

【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6年7月4日(2024.7.4)

【国際公開番号】WO2022/006309
 【公表番号】特表2023-532917(P2023-532917A)
 【公表日】令和5年8月1日(2023.8.1)
 【年通号数】公開公報(特許)2023-143
 【出願番号】特願2022-581341(P2022-581341)

【国際特許分類】

10

- C 1 2 N 15/09(2006.01)
- C 1 2 N 15/12(2006.01)
- C 1 2 N 15/13(2006.01)
- C 1 2 N 15/19(2006.01)
- C 1 2 N 15/52(2006.01)
- C 1 2 N 15/62(2006.01)
- C 1 2 N 15/85(2006.01)
- C 1 2 N 15/86(2006.01)
- C 1 2 N 15/864(2006.01)
- C 1 2 N 15/867(2006.01)
- C 1 2 N 5/10(2006.01)
- C 1 2 N 5/0781(2010.01)
- A 6 1 K 38/46(2006.01)
- A 6 1 K 35/17(2015.01)
- A 6 1 K 48/00(2006.01)
- A 6 1 P 43/00(2006.01)

20

【F I】

- C 1 2 N 15/09 1 1 0
- C 1 2 N 15/09 1 0 0
- C 1 2 N 15/12 Z N A
- C 1 2 N 15/13
- C 1 2 N 15/19
- C 1 2 N 15/52 Z
- C 1 2 N 15/62 Z
- C 1 2 N 15/85 Z
- C 1 2 N 15/86 Z
- C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
- C 1 2 N 15/867 Z
- C 1 2 N 5/10
- C 1 2 N 5/0781
- A 6 1 K 38/46
- A 6 1 K 35/17
- A 6 1 K 48/00
- A 6 1 P 43/00 1 0 5

30

40

【手続補正書】

【提出日】令和6年6月26日(2024.6.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

50

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞の内因性 2ミクログロブリン (B2M) 遺伝子の組換えシステムであって、
該システムが、

細胞のゲノム内の内因性B2M遺伝子の標的遺伝子座を切断することができるヌクレアーゼ、または該ヌクレアーゼをコードする核酸と、

前記B2M遺伝子に相補的な配列を含むガイドRNA (gRNA)、および

第1の相同アームと、第2の相同アームと、該第1の相同アームと該第2の相同アームの間にペイロードをコードする核酸とを含む修復鋳型とを含み、

前記第1の相同アームおよび/または前記第2の相同アームが、前記B2M遺伝子の配列と同一性を有する、システム。

【請求項 2】

(i) 前記gRNAが、配列番号3で示されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む；配列番号3で示されるヌクレオチド配列を含む；もしくは配列番号3と比較して3個以下のミスマッチを有する前記ヌクレオチド配列のバリエーションを含む；

(ii) 前記gRNAが、配列番号1、2および4のいずれかで示されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む；配列番号1、2および4のいずれかで示されるヌクレオチド配列を含む；もしくは配列番号1~4のいずれかと比較して3個以下のミスマッチを有する前記ヌクレオチド配列のバリエーションを含む；

(iii) 前記gRNAが、前記内因性B2M遺伝子を不活性化するように構成されている；および/または

(iv) 前記標的遺伝子座が、前記B2M遺伝子の第1のコーディングエクソン内にある、請求項1に記載のシステム。

【請求項 3】

前記ヌクレアーゼが、Casヌクレアーゼを含む、請求項1または2に記載のシステム。

【請求項 4】

前記修復鋳型が、前記ヌクレアーゼの標的配列を持たず、かつ/または前記gRNAの配列もしくはその相補鎖にハイブリダイズすることができる配列を持たない、請求項1~3のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項 5】

ペイロードをコードする前記核酸が、(i) B2M cDNAをコードする第1の核酸；(ii) 非多型性HLAポリペプチドまたは治療用ポリペプチドをコードする第2の核酸；および/または (iii) 前記非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドをコードする第3の核酸を含み、前記非多型性HLAポリペプチドが、HLA-E、HLA-FおよびHLA-Gから選択されてもよい、請求項1~4のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項 6】

前記第1の核酸が、前記内因性B2M遺伝子のプロモーターに作動可能に連結されている、および/または第1のポリペプチドが、前記内因性B2M遺伝子によってコードされるポリペプチドとインフレームである、請求項5に記載のシステム。

【請求項 7】

ペイロードをコードする前記核酸が、前記第1の核酸に作動可能に連結された異種プロモーターを含み、該異種プロモーターが、構成的プロモーターであってもよく、MNDプロモーター、EF1 プロモーターおよびPGKプロモーターから選択されてもよい、請求項5または6に記載のシステム。

【請求項 8】

前記修復鋳型がベクターに含まれており、該ベクターが、ウイルスベクターを含んでいてもよく、該ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターまたはレンチ

10

20

30

40

50

ウイルスベクターを含んでいてもよい、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 9】

前記ヌクレアーゼと、任意の構成要素として前記gRNAおよび/または修復鋳型とを含む細胞をさらに含み、前記細胞が、B細胞、造血幹細胞、初期プロB細胞、後期プロB細胞、大型プレB細胞、小型プレB細胞、未熟B細胞、T1 B細胞、T2 B細胞、辺縁帯B細胞、成熟B細胞、ナイーブB細胞、(短命)形質芽球細胞、GC B細胞、メモリーB細胞および長命形質細胞からなる群から選択されてもよい、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のシステムと薬学的に許容される添加剤とを含む医薬組成物。

10

【請求項 11】

組換え細胞を作製する方法であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のシステムを得る工程と、第 1 の細胞にヌクレアーゼを導入する工程を含み、前記第 1 の細胞がB細胞であり、任意の工程として、

前記第 1 の細胞にgRNAを導入する工程、および/または前記第 1 の細胞に修復鋳型を導入する工程

を含み、

ゲノム内のB2M遺伝子座が組換えられた組換え細胞が得られることを特徴とする方法。

20

【請求項 12】

前記組換えられたB2M遺伝子座が、不活性化された内因性B2M遺伝子を含み、前記組換え細胞を免疫細胞に接触させることによって選択する工程をさらに含み、前記免疫細胞が、前記第 1 の細胞と同じ種に由来する免疫細胞であってもよく、前記免疫細胞が、T細胞およびナチュラルキラー細胞から選択されてもよく、前記免疫細胞が、前記第 1 の細胞のMHC-Iとは異なるMHC-Iを含んでいてもよい、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記組換えられたB2M遺伝子座が、活性型B2M遺伝子またはB2M cDNAを発現し、前記組換え細胞を免疫細胞に接触させることによって選択する工程をさらに含み、前記免疫細胞が、前記第 1 の細胞と同じ種に由来する免疫細胞であってもよく、前記免疫細胞が、T細胞およびナチュラルキラー細胞から選択されてもよい、請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記組換えられたB2M遺伝子座が、不活性化された内因性B2M遺伝子を含み、置換されたMHC-Iを発現し、ならびに/または前記修復鋳型が、B2M cDNA、非多型性HLAポリペプチド、および/もしくは該非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドをコードするペイロードを含み、前記組換え細胞を免疫細胞に接触させることによって選択する工程をさらに含み、前記免疫細胞が、前記第 1 の細胞と同じ種に由来する免疫細胞であってもよく、前記免疫細胞が、T細胞およびナチュラルキラー細胞から選択されてもよい、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

同種細胞輸液用の組換えB細胞を作製する方法であって、請求項 11 に記載の方法に従って、B2M cDNAと、非多型性HLAポリペプチドと、該非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドとをコードするペイロードを含む修復鋳型を用いて、組換えB細胞を作製する工程を含み、前記組換えB細胞が、対象と同じ種に由来する細胞であり、前記組換えB細胞を前記対象に投与する工程をさらに含んでいてもよく、前記非多型性HLAポリペプチドが、HLA-E、HLA-FおよびHLA-Gから選択されてもよい、方法。

40

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

50

【補正対象項目名】 0 0 1 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態において、前記第1のポリペプチドまたは前記第2のポリペプチドは、B2M cDNAをコードする。いくつかの実施形態において、前記第1のポリペプチドまたは前記第2のポリペプチドは、非多型性HLAポリペプチドまたは治療用ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、前記非多型性HLAポリペプチドは、HLA-A-E、HLA-FおよびHLA-Gから選択される。いくつかの実施形態は、前記非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドをコードする第3のポリペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記治療用ポリペプチドは、酵素、抗体もしくはその抗原結合断片、受容体、キメラ抗原受容体またはサイトカインを含む。いくつかの実施形態において、前記治療用ポリペプチドは、第IX因子、アンギオテンシン変換酵素2 (Ace2)、 α -グルコセレブロシダーゼ (GBA)、 α -ガラクトシダーゼA (GLA) または酸性 α -グルコシダーゼ (GAA) を含む。

10

【手続補正3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 3 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態において、前記組換えられたB2M遺伝子座は、置換されたMHC-Iを発現する。いくつかの実施形態において、前記組換えられたB2M遺伝子座は、不活性化されたB2M内因性遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、前記修復鋳型は、B2M cDNA、非多型性HLAポリペプチド、および/または該非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドをコードするペイロードを含む。いくつかの実施形態は、前記組換え細胞を選択する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記選択工程は、前記組換え細胞を免疫細胞に接触させる工程を含む。いくつかの実施形態において、前記免疫細胞は、前記第1の細胞と同じ種に由来する免疫細胞である。いくつかの実施形態において、前記免疫細胞は、細胞傷害性CD8⁺T細胞などのT細胞およびナチュラルキラー細胞から選択される。

20

30

【手続補正4】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 3 8

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態は、組換えB細胞を濃縮する方法であって、本明細書で提供される方法のいずれかに従って、B2M cDNAと、非多型性HLAポリペプチドと、該非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドとをコードするペイロードを含む修復鋳型を用いて、置換されたMHC-Iを発現するように第1の細胞のB2M遺伝子座を組換えることによって組換え細胞を作製する工程と、

40

前記第1の細胞と同じ種に由来するT細胞またはナチュラルキラー細胞に、前記組換え細胞を接触させる工程とを含む方法を含む。

【手続補正5】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 3 9

【補正方法】 変更

【補正の内容】

50

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態は、同種細胞輸液用の組換えB細胞を作製する方法であって、本明細書で提供される方法のいずれかに従って、B2M cDNAと、非多型性HLAポリペプチドと、該非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドとをコードするペイロードを含む修復鋳型を用いて、組換えB細胞を作製する工程を含む方法を含む。

いくつかの実施形態は、前記組換えB細胞を対象に投与する工程をさらに含み、該組換えB細胞は、前記対象と同じ種に由来する細胞である。いくつかの実施形態において、前記非多型性HLAポリペプチドは、HLA-E、HLA-FおよびHLA-Gから選択される。いくつかの実施形態において、前記対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態において、前記対象はヒトである。

10

【 手 続 補 正 6 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 4 2

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 4 2 】

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、同種細胞輸液用の組換えB細胞を作製する方法であって、

B細胞の内因性 2ミクログロブリン (B2M) 遺伝子を不活性化する工程と、

外因性B2Mポリペプチドと、非多型性HLAポリペプチドと、該非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドとを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、前記不活性化したB2M遺伝子に導入することによって、組換えB細胞を得る工程とを含む方法を含む。

20

いくつかの実施形態は、前記組換えB細胞を対象に投与する工程をさらに含み、該組換えB細胞は、前記対象と同じ種に由来する細胞である。いくつかの実施形態において、前記非多型性HLAポリペプチドは、HLA-EおよびHLA-Gから選択される。

【 手 続 補 正 7 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 8 6

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態は、例えば、MHC-Iのノックダウン/不活性化などのB2M遺伝子座の編集を効率的に行うのに有用な、ヒトB2M用の合成ガイドRNAを含む。いくつかの実施形態は、内因性B2Mの発現を維持しながら、このB2Mに外因性配列を導入するための修復鋳型を含む。このような修復鋳型は、第IX因子、アンギオテンシン変換酵素2 (Ace2)、 α -グルコセレブロシダーゼ (GBA)、 α -ガラクトシダーゼA (GLA)、酸性 α -グルコシダーゼ (GAA) などの治療用タンパク質をコードする配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態は、非多型性のHLA (例えば、HLA-EやHLA-G) とNK細胞による殺傷を抑制するペプチドとB2Mからなる融合タンパク質で内因性B2Mを置換するための修復鋳型を含む。これらの配列を利用することによって、宿主の免疫細胞 (例えば、T細胞および/またはNK細胞) による移植片拒絶を起こすことなく、同種形質細胞の生着を促すことができる。いくつかの実施形態は、非多型性HLAとB2Mの融合タンパク質でB2Mを置換し、治療用タンパク質をコードする外因性配列を導入するための修復鋳型を含む。

40

【 手 続 補 正 8 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 8 8

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

50

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態は、同種免疫細胞による殺傷に対する組換えB細胞の耐性を向上させることに関する。例えば、いくつかの実施形態において、不活性化された内因性B2M遺伝子のMHC-Iを置換することによって、同種免疫細胞による殺傷に対する組換えB細胞の耐性を向上させる。このような実施形態のいくつかは、細胞のMHC-Iを置換することによって、同種T細胞または同種ナチュラルキラー細胞による殺傷に対する耐性が向上されている組換えB細胞を濃縮するための組成物および方法を含む。このような実施形態のいくつかは、置換されたMHC-Iを発現するようにB2M遺伝子座が組換えられた組換えB細胞を作製する工程を含む。このような実施形態のいくつかにおいて、内因性B2M遺伝子座は不活性化され、B2M cDNAと、非多型性HLAポリペプチドと、該非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドとをコードするペイロードで置換される。いくつかの実施形態は、例えばT細胞、例えばCD8+T細胞などの免疫細胞に前記組換え細胞を接触させる工程をさらに含み、該免疫細胞は、前記組換え細胞と同じ種に由来する細胞である。

10

【 手 続 補 正 9 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 1 3 0

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 1 3 0 】

20

同種細胞輸液用の組換えB細胞を作製する特定の方法

本明細書で提供される方法および組成物の実施形態のいくつかは、同種細胞輸液用の組換えB細胞を作製する方法を含む。このような実施形態のいくつかは、B細胞の内因性B2M遺伝子を不活性化する工程と、および外因性B2Mポリペプチドと、非多型性HLAポリペプチドと、該非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドとを含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、前記不活性化したB2M遺伝子に導入することによって、組換えB細胞を得る工程とを含む。いくつかの方法は、前記組換えB細胞を対象に投与する工程をさらに含み、該組換えB細胞は、前記対象と同じ種に由来する細胞である。いくつかの実施形態において、前記非多型性HLAポリペプチドは、HLA-EおよびHLA-Gから選択される。

30

【 手 続 補 正 1 0 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 1 5 0

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 1 5 0 】

いくつかの実施形態において、前記第1のポリペプチドまたは前記第2のポリペプチドは、非多型性HLAポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、前記非多型性HLAポリペプチドは、HLA-E、HLA-FおよびHLA-Gから選択される。いくつかの実施形態は、前記非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドをコードする第3のポリペプチドをさらに含む。

40

【 手 続 補 正 1 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 1 5 9

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態において、前記組換えられたB2M遺伝子座は、置換されたMHC-Iを発現する。いくつかの実施形態において、前記修復鋳型は、B2M cDNA、非多型性HLAポリペプチド、および/または該非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己

50

ペプチドをコードするペイロードを含む。いくつかの実施形態は、前記組換え細胞を選択する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記選択工程は、前記組換え細胞を免疫細胞に接触させる工程を含む。いくつかの実施形態において、前記免疫細胞は、前記第1の細胞と同じ種に由来する細胞である。いくつかの実施形態において、前記免疫細胞は、細胞傷害性CD8+T細胞などのT細胞およびナチュラルキラー細胞から選択される。いくつかの実施形態において、前記免疫細胞はインビボの細胞である。いくつかの実施形態において、前記免疫細胞はエクスピボの細胞である。いくつかの実施形態において、前記第1の細胞はB細胞である。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0162

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0162】

いくつかの実施形態は、組換えB細胞を濃縮する方法であって、本明細書に開示されたシステムのいずれかによって組換え細胞を作製する工程、ならびに第1の細胞にヌクレアーゼを導入する工程および/または前記細胞に修復鋳型を導入する工程を含み、ゲノム内のB2M遺伝子座が組換えられた組換え細胞が得られることを特徴とする方法を含む。いくつかの実施形態において、前記組換えられたB2M遺伝子座は、置換されたMHC-Iを発現し、前記修復鋳型は、B2M cDNAと、非多型性HLAポリペプチドと、該非多型性HLAポリペプチドによって提示される自己ペプチドとをコードするペイロードを含む。いくつかの実施形態は、前記第1の細胞と同じ種に由来するT細胞またはナチュラルキラー細胞に、前記組換え細胞を接触させる工程をさらに含む。

10

20

30

40

50