

【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26年1月16日(2014.1.16)

【公表番号】特表2013-512673(P2013-512673A)

【公表日】平成25年4月18日(2013.4.18)

【年通号数】公開・登録公報2013-018

【出願番号】特願2012-542163(P2012-542163)

【国際特許分類】

C 12 N 5/0783 (2010.01)

C 12 N 5/0784 (2010.01)

A 61 K 35/12 (2006.01)

A 61 P 35/00 (2006.01)

A 61 P 37/04 (2006.01)

【F I】

C 12 N 5/00 202 L

C 12 N 5/00 202 M

A 61 K 35/12

A 61 P 35/00

A 61 P 37/04

【手続補正書】

【提出日】平成25年11月22日(2013.11.22)

【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】

ナチュラルキラー(NK)細胞を生成する方法であって、

血管芽細胞を提供する工程、

前記血管芽細胞を、メチルセルロース、並びにIL2、IL3、IL6、IL7、IL15、SCF、およびFLを含む第1のサイトカイン混合物上で培養する工程、

前記培養した細胞を回収する工程、および

前記回収した細胞を、ヒト血清、並びにIL7、IL15、SCF、およびFLを含む第2のサイトカイン混合物を含む液体培地内で培養してNK細胞を生成する工程を含む方法。

【請求項2】

前記メチルセルロースが、H4236メチルセルロースである、請求項1に記載の方法。

。

【請求項3】

前記メチルセルロースが、H4536メチルセルロースである、請求項1に記載の方法。

。

【請求項4】

IL2の濃度が、約5～10ng/mlであり、IL3が約1～10ng/mlであり、IL6が約1～10ng/mlであり、IL7が約5～20ng/mlであり、IL15が約5～10ng/mlであり、SCFが約10～50ng/mlであり、FLが約10～50ng/mlである、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記血管芽細胞の培養が、約6～8日間である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記回収した細胞の培養が、約14～21日間である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

培地を週1回変更して、前記第2のサイトカイン混合物を新しくする工程を更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記血管芽細胞が、ヒト胚性幹細胞(hESC)から分化する、請求項1に記載の方法。
。

【請求項9】

前記血管芽細胞が、誘導多能性(iPS)細胞から分化する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記NK細胞が、未熟NK細胞であり、CD56+およびCD16-である、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記NK細胞が、成熟NK細胞であり、CD56-およびCD16+であるか、またはCD56loおよびCD16+である、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

請求項1～11のいずれか一項に記載の方法により生成されるナチュラルキラー(NK)細胞。

【請求項13】

請求項12に記載のNK細胞をある量含む薬学的に許容される組成物。

【請求項14】

ナチュラルキラー(NK)細胞を生成する方法であって、
血管芽細胞を提供する工程、

前記血管芽細胞を、ヒト血清、並びにIL2、IL3、IL6、IL7、IL15、およびSCFを含む第1のサイトカイン混合物を含む液体培地中で培養する工程、

前記培養した細胞を回収する工程、および

前記回収した細胞を、ヒト血清、並びにIL7、IL15、SCF、およびFLを含む第2のサイトカイン混合物を含む液体培地中で培養して前記NKを生成する工程を含む方法。

【請求項15】

IL2の濃度が、約5～10ng/mlであり、IL3が約1～10ng/mlであり、IL6が約1～10ng/mlであり、IL7が約5～20ng/mlであり、IL15が約5～10ng/mlであり、SCFが約10～50ng/mlであり、FLが約10～50ng/mlである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記血管芽細胞の培養が、約6～8日間である、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記回収した細胞の培養が、約14～21日間である、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

培地を週1回変更して、前記第2のサイトカイン混合物を新しくする工程を更に含む、請求項14に記載の方法。

【請求項19】

前記血管芽細胞が、ヒト胚性幹細胞(hESC)から分化する、請求項14に記載の方法。

【請求項20】

前記血管芽細胞が、誘導多能性(iPS)細胞から分化する、請求項14に記載の方法。
。

【請求項21】

前記 N K 細胞が、未熟 N K 細胞であり、 C D 5 6 + および C D 1 6 - である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 N K 細胞が、成熟 N K 細胞であり、 C D 5 6 - および C D 1 6 + であるか、または C D 5 6 1 o および C D 1 6 + である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 4 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法により生成されるナチュラルキラー(N K)細胞。

【請求項 2 4】

請求項 2 4 に記載の N K 細胞をある量含む薬学的に許容される組成物。

【請求項 2 5】

樹状細胞(D C)を生成する方法であって、

血管芽細胞を提供する工程、

前記血管芽細胞を、ヒト血清、 S C F 、 F L 、 I L 3 、および G M - C S F を含む液体培地中で培養する工程、

前記液体培地に I L 4 を添加する工程、および

前記血管芽細胞を更に培養して、前記 D C を生成する工程を含む方法。

【請求項 2 6】

前記血管芽細胞の培養が、約 7 ~ 1 1 日間である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 I L 4 添加の後の前記血管芽細胞の培養が、約 8 ~ 1 0 日間である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

I L 1 b 、 T N F 、および I L 6 を含むサイトカイン混合物を添加して、前記 D C の成熟化を誘導する工程を更に含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記サイトカイン混合物が、約 4 8 時間添加される、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記サイトカイン混合物が、 P G E 2 、 I F N 2 b 、 P o l y I : C 、 I F N 、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを更に含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

L P S 、 I F N 、および / または S - 2 8 4 6 3 を添加して、前記 D C からの I L 1 2 p 7 0 産生および / または前記 D C からの H L A - D R 発現を刺激する工程を更に含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 2】

S C F の濃度が、約 2 0 ~ 1 0 0 n g / m l であり、 F L が約 1 0 ~ 5 0 n g / m l であり、 I L 3 が約 5 ~ 5 0 n g / m l であり、 G M - C S F が約 5 0 ~ 1 0 0 n g / m l であり、 I L 4 が約 5 0 ~ 1 0 0 n g / m l である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 3】

I L 1 b の濃度が、約 1 0 n g / m l であり、 T N F が、約 1 0 n g / m l であり、 I L 6 が約 1 5 0 n g / m l である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 4】

P G E 2 の濃度が、約 1 μ g / m l であり、 I F N 2 b が約 3 0 0 0 単位 / m l であり、 p o l y I : C が約 2 0 μ g / m l であり、 I F N が約 2 0 n g / m l である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 D C が、成熟 D C であり、 C D 8 3 を発現する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記 D C が、成熟 D C であり、 C D 2 0 9 、 H L A D R 、および / または C D 1 1 c の発現が増加される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

請求項 2 5 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法により生成される樹状細胞 (D C) 。

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載の D C 細胞を有する量含む薬学的に許容される組成物。

【請求項 3 9】

前記血管芽細胞が、以下：

(a) h E S C の胚様体への分化を誘導するのに十分な量の少なくとも一つの成長因子の存在下で無血清培地中に前記 h E S C を含む、細胞培養物を培養する工程；および

(b) 胚様体を含む前記培養物に、少なくとも二つの成長因子を添加して、無血清培地中の前記培養物を培養し続ける工程であって、前記成長因子は、前記胚様体培養物中で血管芽細胞を増殖させるのに十分な量で存在する、工程
を含む方法により、 h E S C から分化し、

前記 h E S C 、胚様体、および血管芽細胞は、前記方法の工程 (a) および (b) にわたって、無血清培地内で増殖し、そして

工程 (b) における、前記少なくとも二つの成長因子は、 B M P 4 、 V E G F 、および / または b F G F を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記血管芽細胞が、以下：

(a) i P S 細胞の胚様体への分化を誘導するのに十分な量の少なくとも一つの成長因子の存在下で無血清培地中に前記 i P S 細胞を含む、細胞培養物を培養する工程；および

(b) 胚様体を含む前記培養物に、少なくとも二つの成長因子を添加して、無血清培地中の前記培養物を培養し続ける工程であって、前記成長因子は、前記胚様体培養物中で血管芽細胞を増殖させるのに十分な量で存在する、工程
を含む方法により、 i P S 細胞から分化し、

前記 i P S 細胞、胚様体、および血管芽細胞は、前記方法の工程 (a) および (b) にわたって、無血清培地内で増殖し、そして

工程 (b) における、前記少なくとも二つの成長因子は、 B M P 4 、 V E G F 、および / または b F G F を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記血管芽細胞が、以下：

(a) h E S C の胚様体への分化を誘導するのに十分な量の少なくとも一つの成長因子の存在下で無血清培地中に前記 h E S C を含む、細胞培養物を培養する工程；および

(b) 胚様体を含む前記培養物に、少なくとも二つの成長因子を添加して、無血清培地中の前記培養物を培養し続ける工程であって、前記成長因子は、前記胚様体培養物中で血管芽細胞を増殖させるのに十分な量で存在する、工程
を含む方法により、 h E S C から分化し、

前記 h E S C 、胚様体、および血管芽細胞は、前記方法の工程 (a) および (b) にわたって、無血清培地内で増殖し、そして

工程 (b) における、前記少なくとも二つの成長因子は、 B M P 4 、 V E G F 、および / または b F G F を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記血管芽細胞が、以下：

(a) i P S 細胞の胚様体への分化を誘導するのに十分な量の少なくとも一つの成長因子の存在下で無血清培地中に前記 i P S 細胞を含む、細胞培養物を培養する工程；および

(b) 胚様体を含む前記培養物に、少なくとも二つの成長因子を添加して、無血清培地中の前記培養物を培養し続ける工程であって、前記成長因子は、前記胚様体培養物中で血管芽細胞を増殖させるのに十分な量で存在する、工程
を含む方法により、 i P S 細胞から分化し、

前記 i P S 細胞、胚様体、および血管芽細胞は、前記方法の工程（ a ）および（ b ）にわたって、無血清培地中で増殖し、そして
工程（ b ）における、前記少なくとも二つの成長因子は、 B M P 4 、 V E G F 、および / または b F G F を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【手続補正 2 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 0 2 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 2 6 】

本発明の種々の実施形態は、本発明の方法のいずれかにより生成された樹状細胞（ D C ）細胞を提供する。本発明の他の実施形態は、本発明の方法のいずれかにより生成された D C をある量含む薬学的に許容される組成物を提供する。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目 1 ）

ナチュラルキラー（ N K ）細胞を生成する方法であって、

血管芽細胞を提供すること、

前記血管芽細胞を、メチルセルロース、並びに I L 2 、 I L 3 、 I L 6 、 I L 7 、 I L 1 5 、 S C F 、および F L を含む第 1 のサイトカイン混合物上で培養すること、

前記培養した細胞を回収すること、および

前記回収した細胞を、ヒト血清、並びに I L 7 、 I L 1 5 、 S C F 、および F L を含む第 2 のサイトカイン混合物を含む液体培地中で培養して N K 細胞を生成することを含む方法。

（項目 2 ）

前記メチルセルロースが、 H 4 2 3 6 メチルセルロースである、項目 1 に記載の方法。

（項目 3 ）

前記メチルセルロースが、 H 4 5 3 6 メチルセルロースである、項目 1 に記載の方法。

（項目 4 ）

I L 2 の濃度が、約 5 ~ 1 0 n g / m l であり、 I L 3 が約 1 ~ 1 0 n g / m l であり、 I L 6 が約 1 ~ 1 0 n g / m l であり、 I L 7 が約 5 ~ 2 0 n g / m l であり、 I L 1 5 が約 5 ~ 1 0 n g / m l であり、 S C F が約 1 0 ~ 5 0 n g / m l であり、 F L が約 1 0 ~ 5 0 n g / m l である、項目 1 に記載の方法。

（項目 5 ）

前記血管芽細胞の培養が、約 6 ~ 8 日間である、項目 1 に記載の方法。

（項目 6 ）

前記回収した細胞の培養が、約 1 4 ~ 2 1 日間である、項目 1 に記載の方法。

（項目 7 ）

培地を週 1 回変更して、前記第 2 のサイトカイン混合物を新しくすることを更に含む、項目 1 に記載の方法。

（項目 8 ）

前記血管芽細胞が、ヒト胚性幹細胞（ h E S C ）から分化する、項目 1 に記載の方法。

（項目 9 ）

前記血管芽細胞が、誘導多能性（ i P S ）細胞から分化する、項目 1 に記載の方法。

（項目 1 0 ）

前記 N K 細胞が、未熟 N K 細胞であり、 C D 5 6 + および C D 1 6 - である、項目 1 に記載の方法。

（項目 1 1 ）

前記 N K 細胞が、成熟 N K 細胞であり、 C D 5 6 - および C D 1 6 + であるか、または

C D 5 6 1 o および C D 1 6 + である、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 2)

項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法により生成されるナチュラルキラー(N K)細胞。

(項目 1 3)

項目 1 2 に記載の N K 細胞を有する量含む薬学的に許容される組成物。

(項目 1 4)

ナチュラルキラー(N K)細胞を生成する方法であつて、
血管芽細胞を提供すること、

前記血管芽細胞を、ヒト血清、並びに I L 2 、 I L 3 、 I L 6 、 I L 7 、 I L 1 5 、および S C F を含む第 1 のサイトカイン混合物を含む液体培地中で培養すること、

前記培養した細胞を回収すること、および

前記回収した細胞を、ヒト血清、並びに I L 7 、 I L 1 5 、 S C F 、および F L を含む第 2 のサイトカイン混合物を含む液体培地中で培養して前記 N K を生成することを含む方法。

(項目 1 5)

I L 2 の濃度が、約 5 ~ 1 0 n g / m l であり、 I L 3 が約 1 ~ 1 0 n g / m l であり、 I L 6 が約 1 ~ 1 0 n g / m l であり、 I L 7 が約 5 ~ 2 0 n g / m l であり、 I L 1 5 が約 5 ~ 1 0 n g / m l であり、 S C F が約 1 0 ~ 5 0 n g / m l であり、 F L が約 1 0 ~ 5 0 n g / m l である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記血管芽細胞の培養が、約 6 ~ 8 日間である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記回収した細胞の培養が、約 1 4 ~ 2 1 日間である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 8)

培地を週 1 回変更して、前記第 2 のサイトカイン混合物を新しくすることを更に含む、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記血管芽細胞が、ヒト胚性幹細胞(h E S C)から分化する、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記血管芽細胞が、誘導多能性(i P S)細胞から分化する、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記 N K 細胞が、未熟 N K 細胞であり、 C D 5 6 + および C D 1 6 - である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記 N K 細胞が、成熟 N K 細胞であり、 C D 5 6 - および C D 1 6 + であるか、または C D 5 6 1 o および C D 1 6 + である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 2 3)

項目 1 4 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法により生成されるナチュラルキラー(N K)細胞。

(項目 2 4)

項目 2 4 に記載の N K 細胞を有する量含む薬学的に許容される組成物。

(項目 2 5)

樹状細胞(D C)を生成する方法であつて、

血管芽細胞を提供すること、

前記血管芽細胞を、ヒト血清、 S C F 、 F L 、 I L 3 、および G M - C S F を含む液体培地中で培養すること、

前記液体培地中に I L 4 を添加すること、および

前記血管芽細胞を更に培養して、前記 D C を生成することを含む方法。

(項目26)

前記血管芽細胞の培養が、約7～11日間である、項目25に記載の方法。

(項目27)

前記IL4添加の後の前記血管芽細胞の培養が、約8～10日間である、項目25に記載の方法。

(項目28)

IL1b、TNF、およびIL6を含むサイトカイン混合物を添加して、前記DCの成熟化を誘導することを更に含む、項目25に記載の方法。

(項目29)

前記サイトカイン混合物が、約48時間添加される、項目28に記載の方法。

(項目30)

前記サイトカイン混合物が、PGE2、IFN2b、Poly I:C、IFN、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを更に含む、項目28に記載の方法。

(項目31)

LPS、IFN、および/またはS-28463を添加して、前記DCからのIL12p70産生および/または前記DCからのHLA-DR発現を刺激することを更に含む、項目25に記載の方法。

(項目32)

SCKの濃度が、約20～100ng/mlであり、FLが約10～50ng/mlであり、IL3が約5～50ng/mlであり、GM-CSFが約50～100ng/mlであり、IL4が約50～100ng/mlである、項目25に記載の方法。

(項目33)

IL1bの濃度が、約10ng/mlであり、TNFが、約10ng/mlであり、IL6が約150ng/mlである、項目28に記載の方法。

(項目34)

PGE2の濃度が、約1μg/mlであり、IFN2bが約3000単位/mlであり、poly I:Cが約20μg/mlであり、IFNが約20ng/mlである、項目30に記載の方法。

(項目35)

前記DCが、成熟DCであり、CD83を発現する、項目25に記載の方法。

(項目36)

前記DCが、成熟DCであり、CD209、HLA-DR、および/またはCD11cの発現が増加される、項目25に記載の方法。

(項目37)

項目25～36のいずれか一項に記載の方法により生成される樹状細胞(DC)。

(項目38)

項目37に記載のDC細胞をある量含む薬学的に許容される組成物。