

【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6月19日(2023.6.19)

【公開番号】特開2023-52079(P2023-52079A)

【公開日】令和5年4月11日(2023.4.11)

【年通号数】公開公報(特許)2023-067

【出願番号】特願2022-208126(P2022-208126)

【国際特許分類】

C 12 N 5/10(2006.01)

10

C 12 N 5/074(2010.01)

C 12 N 15/11(2006.01)

C 12 N 15/12(2006.01)

C 12 N 15/09(2006.01)

C 12 N 15/38(2006.01)

C 12 N 15/31(2006.01)

C 12 N 15/55(2006.01)

A 61K 35/545(2015.01)

A 61K 31/522(2006.01)

A 61K 45/00(2006.01)

20

A 61P 43/00(2006.01)

A 61K 31/7072(2006.01)

【F I】

C 12 N 5/10

C 12 N 5/074

C 12 N 15/11 Z

C 12 N 15/12

C 12 N 15/09 110

C 12 N 15/38

30

C 12 N 15/31

C 12 N 15/55

A 61K 35/545

A 61K 31/522

A 61K 45/00

A 61P 43/00 105

A 61K 31/7072

【手続補正書】

【提出日】令和5年6月9日(2023.6.9)

【手続補正1】

40

【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】

以下を含む低免疫原性細胞：

i. 親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスI(HLA-I)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子変更、及び親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスII(HLA-II)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子変更；

50

ii. 親細胞と比較して、機能的なCD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる1つ以上の遺伝子改変；並びに、

iii. 安全スイッチ、

ここで、前記低免疫原性細胞は、膵島細胞、神経系細胞(neural cell)、神経幹細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、内皮細胞、内皮コロニー形成細胞、甲状腺細胞、網膜色素上皮細胞、又は甲状腺前駆細胞(progenitor cell)である。

【請求項2】

請求項1に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、膵島細胞である。

【請求項3】

請求項1に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経細胞(neuronal cell)である。 10

【請求項4】

請求項1に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、平滑筋細胞である。

【請求項5】

請求項1に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、心筋細胞である。

【請求項6】

請求項1に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、内皮細胞又は内皮コロニー形成細胞である。

【請求項7】

請求項1に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺細胞である。

【請求項8】

請求項1に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺前駆細胞(progenitor cell)である。

【請求項9】

請求項1に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経系細胞(neuronal cell)である。

【請求項10】

請求項1に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、網膜色素上皮細胞である。 30

【請求項11】

請求項1から10の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記安全スイッチは、以下の自殺遺伝子を含む：

i. 単純ヘルペス・ウイルス・チミジン・キナーゼ遺伝子(HSV-tk)、

ii. 大腸菌(Escherichia coli)シトシン・デアミナーゼ遺伝子(EC-CD)、又は、

iii. 誘導性カスパーゼ・タンパク質。

【請求項12】

請求項11に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記自殺遺伝子は、HSV-tkである。

【請求項13】

請求項11に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記自殺遺伝子は、EC-CDである。 40

【請求項14】

請求項11に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ・タンパク質である。

【請求項15】

請求項1から14の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、2週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項16】

請求項1から15の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、4週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。 50

【請求項 17】

請求項 1 から 16 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、6週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 18】

請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルは、その親細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルよりも、1.5倍から5倍高い。

【請求項 19】

以下を含む低免疫原性細胞：

i. 親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスI(HLA-I)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子改変、及び親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスII(HLA-II)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子改変；

ii. 親細胞と比較して、機能的なCD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる1つ以上の遺伝子改変、

ここで、前記低免疫原性細胞は、2週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、4週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 21】

請求項 19 又は 20 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、6週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 22】

請求項 19 から 21 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、臍島細胞である。

【請求項 23】

請求項 19 から 21 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経細胞(neuronal cell)である。

【請求項 24】

請求項 19 から 21 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、平滑筋細胞である。

【請求項 25】

請求項 19 から 21 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、心筋細胞である。

【請求項 26】

請求項 19 から 21 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、内皮細胞又は内皮コロニー形成細胞である。

【請求項 27】

請求項 19 から 21 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺細胞である。

【請求項 28】

請求項 19 から 21 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺前駆細胞(progenitor cell)である。

【請求項 29】

請求項 19 から 21 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経系細胞(neural cell)である。

【請求項 30】

請求項 19 から 21 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、網膜色素上皮細胞である。

【請求項 31】

10

20

30

40

50

請求項 19 から 30 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、安全スイッチを更に含む。

【請求項 32】

請求項 31 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記安全スイッチは、以下の自殺遺伝子を含む：

- i. 単純ヘルペス・ウイルス・チミジン・キナーゼ遺伝子(HSV-tk)、
- ii. 大腸菌(Escherichia coli)シトシン・デアミナーゼ遺伝子(EC-CD)、又は、
- iii. 誘導性カスパーゼ・タンパク質。

【請求項 33】

請求項 32 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記自殺遺伝子は、HSV-tkである。

10

【請求項 34】

請求項 32 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記自殺遺伝子は、EC-CDである。

【請求項 35】

請求項 32 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ・タンパク質である。

【請求項 36】

請求項 19 から 35 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルは、その親細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルよりも、1.5倍から5倍高い。

20

【請求項 37】

以下を含む低免疫原性細胞：

- i. 親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスI(HLA-I)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子改变、及び親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスII(HLA-II)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子改变；
- ii. 親細胞と比較して、機能的なCD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる1つ以上の遺伝子改变、

ここで、前記低免疫原性細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルは、その親細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルよりも、1.5倍から5倍高い。

【請求項 38】

請求項 37 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、膵島細胞である。

30

【請求項 39】

請求項 37 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経細胞(neuronal cell)である。

【請求項 40】

請求項 37 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、平滑筋細胞である。

【請求項 41】

請求項 37 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、心筋細胞である。

40

【請求項 42】

請求項 37 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、内皮細胞又は内皮コロニー形成細胞である。

【請求項 43】

請求項 37 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺細胞である。

【請求項 44】

請求項 37 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺前駆細胞(progenitor cell)である。

【請求項 45】

50

請求項 3 7 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経系細胞(neuronal cell)である。

【請求項 4 6】

請求項 3 7 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、網膜色素上皮細胞である。

【請求項 4 7】

請求項 3 7 から 4 6 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、安全スイッチを更に含む。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記安全スイッチは、以下の自殺遺伝子 10 を含む：

- i. 単純ヘルペス・ウイルス・チミジン・キナーゼ遺伝子(HSV-tk)、
- ii. 大腸菌(Escherichia coli)シトシン・デアミナーゼ遺伝子(EC-CD)、又は、
- iii. 誘導性カスパーゼ・タンパク質。

【請求項 4 9】

請求項 4 8 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記自殺遺伝子は、HSV-tkである。

【請求項 5 0】

請求項 4 8 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記自殺遺伝子は、EC-CDである。

【請求項 5 1】

請求項 4 8 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ・ 20 タンパク質である。

【請求項 5 2】

請求項 3 7 から 5 1 の何れか一項の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、 2週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 5 3】

請求項 3 7 から 5 2 の何れか一項の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、 4週間以上毎に1回、対象への治療投与に適している。

【請求項 5 4】

請求項 3 7 から 5 3 の何れか一項の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、 6週間以上毎に1回、対象への治療投与に適している。

【請求項 5 5】

請求項 1 から 5 4 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、対象に移植された場合に、拒絶反応に対して、その親細胞よりも感受性が低い。

【請求項 5 6】

請求項 1 から 5 5 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、マクロファージ貪食作用、ナチュラル・キラー(NK)細胞応答、又はその両方、に対して、その親細胞よりも感受性が低い。

【請求項 5 7】

請求項 1 から 5 6 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、多能性細胞に由来する。

【請求項 5 8】

請求項 5 7 に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記多能性細胞は、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell)(iPSC)、胚性幹細胞、胎児性幹細胞、羊膜性幹細胞、又は体性幹細胞、である。

【請求項 5 9】

請求項 1 から 5 8 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、機能的なHLA-I複合体の細胞表面発現を減少させる前記1つ以上の遺伝子改変は、親細胞と比較して、1つ以上の、HLA-I遺伝子又はHLA-I関連遺伝子、の発現を減少させる、1つ以上の遺伝子改変を含む。

【請求項 6 0】

10

30

40

50

請求項 1 から 5 9 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、機能的な HLA-I 複合体の細胞表面発現を減少させる前記1つ以上の遺伝子改変は、1つ以上の、HLA-I 遺伝子又は HLA-I 関連遺伝子、の発現をノックアウトする、1つ以上の遺伝子改変を含む。

【請求項 6 1】

請求項 1 から 6 0 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、機能的な HLA-I 複合体の細胞表面発現を減少させる前記1つ以上の遺伝子改変は、1つ以上の、HLA-I 遺伝子又は HLA-I 関連遺伝子、の両方の対立遺伝子上に存在する。

【請求項 6 2】

請求項 5 9 から 6 1 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記1つ以上の HLA-I 遺伝子は、HLA-A 遺伝子、HLA-B 遺伝子、HLA-C 遺伝子、若しくはそれらの組み合わせ、を含む、及び / 又は前記1つ以上の HLA-I 関連遺伝子は、-2 ミクログロブリン (B2M) 遺伝子を含む。

【請求項 6 3】

請求項 5 9 から 6 2 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記1つ以上の HLA-I 遺伝子は、HLA-A 遺伝子を含む。

【請求項 6 4】

請求項 5 9 から 6 3 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記1つ以上の HLA-I 遺伝子は、HLA-B 遺伝子を含む。

【請求項 6 5】

請求項 5 9 から 6 4 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記1つ以上の HLA-I 遺伝子は、HLA-C 遺伝子を含む。

【請求項 6 6】

請求項 5 9 から 6 5 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記1つ以上の HLA-I 関連遺伝子は、B2M 遺伝子を含む。

【請求項 6 7】

請求項 1 から 6 6 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、機能的な HLA-II 複合体の細胞表面発現を減少させる前記1つ以上の遺伝子改変は、親細胞と比較して、1つ以上の、HLA-II 遺伝子又は HLA-II 関連遺伝子、の発現を減少させる、1つ以上の遺伝子改変を含む。

【請求項 6 8】

請求項 1 から 6 7 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、機能的な HLA-II 複合体の細胞表面発現を減少させる前記1つ以上の遺伝子改変は、1つ以上の、HLA-II 遺伝子又は HLA-II 関連遺伝子、の発現をノックアウトする、1つ以上の遺伝子改変を含む。

【請求項 6 9】

請求項 1 から 6 8 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、機能的な HLA-II 複合体の細胞表面発現を減少させる前記1つ以上の遺伝子改変は、1つ以上の、HLA-II 遺伝子又は HLA-II 関連遺伝子、の両方の対立遺伝子上に存在する。

【請求項 7 0】

請求項 6 7 から 6 9 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記1つ以上の HLA-II 遺伝子は、HLA-DP 遺伝子、HLA-DR 遺伝子、HLA-DQ 遺伝子、若しくはそれらの組み合わせ、を含む、及び / 又は前記1つ以上の HLA-II 関連遺伝子は、CIITA 遺伝子を含む。

【請求項 7 1】

請求項 6 7 から 7 0 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記1つ以上の HLA-II 遺伝子は、HLA-DP 遺伝子を含む。

【請求項 7 2】

請求項 6 7 から 7 1 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記1つ以上の HLA-II 遺伝子は、HLA-DR 遺伝子を含む。

【請求項 7 3】

請求項 6 7 から 7 2 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記1つ以上の H

10

20

30

40

50

LA-II遺伝子は、HLA-DQ遺伝子を含む。

【請求項 7 4】

請求項 6 7 から 7 3 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記1つ以上のHLA-II関連遺伝子は、CIITA遺伝子を含む。

【請求項 7 5】

請求項 5 9 から 7 4 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、1つ以上の、HLA-I遺伝子又はHLA-I関連遺伝子、の発現は、前記1つ以上のHLA-I遺伝子によってコードされる1つ以上のタンパク質の細胞表面発現を含む。

【請求項 7 6】

請求項 6 7 から 7 5 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、1つ以上の、HLA-II遺伝子又はHLA-II関連遺伝子、の発現は、前記1つ以上のHLA-II遺伝子によってコードされる1つ以上のタンパク質の細胞表面発現を含む。 10

【請求項 7 7】

請求項 1 から 7 6 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記CD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる前記1つ以上の遺伝子改变は、内因性CD47遺伝子座に対する改变又はCD47導入遺伝子の発現、を含む。

【請求項 7 8】

請求項 1 から 7 7 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記CD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる前記1つ以上の遺伝子改变は、内因性プロモーターを、構成的プロモーター又は誘導性プロモーター、と交換するステップを含む。 20

【請求項 7 9】

請求項 1 から 7 8 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記CD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる前記1つ以上の遺伝子改变は、誘導性又は構成的プロモーターの制御下にあるCD47導入遺伝子を含む。

【請求項 8 0】

請求項 1 から 7 9 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、1つ以上の前記遺伝子改变を、ジンク・フィンガー・ヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクター・ヌクレアーゼ(TALEN)、クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドローム・リピート(CRISPR)/ヌクレアーゼ、レトロウイルス・ベクター、レンチウイルス・ベクター、アデノウイルス・ベクター、センダイ・ウイルス・ベクター、又はそれらの組み合わせ、を使用して、前記細胞に導入する。 30

【請求項 8 1】

請求項 1 から 8 0 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、ここで、前記低免疫原性細胞は、ヒトである。

【請求項 8 2】

2つ以上の、請求項 1 から 8 1 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞を含む、低免疫原性細胞の集団。

【請求項 8 3】

請求項 8 2 に記載の低免疫原性細胞の集団を含む、組成物。

【請求項 8 4】

1つ以上の、請求項 1 から 8 1 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞を含む、組成物。 40

【請求項 8 5】

以下を親細胞に導入するステップを含む、低免疫原性細胞を產生する方法：

i. 親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスI(HLA-I)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子改变、及び親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスII(HLA-II)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子改变；

ii. 親細胞と比較して、機能的なCD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる1つ以上の遺伝子改变；並びに、

iii. 安全スイッチ、

ここで、前記低免疫原性細胞は、膵島細胞、神経系細胞(neural cell)、神経幹細胞、

50

平滑筋細胞、心筋細胞、内皮細胞、内皮コロニー形成細胞、甲状腺細胞、網膜色素上皮細胞、又は甲状腺前駆細胞(progenitor cell)である。

【請求項 8 6】

請求項 8 5 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、膵島細胞である。

【請求項 8 7】

請求項 8 5 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経細胞(neuronal cell)である。

【請求項 8 8】

請求項 8 5 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、平滑筋細胞である。

【請求項 8 9】

請求項 8 5 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、心筋細胞である。

【請求項 9 0】

請求項 8 5 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、内皮細胞又は内皮コロニー形成細胞である。

【請求項 9 1】

請求項 8 5 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺細胞である。

【請求項 9 2】

請求項 8 5 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺前駆細胞(progenitor cell)である。

【請求項 9 3】

請求項 8 5 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経系細胞(neural cell)である。

【請求項 9 4】

請求項 8 5 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、網膜色素上皮細胞である。

【請求項 9 5】

請求項 8 5 から 9 4 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記安全スイッチは、以下の自殺遺伝子を含む：

- i. 単純ヘルペス・ウイルス・チミジン・キナーゼ遺伝子(HSV-tk)、
- ii. 大腸菌(Escherichia coli)シトシン・デアミナーゼ遺伝子(EC-CD)、又は、
- iii. 誘導性カスパーゼ・タンパク質。

【請求項 9 6】

請求項 9 5 に記載の方法、ここで、前記自殺遺伝子は、HSV-tkである。

【請求項 9 7】

請求項 9 5 に記載の方法、ここで、前記自殺遺伝子は、EC-CDである。

【請求項 9 8】

請求項 9 5 に記載の方法、ここで、前記自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ・タンパク質である。

【請求項 9 9】

請求項 8 5 から 9 8 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、2週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 1 0 0】

請求項 8 5 から 9 9 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、4週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 1 0 1】

請求項 8 5 から 1 0 0 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、6週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 1 0 2】

請求項 8 5 から 1 0 1 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルは、その親細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルよりも、1.5倍から5倍高い。

10

20

30

40

50

【請求項 103】

以下を親細胞に導入するステップを含む、低免疫原性細胞を產生する方法：

i. 親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスI(HLA-I)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子改変、及び親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスII(HLA-II)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子改変；

ii. 親細胞と比較して、機能的なCD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる1つ以上の遺伝子改変、

ここで、前記低免疫原性細胞は、2週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 104】

請求項103に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、4週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 105】

請求項103又は104に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、6週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 106】

請求項103から105の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、臍島細胞である。

【請求項 107】

請求項103から105の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経細胞(neuronal cell)である。

【請求項 108】

請求項103から105の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、平滑筋細胞である。

【請求項 109】

請求項103から105の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、心筋細胞である。

【請求項 110】

請求項103から105の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、内皮細胞又は内皮コロニー形成細胞である。

【請求項 111】

請求項103から105の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺細胞である。

【請求項 112】

請求項103から105の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺前駆細胞(progenitor cell)である。

【請求項 113】

請求項103から105の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経系細胞(neural cell)である。

【請求項 114】

請求項103から105の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、網膜色素上皮細胞である。

【請求項 115】

請求項103から114の何れか一項に記載の方法、ここで、前記方法は、安全スイッチを前記親細胞に導入するステップを更に含む。

【請求項 116】

請求項115に記載の方法、ここで、前記安全スイッチは、以下の自殺遺伝子を含む：

i. 単純ヘルペス・ウイルス・チミジン・キナーゼ遺伝子(HSV-tk)、

ii. 大腸菌(Escherichia coli)シトシン・デアミナーゼ遺伝子(EC-CD)、又は、

iii. 誘導性カスパーゼ・タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 7】

請求項 1 1 6 に記載の方法、ここで、前記自殺遺伝子は、HSV-tkである。

【請求項 1 1 8】

請求項 1 1 6 に記載の方法、ここで、前記自殺遺伝子は、EC-CDである。

【請求項 1 1 9】

請求項 1 1 6 に記載の方法、ここで、前記自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ・タンパク質である。

【請求項 1 2 0】

請求項 1 0 3 から 1 1 9 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルは、その親細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルよりも、1.5倍から5倍高い。10

【請求項 1 2 1】

以下を親細胞に導入するステップを含む、低免疫原性細胞を產生する方法：

i. 親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスI(HLA-I)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子改変、及び親細胞と比較して、機能的な主要組織適合抗原クラスII(HLA-II)複合体の細胞表面発現を減少させる1つ以上の遺伝子改変；

ii. 親細胞と比較して、機能的なCD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる1つ以上の遺伝子改変、

ここで、前記低免疫原性細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルは、その親細胞の表面上に発現するCD47タンパク質のレベルよりも、1.5倍から5倍高い。20

【請求項 1 2 2】

請求項 1 2 1 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、膵島細胞である。

【請求項 1 2 3】

請求項 1 2 1 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経細胞(neuronal cell)である。

【請求項 1 2 4】

請求項 1 2 1 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、平滑筋細胞である。

【請求項 1 2 5】

請求項 1 2 1 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、心筋細胞である。

【請求項 1 2 6】

請求項 1 2 1 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、内皮細胞又は内皮コロニー形成細胞である。30

【請求項 1 2 7】

請求項 1 2 1 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺細胞である。

【請求項 1 2 8】

請求項 1 2 1 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、甲状腺前駆細胞(progenitor cell)である。

【請求項 1 2 9】

請求項 1 2 1 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、神経系細胞(neural cell)である。40

【請求項 1 3 0】

請求項 1 2 1 に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、網膜色素上皮細胞である。

【請求項 1 3 1】

請求項 1 2 1 から 1 3 0 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記方法は、安全スイッチを前記親細胞に導入するステップを更に含む。

【請求項 1 3 2】

請求項 1 3 1 に記載の方法、ここで、前記安全スイッチは、以下の自殺遺伝子を含む：

i. 単純ヘルペス・ウイルス・チミジン・キナーゼ遺伝子(HSV-tk)、

ii. 大腸菌(Escherichia coli)シトシン・デアミナーゼ遺伝子(EC-CD)、又は、

50

iii. 誘導性カスパーゼ・タンパク質。

【請求項 133】

請求項 132 に記載の方法、ここで、前記自殺遺伝子は、HSV-tk である。

【請求項 134】

請求項 132 に記載の方法、ここで、前記自殺遺伝子は、EC-CD である。

【請求項 135】

請求項 132 に記載の方法、ここで、前記自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ・タンパク質である。

【請求項 136】

請求項 121 から 135 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、
10
2週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 137】

請求項 121 から 136 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、
4週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 138】

請求項 121 から 137 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、
6週間以上毎に1回、対象への治療的投与をすることに適している。

【請求項 139】

請求項 85 から 138 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、対
象に移植された場合に、拒絶反応に対して、その親細胞よりも感受性が低い。

【請求項 140】

請求項 85 から 139 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、マ
クロファージ貪食作用、ナチュラル・キラー(NK)細胞応答、又はその両方、に対して、
その親細胞よりも感受性が低い。

【請求項 141】

請求項 85 から 140 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、多
能性細胞に由来する。

【請求項 142】

請求項 141 に記載の方法、ここで、前記多能性細胞は、人工多能性幹細胞(induced
30
pluripotent stem cell)(iPSC)、胚性幹細胞、胎児性幹細胞、羊膜性幹細胞、又は体
性幹細胞、である。

【請求項 143】

請求項 85 から 142 の何れか一項に記載の方法、ここで、機能的な HLA-I 複合体の
細胞表面発現を減少させる前記 1 つ以上の遺伝子変更を導入するステップは、親細胞と比
較して、1 つ以上の、HLA-I 遺伝子又は HLA-I 関連遺伝子、の発現を減少させる、1 つ以
上の遺伝子変更を導入するステップを含む。

【請求項 144】

請求項 85 から 143 の何れか一項に記載の方法、ここで、機能的な HLA-I 複合体の
細胞表面発現を減少させる前記 1 つ以上の遺伝子変更を導入するステップは、1 つ以
上の、HLA-I 遺伝子又は HLA-I 関連遺伝子、の発現をノックアウトする、1 つ以上の遺伝子改
変を導入するステップを含む。

【請求項 145】

請求項 85 から 144 の何れか一項に記載の方法、ここで、機能的な HLA-I 複合体の
細胞表面発現を減少させる前記 1 つ以上の遺伝子変更を導入する部位は、1 つ以上の、HL
A-I 遺伝子又は HLA-I 関連遺伝子、の両方の対立遺伝子上に存在する。

【請求項 146】

請求項 143 から 145 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記 1 つ以上の HLA-I 遺
伝子は、HLA-A 遺伝子、HLA-B 遺伝子、HLA-C 遺伝子、若しくはそれらの組み合わせ、
を含む、及び / 又は前記 1 つ以上の HLA-I 関連遺伝子は、-2 ミクログロブリン(B2M)
遺伝子を含む。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4 7】

請求項 1 4 3 から 1 4 6 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記1つ以上のHLA-I遺伝子は、HLA-A遺伝子を含む。

【請求項 1 4 8】

請求項 1 4 3 から 1 4 7 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記1つ以上のHLA-I遺伝子は、HLA-B遺伝子を含む。

【請求項 1 4 9】

請求項 1 4 3 から 1 4 8 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記1つ以上のHLA-I遺伝子は、HLA-C遺伝子を含む。

【請求項 1 5 0】

請求項 1 4 3 から 1 4 9 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記1つ以上のHLA-I関連遺伝子は、B2M遺伝子を含む。

【請求項 1 5 1】

請求項 8 5 から 1 5 0 の何れか一項に記載の方法、ここで、機能的なHLA-II複合体の細胞表面発現を減少させる前記1つ以上の遺伝子改変を導入するステップは、親細胞と比較して、1つ以上の、HLA-II遺伝子又はHLA-II関連遺伝子、の発現を減少させる、1つ以上の遺伝子改変を導入するステップを含む。

【請求項 1 5 2】

請求項 8 5 から 1 5 1 の何れか一項に記載の方法、ここで、機能的なHLA-II複合体の細胞表面発現を減少させる前記1つ以上の遺伝子改変を導入するステップは、1つ以上の、HLA-II遺伝子又はHLA-II関連遺伝子、の発現をノックアウトする、1つ以上の遺伝子改変を導入するステップを含む。

【請求項 1 5 3】

請求項 8 5 から 1 5 2 の何れか一項に記載の方法、ここで、機能的なHLA-II複合体の細胞表面発現を減少させる前記1つ以上の遺伝子改変を導入する部位は、前記1つ以上の、HLA-II遺伝子又はHLA-II関連遺伝子、の両方の対立遺伝子上に存在する。

【請求項 1 5 4】

請求項 1 5 1 から 1 5 3 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記1つ以上のHLA-II遺伝子は、HLA-DP遺伝子、HLA-DR遺伝子、HLA-DQ遺伝子、若しくはそれらの組み合わせ、を含む、及び／又は前記1つ以上のHLA-II関連遺伝子は、CIITA遺伝子を含む。

【請求項 1 5 5】

請求項 1 5 1 から 1 5 4 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記1つ以上のHLA-II遺伝子は、HLA-DP遺伝子を含む。

【請求項 1 5 6】

請求項 1 5 1 から 1 5 5 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記1つ以上のHLA-II遺伝子は、HLA-DR遺伝子を含む。

【請求項 1 5 7】

請求項 1 5 1 から 1 5 6 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記1つ以上のHLA-II遺伝子は、HLA-DQ遺伝子を含む。

【請求項 1 5 8】

請求項 1 5 1 から 1 5 7 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記1つ以上のHLA-II関連遺伝子は、CIITA遺伝子を含む。

【請求項 1 5 9】

請求項 1 4 3 から 1 5 8 の何れか一項に記載の方法、ここで、1つ以上の、HLA-I遺伝子又はHLA-I関連遺伝子、の発現は、前記1つ以上のHLA-I遺伝子によってコードされる1つ以上のタンパク質の細胞表面発現を含む。

【請求項 1 6 0】

請求項 1 5 1 から 1 5 9 の何れか一項に記載の方法、ここで、1つ以上の、HLA-II遺伝子又はHLA-II関連遺伝子、の発現は、前記1つ以上のHLA-II遺伝子によってコードされる1つ以上のタンパク質の細胞表面発現を含む。

10

20

30

40

50

【請求項 161】

請求項 85 から 160 の何れか一項に記載の方法、ここで、CD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる前記1つ以上の遺伝子改変を導入するステップは、内因性CD47遺伝子座に対する改変又はCD47導入遺伝子の発現、を導入するステップを含む。

【請求項 162】

請求項 85 から 161 の何れか一項に記載の方法、ここで、CD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる前記1つ以上の遺伝子改変を導入するステップは、内因性プロモーターを、構成的プロモーター又は誘導性プロモーター、と交換するステップを含む。

【請求項 163】

請求項 85 から 162 の何れか一項に記載の方法、ここで、CD47タンパク質の細胞表面発現を増大させる前記1つ以上の遺伝子改変を導入するステップは、誘導性又は構成的プロモーターの制御下にあるCD47導入遺伝子を導入するステップを含む。 10

【請求項 164】

請求項 85 から 163 の何れか一項に記載の方法、ここで、1つ以上の前記遺伝子改変を、ジンク・フィンガー・スクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクター・スクレアーゼ(TALEN)、クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドローム・リピート(CRISPR)/スクレアーゼ、レトロウイルス・ベクター、レンチウイルス・ベクター、アデノウイルス・ベクター、センダイ・ウイルス・ベクター、又はそれらの組み合わせ、を使用して、前記細胞に導入する。

【請求項 165】

請求項 85 から 164 の何れか一項に記載の方法、ここで、前記低免疫原性細胞は、ヒトである。 20

【請求項 166】

対象に移植するステップを含む使用のための医薬組成物、ここで、前記医薬組成物は、1つ以上の請求項 1 から 81 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、及び / 又は請求項 82 に記載の低免疫原性細胞の集団、を含む。

【請求項 167】

請求項 166 に記載の医薬組成物、ここで、前記使用は、細胞療法の使用である。

【請求項 168】

請求項 166 に記載の医薬組成物、ここで、前記使用は、前記対象の、肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓、脳、神経組織、血液、骨、又は骨髄の、疾患又は障害を治療する使用である。 30

【請求項 169】

請求項 166 に記載の医薬組成物、ここで、前記使用は、眼の疾患を治療する使用である。

【請求項 170】

請求項 166 に記載の医薬組成物、ここで、前記使用は、心血管疾患又は末梢動脈疾患を治療する使用である。

【請求項 171】

請求項 166 に記載の医薬組成物、ここで、前記使用は、糖尿病を治療する使用である。 40

【請求項 172】

請求項 166 に記載の医薬組成物、ここで、前記使用は、肝細胞機能の喪失又は肝臓の肝硬変を治療する使用である。

【請求項 173】

請求項 166 に記載の医薬組成物、ここで、前記使用は、自己免疫性甲状腺炎を治療する使用である。

【請求項 174】

請求項 166 から 173 の何れか一項に記載の医薬組成物、ここで、前記組成物中の、前記低免疫原性細胞又は前記1つ以上の低免疫原性細胞は、安全スイッチを含む。 50

【請求項 175】

請求項174に記載の医薬組成物、ここで、前記使用は、前記安全スイッチを活性化するステップを含む。

【請求項 176】

請求項174又は175に記載の医薬組成物、ここで、前記安全スイッチは、以下の自殺遺伝子を含む：

- i. HSV-tk、
- ii. EC-CD、又は、
- iii. 誘導性カスパーゼ・タンパク質。

【請求項 177】

請求項176に記載の医薬組成物、ここで、前記使用は、前記対象に引き金を投与するステップを更に含む。

10

【請求項 178】

請求項177に記載の医薬組成物、ここで：

- i. 前記自殺遺伝子は、HSV-tkである、及び前記引き金は、ガンシクロビルである、
- ii. 前記自殺遺伝子は、EC-CDである、及び前記引き金は、5-フルオロシトシン(5-F C)である、又は、
- iii. 前記自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ・タンパク質である、及び前記引き金は、二量体化への化学誘導剤(CID)である。

【請求項 179】

請求項166から178の何れか一項に記載の医薬組成物、ここで、前記医薬組成物として、前記低免疫原性細胞又は前記1つ以上の低免疫原性細胞、を対象に移植するステップは、2回以上、前記医薬組成物として、前記低免疫原性細胞又は前記1つ以上の低免疫原性細胞、を移植するステップを含む。

20

【請求項 180】

請求項179に記載の医薬組成物、ここで、2回以上、前記医薬組成物として、前記低免疫原性細胞又は前記1つ以上の低免疫原性細胞、を移植するステップは、2週間以上毎に1回、前記医薬組成物として、前記低免疫原性細胞又は前記1つ以上の低免疫原性細胞、を移植するステップを含む。

30

【請求項 181】

請求項179に記載の医薬組成物、ここで、2回以上、前記医薬組成物として、前記低免疫原性細胞又は前記1つ以上の低免疫原性細胞、を移植するステップは、4週間以上毎に1回、前記医薬組成物として、前記低免疫原性細胞又は前記1つ以上の低免疫原性細胞、を移植するステップを含む。

【請求項 182】

請求項179に記載の医薬組成物、ここで、2回以上、前記医薬組成物として、前記低免疫原性細胞又は前記1つ以上の低免疫原性細胞、を移植するステップは、6週間以上毎に1回、前記医薬組成物として、前記低免疫原性細胞又は前記1つ以上の低免疫原性細胞、を移植するステップを含む。

40

【請求項 183】

1つ以上の低免疫原性細胞を含む医薬組成物、ここで、前記1つ以上の低免疫原性細胞は、安全スイッチを活性化するステップを含む方法によって、対象において、除去することができる。

ここで、前記1つ以上の低免疫原性細胞は、請求項1から81の何れか一項に記載の低免疫原性細胞である、及び

ここで、前記1つ以上の低免疫原性細胞は、前記安全スイッチを含む。

【請求項 184】

請求項183に記載の医薬組成物、ここで、前記安全スイッチは、以下の自殺遺伝子を含む：

- i. HSV-tk、

50

- ii. EC-CD、又は、
- iii. 誘導性カスパーゼ・タンパク質。

【請求項 185】

請求項 183 又は 184 に記載の医薬組成物、ここで、前記方法は、前記対象に引き金を投与するステップを含む。

【請求項 186】

請求項 185 に記載の医薬組成物、ここで、前記安全スイッチは、自殺遺伝子を含む、並びに、ここで：

- i. 前記自殺遺伝子は、HSV-tk である、及び前記引き金は、ガンシクロビルである、
- ii. 前記自殺遺伝子は、EC-CD である、及び前記引き金は、5-フルオロシトシン(5-F C) である、又は、
- iii. 前記自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ・タンパク質である、及び前記引き金は、二量体化への化学誘導剤 (CID) である。

【請求項 187】

1つ以上の、請求項 1 から 81 の何れか一項に記載の低免疫原性細胞、を含む医薬組成物、ここで、その1つ以上の低免疫原性細胞は、前記安全スイッチを活性化するステップを含む方法によって、除去することができる。

【請求項 188】

請求項 187 に記載の医薬組成物、ここで、前記安全スイッチは、以下の自殺遺伝子を含む：

- i. HSV-tk、
- ii. EC-CD、又は、
- iii. 誘導性カスパーゼ・タンパク質。

【請求項 189】

請求項 187 又は 188 に記載の医薬組成物、ここで、前記方法は、対象に引き金を投与するステップを含む。

【請求項 190】

請求項 189 に記載の医薬組成物、ここで、前記安全スイッチは、自殺遺伝子を含む、並びに、ここで：

- i. 前記自殺遺伝子は、HSV-tk である、及び前記引き金は、ガンシクロビルである、
- ii. 前記自殺遺伝子は、EC-CD である、及び前記引き金は、5-フルオロシトシン(5-F C) である、又は、
- iii. 前記自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ・タンパク質である、及び前記引き金は、二量体化への化学誘導剤 (CID) である。

20

30

40

50