

【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5年8月18日(2023.8.18)

【国際公開番号】WO2021/032852

【公表番号】特表2022-545078(P2022-545078A)

【公表日】令和4年10月25日(2022.10.25)

【年通号数】公開公報(特許)2022-196

【出願番号】特願2022-510802(P2022-510802)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/10(2006.01)

A 6 1 K 35/17(2015.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

C 1 2 N 15/867(2006.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

C 1 2 N 15/13(2006.01)

C 1 2 N 15/62(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/10

A 6 1 K 35/17 Z

A 6 1 P 35/00

C 1 2 N 15/867 Z

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/62 Z

【手続補正書】

【提出日】令和5年8月9日(2023.8.9)

【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】

(i) R A G が不活性化された人工多能性幹細胞 ( i P S C ) の集団を中胚葉細胞に分化させることと、

( i i ) 前記中胚葉細胞 ( M C ) を分化させて、造血性内皮細胞 ( H E C ) の集団を生成することと、

( i i i ) 前記 H E C を造血前駆細胞 ( H P C ) の集団に分化させることと、

( i v ) 前記 H P C の集団を前駆 T 細胞に分化させることと、

( v ) 前記前駆 T 細胞を成熟させて、二重陽性 C D 4 + C D 8 + T 細胞の集団を生成することと、

を含む、T細胞の集団を生成する方法であって、

抗原受容体をコードする異種核酸を ( a ) 前記 H P C 、又は ( b ) 前記前駆 T 細胞の1つに導入することを含む、方法。

【請求項2】

( v i ) 前記 T 細胞を活性化及び拡大させて、単独陽性 C D 8 + T 細胞の集団又は単独陽性 C D 4 + T 細胞の集団を生成すること、

を更に含む、請求項1に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3】

前記抗原受容体をコードする前記異種核酸は、発現ベクター中に含まれており、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、又はVSVg偽型ウイルスベクターであってもよい、請求項1又は請求項2に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記抗原受容体は、T細胞受容体(TCR)であり、下記(i)及び/又は(ii)及び/又は(iii)を満たしていてもよい、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

(i)前記TCRは、親和性増強TCRであること、

(ii)前記TCRは、TCR又はTCRであること、

(iii)前記TCRは、細胞によって発現される標的抗原のペプチド断片を提示するMHCに特異的に結合し、又はMHC提示とは無関係に細胞によって発現される標的抗原若しくはそのペプチドに特異的に結合し、前記TCRは、癌細胞によって発現される腫瘍抗原のペプチド断片を提示するMHCに特異的に結合してもよく、又はMHC提示とは無関係に癌細胞によって発現される腫瘍抗原若しくはそのペプチド断片に特異的に結合してもよく、前記腫瘍抗原はアルファ-フェトプロテイン(AFP)、NY-ESO1、MAGE-A10、又はMAGE-A4であってもよいこと。

10

## 【請求項 5】

前記抗原受容体は、キメラ抗原受容体(CAR)であり、前記CARは、細胞によって発現される標的抗原、癌細胞によって発現される腫瘍抗原、アルファ-フェトプロテイン(AFP)、NY-ESO1、MAGE-A10、又はMAGE-A4に特異的に結合してもよい、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記抗原受容体は、NK細胞受容体(NKCR)であり、前記NKCRは、細胞によって発現される標的抗原のペプチド断片を提示するMHCに特異的に結合してもよく、前記NKCRは、癌細胞によって発現される腫瘍抗原のペプチド断片を提示するMHCに特異的に結合してもよく、前記腫瘍抗原はアルファ-フェトプロテイン(AFP)、NY-ESO1、MAGE-A10、又はMAGE-A4であってもよい、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記RAGが不活性化されたiPSCを、第1の中胚葉誘導培地、第2の中胚葉誘導培地、及び第3の中胚葉誘導培地中で逐次培養して、中胚葉細胞への分化を誘導することを含み、下記(i)及び/又は(ii)及び/又は(iii)を満たしていてもよい、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

30

(i)前記第1の中胚葉誘導培地は、アクチビンを含み、前記第1の中胚葉誘導培地は、1つ以上の分化因子が補充された化学的に定義された栄養培地からなるものであってもよく、前記1つ以上の分化因子はアクチビンからなること、

(ii)前記第2の中胚葉誘導培地は、アクチビン、BMP、及びFGFを含み、前記第2の中胚葉誘導培地は、1つ以上の分化因子が補充された化学的に定義された栄養培地からなるものであってもよく、前記1つ以上の分化因子はアクチビン、BMP、及びFGFからなること、

40

(iii)前記第3の中胚葉誘導培地は、アクチビン、BMP、FGF、及びGSK3阻害剤を含み、前記第3の中胚葉誘導培地は、1つ以上の分化因子が補充された化学的に定義された栄養培地からなるものであってもよく、前記1つ以上の分化因子はアクチビン、BMP、FGF、及びGSK3阻害剤からなること。

## 【請求項 8】

前記中胚葉細胞は、ブラキウリ<sup>+</sup>、グースコイド<sup>+</sup>、Mixl1<sup>+</sup>、KDR<sup>+</sup>、FoxA2<sup>+</sup>、GATA6<sup>+</sup>、及びPDGFR<sup>+</sup>の1つ以上を示す、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記中胚葉細胞をHE誘導培地中で培養して、HECへの分化を誘導し、前記HE誘導

50

培地は、SCF及びVEGFを含んでいてもよく、更に前記HE誘導培地は、1つ以上の分化因子が補充された化学的に定義された栄養培地からなるものであってもよく、前記1つ以上の分化因子はSCF及びVEGFからなる、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

リンパ球分化を促進するのに適した条件下で、前記HPCを前駆T細胞に分化させることを含み、下記(i)及び/又は(ii)を満たしていてもよい、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

(i)リンパ球拡大培地中で前記HPCの集団を培養して、前記前駆T細胞を生成することを含む方法によって、前記HPCを分化させること、

10

(ii)前記前駆T細胞は、CD5<sup>+</sup>、CD7<sup>+</sup>の表現型を有すること。

【請求項11】

T細胞成熟を促進するのに適した条件下で、前記前駆T細胞をT細胞に成熟させ、T細胞成熟培地中で前記前駆T細胞の集団を培養して、前記二重陽性T細胞を生成することを含む方法によって、前記前駆T細胞を成熟させてもよい、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

下記(i)及び/又は(ii)及び/又は(iii)及び/又は(iv)を満たす、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

(i)前記二重陽性T細胞及び/又は前記単独陽性T細胞を分離又は精製することを更に含み、二重陽性T細胞及び/又は単独陽性T細胞を、磁気活性化セルソーティングによって分離してもよいこと、

20

(ii)前記二重陽性T細胞及び/又は単独陽性T細胞の集団を濃縮することを更に含むこと、

(iii)前記二重陽性T細胞及び/又は単独陽性T細胞の集団を貯蔵することを更に含むこと、

(iv)前記二重陽性T細胞及び/又は単独陽性T細胞の集団を薬学的に許容可能な添加剤とともに製剤化することを更に含むこと。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか一項に記載の方法によって生産される二重陽性T細胞及び/又は単独陽性T細胞の集団であって、前記T細胞は異種抗原受容体を発現し、前記異種抗原受容体はTCR、CAR、又はNKCRであってもよく、及び/又は、前記T細胞はRAGが不活性化され内因性TCRを発現しないものであってもよい、集団。

30

【請求項14】

請求項13に記載の二重陽性T細胞及び/又は単独陽性T細胞の集団と、薬学的に許容可能な添加剤とを含む医薬組成物。

【請求項15】

治療方法において使用するための、請求項13に記載の二重陽性T細胞及び/又は単独陽性T細胞の集団であって、前記使用は癌の治療方法における使用であってもよい、集団。

40

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0176

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0176】

上の実施形態の変形形態、更なる実施形態及びそれらの変形形態は、本開示を読むことによって当業者に明らかとなり、それら自体が本発明の範囲に含まれる。

本開示は、次の態様を包含する。

[項1]

50

( i ) R A G が不活性化された人工多能性幹細胞 ( i P S C ) の集団を中胚葉細胞に分化させることと、

( i i ) 前記中胚葉細胞 ( M C ) を分化させて、造血性内皮細胞 ( H E C ) の集団を生成することと、

( i i i ) 前記 H E C を造血前駆細胞 ( H P C ) の集団に分化させることと、

( i v ) 前記 H P C の集団を前駆 T 細胞に分化させることと、

( v ) 前記前駆 T 細胞を成熟させて、二重陽性 C D 4 <sup>+</sup> C D 8 <sup>+</sup> T 細胞の集団を生成することと、

を含む、T 細胞の集団を生産する方法であって、

抗原受容体をコードする異種核酸を ( a ) 前記 i P S C 、 ( b ) 前記 H P C 、 又は ( c ) 前記前駆 T 細胞の 1 つに導入することを含む、方法。

10

[ 項 2 ]

( v i ) 前記 T 細胞を活性化及び拡大させて、単独陽性 C D 8 <sup>+</sup> T 細胞の集団又は単独陽性 C D 4 <sup>+</sup> T 細胞の集団を生成すること、

を更に含む、項 1 に記載の方法。

[ 項 3 ]

前記異種核酸を前記 i P S C に導入することを含む、項 1 又は 2 に記載の方法。

[ 項 4 ]

前記異種核酸を前記 H P C に導入することを含む、項 1 又は 2 に記載の方法。

[ 項 5 ]

前記異種核酸を前記前駆 T 細胞に導入することを含む、項 1 又は 2 に記載の方法。

20

[ 項 6 ]

前記抗原受容体をコードする前記異種核酸は、発現ベクター中に含まれている、項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

[ 項 7 ]

前記発現ベクターは、レンチウイルスベクター又はアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターである、項 6 に記載の方法。

[ 項 8 ]

前記レンチウイルスベクターは、V S V g 偽型ウイルスベクターである、項 6 に記載の方法。

30

[ 項 9 ]

前記抗原受容体は、T 細胞受容体 ( T C R ) である、項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

[ 項 1 0 ]

前記 T C R は、親和性増強 T C R である、項 9 に記載の方法。

[ 項 1 1 ]

前記 T C R は、           T C R 又は            T C R である、項 9 又は 1 0 に記載の方法。

[ 項 1 2 ]

前記 T C R は、細胞によって発現される標的抗原のペプチド断片を提示する M H C に特異的に結合する、又は M H C 提示とは無関係に細胞によって発現される標的抗原若しくはそのペプチドに特異的に結合する、項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

40

[ 項 1 3 ]

前記 T C R は、癌細胞によって発現される腫瘍抗原のペプチド断片を提示する M H C に特異的に結合する、又は M H C 提示とは無関係に癌細胞によって発現される腫瘍抗原若しくはそのペプチド断片に特異的に結合する、項 1 2 に記載の方法。

[ 項 1 4 ]

前記抗原受容体は、キメラ抗原受容体 ( C A R ) である、項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

[ 項 1 5 ]

前記 C A R は、細胞によって発現される標的抗原に特異的に結合する、項 1 4 に記載の

50

方法。

[ 項 1 6 ]

前記 T C R は、癌細胞によって発現される腫瘍抗原に特異的に結合する、項 1 5 に記載の方法。

[ 項 1 7 ]

前記抗原受容体は、NK細胞受容体 ( N K C R ) である、項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

[ 項 1 8 ]

前記 N K C R は、細胞によって発現される標的抗原のペプチド断片を提示する M H C に特異的に結合する、項 1 7 に記載の方法。

[ 項 1 9 ]

前記 N K C R は、癌細胞によって発現される腫瘍抗原のペプチド断片を提示する M H C に特異的に結合する、項 1 8 に記載の方法。

[ 項 2 0 ]

前記腫瘍抗原は、アルファ - フェトプロテイン ( A F P )、N Y - E S O 1、M A G E - A 1 0、又は M A G E - A 4 である、項 1 3、1 6、又は 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

[ 項 2 1 ]

前記 R A G が不活性化された i P S C を、中胚葉分化を促進するのに適した条件下で該 i P S C の集団を培養することによって、中胚葉細胞に分化させる、項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

[ 項 2 2 ]

前記 R A G が不活性化された i P S C を、第 1 の中胚葉誘導培地、第 2 の中胚葉誘導培地、及び第 3 の中胚葉誘導培地中で逐次培養して、中胚葉細胞への分化を誘導する、項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

[ 項 2 3 ]

前記第 1 の中胚葉誘導培地は、S M A D 2 及び S M A D 3 に媒介されるシグナル伝達経路を刺激する、項 2 2 に記載の方法。

[ 項 2 4 ]

前記第 1 の中胚葉誘導培地は、アクチビンを含む、項 2 3 に記載の方法。

[ 項 2 5 ]

前記第 1 の中胚葉誘導培地は、1 つ以上の分化因子が補充された化学的に定義された栄養培地からなり、ここで、前記 1 つ以上の分化因子はアクチビンからなる、項 2 3 又は 2 4 に記載の方法。

[ 項 2 6 ]

前記第 2 の中胚葉誘導培地は、( i ) S M A D 1、S M A D 2、S M A D 3、S M A D 5、及び S M A D 9 に媒介されるシグナル伝達経路を刺激し、かつ ( i i ) 線維芽細胞成長因子 ( F G F ) 活性を有する、項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

[ 項 2 7 ]

前記第 2 の中胚葉誘導培地は、アクチビン、B M P、及び F G F を含む、項 2 6 に記載の方法。

[ 項 2 8 ]

前記第 2 の中胚葉誘導培地は、1 つ以上の分化因子が補充された化学的に定義された栄養培地からなり、ここで、前記 1 つ以上の分化因子はアクチビン、B M P、及び F G F からなる、項 2 6 又は 2 7 に記載の方法。

[ 項 2 9 ]

前記第 3 の中胚葉誘導培地は、( i ) S M A D 1、S M A D 2、S M A D 3、S M A D 5、及び S M A D 9 に媒介されるシグナル伝達経路を刺激し、( i i ) 線維芽細胞成長因子 ( F G F ) 活性を有し、かつ ( i i i ) グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 を阻害する、項 2 2 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## [ 項 3 0 ]

前記第 3 の中胚葉誘導培地は、アクチビン、BMP、FGF、及びGSK3阻害剤を含む、項 2 9 に記載の方法。

## [ 項 3 1 ]

前記第 3 の中胚葉誘導培地は、1 つ以上の分化因子が補充された化学的に定義された栄養培地からなり、ここで、前記 1 つ以上の分化因子はアクチビン、BMP、FGF、及びGSK3阻害剤からなる、項 3 0 に記載の方法。

## [ 項 3 2 ]

前記中胚葉細胞は、 $\text{Plex1}^+$ 、 $\text{Gscoid}^+$ 、 $\text{Mixl1}^+$ 、 $\text{KDR}^+$ 、 $\text{FoxA2}^+$ 、 $\text{Gata6}^+$ 、及びPDGFR $^+$ の 1 つ以上を示す、項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

## [ 項 3 3 ]

前記中胚葉細胞を、造血性内皮 (HE) 分化を促進するのに適した条件下で該中胚葉細胞の集団を培養することによって、HEC に分化させる、項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 3 4 ]

前記中胚葉細胞をHE誘導培地中で培養して、HEC への分化を誘導する、項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 3 5 ]

前記HE誘導培地は、(i)KIT (KITプロトオンコジーン、受容体チロシンキナーゼ) 媒介性シグナル伝達経路を刺激し、かつ(ii)VEGFR 媒介性シグナル伝達経路を刺激する、項 3 4 に記載の方法。

20

## [ 項 3 6 ]

前記HE誘導培地は、SCF及びVEGFを含む、項 3 5 に記載の方法。

## [ 項 3 7 ]

前記HE誘導培地は、1 つ以上の分化因子が補充された化学的に定義された栄養培地からなり、ここで、前記 1 つ以上の分化因子はSCF及びVEGFからなる、項 3 6 に記載の方法。

## [ 項 3 8 ]

リンパ球分化を促進するのに適した条件下で、前記HPCを前駆T細胞に分化させる、項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

## [ 項 3 9 ]

リンパ球拡大培地中で前記HPCの集団を培養して、前記前駆T細胞を生成することを含む方法によって、前記HPCを分化させる、項 3 8 に記載の方法。

## [ 項 4 0 ]

前記前駆T細胞は、 $\text{CD5}^+$ 、 $\text{CD7}^+$ の表現型を有する、項 3 8 又は 3 9 に記載の方法。

## [ 項 4 1 ]

T細胞成熟を促進するのに適した条件下で、前記前駆T細胞をT細胞に成熟させる、項 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

## [ 項 4 2 ]

T細胞成熟培地中で前記前駆T細胞の集団を培養して、前記二重陽性T細胞を生成することを含む方法によって、前記前駆T細胞を成熟させる、項 4 1 に記載の方法。

## [ 項 4 3 ]

前記二重陽性T細胞及び/又は前記単独陽性T細胞を分離又は精製することを更に含む、項 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

## [ 項 4 4 ]

二重陽性T細胞及び/又は単独陽性T細胞を、磁気活性化セルソーティングによって分離する、項 4 3 に記載の方法。

## [ 項 4 5 ]

50

前記二重陽性T細胞及び／又は単独陽性T細胞の集団を濃縮することを含む、項1～44のいずれか一項に記載の方法。

[項46]

前記二重陽性T細胞及び／又は単独陽性T細胞の集団を貯蔵することを含む、項1～45のいずれか一項に記載の方法。

[項47]

前記二重陽性T細胞及び／又は単独陽性T細胞の集団を薬学的に許容可能な添加剤とともに製剤化することを含む、項1～46のいずれか一項に記載の方法。

[項48]

項1～47のいずれか一項に記載の方法によって生産される二重陽性T細胞及び／又は単独陽性T細胞の集団。 10

[項49]

前記T細胞は、異種抗原受容体を発現する、項48に記載の集団。

[項50]

前記異種抗原受容体は、TCR、CAR、又はNKCRである、項49に記載の集団。

[項51]

前記T細胞は、RAGが不活性化されており、内因性TCRを発現しない、項49又は50に記載の集団。

[項52]

項1～47のいずれか一項に記載の方法によって生産される二重陽性T細胞及び／又は単独陽性T細胞の集団と、薬学的に許容可能な添加剤とを含む医薬組成物。 20

[項53]

治療方法において使用するための、項1～47のいずれか一項に記載の方法によって生産される二重陽性T細胞及び／又は単独陽性T細胞の集団。

[項54]

癌の治療方法において使用するための、項1～47のいずれか一項に記載の方法によって生産される二重陽性T細胞及び／又は単独陽性T細胞の集団。

[項55]

治療を必要とする個体に、項1～47のいずれか一項に記載の方法によって生産される二重陽性T細胞及び／又は単独陽性T細胞の集団を投与することを含む、癌の治療方法。 30