亘るG-CSFの投与 (AML/MDS発症のリスク)
- 他家骨髄幹細胞移植 (GVHD、生着不全、死亡のリスク)

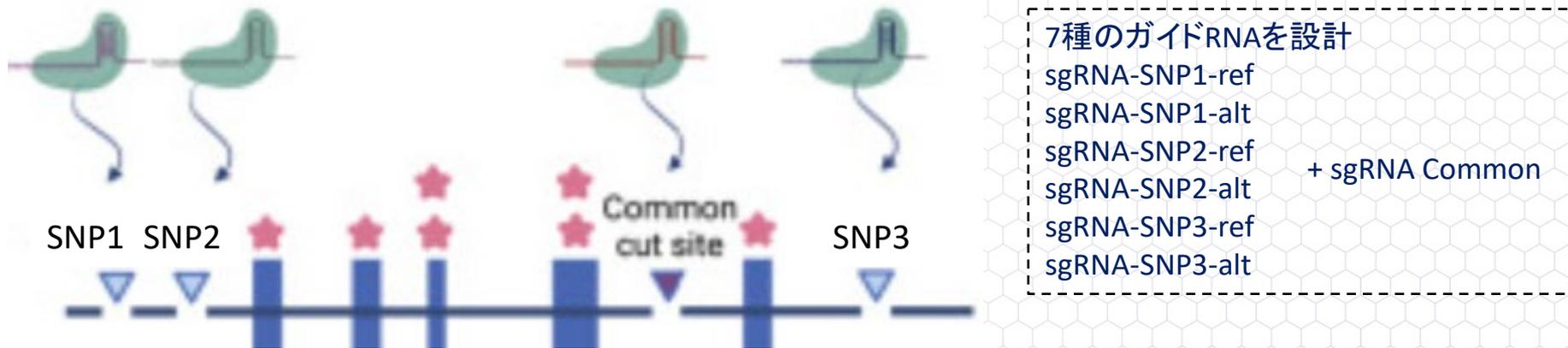
- 本治療の有用性

- Ex vivoで編集処理を行う (ウイルスベクターを用いない) (RNPをエレクトロポレーションで導入)
- 編集処理後の自家造血幹細胞が患者に生着し、1回の治療で生涯に亘って有効性が期待できる。
- 編集処理が成功した細胞が、患者骨髄で優先的に分化・増殖する。
- 治療効果が明確 (好中球数の回復)



SNPsを標的とするゲノム編集戦略

- これまでに200種以上の点突然変異が報告されている。
- 病因変異を標的として、患者ごとにガイドRNAを設計するのは現実的ではない。



- 遺伝子を2か所で切断し、編集後に病因遺伝子が発現しないようにする。
 - 2か所の内1か所はSNPs(病因ではない)を標的とすることによりアレル特異的な編集を行う。
 - Hetero frequencyの高いSNPsを3カ所選択
 - One of 3 SNPs + Common Cut Siteの2か所で切断
- 削除すべきアレルのSNPが基準配列(ref)か変異配列(alt)かLong Read DNA Sequenceで確認する。

SNPsを標的とするゲノム編集戦略

tube #	Diagnosis	ELANE mutation	Exon	SNPs		
				SNP1	SNP2	SNP3
1	cong	S126L	4	CC	TA	CC
2	cong	G210V	5	CT	TT	CC
3	cong	C55S	2	CC	TA	CC
4	cong	G221ter	5	CC	TA	AA
5	cong	D230fs	5	CC	AA	CC
6	cong	A57T	2	CT	TA	AA
7	cong	R103P	3	CC	TT	AA
8	cong	T128del	4	CT	AA	CA
9	cong	V83D	3	CT	TT	AA
10	cong	L84P	3	CT	TA	CA
11	cong	L84P	3	CT	TT	CA
12	cong	M154R	4	CC	TT	CA
13	cong	G221ter	5	CT	TT	AA
14	cong	G203R	5	CT	TA	CA
15	cong	G214R	5	CC	AA	CA
16	cong	P139L	4	CC	AA	CC
17	cong	Y228ter	5	CT	TT	AA
18	cong	P139L	4	CC	TA	CA
19	cong	W156R	4	CT	TA	CC
20	cong	P139L	4	CC	AA	CA
21	cyclic	P139L	4	CC	TT	CC
22	cong	I120N	3	CT	TT	AA
23	cong	G214R	5	CC	TA	CC
24	cyclic	S46F	2	CC	TA	CA
25	cong	IVS4 +5G>A	INT	CC	TT	CA
26	cong	S126L	4	CC	TA	CA
27	cong	R103L	3	CC	TA	CA
28	cong	M66R	2	TT	TT	CC
29	cong	C208X	5	CT	TA	CC
30	cong	M1R	1	CC	TT	CA
31	cong	P234fs	5	CC	AA	CC
32	cong	I60T	2	CC	TT	CA

	Heterozygous Frequency
SNP1	33 %
SNP2	46 %
SNP3	42 %
Combined coverage	76 %

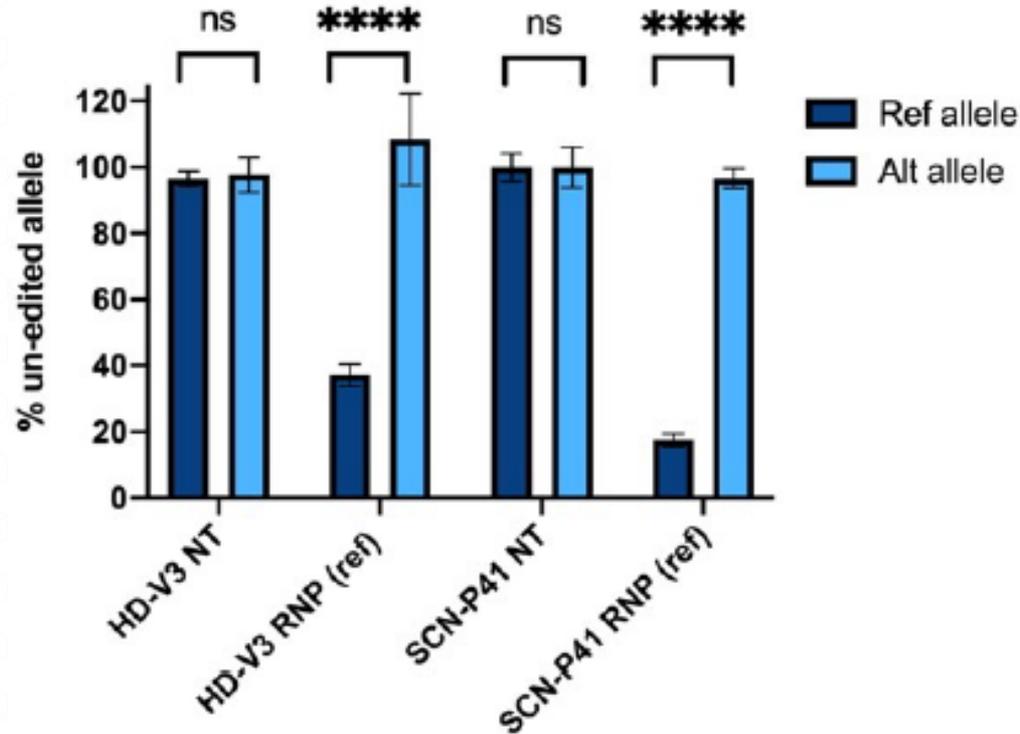
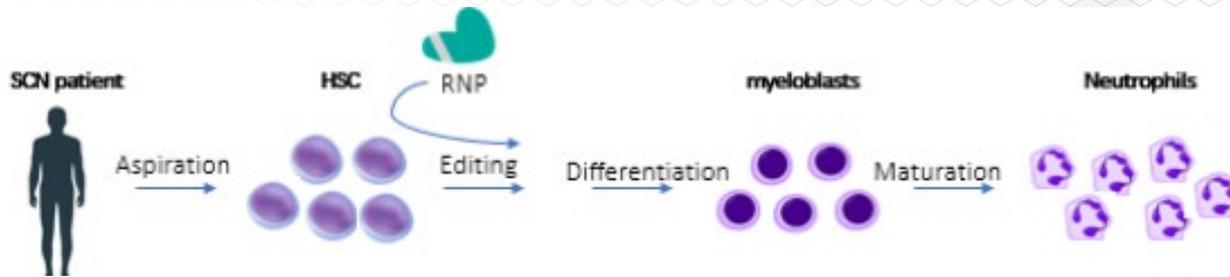
Expected Coverage= 76%

Observed Coverage=

$$\frac{\# \text{ of samples harboring at least 1 SNP}}{\# \text{ of total samples}} \times 100 = 81\%$$

3カ所のSNPsについて準備することにより、80%以上の患者をこの治療の対象とすることができると言える。

患者造血幹細胞を用いたアレル特異的編集



✓ アレル特異的編集

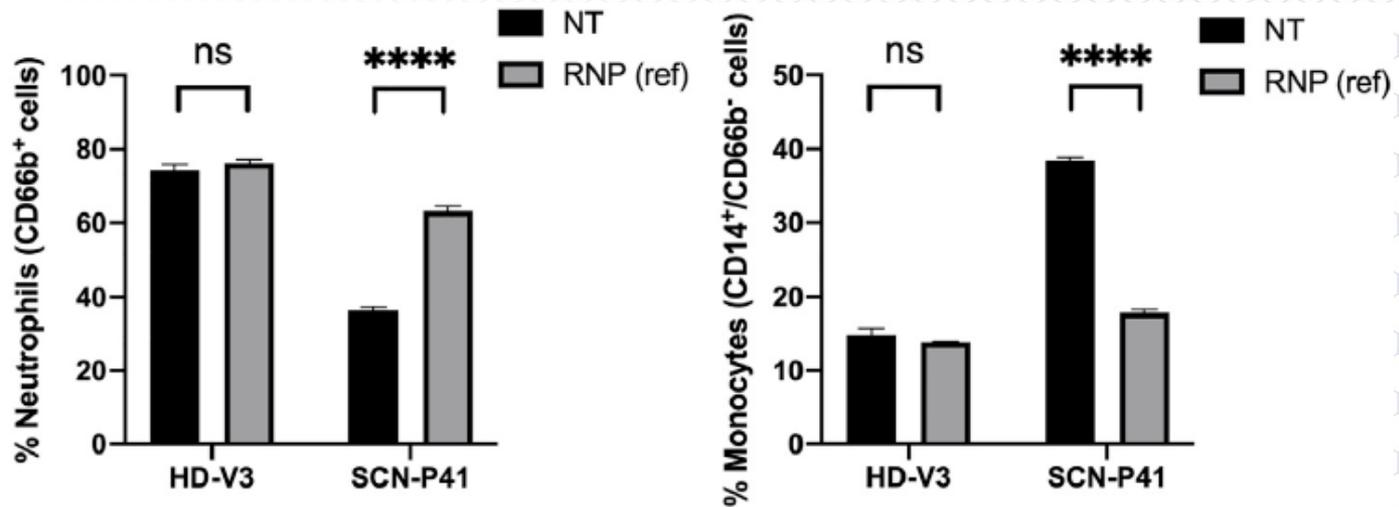
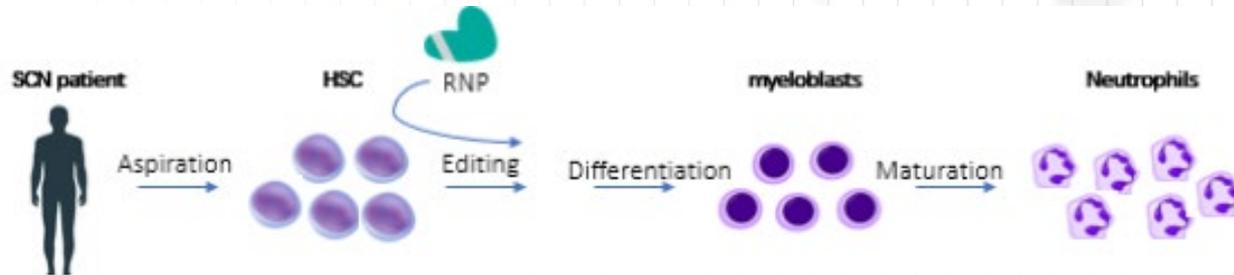
基準配列用のガイドRNAを用いて処理した時、

- 基準配列を持つアレルは20~40%を残して編集されたが、
- 変異配列を持つアレルは編集されなかった。



一塩基多型を正確に区別

in vitroにおける血球分化

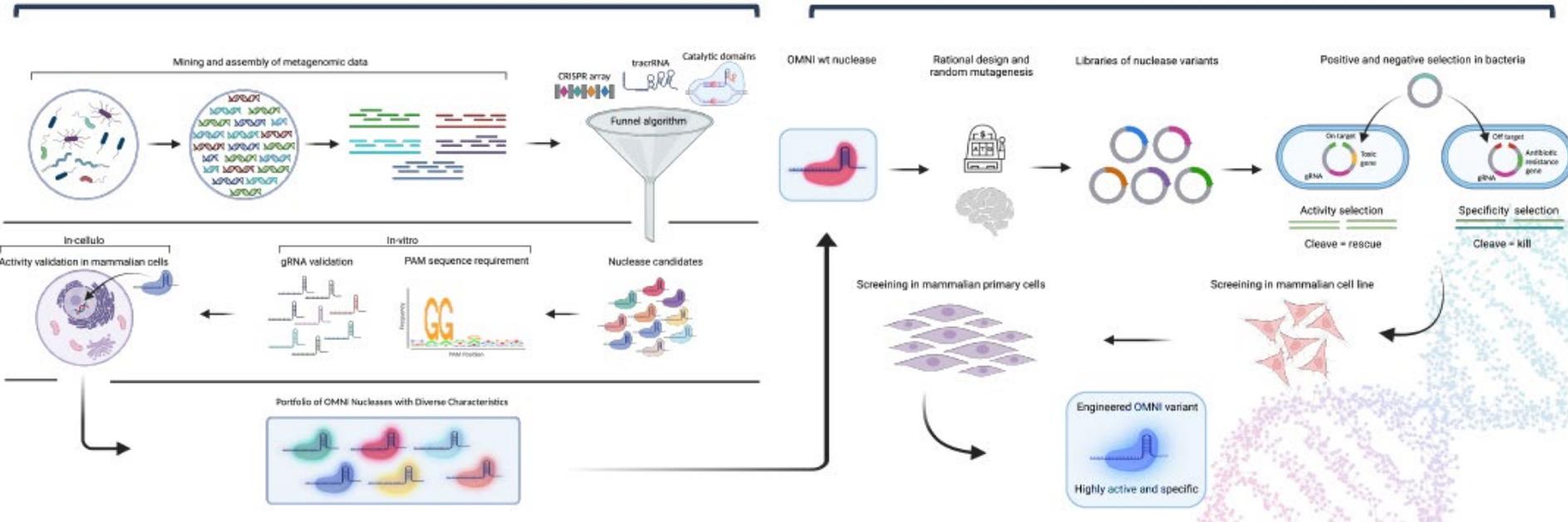


毒性を獲得したELANE遺伝子をアレル特異的にノックアウトすることにより、
阻害されていた好中球への分化・増殖が可能になった

新規ヌクレアーゼ (OMNI™) の探索および最適化プラットフォーム

探索

最適化



広大な微生物界を探索し、
様々な特徴 (サイズ、PAM配列、活性・特異性) を持つ
未知のヌクレアーゼを同定する

指向性進化法 (Directed Evolution) により新規ヌクレアーゼ (RNA Guided Nuclease) の精度を向上させる。
高活性・低オフターゲット効果・アレル特異性

OMNI-A1 (野生型)はspCas9より 精度の高いゲノム編集が可能



Total number of off-target sites found
by GuideSeq on 5 genomic targets

On-Target

Site	SpCas9	OMNI A1
gRNA1	88%	95%
gRNA2	86%	80%
gRNA3	82%	80%
gRNA4	89%	85%
gRNA5	---	---

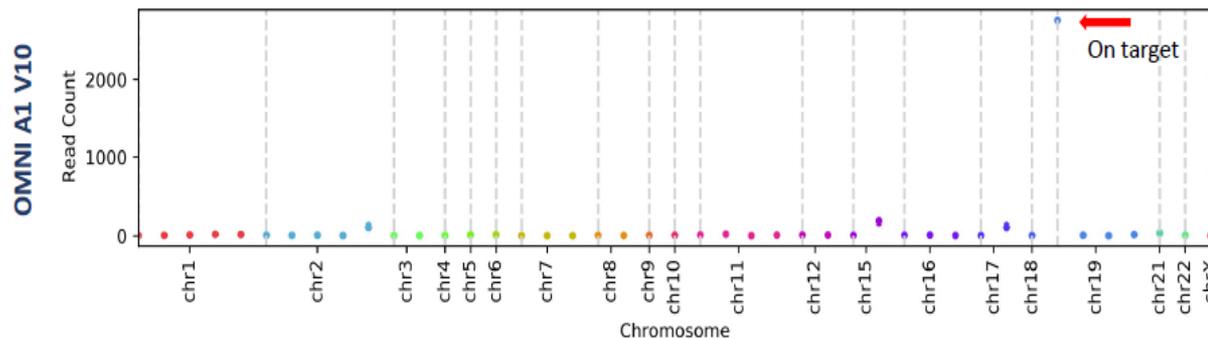
On-target editing levels
measured by NGS

OMNI A1, a newly discovered nuclease, shows improved fidelity compared with SpCas9 without compromising on activity, even before optimization.

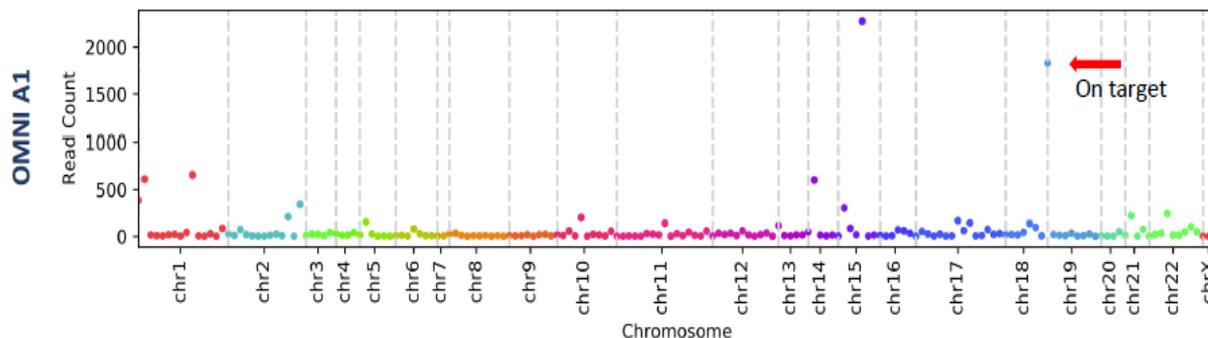
- 酵素活性を損なわず、特異性の高いヌクレアーゼを取得
- OMNI-A1(野生型)はすでにspCas9より特異性が高いが、アレル特異的ゲノム編集を達成するため、それぞれの標的配列に合わせた最適化を実施

OMNI-A1(野生型)から最適化されたOMNI-A1-V10

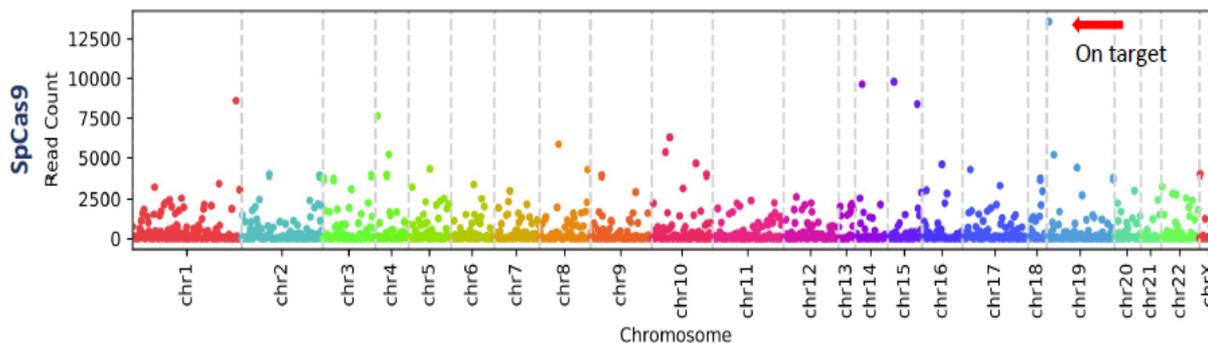
'Off Targets' identified in healthy donor cells edited OMNIA1 and OMNIA1 V10 (CIRCLEseq data)



OMNI-A1 V10:
オンターゲット以外はほとんど切断が起こらない。



野生型のOMNI-A1:
オフターゲットサイトはかなり少ないが、オンターゲット以外の切断点も散見される。



spCas9:
オンターゲットサイト以外にも、かなりの数のオフターゲットサイトがかなり頻度高く見られる。

がん免疫療法に用いるゲノム編集組成物

Major IP Issue in the Cell Therapy Space: Heavily Patented NGG Guides

NGG Patented Guides Covered in Patent Applications by Many Entities
Commonly used nucleases and compatible guide targets are heavily patented by multiple unrelated entities.

	# of patent families directed to guide sequences	# of NGG guides left after patent screen	# of guides for non-NGG nuclease selected for this program
TRAC	56	0/20	15
TRBC1	23	1/20	3
TRBC2	23	1/21	5
CD3e	4	10/79	18
B2M	42	0/33	12
CIITA	9	0/294	35
PD1 (PDCD1)	51	0/196	29
TET2	6	8/638	288

Emendo Provides a Novel Solution

IP Generated for Multiple Targets Using Emendo's Novel Nucleases with Alternative PAMs

T Cell Exhaustion	Check Point Inhibitors	Allogeneic	Off-Target (cytotoxicity)	Avoid GvHD
TIM-3	PD1	HLA	TRAC	TRAC
LAG3	CTLA4	B2M	TRBC1	TRBC1
TOX2		HLA-DRA	TRBC2	TRBC2
TOX		HLA-A	CD3e	CD3e
			CD3g	CD3g
				CIITA
				CD52

- CAR-T改良のためのゲノム編集ツールが各社で特許化
- PAM配列が異なるヌクレアーゼを用いることによって、それらの特許を回避したゲノム編集ツールの構築が可能
- CAR-T療法の開発会社への導出

進行中のプログラム

Programs	Drug Name	Stage	Collaborator
 Hematology			
Severe Congenital Neutropenia	EMD-101	IND enabling studies	University of Washington
Immunodeficiency	EMD-102	Pre-Clinical	National Institutes of Health
Bone Marrow Failure	EMD-103	Pre-Clinical	National Institutes of Health
 Ophthalmology			
Retinitis Pigmentosa	EMD-201	Pre-Clinical	Columbia University
Cone-rod dystrophy	EMD-202	Pre-Clinical	Proprietary
Macular dystrophy	EMD-203	Pre-Clinical	Proprietary
 CNS			
Familial Parkinson's disease	EMD-401	Pre-Clinical	Proprietary
Familial ALS	EMD-402	Pre-Clinical	Proprietary
 Liver			
Inborn errors of metabolism	EMD-501	Pre-Clinical	Confidential
Dominant liver diseases	EMD-502	Pre-Clinical	Confidential
 Immuno-oncology			
CAR-T, NK cells	Collaboration		Confidential

- オフターゲット効果の排除は、ゲノム編集の臨床応用に必須の課題
- 高い特異性と高い活性を両立した新規ヌクレアーゼの探索技術プラットフォームを確立
- オフターゲット効果の排除のみならず、アレル特異的ゲノム編集を可能とする。

偶然似たDNA配列を持つ
関係のない遺伝子を
編集してしまう

基本的に同じ配列を持つアレル間の
たった1塩基の違いを識別し、
正常アレルは編集せず
変異アレルのみを編集する

- 常染色体顕性遺伝子疾患等、これまで対象にできなかった種類の遺伝子疾患の治療を目指す
- SNPsを標的とし、病因遺伝子の多種類の変異に対して、少数のガイドRNAで対応できる編集戦略を開発
- 遺伝子疾患に限らず、あらゆる疾患に対して安全に使用できるゲノム編集治療の開発が期待できる

ご清聴ありがとうございました。