

ゲノム編集技術の医療応用 — EmendoBio Inc.の取り組み —



アンジェス株式会社の拠点



<https://www.anges.co.jp/company/#office>

Location 拠点

本社	〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目7番15号 彩都バイオインキュベータ
東京支社	〒108-0014 東京都港区芝四丁目13番3号 PMO田町Ⅱ9階
殿町研究開発センター (CMC開発部・創薬研究部)	〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区殿町三丁目25-14 ナノ医療イノベーションセンター内
アンジェスクリニカル リサーチラボラトリ (ACRL)	〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区殿町三丁目25-13 川崎生命科学・環境研究センター内

Group 当社グループ会社

AnGes USA, Inc.	111 Town Square Place, Suite 1507, Jersey City, New Jersey, 07310 USA
EmendoBio Inc.	400 W 61st St, #2330 New York, NY USA

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 (約8割はR&D要員)
- 2020年末、アンジェス株式会社の100%子会社となる

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
 - Bioinformatics
 - High Throughput Screening
- ✓ ヌクレアーゼの最適化技術
 - Machine Learning
 - Directed Evolution



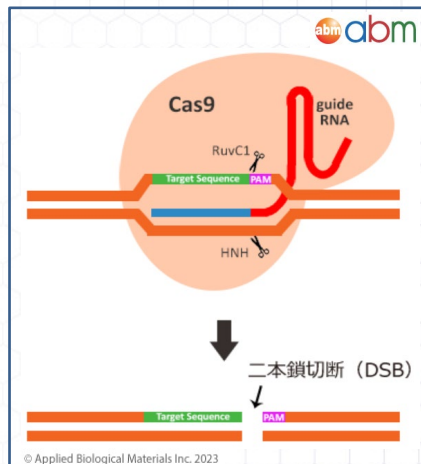
EXTREME PRECISION GENE EDITING

- ✓ 安全性
 - オフターゲット効果の排除
- ✓ 適用範囲の拡大
 - アレル特異的編集
 - SNPを標的とした編集戦略
 - PAM配列による拘束の緩和
- ✓ 安全な臨床応用

CRISPR-Cas9を用いたゲノム編集

コスモバイオ株式会社ホームページ「CRISPR-Cas9基本の「き」より」
https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/crispr-cas9-introduction-apb.asp?entry_id=15520

ガイドRNA
 +
 エンドヌクレアーゼ
 ||
 RNA誘導型ヌクレアーゼ
 (RNA guided nuclease)

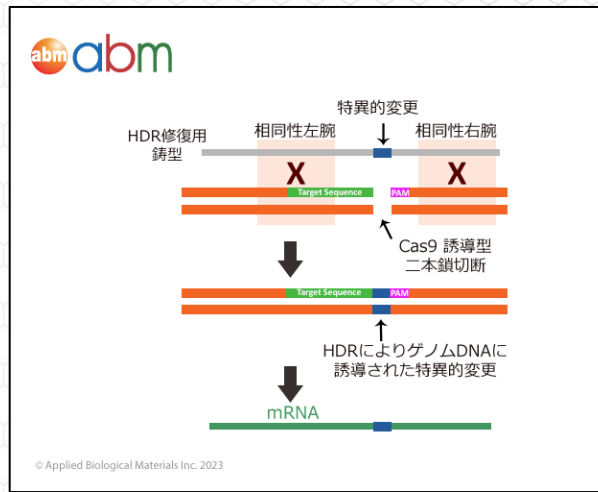
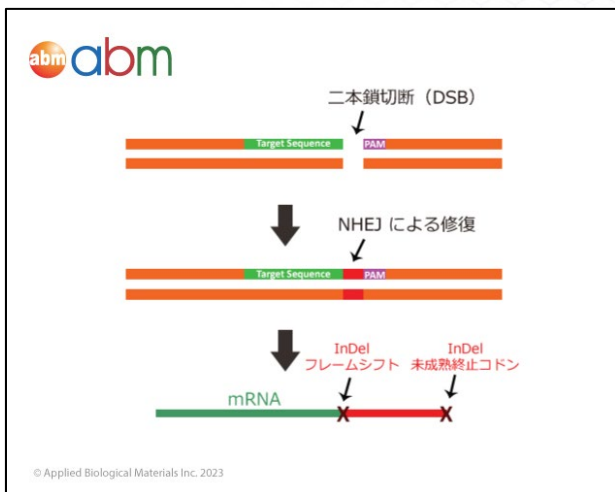


ガイドRNAの塩基配列と相補的な配列を持つDNA部位にヌクレアーゼを誘導し2本鎖を切断する

ヌクレアーゼはDNAを切断するのみ
 ↓
 その後の反応は細胞に内在する修復機構による

non-homologous end joining

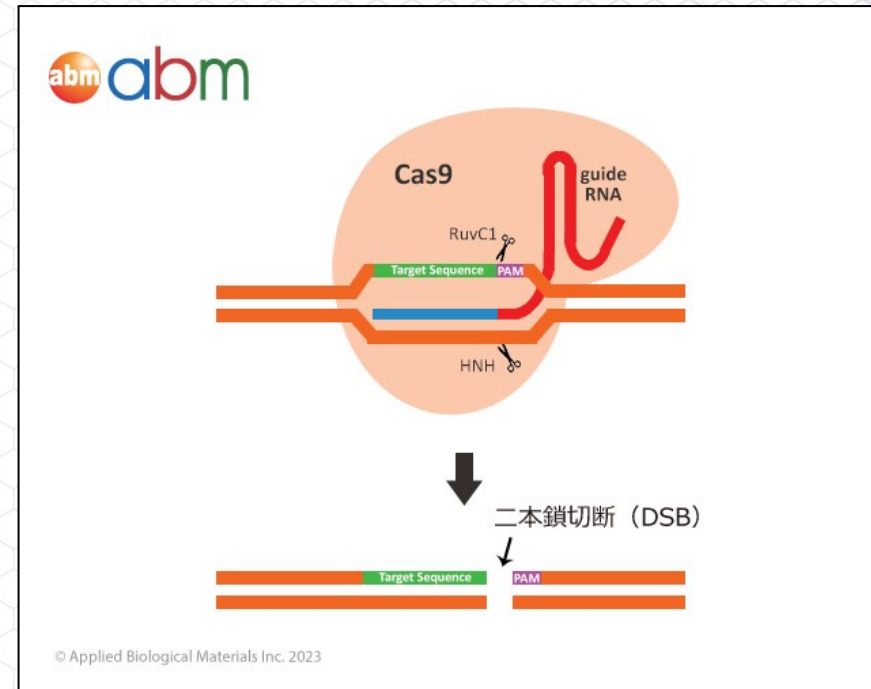
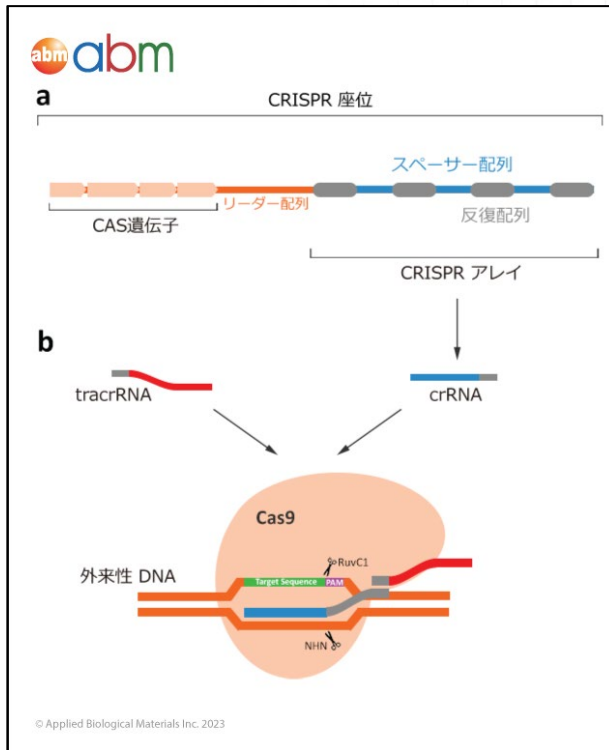
homology directed repair



細胞周期に依存

CRISPR-Cas9 の起源

コスモバイオ株式会社ホームページ「CRISPR-Cas9基本の「き」より」
https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/crispr-cas9-introduction-apb.asp?entry_id=15520



CRISPR-Cas9 は、外来性ウイルスやプラスミドへの獲得免疫を与える細菌や古細菌の適応免疫システム

- 侵入した外来性DNAは断片化され、反復配列により挟まれたスペーサー配列としてCRISPR座位に取り込まれる。
- 取り込まれたスペーサーは、短鎖CRISPR RNA (crRNA)を産生する鋳型となる。
- crRNAはトランス活性化型crRNA (tracrRNA)と共に複合体を形成し、ガイド鎖として機能し、Cas9ヌクレアーゼを相補的な侵入DNAへと誘導する。
- DNAに結合したCas9タンパク質は、”crRNA相補鎖“と反対鎖をそれぞれHNHおよびRuvC1様ヌクレアーゼドメインにより切断

CRISPR: **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats

CRISPRシステムによるゲノム編集

- **sgRNA: single guide RNA**
- **PAM (Proto-spacer Adjacent Motif)**
 - CRISPR-Cas9システムはsgRNAデザインに応じて、いかなるゲノム領域をも標的可能であるものの、標的配列直下に位置するプロトスペーサー隣接配列 (PAM) に依存する。
 - 細菌や古細菌の免疫システムにおいて自身と他との区別する手段 (例: CRISPR座位が標的されないよう防御)

sgRNAの設計によるオフターゲット効果の低減

(標的配列に類似した配列を認識)

ゲノム内にsgRNAの塩基配列(標的配列)と類似した配列が無い配列を探す。

© DBCLS CRISPRdirect / CC-BY 4.0

<https://crispr.dbcls.jp/>

<http://GGGenome.dbcls.jp/>

Ultrafast sequence search
GGGenome

Help

ゲノムをミスマッチおよび挿入・欠失を許容して検索

ACTTGCTGTGACAGAGTACAC Search Human genome, GRCh37/hg19 (Feb, 2009)

Max number of mismatches/gaps: 2 (no more than 20% of the query length)

2013-10-25 17:23:20, GGGenome : Human genome, GRCh37/hg19 (Feb, 2009)

Summary:

- ACTTGCTGTGACAGAGTACAC (8)
- GTGTAAGTGTGACAGCAAGT (6)

ヒット件数

生物種を選択する
350種以上に対応

Results:

Showing first 50 results for each strand of the query sequence.
Matches are highlighted with blue background. Mismatches and indels are marked in red.

```
chr2:204895405-204895423 204895405
GACTTCCCAACATTATTTATAAGCTCTCAACCTGCTGACAGAGTACACAATTATTCCTGGAAATAAAGCACTCCAAG

chr3:64817429-64817449 64817429
GTTGGTCAGGGAGGATACCTCTGCCACCCGCTCTGCTGTGCAGAGTACACATCA

chr3:147681558-147681576 147681558
GGTTGCTTTCACATTACAGTAGCAGGGTTCCTGCTGTGACAGAGACACATGGCC

chr3:159168436-159168454 159168436
ATACACATAAATCAGAGCAGGAGCGTGGCACTTGTCTGTGCAAGTACACCTCAAGCCAAAGTGCCTTCTCTTCA

chr6:156537589-165637607 165637589
GATAAAATGTAGGCAGTTCCTTTAGAAATGACTTGTGTGACAGAGAAACATTAGAGCTTTAGCTGGAAGGCGCACTTGA

chr7:75742257-75742275 75742257
AAAAAAGACCCCTACGCTCATAAGGGTGAACCTTGTCTGTGACAGAGTTCATCTTGGCAGTGTCTGCAACCATCTCTGA

chr11:94299956-94299975 94299956
GTGAGTGAATAACCTGAGGGATTGAAGATCTTGTCTGTGAACAGTACACTTACGAAGTTAATGAAAAGAAAATATTATA

chr11:118247368-118247388 118247368
TCCACAGAACTCAACCTTGTAAACAGAGAACTTGTCTGTGACAGAGTACACTTGTACTTGGGATTTACAGGTAACCTCT

chr1:201564762-201564782 201564762
GGGCCAGGGTAGGGCAGGCAGCAGCAAGTGTGCACTGTCCACAGCAAGTGGCTGGTCTGGGAATTCAGTTGGTGGTT

chr2:216298157-216298176 216298157
TAAGTGTCAACCCACTCGGTAAAGTGTCCCAAGTGTACTGTGCAAGCAAGTCTTCTCACTGAGGGGAAAAAGGAAAGTCCA

chr7:21684333-21684353 21684333
AGGAGGAAGGAATGAAAGCTGCTCATGAAAGTGTACTGTCTGACAGAAAGTACAGTGAAGGCAACTCTGCTGGCATGA
```

ミスマッチおよび挿入・欠失を赤く表示



Results:

Sequence name: sample sequence
PAM sequence: NGG
Specificity check: Human genome, GRCh37/hg19 (Feb, 2009)
Time: 201X-XX-XX XX:XX:XX

- Highlighted target positions (e.g., 45 - 67) indicate sequences that are highly specific and have fewer off-target hits.
- Target sequences with '0' in '20mer+PAM' (in number of target sites column) are shown in gray. Such sequences may possibly span over exon-exon junctions, so avoid using these.
- Target sequences with TTTTs are also shown in gray. Avoid TTTTs in gRNA vectors with pol III promoter.

show highly specific target only

Show 20 entries

Search:

position	target sequence	sequence information				number of target sites		
		GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
1 - 23	ggctccaagaacctgcaggagg	65.00 %	80.27 °C	-	PstI	1	19	4120
6 - 28	ccagaagaactgcaggaggcaaga	55.00 %	76.78 °C	-	PstI	1	24	3084
12 - 34	acctgcaggaggcagaagaatgg	55.00 %	76.78 °C	-	PstI	1	3159	7292
13 - 35	ccctgcaggaggcagaagaatgg	55.00 %	75.77 °C	-	PstI	1	55	4120
42 - 64	ccaagtgtgctgacctctctgag	50.00 %	71.86 °C	-	-	0	9	1578
43 - 65	caagttgtgctgacctctctgagg	50.00 %	70.46 °C	-	-	0	33	4279
54 - 76	acctctctgaggctgccaaccga	60.00 %	78.13 °C	-	-	1	1	214
55 - 77	ccctctctgaggctgccaaccga	65.00 %	80.02 °C	-	-	1	28	4279
69 - 91	ccaacggaacaatgacgccctg	60.00 %	77.46 °C	-	BsaHI	1	1	129
73 - 95	ccggaacaatgacgccctgccc	65.00 %	79.11 °C	-	BsaHI	1	1	169
76 - 98	gaacaatgacgccctgcccagg	75.00 %	79.11 °C	-	BsaHI	1	3	665
85 - 107	cgccctgcaggcaaacgaggag	65.00 %	85.51 °C	-	-	-	-	-
87 - 109	cccctgcaggcaaacgaggag	65.00 %	85.51 °C	-	-	-	-	-
88 - 110	ccctgcaggcaaacgaggag	65.00 %	85.51 °C	-	-	-	-	-
94 - 116	ccaggcaaacgaggagccaactg	60.00 %	76.89 °C	-	-	1	2	150
102 - 124	agcaggagccaactgagtaaccg	55.00 %	75.25 °C	-	-	1	4	409
109 - 131	gtccaactgagtaaccgagagacc	60.00 %	75.72 °C	-	-	1	2	1173
111 - 133	ccactgagtaaccgagagaccg	60.00 %	75.67 °C	-	-	1	2	409
121 - 143	cgagagcaggtagcagccctca	60.00 %	76.98 °C	-	-	1	52	3242
133 - 155	gcagtcctcaactgtagagtagg	60.00 %	76.19 °C	-	-	1	52	3242

制限酵素サイト

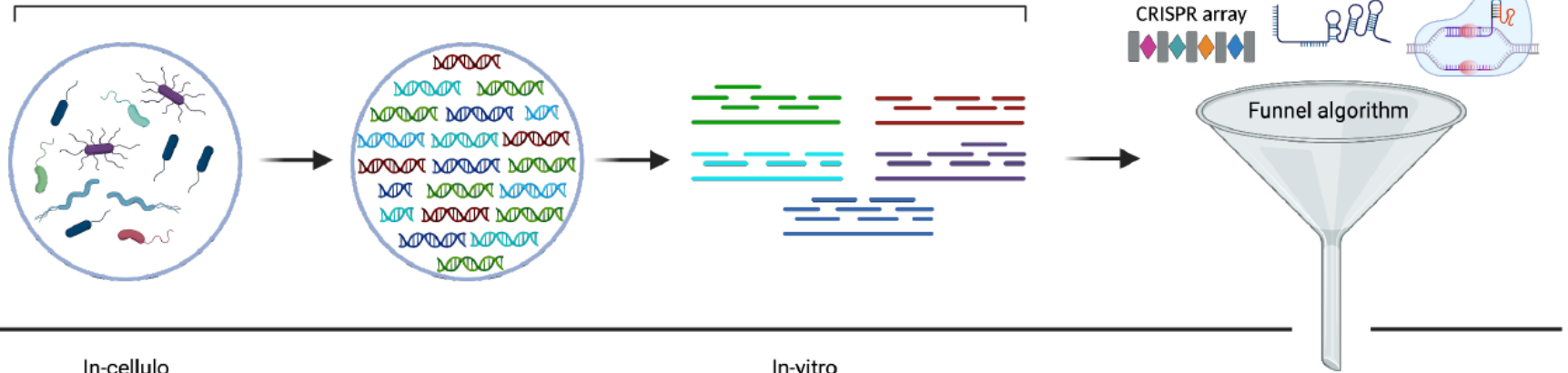
オフターゲット検索
by GGGenome

Showing 1 to 20 of 73 entries

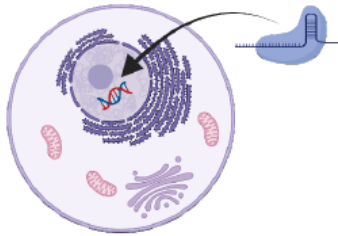
OMNIプラットフォーム

新規RNA誘導型ヌクレアーゼの探索

Mining and assembly of metagenomic data

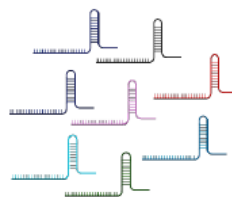


In-cellulo
Activity validation in mammalian cells

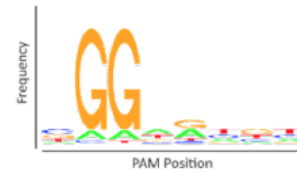


In-vitro

gRNA validation



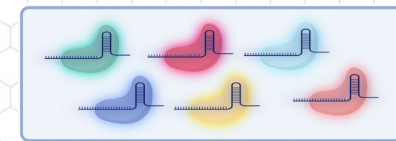
PAM sequence requirement



Nuclease candidates

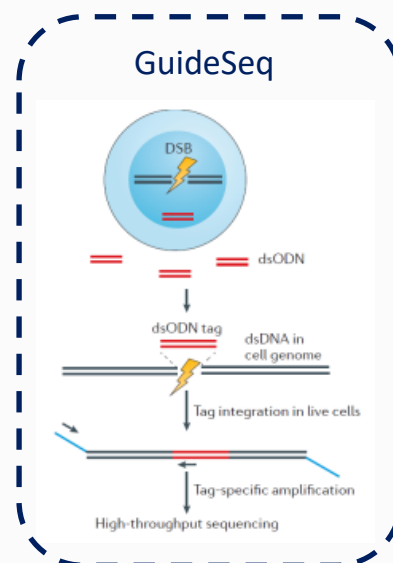
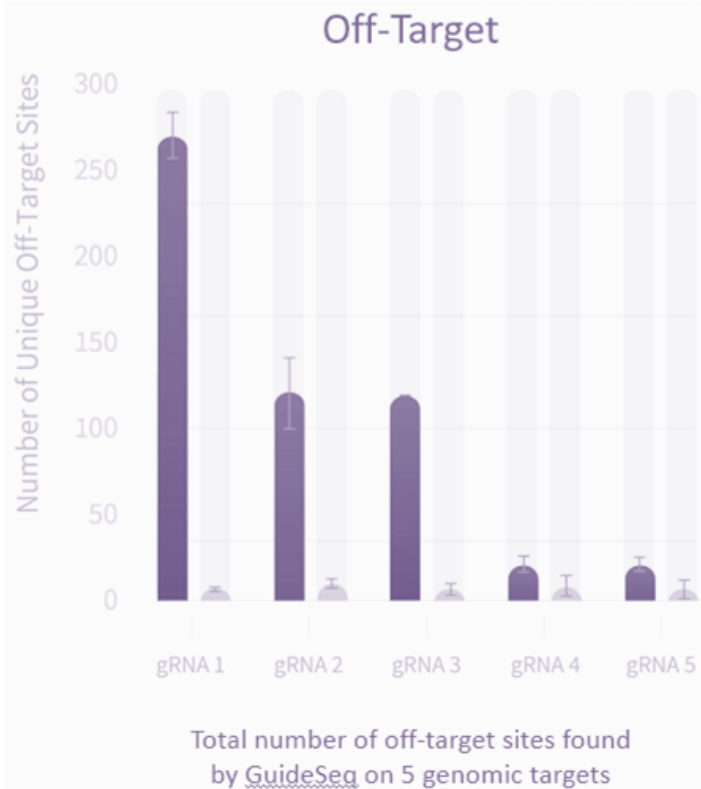


Emendo's Panel of OMNI Nuclease
with Diverse Characteristics



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

OMNI-A1 (野生型) は spCas9より精度の高いゲノム編集が可能



On-Target

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

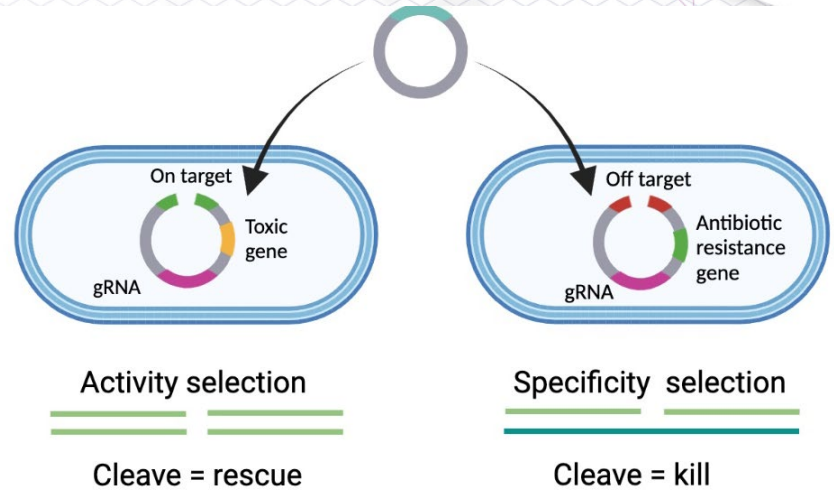
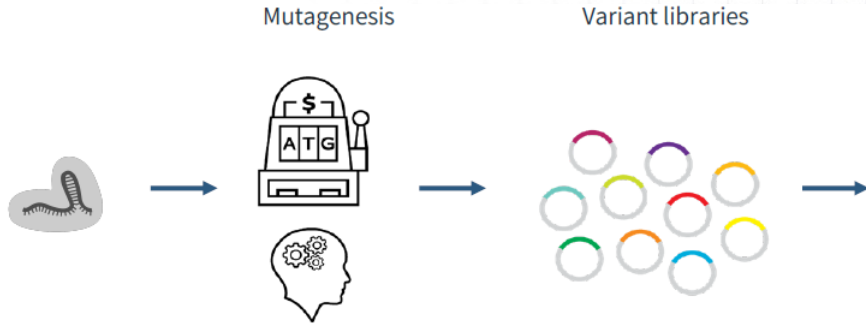
On-target editing levels measured by NGS

- 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、若干ではあるが、オフターゲット効果が残存する
- 更に特性を上げるため、それぞれの標的配列に合わせた最適化を実施

OMNIプラットフォーム

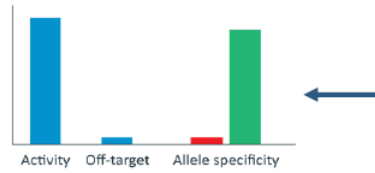
指向性進化による最適化

Positive and Negative selections in bacteria



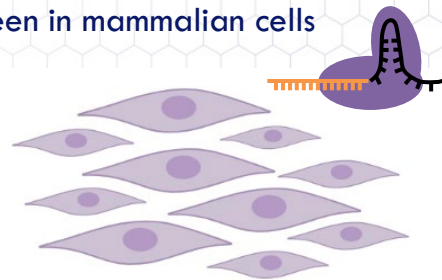
- 意図的な変異とランダムな変異を組み合わせ、変異ヌクレアーゼのライブラリーを作成
- 指向性進化による選別
⇒ 最適化済ヌクレアーゼ変異体
- 解析結果をデータベース化し機械学習に利用

Optimized OMNI CRISPR Composition for Each Specific Target of Interest

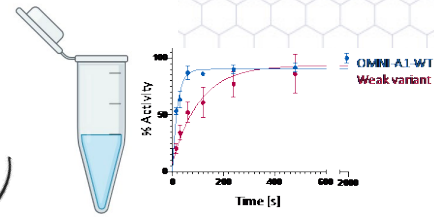


Optimized variant

Screen in mammalian cells



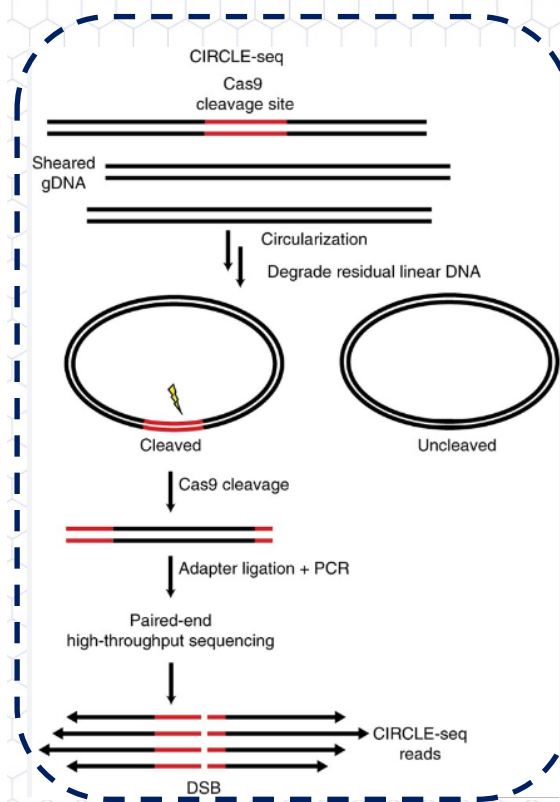
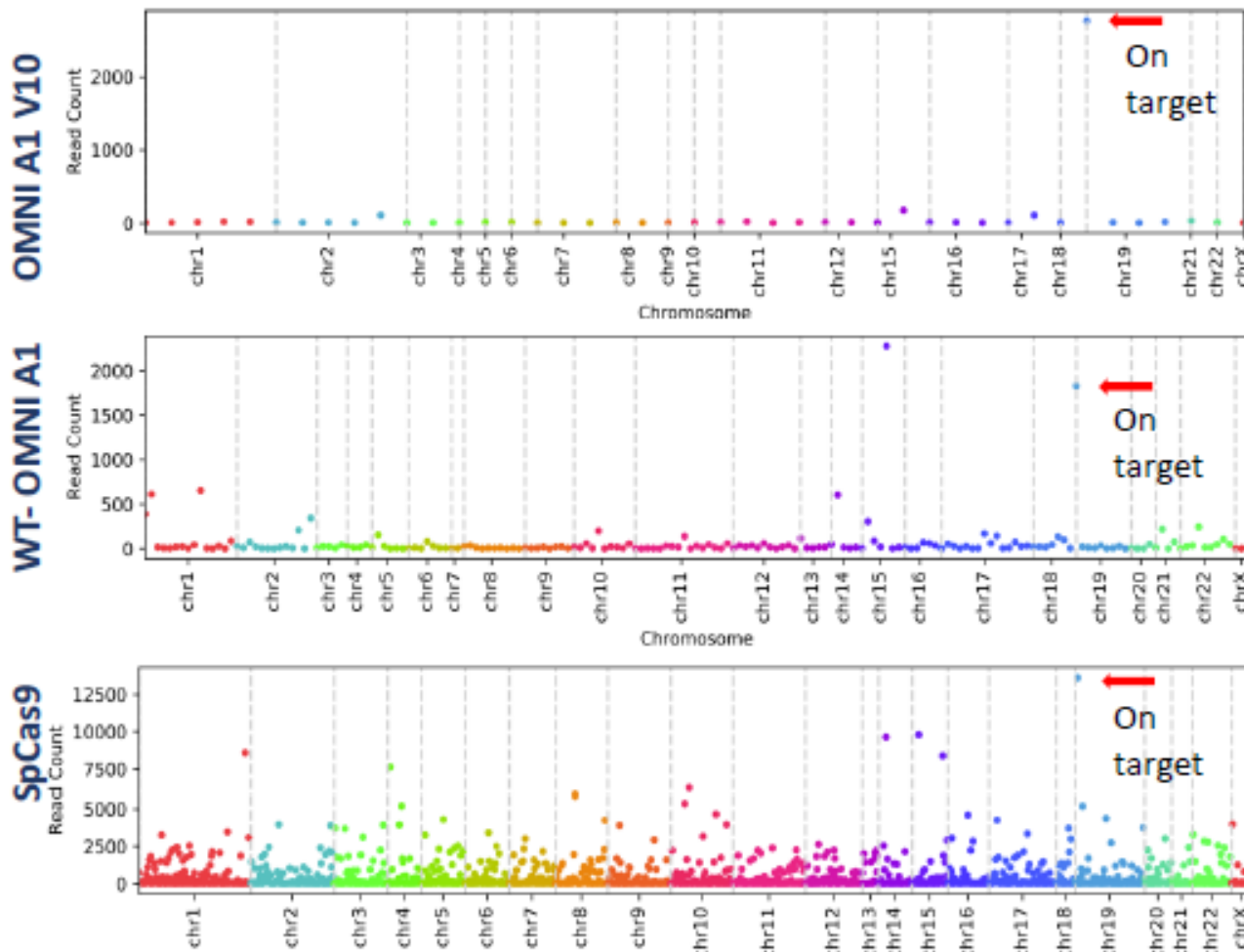
HTP in-vitro screen



~30% of the non-functional in cells

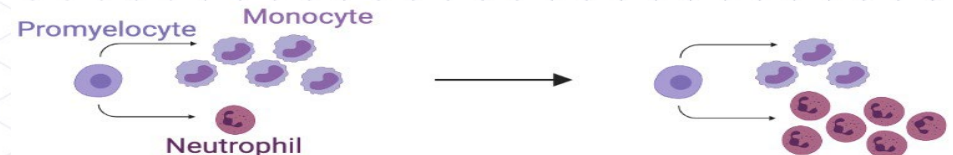
OMNI A1 V10 (最適化後) と OMNI A1 (野生型) の比較

OMNIA1及びOMNIA1 V10で検出されたオフターゲット部位 (CIRCLEseq data)



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)

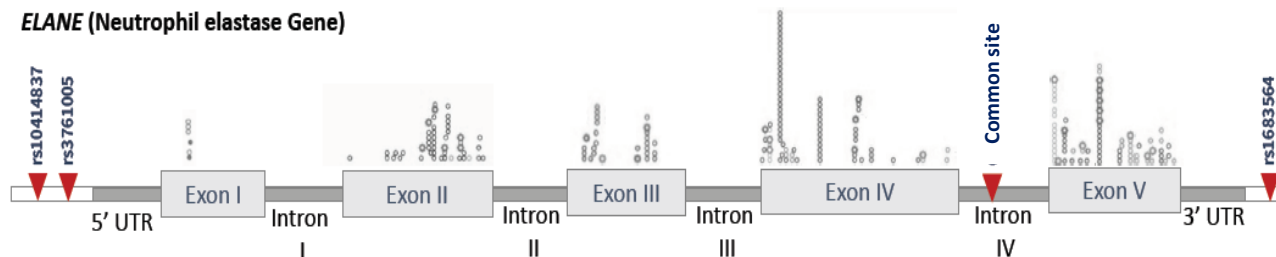
本治療の有用性

- 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を標的とする対立遺伝子特異的ゲノム編集

- 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。

ELANE (Neutrophil elastase Gene)

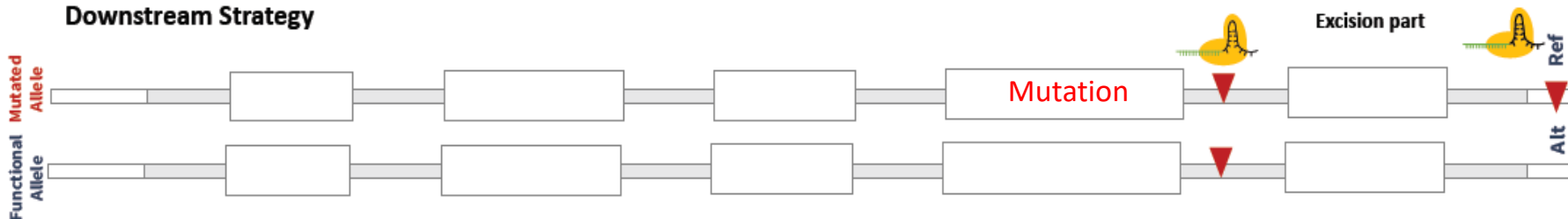


7種のガイドRNAを設計

sgRNA-SNP1-ref
sgRNA-SNP1-alt
sgRNA-SNP2-ref
sgRNA-SNP2-alt
sgRNA-SNP3-ref
sgRNA-SNP3-alt

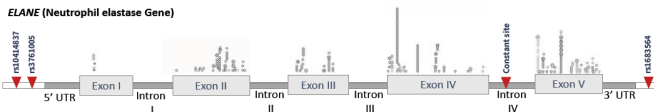
+ sgRNA Common

Downstream Strategy



- 標的遺伝子領域でヘテロ頻度が高いSNP（一塩基多型）を数か所確認
- その基準配列及び代替配列に対するsgRNAを設計する
- 患者の遺伝子を解析し、アレル間でヘテロであるSNPを同定する。
- 削除すべきアレル（病因変異を有するアレル）のSNPが基準配列(ref)か代替配列(alt)かLong Read DNA Sequenceで確認する。
- 1カ所のヘテロなSNPとCommon siteの2か所で切断し、修復後に遺伝子が発現しないようにする。

SNPsを標的とする 対立遺伝子特異的ゲノム編集



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

Expected Coverage= 76%

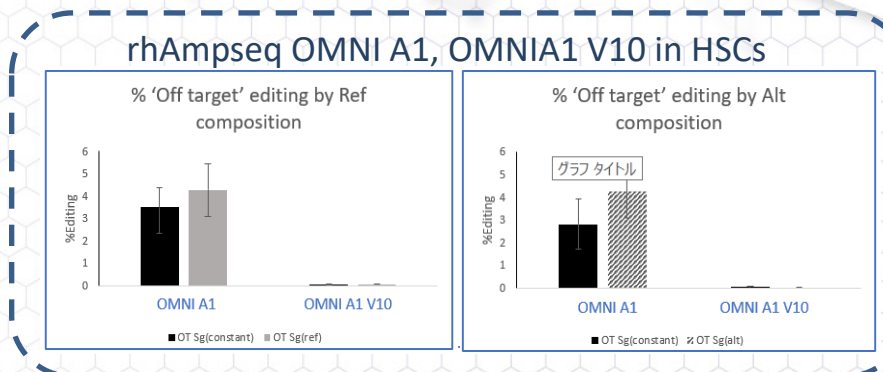
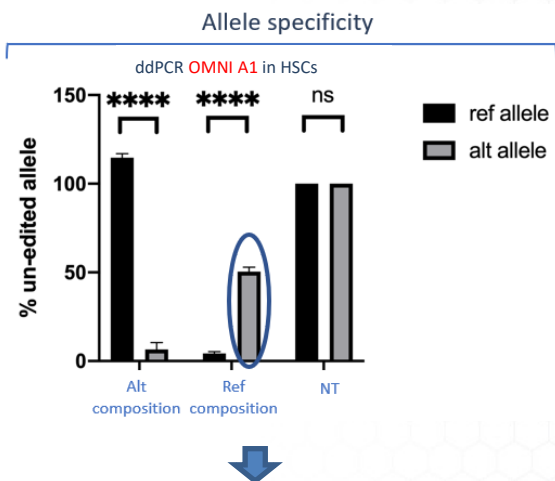
Observed Coverage=

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

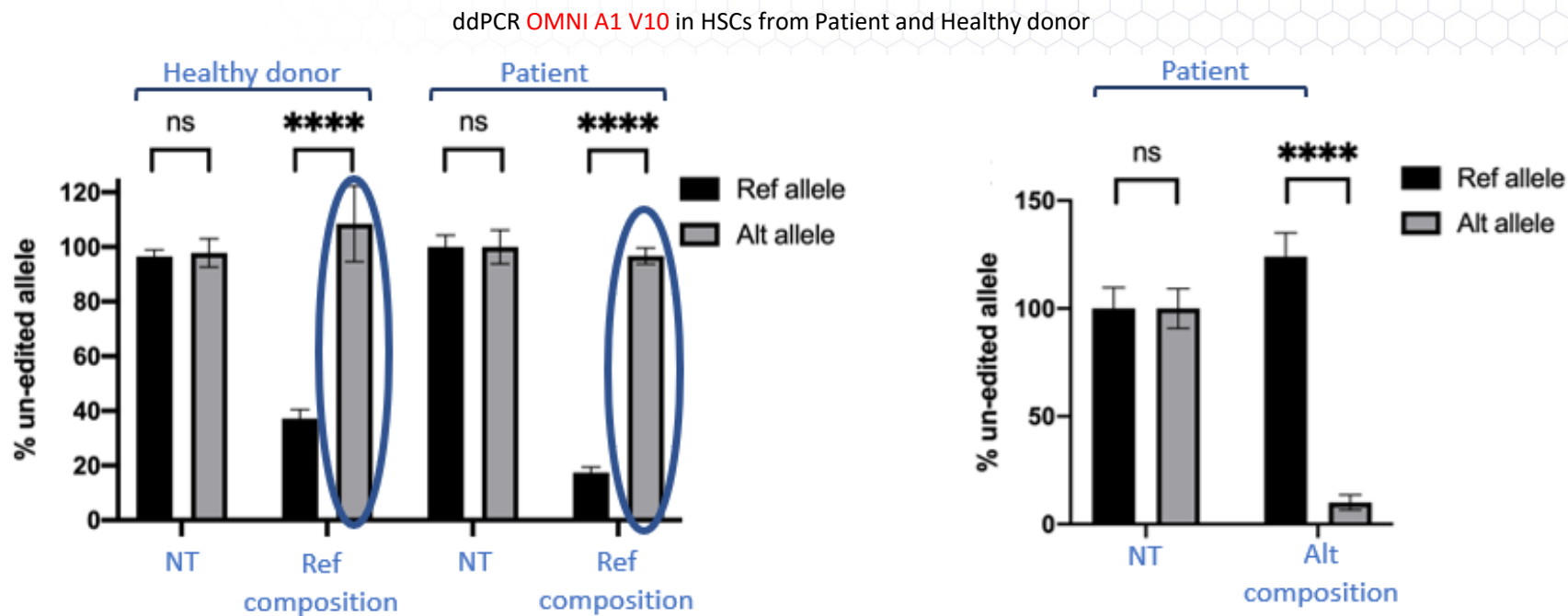
3カ所のSNPsについて準備することにより、80%以上の患者をこの治療の対象とすることができる。

tube #	Diagnosis	ELANE mutation	Exon	SNPs		
				rs837	rs1005	rs564
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

OMNI A1 V10による対立遺伝子特異的ゲノム編集

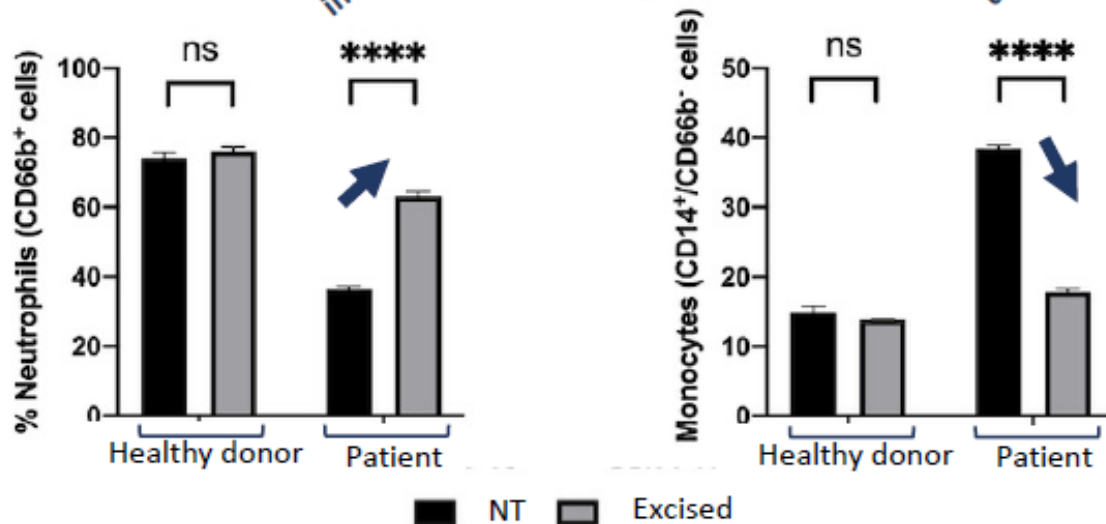
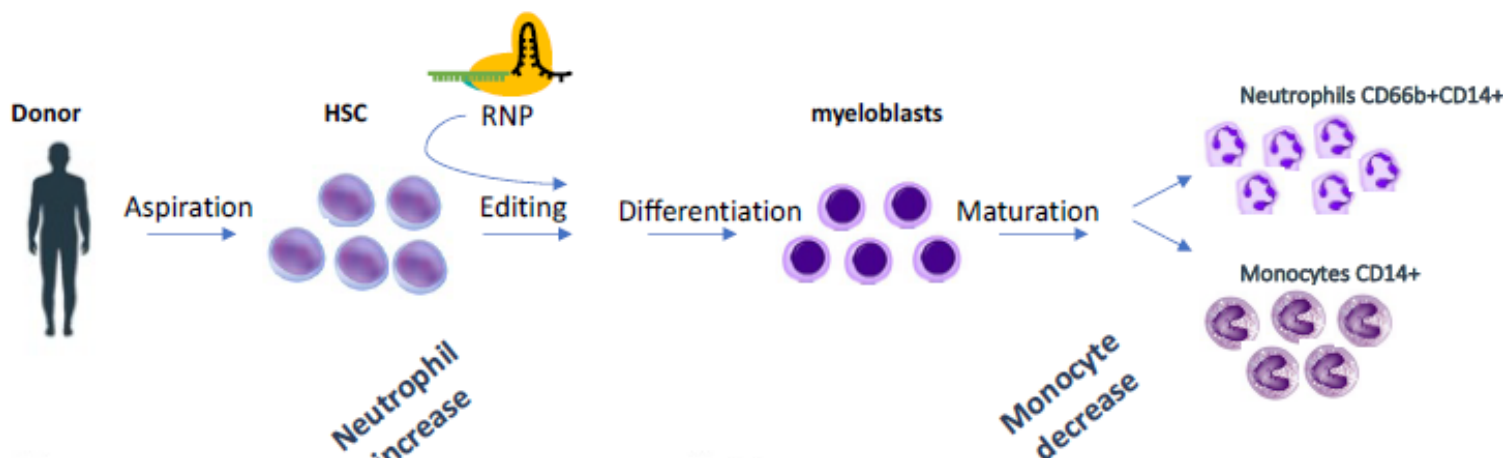


Allele specificity



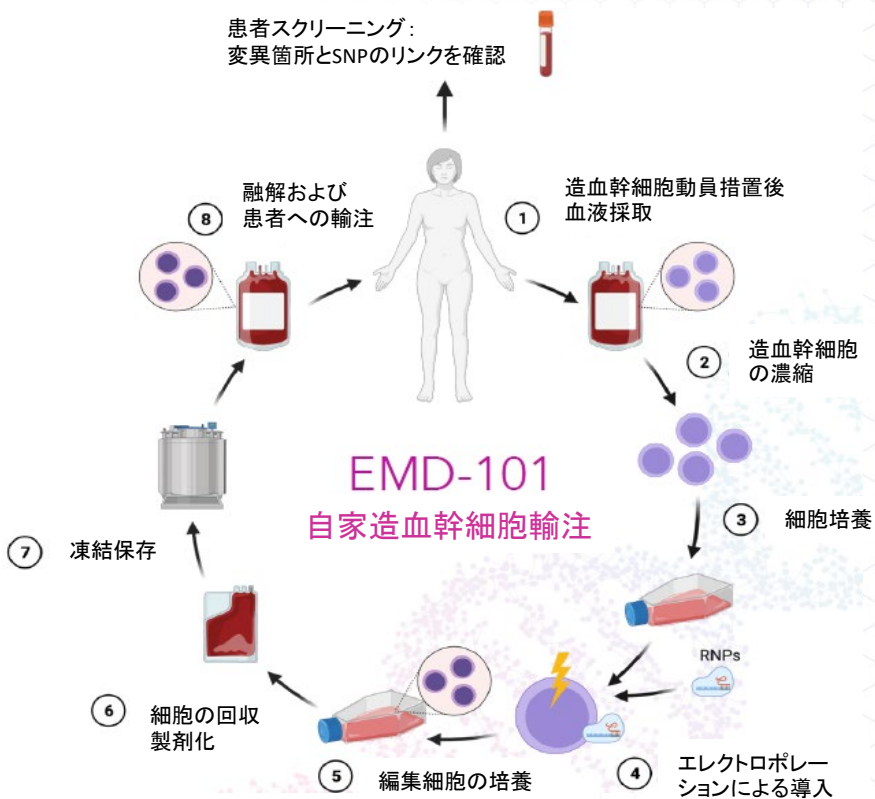
In vitroでの好中球分化能の回復

変異アレルのみをEx vivoで編集した健常人および患者由来造血幹細胞のin vitroでの分化



• 未処理の患者細胞は、好中球への分化能が著しく低下し、単球数が代替的に上昇
 • 編集後、好中球数が増加し、単球数は正常化

ELANE関連重症先天性好中球減少症 ～ 治験開始までのスケジュール ～



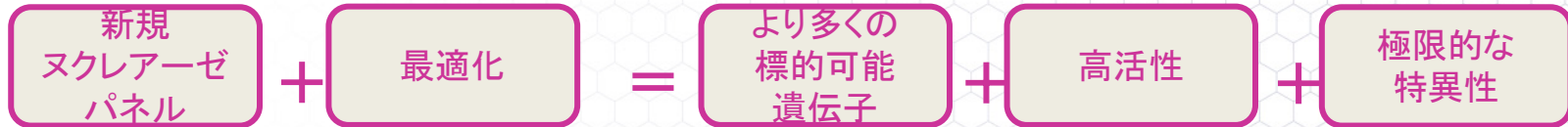
- 患者の造血幹細胞（HSPC）を用いたPOCを確立
 - 好中球への分化・成熟の回復をin vitroで確認
- 治験用細胞加工工程のスケールアップ
- sgRNAおよびOMNIヌクレアーゼのGMP製造
- シアトル小児病院（SCRI）にて患者造血幹細胞動員試験を実施中
- SCRIにて治験計画策定中

Ex-Vivo

PROGRAM	COLLABORATOR	LEAD OPTIMIZATION	PRE-CLINICAL	IND-ENABLING	PHASE 1-3
HEMATOLOGY					
EMD-101 ELANE関連重症先天性好中球減少症	ワシントン大学				
IMMUNO-ONCOLOGY					
CAR-T 細胞	非開示				
NK 細胞	自社開発				

In-Vivo

PROGRAM	COLLABORATOR	LEAD OPTIMIZATION	PRE-CLINICAL	IND-ENABLING	PHASE 1-3
LIVER					
EMD-301 家族性高コレステロール血症	自社開発				
EMD-302 先天性代謝異常症	自社開発				
OPHTHALMOLOGY					
EMD-201 網膜色素変性症	コロンビア大学				
EMD-202 桿体錐体ジストロフィー	自社開発				
EMD-203 黄斑変性症	自社開発				



- 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・最適化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
- PAM配列が異なる様々なヌクレアーゼによる、標的配列の選択の自由度
- 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を推進する

ご清聴ありがとうございました。