



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202421780 A

(43) 公開日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：112136655

(22) 申請日：中華民國 112 (2023) 年 09 月 25 日

(51) Int. Cl. :

C12N5/0783 (2010.01)

A61K35/17 (2015.01)

C12N15/63 (2006.01)

C12N15/64 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30) 優先權：2022/09/26

日本

2022-152606

(71) 申請人：國立大學法人京都大學 (日本) KYOTO UNIVERSITY (JP)

日本

日商武田藥品工業股份有限公司 (日本) TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (JP)

日本

(72) 發明人：金子新 KANEKO, SHIN (JP)；入口翔一 IRIGUCHI, SHOICHI (JP)；佐藤崇之 SATO, TAKAYUKI (JP)；葛西義明 KASSAI, YOSHIAKI (JP)

(74) 代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：8 共 72 頁

(54) 名稱

T 細胞的製造方法

(57) 摘要

本發明係揭示：一種調節性 T 細胞經增殖之細胞集團的製造方法，其係包含(1)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下將包含源自多能性幹細胞之 CD4⁺T 細胞之細胞集團進行培養之步驟；藉由該方法所得之包含調節性 T 細胞之細胞集團；以及含有包含該調節性 T 細胞之細胞集團而成之醫藥。

The present invention discloses: a method for manufacturing a cell population in which regulatory T cells have been expanded, the method comprising (1) a step of culturing a cell population containing pluripotent stem cell-derived CD4⁺ T cells in the presence of IL-4 and TGF- β R agonists; a cell population containing regulatory T cells obtained by the method; and a medicament containing the cell population containing the regulatory T cells.

【發明摘要】

【中文發明名稱】 T細胞的製造方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR MANUFACTURING T CELL

【中文】

本發明係揭示：一種調節性 T 細胞經增殖之細胞集團的製造方法，其係包含(1)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下將包含源自多能性幹細胞之 CD4⁺T 細胞之細胞集團進行培養之步驟；藉由該方法所得之包含調節性 T 細胞之細胞集團；以及含有包含該調節性 T 細胞之細胞集團而成之醫藥。

【英文】

The present invention discloses: a method for manufacturing a cell population in which regulatory T cells have been expanded, the method comprising (1) a step of culturing a cell population containing pluripotent stem cell-derived CD4⁺ T cells in the presence of IL-4 and TGF- β R agonists; a cell population containing regulatory T cells obtained by the method; and a medicament containing the cell population containing the regulatory T cells.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 T細胞的製造方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR MANUFACTURING T CELL

【技術領域】

【0001】 本發明係關於調節性 T 細胞經增殖之細胞集團的製造方法；藉由該方法所得之包含調節性 T 細胞之細胞集團；含有包含該調節性 T 細胞之細胞集團之醫藥等。

【先前技術】

【0002】 近年來，由於調節性 T 細胞(regulatory T cell(Treg))具有免疫反應抑制功能，因而以治療各式各樣的自體免疫疾病為目的，在全世界正進行使用調節性 T 細胞之細胞治療(Treg therapy)的研究開發。據此，調節性 T 細胞被期待用於移植物抗宿主病(GvHD)、自體免疫疾病的治療、炎症性疾病、過敏性疾病的治療及預防。

【0003】 調節性 T 細胞可分為二大類：內源性調節性 T 細胞(naturally occurring regulatory T cell(natural Treg)：nTreg，或 thymic Treg：tTreg)及誘導性調節性 T 細胞(inducible regulatory T cell(induced Treg)：iTreg)，已知 nTreg 自然產生於胸腺內，iTreg 係藉由抗原刺激及 IL-2、TGF- β 等細胞介素由末梢血液中之初始 T 細胞分化誘導出。此等調節性 T 細胞可進一步依照表現於該細胞之標記的種類而加以細分。

【0004】從生體去除調節性 T 細胞時，各種臟器特異性自體免疫疾病會自然發病，此時，若移植調節性 T 細胞，則阻止自體免疫疾病的發病，因而認為調節性 T 細胞於維持末梢之免疫自體耐受性方面發揮重要的作用。隨後，已明確得知調節性 T 細胞不僅可抑制自體免疫，還可抑制由外來抗原所引發之炎症、由移植所引發之排斥反應、感染免疫、過敏、腫瘤免疫等大部分的免疫反應。再者，此調節性 T 細胞的主要調節子已知有轉錄因子 FOXP3。

【0005】FOXP3 為 Treg 的主要調節子，已知在 Treg 中恆定地表現 FOXP3，以及在不具有抑制功能之通常型 T 細胞(有時亦稱為 Tconv(conventional T 細胞)、效應 T 細胞、炎症性 T 細胞)中則未觀察到恆定的表現。於是，已進行關於初級 Treg(primary Treg)中之 FOXP3 的表現維持及初級 Tconv 或大量(bulk)的 CD4 單陽性(SP)T 細胞中之 FOXP3 表現誘導之研究，並已報導具有該等表現維持及表現誘導的活性之化合物、細胞介素、其組合。如此之化合物、細胞介素有 IL-3(非專利文獻 1)、TGF- β (非專利文獻 2、3)、IL-4(非專利文獻 4、5)等。

【0006】再者，如此之化合物、細胞介素及其組合有屬於 CDK8/19 阻礙藥之 AS2863619(非專利文獻 6)、屬於 mTOR 阻礙劑之雷帕黴素(Rapamycin)(非專利文獻 7、非專利文獻 8、非專利文獻 9、非專利文獻 10)、TNFR2 促效劑抗體(非專利文獻 9、非專利文獻 11、非專利文獻 12)、細胞介素 TGF- β (非專利文獻 6、非專利文獻 10)等。

【0007】針對 IL-3、IL-4 及 TGF- β 對初級 Treg 的效果，儘管已分別如上述般報導，但並未有 IL-4 與 TGF- β (進一步於其中添加 IL-3)的組合為特佳之報導。關於 IL-4，同時存在對 Treg 的分化及功能有利或不利之報導。再者，在非

專利文獻 3 中，已報導藉由添加 IL-4 可獲得與 TGF- β 完全不同的效果，小鼠 Treg 中之 FOXP3 的表現及 Treg 的增殖會因 IL-4 而受到抑制。

【0008】關於源自多能性幹細胞之調節性 T 細胞，尚未知維持 FOXP3 的表現之化合物及細胞介素以及其組合、從不表現 FOXP3 之 T 細胞誘導 FOXP3 表現之化合物及細胞介素以及其組合等，且未記載於先前所列舉之文獻中。再者，雖然期望工業性且製造效率(產率)較高的製造方法，但已知調節性 T 細胞難以增殖，特別是，在保持其抑制功能之同時進行增殖，遂期待其有效率的製造方法。

【0009】在非專利文獻 13 中，關於由 FOXP3 中之變異所引起之 IPEX(Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked)症候群，為了使 FOXP3 的表現恢復，已記載使用慢病毒載體將基因導入自體的造血幹細胞中，並將該細胞投予至 IPEX 症候群的模型小鼠。其結果，已報導造血幹細胞分化成功能性調節性 T 細胞，從自體免疫性表現型恢復。再者，在專利文獻 1 中亦記載包含核苷酸序列之重組慢病毒載體，該核苷酸序列係編碼同樣的人類 FOXP3 蛋白質。

【0010】在專利文獻 2 中，已揭示使 Mcl-1 與 Foxp3 共同進行表現對於提升 Treg 的生存而言實屬重要。再者，在專利文獻 3 中，已揭示包含導入基因之經基因操作之哺乳動物細胞，該導入基因係編碼促進向 CD4⁺Treg 之分化之分化系列決定因子。在專利文獻 4 中，已揭示藉由將包含表現 Notch 配體之間質細胞的選擇集團及幹細胞或前驅細胞的選擇集團之三維細胞凝集體進行培養，而從幹細胞或前驅細胞調製 T 細胞的組成物之方法。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0011】

[專利文獻 1]國際公開第 2019/040655 號

[專利文獻 2]國際公開第 2014/180943 號

[專利文獻 3]國際公開第 2021/092581 號

[專利文獻 4]國際公開第 2017/075389 號

[非專利文獻]

【0012】

[非專利文獻 1]J Immunol (2011) 186:2262-2272

[非專利文獻 2]J Exp Med (2003) 198(12):1875-1886

[非專利文獻 3]Immunology (2009) 128:e670-e678

[非專利文獻 4]Front. Immunol. 8:1508. doi:10.3389/fimmu.2017.01508

[非專利文獻 5]Immunology. 2009 Jul; 127(3):338-344

[非專利文獻 6]Sci. Immunol. 4, eaaw2707 (2019)

[非專利文獻 7]Nat. Immunol. 20(9), 1208-1219 (2019)

[非專利文獻 8]Clin. Exp. Immunol., 197(1):52-63. (2019)

[非專利文獻 9]Front. Immunol. 9:573 (2018)

[非專利文獻 10]PLoS One., 11(2):e0148474. (2016)

[非專利文獻 11]PLoS One., 11(5), e0156311 (2016)

[非專利文獻 12]Sci. Signal. 13, eaba9600 (2020)

[非專利文獻 13]Cell Stem Cell 24, 309-317, February 7, 2019

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

【0013】 本發明之目的係提供一種調節性 T 細胞經增殖之細胞集團的製造方法，其可以高效率且維持其抑制功能之同時使調節性 T 細胞進行增殖。

[解決課題之手段]

【0014】 本發明者等人為了達成上述目的而反覆致力研究之結果，獲得藉由在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下，培養包含源自多能性幹細胞(特別是，iPS 細胞)之 CD4⁺T 細胞之細胞集團，可以高效率且維持其抑制功能之同時使調節性 T 細胞增殖之見解。

【0015】 本發明係基於此等見解進一步反覆檢討而完成者，其提供下述之調節性 T 細胞經增殖之細胞集團的製造方法、包含調節性 T 細胞之細胞集團、醫藥等。

【0016】 [1]一種調節性 T 細胞經增殖之細胞集團的製造方法，其包含(1)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下，培養包含源自多能性幹細胞之 CD4⁺T 細胞之細胞集團之步驟。

[2]如[1]所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑及 IL-3 的存在下進行前述步驟(1)。

[3]如[1]所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑及 IL-33 的存在下進行前述步驟(1)。

[4]如[1]所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3 及 IL-33 的存在下進行前述步驟(1)。

[5]如[1]至[4]中任一項所記載之方法，其係進一步在選自由 IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑所組成之群組中之至少 1 種以上的存在下進行前述步驟(1)。

[6]如[5]所記載之方法，其係進一步在 IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

[7]如[1]至[6]中任一項所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3、IL-33、IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

[8]如[1]至[7]中任一項所記載之方法，其係進一步在 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

[9]如[1]至[8]中任一項所記載之方法，其中，前述 TGF- β R 促效劑為 TGF- β 。

[10]如[5]至[9]中任一項所記載之方法，其中，前述 mTOR 阻礙劑為雷帕黴素。

[11]如[5]至[10]中任一項所記載之方法，其中，前述 TNFR2 促效劑為 TNFR2 促效劑抗體。

[12]如[8]至[11]中任一項所記載之方法，其中，前述 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑為選自由 4-[1-(2-甲基-1H-苯并咪唑-5-基)-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基]-1,2,5-噁二唑-3-胺、3-{ 1-[1-(4-甲氧基苯基)哌啶-4-基]-4-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基 } 吡啶-2-胺、以及 CDK8 及/或 CDK19 的 siRNA 所組成之群組中之至少 1 種。

[13]如[1]至[12]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD25⁺/FOXP3⁺細胞。

[13a]如[1]至[12]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD25⁺/CD127⁻細胞。

[13b]如[1]至[13a]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 Helios⁺細胞。

[13c]如[1]至[13b]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CTLA4⁺細胞。

[13d]如[1]至[13c]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD39⁺細胞。

[13e]如[1]至[13d]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD73⁺細胞。

[14]如[1]至[13e]中任一項所記載之方法，其中，前述 CD4⁺T 細胞為選自由 CD25⁺/FOXP3⁺細胞及 CD25⁻/FOXP3⁻細胞所組成之群組中之至少 1 種細胞。

[15]如[1]至[14]中任一項所記載之方法，其中，前述 CD4⁺T 細胞為導入有表現構築物之細胞，該表現構築物包含下列(a)至(c)：

(a)FOXP3 基因的保守非編碼序列(Conserved Non-coding Sequence, CNS)1、CNS2 及 CNS3；

(b)啟動子；以及

(c)編碼 FOXP3 之核酸。

[16]如[1]至[15]中任一項所記載之方法，其中，在前述步驟(1)之前，進一步包含(2)將多能性幹細胞分化誘導成包含 CD4⁺T 細胞之細胞集團之步驟。

[17]如[16]所記載之方法，其中，在前述步驟(2)之前，進一步包含(3)將表現構築物導入至多能性幹細胞中之步驟，該表現構築物包含下列(a)至(c)：

(a)FOXP3 基因的 CNS1、CNS2 及 CNS3；

(b)啟動子；以及

(c)編碼 FOXP3 之核酸。

[17a]如[1]至[17]中任一項所記載之方法，其包含(4)在包含多能性幹細胞(特別是，iPS 細胞)、CD4⁺T 細胞或調節性 T 細胞之細胞集團中導入外來基因(特別是，用以表現嵌合抗原受體之基因)之步驟。

[18]一種調節性 T 細胞的增殖方法，其包含(1A)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下，培養包含源自多能性幹細胞之調節性 T 細胞之細胞集團之步驟。

[18a]如[18]所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑及 IL-3 的存在下進行前述步驟(1)。

[18b]如[18]所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑及 IL-33 的存在下進行前述步驟(1)。

[18c]如[18]所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3 及 IL-33 的存在下進行前述步驟(1)。

[18d]如[18]至[18c]中任一項所記載之方法，其係進一步在選自由 IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑所組成之群組中之至少 1 種以上的存在下進行前述步驟(1)。

[18e]如[18d]所記載之方法，其係進一步在 IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

[18f]如[18]至[18e]中任一項所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3、IL-33、IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

[18g]如[18]至[18f]中任一項所記載之方法，其係進一步在 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

[18h]如[18]至[18g]中任一項所記載之方法，其中，前述 TGF- β R 促效劑為 TGF- β 。

[18i]如[18d]至[18h]中任一項所記載之方法，其中，前述 mTOR 阻礙劑為雷帕黴素。

[18j]如[18d]至[18i]中任一項所記載之方法，其中，前述 TNFR2 促效劑為 TNFR2 促效劑抗體。

[18k]如[18g]至[18j]中任一項所記載之方法，其中，前述 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑為選自由 4-[1-(2-甲基-1H-苯并咪唑-5-基)-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基]-1,2,5-噁二唑-3-胺、3-{1-[1-(4-甲氧基苯基)哌啶-4-基]-4-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基}吡啶-2-胺以及 CDK8 及/或 CDK19 的 siRNA 所組成之群組中之至少 1 種。

[18l]如[18]至[18k]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD25⁺/FOXP3⁺細胞。

[18m]如[18]至[18l]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD25⁺/CD127⁺細胞。

[18n]如[18]至[18m]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 Helios⁺細胞。

[18o]如[18]至[18n]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CTLA4⁺細胞。

[18p]如[18]至[18o]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD39⁺細胞。

[18q]如[18]至[18p]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD73⁺細胞。

[18r]如[18]至[18q]中任一項所記載之方法，其中，前述源自多能性幹細胞之調節性 T 細胞為導入有表現構築物之細胞，該表現構築物包含下列(a)至(c)：

(a)FOXP3 基因的保守非編碼序列(CNS)1、CNS2 及 CNS3；

(b)啟動子；以及

(c)編碼 FOXP3 之核酸。

[18s]如[18]至[18r]中任一項所記載之方法，其中，在前述步驟(1)之前，進一步包含(2)將多能性幹細胞分化誘導成包含調節性 T 細胞之細胞集團之步驟。

[18t]如[18s]所記載之方法，其中，在前述步驟(2)之前，進一步包含(3)將表現構築物導入多能性幹細胞中之步驟，該表現構築物包含下列(a)至(c)：

(a)FOXP3 基因的 CNS1、CNS2 及 CNS3；

(b)啟動子；以及

(c)編碼 FOXP3 之核酸。

[18u]如[18]至[18t]中任一項所記載之方法，其包含(4)在包含多能性幹細胞(特別是，iPS 細胞)或調節性 T 細胞之細胞集團中導入外來基因(特別是，用於表現嵌合抗原受體之基因)之步驟。

[19]一種包含調節性 T 細胞之細胞集團的製造方法，其包含(1B)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下，培養包含源自多能性幹細胞之 CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺ T 細胞之細胞集團之步驟。

[19a]如[19]所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑及 IL-3 的存在下進行前述步驟(1)。

[19b]如[19]所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑及 IL-33 的存在下進行前述步驟(1)。

[19c]如[19]所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3 及 IL-33 的存在下進行前述步驟(1)。

[19d]如[19]至[19c]中任一項所記載之方法，其係進一步在選自由 IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑所組成之群組中之至少 1 種以上的存在下進行前述步驟(1)。

[19e]如[19d]所記載之方法，其係進一步在 IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

[19f]如[19]至[19e]中任一項所記載之方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3、IL-33、IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

[19g]如[19]至[19f]中任一項所記載之方法，其係進一步在 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

[19h]如[19]至[19g]中任一項所記載之方法，其中，前述 TGF- β R 促效劑為 TGF- β 。

[19i]如[19d]至[19h]中任一項所記載之方法，其中，前述 mTOR 阻礙劑為雷帕黴素。

[19j]如[19d]至[19i]中任一項所記載之方法，其中，前述 TNFR2 促效劑為 TNFR2 促效劑抗體。

[19k]如[19g]至[19j]中任一項所記載之方法，其中，前述 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑為選自由 4-[1-(2-甲基-1H-苯并咪唑-5-基)-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基]-1,2,5-噁二唑-3-胺、3-{1-[1-(4-甲氧基苯基)哌啶-4-基]-4-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基}吡啶-2-胺以及 CDK8 及/或 CDK19 的 siRNA 所組成之群組中之至少 1 種。

[19l]如[19]至[19k]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD25⁺/FOXP3⁺細胞。

[19m]如[19]至[19k]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD25⁺/CD127⁺細胞。

[19n]如[19]至[19m]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 Helios⁺細胞。

[19o]如[19]至[19n]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CTLA4⁺細胞。

[19p]如[19]至[19o]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD39⁺細胞。

[19q]如[19]至[19p]中任一項所記載之方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD73⁺細胞。

[19r]如[19]至[19q]中任一項所記載之方法，其中，在前述步驟(1)之前，進一步包含(2)將多能性幹細胞分化誘導成包含 CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺ T 細胞之細胞集團之步驟。

[19s]如[19]至[19r]中任一項所記載之方法，其包含(4)在包含多能性幹細胞(特別是，iPS 細胞)、CD4⁺/CD25⁻/FOXP3⁺T 細胞或調節性 T 細胞之細胞集團中導入外來基因(特別是，用以表現嵌合抗原受體之基因)之步驟。

[20]如[1]至[19s]中任一項所記載之方法，其中，前述多能性幹細胞為 iPS 細胞。

[21]一種包含調節性 T 細胞之細胞集團，其係藉由[1]至[20]中任一項所記載之方法獲得者。

[22]一種醫藥，其係含有[21]所記載之包含調節性 T 細胞之細胞集團而成者。

[23]如[22]所記載之醫藥，其係用於預防及/或治療免疫反應的異常亢進。

[24]一種免疫反應的異常亢進的預防及/或治療方法，其包含將[21]所記載之包含調節性 T 細胞之細胞集團投予至對其有需求之對象。

[25]如[21]所記載之包含調節性 T 細胞之細胞集團，其係用以在免疫反應的異常亢進的預防及/或治療中使用。

[26]一種[21]所記載之包含調節性 T 細胞之細胞集團的用途，其係製造用以預防及/或治療免疫反應的異常亢進之醫藥。

[發明效果]

【0017】 根據本發明，能夠以高效率且維持其抑制功能之同時使調節性 T 細胞增殖。

【圖式簡單說明】

【0018】

圖 1 係顯示將從 iPS 細胞分化誘導成 Treg 後之細胞，以包含 IL-4 及 TGF- β 1 之培養基進行擴大培養時之經時性細胞數的變化結果之圖表。

圖 2 顯示使用實施例 1 中經擴大培養之 Treg，檢討在 Treg 中表現之蛋白質的表現量而得之結果之圖。圖中之所有點陣圖表示 CD3⁺CD4⁺CD8⁻集團。圖表的第一行的數值表示在各細胞集團中之 Treg(CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25⁺FOXP3⁺)的比例。

圖 3 顯示使用實施例 1 中經擴大培養之 Treg，與源自人類 PBMC 之同種異體(allogeneic)T 細胞共培養後，經由流式細胞儀所得之分析結果之圖。圖中之以 %表示之數值表示目標細胞在細胞分裂中之抑制率。Treg: 目標(Target)表示 Treg 與人類 T 細胞的細胞數之比。

圖 4 顯示將從 iPS 細胞分化誘導成 CD4⁺T 細胞後之細胞，以包含或不包含 IL-4、TGF- β 1、IL-3 及 IL-33 之培養基反覆進行擴大培養時之經時性細胞數的變化結果之圖表。

圖 5 顯示使用實施例 4 中經擴大培養之細胞集團，檢討在 Treg 中表現之蛋白質的表現量而得之結果之圖。圖中之所有點陣圖表示 CD3⁺CD4⁺CD8⁻集團。再者，圖表的數值表示在各細胞集團中之 Treg(CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25⁺FOXP3⁺)的比例。

圖 6 顯示使用實施例 4 中經擴大培養而得之細胞集團，與源自人類 PBMC 之同種異體 T 細胞共培養後，經由流式細胞儀所得之分析結果之圖。圖中之以 %表示之數值表示目標細胞在細胞分裂中之抑制率。Treg:目標(Target)表示 Treg 與人類 T 細胞的細胞數之比。

圖 7 顯示將從 iPS 細胞分化誘導成 CD4⁺T 細胞後之細胞，以包含 IL-4、TGF- β 1、IL-3、IL-33 及 CDK8/19 阻礙劑之培養基進行擴大培養時之經時性細胞數的變化結果之圖表。

圖 8 顯示使用實施例 7 中經擴大培養之細胞集團，檢討在 Treg 中表現之蛋白質的表現量而得之結果之圖。圖中之所有點陣圖表示 CD3⁺CD4⁺CD8⁻集團。再者，圖表的數值表示在各細胞集團中之 Treg(CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25⁺FOXP3⁺) 的比例。

【實施方式】

【0019】 以下，針對本發明的實施形態詳細地說明。

【0020】 所謂「包含(comprise(s)或 comprising)…」，意指表示包含接續於該語句之要素，但不限定於此。因此，暗示包含接續於該語句之要素，但並未暗示排除其他任意的要素。所謂「由…所組成(consist(s) of 或 consisting of)」，意指含括接續於該語句之所有要素，且限定於此。因此，「由…所組成」之語句表示所列舉之要素是被要求或必須的，且實質上不存在其他要素。所謂「本質上由…所組成(consist(s) essentially of 或 consisting essentially of)」，意指包含接續於該語句之任意的要素，且針對該要素限定於不影響本揭示所特定之活性或作用之其他要素。因此，「本質上由…所組成」之語句表示所列舉之要素是被要求或必須的，但其他要素為任意選擇，因應該等是否會對所列舉之要素的活性或作用造成影響，有存在之情形，亦有不存在之情形。

【0021】 在本說明書中，所謂「培養」係指在活體外(in vitro)環境維持細胞或/及使其增殖。所謂「進行培養」意指在組織外或體外，例如，在細胞培養皿或燒瓶中使細胞持續或/及增殖。

【0022】 在本說明書中，所謂「在物質的存在下培養細胞集團」係指例如在包含物質之培養基中培養細胞集團。如此之培養可列舉例如僅在該物質、或該物質及其他分化誘導因子等共存之培養基中之培養。在將該物質添加至培養基中之情況，可直接添加至培養基中，或者將該物質在使用時以適切的溶劑溶解後，添加至培養基中。再者，亦可將該物質固定化於培養時之基板及載體表面上而進行培養。

【0023】 在本說明書中，所謂「陽性(positive(+))」意指蛋白質或基因以該領域公知的手法可檢測之量進行表現。再者，在表現於細胞內且並未出現於細胞表面之蛋白質(例如轉錄因子或其次單元等)之情況，藉由使該蛋白質與報導子蛋白質共同表現，並檢測該報導子蛋白質，則可檢測出作為對象之蛋白質。基因的檢測可利用例如 RT-PCR、微陣列、生物晶片及 RNAseq 等核酸增幅方法及/或核酸檢測方法進行。

【0024】 在本說明書中，所謂「陰性(negative(-))」意指蛋白質或基因的表現量未達如上述之公知手法之全部或任一者之檢測下限值，或者其表現的程度屬低表現性。蛋白質或基因的表現的檢測下限值可因各手法而異。蛋白質或基因的表現的程度(低表現性或高表現性)，係可藉由與在同一條件下測得之對照細胞的結果進行比較而加以判斷。例如，某種細胞的集團中之 CD25 的表現程度可使用流式細胞儀，將該細胞集團中之 CD25 表現量與源自 PBMC 之 Tconv(對照：

已知為 CD25 低表現性)中之 CD25 表現量進行比較，在可觀察到與對照同等的表現之情況時判斷為低表現性，在表現高於對照細胞之情況時判斷為高表現性。

【0025】 在本說明書中，所謂「標記」意指在預定的細胞型中，特異性地表現於細胞表面、細胞質內、核內等之蛋白質或其基因。標記較佳為「細胞表面標記」。所謂「細胞表面標記」係指表現於細胞表面之蛋白質，其能夠藉由螢光物質予以標識(染色)，並容易地進行表現細胞表面標記之細胞的檢測、濃縮、分離等。所謂該細胞表面標記，係指在預定的細胞型中，特異性地表現(陽性標記)或未表現(陰性標記)之基因，具體而言，生成(陽性標記)或不生成(陰性標記)基因體中之由該基因的轉錄所得之 mRNA、或由該 mRNA 的轉譯所得之蛋白質之物質。

【0026】 如此之細胞表面標記的檢測可利用使用針對該細胞表面標記之特異性抗體之免疫學檢驗，例如 ELISA、免疫染色、流式細胞儀來進行。

【0027】 在本說明書中，所謂「表現(expression)」係定義為藉由細胞內之啟動子所驅動之特定的核苷酸序列的轉錄及/或轉譯。

【0028】 在本說明書中，所謂「多能性幹細胞(pluripotent stem cell)」係指胚胎幹細胞(ES 細胞)及潛在性地具有與其同樣的分化多能性，亦即，分化成生體的各式各樣組織(內胚層、中胚層、外胚層的全部)之能力之細胞。具有與 ES 細胞同樣的分化多能性之細胞可列舉「誘導性富潛能幹細胞」(本說明書中，有時亦稱為「iPS 細胞」)。

【0029】 在本說明書中，所謂「造血幹細胞(HSC)」係可分化成血球系細胞之多潛能性幹細胞(multipotent stem cell)。造血幹細胞在人類生體內主要存在於骨髓，分化成白血球(嗜中性球、嗜酸性球、嗜鹼性球、淋巴球、單核球、巨噬

細胞)、紅血球、血小板、肥大細胞、樹突狀細胞等。在本說明書中，造血幹細胞(HSC)可為 CD34 陽性，CD7 陰性(CD34⁺/CD7⁻)。另外，本說明書中，「CD34⁺/CD7⁻」等表述中所使用之所謂「/」意指「及」。

【0030】 在本說明書中，本說明書所謂的「造血前驅細胞」(HPC)，係具有分化成血球系細胞之能力，但不具有如同幹細胞般之自體再生能力之細胞。造血前驅細胞在人類生體內主要存在於骨髓。在本說明書中，造血前驅細胞(HPC)可為 CD34 陽性，CD43 陽性(CD34⁺/CD43⁺)。再者，HPC 係如國際公開第 2018/199186 號所記載，可為 CD24、CD62L、CD90、CD143、CD263、Notch3、CD32、CD39、CD49a、CD164、CD317、CD200、CD218a、CD7、CD144、CD56、CD226、CD262 及 CD325 陽性，可為 CD49f、CD51、CD102、CD42b、CD61、CD62P、CD69、CD102 及 CD156c 陰性。

【0031】 在本說明書中，所謂「造血性內皮細胞(hemogenic endothelial cell: HEC)」係表現 CD34 且不表現 CD43、CD184 及 CD73(CD34⁺/CD43⁻/CD184⁻/CD73⁻)之細胞(另外，由於 CD34⁺/CD43⁻/CD184⁻/CD73⁻細胞不表現 CD7，因而 CD34⁺/CD43⁻/CD184⁻/CD73⁻細胞亦表示為 CD34⁺/CD7⁻/CD43⁻/CD184⁻/CD73⁻細胞)。

【0032】 在本說明書中，所謂「T 前驅細胞(proT)」意指在人類生體內，從造血幹細胞分化成 CD3 陽性 T 細胞之過程中所產生之造血系細胞，其係 CD34 及 CD7 陽性(CD34⁺/CD7⁺細胞)。再者，在本說明書中，proT 可為 CD43、CD1a 及/或 CD116 陰性。

【0033】 在本說明書中，所謂「中胚層前驅細胞」意指表現例如選自由 T(與 Brachyury 同義)、KDR、FOXF1、FLK1、BMP4、MOX1 及 SDF1 所組成之標記

基因中之至少一種標記基因之細胞。中胚層前驅細胞不是與中胚層細胞有所區別者，亦可將上述標記基因的表現較弱者稱為中胚層前驅細胞。

【0034】 在本說明書中，所謂「調節性 T 細胞」意指在接受透過 T 細胞受體之刺激時，具有可阻礙效應 T 細胞的活化之能力，並掌控免疫反應的抑制(免疫耐受性)之 T 細胞。調節性 T 細胞通常為 CD25⁺/FOXP3⁺細胞或 CD25⁺/CD127⁻細胞，其中，存在 CD4⁺或 CD8⁺的細胞。在本發明中，調節性 T 細胞可為 CD4⁺的細胞(亦即，CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺或 CD4⁺/CD25⁺/CD127⁻)，亦可為 CD8⁺的細胞(亦即，CD8⁺/CD25⁺/FOXP3⁺或 CD8⁺/CD25⁺/CD127⁻)，更佳為 CD4⁺的細胞。再者，CD4⁺/CD25⁺調節性 T 細胞的主要調節子已知有轉錄因子 FOXP3。除此以外，調節性 T 細胞可為作為顯現調節性 T 細胞的抑制功能之指標被已知之 Helios、CTLA4(Cytotoxic T Lymphocyte (associated) Antigen 4)(CD152)、CD39 及 CD73 陽性。Helios 為 Ikaros 轉錄因子家族的成員，已顯示其與 Foxp3 啟動子結合並使 Foxp3 的表現增加。CTLA4 為免疫檢查點蛋白質，若表現於 T 細胞的表面之 CTLA4 在抗原呈現細胞的表面與 CD80 或 CD86 結合，則 T 細胞的活化會受到抑制。再者，已知有若 CD39 及 CD73 分別水解 ATP 及 AMP 並產生腺苷作為最終產物，腺苷作用於 T 細胞，則 T 細胞的活化會受到抑制之機制。

【0035】 在本說明書中，所謂「CD4⁺T 細胞」意指 T 細胞之中，表面抗原的 CD4 呈陽性之細胞。較佳係 CD4⁺T 細胞為 CD8 陰性(CD4⁺/CD8⁻，CD4 單陽性(SP))，此時，T 細胞可藉由屬於表面抗原之 CD3 及 CD45 呈陽性而加以識別，故 CD4⁺T 細胞可鑑定為 CD8 呈陰性且 CD4、CD3 及 CD45 呈陽性之細胞(CD4⁺/CD8⁻/CD3⁺/CD45⁺細胞)。CD4⁺T 細胞可列舉例如輔助性 T 細胞、調節性 T 細

胞。本說明書中之「CD4⁺T 細胞」較佳為 CD4⁺/CD25⁻/FOXP3⁻細胞或 CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺細胞。

【0036】 在本說明書中，所謂「CD8⁺T 細胞」意指 T 細胞之中，表面抗原的 CD8 呈陽性之細胞。較佳係 CD8⁺T 細胞為 CD4 陰性(CD4⁻/CD8⁺，CD8 單陽性(SP))，此時，T 細胞可藉由屬於表面抗原之 CD3 及 CD45 呈陽性而加以識別，故 CD8⁺T 細胞可鑑定為 CD4 呈陰性且 CD8、CD3 及 CD45 呈陽性之細胞(CD4⁻/CD8⁺/CD3⁺/CD45⁺細胞)。CD8⁺T 細胞可列舉例如細胞傷害性 T 細胞、調節性 T 細胞。本說明書中之「CD8⁺T 細胞」較佳為 CD8⁺/CD25⁻/FOXP3⁻細胞或 CD8⁺/CD25⁺/FOXP3⁺細胞。

【0037】 在本說明書中，所謂「間質細胞」係指在生體組織中，構成支持實質細胞之結締組織之細胞，特別是，可製作產生 T 細胞之 ATO(人工胸腺類器官(artificial thymic organoid))之間質細胞，代表性的有骨髓、胸腺等造血系組織所包含之間質細胞，可列舉例如纖維母細胞、血球細胞、間葉系幹細胞、內皮細胞、平滑肌細胞、上皮細胞、組織幹細胞等。間質細胞可為屬於小鼠骨髓細胞株之 MS-5、OP9、S17、屬於人類間質細胞株之 HS-5、HS-27a 等株化細胞、採自人類等之初代細胞及從人類等的多能性幹細胞(iPS 細胞等)分化誘導出之細胞，在從人類等的多能性幹細胞分化誘導出之細胞之情況，較佳為從人類 iPS 細胞分化誘導出之間質細胞(特別是，從人類 iPS 細胞分化誘導出之纖維母細胞)。

【0038】 在本說明書中，所謂「CD4CD8 雙陽性 T 細胞」意指 T 細胞之中，表面抗原的 CD4 及 CD8 同時呈陽性之細胞(CD8⁺/CD4⁺)，T 細胞可藉由屬於表面抗原之 CD3 及 CD45 呈陽性而加以識別，故 CD4CD8 雙陽性 T 細胞可鑑定為 CD4、CD8、CD3 及 CD45 呈陽性之細胞(CD8⁺/CD4⁺/CD3⁺/CD45⁺細胞)。

【0039】 在本說明書中，所謂「CD4CD8 雙陰性 T 細胞」意指 T 細胞之中，表面抗原的 CD4 及 CD8 同時呈陰性之細胞(CD8⁻/CD4⁻)，T 細胞可藉由屬於表面抗原之 CD3 及 CD45 呈陽性而加以識別，故 CD4CD8 雙陰性 T 細胞可鑑定為 CD4 及 CD8 呈陰性且 CD3 及 CD45 呈陽性之細胞(CD8⁻/CD4⁻/CD3⁺/CD45⁺細胞)。

【0040】 在本說明書中，所謂「細胞集團(population)」意指相同種類或不同種類的 2 個以上的細胞。「細胞集團(population)」也意指相同種類或不同種類的細胞的團塊(mass)。

【0041】 在本說明書中，所謂「調節性 T 細胞經增殖」、「調節性 T 細胞的增殖」係指相較於培養前或如未實施本發明所得之細胞般之對照，細胞集團中之調節性 T 細胞的數量(絕對數)為增加，例如，其意指相較於培養前或對照增加至少 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%。在本發明的特定實施形態中，相較於培養前或對照的細胞的數量，以使藉由本發明所製造之細胞集團中之調節性 T 細胞的數量(絕對數)增加至少 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%之方式進行製造。

【0042】 從應用於治療之觀點而言，本發明中所使用之各種細胞較佳為 GMP(Good Manufacturing Practice)規格的細胞。

【0043】 多能性幹細胞可列舉例如胚胎幹細胞(embryonic stem cell：ES 細胞)、誘導性富潛能幹細胞(induced pluripotent stem cell：iPS 細胞)、胚胎腫瘤細胞(EC 細胞)、胚胎生殖幹細胞(EG 細胞)、Muse 細胞，較佳為 iPS 細胞(更佳為人

類 iPS 細胞)。在上述多能性幹細胞為 ES 細胞或源自於人類胚胎之任意的細胞之情況，該細胞可為破壞胚胎所製成之細胞，或者亦可為未破壞胚胎所製成之細胞，較佳為未破壞胚胎所製成之細胞。

【0044】「ES 細胞」若為小鼠 ES 細胞，能夠利用 inGenious targeting laboratory 公司、理研(理化學研究所)等所建立之各種小鼠 ES 細胞株，若為人類 ES 細胞，能夠利用威斯康辛大學、NIH、理研、京都大學、日本國立成育醫療研究中心、Cellartis 公司等所建立之各種人類 ES 細胞株。例如，人類 ES 細胞株可利用 ESI Bio 公司所分讓之 CHB-1 至 CHB-12 株、RUES1 株、RUES2 株、HUES1 至 HUES28 株等、WiCell Research 所分讓之 H1 株、H9 株等、理研所分讓之 KhES-1 株、KhES-2 株、KhES-3 株、KhES-4 株、KhES-5 株、SSES1 株、SSES2 株、SSES3 株等。

【0045】所謂「誘導性富潛能幹細胞」係指藉由在哺乳動物體細胞或未分化幹細胞中導入特定的因子(核初期化因子)並進行再編程所得之細胞。目前，在「誘導性富潛能幹細胞」中有各式各樣者，除了由山中等人藉由在小鼠纖維母細胞中導入 Oct3/4 · Sox2 · Klf4 · c-Myc 之 4 因子所建立之 iPS 細胞(Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676)以外，亦可使用將同樣的 4 因子導入至人類纖維母細胞中所建立之源自人類細胞之 iPS 細胞(Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131:861-872.)；導入上述 4 因子後，以 Nanog 的表現作為指標進行分選所建立之 Nanog-iPS 細胞(Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.)；以不包含 c-Myc 之方法所製得之 iPS 細胞(Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106)；以無病毒法導入 6 因子所建立之 iPS 細胞(Okita K et al. Nat. Methods 2011 May; 8(5):409-12、Okita 333630

K et al. Stem Cells. 31(3):458-66.)。再者，亦可使用由 Thomson 等人所製得之導入 OCT3/4 · SOX2 · NANOG · LIN28 之 4 因子所建立之誘導性富潛能幹細胞 (Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318:1917-1920.)；由 Daley 等人所製得之誘導性富潛能幹細胞(Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451:141-146)；由櫻田等人所製得之誘導性富潛能幹細胞(日本特開 2008-307007 號公報)等。

【0046】此外，可使用已公開之所有論文(例如 Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol3, Issue 5, 568-574；Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650；Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7,795-797)或專利(例如日本特開 2008-307007 號公報、日本特開 2008-283972 號公報、美國專利申請公開第 2008/2336610 號說明書、美國專利申請公開第 2009/047263 號說明書、國際公開第 2007/069666 號、國際公開第 2008/118220 號、國際公開第 2008/124133 號、國際公開第 2008/151058 號、國際公開第 2009/006930 號、國際公開第 2009/006997 號、國際公開第 2009/007852 號)所記載之該領域中公知的誘導性富潛能幹細胞中之任意者。

【0047】誘導性富潛能幹細胞株能夠利用 NIH、理研、京都大學等所建立之各種 iPS 細胞株。例如，若為人類 iPS 細胞株，可列舉理研的 HiPS-RIKEN-1A 株、HiPS-RIKEN-2A 株、HiPS-RIKEN-12A 株、Nips-B2 株、京都大學的 Ff-I01s04 株、QHJI 株、RWMH 株、DRXT 株、RJWI 株、YZWJ 株、ILCL 株、GLKV 株、253G1 株、201B7 株、409B2 株、454E2 株、606A1 株、610B1 株、648A1 株等。

【0048】所謂「核酸」，只要是核苷酸及具有與該核苷酸同等功能之分子聚合而成之分子，則可為任意者，可列舉例如屬於核糖核苷酸的聚合物之 RNA、屬於去氧核糖核苷酸的聚合物之 DNA、核糖核苷酸及去氧核糖核苷酸混合而成

之聚合物、以及包含核苷酸類似物之核苷酸聚合物，再者，亦可為包含核酸衍生物之核苷酸聚合物。核酸可為單鏈核酸或雙鏈核酸。在雙鏈核酸中，亦包含對於其中一鏈，另一鏈會在嚴苛的條件下進行雜交之雙鏈核酸。

【0049】 核苷酸類似物只要是相較於 RNA 或 DNA，為了提升或穩定化核酸酶耐性，為了提高與互補鏈核酸之親和力，或為了提高細胞穿透性，或者為了可視化，而對核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸、RNA 或 DNA 施以修飾而得之分子，則可為任意分子。核苷酸類似物可為天然存在的分子，亦可為非天然的分子，可列舉例如醣部修飾核苷酸類似物(例如：經 2'-O-甲基核糖取代之核苷酸類似物、經 2'-O-丙基核糖取代之核苷酸類似物、經 2'-甲氧基乙氧基核糖取代之核苷酸類似物、經 2'-O-甲氧基乙基核糖取代之核苷酸類似物、經 2'-O-[2-(胍鎗)乙基]核糖取代之核苷酸類似物、經 2'-氟核糖取代之核苷酸類似物、架橋結構型人工核酸(BNA：Bridged Nucleic Acid)、鎖定人工核酸(LNA：Locked Nucleic Acid)、乙烯架橋結構型人工核酸(ENA：Ethylene bridged nucleic acid)、肽核酸(PNA)、氧基肽核酸(OPNA)、肽核糖核酸(PRNA))、磷酸二酯鍵修飾核苷酸類似物(例如，經取代成硫代磷酸酯鍵之核苷酸類似物、經取代成 N3'-P5'磷醯胺鍵之核苷酸類似物)等。

【0050】 核酸衍生物只要是相比於核酸，為了提升核酸酶耐性，為了穩定化，為了提高與互補鏈核酸之親和力，為了提高細胞穿透性，或者為了可視化，而對該核酸附加另一化學物質而得之分子，則可為任意分子，作其具體例可列舉 5'-多胺加成衍生物、膽固醇加成衍生物、類固醇加成衍生物、膽汁酸加成衍生物、維生素加成衍生物、Cy5 加成衍生物、Cy3 加成衍生物、6-FAM 加成衍生物、生物素加成衍生物等。

【0051】本發明之調節性 T 細胞經增殖之細胞集團的製造方法(在本說明書中，有時簡稱為「本發明之製造方法」)係以包含下列步驟為特徵。

(1)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下，培養包含源自多能性幹細胞之 CD4⁺T 細胞之細胞集團之步驟。

【0052】步驟(1)係除了 IL-4 及 TGF- β R 促效劑以外，亦可在 IL-3 及/或 IL-33 的存在下進行。亦即，步驟(1)亦可在 IL-4、TGF- β R 促效劑及 IL-3 的存在下，在 IL-4、TGF- β R 促效劑及 IL-33 的存在下，或在 IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3 及 IL-33 的存在下等進行。

【0053】再者，步驟(1)係除了上述成分以外，亦可在選自由 IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑所組成之群組中之至少 1 種以上的存在下，特別是，在 IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑的存在下進行。

【0054】再者，步驟(1)係除了上述成分以外，亦可在 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑的存在下進行。

【0055】IL(介白素)-4、IL(介白素)-3、IL(介白素)-2 及 IL(介白素)-33 較佳係源自哺乳類，特佳係源自人類。再者，IL-4、IL-3、IL-2 及 IL-33 可為從哺乳動物(特別是，人類)中單離及精製而得之天然物，或者亦可為藉由基因工程手法經人工製得之物(亦可施以胺基酸的取代、缺失、插入及/或附加等)。

【0056】所謂 TGF- β R(Transforming Growth Factor- β Receptor)促效劑，係定義為可與 TGF- β R 結合，並活化 TGF- β R 的訊息傳遞之物質。TGF- β R 促效劑可列舉隸屬於 TGF- β 超家族之因子，在 TGF- β 超家族中，存在有 TGF- β 家族、活化素家族及 BMP 家族(bone morphogenetic protein)。如此之隸屬於 TGF- β 超家族之因子可列舉例如 TGF- β (TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3)、活化素 A、

活化素 B、GDF-8、GDF-11 等。TGF- β R 促效劑較佳為 TGF- β ，更佳為 TGF- β 1。TGF- β R 促效劑可單獨使用 1 種，或者組合 2 種以上使用。

【0057】所謂 TNFR2(Tumor necrosis Factor Receptor-2)促效劑係定義為可與 TNFR2 結合，並活化 TNFR2 的訊息傳遞之物質，例如抗體(例如抗 TNFR2 抗體)、胜肽、低分子化合物、蛋白質等。TNFR2 促效劑抗體可列舉例如殖株(clone) MR2-1(Hycult Biotech 公司)、殖株 MAB2261(R&D Systems 公司)等結合至 TNFR2 之單株抗體等。再者，TNFR2 促效劑亦可為作為促效劑僅與 TNFR2 結合之 TNF- α 突變蛋白。TNFR2 促效劑可單獨使用 1 種，或者組合 2 種以上使用。

【0058】TNFR2 促效劑較佳為 TNFR2 促效劑抗體。該抗體，亦可為其功能性片段，功能性片段可列舉例如 Fd、Fv、Fab、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、單鏈 Fv(scFv)、雙功能抗體(diabody)、三鏈抗體(triobody)、四鏈抗體(tetrabody)及微型抗體。抗體可列舉源自小鼠、大鼠、牛、兔、山羊、綿羊、豚鼠等動物者。抗體的同型(isotype)並無特別限制，同型可列舉例如 IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgA、IgD、IgE 及 IgM。再者，抗體可為單株抗體及多株抗體中之任意者，較佳為單株抗體，再者，抗體亦可為人類化抗體、嵌合抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)等。抗體能夠藉由公知的方法予以製造，例如，可藉由構築含有編碼抗體之核酸之表現載體，並將已導入該核酸之轉形體進行培養，將產生抗體之融合瘤進行培養等而加以生產。

【0059】所謂 mTOR(mechanistic target of rapamycin)阻礙劑係定義為阻礙 mTOR 的功能之物質，其中，包含阻礙 mTOR 本身功能之物質、以及阻礙屬於 mTOR 的複合物之 mTOR 複合物 1(mTOR complex 1, mTORC1)及 mTOR 複合物 2(mTOR complex 2, mTORC2)的功能之物質。mTOR 阻礙劑可列舉例如：雷

帕儼素或其衍生物、依維莫司(Everolimus)、替西羅莫司(Temsirolimus)、利達福莫司(Ridaforolimus)、西羅莫司(Sirolimus)、KU0063794、AZD805、AZD8055、WYE-354、WAY-600、WYE-687、Pp121、Pp242、達妥昔布(Dactolisib)、薩帕尼替布(Sapanisertib)、奧米昔布(Omipalisib)、維塞替布(Vistusertib)、Torin 1、Torin 2 等。此外，mTOR 阻礙劑亦可列舉針對編碼 mTOR 之基因及/或其轉錄產物之 siRNA、shRNA、dsRNA、miRNA、反義核酸及表現此等之表現載體，進一步可列舉針對編碼將 mTOR 磷酸化並活化之酵素之基因及/或其轉錄產物之 siRNA、shRNA、dsRNA、miRNA、反義核酸及表現此等之表現載體等。mTOR 阻礙劑中較佳為雷帕儼素或其衍生物，更佳為雷帕儼素。mTOR 阻礙劑可單獨使用 1 種，或者組合 2 種以上使用。

【0060】 所謂 CDK8(cyclin-dependent kinase 8)及/或 CDK19 阻礙劑(在本說明書中，有時稱為 CDK8/19 阻礙劑)係定義為阻礙 CDK8 及/或 CDK19 的功能之物質，特別是，阻礙 CDK8 及/或 CDK19 的激酶活性之物質，可為 CDK8 及 CDK19 兩者的阻礙劑，亦可為任一者的阻礙劑。CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑可列舉例如：4-[1-(2-甲基-1H-苯并咪唑-5-基)-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基]-1,2,5-噁二唑-3-胺(AS2863619)(以下，有時亦稱為「化合物 1」)、3-{1-[1-(4-甲氧基苯基)哌啶-4-基]-4-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基}吡啶-2-胺(AS3334366)(以下，有時亦稱為「化合物 2」)、針對編碼 CDK8 及/或 CDK19 之基因及/或該等的轉錄產物之 siRNA、shRNA、dsRNA、miRNA、反義核酸及表現此等之表現載體、美國專利第 8598344 號說明書、國際公開第 2013/116786 號、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109 13799-13804 (2012)、國際公開第 2013/001310 號、國際公開第 2013/040153 號、國際公開第 2014/029726 號、國際公開第 2014063778 號、國際公開第 2014/072435 號、333630

第 27 頁，共 54 頁(發明說明書)

國際公開第2014/090692號、國際公開第2014/106606號、國際公開第2014/123900號、國際公開第2014/154723號、國際公開第2014/194245號、國際公開第2015/049325號、國際公開第2015/100420號、國際公開第2015/144290號、國際公開第2015/159937號、國際公開第2015/159938號(特別是，(2E)-N-(2-氟-4-(嗎啉-4-基甲基)苯基)-3-(4-(1-甲基-1H-吡啶-4-基)吡啶-3-基)丙烯醯胺(以下，有時稱為「化合物3」)及(2E)-3-(4-(1-環丙基-1H-吡啶-4-基)吡啶-3-基)-N-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)丙烯醯胺(以下，有時稱為「化合物4」))、國際公開第2016/009076號、國際公開第2018/159805號(特別是，8-(2,4-二氟苯氧基)-1-甲基-4,5-二氫-1H-噁吩并[3,4-g]吡啶-6-羧醯胺(以下，有時稱為「化合物5」)、4-((4-氟苯基)磺醯基)-3-(2-(咪唑并[1,2-b]噻吡啶-6-基氫硫基)乙基)-3,4-二氫喹啉-2(1H)-酮(以下，有時稱為「化合物6」)、2-(苄基胺基)-4-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)苄醯胺(以下，有時稱為「化合物7」)、3-(3-(苄基氧基)苯基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶(以下，有時稱為「化合物8」)、4-(4-(2,3-二氫-1,4-苯并二氧雜環己烯-6-基)-1H-吡啶-3-基)苯-1,3-二醇(特別是，其三氟醋酸鹽)(以下，有時稱為「化合物9」)、N-丁基-8-(4-甲氧基苯基)-1,6-噻啶-2-羧醯胺及8-(4-甲基苯基)-N,N-二丙基-1,6-噻啶-2-羧醯胺(特別是，其三氟醋酸鹽)(以下，有時稱為「化合物10」))、國際公開第2022/107877號(特別是，(E)-(4-(3-(5-(4-氟苯基)-1-甲基-1H-吡啶-4-基)丙烯醯胺)苄基)膦酸二乙酯(以下，有時稱為「化合物11」)、2-(4-(4-(異喹啉-4-基)苯基)-1H-吡啶-1-基)-N,N-二甲基乙醯胺(BI-1347)及4-((2-(6-(4-甲基吡啶-1-羧基)萘-2-基)乙基)胺基)喹啉-6-甲腈(Senexin B))所記載之化合物、MSC2530818(CAS 編號：1883423-59-3)及CCT251921(CAS 編號：1607837-31-9)等。其中，較佳為化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物8、化合物

9、化合物 10、化合物 11、BI-1347、Senexin B、MSC2530818、CCT251921、針對編碼 CDK8 及/或 CDK19 之基因及/或該等的轉錄產物之 siRNA，更佳為化合物 1、化合物 2、針對編碼 CDK8 及/或 CDK19 之基因及/或該等的轉錄產物之 siRNA，再佳為化合物 1。CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑可單獨使用 1 種，或者組合 2 種以上使用。此外，阻礙 CDK8 及/或 CDK19 之方法亦可藉由剔除(knock out)編碼 CDK8 及/或 CDK19 之基因而進行。如此之剔除基因之方法可使用例如利用 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas 系統等之基因體編輯等該技術領域中公知的方法。

【0061】再者，IL-2、IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3、IL-33、TNFR2 促效劑、mTOR 阻礙劑以及 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑可以游離的狀態或鹽的狀態使用。鹽可列舉例如：鈉鹽、鎂鹽、鉀鹽、鈣鹽、鋁鹽等與無機鹼之鹽；甲基胺鹽、乙基胺鹽、乙醇胺鹽等與有機鹼之鹽；與離胺酸、鳥胺酸、精胺酸等鹼性胺基酸之鹽及銨鹽。該鹽亦可為酸加成鹽，如此之鹽具體可列舉：與鹽酸、氫溴酸、氫碘酸、硫酸、硝酸、磷酸等無機酸；甲酸、醋酸、丙酸、草酸、丙二酸、蘋果酸、酒石酸、富馬酸、琥珀酸、乳酸、馬來酸、檸檬酸、甲磺酸、乙磺酸等有機酸；天冬胺酸、麩胺酸等酸性胺基酸之酸加成鹽。在 IL-2、IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3、IL-33、TNFR2 促效劑、mTOR 阻礙劑以及 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑中，亦包含水合物、溶劑合物、結晶多形體等。

【0062】培養基中之 IL-4 的濃度並無特別限定，例如為 0.01 至 100ng/mL，較佳為 10 至 100ng/mL。

【0063】 培養基中之 TGF- β R 促效劑的濃度並無特別限定，可依所使用之 TGF- β R 促效劑的種類等而適當地調整。TGF- β R 促效劑的濃度係例如為 0.1 至 100ng/mL，較佳為 1 至 50ng/mL。

【0064】 培養基中之 IL-3 的濃度並無特別限定，例如為 0.01 至 100ng/mL，較佳為 10 至 100ng/mL。

【0065】 培養基中之 IL-33 的濃度並無特別限定，例如為 0.1 至 100ng/mL，較佳為 10 至 100ng/mL。

【0066】 培養基中之 IL-2 的濃度並無特別限定，例如為 0.1 至 100ng/mL，較佳為 10 至 100ng/mL。

【0067】 培養基中之 TNFR2 促效劑的濃度並無特別限定，可依所使用之 TNFR2 促效劑的種類等而適當地調整。TNFR2 促效劑的濃度係例如為 0.0001 至 100 μ g/mL，較佳為 0.01 至 10 μ g/mL。

【0068】 培養基中之 mTOR 阻礙劑的濃度並無特別限定，可依所使用之 mTOR 阻礙劑的種類等而適當地調整。mTOR 阻礙劑的濃度係例如為 1 至 100nM，較佳為 10 至 100nM。

【0069】 培養基中之 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑的濃度並無特別限定，可依所使用之 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑的種類等而適當地調整。CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑的濃度係例如為 0.01 至 300 μ M，較佳為 0.05 至 150 μ M。

【0070】 步驟(1)的培養中所使用之培養基係以用於動物細胞的培養之培養基作為基礎培養基，包含前述之 IL-4、TGF- β R 促效劑(以及 IL-2、IL-3、IL-33、TNFR2 促效劑、mTOR 阻礙劑、CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑等)。基礎培養基只要是可使用於動物細胞的培養者，即無特別限定，可列舉例如 AIM V、X-333630

VIVO-15、NeuroBasal、EGM2、TeSR、BME、BGJb、CMRL 1066、Glasgow MEM、改良 MEM 鋅選擇性培養基(Improved MEM Zinc Option)、IMDM、199 培養基、Eagle MEM、 α MEM、DMEM、Ham、RPMI-1640、Fischer 培養基等。此等培養基可單獨使用任 1 種，亦可混合 2 種以上使用。

【0071】 培養基可含有血清，亦可無血清。再者，培養基亦可含有血清替代物(例如，白蛋白、運鐵蛋白、Knockout Serum Replacement(KSR)、脂肪酸、胰島素、膠原蛋白前驅物、微量元素、2-巰基乙醇、3'-硫醇基甘油、ITS-補充品、B27(商標)補充品等)。血清替代物可使用 1 種或 2 種以上。

【0072】 進一步，在培養基中，亦可含有脂質、胺基酸(非必需胺基酸等)、L-麩醯胺酸、維生素、增殖因子、細胞介素(IL-2 等)、抗 CD3 抗體、抗 CD30 抗體、抗 CD28 抗體、抗生物質、抗氧化劑、丙酮酸、緩衝劑、無機鹽類等 1 種以上物質。為了減低培養基的批次間之差異、可調製品質穩定的細胞，培養基較理想係使用不含血清等成分不明物之組成已知(chemically-defined)的培養基。

【0073】 培養基的 pH 值通常為 7.0 至 7.8，較佳為 7.2 至 7.6。培養基在使用前為了防止污染，較佳係藉由過濾、紫外線照射、加熱滅菌、放射線照射等方法進行滅菌。

【0074】 培養係在餵養細胞(feeder cell)的存在下或不存在下實施。為了不混入成分不明物，且可穩定地製造具有性質一致之調節性 T 細胞，本發明之製造方法較理想係在餵養細胞不存在下實施。

【0075】 本發明之製造方法的培養條件並無特別限制，培養溫度係例如為 37 至 42°C 左右，較佳為 37 至 39°C 左右，CO₂ 濃度係例如為 2% 至 10%，較佳為 2 至 5%，氧濃度係例如為 1 至 20%，較佳為 5 至 20%。

【0076】再者，針對培養期亦無特別限制，只要是所屬技術領域具有通常知識者即可一邊監測調節性 T 細胞的數量等一邊適當地決定，例如為 7 日以上，較佳為 14 日以上，更佳為 21 日以上，再佳為 28 日以上。培養期的上限並無特別限定，例如為 42 日以下，較佳為 35 日以下，更佳為 28 日以下。在本發明中之培養中，為了獲得所期望的量的調節性 T 細胞，可進行需要的次數繼代，亦可進行培養基的追加及更換。本發明中之培養可使用公知的 CO₂ 保溫培養箱而進行。培養容器並無特別限定，可從盤、碟、培養皿、燒瓶、袋、瓶、槽(培養槽)、生物反應器等中適當地選擇。培養容器可使用已結合抗 CD3 抗體之容器。

【0077】在步驟(1)中，亦可以重複地進行在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑(亦可進一步加入 IL-3、IL-33、IL-2、TNFR2 促效劑、CDK8/19 阻礙劑及/或 mTOR 阻礙劑)的存在下，最初使用抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體將細胞進行培養(刺激)後，以不包含抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體之培養基進行培養之方式進行培養。此重複的培養期係例如為 6 至 16 日，較佳為 7 至 14 日。具體可舉出：最初的 3 日左右在抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體的存在下將細胞進行培養(刺激)後，以不包含抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體之培養基進行 4 至 11 日左右的培養，重複進行此單位的培養。培養的重複次數並無特別限制，只要是所屬技術領域具有通常知識者即可一邊監測調節性 T 細胞的數量等一邊適當地決定，例如為 1 至 5 次。再者，在添加抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體之步驟中，亦可進一步添加抗 CD30 抗體來進行培養。

【0078】本發明中所使用之多能性幹細胞、用以製作多能性幹細胞之細胞可源自人類，亦可為源自人類以外之哺乳類(非人類哺乳類)之細胞，較佳為人類。非人類哺乳類可列舉例如：小鼠、大鼠、倉鼠、豚鼠、兔、犬、貓、豬、牛、馬、

綿羊、猴。再者，亦可使用經通用化(具有對多數患者不會引起免疫排斥之特定的 HLA 型，或 HLA 經剔除)之 iPS 細胞。

【0079】 本發明之製造方法中所使用之包含 $CD4^+$ T 細胞之細胞集團為包含從多能性幹細胞(特別是，iPS 細胞(尤其是人類 iPS 細胞))分化誘導出之 $CD4^+$ T 細胞之細胞集團。包含 $CD4^+$ T 細胞之細胞集團中所包含之 $CD4^+$ T 細胞的比例(細胞數)係例如為 5%以上，較佳為 10%以上，更佳為 30%以上，再者，上限係例如為 100%以下。

【0080】 為了濃縮所得之調節性 T 細胞，本發明之製造方法亦可進一步包含將調節性 T 細胞進行分離之步驟。調節性 T 細胞的分離可藉由使用流式細胞儀之方法、磁性細胞分離法等公知的方法進行。

【0081】 藉由本發明之製造方法，可製造調節性 T 細胞經增殖之包含調節性 T 細胞之細胞集團。在此，使用屬於調節性 T 細胞之 $CD25^+$ /FOXP3⁺細胞作為源自多能性幹細胞之 $CD4^+$ T 細胞時，可藉由本發明之製造方法將調節性 T 細胞進行擴大培養。在另一方面，在使用不屬於調節性 T 細胞之 $CD25^-$ /FOXP3⁻細胞作為源自多能性幹細胞之 $CD4^+$ T 細胞時，可分化誘導成調節性 T 細胞，製造調節性 T 細胞的含有比例較高之包含調節性 T 細胞之細胞集團。

【0082】 在使用 $CD25^-$ /FOXP3⁻細胞作為 $CD4^+$ T 細胞時，藉由本發明之製造方法所得之包含調節性 T 細胞之細胞集團中所包含之調節性 T 細胞的比例(細胞數)係例如為 10%以上，較佳為 50%以上，更佳為 80%以上，再者，上限係例如為 100%以下。

【0083】 本發明之製造方法係除了包含 $CD4^+$ T 細胞之細胞集團以外，亦適用於包含 $CD8^+$ T 細胞之細胞集團。

【0084】再者，使用屬於調節性 T 細胞之 $CD25^+$ / $FOXP3^+$ 細胞作為源自多能性幹細胞之 $CD4^+$ T 細胞時，本發明的實施形態中之包含調節性 T 細胞之細胞集團的增殖方法係以包含下列步驟為特徵。

(1A)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下，培養包含源自多能性幹細胞之調節性 T 細胞之細胞集團之步驟。

【0085】在使用不屬於調節性 T 細胞之 $CD25^+$ / $FOXP3^+$ 細胞作為源自多能性幹細胞之 $CD4^+$ T 細胞時，本發明的實施形態中之包含調節性 T 細胞之細胞集團的製造方法係以包含下列步驟為特徵。

(1B)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下，培養包含源自多能性幹細胞之 $CD4^+$ / $CD25^+$ / $FOXP3^+$ T 細胞之細胞集團之步驟。

【0086】步驟(1A)及步驟(1B)可與步驟(1)同樣地實施。上述包含調節性 T 細胞之細胞集團的增殖方法及包含調節性 T 細胞之細胞集團的製造方法係含括於本發明之製造方法中，適用關於本發明之製造方法之說明。

【0087】本發明之製造方法及增殖方法亦可在步驟(1)之前，進一步包含(2)將多能性幹細胞分化誘導成包含 $CD4^+$ T 細胞之細胞集團之步驟。

【0088】將多能性幹細胞分化誘導成包含 $CD4^+$ T 細胞之細胞集團可依照公知的方法實施。如此之方法可列舉例如：將多能性幹細胞分化誘導成能夠分化成 $CD4^+$ T 細胞之細胞後，將該能夠分化成 $CD4^+$ T 細胞之細胞分化誘導成包含 $CD4^+$ T 細胞之細胞集團。能夠分化成 $CD4^+$ T 細胞之細胞可列舉： $CD34^+$ 細胞、中胚層前驅細胞、 $CD4CD8$ 雙陰性 T 細胞、 $CD4CD8$ 雙陽性 T 細胞等，較佳為 $CD34^+$ 細胞或中胚層前驅細胞，更佳為造血性內皮細胞、造血幹細胞、造血前驅細胞、T 前驅細胞或中胚層前驅細胞，特佳為造血性內皮細胞。上述 $CD34^+$ 細胞

為表現 CD34 之(CD34⁺)細胞，特別是，表現 CD34 且不表現 CD7(CD34⁺/CD7⁻)之細胞。CD34⁺細胞可列舉例如：造血性內皮細胞、造血幹細胞、造血前驅細胞。

【0089】 將多能性幹細胞分化誘導成能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞可依照公知的方法實施(參照例如國際公開第 2021/085576 號等)。例如，能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞可藉由無餵養細胞法予以製作，其中，較佳為在未使用餵養細胞之情形下，使胚胎體(embryonic body)形成並使造血前驅細胞產生之「胚胎體法(EB 法)」(參照 AE Grigoriadis et al. (2010). Blood, 115(14):2769-2776.)。

【0090】 再者，亦可將多能性幹細胞在餵養細胞上進行培養而分化誘導成造血幹細胞及/或造血前驅細胞(參照國際公開第 2011/096482 號、國際公開第 2013/176197 號)。從易於誘導向中胚層系分化之觀點而言，餵養細胞較佳為間質細胞。從易於誘導向造血系分化之觀點而言，間質細胞較佳為 OP9 細胞、10T1/2 細胞(C3H10T1/2 細胞)等。

【0091】 將多能性幹細胞分化誘導成 CD34⁺細胞可依照公知的方法實施，多能性幹細胞為 iPS 細胞時，可藉由例如國際公開第 2017/221975 號、國際公開第 2018/135646 號及 Cell Reports 2 (2012) 1722-1735 所記載之方法，分化誘導出造血前驅細胞，製造 CD34⁺細胞。

【0092】 將能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞分化誘導成包含 CD4⁺T 細胞之細胞集團之方法可列舉例如：ATO(人工胸腺類器官(artificial thymic organoid))法(參照國際公開第 2017/075389 號等)。如此之 ATO 法係將包含能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞及表現 Notch 配體之間質細胞(stromal cell)之三維細胞凝集體進行培養，藉此能夠以高效率分化誘導成 CD4⁺T 細胞。ATO 法為公知的方法，可參考國際公開第 2017/075389 號、國際公開第 2021/085576 號等的記載而實施。再

者,其他方法可列舉:國際公開第 2021/092581 號所記載之分化誘導方法(與 MS5-DLL1/4 間質細胞、OP9 或 OP9-DLL1 間質細胞或者 EpCAM-CD56⁺間質細胞進行共培養之方法等)。

【0093】 在實施 ATO 法時,亦可在實施 ATO 法之前不實施將能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞進行分離之步驟,再者,亦可對依照公知的方法(例如流式細胞儀、磁性細胞分離法)所分離出之能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞實施 ATO 法。

【0094】 較佳係在間質細胞中導入用以表現 Notch 配體之核酸。表現 Notch 配體之間質細胞可藉由在間質細胞中導入上述核酸而予以製造。再者,亦可藉由在多能性幹細胞(特別是,iPS 細胞(尤其是人類 iPS 細胞))中導入上述核酸後,將多能性幹細胞分化成間質細胞而予以製造。

【0095】 本發明之製造方法中所使用之間質細胞,可列舉例如從多能性幹細胞(特別是,iPS 細胞(尤其是人類 iPS 細胞))分化誘導出之間質細胞,其中,較理想係使用將多能性幹細胞(特別是,iPS 細胞(尤其是人類 iPS 細胞))分化誘導成纖維母細胞而得之細胞。將多能性幹細胞分化誘導成間質細胞可依照公知的方法實施,在多能性幹細胞為人類 iPS 細胞時,可藉由例如 PLoS ONE 8 (10):e77673, 2013 所記載之方法,製造從 iPS 細胞分化誘導出之纖維母細胞。

【0096】 Notch 配體並無特別限定,包含國際公開第 2017/075389 號所記載之標準 Notch 配體及非標準 Notch 配體。標準 Notch 配體可列舉例如: DLL4(Delta 樣配體 4)、DLL1(Delta 樣配體 1)、JAG1(Jagged1)、JAG2(Jagged2)等。此等可單獨使用 1 種或組合 2 種以上使用。非標準 Notch 配體可列舉例如: 接觸素(contactin)-1、NOV/CCN3、接觸素-6、骨膜素(periostin)/OSF-2、DLK2/EGFL9、Pref-1/DLK1/FA1、DNER、血小板反應素(thrombospondin)-2、MAGP-1/MFAP2、

333630 第 36 頁,共 54 頁(發明說明書)

血小板反應素-3、MAGP-2/MFAP5、血小板反應素-4 及 netrin-1。Notch 配體較佳係使用人類 DLL4。

【0097】用以將用於表現上述 Notch 配體之核酸導入至間質細胞或多能性幹細胞中之手段並無特別限定，可採用公知或一般的各種手段。典型而言，用於表現上述 Notch 配體之核酸係使用表現載體導入至間質細胞中並使其進行表現。表現載體可為直鏈狀，亦可為環狀，亦可為質體等非病毒載體、病毒載體、經由轉位子(transposon)所得之載體。

【0098】用以將表現載體導入間質細胞中之手法可設為因應實施形態之適切者。例如，可藉由病毒感染法、磷酸鈣法、脂轉染法、顯微注射法、電穿孔法等公知的方法，將表現載體導入至間質細胞中。表現載體可藉由公知的手段，並且適當地使用市售的套組(依照其指示書)，而調製成適合在各手法中使用之形態。

【0099】表現載體可藉由病毒感染法導入至間質細胞中。病毒載體可列舉例如：反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體。在使用如此之病毒載體時，只要使用對應的市售的套組，將包含用以表現上述 Notch 配體之核酸之載體及各病毒的包裝載體(質體)轉染至宿主細胞中而製作重組病毒後，使所得之重組病毒感染間質細胞即可。

【0100】表現載體係除了用以表現上述 Notch 配體之核酸以外，亦可因應所需包含核定位訊息(NLS)、多選殖位點(MCS)等序列。表現載體亦可進一步包含編碼諸如報導子基因(例如編碼各色的螢光蛋白質之基因)、藥劑選擇基因(例如卡納黴素(kanamycin)耐性基因、胺苄青黴素(ampicillin)耐性基因、嘌呤黴素(puromycin)耐性基因)、自殺基因(例如編碼白喉 A 毒素、單純疱疹胸苷激酶(HSV-

TK)、羧肽酶 G2(CPG2)、羧酸酯酶(CA)、胞嘧啶去胺酶(CD)、細胞色素 P450(cyt-450)、去氧胞苷激酶(dCK)、硝基還原酶(NR)、嘌呤核苷磷解酶(PNP)、胸苷磷解酶(TP)、水痘帶狀疱疹病毒胸苷激酶(VZV-TK)、黃嘌呤-鳥嘌呤磷醯核糖基轉移酶(XGPRT)、誘導性凋亡蛋白酶 9(inducible caspase 9)等之基因)之“功能性基因”之核酸(鹼基序列)。

【0101】三維細胞凝集體可例如藉由將能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞及表現 Notch 配體之間質細胞進行離心分離而形成。較佳係在間質細胞中導入用以表現 Notch 配體之核酸。間質細胞：能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞之比率係能夠依所使用之間質細胞及能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞的種類等，由所屬技術領域具有通常知識者適當地調整，可列舉例如 100：1 至 1：100、90：1 至 1：90、80：1 至 1：80、70：1 至 1：70、60：1 至 1：60、50：1 至 1：50、40：1 至 1：40、30：1 至 1：30、20：1 至 1：20、10：1 至 1：10 等。例如，在間質細胞為小鼠骨髓細胞(特別是，MS-5)時，較佳為 20：1 至 1：4，在間質細胞為源自多能性幹細胞之間質細胞(特別是，從 iPS 細胞(尤其是人類 iPS 細胞)分化誘導出之纖維母細胞)時，較佳為 4：1 至 1：4，更佳為 1：1。

【0102】用以培養三維細胞凝集體之培養基並無特別限定，可列舉例如：含有血清之培養基、不含血清之培養基或無異源培養基，較佳為不含血清之培養基，特別是，含有胰島素(再者，生物素、運鐵蛋白及白蛋白)之不含血清的培養基。

【0103】用以培養三維細胞凝集體之基礎培養基可列舉例如：AIM V、X-VIVO-15、NeuroBasal、EGM2、TeSR、BME、BGJb、CMRL 1066、Glasgow MEM、改良 MEM 鋅選擇性培養基(Improved MEM Zinc Option)、IMDM、199 培養基、

Eagle MEM、 α MEM、DMEM、Ham、RPMI-1640、Fischer 培養基等。此等培養基可單獨使用任 1 種，亦可混合 2 種以上使用。

【0104】 培養基可含有血清，亦可無血清。再者，培養基亦可含有血清替代物(例如白蛋白、運鐵蛋白、Knockout Serum Replacement(KSR)、脂肪酸、胰島素、膠原蛋白前驅物、微量元素、2-巰基乙醇、3'-硫醇基甘油、ITS-補充品、B27(商標)補充品等)。血清替代物可使用 1 種或 2 種以上。

【0105】 進一步，在培養基中，亦可含有脂質、胺基酸(非必需胺基酸等)、L-麩醯胺酸、維生素、增殖因子、細胞介素、抗生物質、抗氧化劑、丙酮酸、緩衝劑、無機鹽類等 1 種以上物質。為了減低培養基的批次間之差異，可調製品質穩定的細胞，培養基較理想係使用不含血清等成分不明物之組成已知(chemically-defined)的培養基。此外，可適當地摻合國際公開第 2017/075389 號所記載之培養基成分等。

【0106】 三維細胞凝集體的培養溫度係例如為 20 至 40°C，較佳為約 37°C，CO₂ 濃度係例如為 2 至 10%，較佳為 2 至 5%，氧濃度係例如為 1 至 20%，較佳為 5 至 20%。培養開始時之細胞密度可設為例如 1.0×10⁴ 至 1.0 至 10¹⁰ 個細胞/mL 左右。

【0107】 三維細胞凝集體的培養期能夠依所使用之間質細胞及能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞的種類等由所屬技術領域具有通常知識者適當地調整，例如為 4 週以上，較佳為 5 週以上，更佳為 6 週以上。培養期的上限並無特別限定，較佳為 16 週以下，更佳為 14 週以下，再佳為 12 週以下，特佳為 9 週以下。

【0108】 在藉由三維細胞凝集體的培養所得之包含 CD4⁺T 細胞之細胞集團中，有時會包含 CD4⁺T 細胞以外之細胞，因而亦可針對包含 CD4⁺T 細胞之細

胞集團，藉由例如使用經螢光標識之抗 CD4 抗體及細胞分選儀之流式細胞儀(代表性地，螢光活化細胞分選：FACS)，單離並回收 CD4⁺T 細胞。再者，亦可單離並回收 CD4SP T 細胞。再者，亦可單離並回收進一步以 CD25 陰性所分割出之效應 T 細胞(Tconv)。

【0109】 藉由三維細胞凝集體的培養所得之包含 CD4⁺T 細胞之細胞集團亦可在步驟(1)之前，進行經由公知的方法(例如在包含抗 CD3 抗體及 IL-2 之培養基中，培養包含 CD4⁺T 細胞之細胞集團)之擴大培養步驟。

【0110】 在步驟(1)中使用包含 CD8⁺T 細胞之細胞集團時，步驟(2)係為了分化誘導出包含 CD8⁺T 細胞之細胞集團而實施。

【0111】 在本發明之製造方法中，亦可使用導入有包含下列(a)至(c)之表現構築物(在本說明書中，有時稱為 CNS-Foxp3)之細胞作為 CD4⁺T 細胞：

(a)Foxp3 基因的 CNS1、CNS2 及 CNS3；

(b)啟動子；以及

(c)編碼 FOXP3 之核酸。

【0112】 導入表現構築物之細胞並無特別限定，可為分化的任意階段，可列舉例如 CD4⁺T 細胞、多能性幹細胞或能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞。將表現構築物導入至 CD4⁺T 細胞、多能性幹細胞或能夠分化成 CD4⁺T 細胞之細胞中之方法可舉出前述之方法。

【0113】 本發明中之表現構築物(expression construct)係用以使 FOXP3 表現者，其包含(a)Foxp3 基因的 CNS1(保守的非編碼序列 1)、CNS2(保守的非編碼序列 2)及 CNS3(保守的非編碼序列 3)，(b)啟動子，以及(c)編碼 FOXP3 之核酸。藉由將如此之表現構築物導入至 CD4⁺T 細胞、多能性幹細胞或能夠分化成 CD4

T細胞之細胞中，能夠以高效率製造調節性 T 細胞。表現構築物只要可使 FOXP3 表現，即無特別限定，較佳係除了上述(a)、(b)及(c)以外，亦包含終止子、多腺苷酸化訊息、Foxp3 3'UTR 等，更佳為此等在被導入之細胞內發揮功能者。

【0114】人類的 Foxp3 基因的鹼基序列係登錄為 RefSeq Accession No. NM_001114377(序列編號 1)、NM_014009(序列編號 2)，胺基酸序列亦登錄為 RefSeq Accession No. NP_001107849(序列編號 3)、NP_054728(序列編號 4)。在此處之 RefSeq ID 係登錄於 NCBI 的網站者。在本發明中，在上述基因中，除了具有登錄於如前述之資料庫之鹼基序列者以外，亦包含其簡併物及變異體，變異體較理想為編碼具有與由上述胺基酸序列所組成之蛋白質同等的生物學活性之蛋白質者。變異體可列舉相對於天然的胺基酸序列，具有 80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或 99%以上的同一性的胺基酸序列之變異型 FOXP3。在本說明書中，FOXP3 意指蛋白質，Foxp3 意指基因，但在將 FOXP3、Foxp3 分別解釋為基因、蛋白質為較適切之情況時，則意味基因、蛋白質。

【0115】編碼 FOXP3 之核酸只要是編碼 FOXP3 蛋白質之核酸，即無特別限定，較佳為 FOXP3 的 cDNA。

【0116】本發明中所使用之 CNS1、CNS2 及 CNS3 皆為源自 Foxp3 基因者。CNS1、CNS2 及 CNS3 為 Foxp3 增強子元件。本發明中所使用之啟動子並無特別限定，例如 CAG 啟動子、泛素基因的啟動子、Foxp3 基因的啟動子、EF1 α 啟動子、SR α 啟動子、SV40 啟動子、LTR 啟動子、CMV(巨細胞病毒)啟動子、RSV(勞斯肉瘤病毒)啟動子、MoMuLV(莫洛尼小鼠白血病病毒)LTR、HSV-TK(單純疱疹病毒胸苷激酶)啟動子等，較佳為 Foxp3 基因的啟動子。人類的 Foxp3 基

因的 CNS1、CNS2、CNS3 及啟動子的較佳鹼基序列可分別列舉序列編號 5 至 8 所記載之鹼基序列。在該啟動子、CNS1、CNS2 及 CNS3 中，除了具有如前述之鹼基序列者以外，亦包含變異體，變異體較理想為具有與由上述鹼基序列所組成之啟動子、CNS1、CNS2 及 CNS3 同等的生物學活性者。變異體可列舉相對於天然的鹼基序列，具有 80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上或 99%以上的同一性的鹼基序列者。

【0117】 啟動子、CNS1、CNS2、CNS3 及編碼 FOXP3 之核酸在表現構築物中之配置(順序)並無特別限定，較佳係 CNS1、CNS2 及 CNS3 位於啟動子的上游，更佳係從 5' 末端側起依序為 CNS1-CNS2-CNS3-啟動子-編碼 FOXP3 之核酸。

【0118】 導入上述表現構築物之細胞只要是 $CD4^+$ T 細胞、多能性幹細胞或能夠分化成 $CD4^+$ T 細胞之細胞，即無特別限定，可列舉例如：多能性幹細胞、造血幹細胞、造血性內皮細胞、造血前驅細胞、T 前驅細胞、中胚層前驅細胞、輔助性 T 細胞等，較佳為多能性幹細胞，更佳為 iPS 細胞。其中，較理想係使用多能性幹細胞(特別是，iPS 細胞)作為導入上述表現構築物之細胞，將其分化誘導成 $CD34^+$ 細胞(特別是，造血性內皮細胞)，並對該 $CD34^+$ 細胞(特別是，造血性內皮細胞)實施 ATO 法，使其分化成調節性 T 細胞。

【0119】 藉由本發明之製造方法及增殖方法所得之調節性 T 細胞亦可為導入有外來基因之調節性 T 細胞。

【0120】 「外來基因」係為了使調節性 T 細胞表現所期望的蛋白質而從外部導入之基因，可因應調節性 T 細胞的用途而適當地選擇。

【0121】 外來基因可設為例如用以表現 CAR(嵌合抗原受體)之基因,其中,可進一步包含用以表現細胞介素及/或趨化介素之基因。調節性 T 細胞所表現之 CAR 基本上與一般的或公知的 CAR 同樣地,下列各部位的胜肽因應所需經由間隔子藉此連結而構成:(i)識別癌細胞的細胞表面抗原之抗原識別部位(例如單鏈抗體)、(ii)跨細胞膜區域、及(iii)誘導 T 細胞的活化之訊息傳遞區域。再者,外來基因亦可設為例如用以表現外源性 T 細胞受體(TCR)之基因。所謂外源性 TCR 意指對被導入編碼外源性 TCR 之核酸之 T 細胞而言為外源性,外源性 TCR 的胺基酸序列可與該 T 細胞的內源性 TCR 相同,亦可不同。外來基因可導入 1 種或 2 種以上(例如 CAR 及外源性 TCR)。

【0122】 用以將外來基因導入至細胞中之手段可列舉前述之方法。另外,導入外來基因之細胞並無特別限定,可為分化的任意階段,可列舉例如多能性幹細胞(特別是, iPS 細胞)、CD4⁺T 細胞、調節性 T 細胞等。

【0123】 藉由本發明之製造方法及增殖方法所製得之包含調節性 T 細胞之細胞集團係對治療免疫反應異常亢進之動物(特別是,人類)影用,例如,對治療及預防 X 染色體連鎖型免疫調節異常/多發性內分泌障礙/腸症(IPEX)症候群、移植植物抗宿主病(GVHD)、臟器移植中之排斥反應、自體免疫疾病、炎症性疾病、過敏疾病(花粉症、氣喘、異位性皮膚炎、濕疹、食品過敏、食物過敏症、蕁麻疹、過敏性鼻炎、過敏性結膜炎、藥劑過敏)等影用,但不限定於此等。藉由本發明之製造方法所製得之調節性 T 細胞可用於自體移植,亦可用於同種異體移植。再者,亦可與其他藥劑併用。

【0124】在實施如此之細胞治療時，從不會引起排斥反應之觀點而言，單離出使用於調節性 T 細胞的製造之細胞之對象較佳為與調節性 T 細胞所投予之對象係 HLA 的類型一致，更佳為與調節性 T 細胞所投予之對象相同的對象。

【0125】根據本發明，可製造含有包含調節性 T 細胞之細胞集團而成之醫藥(以下，有時稱為本發明之醫藥)。本發明之醫藥較佳係依照公知的手段(例如日本藥典所記載之方法等)，將有效量的調節性 T 細胞與藥學上可容許的載體進行混合等，而製造成非經口製劑。本發明之醫藥較佳係製造成注射劑、懸浮劑、點滴劑等非經口製劑。非經口的投予方法可列舉：靜脈內、動脈內、肌肉內、腹腔內、皮下投予等方法。藥學上可容許的載體可列舉例如：溶劑、基劑、稀釋劑、賦形劑、無痛化劑、緩衝劑、保存料、穩定劑、懸浮劑、等張化劑、界面活性劑、溶解輔助劑等。

【0126】本發明之醫藥的投予量可因應患者的體重、年齡、性別、症狀等多種條件而適當地決定，通常，就細胞數而言，對於體重 60kg 的對象，係以每 1 次通常成為 1×10^6 至 1×10^{10} 個之方式，較佳係成為 1×10^7 至 1×10^9 個之方式，更佳係成為 5×10^7 至 5×10^8 個之方式進行投予。再者，可 1 次性投予，亦可分成複數次投予。本發明之醫藥可製成適合非經口投予之公知的形態，例如注射或注入劑。再者，為了穩定地維持細胞，本發明之醫藥亦可包含生理食鹽水、磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)、培養基等。作為培養基，並無特別限定，可列舉 RPMI、AIM-V、X-VIVO10 等培養基，但不限定於此等。再者，在該醫藥中，亦可在穩定化之目的下添加醫藥上可容許的載體(例如：人類血清白蛋白)、保存劑等。本發明之醫藥可對包含人類在內之哺乳動物進行應用。

【0127】 在本說明書及申請專利範圍中使用之情況，於上下文沒有特別要求之前提下，單數形的用語視為包含複數形，複數形的用語視為包含單數形。因此，單數形的冠詞(例如，在英語之情況，「a」、「an」、「the」等)於沒有特別提及之前提下，應理解為亦包含其複數形的概念。

[實施例]

【0128】 以下，為了進一步詳細地說明本發明而列舉實施例。惟，本發明完全不是限定於此等實施例等者。

【0129】 [實施例 1]iPS-Treg 的擴大培養

將從 iPS 細胞分化誘導成 Treg 後之細胞，以包含 IL-4 及 TGF- β 之培養基進行擴大培養。

【0130】 從 iPS 細胞分化成 Treg 的誘導具體係如下述。設計並合成質體序列，該質體序列係將登錄於 GenBank 之序列(MK012431)內之 mStrawberry 蛋白質序列變更成 dTomato 序列，並將所得之 DNA 序列組入第 3 世代慢病毒載體製作用的轉移質體中而得。將接受到之質體與慢病毒載體製作用的包裝質體及包膜質體一起對 HEK293 系統的細胞進行轉染，將包含所產生之慢病毒載體之上清液進行回收後，以高速離心法進行濃縮，取得對 iPS 細胞進行導入之慢病毒載體。接著，將 Ff-I01s04 株以 1×10^4 個細胞/孔接種於 24 孔盤，以最終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ 添加魚精蛋白後，直接添加已組入 CNS-Foxp3 基因之慢病毒溶液，而製作出病毒感染 iPS 細胞。

【0131】 將經病毒感染之 Ff-I01s04 株以 1×10^6 個細胞/孔接種於經超低黏附處理之 6 孔盤(Corning)(Day 0)，在 EB 培養基(在 StemPro34(Gibco)中添加 $10 \mu\text{g/ml}$ 人類胰島素、 $5.5 \mu\text{g/ml}$ 人類運鐵蛋白、 5ng/ml 亞硒酸鈉(ITS, Gibco)、

2mM L-麩醯胺酸(Sigma-Aldrich)、45mM α -單硫代甘油(Nacalai Tesque 股份有限公司)及 50 μ g/ml 抗壞血酸 2-磷酸(Sigma-Aldrich))中，添加 50ng/ml BMP4(R&D systems)、50ng/ml bFGF(富士 Film 和光純藥股份有限公司)、50ng/ml VEGF(R&D systems)、2 μ M SB431542(富士 Film 和光純藥股份有限公司)，在低氧條件下(5%O₂)進行 4 日培養(第 4 天(Day 4))。繼而，以添加有 50ng/ml bFGF、50ng/ml VEGF、50ng/ml SCF(R&D systems)之培養基進一步進行 4 日培養(第 8 天(Day 8))，獲得包含 HEC 之細胞集團。再者，以使人類 DLL4 蛋白質在源自小鼠之間質細胞株 MS5 中強制表現而得之物作為支持體，與源自導入有 CNS-Foxp3 之人類 iPS 細胞之 HEC 以 4:1 的細胞比進行共培養。培養基係使用以最終濃度計包含 2 \times B27 supplement (Invitrogen)、1 \times PSG (Sigma-Aldrich)、1 \times Glutamax (Invitrogen)、5ng/mL IL-7 (PeproTech)、5ng/mL FLT3L (PeproTech)、50 μ g/mL 抗壞血酸(Sigma-Aldrich)之 RPMI-1640(富士 Film 和光純藥股份有限公司)，將在 30mm Millicell(親水性 PTFE，孔徑 0.4 μ m，高度 5mm，Merck Millipore)上進行共培養而得之物靜置於 6 孔盤(TPP)內，以 3-4 日一次的頻率一邊進行培養基更換一邊培養 9 週。

【0132】將上述所得之包含源自導入有 CNS-Foxp3 之人類 iPS 細胞之 Treg 之細胞集團，以 2.5 \times 10⁵ 個細胞/孔接種於已結合抗 CD3 抗體(eBioscience)之 48 孔細胞培養盤，在 CO₂ 保溫培養箱中，在 37°C、5.0%CO₂ 條件下培養 3 日後，重新接種於 24 孔 G-Rex 細胞培養盤並繼續培養。培養基係使用以最終濃度計包含 FBS(15%，Corning)、L-麩醯胺酸-青黴素-鏈黴素溶液(1/100，Invitrogen，Sigma-Aldrich)、胰島素-運鐵蛋白-硒補充品(1/100，Invitrogen)、抗壞血酸 2-磷酸(50 μ g/mL，Sigma-Aldrich)、IL-2(10ng/mL，PeproTech)、抗 CD30 抗體(300ng/mL，R&D

systems)及凋亡蛋白酶阻礙藥($10\ \mu\text{M}$, R&D systems)之 α -MEM(Invitrogen)。最初的3日係對上述組成進一步添加抗 CD28 抗體($1.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$, BioLegend)。培養係在培養開始第3日及其以後以3-4日一次的頻率一邊進行培養基更換一邊培養14日。再者,在此培養期的第10日使用 CD4 MicroBeads (Miltenyi Biotec)將 CD4^+ 及 CD4CD8 雙陽性 T 細胞進行精製。所得之細胞係在與上述同樣的培養條件下再次實施擴大培養,在第10日藉由使用 CD8 MicroBeads(Miltenyi Biotec)而去除 CD8 表現細胞,將 CD4^+ T 細胞進行精製。

【0133】 將上述所得之包含 CD4^+ T 細胞之細胞集團,以 2.5×10^5 個細胞/孔接種於已結合抗 CD3 抗體(eBioscience)之 48 孔細胞培養盤,在 CO_2 保溫培養箱中,在 37°C 、 $5.0\%\text{CO}_2$ 條件下培養3日後,重新接種於 24 孔 G-Rex 細胞培養盤並繼續培養。培養基係使用以最終濃度計包含 FBS(15% , Corning)、L-麩醯胺酸-青黴素-鏈黴素溶液($1/100$, Invitrogen, Sigma-Aldrich)、胰島素-運鐵蛋白-硒補充品($1/100$, Invitrogen)、抗壞血酸 2-磷酸($50\ \mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich)、IL-2($10\text{ng}/\text{mL}$, Peprotech)、抗 CD30 抗體($300\text{ng}/\text{mL}$, R&D systems)、凋亡蛋白酶阻礙藥($10\ \mu\text{M}$, R&D systems)、雷帕黴素(10nM , merck millipore)及抗 TNFR2 抗體($3\ \mu\text{g}/\text{mL}$, Hycult Biotech)之 α -MEM(Invitrogen), IL-3(BioLegend)、IL-4(BioLegend)、IL-33(BioLegend)、TGF- β 1(BioLegend)添加組係對上述組成進一步分別添加 $60\text{ng}/\text{mL}$ 、 $30\text{ng}/\text{mL}$ 、 $30\text{ng}/\text{mL}$ 、 $5\text{ng}/\text{mL}$ 。最初的3日係對上述組成進一步添加抗 CD28 抗體($1.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$, BioLegend)。培養係在培養開始第3日及其以後以3-4日一次的頻率一邊進行培養基更換一邊培養18日。在第3、6、10、13、18日對細胞數進行計測,製作折線圖。將結果示於圖1。

【0134】 經添加 IL-4 及 TGF- β 1 之細胞集團與對照(不包含 IL-4 及 TGF- β)相比，可確認細胞增殖受到促進(在擴大培養第 18 日，經添加 IL-4 及 TGF- β 之細胞集團相較於擴大培養開始時，細胞數呈 54.7 倍，相對於此，對照組呈 38.4 倍)。再者，除了 IL-4 及 TGF- β 以外尚追加添加 IL-3 或 IL-33 或者該兩者而得之細胞集團，係可觀察到與經添加 IL-4 及 TGF- β 之組同程度或其以上的細胞增殖的促進(在第 18 日，經追加添加 IL-3 之組呈 57 倍，經追加添加 IL-33 之組呈 87 倍，經追加添加 IL-3 及 IL-33 兩者之組呈 77.8 倍)。

【0135】 [實施例 2]擴大培養中之 Treg 的蛋白質的表現量的檢討

使用實施例 1 中經擴大培養之 Treg，檢討在 Treg 中表現之蛋白質的表現量。

【0136】 具體而言，使用實施例 1 中經擴大培養之第 18 日的各細胞集團，使用以下抗體組進行染色並藉由流式細胞儀進行解析：

Panel(1): Zombie NIR、BV510 CD3、BV421 CD4、PE/Cy7 CD8 β 、APC CD25、FITC Foxp3、PerCP/Cy5.5 CTLA4

Panel(2): Zombie NIR、BV510 CD3、BV421 CD4、PE/Cy7 CD8 β 、FITC Foxp3、PE Helios、PerCP/Cy5.5 CD39、APC CD73。

將結果示於圖 2。

【0137】 與對照(不包含 IL-4 及 TGF- β)相比，經添加 IL-4 及 TGF- β 之細胞集團，以及除了 IL-4 及 TGF- β 以外尚添加 IL-3 而得之細胞集團可觀察到同程度的 Foxp3 陽性率。再者，與對照相比，除了 IL-4 及 TGF- β 以外尚追加 IL-3 及 IL-33 兩者或者僅追加 IL-33 而得之細胞集團可觀察到 Foxp3 陽性率降低之傾向。若考慮到實施例 1 的細胞增殖率，則任意群組與對照相比，均可確認到更高的 Treg(CD25⁺/Foxp3⁺細胞)的增殖，再者，作為表示 Treg 的抑制功能之指標

被已知之蛋白質(Helios、CTLA4、CD39及CD73)的表現亦被保持，故可在維持 Treg 的性狀之同時達成較佳的增殖率。

【0138】 [實施例 3]Treg 的抑制性功能的評估

使用實施例 1 中經擴大培養之 Treg，與源自人類 PBMC 之同種異體 T 細胞共培養後，進行經由流式細胞儀所得之分析。

【0139】 具體而言，將源自與 Treg 不同的供體(donor)之未經抗 CD3 抗體處置或經抗 CD3 抗體處置之 T 細胞以 CellTrace Violet(Thermo Fisher Scientific)進行染色，將所得之物作為目標細胞使用，與 Treg 進行共培養。培養基係使用以最終濃度計包含 FBS(15%，Corning)、L-麩醯胺酸-青黴素-鏈黴素溶液(1/100，Invitrogen，Sigma-Aldrich)、胰島素-運鐵蛋白-硒補充品(1/100，Invitrogen)及抗壤血酸 2-磷酸($50 \mu\text{g/mL}$ ，Sigma-Aldrich)之 α -MEM(Invitrogen)，培養 4 日。各細胞集團係使用下列抗體組進行染色(Zombie NIR、PE/Cy7 CD3、FITC HLA-A24)。將結果示於圖 3。

【0140】 在與 iPS-Treg 進行共培養之組中，目標細胞的細胞分裂係以依賴 Treg 的細胞數的方式被強烈地抑制。再者，其抑制性功能在添加 IL-3、IL-4 及 TGF- β 並進行培養而得之 Treg 中，與對照(不包含 IL-3、IL-4 及 TGF- β)相比，可觀察到更強的效果。在 Treg：目標(Target)=2：1 時，相對於對照的抑制率為 31.3%，添加 IL-3、IL-4 及 TGF- β 而得之細胞集團中，可觀察到 66.9%的抑制率。由此等結果，已確認可在保持 Treg 的抑制性功能之同時，充分地增殖 Treg。

【0141】 [實施例 4]iPS-Treg 的擴大培養

將上述實施例 1 中所得之包含 CD4⁺T 細胞之細胞集團，以 2×10^5 個細胞/孔接種於已結合抗 CD3 抗體(eBioscience)之 48 孔細胞培養盤，在 CO₂ 保溫培養箱

中，在 37°C、5.0%CO₂ 條件下培養 3 日後，重新接種於 24 孔 G-Rex 細胞培養盤並繼續培養。培養基係使用以最終濃度計包含 FBS(15%，Corning)、L-麩醯胺酸-青黴素-鏈黴素溶液(1/100，Invitrogen，Sigma-Aldrich)、胰島素-運鐵蛋白-硒補充品(1/100，Invitrogen)、抗壞血酸 2-磷酸(50 μg/mL，Sigma-Aldrich)、IL-2(10ng/mL，Peprotech)、雷帕黴素(10nM，merck millipore)、抗 TNFR2 抗體(3 μg/mL，Hycult Biotech)、IL-3(60ng/mL，BioLegend)、IL-4(30ng/mL，BioLegend)、IL-33(30ng/mL，BioLegend)及 TGF-β 1(5ng/mL，BioLegend)之 α-MEM(Invitrogen)。再者，對照條件係使用從上述培養基組成中減去雷帕黴素、抗 TNFR2 抗體、IL-3、IL-4、IL-33 及 TGF-β 1 而得之培養基。最初的 3 日係對上述組成進一步添加抗 CD28 抗體(1.5 μg/mL，BioLegend)、抗 CD30 抗體(300ng/mL，R&D systems)。培養係在培養開始第 3 日及其以後以 2-3 日一次的頻率一邊進行培養基更換一邊培養 14 日。再者，將培養第 14 日的細胞一部分以 2×10⁵ 個細胞/孔接種於上述已結合抗 CD3 抗體之 48 孔細胞培養盤，以同樣的方法再次進行 14 日培養。每 14 日重複此步驟，繼續培養合計 42 日，對細胞數進行計測並製作折線圖。將結果示於圖 4。

【0142】以包含 IL-3、IL-4、IL-33 及 TGF-β 1 之培養基進行擴大培養所得之細胞集團，係相較於在對照條件下進行擴大培養所得之細胞集團顯現出較強的增殖力。使用 2 批導入有 CNS-Foxp3 之 iPS 細胞進行檢討，已判明細胞增殖的傾向在批次間未觀察到差異。由於在對照條件下進行擴大培養之組並未充分地增殖，細胞數較少，無法測定精確的細胞數，因而在 42 日前終止檢討。

【0143】[實施例 5]擴大培養中之 Treg 的蛋白質的表現量的檢討

使用實施例 4 中經擴大培養之細胞集團，檢討在 Treg 中表現之蛋白質的表現量。

【0144】 具體而言，使用實施例 4 中經擴大培養之第 8 日及第 30 日的各細胞集團，使用下列抗體組進行染色並藉由流式細胞儀進行解析：

Zombie NIR、BV510 CD3、BV421 CD4、PE/Cy7 CD8 β 、APC CD25、FITC FOXP3、PerCP/Cy5.5 CTLA4、PE Helios。

將結果示於圖 5。

【0145】 在第 8 天(Day 8)，相較於對照條件，添加 IL-3、IL-4、IL-33 及 TGF- β 1 並進行培養之組係 Treg 的比例增加(對照組為 27.5 至 28.9%，添加 IL-3、IL-4、IL-33 及 TGF- β 1 並進行培養之組為 78.3 至 82.4%)。再者，使用 2 批從導入有 CNS-Foxp3 之 iPS 細胞各自分化出之細胞進行檢討，在經擴大培養之細胞的 Treg 的蛋白質的表現量中，已判明該傾向亦未見到差異。

【0146】 [實施例 6]Treg 的抑制性功能的評估

使用實施例 4 中經擴大培養之細胞集團，與源自人類 PBMC 之同種異體 T 細胞共培養後，進行經由流式細胞儀所得之分析。

【0147】 具體而言，將源自與 Treg 不同的供體之未經抗 CD3 抗體處置或經抗 CD3 抗體處置之 T 細胞以 CellTrace Violet(Thermo Fisher Scientific)進行染色，將所得之物作為目標細胞使用，與 Treg 進行共培養。培養基係使用以最終濃度計包含 FBS(15%，Corning)、L-麩醯胺酸-青黴素-鏈黴素溶液(1/100，Invitrogen，Sigma-Aldrich)、胰島素-運鐵蛋白-硒補充品(1/100，Invitrogen)及抗壞血酸 2-磷酸(50 μ g/mL，Sigma-Aldrich)之 α -MEM(Invitrogen)，培養 5 日。各細

胞集團係使用以下抗體組進行染色(Zombie NIR、PE/Cy7 CD3、FITC HLA-A24)。將結果示於圖 6。

【0148】在與 iPS-Treg 進行共培養之組中，目標細胞的細胞分裂係以依賴 Treg 的細胞數之方式被強烈地抑制。其抑制性功能在批次間為同程度。由此等結果，已確認可在保持 Treg 的抑制性功能之同時，充分地增殖 Treg。

【0149】[實施例 7]iPS-Treg 的擴大培養

將上述實施例 1 中所得之包含 CD4⁺T 細胞之細胞集團，以 2×10^5 個細胞/孔接種於已結合抗 CD3 抗體(eBioscience)之 48 孔細胞培養盤，在 CO₂ 保溫培養箱中，在 37°C、5.0%CO₂ 條件下培養 3 日後，重新接種於 24 孔 G-Rex 細胞培養盤並繼續培養。培養基係使用以最終濃度計包含 FBS(15%，Corning)、L-麩醯胺酸-青黴素-鏈黴素溶液(1/100，Invitrogen，Sigma-Aldrich)、胰島素-運鐵蛋白-硒補充品(1/100，Invitrogen)、抗壞血酸 2-磷酸(50 μ g/mL，Sigma-Aldrich)、IL-2(10ng/mL，Peprotech)、抗 TNFR2 抗體(3 μ g/mL，Hycult Biotech)、IL-3(60ng/mL，BioLegend)、IL-4(30ng/mL，BioLegend)、IL-33(30ng/mL，BioLegend)及 TGF- β 1(5ng/mL，BioLegend)之 α -MEM(Invitrogen)。最初的 3 日係對上述組成進一步添加抗 CD28 抗體(1.5 μ g/mL，BioLegend)、抗 CD30 抗體(300ng/mL，R&D systems)。培養係在培養開始第 3 日及其以後以 2-3 日一次的頻率一邊進行培養基更換一邊培養 14 日。將此步驟重複進行 4 次。

【0150】將所得之細胞集團進一步以 2×10^5 個細胞/孔接種於已結合抗 CD3 抗體(eBioscience)之 48 孔細胞培養盤，在 CO₂ 保溫培養箱中，在 37°C、5.0%CO₂ 條件下培養 3 日後，重新接種於 24 孔 G-Rex 細胞培養盤並繼續培養。培養基係使用以最終濃度計包含 FBS(15%，Corning)、L-麩醯胺酸-青黴素-鏈黴素溶液

(1/100, Invitrogen, Sigma-Aldrich)、胰島素-運鐵蛋白-硒補充品(1/100, Invitrogen)、抗壞血酸 2-磷酸($50 \mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich)、IL-2(10ng/mL , Peprotech)、雷帕黴素(10nM , merck millipore)、抗 TNFR2 抗體($3 \mu\text{g/mL}$, Hycult Biotech)、IL-3(60ng/mL , BioLegend)、IL-4(30ng/mL , BioLegend)、IL-33(30ng/mL , BioLegend)及 TGF- β 1(5ng/mL , BioLegend)之 α -MEM(Invitrogen), 進一步添加 CDK8/19 阻礙劑(AS2863619, MedChemExpress) $0.05 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.015 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $1.5 \mu\text{g/mL}$ 或 $5.0 \mu\text{g/mL}$ 。最初的 3 日係對上述組成進一步添加抗 CD28 抗體($1.5 \mu\text{g/mL}$, BioLegend)、抗 CD30 抗體(300ng/mL , R&D systems)。培養係在培養開始第 3 日及其以後以 2-3 日一次的頻率一邊進行培養基更換一邊培養 17 日, 對細胞數進行計測並製作折線圖。將結果示於圖 7。

【0151】在經添加 CDK8/19 阻礙劑之組中, 獲得細胞增殖係以依賴 CDK8/19 阻礙劑的濃度之方式而亢進之結果(在擴大培養第 17 日, 相比於擴大培養前經添加 $5.0 \mu\text{g/mL}$ CDK8/19 阻礙劑者增殖了 58 倍, 相對於此, 未添加組增殖了 2.7 倍)。

【0152】[實施例 8]擴大培養中之 Treg 的蛋白質的表現量的檢討

使用實施例 7 中經擴大培養之細胞集團, 檢討在 Treg 中表現之蛋白質的表現量。

具體而言, 使用實施例 7 中經擴大培養之第 17 日的各細胞集團, 使用下列抗體組進行染色並藉由流式細胞儀進行解析:

Zombie NIR、BV510 CD3、BV421 CD4、PE/Cy7 CD8 β 、APC CD25、FITC FOXP3、PerCP/Cy5.5 CTLA4。

將結果示於圖 8。

【0153】實施例 7 中進行擴大培養所得之細胞集團可觀察到 Treg 的比例係以依賴 CDK8/19 阻礙劑的濃度之方式增加。此時之 Treg 的比例在 CDK8/19 阻礙劑的濃度為 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 時達到平線區，即便將濃度提高至其以上，亦幾乎未見到 Treg 的比例增加。關於 CTLA4 陽性率，在經添加 CDK8/19 阻礙劑之細胞中，亦可觀察到相比於對照有變高之傾向。

【0154】本申請案係以在日本於 2022 年 9 月 26 日申請之日本特願 2022-152606 號為基礎，其內容全部含括於本說明書中。

【符號說明】無

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="ja" dtdVersion="V1_3"
fileName="333630中文序列表.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-01-12">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112136655</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-09-25</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>P23-204W0</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>JP</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>2022-152606</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-09-26</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">國立大學法人京都大學</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>Kyoto University</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="en">Method for manufacturing T
cell</InventionTitle>
  <InventionTitle languageCode="zh">T細胞之製造方法</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>8</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>1191</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..1191</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgcccaaccccaggcctggcaagccctcggcccccttccttggcccttggcccatccccagg
agcctcgcccagctggagggtgcacccaaagcctcagacctgctggggggccggggcccagggggaaccttccagggcc
gagatcttcgaggcggggcccatgcctcctcttcttcttgaaccccatgccaccatcgcagctgcagctctcaacggtg
gatgcccacgcccggaccctgtgctgcaggtgcacccctggagagcccagccatgatcagcctcacaccaccaccac
cgccactggggctcttctccctcaaggcccggcctggcctcccacctgggatcaacgtggccagcctggaatgggtgtcca
gggagccggcactgctctgcaccttcccaaattcccagtgcaccaggaaggacagcacccttctggctgtgccccagagc
tcctaccactgctggcaaatgggtgtctgcaagtggcccggatgtgagaaggtcttcgaagagccagaggacttctcaa
gcactgccaggcggaccatcttctggatgagaagggcagggcacaatgtctcctccagagagagatggtacagtctctgg
agcagcagctggtgctggagaaggagaagctgagtgccatgcaggcccacctggctgggaaaatggcactgaccaaggct
tcctctgtggcatcatccgacaagggtcctgctgcatcgtagctgctggcagccaaggccctgtcgtcccagcctggtc
tggccccgggaggccctgacagcctgtttgctgtccggaggcacctgtgggtagccatggaaacagcacattcccag
agttctccacaacatggactacttcaagttccacaacatgcgaccccccttccactacgccacgctcatccgctgggcc
atcctggaggctccagagaagcagcggacactcaatgagatctaccactggttcacacgcatgtttgccttcttcagaaa
ccatcctgccacctggaagaacgccatccgccacaacctgagctctgcacaagtgctttgtgcggtggagagcgagaagg
ggctgtgtggaccgtggatgagctggagttccgcaagaaacggagccagaggcccagcaggtgttccaaccctacacct
ggcccctga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1296</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1296</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q2">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgcccaaccccaggcctggcaagccctcggcccccttccttggcccttggcccatccccagg
agcctcgcccagctggagggtgcacccaaagcctcagacctgctggggggcccggggcccagggggaaccttccagggcc
gagatcttcgaggcggggcccatgcctcctcttcttcttgaaccccatgccaccatcgcagctgcagctgcccacactg
cccctagtcatggtggcaccctccggggcacggctgggcccccttgccccacttacaggcactcctccaggacaggccaca
tttcatgcaccagctctcaacggtgatgccacgccccggacccctgtgctgcaggtgcacccccctggagagcccagcca
tgatcagcctcacaccaccaccaccgcccactgggggtcttctccctcaaggccccggcctggcctcccacctgggatcaac
gtggccagcctggaatgggtgtccaggagccggcactgctctgcaccttcccaaatcccagtgcacccaggaaggacag
cacccttccggctgtgccccagagctcctaccactgctggcaaatggtgtctgcaagtggccccggatgtgagaaggctct
tcgaagagccagaggacttcccaagcactgccaggcggaccatcttctggatgagaagggcagggcacaatgtctctctc
cagagagagatggtacagtctctggagcagcagctggtgctggagaaggagaagctgagtgccatgcaggccccacctggc
tgggaaatggcactgaccaaggttcatctgtggcatcatccgacaagggtcctgctgcatcgtagctgctggcagcc
aaggccctgtcgtcccagcctggtctggcccccgaggccccctgacagcctgtttgctgtccggaggcacctgtgggggt
agccatggaacagcacattcccagagttcctccacaacatggactacttcaagttccacaacatgcgaccccccttccac
ctacgccacgctcatccgctgggccatcctggaggctccagagaagcagcggacactcaatgagatctaccactggttca
cacgcatgtttgccttcttcagaaaccatcctgccacctggaagaacgccatccgccacaacctgagctctgcacaagtgc
tttgtgcgggtggagagcgagaagggggctgtgtggaccgtggatgagctggagttccgcaagaaacggagccagaggcc
cagcaggtgttccaaccctacacctggccccctga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>396</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..396</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q3">

```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MPNPRPGKPSAPSLALGPSGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSSSLN
PMPPSQLQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAP
RKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQ
AHLGKMLTKASSVASSDKGCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMR
PPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVVRVESEKGAVWTVDELEFRKKR
SQRPSRCSNPTPGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>431</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..431</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q4">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MPNPRPGKPSAPSLALGPSGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSSSLN
PMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFS
LKARPLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADH
LLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLGKMLTKASSVASSDKGCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREAP
DSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEYHWFTRMFAFFRNHPATWK

```

```

NAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNPTPGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 5" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>238</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..238</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q5">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>taggttagtcttttttctgtggcttctgtctctggttttgtgcttagaaagtcctttccta
cttgaatgagataaatgttcacctatgttgcttctagtctcttttatggcttcatttttccatttactatagaggt
taagagtgtgggtactggagccagactgtctgggacaaaccagcgtcacccaagccctatgtgtgatttttagccagg
cactaacctctcat</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 6" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>360</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..360</INSDFeature_location>

```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q6">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ccaagaaggccaggtcttcagagctaggggcttgtcatagtggccagatggacatcaccta
ccacatccaccagcaccatgtcacccccacctgggccaagcctgctgcaggacagggcagccagttctcggaacgaaacc
tgtggggtgggtatctgccctcttctcttctccctggtgtcgatgaagcccggcgcatccggccgccatgacgtcaat
ggcggaaaaatctgggcaagtcggggctgtgacaacagggcccagatgcagaccccgatatgaaaacataatctgtgtc
ccagaacatccccattcagcttctgagaaaccagtcagaaagggacgtcccaaca</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>218</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..218</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q7">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gaggccctgggcccaggatggggcaggcagggtgggggtacctggacctacaggtgccgacct
ttactgtggcactgggcgggaggggggctggctggggcacaggaagtggtttctgggtcccaggcaagtctgtgacttat
gcagatgttcaggccaagaaaatccccacctgccaggcctcagagattggaggctctccccgacctccaatcc</IN
SDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>383</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..383</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q8">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tccatccacacatagagcttcagattctctttctttccccagagacctcaaatatcctct
cactcacagaatggtgtctctgcctgcctcgggttgccctgtgatttatttttagttctttcccttggtttttttttt
caactctatacacttttggttttaaaactgtggtttctcatgagccctattatctcattgatacctctcacctctgtgg
tgaggggaagaaatcatattttcagatgactcgtaaaggcgaagaaaaaacccaaaatttcaaaatttccgtttaagt
ctcataatcaagaaaaggagaaacacagagagagagaaaaaaaactatgagaaccctccccacccctgattatcag
c</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種調節性 T 細胞經增殖之細胞集團的製造方法，其包含(1)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下，培養包含源自多能性幹細胞之 CD4⁺T 細胞之細胞集團之步驟。

【請求項2】 如請求項 1 所述之製造方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑及 IL-3 的存在下進行前述步驟(1)。

【請求項3】 如請求項 1 所述之製造方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑及 IL-33 的存在下進行前述步驟(1)。

【請求項4】 如請求項 1 所述之製造方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3 及 IL-33 的存在下進行前述步驟(1)。

【請求項5】 如請求項 1 所述之製造方法，其係更在選自由 IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑所組成之群組中之至少 1 種以上的存在下進行前述步驟(1)。

【請求項6】 如請求項 5 所述之製造方法，其係更在 IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

【請求項7】 如請求項 1 所述之製造方法，其係在 IL-4、TGF- β R 促效劑、IL-3、IL-33、IL-2、TNFR2 促效劑及 mTOR 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

【請求項8】 如請求項 1 所述之製造方法，其係更在 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑的存在下進行前述步驟(1)。

【請求項9】 如請求項 1 所述之製造方法，其中，前述 TGF- β R 促效劑為 TGF- β 。

【請求項10】 如請求項 5 至 7 中任一項所述之製造方法，其中，前述 mTOR 阻礙劑為雷帕黴素。

【請求項11】 如請求項 5 至 7 中任一項所述之製造方法，其中，前述 TNFR2 促效劑為 TNFR2 促效劑抗體。

【請求項12】 如請求項 8 所述之製造方法，其中，前述 CDK8 及/或 CDK19 阻礙劑為選自由 4-[1-(2-甲基-1H-苯并咪唑-5-基)-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基]-1,2,5-噁二唑-3-胺、3-{1-[1-(4-甲氧基苯基)哌啶-4-基]-4-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-基}吡啶-2-胺、以及 CDK8 及/或 CDK19 的 siRNA 所組成之群組中之至少 1 種。

【請求項13】 如請求項 1 所述之製造方法，其中，前述調節性 T 細胞為 CD25⁺/FOXP3⁺細胞。

【請求項14】 如請求項 1 所述之製造方法，其中，前述 CD4⁺T 細胞為選自由 CD25⁺/FOXP3⁺細胞及 CD25⁻/FOXP3⁻細胞所組成之群組中之至少 1 種細胞。

【請求項15】 如請求項 1 所述之製造方法，其中，前述 CD4⁺T 細胞為導入有表現構築物之細胞，該表現構築物包含下列(a)至(c)：

(a)FOXP3 基因的保守非編碼序列(Conserved Non-coding Sequence, CNS)1、CNS2 及 CNS3；

(b)啟動子；以及

(c)編碼 FOXP3 之核酸。

【請求項16】 如請求項 1 所述之製造方法，其係在前述步驟(1)之前，更包含(2)將多能性幹細胞分化誘導成包含 CD4⁺T 細胞之細胞集團之步驟。

【請求項17】 如請求項 16 所述之製造方法，其係在前述步驟(2)之前，更包含(3)將表現構築物導入至多能性幹細胞中之步驟，該表現構築物包含下列(a)至(c)：

(a)FOXP3 基因的 CNS1、CNS2 及 CNS3；

(b)啟動子；以及

(c)編碼 FOXP3 之核酸。

【請求項18】 一種調節性 T 細胞的增殖方法，其包含(1A)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下，培養包含源自多能性幹細胞之調節性 T 細胞之細胞集團之步驟。

【請求項19】 一種包含調節性 T 細胞之細胞集團的製造方法，其包含(1B)在 IL-4 及 TGF- β R 促效劑的存在下，培養包含源自多能性幹細胞之 CD4⁺/CD25⁻/FOXP3-T 細胞之細胞集團之步驟。

【請求項20】 如請求項 1、18 或 19 所述之方法，其中，前述多能性幹細胞為 iPS 細胞。

【請求項21】 一種包含調節性 T 細胞之細胞集團，其係藉由請求項 1、18 或 19 所述之方法所獲得者。

【請求項22】 一種醫藥，其係含有請求項 21 所述之包含調節性 T 細胞之細胞集團而成者。

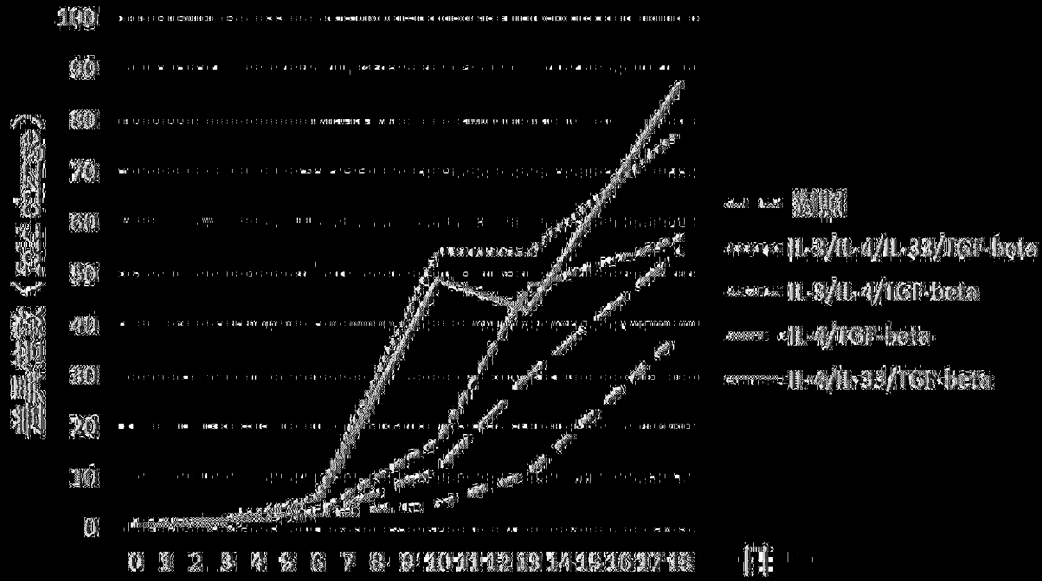
【請求項23】 如請求項 22 所述之醫藥，其係用於免疫反應的異常亢進之預防及/或治療。

【請求項24】 一種免疫反應的異常亢進的預防及/或治療方法，其包含將請求項 21 所述之包含調節性 T 細胞之細胞集團投予至對其有需求之對象。

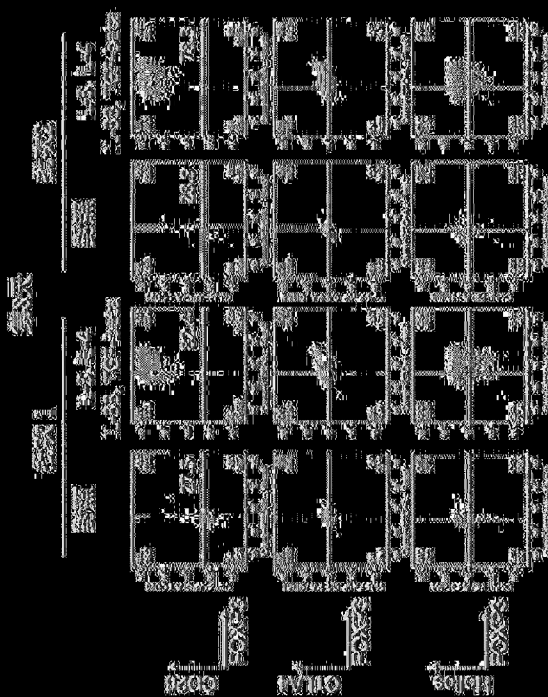
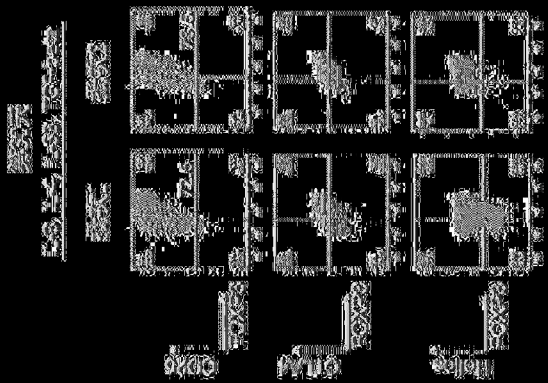
【請求項25】 如請求項 21 所述之包含調節性 T 細胞之細胞集團，其係用於在免疫反應的異常亢進的預防及/或治療中使用。

【請求項26】 一種請求項 21 所述之包含調節性 T 細胞之細胞集團的用途，其係製造用以預防及/或治療免疫反應的異常亢進之醫藥。

(發明圖式)



(圖1)



Top: LMS

100%

品質管理

第1次

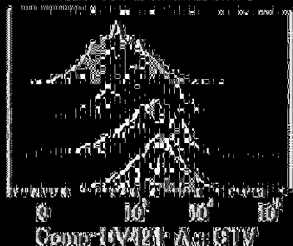
0:1
0.5:1
1:1
2:1



52.8
68.0
69.3

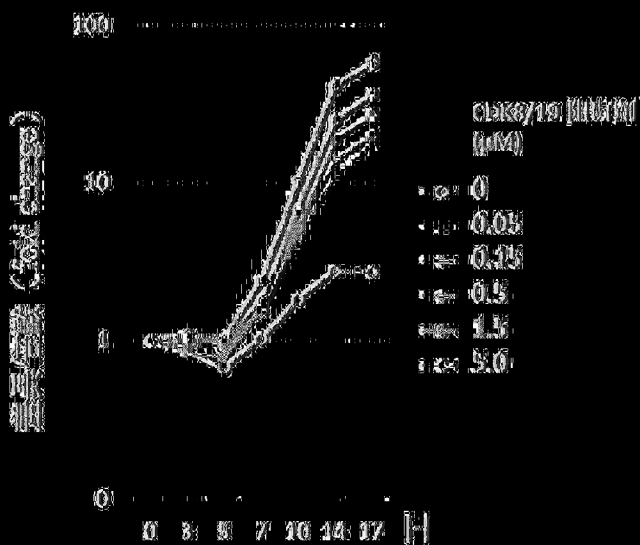
第2次

0:1
0.5:1
1:1
2:1



47.0
59.9
65.6

[16]



[17]

