

【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1月9日(2025.1.9)

【公開番号】特開2024-153768(P2024-153768A)

【公開日】令和6年10月29日(2024.10.29)

【年通号数】公開公報(特許)2024-202

【出願番号】特願2024-121246(P2024-121246)

【国際特許分類】

- C 1 2 N 5/071(2010.01) 10
- C 1 2 N 5/0735(2010.01)
- C 1 2 N 5/10(2006.01)
- C 1 2 N 5/074(2010.01)
- C 1 2 N 1/00(2006.01)
- A 6 1 K 35/55(2015.01)
- A 6 1 P 37/02(2006.01)
- A 6 1 P 3/10(2006.01)
- A 6 1 P 19/02(2006.01)
- A 6 1 P 17/06(2006.01)
- A 6 1 P 25/00(2006.01) 20
- A 6 1 P 1/04(2006.01)
- A 6 1 P 5/16(2006.01)
- A 6 1 P 5/14(2006.01)
- A 6 1 P 21/04(2006.01)
- A 6 1 P 9/00(2006.01)
- A 6 1 P 7/06(2006.01)
- A 6 1 P 17/00(2006.01)
- A 6 1 P 17/14(2006.01)
- C 0 7 K 14/50(2006.01)

【F I】 30

- C 1 2 N 5/071
- C 1 2 N 5/0735 Z N A
- C 1 2 N 5/10
- C 1 2 N 5/074
- C 1 2 N 1/00 G
- A 6 1 K 35/55
- A 6 1 P 37/02
- A 6 1 P 3/10
- A 6 1 P 19/02
- A 6 1 P 17/06 40
- A 6 1 P 25/00
- A 6 1 P 1/04
- A 6 1 P 5/16
- A 6 1 P 5/14
- A 6 1 P 21/04
- A 6 1 P 9/00
- A 6 1 P 7/06
- A 6 1 P 17/00
- A 6 1 P 17/14
- C 1 2 N 5/0735 50

C 1 2 N 5 / 0 7 1 Z N A
C 0 7 K 1 4 / 5 0

【手続補正書】

【提出日】令和6年12月23日(2024.12.23)

【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】

10

【特許請求の範囲】

【請求項1】

胸腺上皮細胞(TECs)を、該胸腺を含む付加的な細胞と組み合わせることを含む、ハイブリッド胸腺を生成するためのインビトロまたはエクスピボの方法であって、前記胸腺上皮細胞は、多能性幹細胞を上皮細胞または胸腺上皮前駆細胞(TEPs)へと分化誘導するためのプロセスであって、

(a) 確定内胚葉細胞に多能性幹細胞を分化させる工程；

(b) 確定内胚葉細胞を培養する工程および骨形成蛋白質(BMP)を阻害する因子およびTGFシグナル伝達を阻害する因子と確定内胚葉細胞を接触させるあるいはインキュベートすること、かつHOXA3の発現を刺激する因子およびTBX1の発現を刺激する因子と確定内胚葉細胞をさらに接触させるあるいはインキュベートすることにより前腸前部細胞に確定内胚葉細胞を分化させる工程；

20

(c) 前腸前部細胞を培養する工程およびHOXA3の発現を刺激する因子、TBX1の発現を刺激する因子、ならびにPAX9およびPAX1の発現を刺激する因子と前腸前部細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより咽頭内胚葉細胞に前腸前部細胞を分化させる工程；

(d) 咽頭内胚葉細胞を培養する工程およびBMPを阻害する因子と咽頭内胚葉細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより遠位咽頭嚢(PP)に特化した細胞、TECsまたはTEPsに咽頭内胚葉細胞を分化させる工程；および

(e) 工程(c)または工程(d)からの咽頭内胚葉細胞を培養する工程およびBMPと咽頭内胚葉細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより遠位咽頭嚢(PP)に特化した細胞、TECsまたはTEPsに咽頭内胚葉細胞を分化させる工程；を含むプロセスにより得られる、方法。

30

【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、

(A) (i) 工程(a)が、約1日～約6日間実施される；および/もしくは(ii) 工程(a)において、多能性幹細胞が、血清不含の分化培地中で培養されかつ約0.5ng/mlの量のヒトBMP、約2.5ng/mlの量のヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)および約100ng/mlの量のヒトアクチビンAと接触されるあるいはインキュベートされる；

40

(B) (i) 工程(b)が、約3日目～約5日目で開始して約2日～約3日間実施される；および/もしくは(ii) 工程(b)においてBMPを阻害する因子が、ノギン(Noggin)およびドルソモルフィンから成る群から選択され、TGFシグナル伝達を阻害する因子が、SB431542であり、HOXA3の発現を刺激する因子が、レチノイン酸であり、かつTBX1の発現を刺激する因子が、FGF8bである；

(C) (i) 工程(c)が、約5日目～約8日目で開始して約6日～約10日間実施される；および/もしくは(ii) 工程(c)においてHOXA3の発現を刺激する因子が、レチノイン酸であり、TBX1の発現を刺激する因子が、FGF8bであり、かつPAX9およびPAX1の発現を刺激する因子が、ソニック・ヘッジホッグ(Shh)であり、ここで工程(c)において工程(c)の開始から約24時間の時点でFGF8bが、約5

50

0 ng/mlの量で用いられかつレチノイン酸が、約0.25 μMの量で用いられかつ工程(c)の開始から48時間の時点でFGF8bが、約50 ng/mlの量で用いられかつShhが、約100 ng/mlの量で用いられる；

(D)(i)工程(d)が、約12日目～約18日目で開始して約4日～約7日間実施される；および/もしくは(ii)工程(d)においてBMPを阻害する因子が、ノギンおよびドルソモルフィンから成る群から選択される；並びに/または

(E)(i)工程(e)が、約19日目～約25日目で開始して約5日～約15日実施される；および/もしくは(ii)工程(e)においてBMPが、約50 ng/mlの量で用いられる、方法。

【請求項3】

請求項1に記載の方法であって、サバイビン阻害剤と方法の終期でTECsもしくはTEPsを接触させるあるいはインキュベートする工程をさらに含む、方法。

【請求項4】

請求項3に記載の方法であって、サバイビン阻害剤が、YM155である、方法。

【請求項5】

胸腺上皮細胞(TECs)を、該胸腺を含む付加的な細胞と組み合わせることを含む、ハイブリッド胸腺を生成するためのインビトロまたはエクスピボの方法であって、前記胸腺上皮細胞は、多能性幹細胞を胸腺上皮細胞または胸腺上皮前駆細胞(TEPs)へと分化誘導するためのプロセスであって；

(a)血清不含の分化培地中で多能性幹細胞を培養することおよびヒト骨形成蛋白質(BMP)、ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)およびヒトアクチビンAと多能性幹細胞を接触させるまたはインキュベートすることにより確定内胚葉細胞に多能性幹細胞を分化させる工程；

(b)血清不含の分化培地中で工程(a)からの確定内胚葉細胞を培養することおよびノギン、SB431542(NS)、レチノイン酸およびFGF8bと確定内胚葉細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより前腸前部細胞に確定内胚葉細胞を分化させる工程；

(c)血清不含の分化培地中で工程(b)からの前腸前部細胞を培養すること、およびFGF8bおよびレチノイン酸続いてFGF8bおよびソニック・ヘッジホッグ(Shh)と前腸前部細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより咽頭内胚葉細胞に前腸前部細胞を分化させる工程；

(d)血清不含の分化培地中で工程(c)からの咽頭内胚葉細胞を培養することおよびノギン(Noggin)と細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより第3咽頭嚢に特化した細胞、TECs、またはTEPsに咽頭内胚葉細胞を分化させる工程；および

(e)血清不含の分化培地中で工程(c)または工程(d)からの咽頭内胚葉細胞を培養することおよびBMPと咽頭内胚葉細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより第3咽頭嚢に特化した細胞、胸腺上皮細胞、または胸腺上皮前駆細胞に咽頭内胚葉細胞をさらに分化させる工程；

を含むプロセスにより得られる、方法。

【請求項6】

請求項1に記載の方法であって、多能性幹細胞が、胚性幹細胞および誘導多能性幹細胞から成る群から選択される、方法。

【請求項7】

請求項5に記載の方法であって、多能性幹細胞が、胚性幹細胞および誘導多能性幹細胞から成る群から選択される、方法。

【請求項8】

請求項5に記載の方法であって、

(A)(i)工程(a)が、約1日～約6日間実施される；および/もしくは(ii)工程(a)においてBMPが、約0.5 ng/mlの量で用いられ、ヒト塩基性線維芽細胞

10

20

30

40

50

増殖因子が、約 2.5 ng/ml の量で用いられ、かつヒトアクチビン A が、約 100 ng/ml の量で用いられる；

(B) (i) 工程 (b) が、約 3 日目～約 5 日目で開始して約 2 日～約 3 日間実施される；および/もしくは (ii) 工程 (b) においてノギンが、約 200 ng/ml の量で用いられ、SB431542 が、約 $10 \mu\text{M}$ の量で用いられ、レチノイン酸が、約 $0.25 \mu\text{M}$ の量で用いられ、かつ FGF8b が、約 50 ng/mL の量で用いられる；

(C) (i) 工程 (c) が、約 5 日目～約 8 日目で開始して約 6 日～約 10 日間実施される；および/もしくは (ii) 工程 (c) において工程 (c) の開始から約 24 時間の時点で、FGF8b が、約 50 ng/mL の量で用いられ、かつレチノイン酸が、約 $0.25 \mu\text{M}$ の量で用いられる；および/もしくは (iii) 工程 (c) において工程 (c) の開始から約 48 時間の時点で FGF8b が、約 50 ng/mL の量で用いられ、かつ Shh が、約 100 ng/ml の量で用いられる；

(D) (i) 工程 (d) が、約 12 日目～約 18 日目で開始して約 4 日～約 7 日間実施される；および/もしくは (ii) 工程 (d) においてノギンが、約 100 ng/ml の量で用いられる；並びに/または

(E) (i) 工程 (e) が、約 19 日目～約 25 日目で開始して約 5 日～約 15 日間実施される；および/もしくは (ii) 工程 (e) において BMP が、約 50 ng/ml の量で用いられる、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

請求項 5 に記載の方法であって、サバイビン阻害剤と方法の終期に TECs または TEPs を接触させるあるいはインキュベートする工程をさらに含む、方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、サバイビン阻害剤が、YM155 である、方法。

【請求項 11】

ハイブリッド胸腺を生成する方法であって、胸腺上皮細胞をブタ胸腺に移植することを含み、前記胸腺上皮細胞は、多能性幹細胞を上皮細胞または胸腺上皮前駆細胞 (TEPs) へと分化誘導するためのプロセスであって、

(a) 確定内胚葉細胞に多能性幹細胞を分化させる工程；

(b) 確定内胚葉細胞を培養する工程および骨形成蛋白質 (BMP) を阻害する因子および TGF シグナル伝達を阻害する因子と確定内胚葉細胞を接触させるあるいはインキュベートすること、および HOXA3 の発現を刺激する因子および TBX1 の発現を刺激する因子と確定内胚葉細胞をさらに接触させるあるいはインキュベートすることにより前腸前部細胞に確定内胚葉細胞を分化させる工程；

(c) 前腸前部細胞を培養する工程および HOXA3 の発現を刺激する因子、TBX1 の発現を刺激する因子、ならびに PAX9 および PAX1 の発現を刺激する因子と前腸前部細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより咽頭内胚葉細胞に前腸前部細胞を分化させる工程；

(d) 咽頭内胚葉細胞を培養する工程および BMP を阻害する因子と咽頭内胚葉細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより遠位咽頭嚢 (PP) に特化した細胞、TECs または TEPs に咽頭内胚葉細胞を分化させる工程；および

(e) 工程 (c) または工程 (d) からの咽頭内胚葉細胞を培養する工程および BMP と咽頭内胚葉細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより遠位咽頭嚢 (PP) に特化した細胞、TECs または TEPs に咽頭内胚葉細胞を分化させる工程；

を含むプロセスにより得られる、方法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法であって、

(A) (i) 工程 (a) が、約 1 日～約 6 日間実施される；および/もしくは (ii) 工程 (a) において、多能性幹細胞が、血清不含の分化培地中で培養されかつ約 0.5 ng/ml の量のヒト BMP、約 2.5 ng/ml の量のヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、および約 100 ng/ml の量のヒトアクチビン A と接触されるあるいはイン

キュベートされる；

(B) (i) 工程 (b) が、約 3 日目～約 5 日目で開始して約 2 日～約 3 日間実施される；および/もしくは (i i) 工程 (b) において、BMP を阻害する因子が、ノギンおよびドルソモフィンから成る群から選択され、TGF シグナル伝達を阻害する因子が、SB431542 であり、HOXA3 の発現を刺激する因子が、レチノイン酸であり、かつ TBX1 の発現を刺激する因子が、FGF8b である；

(C) (i) 工程 (c) が、約 5 日目～約 8 日目で開始して約 6 日～約 10 日間実施される；および/もしくは (i i) 工程 (c) において HOXA3 の発現を刺激する因子が、レチノイン酸であり、TBX1 の発現を刺激する因子が、FGF8b であり、かつ PAX9 および PAX1 の発現を刺激する因子が、ソニック・ヘッジホッグ (Shh) であり、ここで工程 (c) において、工程 (c) の開始から約 24 時間の時点で FGF8b が、約 50 ng/ml の量で用いられかつレチノイン酸が、約 0.25 μM の量で用いられかつ工程 (c) の開始から約 48 時間の時点で FGF8b が、約 50 ng/ml の量で用いられかつ Shh が約 100 ng/ml の量で用いられる；

(D) (i) 工程 (d) が、約 12 日目～約 18 日目で開始して約 4 日～約 7 日間実施される；および/もしくは (i i) 工程 (d) において、BMP を阻害する因子が、ノギンおよびドルソモフィンから成る群から選択される；並びに/または

(E) (i) 工程 (e) が、約 19 日目～約 25 日目で開始して約 5 日～約 15 日間実施される；および/もしくは (i i) 工程 (e) において、BMP が、約 50 ng/ml の量で用いられる、方法。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の方法であって、サバイビン阻害剤と方法の終期で TECs もしくは TEPs を接触させるあるいはインキュベートする工程をさらに含む、方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法であって、サバイビン阻害剤が、YM155 である、方法。

【請求項 15】

ハイブリッド胸腺を生成する方法であって、胸腺上皮細胞をブタ胸腺に移植することを含み、前記胸腺上皮細胞は、多能性幹細胞を上皮細胞または胸腺上皮前駆細胞 (TEPs) へと分化誘導するためのプロセスであって、

(a) 血清不含の分化培地中で多能性幹細胞を培養することおよびヒト骨形成蛋白質 (BMP)、ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) およびヒトアクチビン A と多能性幹細胞を接触させるまたはインキュベートすることにより確定内胚葉細胞に多能性幹細胞を分化させる工程；

(b) 血清不含の分化培地中で工程 (a) からの確定内胚葉細胞を培養することおよびノギン、SB431542 (NS)、レチノイン酸および FGF8b と確定内胚葉細胞を接触させあるいはインキュベートすることにより前腸前部細胞に確定内胚葉細胞を分化させる工程；

(c) 血清不含の分化培地中で工程 (b) からの前腸前部細胞を培養すること、および FGF8b およびレチノイン酸続いて FGF8b およびソニック・ヘッジホッグ (Shh) と前腸前部細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより咽頭内胚葉細胞に前腸前部細胞を分化させる工程；

(d) 血清不含の分化培地中で工程 (c) からの咽頭内胚葉細胞を培養することおよびノギンと咽頭内胚葉細胞を接触させるあるいはインキュベートすることにより、第 3 咽頭嚢に特化した細胞、TECs または TEPs に咽頭内胚葉細胞を分化させる工程；および
(e) 工程 (c) または工程 (d) からの咽頭内胚葉細胞を血清不含の分化培地中で培養し、咽頭内胚葉細胞を BMP と接触させるあるいはインキュベートすることにより、第 3 咽頭嚢に特化した細胞、胸腺上皮細胞、または胸腺上皮細胞前駆細胞に咽頭内胚葉細胞をさらに分化させる工程；

を含むプロセスにより得られる、方法。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

請求項 1 1 に記載の方法であって、多能性幹細胞が、胚性幹細胞および誘導多能性幹細胞から成る群から選択される、方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 5 に記載の方法であって、多能性幹細胞が、胚性幹細胞および誘導多能性幹細胞から成る群から選択される、方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 5 に記載の方法であって、

(A) (i) 工程 (a) が、約 1 日～約 6 日間実施される；および/もしくは (ii) 工程 (a) において、BMP が約 0.5 ng/ml の量で用いられ、ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) が約 2.5 ng/ml の量で用いられ、かつヒトアクチビン A が約 100 ng/ml の量で用いられる；

(B) (i) 工程 (b) が、約 3 日～約 5 日目で開始して約 2 日～約 3 日間実施される；および/もしくは (ii) 工程 (b) において、ノギンが約 200 ng/ml の量で用いられ、SB431542 が約 $10 \mu\text{M}$ の量で用いられ、レチノイン酸が約 $0.25 \mu\text{M}$ の量で用いられ、かつ FGF8b が約 50 ng/ml の量で用いられる；

(C) (i) 工程 (c) が、約 5 日目～約 8 日目で開始して約 6 日～約 10 日間実施される；(ii) 工程 (c) において、工程 (c) の開始から約 24 時間の時点で、FGF8b が約 50 ng/ml の量で用いられ、レチノイン酸が約 0.25 mM の量で用いられる；および/もしくは (iii) 工程 (c) において、工程 (c) の開始から約 48 時間の時点で、FGF8b が約 50 ng/ml の量で用いられ、かつ Shh が約 100 ng/ml の量で用いられる；

(D) (i) 工程 (d) が、約 12 日目～約 18 日目で開始して約 4 日～約 7 日間実施される；および/もしくは (ii) 工程 (d) において、ノギンが約 100 ng/ml の量で用いられる；並びに/または

(E) (i) 工程 (e) が、約 19 日目～約 25 日目で開始して約 5 日～約 15 日間実施される；および/または (ii) 工程 (e) において、BMP が約 50 ng/ml の量で用いられる、方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 5 に記載の方法であって、サバイビン阻害剤と方法の終期で TEs もしくは TEs を接触させるあるいはインキュベートすることをさらに含む、方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の方法であって、サバイビン阻害剤が、YM155 である、方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 1～2 0 のいずれか 1 項に記載の方法であって、ブタ胸腺が、ミニブタ、幼若なブタ、およびブタ胎児から選択されるブタ由来のものである、方法。

【請求項 2 2】

請求項 1～2 0 のいずれか 1 項に記載の方法により生成されたハイブリッド胸腺。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 に記載の方法により生成されたハイブリッド胸腺。

【請求項 2 4】

ヒト胸腺形成を増加させるための、請求項 2 2 に記載のハイブリッド胸腺の使用。

【請求項 2 5】

ヒト胸腺形成を増加させるための、請求項 2 3 に記載のハイブリッド胸腺の使用。

【請求項 2 6】

ヒト T 細胞の発生を改善するための、請求項 2 2 に記載のハイブリッド胸腺の使用。

【請求項 2 7】

ヒト T 細胞の発生を改善するための、請求項 2 3 に記載のハイブリッド胸腺の使用。

10

20

30

40

50