

【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7年6月19日(2025.6.19)

【国際公開番号】WO2022/264033

【公表番号】特表2024-523332(P2024-523332A)

【公表日】令和6年6月28日(2024.6.28)

【年通号数】公開公報(特許)2024-120

【出願番号】特願2023-577490(P2023-577490)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 P 35/02(2006.01)

A 6 1 K 35/17(2025.01)

【F I】

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 5/10

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02

A 6 1 K 35/17

【手続補正書】

【提出日】令和7年6月11日(2025.6.11)

【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】

ナチュラルキラー(NK)細胞で濃縮した細胞集団を産生する方法であって、
(A) 多能性幹細胞由来の造血前駆細胞(HPC)を含むバルク細胞集団(HP細胞バルク)を提供するステップと、

(B) 前記HP細胞バルクを、p38阻害剤及びSDF-1を含むCD4-誘導培地中で培養して、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8-細胞、及びCD4+/CD8+細胞を含む異種細胞集団を中間体として生成するステップ(ここで、ステップ(B)における異種細胞集団は少なくとも5%のCD4-細胞を含む)と

(C) 前記異種細胞集団を、CD3活性化因子、IL-2、及びIL-7からなる群より選択される少なくとも1つの化合物を含むNK誘導培地中で培養して、CD56+/CD3-NK細胞を含む細胞集団を産生するステップと、を含む、前記方法。

【請求項2】

前記ステップ(A)におけるバルク細胞集団が少なくとも20%のCD34+HPCを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ステップ(B)の後、ステップ(C)で前記異種細胞集団を培養する前に、CD4-細胞を単離することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

CD4-細胞を前記単離することが、前記細胞集団からCD4+細胞を除去することを含

10

20

30

40

50

む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記単離することが、蛍光活性化細胞選別 (FACS) または磁気選別を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記異種細胞集団が以下を含む、請求項 1 に記載の方法：

- (i) 少なくとも 5 % 又は 10 % の CD4 + 細胞；
- (ii) 少なくとも 10 %、15 %、又は 20 % の CD4 - 細胞；
- (iii) 20 ~ 55 % の CD4 - / CD8 + 細胞；又は
- (iv) 25 ~ 55 % の CD4 - / CD8 - 細胞。

10

【請求項 7】

前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞 (iPSC) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ (A) が、骨形成タンパク質 - 4 (BMP4)、血管内皮成長因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、アスコルビン酸、Flt3 リガンド (Flt3L)、トロンボポエチン (TPO)、及び TGF 阻害剤から選択される少なくとも 1 つの化合物を含む培養培地を用いることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ (A) が、

- (a) BMP4 を 5 ng / mL ~ 500 ng / mL の濃度で含む；
- (b) VEGF を 5 ng / mL ~ 500 ng / mL の濃度で含む；
- (c) bFGF を 5 ng / mL ~ 500 ng / mL の濃度で含む；
- (d) アスコルビン酸を 5 µg / mL ~ 500 µg / mL の濃度で含む；
- (e) Flt3L を 1 ng / mL ~ 100 ng / mL の濃度で含む；及び / 又は
- (f) TPO を 1 ng / mL ~ 200 ng / mL の濃度で含む培養培地を用いることを含む、

20

請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ (A) が、

- (a) BMP4 を 50 ng / mL の濃度で含む；
 - (b) VEGF を 50 ng / mL の濃度で含む；
 - (c) bFGF を 50 ng / mL の濃度で含む；
 - (d) アスコルビン酸を 50 µg / mL の濃度で含む；
 - (e) Flt3L を 50 ng / mL の濃度で含む；及び / 又は
 - (f) TPO を 100 ng / mL の濃度で含む培養培地を用いることを含む、
- 請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

ステップ (B) が、アスコルビン酸、幹細胞因子 (SCF)、IL - 7、Flt3L、及びトロンボポエチン (TPO) からなる群から選択される少なくとも 1 つの化合物を含む培養培地を用いることを含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 12】

ステップ (B) が、

- (a) アスコルビン酸を 5 µg / mL ~ 500 µg / mL の濃度で含む；
- (b) SCF を 5 ng / mL ~ 100 ng / mL の濃度で含む；
- (c) IL - 7 を 1 ng / mL ~ 100 ng / mL の濃度で含む；
- (d) Flt3L を 1 ng / mL ~ 100 ng / mL の濃度で含む；
- (e) TPO を 1 ng / mL ~ 200 ng / mL の濃度で含む；
- (f) p38 阻害剤を 0.5 µM ~ 100 µM の濃度で含む；及び / 又は
- (g) SDF - 1 を 10 ng / mL ~ 100 ng / mL の濃度で含む培養培地を用いることを含む、

50

請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

ステップ (B) が、

- (a) アスコルビン酸を $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度で含む；
- (b) SCF を $50 \text{ng} / \text{mL}$ の濃度で含む；
- (c) IL - 7 を $50 \text{ng} / \text{mL}$ の濃度で含む；
- (d) Flt 3 L を $50 \text{ng} / \text{mL}$ の濃度で含む；
- (e) TPO を $100 \text{ng} / \text{mL}$ の濃度で含む；
- (f) p 3 8 阻害剤を $15 \mu\text{M}$ の濃度で含む；及び / 又は
- (g) SDF - 1 を 30nM の濃度で含む培養培地を用いることを含む、

10

請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

ステップ (C) が、CD3 活性化因子、IL - 2、及び IL - 7 からなる群から選択される少なくとも 1 つの化合物を含む培養培地を用いることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

ステップ (C) が、

- (a) IL - 2 を $1 \text{ng} / \text{mL} \sim 100 \text{ng} / \text{mL}$ の濃度で含む；及び / 又は
- (b) IL - 7 を $1 \text{ng} / \text{mL} \sim 100 \text{ng} / \text{mL}$ の濃度で含む培養培地を用いることを含む、

請求項 1 4 に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

ステップ (C) が、IL - 2 を $10 \text{ng} / \text{mL}$ の濃度で含む；及び / 又は IL - 7 を $10 \text{ng} / \text{mL}$ の濃度で含む培養培地を用いることを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

ステップ (B) 及び (C) の各々が、

- (a) 5 % の酸素；
- (b) 1 4 % 超の酸素；
- (c) 大気中酸素；又は
- (d) 5 % 未満の酸素、

で行われる、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 1 8】

多能性幹細胞を (i) 10 日を超えて、(ii) 11 ~ 15 日間、又は (iii) 14 日間培養することによってステップ (A) において HP 細胞バルクが提供される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

ステップ (C) で産生された細胞の少なくとも 30 % が、濃縮のステップを伴わない CD 5 6 + / CD 3 - NK 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

産生された細胞の 25 % 未満が、CD 3 + 細胞である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

産生された細胞のパーセンテージが、フローサイトメトリー、単一細胞 RNA 配列決定 (scRNAseq)、蛍光活性化細胞選別 (FACS) または磁気選別によって決定される、請求項 1 9 に記載の方法。

40

【請求項 2 2】

前記 NK 細胞が、1 つ以上のキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように遺伝子改変されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

抗原が、CD 1 9 である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 NK 細胞が、IL - 1 5 R / IL - 1 5 複合体を発現するように更に遺伝子改変さ

50

れている、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

人工多能性幹細胞 (iPSC) 由来ナチュラルキラー (NK) 細胞を産生する方法であつて、

(1) iPSC を、血管内皮成長因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、及びアスコルビン酸から選択される少なくとも 1 つの化合物を含む誘導培地で培養して、少なくとも 20% の CD34+HPC を含む集団 (HPC 細胞バルク) を得るステップと、

(2) 前記得られた HPC 細胞バルクを、アスコルビン酸、p38 阻害剤、及び SDF-1 を含む培養培地を含む CD4-誘導培地中で培養して、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8-細胞、及び CD4+/CD8+細胞を含む異種細胞集団を中間体として生成するステップ (ここで、ステップ (2) における異種細胞集団は少なくとも 5% の CD4-細胞を含む) と、

(3) 前記異種細胞集団を、CD3 活性化因子、IL-2、及び IL-7 からなる群より選択される少なくとも 1 つの化合物を含む NK 誘導培地中で培養して、CD56+/CD3-NK 細胞を含む細胞集団を産生するステップと、を含む、前記方法。

10

【請求項 26】

ステップ (2) の後、ステップ (3) で前記異種細胞集団を培養する前に、CD4-細胞を単離することを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

CD4-細胞を前記単離することが、前記細胞集団から CD4+細胞を除去することを含む、請求項 26 に記載の方法。

20

【請求項 28】

凍結保存媒体中に凍結保存された、請求項 1 又は 25 に記載の方法を用いて生産された前記 NK 細胞集団を含む医薬組成物。

【請求項 29】

細胞療法を必要とする対象において使用する為の請求項 28 に記載の組成物、ここで、前記対象はがんを有する。

【請求項 30】

がんが白血病またはリンパ腫である、請求項 29 に記載の組成物。

30

40

50