

【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】平成28年6月23日 (2016.6.23)

【公表番号】特表2015-519890(P2015-519890A)

【公表日】平成27年7月16日 (2015.7.16)

【年通号数】公開・登録公報2015-045

【出願番号】特願2015-509079(P2015-509079)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 1/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 P 31/18 (2006.01)

A 6 1 P 31/22 (2006.01)

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 P 31/20 (2006.01)

A 6 1 K 35/12 (2015.01)

【 F I 】

C 1 2 N 5/00 2 0 2 L

C 1 2 N 5/00 2 0 2 C

C 1 2 N 1/00 Z N A F

C 1 2 N 1/00 A

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 31/18

A 6 1 P 31/22

A 6 1 P 31/14

A 6 1 P 31/20

A 6 1 K 35/12

【手続補正書】

【提出日】平成28年4月22日 (2016.4.22)

【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】

未分化幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法であって、
 無血清培地中に未分化幹細胞を配置すること、
 遠心凝集により、前記無血清培地の中で前記未分化幹細胞を凝集させ、且つ遠心胚様体を形成すること、
 前記遠心胚様体からの前駆細胞の産生を誘導するために前記無血清培地の中で前記遠心

胚様体を培養すること、

第 2 無血清培地の中で、かつ外来性間質細胞が存在しない状態で、前記前駆細胞を培養して前記前駆細胞より前記ナチュラルキラー細胞を作製すること、および前記ナチュラルキラー細胞を不活化人工抗原提示細胞 (a A P C) と共培養することを含む前記方法。

【請求項 2】

(i) 前記未分化幹細胞が未分化ヒト胚性幹細胞 (h E S C) を含むか；

(i i) 前記未分化幹細胞が未分化人工多能性幹細胞 (i P S C) を含むか；

(i i i) 前記第 1 無血清培地が前駆細胞の産生を誘導するための増殖因子を含むか；または

(i v) 前記第 1 無血清培地が S C F 複合体、骨形成タンパク質 4 (B M P 4) 、および血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) を含む、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(i) マウス間質が存在しない状態で前記胚様体を培養する前記ステップを実施するか；

(i i) マウス間質細胞が存在しない状態で前記胚様体を培養する前記ステップを実施するか；

(i i i) 前記第 2 無血清培地がナチュラルキラー細胞誘導性増殖因子を含むか；または

(i v) 前記第 2 無血清培地がインターロイキン 3 (I L 3) 、インターロイキン 7 (I L 7) 、インターロイキン 1 5 (I L 1 5) 、 S C F 複合体、および F m s 関連チロシンキナーゼ 3 リガンド (F L T 3 L) を含む、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

(i) 前記前駆細胞が C D 3 4 を発現する細胞を含むか；

(i i) 前記前駆細胞が C D 3 4 と C D 4 3 を共発現する細胞を含むか；または

(i i i) 前記前駆細胞が C D 3 4 と C D 4 5 を共発現する細胞を含む、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

(i) 前記方法が、前記前駆細胞が発現するタンパク質に基づいて前記前駆細胞を選別する細胞選別ステップを前記遠心胚様体培養ステップと前記前駆細胞の培養の間に含まないか；または

(i i) 作製される前記ナチュラルキラー細胞が C D 5 6 、キラー免疫グロブリン様受容体 (K I R) 、 C D 1 6 、 N K p 4 4 、 N K p 4 6 、および N K G 2 D のうちの 1 つ以上を発現する、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

(i) 前記方法が、人工抗原提示細胞 (a A P C) を不活性化して不活化 a A P C を作製することをさらに含むか；

(i i) 前記共培養ステップが 1 : 1 の前記不活化 a A P C に対する前記ナチュラルキラー細胞の比率を有するか；または

(i i i) 前記方法が、インターロイキン 2 (I L 2) を含む培地の中で前記ナチュラルキラー細胞を前記不活化 a A P C と共培養することをさらに含み、特に、前記共培養ステップが約 5 : 1 から 1 : 5 の前記不活化 a A P C に対する前記ナチュラルキラー細胞の比率を有する、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

多能性幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法であって、

(a) 第 1 無血清培地の中で前記多能性幹細胞を凝集させ、それによって胚様体を形成

すること；

(b) 第2無血清培地の中で前記胚様体を培養し、それによって造血前駆細胞を作製すること；

(c) インターロイキン3 (IL-3)、インターロイキン7 (IL-7)、インターロイキン15 (IL-15)、SCF、およびFms関連チロシンキナーゼ3リガンド (FLT3L) を含む第3無血清培地の中で、かつ外来性の間質または間質細胞が存在しない状態で、前記造血前駆細胞を培養し、それによってナチュラルキラー細胞を作製すること；および

(d) 前記ナチュラルキラー細胞を不活化aAPCと共培養すること、を含む前記方法。

【請求項8】

(i) 前記多能性幹細胞がヒト胚性幹細胞 (hESC) または人工多能性幹細胞 (iPSC) であるか；

(ii) 遠心凝集によって前記凝集を実施するか；または

(iii) 前記第2無血清培地がSCF、骨形成タンパク質4 (BMP4)、および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を含む、

請求項7に記載の方法。

【請求項9】

(i) 前記造血前駆細胞がCD34を発現するか；

(ii) 前記造血前駆細胞がCD34とCD43を共発現するか；または

(iii) 前記造血前駆細胞がCD34とCD45を共発現する、

請求項7に記載の方法。

【請求項10】

前記方法が細胞選別ステップをステップ(b)とステップ(c)の間に含まないか；または、作製される前記ナチュラルキラー細胞がCD56、キラー免疫グロブリン様受容体 (KIR)、CD16、NKp44、NKp46、およびNKG2Dのうちの1つ以上を発現する、

請求項7に記載の方法。

【請求項11】

約5:1から1:5の不活化aAPCに対するナチュラルキラー細胞の比率で前記共培養を実施するか；

前記方法が、インターロイキン2 (IL2) を含む培地の中で前記ナチュラルキラー細胞を不活化aAPCと共培養することをさらに含む、

請求項7に記載の方法。

【請求項12】

ステップ(b)の培養を6~20日間実行するか；または

ステップ(c)の培養を20~60日間実行する、

請求項7に記載の方法。

【請求項13】

必要とする患者にナチュラルキラー細胞の有効量が投与されることを特徴とする、免疫療法において使用するための、請求項7に記載の方法によって作製されたナチュラルキラー細胞を含む組成物。

【請求項14】

(i) 前記患者が癌患者であるか；

(ii) 前記患者が感染症を有し、特に前記患者がウイルス感染症を有し、特に前記患者がヒト免疫不全ウイルス (HIV)、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、単純ヘルペスウイルス (HSV)、サイトメガロウイルス (CMV)、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、B型肝炎ウイルス (HBV) またはC型肝炎ウイルス (HCV) に感染しているか；あるいは

(iii) 前記多能性細胞が前記患者に由来する、

請求項 1 3 に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 6】

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

未分化幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法であって、

無血清培地中に未分化幹細胞を配置すること、

遠心凝集により、前記無血清培地の中で前記未分化幹細胞を凝集させ、且つ遠心胚様体を形成すること、

前記遠心胚様体からの前駆細胞の産生を誘導するために前記無血清培地の中で前記遠心胚様体を培養すること、および

第 2 無血清培地の中で前記前駆細胞を培養して前記前駆細胞より前記ナチュラルキラー細胞を作製すること

を含む前記方法。

(項目 2)

前記未分化幹細胞が未分化ヒト胚性幹細胞 (hESC) を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記未分化幹細胞が未分化人工多能性幹細胞 (iPSC) を含む、項目 1 に記載の方法

。

(項目 4)

前記第 1 無血清培地が前駆細胞の産生を誘導するための増殖因子を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記第 1 無血清培地が SCF 複合体、骨形成タンパク質 4 (BMP4)、および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

マウス間質が存在しない状態で前記胚様体を培養する前記ステップを実施する、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

マウス間質細胞が存在しない状態で前記胚様体を培養する前記ステップを実施する、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

前記第 2 無血清培地がナチュラルキラー細胞誘導性増殖因子を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

前記第 2 無血清培地がインターロイキン 3 (IL3)、インターロイキン 7 (IL7)、インターロイキン 15 (IL15)、SCF 複合体、および Fms 関連チロシンキナーゼ 3 リガンド (FLT3L) を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 10)

前記第 2 無血清培地の中で前記前駆細胞を培養する前記ステップが、外来性間質細胞が存在しない状態にある、項目 1 に記載の方法。

(項目 11)

前記第 2 無血清培地の中で前記前駆細胞を培養する前記ステップが、外来性間質細胞が存在しない状態にある、項目 1 に記載の方法。

(項目 12)

前記前駆細胞が CD34 を発現する CD34⁺ 細胞を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記前駆細胞が C D 3 4 と C D 4 3 を共発現する C D 3 4 + C D 4 3 + 細胞を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記前駆細胞が C D 3 4 と C D 4 5 を共発現する C D 3 4 + C D 4 5 + 細胞を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記方法が、前記前駆細胞が発現するタンパク質に基づいて前記前駆細胞を選別する細胞選別ステップを前記遠心胚様体培養ステップと前記前駆細胞の培養の間に含まない、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 6)

作製される前記ナチュラルキラー細胞が C D 5 6、キラー免疫グロブリン様受容体 (K I R)、C D 1 6、N K p 4 4、N K p 4 6、および N K G 2 D のうちの 1 つ以上を発現する、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 7)

人工抗原提示細胞 (a A P C) を不活性化して不活化 a A P C を作製すること、および前記ナチュラルキラー細胞を前記不活化 a A P C と共培養することをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記共培養ステップが 1 : 1 の前記不活化 a A P C に対する前記ナチュラルキラー細胞の比率を有する、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

不活化 a A P C を作製するための薬剤で人工抗原提示細胞 (a A P C) を処理すること、および

インターロイキン 2 (I L 2) を含む培地の中で前記ナチュラルキラー細胞を前記不活化 a A P C と共培養することをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記共培養ステップが約 5 : 1 から 1 : 5 の前記不活化 a A P C に対する前記ナチュラルキラー細胞の比率を有する、項目 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

多能性幹細胞よりナチュラルキラー細胞を作製するための方法であって、

(a) 第 1 無血清培地の中で前記多能性幹細胞を凝集させ、それによって胚様体を形成すること、

(b) 第 2 無血清培地の中で前記胚様体を培養し、それによって造血前駆細胞を作製すること、および

(c) インターロイキン 3 (I L - 3)、インターロイキン 7 (I L - 7)、インターロイキン 1 5 (I L - 1 5)、S C F、および F m s 関連チロシンキナーゼ 3 リガンド (F L T 3 L) を含む第 3 無血清培地の中で前記造血前駆細胞を培養し、それによってナチュラルキラー細胞を作製すること

を含む前記方法。

(項目 2 2)

前記多能性幹細胞がヒト胚性幹細胞 (h E S C) または人工多能性幹細胞 (i P S C) である、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

遠心凝集によって前記の凝集を実施する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記第 2 無血清培地が S C F、骨形成タンパク質 4 (B M P 4)、および血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) を含む、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 5)

マウス間質またはマウス間質細胞が存在しない状態で前記胚様体を培養する前記ステップを実施する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 6)

外来性の間質または間質細胞が存在しない状態で前記造血前駆細胞を培養する前記ステップを実施する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記造血前駆細胞が C D 3 4 を発現する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記造血前駆細胞が C D 3 4 と C D 4 3 を共発現する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記造血前駆細胞が C D 3 4 と C D 4 5 を共発現する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記方法が細胞選別ステップをステップ (b) とステップ (c) の間に含まない、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 3 1)

作製される前記ナチュラルキラー細胞が C D 5 6、キラー免疫グロブリン様受容体 (K I R)、C D 1 6、N K p 4 4、N K p 4 6、および N K G 2 D のうちの 1 つ以上を発現する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記ナチュラルキラー細胞を不活化人工抗原提示細胞 (a A P C) と共培養することをさらに含む、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

約 5 : 1 から 1 : 5 の不活化 a A P C に対するナチュラルキラー細胞の比率で前記共培養を実施する、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

インターロイキン 2 (I L 2) を含む培地の中で前記ナチュラルキラー細胞を不活化 a A P C と共培養することをさらに含む、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 3 6)

ステップ (b) の培養を 6 ~ 2 0 日間実行する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 3 7)

ステップ (c) の培養を 2 0 ~ 6 0 日間実行する、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 3 8)

必要とする患者に項目 2 1 に記載の方法によって作製されたナチュラルキラー細胞の有効量を投与することを含む、患者を治療する免疫療法。

(項目 3 8)

(a) 項目 2 1 に記載の方法によってナチュラルキラー (N K) 細胞の集団を作製すること、および

(b) 必要とする患者に前記 N K 細胞の有効量を投与することを含む、患者を治療する免疫療法。

(項目 3 9)

前記患者が癌患者である、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記患者が感染症を有する、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記患者がウイルス感染症を有する、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記患者がヒト免疫不全ウイルス (H I V)、エプスタイン・バーウイルス (E B V)、単純ヘルペスウイルス (H S V)、サイトメガロウイルス (C M V)、水痘帯状疱疹ウイルス (V Z V)、B 型肝炎ウイルス (H B V) または C 型肝炎ウイルス (H C V) に感染している、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記多能性細胞が前記患者に由来する、項目 3 8 に記載の方法。

第 1 の実施形態では、未分化多能性幹細胞より NK 細胞を作製するための方法は、第 1 無血清培地中に未分化幹細胞を配置すること、遠心凝集 (spin aggregation) により、第 1 無血清培地の中で未分化細胞を凝集させ、且つ、胚様体 (EB) を形成すること (遠心胚様体 (spin embryoid bodies) (遠心 EB (spin EBs)) を形成することになる)、遠心 EB から前駆細胞の産生を誘導するために第 1 無血清培地の中で遠心 EB を培養すること、および前駆細胞から NK 細胞を作製するための第 2 無血清培地の中でそれらの前駆細胞を培養することを含む。その方法は未分化ヒト胚性幹細胞 (hESC) または未分化人工多能性幹細胞 (iPSC) である未分化幹細胞を使用する。