

【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3年3月18日(2021.3.18)

【公開番号】特開2020-191901(P2020-191901A)

【公開日】令和2年12月3日(2020.12.3)

【年通号数】公開・登録公報2020-049

【出願番号】特願2020-141042(P2020-141042)

【国際特許分類】

C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 1 2 N	15/13	(2006.01)
C 1 2 N	15/62	(2006.01)
C 1 2 N	15/63	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63	Z

【手続補正書】

【提出日】令和3年2月1日(2021.2.1)

【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】

初代Tリンパ球に核酸を導入する方法であって、

(i) 該初代Tリンパ球を自然免疫系の阻害薬である化合物と接触させること、該化合物は、ピセタノール、ゲフィチニブ、Z-VAD-FMK、グリベンクラミド、Peplin h-MyD、OxPAPC、CLL-095、ポリミキシンB、H-89、クロロキン、又はバフィロマイシンA1であり；及び

(ii) 該初代Tリンパ球を該核酸を含むレンチウイルスベクターと接触させることを含み、

該初代Tリンパ球と該化合物との接触が、該初代Tリンパ球とレンチウイルスベクターとの接触の前に行われ；かつ、これにより該核酸が該初代Tリンパ球中へと導入される、前記方法。

【請求項2】

前記初代Tリンパ球は、ヒト初代Tリンパ球である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

該初代Tリンパ球と前記化合物との接触が、前記初代Tリンパ球と前記ウイルスベクターとの接触の3時間前に行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記レンチウイルスベクターは、1.5～2.5の感染効率(MOI)で前記初代Tリンパ球と接触する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記核酸が、(i) 長さ 10 キロベース (k b) よりも長く；(ii) 長さ 9 k b ~ 長さ 20 k b であり；及び/又は(iii) キメラ抗原受容体をコードする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記核酸がキメラ抗原受容体をコードする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

さらに、前記初代 T リンパ球が、前記レンチウイルスベクターと接触する前に、前記初代 T リンパ球を、T 細胞受容体複合体を刺激することのできる作用因子と接触させることを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記作用因子が、抗体または抗原結合フラグメントであり、任意に該抗体または抗原結合フラグメントが C D 3 及び / または C D 2 8 へ特異的に結合する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記初代 T リンパ球を前記レンチウイルスベクターと接触させる前に、前記作用因子を前記初代 T リンパ球と 24 時間接触させる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

さらに、前記レンチウイルスベクターと接触させると同時に、及び/又はその後に、前記初代 T リンパ球を前記化合物と接触させることを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記初代 T リンパ球を前記レンチウイルスベクター及び前記化合物と接触させることを、少なくとも 6 時間同時に行う、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

さらに、前記初代 T リンパ球を形質転換試薬及びサイトカインと接触させることを含み、任意に(i) 該形質転換試薬がジエチルアミノエチル - デキストラン、又はプロタミンスルファートであり、及び/又は(ii) 前記サイトカインが、インターロイキン 2 (IL - 2) である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記初代 T リンパ球がヒト初代 T リンパ球であり、前記形質転換試薬が、ジエチルアミノエチル - デキストランであり、かつ前記核酸がキメラ抗原受容体をコードする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記初代 T リンパ球がヒト初代 T リンパ球であり、前記形質転換試薬がプロタミンスルファートであり、かつ前記核酸がキメラ抗原受容体をコードする、請求項 12 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

本明細書に説明する方法の一実施形態において、細胞（例えば、初代ヒト T リンパ球）は、ベクター、例えば、ウイルスベクターを用いた導入（例えば、レトロウイルス導入、例えば、レンチウイルス導入）の前に、当該導入と同時に、または当該導入の後に、本明細書に説明する化合物（例えば、B X 7 9 5 または 2 - A P ）と接触させられる。別の実施形態において、細胞（例えば、初代ヒト T リンパ球）は、ウイルスベクターによる導入（例えば、レトロウイルス導入、例えば、レンチウイルス導入）の前に 30 分間、60 分間、2 時間または 3 時間、本明細書に説明する化合物（例えば、B X 7 9 5 または 2 - A

P)と接触させられる。別の実施形態において、細胞(例えば、初代ヒトTリンパ球)は、ウイルスベクターによる導入(例えば、レトロウイルス導入、例えば、レンチウイルス導入)と同時に、かつその後2時間、4時間、または6時間、本明細書に説明する化合物(例えば、BX795または2-AP)と接触させられる。別の実施形態において、細胞(例えば、初代ヒトTリンパ球)は、ウイルスベクターによる導入(例えば、レトロウイルス導入、例えば、レンチウイルス導入)の前に30分間、60分間、2時間または3時間、かつ導入(例えば、レトロウイルス導入、例えば、レンチウイルス導入)と同時にその後2時間、4時間または6時間、本明細書に説明する化合物(例えば、BX795 2-AP)と接触させられる。具体的な実施形態において、本明細書に説明する当該化合物(例えば、BX795または2-AP)は、それぞれ1～20μMまたはmMの濃度で使用する。別の実施形態において、本明細書に説明する当該化合物(例えば、BX795または2-AP)は、それぞれ2.5～10μMまたはmMの濃度で使用する。さらに別の実施形態において、本明細書に説明する当該化合物(例えば、BX795または2-AP)は、それぞれ4～8μMまたはmMの濃度で使用する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

別の具体的な実施形態において、当該化合物は、IKKキナーゼ(IKK)またはTANK結合キナーゼ1(TBK1)の活性を阻害する。別の具体的な実施形態において、IKKキナーゼ(IKK)またはTANK結合キナーゼ1(TBK1)の活性を阻害する当該化合物は、BX795(例えば、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μMまたは10μMのBX795)である。別の具体的な実施形態において、当該化合物は、プロテインキナーゼR(PKR)の活性を阻害する。別の具体的な実施形態において、プロテインキナーゼR(PKR)の活性を阻害する当該化合物は、2-アミノプリン(2-AP)(例えば、1mM、2mM、2.5mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mMまたは10mMの2-AP)である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

別の具体的な実施形態において、本明細書に提供するのは、ヒト初代Tリンパ球を、ジエチルアミノエチル-デキストランまたはプロタミンスルファート及びインターロイキン2の存在下で、i)キメラ抗原受容体をコードする核酸を含むレトロウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクター、及びii)2-AP(例えば、2.5～10mMの2-AP)と接触させ、それにより核酸をTリンパ球中へと導入することを含む、初代Tリンパ球(例えば、ヒト初代Tリンパ球)の導入方法である。具体的な実施形態において、当該初代Tリンパ球を2-APと当該接触させることは、当該Tリンパ球を当該ウイルスベクターと接触させることの前に(例えば、90分前、2時間前、または3時間前に)及び/または同時に生じる。別の具体的な実施形態において、当該ベクターは、1つ以上のキメラ抗原受容体をコードする核酸を含む。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】**【0018】**

別の具体的な実施形態において、本明細書に提供するのは、ヒト初代Tリンパ球を、ジエチルアミノエチル-デキストランまたはプロタミンスルファート及びインターロイキン2の存在下で、i) キメラ抗原受容体をコードする核酸を含むレトロウイルスペクター、例えば、レンチウイルスペクター、及びii) 2.5~10mMの2-APを含む、初代Tリンパ球(例えば、ヒト初代Tリンパ球)の導入方法であり、この中で、ヒト初代Tリンパ球を2.5~10mMの2-APと接触させることは、90分間生じ、それに次いで、ヒト初代Tリンパ球をウイルスペクター及び2.5~10mMの2-APと同時に5時間接触させ、それにより核酸はTリンパ球中へと導入される。別の具体的な実施形態において、当該ベクターは、1つ以上のキメラ抗原受容体をコードする核酸を含む。

【手続補正6】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0022****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0022】**

【図4】図4A及び図4Bは、2-APの非存在下での(図4A)または増大する濃度の2-APの存在下での(2.5mM、5mMまたは10mMの濃度における図4B)レンチウイルス導入効率を示す。

【手続補正7】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0036****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0036】**

本明細書に説明する方法の具体的な実施形態において、Tリンパ球(例えば、初代ヒトTリンパ球)の導入(例えば、レトロウイルス導入、例えば、レンチウイルス導入)は、0.5mM、1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mMまたはそれより高い濃度の2-APを用いた処理の際に亢進することができる。本明細書に説明する方法の別の具体的な実施形態において、Tリンパ球(例えば、初代ヒトTリンパ球)の導入(例えば、レトロウイルス導入、例えば、レンチウイルス導入)は、0.5mM~1mM、1mM~3mM、2mM~4mM、3mM~5mM、4mM~6mM、5mM~7mM、6mM~8mM、7mM~9mM、8mM~10mM、9mM~11mM、10mM~12mM、11mM~13mM、12mM~14mMまたは13mM~15mMの濃度の2-APを用いた処理の際に亢進することができる。

【手続補正8】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0042****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0042】**

本明細書に説明する方法の具体的な実施形態において、初代ヒトTリンパ球は、抗CD3抗体及び/または抗CD28抗体、あるいはこれらの抗原結合フラグメント(複数可)を用いて、50U/mLのIL-2及び10μg/mLのDEAE-デキストランの存在下で、24時間刺激され、それに次いで、当該リンパ球の2-APを用いた5時間の処理、それに次いで、当該リンパ球のレンチウイルス導入が続き、この中で、当該ウイルスは、1.8の感染効率(MOI)にあり、かつこの中で、当該ヒトTリンパ球は、レンチウイルスの添加と同時に2.5~10mMの2-APを用いてさらに5時間処理される。

【手続補正9】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0044**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0044】**

本明細書に説明する方法の具体的な実施形態において、初代ヒトリンパ球は、50U / m1のIL-2及び10μg / m1のプロタミンスルファートの存在下で、抗CD3抗体及び/または抗CD28抗体あるいはこれらの抗原結合フラグメント（複数可）を用いて24時間刺激され、それに次いで、当該リンパ球の5時間の処理、それに次いで、当該リンパ球のレンチウイルス導入が続き、この内で、当該ウイルスは、1.8の感染効率（MOI）にあり、かつこの内で、当該ヒトリンパ球は、レンチウイルスの添加と同時に2.5~10mMの2-APを用いてさらに5時間処理される。