

【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 2 年 11 月 12 日 (2020.11.12)

【公表番号】特表 2019-532672 (P2019-532672A)

【公表日】令和 1 年 11 月 14 日 (2019.11.14)

【年通号数】公開・登録公報 2019-046

【出願番号】特願 2019-538110 (P2019-538110)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/87 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/87 Z N A Z

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 5/10

C 1 2 M 1/00 A

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 9 月 18 日 (2020.9.18)

【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

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞処理の方法であって：

複数の細孔を含む膜の 1 つ以上の細孔に複数の細胞を通過させると共に、前記細胞を薬剤に暴露して、前記細胞内に変化を引き起こし、それにより前記薬剤を前記細胞の少なくとも 1 つに進入させることを含み；

前記細孔の各々は、入口開口部から出口開口部に延び、約 7 ミクロン～約 9 ミクロンの範囲内の最大断面寸法を有する、方法。

【請求項 2】

前記最大断面寸法が約 8 ミクロン～約 9 ミクロンの範囲内、場合により最大断面寸法が約 7 ミクロン、場合により最大断面寸法が約 8 ミクロン、場合により最大断面寸法が約 9 ミクロンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の方法であって、

前記細胞が循環細胞であり、

場合により前記循環細胞が、C D 3 4 + 細胞、前駆細胞、誘導多能性幹細胞 (i P S C)、造血性幹細胞及び前駆細胞 (H S P C)、免疫エフェクター細胞、C D 3 + 細胞、並びに T 細胞及び N K 細胞からなる群から選択され、

場合により前記循環細胞が、キメラ抗原受容体を発現するように操作される、方法。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記細孔が、約 7 ミクロン～約 10 ミクロンの範囲内の長さを有し、

場合により前記細孔が、約 18 ミクロン～約 21 ミクロンの範囲内の長さを有する、方法。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記膜が、約  $7 \text{ mm}^2$  ~ 約  $80 \text{ mm}^2$  の範囲内の活性表面積を有する、方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記膜が、約  $1 \times 10^5$  ~ 約  $2 \times 10^6$  細孔 /  $\text{cm}^2$  の範囲内の表面細孔密度を有する、方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記細胞及び前記薬剤が液体担体中に配置され、前記液体担体が、前記液体担体に印加される圧力によって前記細孔を通して押され、

場合により前記液体担体中の前記細胞の濃度が、約 10,000 ~ 約 200,000 細胞 / マイクロリットルの範囲内であり、

場合により前記細胞の前記濃度が約 50,000 ~ 約 200,000 細胞 / マイクロリットルの範囲内であり、

場合により前記細胞の前記濃度が約 100,000 ~ 約 200,000 細胞 / マイクロリットルの範囲内であり、

場合により前記細胞の前記濃度が約 150,000 ~ 約 200,000 細胞 / マイクロリットルの範囲内である、方法。

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法であって、

前記液体担体に印加される前記圧力が、前記細胞が前記細孔を少なくとも約 10 ~ 約 20 ml (ミリリットル) / 分の流速で通過するような圧力であり、

場合により前記液体担体に印加される前記圧力が、約 5 psi ~ 約 20 psi の範囲内である、方法。

## 【請求項 9】

請求項 7 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記液体担体が、水、基本細胞培養培地、血清フリー培地、HSC ブリュウ、1 つ以上のサイトカイン、1 つ以上の増殖因子、1 つ以上の生存率向上剤、ポリエチレングリコール (PEG)、洗剤、膜安定剤及びそれらの組み合わせのいずれかを含み、場合により前記 1 つ以上の生存率向上剤が、UM171、SR1、((S)-2-(6-(2-(1H-インドール-3-イル)エチルアミノ)-2-(5-フルオロピリジン-3-イル)-9H-プリン-9-イル)プロパン-1-オール、及びそれらの組み合わせのいずれかであり、

場合により前記 1 つ以上のサイトカインが、トロンボポエチン (TPO)、Flt3 リガンド (Flt-3L)、幹細胞因子 (SCF)、インターロイキン-6 (IL-6)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、方法。

## 【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記膜の前記細孔が、少なくとも部分的にポリビニルピロリドンで被覆されている、方法。

## 【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記薬剤が、デオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA)、プラスミド、リボ核タンパク質複合体 (RNP)、タンパク質、ペプチド、脂質、多糖、オリゴ糖、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー、ナノ粒子、色素、膜非透過性化合物、及びそれらの組み合わせのいずれかを含む、方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記薬剤が遺伝子編集システムであり、

前記遺伝子編集システムが、場合により、C R I S P R 遺伝子編集システム、Z F N 遺伝子編集システム、T A L E N 遺伝子編集システム、メガヌクレアーゼ遺伝子編集システム又はC r eリコンビナーゼ遺伝子編集システムであり、

前記C R I S P R 遺伝子編集システムが、場合により1つ以上のR N Pを含み、  
場合により前記R N PがC a s 9 - g R N A 複合体である、方法。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか一項に記載の方法であって、

前記薬剤が、約2 k D aを超える、場合により約2 k D a～約100 k D aの範囲内の分子量を有する、方法。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか一項に記載の方法であって、

前記膜が高分子材料を含み、

場合により前記高分子材料が、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン(P T F E)、ポリスチレン、ポリフッ化ビニリデン(P V D F)、ポリエチレンテレフタレート(P E T)、ポリメチルメタクリレート(P M M A)、ポリプロピレン(P P)、ポリイミド(P I)、環状オレフィンコポリマー(C O C)、シクロオレフィンポリマー(C O P)、ポリエステル及びポリジメチルシロキサン(P D M S)からなる群から選択される、方法。

【請求項15】

請求項1～14のいずれか一項に記載の方法であって、

前記膜が半導体、セラミック又は金属のいずれかを含む、方法。

【請求項16】

請求項1～15のいずれか一項に記載の方法であって、

前記細孔が、前記細孔の各々の長さに沿って実質的に均一の断面積を有し、

場合により前記細孔が実質的に円筒状である、方法。

【請求項17】

請求項1～15のいずれか一項に記載の方法であって、

前記細孔が規則的な又は不規則な断面形状を有し、

場合により前記規則的な断面形状が、円形、長円形及び多角形状のいずれかであり、

場合により前記多角形状が、正方形、矩形、六角形及び八角形状からなる群から選択される、方法。

【請求項18】

請求項1～17のいずれか一項に記載の方法であって、

前記細胞を前記膜に通過させることの前に、不均一細胞の収集物から前記細胞を選択することを更に含み、

場合により前記選択された細胞が、C D 3 4 +、造血性幹細胞、造血性前駆細胞、造血性幹細胞及び前駆細胞(H S P C)、免疫エフェクター細胞、C D 3 +細胞、T細胞並びにN K細胞からなる群から選択され、

場合により前記選択された細胞が、キメラ抗原受容体(C A R)を発現するように操作される、方法。

【請求項19】

請求項1～18のいずれか一項に記載の方法であって、

前記細胞の少なくとも約40%が、前記1つ以上の細孔を通過することによって前記薬剤を取り込み、

場合により前記細胞の少なくとも約50%が、前記1つ以上の細孔を通過することによって前記薬剤を取り込み、

場合により前記細胞の少なくとも約60%が、前記1つ以上の細孔を通過することによって前記薬剤を取り込み、

場合により前記細胞の少なくとも約70%が、前記1つ以上の細孔を通過することによって前記薬剤を取り込み、

場合により前記細胞の少なくとも約 80 % が、前記 1 つ以上の細孔を通過することによって前記薬剤を取り込み、

場合により前記細胞の少なくとも約 90 % が、前記 1 つ以上の細孔を通過することによって前記薬剤を取り込む、方法。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記細胞が、約 50 % を超える細胞生存率で前記薬剤を取り込み、

場合により前記細胞が、約 60 % を超える細胞生存率で前記薬剤を取り込み、

場合により前記細胞が、約 70 % を超える細胞生存率で前記薬剤を取り込み、

場合により前記細胞が、約 80 % を超える細胞生存率で前記薬剤を取り込み、

場合により前記細胞が、約 90 % を超える細胞生存率で前記薬剤を取り込む、方法。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記膜が、前記細孔の最大長さと実質的に等しい最大厚さを有する、方法。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記細孔が実質的に均一の長さを有し、前記膜が、前記長さと実質的に等しい厚さを有する、方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記薬剤が、デオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA)、プラスミド、リボ核タンパク質複合体 (RNP)、タンパク質、ペプチド、脂質、多糖、オリゴ糖、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー、ナノ粒子、色素、膜非透過性化合物、膜不透過性小分子、及びそれらの組み合わせのいずれかを含み、

場合により前記薬剤が、50 グラム / リットルまでの濃度を有する、方法。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の細胞処理の方法からなる、治療のための細胞を作る方法。

【請求項 25】

治療のための細胞処理の方法であって：

複数の細孔を含む膜の 1 つ以上の細孔に複数の細胞を通過させると共に、前記細胞を薬剤に暴露して、前記細胞内に変化を引き起こし、それにより前記薬剤を前記細胞の少なくとも 1 つに進入させることを含み；

前記細孔の各々は、入口開口部から出口開口部に延び、約 7 ミクロン ~ 約 9 ミクロンの範囲内の最大断面寸法を有し、

前記遺伝子編集複合体は、遺伝子療法で使用するために、少なくとも 1 つの細胞を改変するように構成される、方法。

【請求項 26】

請求項 25 の方法であって、

前記遺伝子編集複合体は、CRISPR 遺伝子編集複合体を含み、

場合により前記 CRISPR 遺伝子編集複合体は、少なくとも 1 つの RNA 複合体を含み、

場合により前記 RNA 複合体は、Cas9 - gRNA 複合体である、方法。

【請求項 27】

請求項 25 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記細胞が、造血性幹細胞及び前駆細胞 (HSPC) を含み、

場合により前記造血性幹細胞及び前駆細胞が、CD34+細胞を含む、方法。

【請求項 28】

請求項 25 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記遺伝子編集複合体が、前記細胞の遺伝子修正を達成するように構成される、方法。

## 【請求項 29】

請求項 25 ～ 28 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記細胞を収集することを含み、

場合により収集した前記細胞を凍結保存することを更に含む、方法。