

【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11月4日(2021.11.4)

【公表番号】特表2020-534004(P2020-534004A)

【公表日】令和2年11月26日(2020.11.26)

【年通号数】公開・登録公報2020-048

【出願番号】特願2020-516436(P2020-516436)

【国際特許分類】

C 1 2 N	5/071	(2010.01)
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)
A 6 1 K	35/17	(2015.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/02	(2006.01)
A 6 1 P	31/00	(2006.01)
A 6 1 P	7/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	5/071	
C 1 2 N	5/0783	
A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	7/00	

【手続補正書】

【提出日】令和3年9月21日(2021.9.21)

【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】

インビトロで胸腺オルガノイドを調製する方法であって、

(i) インビトロで多能性幹細胞を内胚葉細胞に分化させることと；

(ii) インビトロで前記内胚葉細胞を第3咽頭囊内胚葉(PPe)細胞に分化させることと；

(iii) インビトロで前記第3Pe細胞を胸腺上皮前駆様細胞(TEPCL)に分化させることと；

(iv) インビトロ三次元培養で前記TEPCLを胸腺上皮前駆細胞(TEPC)に分化させることと；

(v) 骨形成タンパク質4(BMP4)の存在下においてインビトロ三次元培養で前記TEPCを胸腺上皮細胞(TEC)に分化させることと；

(vi) インビトロ三次元培養で前記TECから胸腺オルガノイドを形成させることとを含み、

前記胸腺オルガノイドが、5t、DL4、及びインターロイキン7のうちのいずれか1つ以上を発現し、

前記方法が、前記細胞を間葉又は間質細胞と共に培養することを含まない方法。

【請求項2】

(v) が、Wnt3a 及び線維芽細胞成長因子7 (FGF7) の一方又は両方の存在下においてインビトロ三次元培養で前記TEPCをTECに分化させることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(i) の前に少なくとも1日間、哺乳類細胞基底マトリクスにおいて前記多能性幹細胞を培養することを含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記TEPLCが、ケラチン5<sup>+</sup>/ケラチン8<sup>+</sup>/FOXN1<sup>-</sup>である、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記細胞を継代することを含まない、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

(iii) が、前記細胞を解離させることなく前記第3PPE細胞をTEPLCに分化させることを含む、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記胸腺オルガノイドが、ケラチン5<sup>+</sup>/ケラチン8<sup>+</sup>/FOXN1<sup>+</sup>細胞を含む、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記胸腺オルガノイドが、ケラチン5<sup>+</sup>/ケラチン8<sup>+</sup>/胸腺プロテオソーム5t<sup>+</sup>細胞を含む、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記胸腺オルガノイドが、ケラチン5<sup>高</sup>/ケラチン8<sup>低</sup>細胞を含む、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記胸腺オルガノイドが、ケラチン5<sup>低</sup>/ケラチン8<sup>高</sup>細胞を含む、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

(i)~(vi) のうちのいずれか1つ以上がゼノフリー培地で実施される、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記胸腺オルガノイドを培養して、T細胞の分化を促進する1つ以上の自己タンパク質を過剰発現させることを更に含む、請求項1~11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

T細胞の分化を促進する1つ以上の前記自己タンパク質が、DL14及びIL-7のうちの1つ以上を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

(iv) が、1つ以上の間葉系幹細胞(MSC)因子の存在下で前記TEPLCをTEPCに分化させることを含む、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記1つ以上のMSC因子が、FGF7、BMP4、Wnt3a、線維芽細胞成長因子10 (FGF10)、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、線維芽細胞成長因子8 (FGF8)、トランスフォーミング成長因子阻害剤 (TGF<sub>inhib</sub>)、及びシクロパミンのうちの1つ以上を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記MSC因子のうちの1つ以上が、FGF10、IGF-1、FGF8、TGF<sub>inhib</sub>、及びシクロパミンを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

請求項1~16のいずれか一項に記載の方法によって生成される、胸腺オルガノイド。

【請求項18】

インビトロで胸腺移出T細胞を調製する方法であって、前駆細胞を請求項17に記載の

胸腺オルガノイドに遊走させることと；前記細胞を前記胸腺オルガノイドから放出させることであって、前記胸腺オルガノイドから放出される前記細胞が、胸腺移出T細胞であることと；前記胸腺オルガノイドから前記胸腺移出T細胞を単離することとを含む方法。

【請求項 19】

哺乳類における病態の治療又は予防のための剤を製造する方法であって、：

請求項 1～16 のいずれか一項に記載の方法により胸腺オルガノイドを調製することと；

前駆細胞を前記胸腺オルガノイドに遊走させることと；

前記細胞を前記胸腺オルガノイドから放出させることであって、前記胸腺オルガノイドから放出される前記細胞が、胸腺移出T細胞であることと；

前記胸腺オルガノイドから前記胸腺移出T細胞を単離することとを含み、

前記胸腺移出T細胞が前記剤に製剤化される、方法。

【請求項 20】

前記病態が、がん、免疫不全、自己免疫病態、感染症、又は血液病態である、請求項 19 に記載の方法。