

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和5年9月11日(2023.9.11)

【国際公開番号】WO2021/044379

【公表番号】特表2022-547505(P2022-547505A)

【公表日】令和4年11月14日(2022.11.14)

【年通号数】公開公報(特許)2022-209

【出願番号】特願2022-514833(P2022-514833)

【国際特許分類】

10

C 1 2 N 5/10(2006.01)

A 6 1 P 3/10(2006.01)

A 6 1 K 35/12(2015.01)

A 6 1 K 35/545(2015.01)

A 6 1 K 35/28(2015.01)

A 6 1 K 35/34(2015.01)

A 6 1 K 35/39(2015.01)

A 6 1 K 35/30(2015.01)

A 6 1 K 35/36(2015.01)

A 6 1 K 35/407(2015.01)

20

A 6 1 K 35/35(2015.01)

A 6 1 K 35/22(2015.01)

A 6 1 K 35/14(2015.01)

A 6 1 K 35/15(2015.01)

C 1 2 N 9/16(2006.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

C 1 2 N 15/62(2006.01)

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 N 5/0735(2010.01)

C 1 2 N 5/074(2010.01)

30

C 1 2 N 5/0789(2010.01)

C 1 2 N 5/0775(2010.01)

C 1 2 N 5/0797(2010.01)

C 1 2 Q 1/02(2006.01)

C 1 2 Q 1/68(2018.01)

C 1 2 N 15/63(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/10 Z N A

A 6 1 P 3/10

A 6 1 K 35/12

40

A 6 1 K 35/545

A 6 1 K 35/28

A 6 1 K 35/34

A 6 1 K 35/39

A 6 1 K 35/30

A 6 1 K 35/36

A 6 1 K 35/407

A 6 1 K 35/35

A 6 1 K 35/22

A 6 1 K 35/14 Z

50

A 6 1 K 35/15 Z
 C 1 2 N 9/16 Z
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 15/62 Z
 C 1 2 N 15/09 1 1 0
 C 1 2 N 5/0735
 C 1 2 N 5/074
 C 1 2 N 5/0789
 C 1 2 N 5/0775
 C 1 2 N 5/0797
 C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 Q 1/68
 C 1 2 N 15/63 Z

10

【手続補正書】

【提出日】令和5年9月1日(2023.9.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0548

【補正方法】変更

20

【補正の内容】

【0548】

特定のB2M KO/PD-L1 KI+TXNIP KO/HLA-E KIクローン(「シードクローン」)が製造され、前記プロセスによって単離された。シードクローンは、PEC段階に分化され、特徴付けられた。図27Aは、PEC段階のシードクローンの形態が野生型細胞と同様であったことを示す。図27Bは、シードクローンから分化した細胞における分化時間経過にわたるFOX A2、CHGA、PDX1及びNKX6.1の動的発現パターンが、野生型細胞と同様であったことを示す。図27Cは、分化した集団におけるCHGA⁻/NKX6.1⁺/PDX1⁺細胞のパーセンテージを示す。

30

[1] ユニバーサルドナー細胞を作製するための方法であって、

(a) 生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第1の部位特異的ヌクレアーゼ；及び

(b) (i) (a)の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び (ii) (a)の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸

を細胞に送達することを含み、前記第1の部位特異的ヌクレアーゼは、(a)の前記標的部位を切断し、及び(b)の前記第1の核酸は、(a)の前記部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位で挿入され、それによりユニバーサルドナー細胞を作製し、前記ユニバーサルドナー細胞は、(b)の前記核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した細胞生存を有する、方法。

40

[2] 前記生存因子は、TXNIP、ZNF143、FOXO1、JNK又はMANFである、項目1に記載の方法。

[3] 前記第1の免疫寛容原性因子は、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4又はCD47である、項目1又は2に記載の方法。

[4] 前記生存因子は、TXNIPである、項目1～3のいずれか一項に記載の方法。

[5] 前記第1の免疫寛容原性因子は、HLA-Eである、項目4に記載の方法。

[6] 前記第1の部位特異的ヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ及びガイドRNA(gRNA)を含むCRISPR系である、項目1～5のいずれか一項に記載の方法

—

[7] 前記CRISPRヌクレアーゼは、II型Cas9ヌクレアーゼ又はV型Cfp

50

1ヌクレアーゼであり、及び前記CRISPRヌクレアーゼは、少なくとも1つの核移行シグナルに連結される、項目6に記載の方法。

[8] 前記gRNAは、配列番号15～24からなる標的配列に対応するスペーサー配列を含む、項目6又は7に記載の方法。

[9] (b)(i)の前記ヌクレオチド配列は、配列番号25から本質的になり、及び(b)(ii)の前記ヌクレオチド配列は、配列番号32から本質的になる、項目6～8のいずれか一項に記載の方法。

[10] (c)MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子の1つ以上をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第2の部位特異的ヌクレアーゼ；及び

(d)(iii)(c)の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び(iv)(c)の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸

を前記細胞に送達することをさらに含み、(d)の前記第2の免疫寛容原性因子は、(b)の前記第1の免疫寛容原性因子と異なり、

前記第2の部位特異的ヌクレアーゼは、(c)の前記標的部位を切断し、及び(d)の前記第2の核酸は、(c)の前記部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位で挿入され、前記ユニバーサルドナー細胞は、(d)の前記第2の核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した免疫回避及び/又は細胞生存を有する、項目1～9のいずれか一項に記載の方法。

[11] 前記MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又は前記MHC-I若しくはMHC-II複合体の前記構成要素若しくは前記転写調節因子は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、B2M、NLRC5、CIITA、RFX5、RFXAP又はRFXANKである、項目10に記載の方法。

[12] 前記第2の免疫寛容原性因子は、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4又はCD47である、項目10又は11に記載の方法。

[13] 前記MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又は前記MHC-I若しくはMHC-II複合体の前記構成要素若しくは前記転写調節因子は、B2Mである、項目10～12のいずれか一項に記載の方法。

[14] 前記第2の免疫寛容原性因子は、PD-L1である、項目13に記載の方法。

[15] 前記第2の部位特異的ヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ及びgRNAを含むCRISPR系である、項目10～14のいずれか一項に記載の方法。

[16] 前記CRISPRヌクレアーゼは、II型Cas9ヌクレアーゼ又はV型Cfp1ヌクレアーゼであり、及び前記CRISPRヌクレアーゼは、少なくとも1つの核移行シグナルに連結される、項目15に記載の方法。

[17] 前記gRNAは、配列番号1～3又は35～44からなる標的配列に対応するスペーサー配列を含む、項目15又は16に記載の方法。

[18] (d)(iii)の前記ヌクレオチド配列は、配列番号7から本質的になり、及び(d)(iv)の前記ヌクレオチド配列は、配列番号13から本質的になる、項目15～17のいずれか一項に記載の方法。

[19] 前記CRISPRヌクレアーゼ及び前記gRNAは、1：3のモル比で存在する、項目6～9又は15～18のいずれか一項に記載の方法。

[20] 前記第1の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列は、外来プロモーターに作動可能に連結され、及び前記第2の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列は、外来プロモーターに作動可能に連結される、項目1～19のいずれか一項に記載の方法。

[21] 前記外来プロモーターは、構成的、誘導性、時間特異的、組織特異的又は細胞型特異的プロモーターであり、任意選択により、前記外来プロモーターは、CMV、EF1a、PGK、CAG又はUBCプロモーターである、項目20に記載の方法。

10

20

30

40

50

- [2 2] ユニバーサルドナー細胞を作製するための方法であって、
 (a) 生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第 1 の部位特異的ヌクレアーゼ；
 (b) (i) (a) の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び (i i) (a) の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸であって、前記第 1 の部位特異的ヌクレアーゼは、(a) の前記標的部位を切断し、及び相同組換えのプロセスを通して、(b) の前記第 1 の核酸は、前記第 1 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列を、(a) の前記部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位に挿入し、それにより (a) の前記遺伝子を破壊するための鑄型として利用される、第 1 の核酸；
 (c) M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の 1 つ以上をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第 2 の部位特異的ヌクレアーゼ；及び
 (d) (i i i) (c) の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び (i v) (c) の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の核酸であって、(d) の前記免疫寛容原性因子は、前記免疫寛容原性因子 (b) と異なり、前記第 2 の部位特異的ヌクレアーゼは、(c) の前記標的部位を切断し、及び相同組換えのプロセスを通して、(d) の前記第 2 の核酸は、前記第 2 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列を、(c) の前記部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位に挿入し、それにより (c) の前記遺伝子を破壊するための鑄型として利用される、第 2 の核酸
 を細胞に送達し、それによりユニバーサルドナー細胞を作製することを含み、前記ユニバーサルドナー細胞は、(b) の前記第 1 の核酸及び (d) の前記第 2 の核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した細胞生存を有する、方法。 10
- [2 3] 前記生存因子は、T X N I P であり、前記第 1 の免疫寛容原性因子は、H L A - E であり、前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子は、B 2 M であり、及び前記第 2 の免疫寛容原性因子は、P D - L 1 である、項目 2 2 に記載の方法。 20
- [2 4] 前記細胞は、哺乳動物細胞であり、任意選択により、前記細胞は、ヒト細胞である、項目 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。 30
- [2 5] 前記細胞は、幹細胞である、項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。
- [2 6] 前記細胞は、多能性幹細胞、胚性幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞又は造血幹細胞である、項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。
- [2 7] 前記細胞は、分化細胞又は体細胞である、項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。
- [2 8] 前記ユニバーサルドナー細胞は、系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化することができる、項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。
- [2 9] 前記系列限定前駆細胞は、膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞である、項目 2 8 に記載の方法。 40
- [3 0] 前記完全に分化した体細胞は、膵ベータ細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞、心筋細胞又は免疫系細胞である、項目 2 8 に記載の方法。
- [3 1] 項目 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法によって作製される複数のユニバーサルドナー細胞。
- [3 2] 前記細胞が分化を経るのに十分な時間にわたって目つ条件下で維持される、項目 3 1 に記載の複数のユニバーサルドナー細胞。
- [3 3] 治療を、それを必要とする対象において行う際の使用のための、項目 3 1 又は 50

3 2 に記載の複数の細胞。

[3 4] 前記対象は、疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがあるヒトである、項目 3 3 に記載の使用のための複数の細胞。

[3 5] 項目 3 1 又は 3 2 に記載の複数のユニバーサルドナー細胞を対象に投与することを含む方法。

[3 6] 治療を、それを必要とする対象において行うための方法であって、

(a) 項目 3 1 に記載の複数のユニバーサルドナー細胞を、系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞への分化後に得るか又は得ていることと；

(b) 前記系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞を前記対象に投与することを含む方法。

10

[3 7] 細胞であって、それを必要とする対象への投与のための細胞を得る方法であって、

(a) 項目 3 1 に記載のユニバーサルドナー細胞を得るか又は得ていることと；

(b) 前記細胞が系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化するのに十分な時間にわたって且つ条件下で前記ユニバーサルドナー細胞を維持することと

を含む方法。

[3 8] 前記系列限定前駆細胞は、膵臓内胚葉前駆細胞、膵臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞である、項目 3 6 又は 3 7 に記載の方法。

[3 9] 前記完全に分化した体細胞は、膵ベータ細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞、心筋細胞又は免疫系細胞である、項目 3 6 又は 3 7 に記載の方法。

20

[4 0] 前記対象は、疾患を有するか、それを有することが疑われるか又はそのリスクがあるヒトである、項目 3 5 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

[4 1] 前記疾患は、遺伝的に受け継がれる疾患である、項目 4 0 に記載の方法。

[4 2] 配列番号 1 5 ~ 2 4 からなる標的配列に対応するスペーサー配列を含むガイド RNA。

[4 3] ユニバーサルドナー細胞を作製するためのプロセスであって、

(a) M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子をコードする遺伝子内又はその近傍において、第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を挿入することによって幹細胞を改変し、それにより第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を作製することと；

30

(b) 第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を濃縮することと；

(c) 生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍において、第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を挿入することによって前記第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を改変し、それにより第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を作製することと；

(d) 第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を濃縮することと；

(e) 第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を選択するために単一細胞ソーティングを行うことと；

40

(f) (e) からの前記細胞をユニバーサルドナー細胞として特徴付けることと；

(g) 長期間の保管のために前記ユニバーサルドナー細胞を凍結させることとを含むプロセス。

[4 4] (b) での第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞の前記濃縮は、磁気支援細胞ソーティング (M A C S)、単一細胞クローニング、前記第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせを含む、項目 4 3 に記載のプロセス。

[4 5] (d) での第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞の前記濃縮は、磁気支援細胞ソーティング、単一細胞クローニング、前記第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせ

50

を含む、項目 4 3 又は 4 4 に記載のプロセス。

[4 6] (a) において、前記作製された第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増殖させること、(c) において、前記作製された第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増殖させること、(e) において、前記選択された第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせをさらに含む、項目 4 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載のプロセス。

[4 7] (a) での前記改変は、(1) M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子座位中の標的部位を標的化する第 1 の R N A 誘導型ヌクレアーゼ及び第 1 のガイド R N A (g R N A)、並びに (2) 第 1 の核酸であって、(i) 前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子座位中の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、(i i) 前記第 1 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列、及び (i i i) 前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子座位中の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸を含む第 1 のベクターを前記幹細胞に送達することを含み、前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子座位は、前記標的部位で切断され、及び前記第 1 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列を含む前記第 1 の核酸は、前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子座位に挿入され、それにより前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子を破壊する、項目 4 3 ~ 4 6 のいずれか一項に記載のプロセス。

[4 8] 前記第 1 の R N A 誘導型ヌクレアーゼ及び前記第 1 の g R N A は、第 1 のリボ核タンパク質 (R N P) 複合体を形成する、項目 4 7 に記載のプロセス。

[4 9] (a) での前記改変は、(1) M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子座位中の標的部位を標的化する第 1 の R N A 誘導型ヌクレアーゼ及び第 1 のガイド R N A (g R N A) を含む第 1 のリボ核タンパク質 (R N P) 複合体、並びに (2) 第 1 の核酸であって、(i) 前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子座位中の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、(i i) 前記第 1 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列、及び (i i i) 前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子座位中の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸を含む第 1 のベクターを前記幹細胞に送達することを含み、前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子座位は、前記標的部位で切断され、及び第 1 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列を含む前記第 1 の核酸は、前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子座位に挿入され、それにより前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子を破壊する、項目 4 3 ~ 4 6 のいずれか一項に記載のプロセス。

[5 0] 前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子は、H L A - A、H L A - B、H L A - C、H L A - D P、H L A - D M、H L A - D O A、H L A - D O B、H L A - D Q、H L A - D R、B 2 M、N L R C 5、C I I T A、R F X 5、R F X A P 又は R F X A N K である、項目 4 3 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のプロセス。

10

20

30

40

50

[5 1] 前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の遺伝子は、 B 2 M である、項目 5 0 に記載のプロセス。

[5 2] (a) (2) (i) の前記ヌクレオチド配列は、配列番号 7 から本質的になり、及び (a) (2) (i i i) の前記ヌクレオチド配列は、配列番号 1 3 から本質的になる、項目 5 1 に記載のプロセス。

[5 3] 前記第 1 の g R N A は、配列番号 2 からなる標的配列に対応するスパーサー配列を含む、項目 5 1 又は 5 2 に記載のプロセス。

[5 4] 前記第 1 の R N A 誘導型ヌクレアーゼは、 C a s 9 ヌクレアーゼである、項目 4 7 ~ 5 3 のいずれか一項に記載のプロセス。

[5 5] 前記 C a s 9 ヌクレアーゼは、少なくとも 1 つの核移行シグナルに連結される、項目 5 4 に記載のプロセス。

[5 6] 第 1 の R N P は、 3 : 1 の第 1 の g R N A : 第 1 の R N A 誘導型ヌクレアーゼのモル比を含む、項目 4 7 ~ 5 5 のいずれか一項に記載のプロセス。

[5 7] 前記第 1 の免疫寛容原性因子は、 P D - L 1 、 H L A - E 、 H L A - G 、 C T L A - 4 又は C D 4 7 である、項目 4 3 ~ 5 6 のいずれか一項に記載のプロセス。

[5 8] 前記第 1 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列は、外来プロモーターに作動可能に連結される、項目 4 3 ~ 5 7 のいずれか一項に記載のプロセス。

[5 9] 前記外来プロモーターは、 C M V 、 E F 1 、 P G K 、 C A G 又は U B C プロモーターである、項目 5 8 に記載のプロセス。

[6 0] 前記第 1 の免疫寛容原性因子は、 P D - L 1 である、項目 4 3 ~ 5 9 のいずれか一項に記載のプロセス。

[6 1] P D - L 1 をコードする前記ヌクレオチド配列は、配列番号 1 1 から本質的になる、項目 6 0 に記載のプロセス。

[6 2] P D - L 1 をコードする前記ヌクレオチド配列は、 C A G プロモーターに作動可能に連結される、項目 6 1 に記載のプロセス。

[6 3] 前記第 1 のベクターは、配列番号 3 3 からなるヌクレオチド配列を含む、項目 6 0 ~ 6 2 のいずれか一項に記載のプロセス。

[6 4] (c) での前記改変は、 (1) 生存因子の遺伝子座位中の標的部位を標的化する第 2 の R N A 誘導型ヌクレアーゼ及び第 2 のガイド R N A (g R N A) 、並びに (2) 第 2 の核酸であって、 (i) 前記生存因子の遺伝子座位中の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、 (i i) 前記第 2 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列、及び (i i i) 前記生存因子の遺伝子座位中の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列を含む第 2 の核酸を含む第 2 のベクターを前記幹細胞に送達することを含み、前記生存因子の遺伝子座位は、前記標的部位で切断され、及び前記第 2 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列を含む前記第 2 の核酸は、前記生存因子の遺伝子座位に挿入され、それにより前記生存因子の遺伝子を破壊する、項目 4 3 ~ 6 3 のいずれか一項に記載のプロセス。

[6 5] 前記第 2 の R N A 誘導型ヌクレアーゼ及び前記第 2 の g R N A は、第 2 のリボ核タンパク質 (R N P) 複合体を形成する、項目 6 4 に記載のプロセス。

[6 6] (c) での前記改変は、 (1) 生存因子の遺伝子座位中の標的部位を標的化する第 2 の R N A 誘導型ヌクレアーゼ及び第 2 のガイド R N A (g R N A) を含む第 2 のリボ核タンパク質 (R N P) 複合体、並びに (2) 第 2 の核酸であって、 (i) 前記生存因子の遺伝子座位中の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、 (i i) 前記第 2 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列、及び (i i i) 前記第 2 の生存因子の遺伝子座位中の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列を含む第 2 の核酸を含む第 2 のベクターを前記第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞に送達することを含み、前記生存因子の遺伝子座位は、前記標的部位で切断され、及び前記第 2 の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列を含む前記第 2 の核酸は、前記生存因子の遺伝子座位に挿入され、それにより前記生存因子の遺伝子を破壊する、項目 4

10

20

30

40

50

3 ~ 63 のいずれか一項に記載のプロセス。

[67] 前記生存遺伝子は、TXNIP、ZNF143、FOXO1、JNK又はMANFである、項目43 ~ 66 のいずれか一項に記載のプロセス。

[68] 前記生存遺伝子は、TXNIPである、項目67に記載のプロセス。

[69] 前記第2のgRNAは、配列番号20からなる標的配列に対応するスパーサー配列を含む、項目68に記載のプロセス。

[70] (c)(2)(i)の前記ヌクレオチド配列は、配列番号25から本質的になり、及び(c)(2)(iii)の前記ヌクレオチド配列は、配列番号32から本質的になる、項目68又は69に記載のプロセス。

[71] 前記第2のRNA誘導型ヌクレアーゼは、Cas9ヌクレアーゼである、項目64 ~ 70 のいずれか一項に記載のプロセス。 10

[72] 前記Cas9ヌクレアーゼは、少なくとも1つの核移行シグナルに連結される、項目71に記載のプロセス。

[73] 前記第2のRNPは、3 : 1の第2のgRNA : 第2のRNA誘導型ヌクレアーゼのモル比を含む、項目64 ~ 72 のいずれか一項に記載のプロセス。

[74] 前記第2の免疫寛容原性因子は、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4又はCD47である、項目43 ~ 73 のいずれか一項に記載のプロセス。

[75] 前記第2の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列は、外来プロモーターに作動可能に連結される、項目43 ~ 74 のいずれか一項に記載のプロセス。

[76] 前記外来プロモーターは、CMV、EF1、PGK、CAG又はUBCプロモーターである、項目75に記載のプロセス。 20

[77] 前記第2の免疫寛容原性因子は、HLA-Eである、項目43 ~ 76 のいずれか一項に記載のプロセス。

[78] HLA-Eをコードする前記ヌクレオチド配列は、そのシグナルペプチドを伴わずにHLA-Eに融合されたB2M膜タンパク質に融合されたHLA-G提示ペプチドに融合されたB2Mシグナルペプチドを含むHLA-E三量体をコードする配列を含む、項目77に記載のプロセス。

[79] 前記HLA-E三量体をコードする前記配列は、配列番号55から本質的になる、項目78に記載のプロセス。

[80] HLA-Eをコードする前記ヌクレオチド配列は、CAGプロモーターに作動可能に連結される、項目78又は79に記載のプロセス。 30

[81] 前記第2のベクターは、配列番号34又は56からなるヌクレオチド配列を含む、項目77 ~ 80 のいずれか一項に記載のプロセス。

[82] (e)での前記単一細胞ソーティングは、蛍光活性化細胞分取(FACS)、単一細胞クローニング、前記単一細胞ソーティングされた細胞を増殖させること又はこれらの組み合わせを含む、項目43 ~ 81 のいずれか一項に記載のプロセス。

[83] (f)での前記特徴付けは、接合状態及び/又はインデルプロファイルについてのDNA分析を含む、項目43 ~ 82 のいずれか一項に記載のプロセス。

[84] (f)での前記特徴付けは、形態、生存能、核型分析、内毒素レベル、マイコプラズマレベル、オン/オフターゲット分析、ランダムベクター挿入、残留Cas9、残留ベクター、多能性状態、分化能又はこれらの組み合わせについての細胞分析を含む、項目43 ~ 83 のいずれか一項に記載のプロセス。 40

[85] (f)での前記特徴付け前に凍結させることをさらに含む、項目43 ~ 84 のいずれか一項に記載のプロセス。

【**手続補正2**】

【**補正対象書類名**】特許請求の範囲

【**補正対象項目名**】全文

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項 1】

ユニバーサルドナー細胞を作製するための方法であって、

(a) 生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第 1 の部位特異的ヌクレアーゼ、ここで前記生存因子が T X N I P であり；及び

(b) (i) (a) の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び (i i) (a) の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第 1 の核酸

を細胞に送達することを含み、前記第 1 の部位特異的ヌクレアーゼは、(a) の前記標的部位を切断し、及び (b) の前記第 1 の核酸は、(a) の前記部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位で挿入され、それによりユニバーサルドナー細胞を作製し、前記ユニバーサルドナー細胞は、(b) の前記核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した細胞生存を有する、方法。

10

【請求項 2】

前記第 1 の免疫寛容原性因子は、P D - L 1、H L A - E、H L A - G、C T L A - 4 又は C D 4 7 であり；そして場合により前記第 1 の免疫寛容原性因子が H L A - E である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 の部位特異的ヌクレアーゼは、C R I S P Rヌクレアーゼ及びガイドRNA (g R N A) を含む C R I S P R システムであり；場合により前記 C R I S P Rヌクレアーゼが I I 型 C a s 9ヌクレアーゼ又は V 型 C f p 1ヌクレアーゼであり、そして前記 C R I S P Rヌクレアーゼが少なくとも 1 つの核局在化シグナルに連結されており；および / または

20

前記 g R N A は、配列番号 1 5 ~ 2 4 のいずれか 1 つを含む標的配列に対応するスペーサー配列を含み、および / または (b) (i) のヌクレオチド配列は、配列番号 2 5 を含み、そして (b) (i i) のヌクレオチド配列は配列番号 3 2 を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

(c) M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原又は M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写調節因子の 1 つ以上をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第 2 の部位特異的ヌクレアーゼ、場合により前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原、または M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写制御因子が、H L A - A、H L A - B、H L A - C、H L A - D P、H L A - D M、H L A - D O A、H L A - D O B、H L A - D Q、H L A - D R、B 2 M、N L R C 5、C I I T A、R F X 5、R F X A P、または R F X A N K であり、そしてさらに任意選択で、前記 M H C - I 若しくは M H C - I I ヒト白血球抗原、または M H C - I 若しくは M H C - I I 複合体の構成要素若しくは転写制御因子が B 2 M であり；及び

30

(d) (i i i) (c) の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び (i v) (c) の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第 2 の核酸、ここで

(d) の前記第 2 の免疫寛容原性因子は、(b) の前記第 1 の免疫寛容原性因子と異なり、そして場合により前記第 2 の免疫寛容原性因子が P D - L 1、H L A - E、H L A - G、C T L A - 4、又は C D 4 7 であり、そしてさらに場合により第 2 の免疫寛容原性因子が P D - L 1 である

40

を前記細胞に送達することをさらに含み、

前記第 2 の部位特異的ヌクレアーゼは、(c) の前記標的部位を切断し、及び (d) の前記第 2 の核酸は、(c) の前記部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位で挿入され、前記ユニバーサルドナー細胞は、(d) の前記第 2 の核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した免疫回避及び / 又は細胞生存を有し、そして場合により第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が、外因性プロモーターに作動可能に連結され、そして第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列

50

が、外因性プロモーターに作動可能に連結され；任意選択で、前記外因性プロモーターが、構成的、誘導性、一過的、組織的、または細胞型特異的プロモーターであり；さらに任意選択で、前記外因性プロモーターが、CMV、EF1、PGK、CAG、またはUBCプロモーターである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記第2の部位特異的ヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ及びgRNAを含むCRISPRシステムであり、そして場合により前記CRISPRヌクレアーゼがII型Cas9ヌクレアーゼまたはV型Cfp1ヌクレアーゼであり、そして前記CRISPRヌクレアーゼが少なくとも1つの核局在化シグナルに連結されており；および/または前記gRNAが、配列番号1～3または35～44のいずれか1つを含む標的配列に対応するスペーサー配列を含み、および/または(d)(iii)のヌクレオチド配列が配列番号7を含み、(d)(iv)のヌクレオチド配列が配列番号13を含む、請求項4に記載の方法。

10

【請求項6】

ユニバーサルドナー細胞を作製するための方法であって、
(a) 生存因子をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第1の部位特異的ヌクレアーゼであって、前記生存因子はTXNIPであり；

(b) (i) (a)の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び(ii) (a)の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸であって、前記第1の部位特異的ヌクレアーゼは、(a)の前記標的部位を切断し、及び相同組換えのプロセスを通して、(b)の前記第1の核酸は、前記第1の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列を、(a)の前記部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位に挿入し、それにより(a)の前記遺伝子を破壊するための鑄型として利用される、第1の核酸；

20

(c) MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子の1つ以上をコードする遺伝子内又はその近傍の部位を標的化する第2の部位特異的ヌクレアーゼ；及び

(d) (iii) (c)の前記標的部位の左に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、及び(iv) (c)の前記標的部位の右に位置する領域と相同なヌクレオチド配列に隣接する、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸であって、(d)の前記免疫寛容原性因子は、前記免疫寛容原性因子(b)と異なり、前記第2の部位特異的ヌクレアーゼは、(c)の前記標的部位を切断し、及び相同組換えのプロセスを通して、(d)の前記第2の核酸は、前記第2の免疫寛容原性因子をコードする前記ヌクレオチド配列を、(c)の前記部位と部分的に重複するか、完全に重複するか、又はその中に含有される部位に挿入し、それにより(c)の前記遺伝子を破壊するための鑄型として利用される、第2の核酸

30

を細胞に送達し、それによりユニバーサルドナー細胞を作製することを含み、前記ユニバーサルドナー細胞は、(b)の前記第1の核酸及び(d)の前記第2の核酸が挿入されていない細胞と比較して増加した細胞生存を有する、方法。

40

【請求項7】

前記第1の免疫寛容原性因子は、HLA-Eであり、前記MHC-I若しくはMHC-IIヒト白血球抗原又はMHC-I若しくはMHC-II複合体の構成要素若しくは転写調節因子は、B2Mであり、及び前記第2の免疫寛容原性因子は、PD-L1である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

(i) 前記細胞は、哺乳動物細胞であり、任意選択により、前記細胞は、ヒト細胞であり、

(ii) 前記細胞は、幹細胞であり、

(iii) 前記細胞は、多能性幹細胞、胚性幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞又は造

50

血幹細胞であり、

(iv) 前記細胞は、分化細胞又は体細胞であり、及び/又は

(v) 前記ユニバーサルドナー細胞は、系列限定前駆細胞又は完全に分化した体細胞に分化することができ、そして場合により前記系列限定前駆細胞は、腭臓内胚葉前駆細胞、腭臓内分泌性前駆細胞、間葉系前駆細胞、筋肉前駆細胞、芽球細胞、造血前駆細胞又は神経前駆細胞であり；及び/又は

前記完全に分化した体細胞は、腭ベータ細胞、上皮細胞、内胚葉細胞、マクロファージ、肝細胞、脂肪細胞、腎細胞、血液細胞、心筋細胞又は免疫系細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法によって作製される複数のユニバーサルドナー細胞であって；場合により複数のユニバーサルドナー細胞が、細胞が分化を受けるのに十分な時間と条件下で維持される、前記細胞。

【請求項 10】

配列番号 16 ~ 22 及び 24 のいずれか 1 つを含む標的配列に対応するスパーサー配列を含むガイド RNA。

【請求項 11】

ユニバーサルドナー細胞を作製する方法であって、以下の：

(a) MHC - I もしくは MHC - II ヒト白血球抗原、または MHC - I もしくは MHC - II 複合体の構成要素若しくは転写調節因子をコードする遺伝子内またはその近傍に、第 1 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を挿入することにより幹細胞を改変し、それにより第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を作製する工程；

(b) 第 1 の寛容原性因子陽性細胞を濃縮する工程；

(c) 生存因子をコードする遺伝子内またはその近傍に、第 2 の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を挿入することによって、(b) からの第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を改変する工程であって、前記生存因子は T X N I P であり、それにより第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を作製する工程；

(d) 第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を濃縮する工程；

(e) 第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を選択するために、単一細胞選別する工程；

(f) 工程 (e) から選択された細胞を、ユニバーサルドナー細胞として特徴付ける工程；並びに

(g) 長期保存のためにユニバーサルドナー細胞を凍結保存する工程

を含む、前記方法。

【請求項 12】

工程 (b) における第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞の濃縮が、磁気補助細胞選別 (MACS)、単一細胞クローニング、第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞の増幅、またはそれらの組み合わせからなり；および/または

工程 (d) における第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞の濃縮が、磁気補助細胞選別、単一細胞クローニング、第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞の増幅、またはそれらの組み合わせからなる方法であって；

任意選択で、当該方法はさらに、工程 (a) において、作製された第 1 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増幅すること、工程 (c) において、作製された第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫寛容原性因子陽性細胞を増幅すること、工程 (e) において、選択された第 1 の免疫寛容原性因子陽性 / 第 2 の免疫原性陽性細胞を増幅すること、またはそれらの組み合わせを含み；そして場合により

工程 (e) における単一細胞の選別が、蛍光活性化細胞選別 (FACS)、単一細胞クローニング、前記単一細胞選別された細胞の増殖、またはそれらの組み合わせを含み；及び/又は

工程 (f) における特性決定が、接合性および/またはインデルプロファイルについて

10

20

30

40

50

のDNA分析を含み、および/または、工程(f)における特性決定が、形態、生存率、核型分析、エンドトキシンレベル、マイコプラズマレベル、オン/オフ標的分析、ランダムベクター挿入、残存Cas9、残存ベクター、多能性状態、分化能、またはそれらの組み合わせについての細胞分析を含み、任意選択で、前記方法が、工程(f)における特性決定の前に凍結することをさらに含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

(a)における改変が、幹細胞に、(1)第1のRNAガイドヌクレアーゼと、MHC-IもしくはMHC-IIヒト白血球抗原、またはMHC-IもしくはMHC-II複合体遺伝子座の構成要素もしくは転写調節因子における標的部位を標的とする第1のガイドRNA(gRNA)とを送達することを含み、場合により、前記MHC-IもしくはMHC-IIヒト白血球抗原、またはMHC-IもしくはMHC-II複合体遺伝子の構成要素もしくは転写調節因子が、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、B2M、NLRC5、CIITA、RFX5、RFXAP、またはRFXANKであり、そしてさらに任意選択で、前記MHC-IもしくはMHC-IIヒト白血球抗原、またはMHC-IもしくはMHC-II複合体遺伝子の構成要素もしくは転写調節因子がB2Mであり；そして(2)第1の核酸を含む第1のベクターであって、該第1の核酸は、

10

(i) MHC-IもしくはMHC-IIヒト白血球抗原またはMHC-IもしくはMHC-II複合体遺伝子の遺伝子座の構成要素もしくは転写調節因子における標的部位の左側に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、

20

(ii) 第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列、および

(iii) MHC-IもしくはMHC-IIヒト白血球抗原、またはMHC-IもしくはMHC-II複合体遺伝子座の構成要素もしくは転写調節因子における標的部位の右側に位置する領域と相同なヌクレオチド配列

ここで、前記MHC-IもしくはMHC-IIヒト白血球抗原、またはMHC-IもしくはMHC-II複合体遺伝子座の構成要素もしくは転写調節因子が、標的部位で切断され、そして第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第1の核酸が、MHC-IもしくはMHC-IIヒト白血球抗原、またはMHC-IもしくはMHC-II複合体遺伝子座の構成要素もしくは転写調節因子に挿入され、それによって、MHC-IもしくはMHC-IIヒト白血球抗原、またはMHC-IもしくはMHC-II複合体遺伝子の構成要素もしくは転写調節因子を破壊すること；

30

を含む、第1のベクターを導入し；

任意選択で、(a)における改変が、幹細胞に、(1)第1のRNAガイドヌクレアーゼと、MHC-IもしくはMHC-IIヒト白血球抗原、またはMHC-IもしくはMHC-II複合体遺伝子座の構成要素もしくは転写調節因子中の標的部位を標的とする第1のgRNAとを含む第1のリボヌクレオタンパク質(RNP)複合体を送達することを含む；および/または

(c)における改変が、幹細胞に、(1)第2RNAガイドヌクレアーゼと、生存因子遺伝子座における標的部位を標的とする第2のgRNAと、及び(2)第2の核酸を含む第2のベクターを送達することを含み、該第2の核酸が、

40

(i) 生存因子遺伝子座における標的部位の左側に位置する領域と相同なヌクレオチド配列、

(ii) 第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列、及び

(iii) 生存因子遺伝子座における標的部位の右側に位置する領域と相同なヌクレオチド配列

を含み、生存因子遺伝子座が標的部位で切断され、第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列を含む第2の核酸が生存因子遺伝子座に挿入され、それによって生存因子遺伝子が破壊される、

を含み、

任意選択で、(c)における修飾が、第1の免疫寛容原性因子陽性細胞に、(1)第2

50

のRNAガイドヌクレアーゼと、生存因子遺伝子座における標的部位を標的とする第2のgRNAとを含む第2のリボヌクレオタンパク質(RNP)複合体を送達することを含む、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項14】

第1のRNAガイドヌクレアーゼ及び/又は第2のRNAガイドヌクレアーゼが、Cas9ヌクレアーゼであり；及び/又は、

(a)(2)(i)のヌクレオチド配列が、配列番号7を含み、(a)(2)(iii)のヌクレオチド配列が配列番号13を含み；及び/又は、第1のgRNAが配列番号2を含む標的配列に対応するスペーサー配列を含み；および/または

第2のgRNAが、配列番号20を含む標的配列に対応するスペーサー配列を含み、及び/又は(c)(2)(i)のヌクレオチド配列が配列番号25を含み、そして(c)(2)(iii)のヌクレオチド配列が配列番号32を含む、請求項13に記載の方法。

10

【請求項15】

第1の免疫寛容原性因子がPD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4、またはCD47であり、および/または第1の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が外因性プロモーターに作動可能に連結されており、そして任意選択で、外因性プロモーターがCMV、EF1、PGK、CAG、またはUBCプロモーターであり；さらに任意選択で、第1の免疫寛容原性因子がPD-L1であり、および/または

ここで、第2の免疫寛容原性因子が、PD-L1、HLA-E、HLA-G、CTLA-4、またはCD47であり、及び/又は第2の免疫寛容原性因子をコードするヌクレオチド配列が、外因性プロモーターに作動可能に連結され；任意選択で、ここで、外因性プロモーターが、CMV、EF1、PGK、CAG、またはUBCプロモーターであり；そしてさらに任意選択で

20

前記第2の免疫寛容原性因子がHLA-Eであり、場合によりHLA-Eをコードするヌクレオチド配列が、HLA-E三量体をコードする配列であって、シグナルペプチドを伴わないHLA-Eに融合したB2M膜タンパク質に融合したHLA-G提示ペプチドに融合したB2Mシグナルペプチドを含む、前記配列を含み、ここでHLA-E三量体をコードする配列が、配列番号55のヌクレオチド配列を含む、請求項11~14のいずれか一項に記載の方法。

30

40

50