

【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3月7日(2023.3.7)

【国際公開番号】WO2020/176740
 【公表番号】特表2022-521787(P2022-521787A)
 【公表日】令和4年4月12日(2022.4.12)
 【年通号数】公開公報(特許)2022-065
 【出願番号】特願2021-549970(P2021-549970)
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/09(2006.01)
 C 1 2 N 5/10(2006.01)
 C 1 2 N 15/62(2006.01)
 C 1 2 N 15/12(2006.01)
 C 1 2 N 15/13(2006.01)
 C 1 2 N 15/88(2006.01)
 C 1 2 N 5/0783(2010.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 15/62 Z Z N A
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 15/13
 C 1 2 N 15/88 Z
 C 1 2 N 5/0783

20

【手続補正書】

【提出日】令和5年2月27日(2023.2.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

30

【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】

キメラ抗原受容体(CAR)構築物で形質移入された初代T細胞の集団であって、初代T細胞の前記集団は、PD-1遺伝子座中のcas9ヌクレアーゼ標的部位において前記ゲノム中に組み込まれた前記CAR構築物を有するT細胞を含み、

前記集団の前記T細胞の少なくとも20%が前記CAR構築物を発現し；

前記集団の前記T細胞は、組換えウイルスベクターまたは組換えウイルスベクターに由来する配列を含まない、キメラ抗原受容体(CAR)構築物で形質移入された初代T細胞の集団。

40

【請求項2】

前記CAR構築物が少なくとも1.8kbである、請求項1に記載の初代T細胞の集団。

【請求項3】

前記CAR構築物が、抗CD38 CAR構築物、抗CD19 CAR構築物または抗B2M CAR構築物である、請求項1に記載の初代T細胞の集団。

【請求項4】

前記集団の前記T細胞の少なくとも20%が前記CAR構築物を発現するが、PD-1を発現しない、請求項1に記載の初代T細胞の集団。

50

【請求項 5】

ドナー DNA 分子を生成するための組成物であって、

5'末端の5ヌクレオチド以内に1またはそれを超えるホスホロチオアート結合および1またはそれを超える修飾されたヌクレオチドを有する第1のプライマーと、

5'末端ホスファートを有する第2のプライマーと、を含み、

前記第1および第2のプライマーが、標的ゲノム中のRNA誘導型エンドヌクレアーゼのPD-1標的部位の反対側の配列に相同である、組成物。

【請求項 6】

前記第1のプライマーが、前記5'末端の5ヌクレオチド以内に、2'-O-メチル化修飾を有する1またはそれを超えるホスホロチオアート結合および1またはそれを超えるヌクレオチドを有する、請求項5に記載の組成物。

10

【請求項 7】

前記第1のプライマーが、前記5'末端の5ヌクレオチド以内に、2'-O-メチル化修飾を有する3個のホスホロチオアート結合および3個のヌクレオチドを有する、請求項6に記載の組成物。

【請求項 8】

前記RNA誘導型エンドヌクレアーゼがCas9である、請求項5に記載の組成物。

【請求項 9】

前記PD-1標的部位が配列番号32を含む、請求項8に記載の組成物。

【請求項 10】

関心対象の配列を宿主ゲノムの標的部位中に組み込むように構成された二本鎖ドナーDNA分子であって、

20

前記関心対象の配列に隣接する相同アームであって、前記宿主ゲノム中で前記標的部位の両側に存在する配列に対して相同な配列を含む相同アームと、

1つのドナーDNA鎖のヌクレオチドに対する1またはそれを超える修飾と、

を含み、前記1またはそれを超える修飾が、前記ドナーDNAの1つの鎖の5'末端の5ヌクレオチド以内に存在する1~5個の修飾されたヌクレオチドを含み、他方の鎖が末端5'ホスファートを有し、

前記標的部位が、PD-1遺伝子中にある、二本鎖ドナーDNA分子。

【請求項 11】

前記修飾されたヌクレオチドが、1~4個のホスホロチオアート(PS)結合もしくは1~4個の2'-O-メチル化修飾またはこれらの組み合わせを含む、請求項10に記載の二本鎖ドナーDNA分子。

30

【請求項 12】

前記標的部位が配列番号32を含む、請求項10に記載の二本鎖ドナーDNA分子。

【請求項 13】

前記相同アームが、配列番号30および配列番号31を含む、請求項12に記載の二本鎖ドナーDNA分子。

【請求項 14】

前記関心対象の配列がキメラ抗原受容体(CAR)構築物を含む、請求項10に記載の二本鎖ドナーDNA分子。

40

【請求項 15】

配列番号33を含む、請求項10に記載の二本鎖ドナーDNA分子。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0115

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0115】

図14は、抗CD38 CARドナー断片およびPD-1遺伝子座を標的化するRNP

50

で形質移入された培養物からの P B M C および単離された T 細胞（それぞれ「P D - 1 K O K I P B M C」および「P D - 1 K O K I T 細胞」）を使用して行われた細胞傷害性アッセイの結果を提供する。これらの改変された細胞は、P D - 1 遺伝子ノックアウトを有するが C A R 構築物を与えられなかった対照細胞（「P D - 1 K O」）および T R A C 遺伝子ノックアウトを有するが C A R 構築物を与えられなかった対照細胞（「T R A C - 1 K O」）に関して、アッセイにおいて標的細胞に対する高レベルの細胞傷害性を示し、抗 C D 3 8 C A R ドナー断片および T R A C 遺伝子座を標的とする R N P を形質移入された細胞（「T R A C K O K I」）より若干劣っていたが、おそらく、観察された P D - 1 部位でのドナー C A R 構築物組み込みの効率がより低いためであろう（図 1 3）。

10

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目 1）

標的 D N A 分子中へのドナー D N A の部位特異的組み込みのための方法であって、

R N A 誘導型エンドヌクレアーゼまたは R N A 誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸分子と、

少なくとも 1 つの操作されたガイド R N A または操作されたガイド R N A をコードする少なくとも 1 つの核酸分子と、

少なくとも 2 つの核酸修飾を含むドナー D N A 分子と、

を細胞中に導入することを含み、

前記ガイド R N A は、前記標的 D N A 中の標的部位とハイブリッド形成するように設計された標的配列を含み、前記ドナー D N A は、前記標的部位において前記標的 D N A 分子中に挿入される、方法。

20

（項目 2）

前記少なくとも 2 つの核酸修飾が、前記ドナー D N A 分子の単一の鎖上に存在する、項目 1 に記載の方法。

（項目 3）

1 またはそれを超える核酸修飾が、前記ドナー D N A 分子の修飾された鎖の 5 ' 末端の 1 0 ヌクレオチド以内の 1 またはそれを超えるヌクレオチドまたはヌクレオチド結合の修飾である、項目 1 または 2 に記載の方法。

（項目 4）

1 またはそれを超える核酸修飾が骨格修飾である、項目 1 に記載の方法。

30

（項目 5）

1 またはそれを超える核酸修飾が、ホスホロチオアート修飾もしくはホスホロアミダイト修飾またはこれらの組み合わせである、項目 4 に記載の方法。

（項目 6）

1 またはそれを超える核酸修飾が核酸塩基の修飾または置換である、項目 1 に記載の方法。

（項目 7）

1 またはそれを超える核酸修飾が糖の修飾または置換である、項目 1 に記載の方法。

（項目 8）

1 またはそれを超える核酸修飾がデオキシリボースの 2 ' - O - メチル基修飾である、項目 7 に記載の方法。

40

（項目 9）

前記ドナー D N A 分子が二本鎖 D N A 分子である、項目 1 または 2 に記載の方法。

（項目 1 0）

前記ドナー D N A 分子が、前記少なくとも 2 つの核酸修飾を含む修飾された鎖を有し、前記修飾された鎖とは反対の鎖上に 5 ' 末端ホスファートを有する、項目 9 に記載の方法。

（項目 1 1）

前記ドナー D N A 分子が、前記ドナー D N A 分子の前記修飾された鎖の前記 5 ' 末端の 1 0 ヌクレオチド以内の前記骨格上の 1 ~ 3 個のホスホロチオアート修飾と、前記ドナー分

50

子の前記修飾された鎖の前記 5' 末端の 10 ヌクレオチド以内の 1 ~ 3 個の 2' - O - メチルヌクレオチド修飾とを有する、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

前記ドナー分子が、前記ドナー分子の前記修飾された鎖の前記 5' 末端の 5 ヌクレオチド以内の前記骨格上の 1 ~ 3 個のホスホロチオラート修飾と、前記ドナー分子の前記修飾された鎖の前記 5' 末端の 5 ヌクレオチド以内の 1 ~ 3 個の 2' - O - メチルヌクレオチド修飾とを有する、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記ドナー DNA 分子が、前記ゲノム中に組み込むための配列に隣接する相同アームを含む、項目 1 に記載の方法。

10

(項目 14)

前記相同アームの少なくとも 1 つが 50 ~ 2000 ヌクレオチド長である、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記相同アームの少なくとも 1 つが 100 ~ 1000 ヌクレオチド長である、項目 13 に記載の方法。

(項目 16)

前記相同アームの少なくとも 1 つが 150 ~ 650 ヌクレオチド長である、項目 13 に記載の方法。

(項目 17)

20

前記相同アームの少なくとも 1 つが 150 ~ 350 ヌクレオチド長である、項目 13 に記載の方法。

(項目 18)

前記相同アームの少なくとも 1 つが 150 ~ 200 ヌクレオチド長である、項目 13 に記載の方法。

(項目 19)

前記ドナー DNA 分子が修飾された鎖および反対鎖を含み、前記修飾された鎖は 2 またはそれを超える核酸修飾を含み、前記反対鎖は末端ホスファートを含む、項目 13 に記載の方法。

(項目 20)

30

前記ドナー DNA がキメラ抗原受容体 (CAR) 構築物を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 21)

前記ガイド RNA が crRNA である、項目 1 に記載の方法。

(項目 22)

tracrRNA を前記細胞中に導入することをさらに含む、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

前記ガイド RNA がキメラガイド RNA である、項目 1 に記載の方法。

(項目 24)

前記 RNA 誘導型エンドヌクレアーゼが Cas9、Cas12a、Cas12b、Cas13、Cas14 または CasX である、項目 1 に記載の方法。

40

(項目 25)

少なくとも 1 つのガイド RNA が前記細胞に導入される、項目 1 に記載の方法。

(項目 26)

RNA 誘導型エンドヌクレアーゼが前記細胞中に導入される、項目 1 に記載の方法。

(項目 27)

前記 RNA 誘導型エンドヌクレアーゼおよび前記ガイド RNA が、リボ核タンパク質複合体 (RNP) として前記細胞中に導入される、項目 26 に記載の方法。

(項目 28)

前記 RNP が tracrRNA をさらに含む、項目 27 に記載の方法。

(項目 29)

50

前記 R N P が電気穿孔またはリポソーム移入によって前記細胞中に導入される、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記ドナー D N A および前記 R N P が同時にまたは別個に前記細胞中に導入される、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記 R N A 誘導型エンドヌクレアーゼまたは R N A 誘導型エンドヌクレアーゼをコードする前記核酸分子と、前記少なくとも 1 つの操作されたガイド R N A または操作されたガイド R N A をコードする前記少なくとも 1 つの核酸分子と、前記ドナー D N A 分子とが、前記細胞中に同時に導入される、項目 1 に記載の方法。

10

(項目 3 2)

前記細胞が真核細胞である、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記細胞が哺乳動物細胞である、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記細胞がヒト細胞である、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記細胞が造血細胞である、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記細胞が T 細胞である、項目 3 5 に記載の方法。

20

(項目 3 7)

前記標的部位が、T 細胞受容体遺伝子、P D - 1 遺伝子または T I M 3 遺伝子から選択される、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 8)

宿主細胞であって、

標的 D N A 分子中に組み込まれたドナー D N A を含み、

前記宿主細胞は、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法によって産生される、宿主細胞。

(項目 3 9)

キメラ抗原受容体 (C A R) 構築物で形質移入された初代 T 細胞の集団であって、初代 T 細胞の前記集団は、c a s 9 ヌクレアーゼ標的部位において前記ゲノム中に組み込まれた前記 C A R 構築物を有する T 細胞を含み、

30

前記集団の前記 T 細胞の少なくとも 2 0 % が前記 C A R 構築物を発現し、

前記集団の前記 T 細胞は、組換えウイルスベクターまたは組換えウイルスベクターに由来する配列を含まない、キメラ抗原受容体 (C A R) 構築物で形質移入された初代 T 細胞の集団。

(項目 4 0)

前記 C A R 構築物が少なくとも 1 . 8 k b である、項目 3 9 に記載の初代 T 細胞の集団。

(項目 4 1)

前記 C A R 構築物が、抗 C D 3 8 C A R 構築物、抗 C D 1 9 C A R 構築物または抗 B C M A C A R 構築物である、項目 3 9 に記載の初代 T 細胞の集団。

40

(項目 4 2)

前記集団の前記細胞の少なくとも 4 0 % が前記 C A R 構築物を発現する、項目 3 9 に記載の初代 T 細胞の集団。

(項目 4 3)

前記集団の前記細胞の少なくとも 5 0 % が前記 C A R 構築物を発現する、項目 3 9 に記載の初代 T 細胞の集団。

(項目 4 4)

前記 C A R 構築物が前記 T R A C 遺伝子座中に挿入されている、項目 3 9 に記載の初代 T 細胞の集団。

50

(項目 4 5)

前記集団の前記細胞の少なくとも 20% が前記 T 細胞受容体を発現しない、項目 4 4 に記載の初代 T 細胞の集団。

(項目 4 6)

前記 C A R 構築物が前記 P D - 1 遺伝子座中に挿入されている、項目 3 9 に記載の初代 T 細胞の集団。

(項目 4 7)

前記集団の前記細胞の少なくとも 20% が P D - 1 を発現しない、項目 4 6 に記載の初代 T 細胞の集団。

(項目 4 8)

標的遺伝子座中へのドナー D N A の標的化された組み込みのための系であって、

R N A 誘導型エンドヌクレアーゼまたは R N A 誘導型エンドヌクレアーゼをコードする核酸分子と、

ガイド R N A またはガイド R N A をコードする核酸分子と、

二本鎖ドナー D N A 分子であって、前記ドナー D N A 分子は、前記修飾された鎖の 5' 末端の 10 ヌクレオチド以内に 1 またはそれを超えるホスホロチオアート結合を有する 1 つの修飾された鎖を含む、二本鎖ドナー D N A 分子と、を含む系。

(項目 4 9)

前記系が R N A 誘導型エンドヌクレアーゼを含む、項目 4 8 に記載の系。

(項目 5 0)

前記系がガイド R N A を含む、項目 4 8 に記載の系。

(項目 5 1)

前記ドナー D N A 分子が、前記修飾された鎖の前記 5' 末端の 10 ヌクレオチド以内に前記修飾された鎖の糖部分または核酸塩基の少なくとも 1 つの修飾をさらに含む、項目 4 8 に記載の系。

(項目 5 2)

前記ドナー D N A が、前記ゲノム中に組み込むための関心対象の配列に隣接する相同アームを有する、項目 4 8 に記載の系。

(項目 5 3)

前記二本鎖 D N A 分子の前記修飾された鎖上の前記 1 またはそれを超えるホスホロチオアート結合が、前記修飾された鎖の前記 5' 末端の 5 ヌクレオチド以内に存在する、項目 4 8 に記載の系。

(項目 5 4)

前記修飾された鎖の糖部分または核酸塩基の前記少なくとも 1 つの修飾が、前記修飾された鎖の前記 5' 末端の 5 ヌクレオチド以内に存在する、項目 5 1 に記載の系。

(項目 5 5)

糖部分の前記少なくとも 1 つの修飾が 2' - O - メチル化を含む、項目 5 1 に記載の系。

(項目 5 6)

前記関心対象の配列が発現カセットを含む、項目 5 2 に記載の系。

(項目 5 7)

前記発現カセットが、1 またはそれを超える抗体または受容体ドメインを含む構築物を含む、項目 5 2 に記載の系。

(項目 5 8)

前記相同アームの少なくとも 1 つが 50 ~ 5000 ヌクレオチド長である、項目 5 2 に記載の系。

(項目 5 9)

前記相同アームの少なくとも 1 つが 100 ~ 1000 ヌクレオチド長である、項目 5 8 に記載の系。

(項目 6 0)

前記相同アームの少なくとも 1 つが 150 ~ 800 ヌクレオチド長である、項目 5 9 に記

10

20

30

40

50

載の系。

(項目61)

前記ヌクレアーゼが、Cas9、Cas12a、Cas12b、CasXおよびこれらの組み合わせからなる群から選択される、項目48に記載の系。

(項目62)

前記ガイドRNAが、crRNAおよびtracrRNAの両方の配列を有するキメラガイドである、項目50に記載の系。

(項目63)

前記ガイドRNAがcrRNAである、項目50に記載の系。

(項目64)

前記ガイドRNAが、1またはそれを超えるホスホロチオアート(PS)オリゴヌクレオチドを含む、項目50に記載の系。

(項目65)

tracrRNAをさらに含む、項目50に記載の系。

(項目66)

前記ガイドRNAがシングルガイドRNAである、項目50に記載の系。

(項目67)

前記RNA誘導型エンドヌクレアーゼと前記ガイドRNAとを含むリボ核タンパク質複合体を含む、項目48に記載の系。

(項目68)

ドナーDNA分子を生成するための組成物であって、

前記二本鎖DNA分子の単一の鎖上に、前記核酸分子の前記修飾された鎖の前記5'末端の5ヌクレオチド以内に1またはそれを超えるホスホロチオアート結合および1またはそれを超える修飾されたヌクレオチドを有する第1のプライマーと、

5'末端ホスファートを有する第2のプライマーと、を含む組成物。

(項目69)

前記第1および第2のプライマーが、標的ゲノム中のRNA誘導型エンドヌクレアーゼの標的部位の反対側の配列に相同である、項目68に記載の組成物。

(項目70)

関心対象の配列を宿主ゲノムの標的部位中に組み込むように構成された二本鎖ドナーDNA分子であって

1つのドナーDNA鎖のヌクレオチドに対する1またはそれを超える修飾と、

前記関心対象の配列に隣接する相同アームであって、前記宿主ゲノム中で前記標的部位の両側に存在する配列に対して相同な配列を含む相同アームと、

前記ドナーDNAの1つの鎖の前記5'末端の10ヌクレオチド以内に存在する1~10個の修飾されたヌクレオチドと、を含む二本鎖ドナーDNA分子。

(項目71)

前記ドナーDNAの1つの鎖の前記5'末端の5ヌクレオチド以内に存在する1~5個の修飾されたヌクレオチドを含む、項目70に記載の二本鎖ドナーDNA分子。

(項目72)

前記修飾されたヌクレオチドが、1~4個のホスホロチオアート(PS)結合もしくは1~4個の2'-O-メチル化修飾またはこれらの組み合わせを含む、項目70に記載の二本鎖ドナーDNA分子。

(項目73)

1つの鎖が、前記ドナーDNAの1つの鎖の前記5'末端の5ヌクレオチド以内に存在する2またはそれを超える修飾ヌクレオチドを有し、他方の鎖が末端5'ホスファートを有する、項目70に記載の二本鎖ドナーDNA分子。

(項目74)

前記関心対象の配列がキメラ抗原受容体(CAR)構築物を含む、項目70に記載の二本鎖ドナーDNA分子。

10

20

30

40

50

(項目 7 5)

前記標的部位が、T細胞受容体遺伝子、PD-1遺伝子またはTIM3遺伝子から選択される、項目70に記載の二本鎖ドナーDNA分子。

10

20

30

40

50