

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7181219号
(P7181219)

(45)発行日 令和4年11月30日(2022.11.30)

(24)登録日 令和4年11月21日(2022.11.21)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 N	5/09 (2010.01)	C 1 2 N	5/09
C 1 2 N	5/0735(2010.01)	C 1 2 N	5/0735
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62
		Z	
		請求項の数 32 (全65頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2019-556588(P2019-556588)	(73)特許権者	510003830
(86)(22)出願日	平成30年4月18日(2018.4.18)		フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2020-517237(P2020-517237 A)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1, マディソン, サイエンス ドラ イブ 5 2 5, スイート 2 0 0, ユニ バーシティ リサーチ パーク
(43)公表日	令和2年6月18日(2020.6.18)	(74)代理人	110000109弁理士法人特許事務所サイ クス
(86)国際出願番号	PCT/US2018/028133	(72)発明者	ボドヤニク マクシム エイ
(87)国際公開番号	WO2018/195175		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 スイート 2 0 0 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレ イテッド内
(87)国際公開日	平成30年10月25日(2018.10.25)		最終頁に続く
審査請求日	令和3年4月15日(2021.4.15)		
(31)優先権主張番号	62/486,875		
(32)優先日	平成29年4月18日(2017.4.18)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 抗原特異的免疫エフェクター細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を生成する方法であって、

(a) 多能性幹細胞(PSC)を改変し、キメラ抗原受容体(CAR)を発現し、それによりCAR-PSCを生成することと；

(b) 前記CAR-PSCをCD34+造血前駆細胞(HPC)に分化させることと、

(c) 前記CD34+HPCをT細胞及び／又はNK細胞にさらに分化させることと；

(d) 前記T細胞及び／又はNK細胞を拡大させることであって、拡大させることが、抗原を発現する細胞と共培養し、それにより抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を生成することを含むことと

を含み、

ステップ(b)が、

(ba) プレビスタチン、GSK-3阻害剤、FGF2、及びVEGFの存在下で胚様体(EB)を生成することと；

(bb) 中胚葉誘導を誘導させるため、前記EBをBMP-4、VEGF、及びFGF2と接触させることと；

(bc) FLT-3リガンド、IL3、SCF、及びTPOの存在下で前記EBを分化させ、それによりHPCを生成することと、

を含む指向された分化誘導を実施することを含む、方法。

【請求項2】

ステップ（a）の前記PSCが、人工多能性幹細胞（iPSC）又は胚性幹細胞（ESC）である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記iPSCが、T細胞からリプログラミングされる、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

ステップ（bc）の分化させることが、BMP4が0.01%未満であるか、又はステップ（bc）の分化させることが、IL-11、cAMP、及び／又はVEGFの存在をさらに含む、請求項1から3の何れか一項に記載の方法。

【請求項5】

ステップ（bc）の分化させることが、IL-11、cAMP、及びVEGFの存在をさらに含む、請求項4に記載の方法。

10

【請求項6】

前記GSK-3阻害剤が、CHIR99021である、請求項1から5の何れか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記PSCが、導入遺伝子を含まない、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記PSCがヒト由来である、請求項1から7の何れか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記T細胞が、CD4+T細胞、CD8+T細胞、細胞傷害性T細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、又はγδT細胞である、請求項1から8の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項10】

ステップ（a）の前記PSCが、単一の誘導性プロモーターの制御下でERG／ETV2、GATA2、及びHOXA9を発現するようにさらに改変される、請求項1から9の何れか一項に記載の方法。

【請求項11】

ステップ（a）が、HMGA2、MYCN、NR4A2、SOX17、TFEC、MEIS1、及びHOXA4を発現するように、前記PSCを改変することをさらに含む、請求項10に記載の方法。

30

【請求項12】

フィーダーフリー条件下で前記細胞を培養することを含む、請求項1から11の何れか一項に記載の方法。

【請求項13】

ステップ（b）が、CD34及びCD43を発現する細胞について、抗原特異的T細胞及び／又はNK細胞に分化させる前に選択することをさらに含む、請求項1から12の何れか一項に記載の方法。

【請求項14】

選択することが、磁気活性化細胞選別（MACS）を実施することを含む、請求項13に記載の方法。

40

【請求項15】

全細胞集団の少なくとも35パーセントがCD34及びCD43を発現するか、全細胞集団の少なくとも65パーセントがCD34及びCD43を発現する、請求項13又は14に記載の方法。

【請求項16】

前記HPCの少なくとも5パーセントが前記CARを発現するか、又は前記HPCの少なくとも10パーセントが前記CARを発現するか、又は前記HPCの少なくとも15パーセントが前記CARを発現する、請求項1から15の何れか一項に記載の方法。

【請求項17】

ステップ（c）の分化させることが、前記HPCを、低酸素条件下、アスコルビン酸及

50

びニコチンアミドの存在下、レトロネクチン及びノッチD L L - 4でコーティングされた表面上で培養することを含む、請求項1から16の何れか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記培養における培養物が、S C F、F L T - 3リガンド、T P O、及びI L - 7をさらに含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記培養における培養物が、G S K - 3阻害剤、I L - 2、及び／又はI L - 12をさらに含む、請求項17又は18に記載の方法。

【請求項20】

前記培養における培養物が、G S K - 3阻害剤、I L - 2、及びI L - 12をさらに含む、請求項17又は18に記載の方法。

10

【請求項21】

前記(c)により分化されたC D 3 4+H P Cの少なくとも1.5パーセントが、C D 3 +C A R+T細胞であるか、又は前記(c)により分化されたC D 3 4+H P Cの少なくとも2パーセントが、C D 3 +C A R+N K細胞であるか、又は前記(d)により拡大されたC D 3 4+H P Cの少なくとも10パーセントが、C D 3 +C A R+N K細胞である、請求項17から20の何れか一項に記載の方法。

【請求項22】

ステップ(d)の拡大させることが、前記抗原特異的T細胞を抗C D 3抗体、I L - 2、及びI L - 15の存在下で培養することをさらに含む、請求項1から21の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項23】

前記拡大されたC D 3 4+H P Cの少なくとも2パーセントが、C D 3 +C A R+N K細胞であるか、又は

ステップ(d)の拡大させることが、前記抗原特異的T細胞を抗C D 3抗体、I L - 2、I L - 15、及びI L - 21の存在下で培養することをさらに含むか、又は

ステップ(d)の拡大させることが、前記抗原特異的T細胞を抗C D 3抗体、F L T 3リガンド、I L - 7、I L - 2、I L - 15、及び／又はI L - 21の存在下で培養することをさらに含むか、又は

ステップ(d)の拡大させることが、S C F及びT P Oからなる群から選択される1つ又は2つの追加的な成分をさらに含む、請求項22に記載の方法。

30

【請求項24】

前記C A Rが、前記抗原を発現する細胞における抗原に特異的である、請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記抗原がC D 19であるか、又は前記抗原を発現する細胞が腫瘍細胞であるか、又は前記抗原を発現する細胞がヒト由来である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記抗原を発現する細胞がH L AクラスI陰性である、請求項24又は25に記載の方法。

40

【請求項27】

前記抗原特異的エフェクターT細胞の少なくとも5パーセントが、標的細胞に対する細胞傷害性活性を示すか、又は前記抗原特異的エフェクターN K細胞の少なくとも40パーセントが、標的細胞に対する細胞傷害性活性を示す、請求項24から26の何れか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記C A Rが、前記P S Cのゲノムに組み込まれたD N Aによってコードされるか、又は前記C A Rが、細胞内シグナル伝達ドメイン、膜貫通ドメイン、及び抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含む、請求項1から27の何れか一項に記載の方法。

【請求項29】

50

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3ζ及びCD28を含むか、又は前記抗原結合領域が、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、又はscFvである、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記PSCがHLAホモ接合性である、請求項1から29の何れか一項に記載の方法。

【請求項31】

前記PSCが、遺伝子座対立遺伝子HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DP又はHLA-DQの1つ以上においてホモ接合性であるか、又は前記PSCが、前記遺伝子座対立遺伝子HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DP又はHLA-DQの2つにおいてホモ接合性である、請求項30に記載の方法。

10

【請求項32】

前記PSCが、HLA-A及びHLA-Bにおいてホモ接合性であるか、又は前記PSCが、HLA-A、HLA-B、及びHLA-Cにおいてホモ接合性である、請求項30又は31に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2017年4月18日に出願された米国仮特許出願第62/486,875号明細書の優先権の利益を主張し、その内容全体はここで参照により援用される。

【背景技術】

20

【0002】

1. 分野

本発明は、一般に分子生物学の分野に関する。より詳細には、それは、抗原特異的免疫エフェクター細胞、例えばT細胞及びNK細胞に関する方法及び組成物に関する。

【0003】

2. 関連技術の説明

がんと診断された患者にとって利用可能な診断及び治療オプションにおける技術的進歩にもかかわらず、依然として予後不良のままであることが多く、多くの患者が治癒不能である。免疫療法は、正常組織を損傷させることなく悪性腫瘍細胞を根絶する可能性とともに、様々な腫瘍を有すると診断された患者に対して強力であるが標的化された治療をもたらす可能性を秘めている。理論上、免疫系のT細胞は、腫瘍細胞に特異的なタンパク質パターンを認識する能力があり、種々のエフェクター機構を通じてのそれらの破壊を媒介することになる。養子T細胞療法は、患者自身のT細胞の腫瘍根絶能力を利用・増幅し、次にこれらのエフェクターを、それらが残留腫瘍を有効に除去しても健常組織を損傷しないような状態で患者に戻すという試みである。この手法は腫瘍免疫学の分野にとって新規性はないが、養子T細胞療法の臨床使用における多くの欠点により、がん治療におけるこの手法の十分な利用が損なわれる。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

40

現行の養子T細胞療法は、患者や腫瘍特異的T細胞の不足、例えば、体内にそれらが希少であること、それらがいくつかの腫瘍免疫系の回避機構を克服できないこと、及びそれらの寿命が短いことにより、制限を受ける。所望される抗原に対して反応性を示す、典型的には少数のT細胞を単離及び拡大することは困難である。したがって、免疫療法における有効利用を意図した治療的に十分且つ機能的な抗原特異的免疫細胞に対する需要は満たされていない。

【課題を解決するための手段】

【0005】

第1の実施形態では、本開示は、抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を生成する方法であって、多能性幹細胞(PSC)を改変し、キメラ抗原受容体(CAR)

50

を発現し、それによりCAR-PSCを生成することと；CAR-PSCをCD34⁺造血前駆細胞（HPC）に分化させるか又はフォワードにリプログラミングすることと；CD34⁺HPCをT細胞及び／又はNK細胞にさらに分化させることと；T細胞及び／又はNK細胞を拡大させることと、を含む、方法を提供する。いくつかの態様では、拡大させることは、抗原特異的標的細胞と共培養し、それにより抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を生成することを含む。

【0006】

特定の態様では、CARを発現するように改変されたPSCは、人工多能性幹細胞（iPSC）又は胚性幹細胞（ESC）である。特定の態様では、iPSCは、体細胞、例えばT細胞からリプログラミングされる。

【0007】

いくつかの態様では、CAR-PSCをCD34⁺HPCに分化させるステップは、指向された分化誘導（directed differentiation）を実施することを含む。特定の態様では、指向された分化誘導は、胚様体（EB）をプレビスタチン、GSK-3阻害剤、FGF2、及びVEGFの存在下で生成することと；中胚葉誘導を誘導するため、EBをBMP4、VEGF、及びFGF2と接触させることと；EBをFLT-3リガンド、IL-3、SCF、及びTPOの存在下で分化させ、それによりHPCを生成することと、を含む。いくつかの態様では、分化は、BMP4が本質的に含まないか又は含まない培地中でなされる。他の態様では、分化は、BMP4の存在下でなされる。特定の態様では、GSK-3阻害剤は、CHIR99021である。いくつかの態様では、分化は、IL-11、cAMP、及び／又はVEGFの存在をさらに含む。

【0008】

いくつかの態様では、指向された分化誘導は、プレビスタチン、BMP4、VEGF、及びbFGFの存在下で、アミンでコーティングされた表面上で個別化されたPSCを培養することと；PSCをBMP4、VEGF、及びFGF2と接触させることにより分化を開始させることと；PSCをFLT-3リガンド、IL-3、IL-6、SCF、TPO、及びヘパリンの存在下でさらに分化させ、それによりHPCを生成することと、を含み、方法はEBの形成を含まない。

【0009】

特定の態様では、方法は、方法全体の持続時間など、限定されたフィーダーフリー条件下で該細胞を培養することを含む。いくつかの態様では、PSCは、本質的には導入遺伝子を含まないか又は導入遺伝子を含まない。特定の態様では、PSCは、ヒトである。特定の態様では、T細胞は、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、細胞傷害性T細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、及び／又はγδT細胞である。

【0010】

特定の態様では、CARを発現するように改変されたPSCは、ERG/ETV2、GATA2、及びHOXA9を、例えば単一の誘導性プロモーターの制御下で発現するようにさらに改変される。いくつかの態様では、方法は、HMGA2、MYCN、NR4A2、SOX17、TFEC、MEIS1、及び／又はHOXA4を発現するようにPSCを改変することをさらに含む。したがって、いくつかの態様では、CAR-PSCをCD34⁺HPCに分化させるステップは、ERG/ETV2、GATA2、及びHOXA9の発現を、HPCを生成するのに十分な期間にわたり誘導することと、HPCをT細胞及び／又はNK細胞にさらに分化させる前に発現の誘導を終了させることと、を含む。

【0011】

具体的な態様では、CAR-PSCをCD34⁺HPCに分化させるステップは、抗原特異的T細胞及び／又はNK細胞に分化させる前に、CD34及び／又はCD43を発現する細胞について選択することをさらに含む。特定の態様では、選択することは、磁気活性化細胞選別（MACS）を実施することを含む。いくつかの態様では、CD34及び／又はCD43を発現する細胞は、全細胞集団の少なくとも25、30、35、40、45、

10

20

30

40

50

50、60、65、70、75、80、85、90、又はより高いパーセントを含む。いくつかの態様では、CD34及び／又はCD43陽性細胞について選択するためにMACsを実施するステップは実施されない。

【0012】

特定の態様では、少なくとも2、3、4、5、10、15、20、又はより高いパーセントのHPCが、CARを発現する。いくつかの態様では、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45又はより高いパーセントのHPCが、CARを発現する。

【0013】

いくつかの態様では、HPCをT細胞及び／又はNK細胞に分化させることは、低酸素条件下、アスコルビン酸及びニコチンアミドの存在下で、HPCをレトロネクチン及びノッチDLL-4でコーティングされた表面上で培養することを含む。いくつかの態様では、培養物は、SCF、FLT-3リガンド、TPO、及びIL-7をさらに含み、また任意選択的には、GSK阻害剤（例えばCHIR99021）、IL-2、及び／又はIL-12を含む。特定の態様では、拡大するステップは、抗原特異的T細胞を抗CD3抗体及びIL-2の存在下で培養することをさらに含む。さらなる態様では、拡大するステップは、抗原特異的T細胞を抗CD3抗体、IL-2、IL-15、及びIL-21の存在下で培養することをさらに含む。いくつかの態様では、拡大するステップは、抗原特異的T細胞を、抗CD3抗体、FLT3リガンド、IL-7、IL-2、及び／又はIL-15の存在下で培養することを含み、また任意選択的にはSCF、TPO、及び／又はIL-21をさらに含む。特定の態様では、分化されたCD34⁺HPCの少なくとも1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50又はより高いパーセントが、CD3⁺CAR⁺T細胞である。いくつかの態様では、分化されたCD34⁺HPCの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50、又はより高いパーセントが、CD3-CAR⁺NK細胞である。いくつかの態様では、拡大されたCD34⁺HPCの少なくとも2パーセントが、CD3⁺CAR⁺T細胞である。特定の態様では、拡大されたCD34⁺HPCの少なくとも10パーセントが、CD3⁺CAR⁺NK細胞である。

【0014】

特定の態様では、CAR及び抗原特異的標的細胞は、同じ抗原に特異的である。ある具体的な態様では、抗原はCD19である。特定の態様では、抗原特異的標的細胞は、腫瘍細胞である。いくつかの態様では、抗原特異的標的細胞は、ヒトである。特定の態様では、抗原特異的標的細胞は、HLAクラスI陰性である。いくつかの態様では、抗原特異的エフェクターT細胞の少なくとも5、例えば、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50、又はより高いパーセントが、標的細胞に対する細胞傷害性活性を呈する。特定の態様では、抗原特異的エフェクターNK細胞の少なくとも10、例えば、15、20、25、30、35、40、45、50、又はより高いパーセントが、標的細胞に対する細胞傷害性活性を呈する。

【0015】

いくつかの態様では、CARは、PSCのゲノムに組み込まれたDNAによってコードされる。特定の態様では、CARは、細胞内シグナル伝達ドメイン、膜貫通ドメイン、及び抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含む。具体的な態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζ及びCD28を含む。いくつかの態様では、抗原結合領域は、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、又はscFvである。

【0016】

特定の態様では、PSCは、HLAホモ接合性である。いくつかの態様では、HLAホモ接合性PSCは、対立遺伝子HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DP又はHLA-DQ遺伝子座の1つ以上においてホモ接合性である。特定の態様では、HLAホモ接合性PSCは、対立遺伝子HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DP又はHLA-DQ遺伝子座の2つにおいてホモ接合性である。

10

20

30

40

50

特定の態様では、HLAホモ接合性PSCは、HLA-A及びHLA-Bにおいてホモ接合性である。特定の態様では、HLAホモ接合性PSCは、HLA-A、HLA-B、及びHLA-Cにおいてホモ接合性である。

【0017】

別の実施形態は、抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を生成する方法であって、CARを発現するようにPSCを改変し、それによりCAR-PSCを生成することと；CAR-PSCをプレビスタチン、GSK-3阻害剤、FGF2、及びVEGFの存在下で培養し、それによりEBを生成することと；中胚葉誘導を誘導するため、EBをBMP4、VEGF、及びFGF2と接触させることと；EBをFlt-3リガンド、BMP4、IL-3、SCF、及びTPOの存在下で分化させ、それによりCD34⁺HPCを生成することと；CD34⁺HPCをT細胞及び／又はNK細胞までさらに分化させることと；T細胞及び／又はNK細胞を拡大させることであって、拡大させることが、抗原特異的標的細胞と共培養し、それにより抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を生成することを含む、ことと、を含む、方法を提供する。特定の態様では、GSK-3阻害剤は、CHIR99021である。

10

【0018】

さらに別の実施形態では、抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を生成する方法であって、CARを発現するようにPSCを改変し、それによりCAR-PSCを生成することと；プレビスタチン、BMP4、VEGFの存在下で、アミンでコーティングされた表面上で個別化されたCAR-PSCを培養し、且つCAR-PSCをBMP4、VEGF、及びFGF2と接触させることにより分化を開始させることと；CAR-PSCをFlt-3リガンド、IL-3、IL-6、SCF、TPO、及びヘパリンの存在下でさらに分化させ、それによりCD34⁺HPCを生成することと；CD34⁺HPCをT細胞及び／又はNK細胞まで分化させることと；T細胞及び／又はNK細胞を拡大させることであって、拡大させることが、抗原特異的標的細胞と共培養し、それにより抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を生成することを含む、ことと、を含む、方法が提供され、方法はEBの形成を含まない。

20

【0019】

さらなる実施形態は、抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を生成する方法であって、CARを発現するようにPSCを改変し、それによりCAR-PSCを生成することと；CAR-PSCをCD34⁺HPCに分化させることと；CD34⁺CD43⁺HPCについて選択することと；CD34⁺CD43⁺HPCをT細胞及び／又はNK細胞までさらに分化させることと；T細胞及び／又はNK細胞を拡大させることであって、拡大させることが、抗原特異的標的細胞と共培養し、それにより抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を生成することを含む、ことと、を含む、方法を提供する。

30

【0020】

別の実施形態では、上記の実施形態に従って生成される抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞の集団が提供される。本明細書に記載の実施形態に従って生成される抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を含む医薬組成物もまた本明細書に提供される。さらに、対象におけるがんの治療のための実施形態に従って生成される抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を含む組成物が本明細書に提供される。がんの治療のための実施形態に従って生成される抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞の使用についても本明細書に提供される。

40

【0021】

さらに別の実施形態では、対象におけるがんを治療する方法であって、本明細書に記載の実施形態に従って生成される抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞を有効量で対象に投与することを含む、方法が提供される。いくつかの態様では、がんは、腫瘍抗原を発現し、抗原特異的エフェクターT細胞及び／又はNK細胞は、前記腫瘍抗原に特異的である。特定の態様では、対象はヒトである。

【0022】

50

本発明の他の目的、特徴及び利点は、以下の詳細な説明から明白となる。しかし、詳細な説明及び具体例が、本発明の好ましい実施形態を示す一方で、あくまで例示として示されることは理解されるべきである、というのは、本発明の精神及び範囲の範囲内での様々な変更及び修飾がこの詳細な説明から当業者にとって明白となるからである。

【0023】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様をさらに明らかにするように含まれる。本発明は、これらの図面の1つ以上を、本明細書に提示される具体的な実施形態の詳細な説明と組み合わせて参照することにより、より十分に理解されることがある。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1A】（図1A）フォワードプログラミング方法及び指向された分化誘導方法を含む、T細胞及びNK細胞をPSCから生成するための方法を表す模式図。（図1B）hPSCのフィーダーフリー並びに無血清T及びNK細胞分化を表す図。略称：CHIR-CHIR99021 GSK-3阻害剤；HDM、無血清造血分化培地；TCDM、T細胞分化培地；TCM、T細胞拡大培地；HPC、造血前駆細胞；アスターリスク（*）マークは任意選択的な増強成分である。（図1C）指向された分化誘導又はフォワードプログラミングを通じてのCD34⁺CD43⁺HPCのPSCからの効率。（図1D）T/NK分化培養物のフローサイトメトリー分析。（図1E）分化全体を通じての異なる細胞集団の収量。（図1F）PSC由来T細胞の表現型。（図1G）PSC由来T細胞の拡大。固定化された抗CD3抗体（iCD3）は、PSC由来T細胞の拡大用である（棒グラフ）。拡大培養下で増殖するT細胞は、不規則な形状をしたリンパ芽球の特徴的形態を得る（写真）。CD56及びCD8は、2週のT細胞拡大の発現を得る（フローサイトメトリーのドットプロット）。

【図1B】（図1A）フォワードプログラミング方法及び指向された分化誘導方法を含む、T細胞及びNK細胞をPSCから生成するための方法を表す模式図。（図1B）hPSCのフィーダーフリー並びに無血清T及びNK細胞分化を表す図。略称：CHIR-CHIR99021 GSK-3阻害剤；HDM、無血清造血分化培地；TCDM、T細胞分化培地；TCM、T細胞拡大培地；HPC、造血前駆細胞；アスターリスク（*）マークは任意選択的な増強成分である。（図1C）指向された分化誘導又はフォワードプログラミングを通じてのCD34⁺CD43⁺HPCのPSCからの効率。（図1D）T/NK分化培養物のフローサイトメトリー分析。（図1E）分化全体を通じての異なる細胞集団の収量。（図1F）PSC由来T細胞の表現型。（図1G）PSC由来T細胞の拡大。固定化された抗CD3抗体（iCD3）は、PSC由来T細胞の拡大用である（棒グラフ）。拡大培養下で増殖するT細胞は、不規則な形状をしたリンパ芽球の特徴的形態を得る（写真）。CD56及びCD8は、2週のT細胞拡大の発現を得る（フローサイトメトリーのドットプロット）。

【図1C】（図1A）フォワードプログラミング方法及び指向された分化誘導方法を含む、T細胞及びNK細胞をPSCから生成するための方法を表す模式図。（図1B）hPSCのフィーダーフリー並びに無血清T及びNK細胞分化を表す図。略称：CHIR-CHIR99021 GSK-3阻害剤；HDM、無血清造血分化培地；TCDM、T細胞分化培地；TCM、T細胞拡大培地；HPC、造血前駆細胞；アスターリスク（*）マークは任意選択的な増強成分である。（図1C）指向された分化誘導又はフォワードプログラミングを通じてのCD34⁺CD43⁺HPCのPSCからの効率。（図1D）T/NK分化培養物のフローサイトメトリー分析。（図1E）分化全体を通じての異なる細胞集団の収量。（図1F）PSC由来T細胞の表現型。（図1G）PSC由来T細胞の拡大。固定化された抗CD3抗体（iCD3）は、PSC由来T細胞の拡大用である（棒グラフ）。拡大培養下で増殖するT細胞は、不規則な形状をしたリンパ芽球の特徴的形態を得る（写真）。CD56及びCD8は、2週のT細胞拡大の発現を得る（フローサイトメトリーのドットプロット）。

10

20

30

40

50

【図 1 D】（図 1 A）フォワードプログラミング方法及び指向された分化誘導方法を含む、T細胞及びNK細胞をPSCから生成するための方法を表す模式図。（図 1 B）hPSCのフィーダーフリー並びに無血清T及びNK細胞分化を表す図。略称：CHIR-CHIR99021 GSK-3阻害剤；HDM、無血清造血分化培地；TCDM、T細胞分化培地；TCM、T細胞拡大培地；HPC、造血前駆細胞；アスターリスク（*）マークは任意選択的な増強成分である。（図 1 C）指向された分化誘導又はフォワードプログラミングを通じてのCD34⁺CD43⁺HPCのPSCからの効率。（図 1 D）T/NK分化培養物のフローサイトメトリー分析。（図 1 E）分化全体を通じての異なる細胞集団の収量。（図 1 F）PSC由来T細胞の表現型。（図 1 G）PSC由来T細胞の拡大。固定化された抗CD3抗体（iCD3）は、PSC由来T細胞の拡大用である（棒グラフ）。拡大培養下で増殖するT細胞は、不規則な形状をしたリンパ芽球の特徴的形態を得る（写真）。CD56及びCD8は、2週のT細胞拡大の発現を得る（フローサイトメトリーのドットプロット）。

10

【図 1 E】（図 1 A）フォワードプログラミング方法及び指向された分化誘導方法を含む、T細胞及びNK細胞をPSCから生成するための方法を表す模式図。（図 1 B）hPSCのフィーダーフリー並びに無血清T及びNK細胞分化を表す図。略称：CHIR-CHIR99021 GSK-3阻害剤；HDM、無血清造血分化培地；TCDM、T細胞分化培地；TCM、T細胞拡大培地；HPC、造血前駆細胞；アスターリスク（*）マークは任意選択的な増強成分である。（図 1 C）指向された分化誘導又はフォワードプログラミングを通じてのCD34⁺CD43⁺HPCのPSCからの効率。（図 1 D）T/NK分化培養物のフローサイトメトリー分析。（図 1 E）分化全体を通じての異なる細胞集団の収量。（図 1 F）PSC由来T細胞の表現型。（図 1 G）PSC由来T細胞の拡大。固定化された抗CD3抗体（iCD3）は、PSC由来T細胞の拡大用である（棒グラフ）。拡大培養下で増殖するT細胞は、不規則な形状をしたリンパ芽球の特徴的形態を得る（写真）。CD56及びCD8は、2週のT細胞拡大の発現を得る（フローサイトメトリーのドットプロット）。

20

【図 1 F-1】（図 1 A）フォワードプログラミング方法及び指向された分化誘導方法を含む、T細胞及びNK細胞をPSCから生成するための方法を表す模式図。（図 1 B）hPSCのフィーダーフリー並びに無血清T及びNK細胞分化を表す図。略称：CHIR-CHIR99021 GSK-3阻害剤；HDM、無血清造血分化培地；TCDM、T細胞分化培地；TCM、T細胞拡大培地；HPC、造血前駆細胞；アスターリスク（*）マークは任意選択的な増強成分である。（図 1 C）指向された分化誘導又はフォワードプログラミングを通じてのCD34⁺CD43⁺HPCのPSCからの効率。（図 1 D）T/NK分化培養物のフローサイトメトリー分析。（図 1 E）分化全体を通じての異なる細胞集団の収量。（図 1 F）PSC由来T細胞の表現型。（図 1 G）PSC由来T細胞の拡大。固定化された抗CD3抗体（iCD3）は、PSC由来T細胞の拡大用である（棒グラフ）。拡大培養下で増殖するT細胞は、不規則な形状をしたリンパ芽球の特徴的形態を得る（写真）。CD56及びCD8は、2週のT細胞拡大の発現を得る（フローサイトメトリーのドットプロット）。

30

【図 1 F-2】（図 1 A）フォワードプログラミング方法及び指向された分化誘導方法を含む、T細胞及びNK細胞をPSCから生成するための方法を表す模式図。（図 1 B）hPSCのフィーダーフリー並びに無血清T及びNK細胞分化を表す図。略称：CHIR-CHIR99021 GSK-3阻害剤；HDM、無血清造血分化培地；TCDM、T細胞分化培地；TCM、T細胞拡大培地；HPC、造血前駆細胞；アスターリスク（*）マークは任意選択的な増強成分である。（図 1 C）指向された分化誘導又はフォワードプログラミングを通じてのCD34⁺CD43⁺HPCのPSCからの効率。（図 1 D）T/NK分化培養物のフローサイトメトリー分析。（図 1 E）分化全体を通じての異なる細胞集団の収量。（図 1 F）PSC由来T細胞の表現型。（図 1 G）PSC由来T細胞の拡大。固定化された抗CD3抗体（iCD3）は、PSC由来T細胞の拡大用である（棒グラフ）。拡大培養下で増殖するT細胞は、不規則な形状をしたリンパ芽球の特徴的形態を得る

40

50

(写真)。CD56及びCD8は、2週のT細胞拡大の発現を得る（フローサイトメトリのドットプロット）。

【図1G-1】（図1A）フォワードプログラミング方法及び指向された分化誘導方法を含む、T細胞及びNK細胞をPSCから生成するための方法を表す模式図。（図1B）hPSCのフィーダーフリー並びに無血清T及びNK細胞分化を表す図。略称：CHIR-CHIR99021 GSK-3阻害剤；HDM、無血清造血分化培地；TCDM、T細胞分化培地；TCM、T細胞拡大培地；HPC、造血前駆細胞；アスターリスク（*）マークは任意選択的な増強成分である。（図1C）指向された分化誘導又はフォワードプログラミングを通じてのCD34⁺CD43⁺HPCのPSCからの効率。（図1D）T/NK分化培養物のフローサイトメトリ分析。（図1E）分化全体を通じての異なる細胞集団の収量。（図1F）PSC由来T細胞の表現型。（図1G）PSC由来T細胞の拡大。固定化された抗CD3抗体（iCD3）は、PSC由来T細胞の拡大用である（棒グラフ）。拡大培養下で増殖するT細胞は、不規則な形状をしたリンパ芽球の特徴的形態を得る（写真）。CD56及びCD8は、2週のT細胞拡大の発現を得る（フローサイトメトリのドットプロット）。

10

【図1G-2】（図1A）フォワードプログラミング方法及び指向された分化誘導方法を含む、T細胞及びNK細胞をPSCから生成するための方法を表す模式図。（図1B）hPSCのフィーダーフリー並びに無血清T及びNK細胞分化を表す図。略称：CHIR-CHIR99021 GSK-3阻害剤；HDM、無血清造血分化培地；TCDM、T細胞分化培地；TCM、T細胞拡大培地；HPC、造血前駆細胞；アスターリスク（*）マークは任意選択的な増強成分である。（図1C）指向された分化誘導又はフォワードプログラミングを通じてのCD34⁺CD43⁺HPCのPSCからの効率。（図1D）T/NK分化培養物のフローサイトメトリ分析。（図1E）分化全体を通じての異なる細胞集団の収量。（図1F）PSC由来T細胞の表現型。（図1G）PSC由来T細胞の拡大。固定化された抗CD3抗体（iCD3）は、PSC由来T細胞の拡大用である（棒グラフ）。拡大培養下で増殖するT細胞は、不規則な形状をしたリンパ芽球の特徴的形態を得る（写真）。CD56及びCD8は、2週のT細胞拡大の発現を得る（フローサイトメトリのドットプロット）。

20

【0025】

【図2-1】PSC由来T/NK細胞におけるCARの発現。プロテインL染色を用いてのフローサイトメトリにより評価された分化段階全体を通じてのCARの発現。CD3⁺T細胞は、λ鎖マウス抗ヒトCD3 mAb（クローンSP34-2）と共染色された。E11 PSC及びE11由来のHPC及びT細胞によるCARの発現が示される。

30

【図2-2】PSC由来T/NK細胞におけるCARの発現。プロテインL染色を用いてのフローサイトメトリにより評価された分化段階全体を通じてのCARの発現。CD3⁺T細胞は、λ鎖マウス抗ヒトCD3 mAb（クローンSP34-2）と共染色された。E11 PSC及びE11由来のHPC及びT細胞によるCARの発現が示される。

【0026】

【図3A-3B】PSC由来T/NK細胞におけるインビトロ抗CD19 CAR媒介性細胞傷害性。（図3A）ルシフェラーゼを発現するCD19⁺Daudi及びRaji標的細胞を用いてのインビトロ細胞傷害性アッセイ。（図3B）Incucyte S3生細胞分析システム（Essen Bioscience）を用いてのリアルタイム標的細胞計数によるCAR-T細胞の細胞溶解能。

40

【0027】

【図4】PSC由来T/NK細胞におけるインビトロ抗CD19 CAR誘導性サイトカイン産生。

【0028】

【図5A-1】PSC由来CAR-T/NK細胞のインビボ腫瘍溶解能。（図5A）インビボ生物発光イメージングによって監視されたマウスにおける腫瘍増殖。（図5B）PSC由来T（1C）又はNK（A16）細胞のいずれかで処置された異なるマウス群におけ

50

る生存曲線。

【図5A-2】PSC由来CAR-T/NK細胞のインビボ腫瘍溶解能。(図5A)インビボ生物発光イメージングによって監視されたマウスにおける腫瘍増殖。(図5B)PSC由来T(1C)又はNK(A16)細胞のいずれかで処置された異なるマウス群における生存曲線。

【図5B】PSC由来CAR-T/NK細胞のインビボ腫瘍溶解能。(図5A)インビボ生物発光イメージングによって監視されたマウスにおける腫瘍増殖。(図5B)PSC由来T(1C)又はNK(A16)細胞のいずれかで処置された異なるマウス群における生存曲線。

【発明を実施するための形態】

【0029】

特定の実施形態では、本開示は、抗原受容体、例えば本明細書中でCAR-PSCと称されるキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように改変されているヒト多能性幹細胞(PSC)から抗原特異的免疫エフェクター細胞を生成するための高度に効率的な方法を提供する。現行の方法によって生成される免疫エフェクター細胞が、限定はされないが、T細胞、NK細胞、及びiNKT細胞を含む。

【0030】

PSCは、T細胞の開始集団を(例えば、レトロウイルス又はエピソーム法により)リプログラミングし、T細胞由来のiPSC(TiPSC)を生成することにより得てもよい。T細胞は、様々な供給源、例えば血液サンプルから単離されてもよい。T細胞の開始集団は、それらの特徴的なT細胞受容体(TCR)遺伝子再構成を保持してもよく、HLAホモ接合性細胞(即ちMHCクラスI及びII遺伝子においてホモ接合性である)であってもよい。したがって、iPSCは、本明細書中でHLAスーパードナーと称されるHLAホモ接合性対象から単離された細胞から生成されうる。

【0031】

次に、CAR-PSCは、CD34⁺造血前駆細胞(HPC)を生成するように分化又はプログラムされてもよい。これは、サイトカイン(例えば、SCF、TPO、FLT-3、IL-6、IL-3、及びヘパリン)の組み合わせを用いた指向された分化誘導を通じて達成されてもよい(例えば、国際出願PCT/US2016/057899号明細書中に記載、その全体が参照により本明細書中に援用される)。代替的方法では、CAR-PSCは、ETV2/ERG、GATA2、及びHOXA9(即ちEGH)をコードする発現構築物によるフォワードプログラミングを用いて、CD34⁺HPCに分化されてもよい(例えば、国際出願PCT/US2016/057893号明細書中に記載、その全体が参照により本明細書中に援用される)。これらのEGH-PSCは、長期生着能(engraftability)のため、HMGA2、MYCN、NR4A2、SOX17、TFEC、MEIS1、及び/又はHOXA4を発現するようにさらに改変されてもよい。

【0032】

最終的には、CD34⁺CAR-HPCは、CD3⁺T細胞又はCD56⁺CD3⁻NK細胞に分化されてもよい。リンパ系能力についてHPC分化中(例えば7~11日)の最適な時間枠は、CD34及びCD43の発現によって同定された7~11日であってもよい。例えば、増強されたリンパ系能力を有するHPCは、マーカーCD144、CD34、CD45、及びCD7の2つ以上について陽性である細胞の画分を選別することにより単離されてもよい。

【0033】

T細胞分化のための例示的方法は、レトロネクチン及びDLL-4のフィーダーフリーマトリックスとしての使用を含む。T細胞分化は、効率及び成熟を増強するためのアスコルビン酸の使用により、並びに低酸素条件下で培養することにより、さらに増強されてもよい。

【0034】

さらに、T細胞及び/又はNK細胞は、分化プロセス中に抗原特異的標的細胞(例えば

10

20

30

40

50

腫瘍細胞)と共培養することにより増強されてもよい。この方法は、標的細胞に対するT細胞及びNK細胞の細胞傷害性活性を増強することが見出され、それは具体的には、腫瘍増殖における減少及び腫瘍細胞が注射されたマウスの生存における増加により認められた。

【0035】

したがって、本開示の方法は、インビボでの安定な移植、インビトロでの化合物のスクリーニング、及び血液学的疾患及び損傷の機構の解明などの広範囲の用途に、無数の抗原特異的免疫エフェクター細胞、例えばT細胞及びNK細胞を提供することができる。

【0036】

I. 定義

本明細書で用いられるとき、「本質的に含まない」は、特定成分の観点で、組成物に意図的に配合されている、且つ／又はあくまで汚染物質として又は微量で存在するような特定成分がないことを意味するように本明細書で用いられる。したがって、組成物の任意の意図しない汚染に起因する特定成分の総量は、0.05%を十分に下回り、好ましくは0.01%未満である。標準的分析法を用いて特定成分が全く検出できないような組成物が最も好ましい。

【0037】

本明細書で用いられるとき、「a」又は「an」は、1以上を意味してもよい。特許請求の範囲で用いられ、用語「含む (comprising)」と併用されるとき、用語「a」又は「an」は、1又は2以上を意味してもよい。

【0038】

特許請求の範囲の中での用語「又は」の使用は、あくまで代替物を指すことが明示されない限り「及び／又は」を意味するように用いられる、或いはその代替物は、相互に排他的であるが、本開示は、あくまで代替物と「及び／又は」を指すような定義を支持する。本明細書で用いられるとき、「別の」は、少なくとも第2又はそれ以上を意味してもよい。

【0039】

本願全体を通じて、用語「約」は、ある値が、その値を決定するために利用されているデバイス、方法における固有の誤差の変動、又は試験対象の中に存在する変動を含むことを示すように用いられる。

【0040】

用語「外因性」は、細胞又は生物におけるタンパク質、遺伝子、核酸、又はポリヌクレオチドに関連して用いられるとき、人工的又は天然手段により細胞又は生物に導入されているタンパク質、遺伝子、核酸、又はポリヌクレオチドを指し；又は細胞に関連して用いられるとき、該用語は、単離され、その後、人工的又は天然手段により他の細胞に又は生物に導入された細胞を指す。外因性核酸は、異なる生物又は細胞に由来してもよい、又はそれは、生物又は細胞内部に天然に存在する核酸の1つ以上の追加的なコピーであってもよい。外因性細胞は、異なる生物に由来してもよい、又はそれは同じ生物に由来してもよい。非限定例によると、外因性核酸は、天然細胞内に存在するような場合と異なる染色体位置に存在するものであり、又はそれ以外では、天然に見出される核酸配列と異なる核酸配列によって隣接される。

【0041】

「発現構築物」又は「発現カセット」は、転写を誘導する能力がある核酸分子を意味する。発現構築物は、最低限、1つ以上の所望される細胞型、組織又は臓器における遺伝子発現を誘導する、1つ以上の転写調節エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー又はそれと機能的に等価な構造）を含む。追加的なエレメント、例えば転写終結シグナルも含められてもよい。

【0042】

「ベクター」又は「構築物」（時として、遺伝子送達系又は遺伝子導入「媒体」と称される）は、インビトロ又はインビボのいずれかで宿主細胞に送達されるべきポリヌクレオチドを含む高分子又は分子の複合体を指す。

【0043】

10

20

30

40

50

ベクターの一般的タイプである「プラスミド」は、染色体DNAを独立して複製する能力がある、染色体DNAとは別の染色体外DNA分子である。特定の場合、それは環状であり、且つ二本鎖である。

【0044】

「複製起点」(「ori」)又は「複製起点」は、細胞内のプラスミド中に存在するとき、プラスミド中、及び／又はDNA合成が開始する部位又はその近傍で連結された配列を維持する能力がある、例えばリンパ増殖性ヘルペスウイルス中のDNA配列である。例として、EBV(エプスタイン・バーウイルス)におけるoriは、FR配列(30bpのリピートの20の不完全なコピー)、好ましくはDS配列を含むが、EBV中の他の部位がEBNA-1に結合し、例えばRep^{*}配列が複製起点としてDSを代替しうる(Kirshmaier and Sugden, 1998)。したがって、EBVの複製起点は、FR、DS又はRep^{*}配列又は任意の機能的に等価な配列を、核酸修飾又はそれらから得られる合成的組み合わせを通じて含む。例えば、本開示ではまた、Lindner et al., 2008に詳述された通り、例えば個別の要素の挿入又は突然変異による、EBVの遺伝子操作された複製起点が用いられてもよい。

10

【0045】

特定のタンパク質を「コードする」、「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「コード領域」、「配列」、「セグメント」、「断片」又は「導入遺伝子」は、適切な制御配列の制御下に置かれるとき、インビトロ又はインビボで、転写される、また任意選択的には遺伝子産物、例えばポリペプチドに翻訳される核酸分子である。コード領域は、cDNA、ゲノムDNA、又はRNAのいずれかの形態で存在してもよい。核酸分子は、DNA形態で存在するとき、一本鎖(即ちセンス鎖)又は二本鎖であってもよい。コード領域の境界は、5'(アミノ)末端での開始コドン及び3'(カルボキシ)末端での翻訳停止コドンにより決定される。遺伝子は、限定はされないが、原核生物又は真核生物mRNAからのcDNA、原核生物又は真核生物DNAからのゲノムDNA配列、及び合成DNA配列を含む。転写終結配列は通常、遺伝子配列の3'側に位置することになる。

20

【0046】

用語「調節エレメント」は、集合的に、プロモーター領域、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製起点、内部リボソーム進入部位(IRES)、エンハンサー、スプライスジャンクションなどを指し、それらは集合的に、レシピエント細胞内のコード配列の複製、転写、転写後プロセッシング、及び翻訳をもたらす。選択されたコード配列が適切な宿主細胞内で複製、転写、及び翻訳されうる限り、これらの調節エレメントのすべてが存在する必要はない。

30

【0047】

用語「プロモーター」は、その通常の意味で、DNA制御配列を含むヌクレオチド領域を指すように本明細書で用いられ、ここで該制御配列は、RNAポリメラーゼに結合し、コード配列下流(3'方向)の転写を開始する能力がある遺伝子に由来する。それは、核酸配列の特異的転写を開始させるため、調節タンパク質及び分子が結合してもよい遺伝要素、例えばRNAポリメラーゼ及び他の転写因子を含有してもよい。語句「作動可能に位置づけられた」、「作動可能に連結された」、「制御下で」及び「転写調節下で」は、プロモーターが、核酸配列の転写開始及び／又は発現を制御するため、核酸配列に関連した正確な機能的位置及び／又は配向で存在することを意味する。

40

【0048】

「エンハンサー」は、プロモーターに近接して位置づけられるとき、エンハンサードメインの不在下でのプロモーターから生じる転写活性と比べて増強された転写活性を付与する核酸配列を意味する。

【0049】

「作動可能に連結された」又は「同時発現された」は、核酸分子に関して、2以上の核酸分子(例えば、転写対象の核酸分子、プロモーター、及びエンハンサーエレメント)が核酸分子の転写を可能にするような方法で接続されることを意味する。「作動可能に連結

50

された」又は「同時発現された」は、ペプチド及び／又はポリペプチド分子に関して、2以上のペプチド及び／又はポリペプチド分子が、単一のポリペプチド鎖、即ち融合ポリペプチドであって、その融合体の各ペプチド及び／又はポリペプチド成分の少なくとも1つの特性を有するものをもたらすような方法で接続されることを意味する。融合ポリペプチドは、好ましくは、キメラ、即ち異種分子からなるものである。

【0050】

「相同性」は、2つのポリヌクレオチド間又は2つのポリペプチド間の同一性のパーセントを指す。ある配列ともう1つの配列との間の対応は、当該技術分野で公知の技術により決定されうる。例えば、相同性は、配列情報を整列し、容易に利用可能なコンピュータプログラムを用いることによる、2つのポリペプチド分子間の配列情報の直接比較により決定されうる。或いは、相同性は、相同性領域間での安定な二本鎖の形成、次いで一本鎖に特異的なヌクレアーゼでの消化と、消化された断片のサイズ決定を容易にする条件下での、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションにより決定されうる。2つのDNA、又は2つのポリペプチドの配列は、上記方法を用いた判定として、ヌクレオチド、又はアミノ酸の少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、また最も好ましくは少なくとも約95%が各々、規定された分子の長さにわたり一致するとき、互いに「実質的に相同である」。

【0051】

用語「細胞」は、本明細書では当該技術分野でその最も広い意味で用いられ、多細胞生物の組織の構成単位である生体を指し、細胞はそれを外部から隔てる膜構造に覆われ、自己複製能を有し、且つ遺伝子情報及びそれを発現するための機構を有する。本明細書で用いられる細胞は、天然に存在する細胞又は人工的に修飾された細胞（例えば、融合細胞、遺伝子組換え細胞など）であってもよい。

【0052】

用語「幹細胞」は、本明細書で、好適な条件下で多様な範囲の特殊化細胞型に分化する能力がある一方で、他の好適な条件下で自己再生し、本質的に未分化な多能性状態で残存する能力がある細胞を指す。用語「幹細胞」はまた、多能性細胞、複能性細胞、前駆細胞（precursor cell）及び前駆細胞（progenitor cell）を含む。例示的なヒト幹細胞は、骨髓組織から得られる造血又は間葉系幹細胞、胚組織から得られる胚性幹細胞、又は胎児の生殖組織から得られる胚性生殖細胞から得られてもよい。例示的な多能性幹細胞はまた、多能性に関連した特定の転写因子の発現により、それらを多能性状態にリプログラミングすることにより体細胞から生成可能であり；これらの細胞は、「人工多能性幹細胞」又は「iPSC又はiPS細胞」と称される。

【0053】

「胚性幹（ES）細胞」は、初期における胚、例えば胚盤胞期の内部細胞塊から得られる、又は人工的手段（例えば核移植）により生成される未分化多能性細胞であり、胚細胞（例えば精子及び卵）を含む、胚又は成体において任意の分化細胞型を生じさせうる。

【0054】

「人工多能性幹細胞（iPSC又はiPS細胞）」は、因子（本明細書でリプログラミング因子と称される）の組み合わせを発現する、又はその発現を誘導することによる体細胞のリプログラミングにより作製された細胞である。iPS細胞は、胎児、出生後、新生児、若年、又は成人体細胞を用いて作製されうる。特定の実施形態では、体細胞を多能性幹細胞にリプログラミングするために使用可能な因子として、例えば、Oct4（時としてOct3/4と称される）、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog、及びLin28が挙げられる。いくつかの実施形態では、体細胞は、体細胞を多能性幹細胞にリプログラミングするための、少なくとも2つのリプログラミング因子、少なくとも3つのリプログラミング因子、少なくとも4つのリプログラミング因子、少なくとも5つのリプログラミング因子、少なくとも6つのリプログラミング因子、又は少なくとも7つのリプログラミング因子を発現させることにより、リプログラミングされる。

【0055】

「造血前駆細胞 (progenitor cells)」又は「造血前駆細胞 (precursor cells)」は、造血系列に関与するが、さらなる造血分化の能力があり、造血幹細胞、多能性造血幹細胞、共通骨髄前駆細胞、巨核球前駆細胞、赤血球前駆細胞、及びリンパ球系前駆細胞を含む細胞を指す。造血幹細胞 (HSC) は、骨髄系列 (単球及びマクロファージ、顆粒球 (好中球、好塩基球、好酸球、及びマスト細胞)、赤血球、巨核球/血小板、樹状細胞)、及びリンパ球系列 (T細胞、B細胞、NK細胞) を含むあらゆる血球型を生じさせる多能性幹細胞である (例えば、Doulatov et al., 2012; Notta et al., 2015を参照)。「マルチリンフォイドプロジェニター (multilymphoid progenitor)」(MLP) は、あらゆるリンパ球系列 (B、T、及びNK細胞) を生じさせるが、その他の (骨髄) 能力を有していても有してしなくてもよく、且つCD45RA⁺/CD10⁺/CD7⁻である、任意の前駆細胞を説明するために定義される (Doulatov et al., 2010)。任意のB、T、及びNK前駆細胞は、MLPと称されうる。「共通骨髄前駆細胞」(CMP) は、顆粒球、単球、巨核球及び赤血球を生じうるCD45⁺/CD31⁺/CD43⁺/CD34⁻細胞の発現によって規定される共通の骨髄前駆細胞を指す。造血前駆細胞は、CD34を発現することがある。造血前駆細胞は、CD133を同時発現することがあり、CD38の発現について陰性であってもよい。造血前駆細胞は、CD34⁺/CD45⁺造血前駆細胞及びCD34⁺/CD45⁺/CD43⁺造血前駆細胞を含む。CD34⁺/CD43⁺/CD45⁺造血前駆細胞は、骨髄前駆細胞を高度に富化することがある。造血細胞はまた、未分化造血細胞の様々なサブセット: CD34⁻/CD133⁺/CD38⁻ (未分化造血前駆細胞)、CD43 (+) CD235a (+) CD41a (+/-) (赤血球-巨核球系細胞)、lin (-) CD34 (+) CD43 (+) CD45 (-) (多能性)、及びlin (-) CD34 (+) CD43 (+) CD45 (+) (骨髄偏向) 細胞、CD133⁺/ALDH⁺ (アルデヒドデヒドロゲナーゼ) を含む。これらの未分化造血細胞型又は造血前駆細胞はいずれも、本明細書に記載のようなiPS細胞に変換されることがあると予想される。いくつかの態様では、該細胞は、肥満細胞、ランゲルハンス細胞、破骨細胞、NK細胞、T細胞、CIKT細胞、又はT細胞、NK細胞、及びB細胞の他のサブタイプを含んでもよい。

【0056】

本明細書で用いられるとき、用語「免疫細胞」は、限定はされないが、T細胞、NK細胞、T/NK細胞、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、好中球、赤血球、単球、好塩基球、好中球、マスト細胞、好酸球、及びそれらの任意の組み合わせを含む、免疫系の細胞を指す。

【0057】

T細胞の「アクチベーター」又はT細胞を活性化することになる条件は、T細胞を活性化刺激を指し、抗原提示細胞上又は他の表面上に提示されることがある抗原; 特異性と無関係に多数のT細胞受容体 (TCR) 複合体に結合するポリクローナルアクチベーターを含み、且つコンカナバリンA (Con-A) やフィトヘマグルチニン (PHA) などのレクチン、及びTCR又はCD3タンパク質上の不変フレームワークエピトープに特異的に結合する抗体などの作用物質; 並びに相当数のT細胞を刺激するスーパー抗原を含み、且つ例えばブドウ球菌 (Staphylococcal) エンテロトキシンなどのエンテロトキシンを含む。

【0058】

用語「Tリンパ球」及び「T細胞」は、交換可能に用いられ、1つ以上のMHC分子又は1つ以上の非古典的MHC分子と共に抗原提示細胞の表面又はマトリックスに提示されたときに抗原を認識する能力があるTCRを発現する細胞を指す。

【0059】

用語「T細胞」は、当該技術分野で定義されるようなTリンパ球を指し、胸腺細胞、未熟Tリンパ球、成熟Tリンパ球、休止Tリンパ球、又は活性化Tリンパ球を含むことが意図される。T細胞は、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD4⁺CD8⁺T細胞、又はCD

4⁺CD8⁺細胞でありうる。T細胞はまた、Tヘルパー細胞、例えば、Tヘルパー1（TH1）細胞、又はTヘルパー2（TH2）細胞、又はTH17細胞、並びに細胞傷害性T細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、又はγδT細胞でありうる（Wilson et al., 2009; Wynn, 2005, Ladi et al., 2006）。少なくとも1つのマーカー、例えばCD4だけ互いに異なるT細胞は、本明細書中でT細胞の「サブセット」と称される。

【0060】

「CD4⁺T細胞」とは、表面上にCD4を発現して細胞媒介性免疫応答に関与するT細胞のサブセットを指す。それらは刺激後の分泌特性によって特徴づけられ、IFNγ、TNFα、IL-2、IL-4及びIL-10などのサイトカインの分泌を含んでもよい。

10

「CD4」は、Tリンパ球上の分化抗原として最初に定義されたものだけでなく、単球／マクロファージを含む他の細胞上に見出される55kD糖タンパク質である。CD4抗原は、免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーであり、会合認識エレメントとしてMHC（主要組織適合複合体）クラスII制限免疫応答に関与する。Tリンパ球については、ヘルパー／インデューサーサブセットが定義される。

【0061】

「CD8⁺T細胞」は、表面上にCD8を発現し、MHCクラスI制限であり、且つ細胞傷害性T細胞として機能するT細胞のサブセットを指す。「CD8」分子は、胸腺細胞上並びに細胞傷害性Tリンパ球上及びサブレッサーTリンパ球上に見出される分化抗原である。CD8抗原は、免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーであり、主要組織適合複合体クラスI制限相互作用における会合認識エレメントである。

20

【0062】

「多能性幹細胞」は、1つ以上の組織若しくは臓器、又は好ましくは3つの胚葉：内胚葉（胃内壁、胃腸管、肺）、中胚葉（筋肉、骨、血液、泌尿生殖器）、若しくは外胚葉（表皮組織及び神経系）のいずれかを構成するすべての細胞に分化する潜在能力を有する幹細胞を指す。

【0063】

本明細書で用いられるとき、用語「体細胞」は、卵子や精子などの生殖細胞以外の任意の細胞であり、そのDNAを次世代に直接的に伝達しないものを指す。典型的には、体細胞は、限られた多能性を有するか又は多能性を全く有しない。本明細書で用いられる体細胞は、天然に存在するか又は遺伝子改変されることがある。

30

【0064】

「プログラミング」は、細胞により生成可能な後代の型を改変するプロセスである。例えば、プログラミングを用いずに同じ条件下で形成できている型と比べて、少なくとも1つの新しい細胞型の後代を培養下又はインビボのいずれかで形成可能になるように改変されているとき、細胞はプログラムされている。このことは、かかる後代をプログラミング前に本質的に全く形成できない場合、十分な増殖後、新しい細胞型の表現型特性を有する後代が測定可能な割合で観測されることを意味し、代替的には、新しい細胞型の特性を有する割合は、プログラミング前よりも多く測定されうる。このプロセスは、分化、脱分化、及び分化転換を含む。

40

【0065】

「分化」は、大して特殊化されていない細胞がより特殊化された細胞型になるプロセスである。「脱分化」とは、部分的又は最終的に分化された細胞がより初期の発生段階、例えば多能性又は複能性の段階に戻る細胞プロセスである。「分化転換」は、ある分化された細胞型を他の分化された細胞型に変換するプロセスである。典型的には、プログラミングによる分化転換は、細胞が中間的多能性段階を経由することなく行われる。即ち、細胞は、ある分化された細胞型から他の分化された細胞型に直接的にプログラムされる。特定の条件下では、新しい細胞型の特性を有する後代の割合は、優先度が高い順に少なくとも約1%、5%、25%、又はそれ以上であってもよい。

【0066】

50

「リプログラミング」は、リプログラミングを用いずに同じ条件下で有すると思われるよりも少なくとも1つの新しい細胞型の後代を形成する測定可能に向上した能力を培養下又はインビボのいずれかで細胞に付与するプロセスである。より具体的には、リプログラミングは、多能性の潜在能力を体細胞に付与するプロセスである。このことは、かかる後代をリプログラミング前に本質的に全く生成できない場合、十分な増殖後、新しい細胞型の表現型特性を有する後代が測定可能な割合になることを意味し、さもなければ、新しい細胞型の特性を有する割合は、リプログラミング前よりも多く測定されうる。特定の条件下では、新しい細胞型の特性を有する後代の割合は、優先度が高い順に少なくとも約1%、5%、25%、又はそれ以上であってもよい。

【0067】

用語「フォワードプログラミング」は、1つ以上の特定の系列決定遺伝子又は遺伝子産物を複能性細胞又は多能性細胞に提供することにより多能性を全く有していない分化された体細胞とは対照的な複能性細胞又は多能性細胞をプログラムすることを指す。例えば、フォワードプログラミングは、造血前駆細胞若しくは他の前駆細胞、又は造血細胞若しくは他の分化された体細胞になるように、ESC又はiPSCをプログラムするプロセスを示してもよい。

【0068】

本明細書で用いられるとき、用語「対象」又は「それを必要とする対象」は、哺乳動物、好ましくは、細胞又は組織の移植を必要とする任意の年齢の男性又は女性のヒトを指す。典型的には、対象（本明細書ではレシピエントとも称される）は、細胞又は組織の移植による治療に適合しうる障害又は病理学的若しくは望ましくない病態、状態、若しくは症候群又は物理的、形態学的、若しくは生理学的な異常が原因で細胞又は組織の移植を必要とする。

【0069】

本明細書で用いられるとき、遺伝子の「破壊」は、破壊の不在下における遺伝子産物の発現レベルと比べて、細胞において対象の遺伝子によりコードされる1つ以上の遺伝子産物の発現が排除又は低減されることを意味する。例示的な遺伝子産物として、遺伝子によってコードされるmRNA及びタンパク質産物が挙げられる。破壊は、いくつかの場合には一過性また可逆的であり、他の場合には永久的である。破壊は、いくつかの場合には、機能性又は全長のタンパク質又はmRNAの破壊であり、切断型又は非機能性産物が生成されることがあるという事実は関係しない。本明細書のいくつかの実施形態では、遺伝子の活性又は機能は、発現とは対照的に破壊される。遺伝子破壊は、人工的方法により、即ち、化合物、分子、複合体、若しくは組成物の添加若しくは導入により、且つ／又は例えばDNAレベルで遺伝子の核酸の破壊若しくは遺伝子との会合により、一般に誘導される。遺伝子破壊の例示的方法として、遺伝子サイレンシング、ノックダウン、ノックアウト、及び／又は遺伝子破壊技術、例えば遺伝子編集が挙げられる。例として、アンチセンス技術、例えば、一般に発現の一過的低減をもたらすRNAi、siRNA、shRNA、及び／又はリボザイム、並びに標的遺伝子の不活性化又は破壊をもたらす遺伝子編集技術、例えば、破壊及び／又は相同組換えの誘導によるものが挙げられる。例として、挿入、突然変異、及び欠失が挙げられる。破壊は、典型的には、遺伝子によりコードされる正常産物又は「野生型」産物の発現の抑制及び／又は完全欠如をもたらす。かかる遺伝子破壊の例として、全遺伝子の欠失を含めて、遺伝子又は遺伝子の一部の挿入、フレームシフト突然変異及びミスセンス突然変異、欠失、ノックイン、並びにノックアウトが挙げられる。かかる破壊は、コード領域、例えば1つ以上のエクソンで行うことが可能であり、結果として、停止コドンの挿入などにより全長産物、機能性産物、又はいずれかの産物を生成できなくなる。かかる破壊はまた、遺伝子の転写を阻止するように、プロモーター又はエンハンサー又は転写の活性化に影響を及ぼす他の領域における破壊により行ってもよい。遺伝子破壊は、相同組換えによる標的遺伝子の不活性化を含む、遺伝子ターゲティングを含む。

【0070】

「ノッチリガンド」は、造血幹細胞などのいくつかの異なる哺乳動物細胞の膜に存在するノッチ受容体ポリペプチドに結合可能なタンパク質である。ヒト細胞において同定されているノッチ受容体として、Notch-1、Notch-2、Notch-3、及びNotch-4が挙げられる。ノッチリガンドは、典型的には、アミノ末端に20～22のアミノ酸を含むDSLドメイン（D-Delta、S-Serrate、及びL-Lag2）及び細胞外表面上に3～8の間のEGF様リピートを有する（Furie and Furie, 1988、Knust et al., 1987、Suzuki et al., 1987）。

【0071】

「スーパードナー」は、特定のMHCクラスI及びII遺伝子がホモ接合性である個体として本明細書で言及される。これらのホモ接合性個体は、スーパードナーとして機能しうるとともに、その細胞は、その細胞を含む組織及び他の物質を含めて、ハプロタイプがホモ接合性又はヘテロ接合性のいずれの個体に移植可能である。スーパードナーは、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DP又はHLA-DQ遺伝子座／遺伝子座対立遺伝子が各々、ホモ接合性でありうる。

【0072】

用語「キメラ抗原受容体（CAR）」は、本明細書で用いられるとき、例えば、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、又はキメラ免疫受容体を指し、特定の免疫エフェクター細胞に人工的な特異性を移植する改変された受容体を包含してもよい。CARは、例えば養子細胞療法における使用を意図して、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に付与し、それにより多数の特異的T細胞の作製を可能にするように用いられてもよい。具体的な実施形態では、CARは、例えば細胞の腫瘍関連抗原に対する特異性を誘導する。いくつかの実施形態では、CARは、細胞内活性化ドメイン、膜貫通ドメイン、及び腫瘍関連抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含む。特定の態様では、CARは、CD3ζ膜貫通ドメイン及びエンドドメインに融合された、モノクローナル抗体由来の一本鎖可変断片（scFv）の融合体を含む。他のCAR設計の特異性は、受容体のリガンド（例えばペプチド）又はパターン認識受容体、例えばデクチンに由来してもよい。特定の場、抗原認識ドメインのスペーシングは、活性化誘導細胞死を低減するように修飾されうる。特定の場、CARは、追加的な同時刺激シグナル伝達のためのドメイン、例えば、CD3ζ、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10、及び／又はOX40を含む。場合によっては、同時刺激分子、イメージング用（例えば陽電子放射断層撮影用）レポーター遺伝子、プロドラッグ、ホーミング受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカイン、及びサイトカイン受容体の添加時、T細胞を条件的に除去する遺伝子産物を含む分子が、CARと同時発現されうる。

【0073】

用語「抗原提示細胞（APC）」は、1つ以上の抗原を、免疫系の特異的なエフェクター細胞によって認識可能なペプチド-MHC複合体の形態で提示し、それによりその抗原又は提示されている抗原に対して有効な細胞性免疫応答を誘導することが可能な細胞のクラスを指す。APCは、インタクトな全細胞、例えば、マクロファージ、B細胞、内皮細胞、活性化T細胞、及び樹状細胞；又は天然に存在するか若しくは合成の、β2ミクログロブリンと複合化された精製されたMHCクラスI分子などの他の分子でありうる。多くの細胞型がT細胞認識のため、その細胞表面上に抗原を提示する能力があってもよい一方で、樹状細胞のみは、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答においてナイーブT細胞を活性化するのに効率的な量で抗原を提示する能力を有する。

【0074】

II. 多能性幹細胞

特定の実施形態では、多能性幹細胞は、抗原受容体、例えばCARを発現するように改変される。多能性幹細胞は、限定はされないが、人工多能性幹細胞及び胚性幹細胞を含む幹細胞であってもよい。特定の態様では、本明細書で用いられる多能性幹細胞は、本開示の造血前駆細胞を含む、インビトロで長期増殖の能力がある一方で、身体のあらゆる細胞

10

20

30

40

50

型に分化する潜在能力を保持する、ヒト胚性幹細胞（ESC）又は人工多能性幹細胞（iPSC）である。

【0075】

A. 胚性幹細胞

特定の態様では、ESCとしての多能性幹細胞。ES細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来し、高いインビトロ分化能を有する。ES細胞は、発生中の胚の外部栄養外胚葉層を除去し、次いで非増殖細胞の支持細胞層上で内部細胞塊を培養することにより単離されうる。再播種された細胞は、増殖し続け、除去、解離、さらなる再播種、及び増殖放置が可能であるES細胞の新しいコロニーを生成することができる。未分化ES細胞を「継代培養する」このプロセスは、数回反復することで、未分化ES細胞を含有する細胞株を生成可能である（米国特許第5,843,780号明細書；米国特許第6,200,806号明細書；米国特許第7,029,913号明細書）。ES細胞は、増殖する一方でその多能性を維持するような潜在能力を有する。例えば、ES細胞は、細胞に関する、また細胞分化を制御する遺伝子に関する研究において有用である。遺伝子操作及び選択と組み合わせでのES細胞の多能性は、トランスジェニック、キメラ、及びノックアウトマウスの作製を通じたインビボでの遺伝子分析試験において用いることができる。

【0076】

マウスES細胞を作製するための方法は周知である。一方法では、マウス129株からの着床前胚盤胞がマウス抗血清で処理され、栄養外胚葉が除去され、内部細胞塊が、ウシ胎仔血清を含有する培地中の化学的に不活化されたマウス胚性線維芽細胞の支持細胞層上で培養される。発生する未分化ES細胞のコロニーは、ウシ胎仔血清の存在下、マウス胚性線維芽細胞支持細胞層上で継代され、ES細胞の集団が作製される。いくつかの方法では、マウスES細胞は、サイトカイン白血病阻害因子（LIF）を血清含有培地に添加することにより、支持細胞層の不在下で増殖されうる。他の方法では、マウスES細胞は、骨形成タンパク質及びLIFの存在下で、無血清培地中で増殖されうる。

【0077】

ヒトES細胞は、前述の方法（Thomson and Marshall, 1998年；Reubinoff et al., 2000）により胚細胞を生成するため、精子及び卵細胞の融合、核移植、単為生殖、又はクロマチンのリプログラミングとそれに続くリプログラミングされたクロマチンの原形質膜内への取り込みによって生成される接合体又は胚盤胞段階の哺乳動物胚から作製又は誘導されうる。一方法では、ヒト胚盤胞が抗ヒト血清に曝露され、栄養外胚葉細胞が溶解され、マウス胚性線維芽細胞の支持細胞層上で培養されている内部細胞塊から除去される。さらに、内部細胞塊に由来する細胞の凝集塊が、化学的又は機械的に解離され、再播種され、未分化形態を有するコロニーが、マイクロピペットにより選択され、解離され、再播種される。いくつかの方法では、ヒトES細胞は、塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下、線維芽細胞の支持細胞層上でES細胞を培養することにより、血清を伴わずに増殖可能である。他の方法では、ヒトES細胞は、塩基性線維芽細胞増殖因子を含有する「条件づけ」培地の存在下、MATRIGEL（商標）又はラミニンなどのタンパク質マトリックス上で該細胞を培養することにより、支持細胞層を伴わずに増殖可能である（Xu et al., 2001）。

【0078】

ES細胞はまた、前述の方法により、アカゲザル及びマーモセットを含む他の生物から（Thomson and Marshall, 1998；Thomson et al., 1995年；Thomson and Odorico, 2000；米国特許第5,843,780号明細書）、さらには樹立されたマウス及びヒト細胞株から誘導されてもよい。例えば、樹立されたヒトES細胞株は、MAOI、MA09、ACT-4、HI、H7、H9、H13、H14及びACT30を含む。さらなる例として、樹立されているマウスES細胞株は、マウス株129胚の内部細胞塊から樹立されたCGR8細胞株を含み、CGR8細胞の培養物は、支持細胞層を伴わずにLIFの存在下で増殖可能である。

【0079】

E S 幹細胞は、転写因子 Oct 4、アルカリホスファターゼ (AP)、段階特異的な胚性抗原 SSEA-1、段階特異的な胚性抗原 SSEA-3、段階特異的な胚性抗原 SSEA-4、転写因子 NANOG、腫瘍拒絶抗原 1-60 (TRA-1-60)、腫瘍拒絶抗原 1-81 (TRA-1-81)、SOX 2、又は REX 1 を含むタンパク質マーカーによって検出可能である。

【0080】

B. 人工多能性幹細胞

他の態様では、本明細書で用いられる多能性幹細胞は、一般に iPS 細胞又は iPSC と略記される、人工多能性幹 (iPS) 細胞である。多能性の誘導は当初、2006 年にマウス細胞を用いて (Yamanaka et al., 2006)、また 2007 年にヒト細胞を用いて (Yuet al., 2007; Takahashi et al., 2007)、多能性に関連した転写因子の導入を介した体細胞のリプログラミングにより達成された。iPSC の使用により、ES 細胞の大規模臨床使用に関連した倫理的且つ実用的問題の大部分が回避され、また iPSC 由来の自家移植片を有する患者は、移植片拒絶を阻止するための生涯にわたる免疫抑制治療を必要としなくてもよい。

【0081】

胚細胞を例外として、iPSC における開始点として任意の細胞を用いることができる。例えば、細胞型であれば、ケラチノサイト、線維芽細胞、造血細胞、間葉細胞、肝細胞、又は胃細胞を挙げることができる。T 細胞もまた、リプログラミング用の体細胞の供給源として用いてもよい (米国特許第 8, 741, 648 号明細書)。細胞分化の度合い又は細胞が収集される動物の年齢について制限はなく；本明細書に開示される方法では、未分化前駆細胞 (体性幹細胞を含む) 及び最終分化成熟細胞であっても、体細胞の供給源として用いることができる。

【0082】

体細胞は、当業者に公知の方法を用いて、iPSC を生成するようにリプログラミング可能である。当業者は、人工多能性幹細胞を容易に作製することができ、例えば、公開された米国特許出願公開第 20090246875 号明細書、公開された米国特許出願公開第 2010/0210014 号明細書；公開された米国特許出願公開第 20120276636 号明細書；米国特許第 8, 058, 065 号明細書；米国特許第 8, 129, 187 号明細書；米国特許第 8, 268, 620 号明細書；PCT 公開の国際公開第 2007/069666 A1 号パンフレット、及び米国特許第 8, 268, 620 号明細書 (参照により本明細書中に援用される) を参照のこと。一般に、核リプログラミング因子は、体細胞から多能性幹細胞を生成するため、用いられる。いくつかの実施形態では、Klf 4、c-Myc、Oct 3/4、Sox 2、Nanog、及び Lin 28 の少なくとも 3 つ、又は少なくとも 4 つが利用される。他の実施形態では、Oct 3/4、Sox 2、c-Myc 及び Klf 4 が利用される。

【0083】

これらの核リプログラミング物質のマウス及びヒト cDNA 配列は、国際公開第 2007/069666 号パンフレット及び米国特許第 8, 183, 038 号明細書 (参照により本明細書中に援用される) に記載の NCBI 受入番号に関連して利用可能である。1 つ以上のリプログラミング物質、又はこれらのリプログラミング物質をコードする核酸を導入するための方法は、当該技術分野で公知であり、例えば、米国特許第 8, 268, 620 号明細書、米国特許第 8, 691, 574 号明細書、米国特許第 8, 741, 648 号明細書、米国特許第 8, 546, 140 号明細書や、公開された米国特許第 8, 900, 871 号明細書及び米国特許第 8, 071, 369 号明細書 (いずれも参照により本明細書中に援用される) に開示されている。

【0084】

iPSC は、一旦得られると、多能性を維持するのに十分な培地中で培養されうる。iPSC は、米国特許第 7, 442, 548 号明細書及び米国特許出願公開第 2003/0211603 号明細書に記載の通り、多能性幹細胞、より詳細には胚性幹細胞を培養する

ために開発された様々な培地及び技術とともに用いられてもよい。マウス細胞の場合、培養は、分化抑制因子としての白血病阻害因子（L I F）の通常の培地への添加とともに実施される。ヒト細胞の場合、塩基性線維芽細胞増殖因子（b F G F）がL I Fの代わりに添加されることが望ましい。当業者に公知と思われる、i P S Cを培養及び維持するための他の方法が、本方法とともに用いられてもよい。

【0085】

特定の実施形態では、未決定の条件が用いられてもよく；例えば、多能性細胞は、幹細胞を未分化状態で維持するため、線維芽細胞支持細胞上又は線維芽細胞支持細胞に曝露されている培地上で培養されてもよい。いくつかの実施形態では、該細胞は、支持細胞としての、細胞分裂を完了させるために放射線又は抗生物質で処理されたマウス胚性線維芽細胞の共存下で培養される。或いは、多能性細胞は、規定されたフィーダー非依存性培養系、例えばT E S R（商標）培地（L u d w i g e t a l . , 2 0 0 6 a ; L u d w i g e t a l . , 2 0 0 6 b）又はE 8（商標）／E s s e n t i a l 8（商標）培地（C h e n e t a l . , 2 0 1 1）を用いて、本質的に未分化な状態で培養及び維持されてもよい。

【0086】

プラスミドは、例えば、調節された高コピー数を達成することや細菌におけるプラスミドの不安定性の潜在的要因を回避すること、またヒト細胞を含む哺乳動物細胞における使用に適合するプラスミド選択のための手段を提供すること、といったいくつかの目標を考慮して設計されている。ヒト細胞における使用に対するプラスミドの二重の要件については、特別な関心が払われている。第1に、プラスミドは大量のDNAが生成及び精製可能であるように、大腸菌（E . C o l i）における維持及び発酵に適する。第2に、プラスミドは、ヒト患者及び動物における使用において安全且つ好適である。第1の要件では、細菌発酵中、比較的容易に選択され、安定に維持されうる、高コピー数のプラスミドが求められる。第2の要件では、選択可能マーカーや他のコード配列などの要素を重視することが求められる。いくつかの実施形態では、マーカーをコードするプラスミドは、（1）高コピー数の複製起点、（2）選択可能マーカー、例えば限定はされないが、カナマイシン抗生物質選択用のn e o遺伝子、（3）チロシナーゼエンハンサーを含む転写終結配列、及び（4）様々な核酸カセットの組み込みのためのマルチクロニング部位；及び（5）チロシナーゼプロモーターに作動可能に連結されたマーカーをコードする核酸配列、から構成される。タンパク質をコードする核酸を誘導するための、当該技術分野で公知のプラスミドベクターが極めて多く存在する。これらは、限定はされないが、米国特許第6, 103, 470号明細書；米国特許第7, 598, 364号明細書；米国特許第7, 989, 425号明細書；及び米国特許第6, 416, 998号明細書（参照により本明細書中に援用される）に開示されたベクターを含む。

【0087】

エピソーム遺伝子送達系は、プラスミド、エプスタイン・バーウイルス（E B V）に基づくエピソームベクター（米国特許第8, 546, 140号明細書）、酵母に基づくベクター、アデノウイルスに基づくベクター、サルウイルス40（S V 40）に基づくエピソームベクター、ウシパピローマウイルス（B P V）に基づくベクター、又はレンチウイルスベクターでありうる。ウイルス遺伝子送達系は、RNAに基づくウイルスベクター又はDNAに基づくウイルスベクターでありうる。

【0088】

1. i P S Cを生成するための細胞

本開示の特定の実施形態は、i P S Cにリプログラミングされる体細胞（例えば、血球又は皮膚細胞）の開始集団に関する。血球の集団は、末梢血単核球（P B M C）、混合集団を含有する全血又はその画分、脾臓細胞、骨髓細胞、腫瘍浸潤リンパ球、白血球除去によって得られた細胞、生検組織、及びリンパ節、例えば腫瘍からのリンパ節流入を含みうる。好適なドナーは、免疫ドナー、非免疫（ナイーブ）ドナー、処置又は未処置ドナーを含む。「処置」ドナーは、1つ以上の生物学的修飾因子に曝露されているものである。「

未処置」ドナーは、1つ以上の生物学的修飾因子に曝露されていない。

【0089】

いくつかの態様では、血球の集団はT細胞を含む。T細胞は、T細胞の精製された集団でありうる、又は代替的には、T細胞は、異なるタイプの細胞、例えばB細胞及び／又は他の末梢血液細胞を有する集団内に存在しうる。T細胞は、T細胞のサブセット、例えばCD4⁺T細胞の精製された集団でありうる、又はそれらは、T細胞の異なるサブセットを含むT細胞の集団でありうる。別の実施形態では、T細胞は、長期間にわたり培養下で維持されているT細胞クローンである。T細胞クローンは、様々な程度、形質転換されうる。具体的な実施形態では、T細胞は、培養下で無制限に増殖するT細胞クローンである。

【0090】

いくつかの態様では、T細胞は、初代T細胞である。用語「初代T細胞」は、長期間にわたり培養下で維持されているT細胞に対して、個体から得られるT細胞を含むことが意図される。したがって、初代T細胞は、特に、対象から得られる末梢血T細胞である。初代T細胞の集団は、多くはT細胞の1つのサブセットから構成されうる。或いは、初代T細胞の集団は、T細胞の異なるサブセットから構成されうる。

【0091】

T細胞は、健常者からの、又は代替的にはある病態に罹患した個体からの、以前に貯蔵された血液サンプルでありうる。該病態は、感染性疾患、例えば、ウイルス感染、細菌感染若しくは任意の他の微生物による感染に起因する病態、又は高増殖性疾患、例えばメラノーマのようながんでありうる。具体的な実施形態では、T細胞は、ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus)(HIV)に感染した個体から得られる。さらに別の実施形態では、T細胞は、自己免疫性疾患若しくはT細胞病理を患うか又はそれに罹りやすい対象から得られる。T細胞は、ヒト起源、マウス起源又は任意の他の哺乳動物種でありうる。

【0092】

T細胞を含む細胞の集団を得る方法は、当該技術分野で周知である。例えば、末梢血単核球(PBMC)は、当該技術分野で公知の方法に記載のように入手可能である。かかる方法の例が、実施例に示され、Kimら(1992); Biswasら(1990); Biswasら(1991)によって考察されている。

【0093】

いくつかの態様では、血球の開始集団は、造血幹細胞(HSC)を含む。HSCは通常、骨髓中に存在するが、血液中に押し出される可能性があり、それは末梢血中の多数のHSCを収集するため、臨床的に用いられる動員というプロセスである。選択される1つの動員物質が、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)である。末梢血中を循環するCD34⁺造血幹細胞又は前駆細胞は、アフエレーシス技術により、非擾乱状態下、又はG-CSFのような造血増殖因子の外部投与後の動員後のいずれかに収集されうる。動員後に収集された幹細胞又は前駆細胞の数は、非擾乱状態下でアフエレーシス後に得られる数よりも多い。いくつかの態様では、細胞集団の供給源は、造血幹細胞又は前駆細胞を濃縮する必要がないことから、外来的に適用される因子により動員されていない細胞を有する対象である。

【0094】

細胞の集団から造血前駆細胞を得る方法もまた、当該技術分野で周知である。造血前駆細胞は、様々なサイトカイン、例えば、hSCF、hFLT3、及び／若しくはIL-3(Akkina et al., 1996)を用いて拡大されてもよい、又はCD34⁺細胞は、MACS又はFACSを用いて濃縮されてもよい。上記の通り、CD34⁺細胞を濃縮するため、ネガティブ選択技術もまた、用いてもよい。

【0095】

本明細書に記載の方法における使用を意図した細胞の集団は、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞、非ヒト霊長類細胞、齧歯類細胞(例えば、マウス又はラット)、ウシ細胞、ヒツジ細胞、ブタ細胞、ウマ細胞、ヒツジ細胞、イヌ細胞、及びネコ細胞又はそれらの混合

10

20

30

40

50

物であってもよい。非ヒト霊長類細胞は、アカゲザル細胞を含む。該細胞は、動物、例えばヒト患者から得てもよい、又は細胞株から得てもよい。該細胞が動物から得られる場合、それらは、例えば非分離細胞（即ち混合集団）のようなものとして用いられてもよい；それらは、まず例えば形質転換により培養下で樹立されていてもよい；又はそれらは、予備的な精製方法が施されていてもよい。例えば、細胞集団は、細胞表面マーカーの発現に基づくポジティブ若しくはネガティブ選択により操作されてもよい；インビトロ若しくはインビボで1つ以上の抗原で刺激されてもよい；インビトロ若しくはインビボで1つ以上の生物学的修飾因子で処置されてもよい；又はこれらのいずれか若しくはすべての組み合わせであってもよい。例示的实施形態では、細胞集団に、非T細胞及び／又は特定のT細胞サブセットの枯渇についてのネガティブ選択が施される。ネガティブ選択は、CD19、及びCD20などのB細胞マーカー；単球マーカーCD14；NK細胞マーカーCD56を含む、種々の分子の細胞表面発現に基づいて実施されうる。代替的には、細胞集団に、非CD34⁺造血細胞及び／又は特定の造血細胞サブセットの枯渇についてのネガティブ選択が施されてもよい。ネガティブ選択は、（例えば巨核球系統の細胞に対する）種々の分子、例えば、抗体のカクテル（例えば、CD2、CD3、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123、CD235a、及びCD41）の細胞表面発現に基づいて実施可能であり、例えばMACS又はカラム分離による他の細胞型の分離用に用いられてもよい

10

【0096】

細胞サンプルを対象から得て、次に所望される細胞型のため、それを濃縮することも可能である。例えば、PBMC及び／又はCD34⁺造血細胞は、本明細書に記載のように血液から単離可能である。PBMCからT細胞を濃縮するため、カウンターフロー遠心分離（水簸）が使用可能である。細胞はまた、種々の技術、例えば所望される細胞型の細胞表面上のエピトープに結合する抗体による単離及び／又は活性化、例えば、該細胞を活性化し、次いで同じビーズによるカラム分離を可能にする抗体コンジュゲートビーズを用いるいくつかのT細胞単離キットを用いて、他の細胞から単離されうる。使用可能な別の方法は、特定の細胞型を、受容体会合により該細胞を活性化することなく選択的に濃縮するため、細胞表面マーカーに対する抗体を用いるネガティブ選択を含む。

20

【0097】

骨髄細胞は、腸骨稜、大腿骨、脛骨、脊椎、肋骨又は他の髄空間から得てもよい。骨髄は、患者から採取され、様々な分離及び洗浄手順を通じて単離されてもよい。骨髄細胞を単離するための公知の手順は、以下のステップ：a) 3つの画分中の骨髄懸濁液の遠心分離及び中間画分、又はバフィーコートの回収；b) ステップ(a)からのバフィーコート画分が、分離流体、一般にはFicoll (Pharmacia Fine Chemicals ABの商標) でもう1回遠心分離され、また骨髄細胞を含有する中間画分が収集される；並びにc) 再注入可能な(re-transfusable) 骨髄細胞の回収のための、ステップ(b)からの収集された画分の洗浄、を含む。

30

【0098】

T細胞中に濃縮された細胞の集団の使用が所望される場合、細胞のかかる集団は、白血球除去及び連続流細胞分離装置を用いる機械的アフレーションにより、細胞の混合集団から入手可能である。例えば、T細胞は、Ficoll-Hypaque（商標）勾配上の分離、Percoll勾配上の分離、又は水簸を含む任意の公知の方法により、バフィーコートから単離されうる。

40

【0099】

特定の態様では、T細胞は、T細胞活性化におけるシグナルカスケードを誘導するためにT細胞受容体に結合する作用剤によって活性化される。例えば、CD3抗体が用いられてもよい。リプログラミングを意図してT細胞を有意な数の増殖状態に拡大するため、サイトカイン、例えばIL-2もまた用いてもよい。特定の態様では、抗CD3及び抗CD28の双方が、同時刺激が関与する場合のT細胞活性化として用いられてもよい。代替的態様では、例えばプレートに結合された抗CD3などの抗CD3の架橋が適用されてもよ

50

い。可溶性抗CD3がPBMC中のT細胞を活性化するために用いられる場合、可溶性抗CD3抗体がPBMC中のAPCに結合することがあり、次に該抗体をT細胞に提示する。可溶性抗CD3抗体単独が精製されたT細胞の集団内で用いられる場合、上述した理由のため、アネルギーが生じることになる。特定の実施形態は、T細胞を抗CD3（OKT3）及びIL2の存在下で培養することを含み、それは高価で扱いにくいビーズ又はプレートに結合した抗体を用いる必要がないことから有利且つ便利であり；OKT3及びIL2の添加後であれば、PBMCの細胞環境はT細胞の活性化に役立つことになる。次に、T細胞は、優先的拡大に起因し、PBMC培養下で他の細胞型を混雑させる。

【0100】

特定の態様では、血球の開始集団は、例えばリンパ芽球様細胞株（LCL）からのリンパ芽球様細胞を含む。LCLの作製は、当該技術分野で公知であり、例えばB細胞のエプスタイン・バーウイルス（Epstein-Barr virus）（EBV）による感染を介する（Frisan et al., 2001）。

【0101】

2. 体細胞のリプログラミング

いくつかの実施形態では、細胞（例えばT細胞）の開始集団が、例えば米国特許出願公開第2014/0315304号明細書（その全体が参照により本明細書中に援用される）に記載の方法により、iPSCにリプログラミングされる。本開示の特定の態様では、リプログラミング因子が、1つ以上のベクター、例えば組み込みベクター又はエピソームベクターに含まれる発現カセットから発現される。さらなる態様では、リプログラミングタンパク質は、タンパク質形質導入によれば、体細胞に直接的に導入可能である。

【0102】

当業者は、標準の組換え技術を通じてベクターを構築することを十分に理解するであろう（例えば、Sambrook et al., 2001年及びAusubel et al., 1996年を参照、いずれも参照により本明細書中に援用される）。ベクターとして、限定はされないが、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルス、及び植物ウイルス）、及び人工染色体（例えばYACs）、例えばレトロウイルスベクター（例えば、モロニー Maus 白血病ウイルスベクター（MoMLV）、MSCV、SFFV、MPSV、SNVなどに由来）、レンチウイルスベクター（例えば、HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIVなどに由来）、アデノウイルス（Ad）ベクター（その複製可能型、複製欠損型及び無活力（gutless）型を含む）、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、サルウイルス40（SV-40）ベクター、ウシパピローマウイルスベクター、エプスタイン・バーウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ハーベイマウス肉腫ウイルスベクター、マウス乳腺腫瘍ウイルスベクター、ラウス肉腫ウイルスベクターが挙げられる。

【0103】

a. ウイルスベクター

本開示の特定の態様では、ウイルスベクターが提供されてもよい。組換えウイルスベクターの作製においては、非必須遺伝子が、典型的には異種（又は非天然）タンパク質における遺伝子又はコード配列で置換される。ウイルスベクターは、核酸、おそらくはタンパク質を細胞に導入するためにウイルス配列を利用する発現構築物の一種である。特定のウイルスが、細胞に感染する、又は受容体媒介エンドサイトーシスを介して細胞に侵入する、そして宿主細胞ゲノムに組み込まれ、ウイルス遺伝子を安定且つ効率的に発現させる能力は、それらを外来核酸の細胞（例えば哺乳動物細胞）への導入における魅力的な候補にしている。本開示の特定の態様の核酸を送達するために用いられてもよいウイルスベクターの非限定例は、下記の通りである。

【0104】

レトロウイルスは、その遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、大量の外来遺伝子材料を導入し、広範囲の種及び細胞型に感染し、且つ特定の細胞株中にパッケージングされるその能力故に、遺伝子送達ベクターとして見込みがある（Miller, 1992）。

10

20

30

40

50

【0105】

レトロウイルスベクターを構築するため、核酸が特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入され、複製欠損のウイルスが生成される。ビリオンを作製するため、gag、pol、及びenv遺伝子を有する（が、LTR及びパッケージング成分を有しない）パッケージング細胞株が構築される（Mann et al., 1983）。cDNAを有する組換えプラスミドが、レトロウイルスLTR及びパッケージング配列と一緒に、（例えばリン酸カルシウム沈殿により）特定の細胞株に導入されるとき、パッケージング配列は、組換えプラスミドのRNA転写物のウイルス粒子へのパッケージングを可能にし、次に培地中に分泌される（Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983）。次に、組換えレトロウイルスを含有する培地は収集され、任意選択的には濃縮され、遺伝子導入用に用いられる。レトロウイルスベクターは、多種多様な細胞型に感染することができる。しかし、組込み及び安定な発現には、宿主細胞の分裂が要求される（Paskind et al., 1975）。

10

【0106】

レンチウイルスは、共通のレトロウイルス遺伝子gag、pol、及びenvに加えて、制御性又は構造的機能を伴う他の遺伝子を有する複合レトロウイルスである。レンチウイルスベクターは、当該技術分野で周知である（例えば、Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; 米国特許第6,013,516号明細書及び米国特許第5,994,136号明細書を参照）。

20

【0107】

組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染する能力があり、生体内及び生体外遺伝子導入と核酸配列の発現の双方に使用可能である。例えば、非分裂細胞に感染する能力がある組換えレンチウイルス（ここで好適な宿主細胞には、パッケージング機能を保有する2つ以上のベクター、即ち、gag、pol及びenv、並びにrev及びtatがトランスフェクトされる）は、米国特許第5,994,136号明細書（参照により本明細書中に援用される）に記載されている。

【0108】

b. エピソームベクター

本開示の特定の態様では、プラスミド又はリポソームに基づく染色体外（即ちエピソーム）ベクターの使用もまた提供されてもよい。かかるエピソームベクターは、例えば、oriPに基づくベクター、及び／又はEBNA-1の誘導体をコードするベクターを含んでもよい。これらのベクターは、DNAの大きい断片の細胞への導入及び染色体外での維持、細胞周期あたり1回の複製、娘細胞への効率的分配を可能にし、且つ実質的に免疫応答を全く誘発しなくてもよい。

30

【0109】

特に、oriPに基づく発現ベクターの複製に必要とされる唯一のウイルスタンパク質であるEBNA-1は、その抗原のMHCクラスI分子上への提示に要求されるプロセッシングをバイパスするための効率的機構を発現していることから、細胞性免疫応答を誘発しない（Levitskaya et al., 1997）。さらに、EBNA-1は、トランスに作用し、クローン化遺伝子の発現を増強し、いくつかの細胞株においてクローン化遺伝子の発現を最大で100倍誘導しうる（Langley-Rouault et al., 1998年; Evans et al., 1997）。最終的には、かかるoriPに基づく発現ベクターの作製は安価である。

40

【0110】

他の染色体外ベクターは、他のリンパ増殖性ヘルペスウイルスに基づくベクターを含む。リンパ増殖性ヘルペスウイルスは、リンパ芽球（例えばヒトBリンパ芽球）において複製するヘルペスウイルスであり、その自然生活環の一部としてプラスミドになる。単純ヘルペスウイルス（HSV）は、「リンパ増殖性」ヘルペスウイルスでない。例示的なリン

50

パ増殖性ヘルペスウイルスとして、限定はされないが、EBV、カポジ肉腫ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma herpes viruses) (KSHV) ; ヘルペスウイルス・サイミリ (Herpes virus saimiri) (HS) 及びマレック病ウイルス (Marek's disease virus) (MDV) が挙げられる。エピソームベスベクターの他の供給源もまた検討され、例えば、酵母ARS、アデノウイルス、SV40、又はBPVが挙げられる。

【0111】

当業者は、標準の組換え技術を通じてベクターを構築することを十分に理解するであろう (例えば、Maniatis et al., 1988 及び Ausubel et al., 1994 を参照、いずれも参照により本明細書中に援用される)。

10

【0112】

ベクターはまた、遺伝子送達及び／又は遺伝子発現をさらに調節する、又はそれ以外では標的化細胞に有利な特性をもたらす、他の成分又は機能性を含みうる。かかる他の成分として、例えば、細胞に対する結合又は標的化に影響を及ぼす成分 (細胞型又は組織に特異的な結合を媒介する成分を含む) ; 細胞によるベクターの核酸の取り込みに影響を及ぼす成分 ; 取り込み後の細胞内でのポリヌクレオチドの局在化に影響を及ぼす成分 (核局在化を媒介する作用物質など) ; 及びポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼす成分が挙げられる。

【0113】

かかる成分はまた、マーカー、例えば、取り込み済みであり且つベクターによって送達された核酸を発現中である細胞について検出又は選択するために使用可能な検出可能マーカー及び／又は選択マーカーを含んでもよい。かかる成分は、(結合及び取り込みを媒介する成分又は機能性を有する特定のウイルスベクターの使用などの) ベクターの天然特性として提供されうる、又はベクターは、かかる機能性を提供するように修飾されうる。多種多様なかかるベクターは、当該技術分野で公知であり、一般に利用可能である。ベクターが宿主細胞内で維持されるとき、ベクターは、自律的構造として有糸分裂中の細胞により安定に複製されうる、宿主細胞のゲノム中に組み込まれうる、又は宿主細胞の核又は細胞質において維持されうる、のいずれかである。

20

【0114】

c. トランスポゾンに基づく系

30

特定の態様では、プログラミング因子の送達では、トランスポゾン-トランスポザーゼシステムを用いることができる。例えば、トランスポゾン-トランスポザーゼシステムは、周知の Sleeping Beauty、Frog Prince トランスポゾン-トランスポザーゼシステム (後者の説明として、例えば欧州特許第 1507865 号明細書を参照)、又は TTA に特異的なトランスポゾン PiggyBac システムでありうる。

【0115】

トランスポゾンは、転位と称されるプロセスである、単細胞のゲノム内部の異なる位置に移動することができる DNA の配列である。該プロセスでは、それらは突然変異を引き起こし、ゲノムにおける DNA の量を変化させうる。トランスポゾンはまた、以前はジャンピング遺伝子と称されたが、移動性遺伝要素の例である。

40

【0116】

種々の移動性遺伝要素が存在し、且つそれらはそれらの転位機構に基づいて分類されうる。クラス I の移動性遺伝要素、又はレトロトランスポゾンは、最初に RNA に転写され、次いで逆転写酵素により DNA に逆転写され、次いでゲノム内の別の位置に挿入されることにより、自らを複製する。クラス II 移動性遺伝要素は、ゲノム内部でそれらを「カットアンドペーストする」ため、トランスポザーゼを用いて、ある位置から別の位置に直接的に移動する。

【0117】

特定の実施形態では、本開示で提供される構築物 (例えば、多系統構築物) では、PiggyBac 発現系が用いられる。PiggyBac (PB) DNA トランスポゾンは、

50

「カットアンドペースト」機構を介して結集し、それにより、トランスポゾン自体によってコードされるトランスポザーゼ酵素（P Bトランスポザーゼ）は、ゲノム内部の他の部位でトランスポゾンを切断し、再び組み込む。P Bトランスポザーゼは、トランスポゾンに隣接するP Bインバーテッド末端リピート（I T R）を特異的に認識し；これらの配列に結合し、トランスポゾンの切除を触媒する。次に、P Bは、比較的ランダムな様式で、ゲノム全体を通じてT T A A部位で組み込む。ジーントラップ突然変異（即ちトランスジェニック動物の作製に適応した）の作出においては、トランスポザーゼは、1つのプラスミド上にトランスに供され、ドナートランスポゾン、トランスポザーゼに対する結合部位によって隣接されるジーントラップ（I T R）を含む組換えトランスポゾンを有するプラスミドが同時トランスフェクトされる。トランスポザーゼは、トランスポゾンのプラスミドからの切除とその後のゲノムへの組み込みを触媒することになる。コード領域内部の組み込みは、ジーントラップ発現に必要な要素を捕捉することになる。P Bは、いくつかの理想的な特性を有する：（1）それは遺伝子内部で優先的に挿入する（挿入の50～67%がヒット遺伝子）（2）それは局所的ホッピングを全く示さない（広範なゲノムカバー率（genome coverage））（3）それはトランスポザーゼのレベル上昇が転位減少を引き起こすような過剰生成阻害に対する感受性がない（4）それは、Sleeping Beautyと異なり、ドナー部位から明確に切断し、「フットプリント」を全く残さない。

【0118】

d. 調節エレメント

本開示において有用なリプログラミングベクターに含まれる発現カセットは、好ましくは、タンパク質コード配列、介在配列を含むスプライシングナル、及び転写終結／ポリアダニル化配列に作動可能に連結された真核生物転写プロモーターを（5'→3'方向に）有する。

【0119】

(i) プロモーター／エンハンサー

本明細書に提供される発現構築物は、プログラミング遺伝子の発現を駆動するためのプロモーターを含む。プロモーターは、一般にRNA合成用の開始部位を位置づけるように機能する配列を含む。この最良の公知例は、T A T Aボックスであるが、T A T Aボックスが欠けているいくつかのプロモーター、例えば、哺乳動物の末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子用のプロモーターや、SV40後期遺伝子用のプロモーターなどでは、開始部位に重なる別々のエレメントが、自ら開始場所を固定することに役立つ。追加的なプロモーターエレメントが、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは開始部位の30～110bp上流領域に位置するが、同様にいくつかのプロモーターが開始部位の下流に機能的エレメントを有することが示されている。コード配列をプロモーター「の制御下に」導くため、転写リーディングフレームの転写開始部位の5'末端が、選択されたプロモーターの「下流」（即ち、その3'側）に位置づけられる。「上流」プロモーターは、DNAの転写を刺激し、コードRNAの発現を促進する。

【0120】

プロモーターエレメント間のスペーシングは柔軟であることが多いことから、プロモーター機能は、エレメントが相互に対して反転又は移動するとき、保存される。tkプロモーターでは、プロモーターエレメント間のスペーシングは、活性が低下し始める前に50bpの間隔に増加されうる。プロモーターに依存し、各エレメントは、転写を活性化するのに協調的又は独立的のいずれかで機能しうると思われる。プロモーターは、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用性制御配列を指す、「エンハンサー」と併用されてもされなくてもよい。

【0121】

プロモーターは、核酸配列に天然に会合されるものであってもよく、コードセグメント及び／又はエクソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得られてもよい。かかるプロモーターは、「内因性」と称することができる。同様に、エンハンサー

は、核酸配列に天然に会合されるものであり、その配列の下流又は上流のいずれかに位置してもよい。或いは、コード核酸セグメントを、通常はその天然環境下で核酸配列に会合されないプロモーターを指す、組換え又は異種プロモーターの制御下に位置づけることにより、特定の利点が得られることになる。組換え又は異種エンハンサーもまた、通常はその天然環境下で核酸配列に会合されないエンハンサーを指す。かかるプロモーター又はエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーター又はエンハンサー、及び任意の他のウイルス、又は原核生物若しくは真核細胞から単離されるプロモーター又はエンハンサー、及び「天然に存在する」ことがない、即ち異なる転写調節領域の異なるエレメント、及び／若しくは発現を改変する突然変異を有するプロモーター又はエンハンサーを含んでもよい。例えば、組換えDNA構成物において最も汎用されるプロモーターは、βラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトース及びトリプトファン（trp）プロモーターシステムを含む。プロモーター及びエンハンサーの核酸配列を合成的に生成することに加えて、配列は、本明細書に開示される組成物と関連させて、PCR（商標）を含む、組換えクローニング及び／又は核酸増幅技術を用いて生成されてもよい（米国特許第4,683,202号明細書及び米国特許第5,928,906号明細書を参照、各々は参照により本明細書中に援用される）。さらに、ミトコンドリア、クロロプラストなどの非核細胞小器官内部の配列の転写及び／又は発現を誘導する制御配列も同様に利用可能であることは検討される。

【0122】

天然に、発現用に選択される、細胞小器官、細胞型、組織、臓器、又は生物におけるDNAセグメントの発現を有効に誘導するプロモーター及び／又はエンハンサーを用いることは重要となる。分子生物学の当業者は一般に、タンパク質発現用のプロモーター、エンハンサー、及び細胞型の組み合わせの使用について理解している（例えば、Sambrook et al., 1989、参照により本明細書中に援用される）。用いられるプロモーターは、組換えタンパク質及び／又はペプチドの大規模生成において有利であるような、導入されたDNAセグメントの高レベルの発現を誘導するのに適した条件下で、構成的、組織特異的、誘導可能、且つ／又は有用であってもよい。プロモーターは、異種であっても又は内因性であってもよい。

【0123】

加えて、発現を誘導するには、任意のプロモーター／エンハンサーの組み合わせ（例えば、真核生物プロモーターデータベースEPDBによる）も利用可能である。T3、T7又はSP6細胞質発現系の使用は、もう一つの考えられる実施形態である。真核細胞は、適切な細菌ポリメラーゼが、送達複合体の一部、又は追加的な遺伝子発現構築物のいずれかとして提供される場合、特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持しうる。

【0124】

プロモーターの非限定例として、初期又は後期ウイルスプロモーター、例えば、SV40初期又は後期プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）初期プロモーター；真核細胞プロモーター、例えば、βアクチンプロモーター（Ng, 1989; Quitsche et al., 1989）、GADPHプロモーター（Alexander et al., 1988, Ercolani et al., 1988）、メタロチオネインプロモーター（Karin et al., 1989年; Richards et al., 1984）；及び連鎖状応答エレメントプロモーター、例えば、環状AMP応答エレメントプロモーター（cre）、血清応答エレメントプロモーター（sre）、ホルボールエステルプロモーター（TPA）及び最小TATAボックス近傍の応答エレメントプロモーター（tre）が挙げられる。ヒト成長ホルモンプロモーター配列（例えば、ジェンバンク受入番号X05244、ヌクレオチド283-341に掲載のヒト成長ホルモン最小プロモーター）又はマウス乳腺腫瘍プロモーター（ATCC、カタログ番号ATCC45007から入手可能）を用いることも可能である。

【0125】

組織特異的な導入遺伝子発現、特にプログラミングから誘導される造血細胞及び造血細

10

20

30

40

50

胞の前駆体におけるレポーター遺伝子発現については、誘導された造血細胞及び前駆体を同定するための方法として望ましいことがある。特異性及び活性の双方を増強するため、シス作用性調節エレメントの使用が検討されている。例えば、造血細胞に特異的なプロモーターが用いられてもよい。多数のかかる造血細胞に特異的なプロモーターは、当該技術分野で公知であり、表 1 に提示される造血遺伝子のプロモーターが挙げられる。

【0126】

特定の態様では、本開示の方法はまた、エンハンサー配列、即ち、プロモーターの活性を増強し、且つシスに作用する潜在性を有し、たとえ（標的プロモーターから最大で数千ベース離れた）比較的長い距離にわたってもその配向性と無関係である、核酸配列に関する。しかし、エンハンサー機能は、それが所与のプロモーターの近隣で機能することもあることから、必ずしもかかる長い距離に制限されるとは限らない。

10

【0127】

多数の造血細胞プロモーター及びエンハンサー配列が同定されており、本方法において有用なことがある。例えば、米国特許第 5, 556, 954 号明細書；米国特許出願公開第 20020055144 号明細書；米国特許出願公開第 20090148425 号明細書を参照のこと。

【0128】

(i i) 開始シグナル及び関連した発現

コード配列の効率的翻訳のため、特定の開始シグナルもまた、本開示で提供される発現構築物において用いられてもよい。これらのシグナルは、A T G 開始コドン又は隣接配列を含む。A T G 開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルが、提供される必要があるかもしれない。当業者であれば、このことを決定し、必要なシグナルを提供することが容易にできるであろう。全インサートの翻訳を保証するため、開始コドンが所望されるコード配列のリーディングフレームと「インフレームで」なければならないことは周知である。外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然又は合成のいずれかでありうる。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントの封入により増強されてもよい。

20

【0129】

特定の実施形態では、多重遺伝子、即ちポリシストロニックメッセージを作出するため、内部リボソーム進入部位 (IRES) エレメントが用いられる。IRES エレメントは、5' メチル化キャップ依存性翻訳のリボソーム走査モデルをバイパスし、内部部位で翻訳を開始することができる (Pelletier and Sonenberg, 1988)。ピコルナウイルスファミリーの 2 メンバー (ポリオ及び脳心筋炎) からの IRES エレメント (Pelletier and Sonenberg, 1988)、並びに哺乳動物メッセージからの IRES (Macejak and Sarnow, 1991) については記載がある。IRES エレメントは、異種オープンリーディングフレームに連結される。複数のオープンリーディングフレームが一緒に転写され、各々が IRES によって分離されることで、ポリシストロニックメッセージを作出しうる。IRES エレメントのおかげで、各オープンリーディングフレームは、効率的翻訳のため、リボソームにアクセス可能である。複数の遺伝子は、単一のメッセージを転写するため、単一のプロモーター／エンハンサーを用いて効率的に発現されうる (米国特許第 5, 925, 565 号明細書及び米国特許第 5, 935, 819 号明細書を参照、各々は参照により本明細書中に援用される)。

30

【0130】

加えて、本開示に提供される構築物においてプログラミング遺伝子の連結又は同時発現をもたらすのであれば、特定の 2 A 配列要素が使用可能である。例えば、オープンリーディングフレームを連結し、単一のシストロンを形成することにより遺伝子を同時発現するのであれば、切断配列が使用可能である。例示的な切断配列が、F 2 A (口蹄疫ウイルス 2 A) 又は「2 A 様」配列 (例えば、ゾセア・アシグナ (Those a s i g n a) ウイルス 2 A ; T 2 A) である。特定の実施形態では、多系統構築物における遺伝子の発現を連結するため、F 2 A 切断ペプチドが用いられる。

40

50

【0131】

e. 複製起点

宿主細胞内でベクターを増殖させるため、それは、1つ以上の複製起点部位（「ori」と称されることが多い）、例えば、上記のようなEBVのoriPに対応する核酸配列、又はプログラミングの際に類似の若しくは増強された機能を伴う遺伝子操作されたoriPに対応する核酸配列（複製が開始される特定の核酸配列である）を含有してもよい。或いは、上記のような他の染色体外複製ウイルスの複製起点又は自己複製配列（ARS）が利用可能である。

【0132】

f. 選択及びスクリーニング可能マーカー

特定の実施形態では、核酸構築物を含有する細胞が、マーカーを発現ベクター内に含めることにより、インピトロ又はインピボで同定されてもよい。かかるマーカーであれば、細胞に同定可能な変化を与え、発現ベクターを含有する細胞の容易な同定が可能になる。一般に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を与えるものである。ポジティブ選択マーカーは、該マーカーの存在がその選択を可能にするようなものである一方、ネガティブ選択マーカーは、その存在がその選択を阻止するようなものである。ポジティブ選択マーカーの例が、薬剤耐性マーカーである。

【0133】

通常、薬剤選択マーカーの組み入れは、形質転換体のクローニング及び同定に役立ち、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン及びヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択マーカーである。条件の実行に基づく形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、比色分析を基本とするGFPなどのスクリーニング可能マーカーを含むマーカーの他のタイプについても検討される。或いは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（tk）又はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）などのネガティブ選択マーカーとしてスクリーニング可能な酵素が利用されてもよい。当業者であれば、おそらくはFACS分析と併せて、免疫学的マーカーを利用する仕方についても理解するであろう。用いられるマーカーは、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現可能である限り、重要であると考えられない。選択及びスクリーニング可能マーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

【0134】

本開示による、核酸、例えばDNA又はRNAの、造血前駆細胞にプログラムされるべき多能性幹細胞への導入では、本明細書に記載の通り、又は当業者に公知と思われる通り、細胞の形質転換のための核酸送達に適した任意の方法を用いてもよい。かかる方法として、限定はされないが、例えば、生体外トランスフェクションによる（Wilson et al., 1989, Nabel et al., 1989）、注射（米国特許第5,994,624号明細書、米国特許第5,981,274号明細書、米国特許第5,945,100号明細書、米国特許第5,780,448号明細書、米国特許第5,736,524号明細書、米国特許第5,702,932号明細書、米国特許第5,656,610号明細書、米国特許第5,589,466号明細書及び米国特許第5,580,859号明細書、各々は参照により本明細書中に援用される）、例えばマイクロインジェクション（Harland and Weintraub, 1985; 米国特許第5,789,215号明細書、参照により本明細書中に援用される）による；エレクトロポレーションによる（米国特許第5,384,253号明細書、参照により本明細書中に援用される；Turkaspas et al., 1986; Potter et al., 1984）；リン酸カルシウム沈殿による（Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990）；DEAE-デキストラン、次いでポリエチレングリコールを用いることによる（Gopal, 1985）；直接音波負荷による（Fechheimer et al., 1987）；リポソーム媒介トランスフェクション（Nicolau and Sene, 1982; Frale

10

20

30

40

50

y et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991) 及び受容体媒介トランスフェクション (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988) による; 微粒子銃による (PCT出願の国際公開第94/09699号パンフレット及び国際公開第95/06128号パンフレット; 米国特許第5, 610, 042号明細書; 米国特許第5, 322, 783号明細書、米国特許第5, 563, 055号明細書、米国特許第5, 550, 318号明細書、米国特許第5, 538, 877号明細書及び米国特許第5, 538, 880号明細書、各々は参照により本明細書中に援用される); シリコンカーバイド繊維を用いた攪拌による (Kaeppler et al., 1990; 米国特許第5, 302, 523号明細書及び米国特許第5, 464, 765号明細書、各々は参照により本明細書中に援用される); アグロバクテリウム媒介形質転換による (米国特許第5, 591, 616号明細書及び米国特許第5, 563, 055号明細書、各々は参照により本明細書中に援用される); 乾燥/阻害媒介DNA取り込みによる (Potrykus et al., 1985) DNAの直接送達、及びかかる方法の任意の組み合わせが挙げられる。これらなどの技術の適用を通じて、細胞小器官、細胞、組織又は生物は、安定に又は一過性に形質転換されてもよい。

【0135】

C. MHCハプロタイプマッチング

主要組織適合複合体 (MHC) は、同種臓器移植片の免疫拒絶の主因である。3つの主要なMHCクラスIIハプロタイプ (A、B、及びC) と3つの主要なMHCクラスIIハプロタイプ (DR、DP、及びDQ) とが存在する。HLA遺伝子座は、高度に多形性であり、染色体6上の4Mbにわたり分布される。領域内部のHLA遺伝子をハプロタイプ化する能力は、この領域が自己免疫及び感染症に関連し、ドナーとレシピエントとの間のHLAハプロタイプの適合性が移植の臨床成績に影響しうることから、臨床的に重要である。MHCクラスIIに対応するHLAは、細胞内部からペプチドを提示し、且つMHCクラスIIに対応するHLAは、細胞の外部からTリンパ球に抗原を提示する。移植片と宿主との間でのMHCハプロタイプの不適合性は、移植片に対する免疫応答を惹起し、その拒絶をもたらす。したがって、患者は、拒絶を予防するため、免疫抑制剤で治療されうる。HLA適合幹細胞株は、免疫拒絶のリスクを克服することがある。

【0136】

移植におけるHLAの重要性を理由に、好ましいドナー-レシピエント対を同定するため、HLA遺伝子座が通常は血清学及びPCRにより分類される。HLAクラスII及びII抗原の血清学的検出は、精製されたT又はBリンパ球を伴う補体媒介性リンパ球毒性試験を用いて達成されうる。この手順は、主にHLA-A及びHLA-B遺伝子座と適合するように用いられる。分子に基づく組織タイピングは、時として血清学的検査よりも正確でありうる。PCR産物が一連のオリゴヌクレオチドプローブに対して試験される、SSOP (配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ) 法などの低分解能分子法は、HLA抗原を同定するために用いることができ、これらの方法は現在、クラスII-HLAタイピング用に用いられる最も一般的な方法である。PCR増幅用に対立遺伝子特異的プライマーを用いる、SSP (配列特異的プライマー) 法などの高分解能技術は、特異的なMHC対立遺伝子を同定しうる。

【0137】

ドナーとレシピエントとの間のMHC適合性は、ドナー細胞がHLAホモ接合性である、即ち各抗原提示タンパク質における同一の対立遺伝子を有する場合、有意に増加する。大部分の個体は、MHCクラスII及びII遺伝子に対してヘテロ接合性であるが、特定の個体は、これらの遺伝子においてホモ接合性である。これらのホモ接合性個体は、スーパードナーとして役立つことができ、それら細胞から作製された移植片は、そのハプロタイプにおいてホモ接合性又はヘテロ接合性のいずれかであるすべての個体に移植されうる。さらに、ホモ接合性ドナー細胞が、ある集団内に高頻度で見出されるハプロタイプを有する場合、これらの細胞は、多数の個体に対する移植療法における用途を有してもよい。

【0138】

したがって、いくつかの実施形態では、本方法のPSCは、治療されるべき対象、又は該患者の場合と同じ若しくは実質的に同じHLAタイプを有する別の対象の体細胞から生成されうる。ある場合、ドナーの主要なHLA（例えば、HLA-A、HLA-B及びHLA-DRの3つの主要な遺伝子座）は、レシピエントの主要なHLAと同一である。場合によっては、体細胞ドナーはスーパードナーであってもよく；したがって、HPCや、それに続く免疫細胞、例えばT細胞を生成するため、MHCホモ接合性スーパードナー由来のPSCが用いられてもよい。したがって、スーパードナーに由来する免疫エフェクター細胞は、そのハプロタイプにおいてホモ接合性又はヘテロ接合性のいずれかである対象に移植されてもよい。例えば、免疫細胞は、HLA-A及びHLA-Bなどの2つのHLA対立遺伝子にホモ接合性でありうる。そのようなものとして、スーパードナーから得られる免疫細胞は、本明細書に開示される方法において用いられ、潜在的には多数の有望なレシピエントに「マッチする」可能性がある免疫細胞が作製可能である。

10

【0139】

D. 遺伝子操作された抗原受容体

PSCは、改変されたTCR又はCARなどの抗原受容体を発現するように遺伝子操作されうる。例えば、PSC（例えば自家又は同種）は、がん抗原に対する抗原特異性を有するTCR又はCARを発現するように修飾される。

【0140】

修飾の好適な方法は、当該技術分野で公知である。例えば、Sambrook and Ausubel, 上記を参照のこと。例えば、該細胞は、がん抗原に対する抗原特異性を有するTCRを発現するため、Heemskerk et al. Hum Gene Ther. 19:496-510 (2008) 及びJohnson et al. Blood 114:535-46 (2009) に記載の形質導入技術を用いて、形質導入されてもよい。

20

【0141】

完全長TCR α 及び β （又は γ 及び δ ）鎖をコードするRNAのエレクトロポレーションは、レトロウイルス性に形質導入された、内因性のTCR鎖の対合によって引き起こされる自己反応性で長期的問題を克服するための選択肢として用いることができる。たとえばかかる代替的な対合が一過性トランスフェクション法において生じるとしても、作製される見込みのある自己反応性T細胞は、導入されたTCR α 及び β 鎖が専ら一過性に発現されることから、後になってこの自己反応性を失うことになる。導入されたTCR α 及び β 鎖の発現が減少するとき、正常な自己T細胞のみが残される。これは、完全長TCR鎖が、導入されたTCR鎖を決して失うことがなく、患者において常在する自己反応性を引き起こす、安定なレトロウイルス形質導入により導入されるような状況ではない。

30

【0142】

いくつかの実施形態では、該細胞は、1つ以上の抗原受容体をコードする、遺伝子工学により導入される1つ以上の核酸、及びかかる核酸の遺伝子操作産物を含む。いくつかの実施形態では、該核酸は、異種である、即ち通常は細胞内又は細胞から得られるサンプル中に存在せず、例えば改変されている細胞及び／又はかかる細胞の由来元である生物において通常は見出されない、別の生物又は細胞から得られるものなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、該核酸は、天然に存在せず、天然に見出されない核酸（例えばキメラ）が挙げられる。

40

【0143】

いくつかの実施形態では、該CARは、抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインを有する。いくつかの実施形態では、該抗原は、細胞の表面上に発現されるタンパク質である。いくつかの実施形態では、該CARはTCR様CARであり、且つ該抗原は、プロセッシングされたペプチド抗原、例えば、TCRのように、主要組織適合複合体（MHC）分子との関連で、細胞表面上で認識される、細胞内タンパク質のペプチド抗原である。

【0144】

50

例示的な抗原受容体、例えばCAR及び組換えTCR、並びに該受容体を改変し、細胞に導入するための方法は、例えば、国際特許出願公開番号としての国際公開第200014257号パンフレット、国際公開第2013126726号パンフレット、国際公開第2012/129514号パンフレット、国際公開第2014031687号パンフレット、国際公開第2013/166321号パンフレット、国際公開第2013/071154号パンフレット、国際公開第2013/123061号パンフレット、米国特許出願公開番号としての米国特許第2002131960号明細書、米国特許第2013287748号明細書、米国特許第20130149337号明細書、米国特許第6,451,995号明細書、米国特許第7,446,190号明細書、米国特許第8,252,592号明細書、米国特許第8,339,645号明細書、米国特許第8,398,282号明細書、米国特許第7,446,179号明細書、米国特許第6,410,319号明細書、米国特許第7,070,995号明細書、米国特許第7,265,209号明細書、米国特許第7,354,762号明細書、米国特許第7,446,191号明細書、米国特許第8,324,353号明細書、及び米国特許第8,479,118号明細書、並びに欧州特許出願番号としての欧州特許第2537416号明細書、並びに／又はSadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3 (4) : 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8 (4) : e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24 (5) : 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18 (2) : 160-75に記載のものを含む。いくつかの態様では、遺伝子操作された抗原受容体は、米国特許第7,446,190号明細書に記載のようなCAR、及び国際特許出願公開番号としての国際公開第2014055668 A1号パンフレットに記載のものを含む。

【0145】

1. キメラ抗原受容体

いくつかの実施形態では、CARは、a) 細胞内シグナル伝達ドメイン、b) 膜貫通ドメイン、及びc) 抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含む。

【0146】

いくつかの実施形態では、改変された抗原受容体は、CAR、例えば、活性化若しくは刺激性CAR、同時刺激性CAR（国際公開第2014/055668号パンフレットを参照）、及び／又は阻害性CAR（iCAR, Fedorov et al., 2013を参照）を含む。CARは、一般に、いくつかの態様ではリンカー及び／又は膜貫通ドメインを介して、1つ以上の細胞内シグナル伝達成分に連結された細胞外抗原（又はリガンド）結合ドメインを含む。かかる分子は、典型的には、天然抗原受容体を通じてシグナルを、同時刺激受容体と組み合わせたかかる受容体を通じてシグナルを、及び／又は同時刺激受容体単独を通じてシグナルを模倣又は近似する。

【0147】

本開示の特定の実施形態は、抗原特異的CARポリペプチド、例えば、細胞内シグナル伝達ドメイン、膜貫通ドメイン、及び1つ以上のシグナル伝達モチーフを含む細胞外ドメインを含む、免疫原性（hCAR）を低減するためにヒト化されているCARをコードする核酸を含む核酸の使用に関する。特定の実施形態では、該CARは、1つ以上の抗原間で共有された空間を含むエピトープを認識してもよい。特定の実施形態では、該結合領域は、モノクローナル抗体の相補性決定領域、モノクローナル抗体の可変領域、及び／又はその抗原結合断片を含みうる。別の実施形態では、その特異性は、受容体に結合するペプチド（例えばサイトカイン）から誘導される。

【0148】

ヒトCAR核酸がヒト患者用の細胞免疫療法を増強するために用いられるヒト遺伝子であってもよいことが検討されている。具体的な実施形態では、本発明は、完全長CAR cDNA又はコード領域を含む。抗原結合領域又はドメインは、特定のヒトモノクローナル抗体に由来する一本鎖可変断片（scFv）のVH及びVL鎖の断片、例えば米国特許第

10

20

30

40

50

7, 109, 304号明細書（参照により本明細書中に援用される）に記載のものを含みうる。該断片はまた、ヒト抗原特異的抗体のいくつもの異なる抗原結合ドメインでありうる。より具体的な実施形態では、該断片は、ヒト細胞における発現のためのヒトコドン使用に最適化された配列によってコードされる抗原特異的 s c F v である。

【0149】

該配列の場合、多量体、例えば二重特異性抗体又は多量体でありうる。多量体は、軽鎖及び重鎖の変換部分の二重特異性抗体への交差対合（cross pairing）により形成される可能性が最も高い。該構築物のヒンジ部分は、完全に欠失されているから、最初のシステインが維持されているまで、セリンではなくプロリンの置換まで、最大で最初のシステインまで切断されているまで、複数の代替物を有しうる。Fc 部分は欠失されうる。安定で且つ／又は二量体化する任意のタンパク質は、この目的を果たしうる。ヒト免疫グロブリンから、Fc ドメインの1つに限り、例えばCH2 又はCH3 ドメインのいずれかであれば使用可能である。さらに、二量体化を改善するために修飾されているヒト免疫グロブリンのヒンジ、CH2 及びCH3 領域であれば使用可能である。さらに、免疫グロブリンのヒンジ部に限れば使用可能である。さらに、CD8α の一部であれば使用可能である。

【0150】

いくつかの実施形態では、CAR 核酸は、他の同時刺激受容体、例えば膜貫通ドメイン及び修飾されたCD28 細胞内シグナル伝達ドメインをコードする配列を含む。他の同時刺激受容体として、限定はされないが、CD28、CD27、OX-40（CD134）、DAP10、及び4-1BB（CD137）の1つ以上が挙げられる。CD3ζ によって開始される一次シグナルに加えて、ヒトCAR に挿入されたヒト同時刺激受容体によって提供される追加的なシグナルは、NK 細胞の完全な活性化にとって重要であり、インビボでの持続性及び養子免疫療法の治療的成功を改善することに役立つ。

【0151】

いくつかの実施形態では、CAR は、特定の抗原（又はマーカー若しくはリガンド）、例えば養子療法により標的にされるべき特定の細胞型において発現される抗原、例えばがんマーカー、及び／又は減衰応答を誘導することが意図された抗原、例えば正常若しくは非罹患細胞型上に発現される抗原に対する特異性を用いて構築される。したがって、CAR は、典型的には、その細胞外部分に、1つ以上の抗原結合分子、例えば、1つ以上の抗原結合断片、ドメイン、若しくは部分、又は1つ以上の抗体可変ドメイン、及び／又は抗体分子を含む。いくつかの実施形態では、CAR は、抗原結合部分又は抗体分子の一部、例えばモノクローナル抗体（mAb）の可変重（VH）鎖及び可変軽（VL）鎖由来の一本鎖抗体断片（s c F v）を含む。

【0152】

キメラ抗原受容体の特定の実施形態では、（抗原結合領域を含む細胞外ドメインと称されてもよい）受容体の抗原特異的部分は、腫瘍関連抗原又は病原体に特異的な抗原結合ドメインを含む。抗原は、パターン認識受容体、例えばデクチン1 によって認識される炭水化物抗原を含む。腫瘍関連抗原は、それが腫瘍細胞の細胞表面上に発現される限り、任意の種類であってもよい。腫瘍関連抗原の例示的な実施形態として、CD19、CD20、がん胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮腫瘍抗原、メラノーマ関連抗原、突然変異p53、突然変異ras などが挙げられる。

【0153】

キメラ受容体をコードするオープンリーディングフレームの配列は、ゲノムDNA 源、cDNA 源から入手されうる、又は（例えばPCR を介して）合成されうる、又はそれらの組み合わせでありうる。ゲノムDNA のサイズ及びイントロンの数に依存して、イントロンがmRNA を安定化することが見出されることから、cDNA 又はその組み合わせを用いることが望ましいことがある。加えて、mRNA を安定化するため、内因性又は外因性非コード領域を用いることがさらに有利なことがある。

【0154】

キメラ構築物がネイキッドDNAとして又は好適なベクター内で免疫細胞に導入可能であることが検討される。ネイキッドDNAを用いてエレクトロポレーションにより細胞を安定にトランスフェクトする方法は、当該技術分野で公知である。例えば、米国特許第6,410,319号明細書を参照のこと。ネイキッドDNAは、一般に発現にとって適切な配向性でプラスミド発現ベクター内に含有されるキメラ受容体をコードするDNAを指す。

【0155】

或いは、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、又はレンチウイルスベクター）は、キメラ構築物を免疫細胞に導入するため、使用可能である。本開示の方法に従う使用に適したベクターは、免疫細胞において非複製性である。細胞において維持されるウイルスのコピー数が細胞の生存度を維持するのに十分に低い場合には、ウイルスに基づく多数のベクターが知られており、例えば、HIV、SV40、EBV、HSV、又はBPVに基づくベクターなどが挙げられる。

【0156】

いくつかの態様では、抗原特異的結合、又は認識成分は、1つ以上の膜貫通及び細胞内シグナル伝達ドメインに連結される。いくつかの実施形態では、CARは、CARの細胞外ドメインに融合された膜貫通ドメインを含む。一実施形態では、天然にCARにおけるドメインの1つに会合される膜貫通ドメインが用いられる。場合によっては、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するため、かかるドメインの同じ又は異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへの結合を回避するようなアミノ酸置換により選択又は修飾される。

【0157】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、天然又は合成供給源のいずれかに由来する。供給源が天然である場合、ドメインは、いくつかの態様では任意の膜結合又は膜貫通タンパク質に由来する。膜貫通領域は、T細胞受容体の α 、 β 又は ζ 鎖、CD28、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、ICOS/CD278、GITR/CD357、NKG2D、及びDAP分子に由来する（即ち、それらの少なくとも膜貫通領域を含む）ものを含む。或いは、膜貫通ドメインは、いくつかの実施形態では合成である。いくつかの態様では、合成膜貫通ドメインは、主にロイシン及びバリンなどの疎水性残基を含む。いくつかの態様では、フェニルアラニン、トリプトファン及びバリンの三つ組が、合成膜貫通ドメインの各末端に見出されることになる。

【0158】

特定の実施形態では、免疫細胞、例えばNK細胞を遺伝的に修飾するための本明細書に開示されるプラットフォーム技術は、(i)エレクトロポレーション装置（例えばnucleofector）を用いる非ウイルス遺伝子導入、(ii)エンドドメイン（例えば、CD28/CD3 ζ 、CD137/CD3 ζ 、又は他の組み合わせ）を通じてシグナル伝達するCAR、(iii)抗原認識ドメインを細胞表面に接続する可変長の細胞外ドメインを有するCAR、及び場合によっては、(iv)CAR⁺免疫細胞を強力且つ数値的に拡大することができる、K562由来の人工的抗原提示細胞（aAPC）を含む（Singhet al., 2008; Singhet al., 2011）。

【0159】

2. T細胞受容体（TCR）

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された抗原受容体は、組換えTCR及び／又は天然に存在するT細胞からクローン化されたTCRを含む。「T細胞受容体」又は「TCR」は、可変 α 及び β 鎖（各々、TCR α 及びTCR β としても公知）又は可変 γ 及び δ 鎖（各々、TCR γ 及びTCR δ としても公知）を有し、且つMHC受容体に結合された抗

原ペプチドに特異的に結合する能力がある分子を指す。いくつかの実施形態では、TCRは、 $\alpha\beta$ 形態である。

【0160】

典型的には、 $\alpha\beta$ 及び $\gamma\delta$ 形態で存在するTCRは、一般に構造的に類似するが、それらを発現するT細胞は、明らかな解剖学的位置又は機能を有してもよい。TCRは、細胞の表面上に又は可溶性形態で見出されうる。一般に、TCRは、一般に主要組織適合複合体(MHC)分子に結合された抗原を認識することに関与する場合、T細胞(又はTリンパ球)の表面上に見出される。いくつかの実施形態では、TCRはまた、定常ドメイン、膜貫通ドメイン及び／又は短い細胞質側末端を有しうる(例えば、Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 433, 1997を参照)。例えば、いくつかの態様では、TCRの各鎖は、1つのN末端免疫グロブリン可変ドメイン、1つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域、及びC末端に短い細胞質側末端を有しうる。いくつかの実施形態では、TCRは、シグナル伝達を媒介することに関与したCD3複合体の不変タンパク質に関連する。特に指定のない限り、用語「TCR」は、その機能的TCR断片を包含するように理解されるべきである。該用語はまた、 $\alpha\beta$ 形態又は $\gamma\delta$ 形態でのTCRを含む、インタクトなTCR又は完全長TCRを包含する。

10

【0161】

したがって、本明細書における目的として、TCRに対する参照には、任意のTCR又は機能断片、例えば、MHC分子において結合された特異的抗原ペプチド、即ちMHC-ペプチド複合体に結合するTCRの抗原結合部分が含まれる。交換可能に使用可能なTCRの「抗原結合部分」又は「抗原結合断片」は、TCRの構造ドメインの一部を有するが、完全なTCRが結合する対象の抗原(例えばMHC-ペプチド複合体)に結合する分子を指す。場合によっては、抗原結合部分は、特定のMHC-ペプチド複合体に結合するための結合部位を形成するのに十分である、TCRの可変ドメイン、例えばTCRの可変 α 鎖及び可変 β 鎖(一般には各鎖が3つの相補性決定領域を有する場合など)を有する。

20

【0162】

いくつかの実施形態では、TCR鎖の可変ドメインは、ループ、又は相補性決定領域(CDR)(免疫グロブリンに類似する)を形成するように会合し、TCR分子の結合部位を形成することにより抗原認識を付与し、ペプチド特異性を決定することで、ペプチド特異性を決定する。典型的には、免疫グロブリンのように、CDRは、フレームワーク領域(FRs)によって分離される(例えば、Jores et al., 1990; Chothia et al., 1988; Lefranc et al., 2003を参照)。いくつかの実施形態では、CDR3は、プロセシングされた抗原を認識することに関与する主要なCDRであるが、 α 鎖のCDR1もまた、抗原ペプチドのN末端部分と相互作用することが示されている一方で、 β 鎖のCDR1は、該ペプチドのC末端部分と相互作用する。CDR2は、MHC分子を認識すると考えられる。いくつかの実施形態では、 β 鎖の可変領域は、さらなる超可変(HV4)領域を有しうる。

30

【0163】

いくつかの実施形態では、TCR鎖は、定常ドメインを有する。例えば、免疫グロブリンのように、TCR鎖の細胞外部分(例えば、 α 鎖、 β 鎖)は、2つの免疫グロブリンドメイン、N末端に可変ドメイン(例えば、 V_α 又は V_β ;典型的にはKabatt付番(Kabat et al., «Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.)に基づくアミノ酸1~116)と、細胞膜に隣接した1つの定常ドメイン(例えば、 α 鎖定常ドメイン又は C_α 、典型的にはKabattに基づくアミノ酸117~259、 β 鎖定常ドメイン又は C_β 、典型的にはKabattに基づくアミノ酸117~295)とを有しうる。例えば、場合

40

50

によっては、2つの鎖によって形成されたTCRの細胞外部分は、2つの膜から近位の定常ドメインと、CDRを有する2つの膜から遠位の可変ドメインを有する。TCRドメインの定常ドメインは、システイン残基がジスルフィド結合を形成し、2つの鎖間を連結させる、短い接続配列を有する。いくつかの実施形態では、TCRは、TCRが定常ドメインにおいて2つのジスルフィド結合を有するように、 α 及び β 鎖の各々において追加的なシステイン残基を有してもよい。

【0164】

いくつかの実施形態では、TCR鎖は、膜貫通ドメインを有しうる。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、正に荷電される。場合によっては、TCR鎖は、細胞質側末端を有する。場合によっては、該構造は、TCRがCD3のような他の分子と会合することを可能にする。例えば、膜貫通領域を伴う定常ドメインを有するTCRは、細胞膜内のタンパク質に固定され、CD3シグナル伝達装置又は複合体の不変サブユニットと会合しうる。

【0165】

一般に、CD3は、哺乳類における3つの異なる鎖(γ 、 δ 、及び ϵ)及び ζ 鎖を有しうる多タンパク質複合体である。例えば、哺乳類では、該複合体は、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、及びCD3 ζ 鎖のホモ二量体を有しうる。CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、及びCD3 ϵ 鎖は、単一の免疫グロブリンドメインを有する免疫グロブリンスーパーファミリーの高度に関連した細胞表面タンパク質である。CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、及びCD3 ϵ 鎖の膜貫通領域は、負に荷電され、それはこれらの鎖の正荷電T細胞受容体鎖との会合を可能にするという特徴である。CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、及びCD3 ϵ 鎖の細胞内末端が各々、免疫受容体チロシンに基づく活性化モチーフ又はITAMとして公知の単一の保存モチーフを有する一方で、各CD3 ζ 鎖は3つを有する。一般に、ITAMは、TCR複合体のシグナル伝達能力に関与する。これらのアクセサリ分子は、負に荷電した膜貫通領域を有し、TCRから該細胞にシグナルを増殖する役割を担う。CD3鎖及び ζ 鎖は、TCRと一緒に、T細胞受容体複合体として公知のものを形成する。

【0166】

いくつかの実施形態では、TCRは2つの鎖 α 及び β (又は任意選択的には γ 及び δ)のヘテロ二量体であってもよく、又は一本鎖TCR構築物であってもよい。いくつかの実施形態では、TCRは、例えば1又は複数のジスルフィド結合によって連結された2本の別々の鎖(α 鎖及び β 鎖又は γ 鎖及び δ 鎖)を有するヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、標的抗原(例えばがん抗原)に対するTCRが同定され、細胞に導入される。いくつかの実施形態では、TCRをコードする核酸は、例えば公的に利用可能なTCR DNA配列のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅により、種々の供給源から得ることができる。いくつかの実施形態では、TCRは、生物学的供給源から、例えば細胞から、例えばT細胞(例えば細胞傷害性T細胞)、T細胞ハイブリドーマ又は他の公的に利用可能な供給源から得られる。いくつかの実施形態では、T細胞は、インビボで単離された細胞から得ることができる。いくつかの実施形態では、高親和性T細胞クローンは、患者から単離され、TCRが単離されうる。いくつかの実施形態では、T細胞は、培養されたT細胞ハイブリドーマ又はクローンでありうる。いくつかの実施形態では、標的抗原に対するTCRクローンは、ヒト免疫系遺伝子(例えば、ヒト白血球抗原系、又はHLA)で改変されたトランスジェニックマウスにおいて作製されている。いくつかの実施形態では、標的抗原に対するTCRを単離するため、ファージディスプレイが用いられる。いくつかの実施形態では、TCR又はその抗原結合部分は、TCRの配列に関する知識から合成的に作製されうる。

【0167】

3. 抗原提示細胞

マクロファージ、Bリンパ球、及び樹状細胞を含むAPCは、特定のMHC分子のそれらの発現により分化される。APCは、抗原を内部移行させ、それらの外部細胞膜上のMHC分子と一緒に、その抗原の一部を再発現する。MHCは、複数の遺伝子座を有する大

10

20

30

40

50

きい遺伝子複合体である。MHC遺伝子座は、クラスⅠ及びクラスⅡ MHCと称される、MHC膜分子の2つの主要クラスをコードする。Tヘルパーリンパ球は、一般にMHCクラスⅡ分子に関連する抗原を認識し、且つT細胞傷害性リンパ球は、MHCクラスⅠ分子に関連する抗原を認識する。MHCは、ヒトではHLA複合体と称され、マウスではH-2複合体と称される。

【0168】

場合によっては、aAPCが、実施形態の治療組成物及び細胞療法生成物を調製するのに有用である。抗原提示系の調製及び使用に関する一般的ガイダンスについては、例えば、米国特許第6,225,042号明細書、米国特許第6,355,479号明細書、米国特許第6,362,001号明細書及び米国特許第6,790,662号明細書を参照のこと。

【0169】

aAPC系は、少なくとも1つの外因性補助分子を含んでもよい。補助分子の任意の好適な数及び組み合わせが利用されてもよい。補助分子は、同時刺激分子及び接着分子などの補助分子から選択されてもよい。例示的な同時刺激分子として、CD86、CD64 (FcγRI)、41BBリガンド、及びIL-21が挙げられる。接着分子は、セレクチンなどの炭水化物結合糖タンパク質、インテグリンなどの膜貫通結合糖タンパク質、カドヘリンなどのカルシウム依存性タンパク質、及び1回膜貫通型免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリータンパク質、例えば細胞間接着分子(ICAM) (例えば、細胞対細胞又は細胞対マトリックス接触を促進する)を含んでもよい。例示的な接着分子として、LFA-3及びICAM、例えばICAM-1が挙げられる。例示的な補助分子、例えば同時刺激分子及び接着分子の選択、クローニング、調製、及び発現にとって有用な技術、方法、及び試薬が、例えば、米国特許第6,225,042号明細書、米国特許第6,355,479号明細書、及び米国特許第6,362,001号明細書に例示されている。

【0170】

4. 抗原

遺伝子操作された抗原受容体によって標的にされる抗原の中に、養子細胞療法により標的にされるべき疾患、状態、又は細胞型との関連で発現されるものが挙げられる。疾患及び状態の中で、増殖性、腫瘍性、及び悪性疾患及び障害、例えばがん及び腫瘍、例えば、血液がん、免疫系のがん、例えばリンパ腫、白血病、及び／若しくは骨髓腫、例えばB-T、及び骨髓性白血病、リンパ腫、及び多発性骨髓腫が挙げられる。いくつかの実施形態では、抗原は、疾患又は状態の細胞上、例えば腫瘍又は病原性細胞上で、正常又は非標的化細胞若しくは組織と比べて、選択的に発現又は過剰発現される。他の実施形態では、抗原は、正常細胞上で発現され、且つ／又は改変細胞上で発現される。

【0171】

任意の好適な抗原は、本方法において用途が見出されてもよい。例示的な抗原として、限定はされないが、感染病原体からの抗原分子、オート／自己抗原、腫瘍／がん関連抗原、及び腫瘍ネオ抗原が挙げられる(Linnemann et al., 2015)。

【0172】

腫瘍関連抗原は、前立腺がん、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、膵がん、腎がん、中皮腫、卵巣がん、又はメラノーマがん由来してもよい。例示的な腫瘍関連抗原又は腫瘍細胞由来抗原として、MAGE1、3、及びMAGE4 (又は他のMAGE抗原) ; PRAME ; BAGE ; RAGE、Lage (NY-ESO-1としても公知) ; SAGE ; 及びHAGE又はGAGEが挙げられる。腫瘍抗原のこれらの非限定例は、メラノーマ、肺がん、肉腫、及び膀胱がんなどの広範囲の腫瘍タイプにおいて発現される。例えば、米国特許第6,544,518号明細書を参照のこと。前立腺がん腫瘍関連抗原は、例えば、前立腺特異膜抗原(PSMA)、前立腺特異抗原(PSA)、前立腺酸性ホスフェート(prostatic acid phosphates)、NKX3.1、及び前立腺の6回膜貫通上皮抗原(STEAP)を含む。

【0173】

他の腫瘍関連抗原として、P l u - 1、H A S H - 1、H a s H - 2、C r i p t o 及び C r i p t i n が挙げられる。加えて、腫瘍抗原は、自己ペプチドホルモン、例えば、多くのがんの治療に有用な、短い10アミノ酸長ペプチドである、全長ゴナドトロピンホルモン放出ホルモン (G n R H)、であってもよい。

【0174】

腫瘍抗原は、腫瘍関連抗原の発現、例えば H E R - 2 / n e u の発現によって特徴づけられるがん由来する腫瘍抗原を含む。目的の腫瘍関連抗原は、系列特異的腫瘍抗原、例えばメラニン細胞-メラノーマ系列抗原 M A R T - 1 / M e l a n - A、g p 1 0 0、g p 7 5、m d a - 7、チロシナーゼ及びチロシナーゼ関連タンパク質を含む。例示的な腫瘍関連抗原として、限定はされないが、p 5 3、R a s、c - M y c、細胞質セリン／トレオニンキナーゼ (例えば、A - R a f、B - R a f、及び C - R a f、サイクリン依存性キナーゼ)、M A G E - A 1、M A G E - A 2、M A G E - A 3、M A G E - A 4、M A G E - A 6、M A G E - A 1 0、M A G E - A 1 2、M A R T - 1、B A G E、D A M - 6、- 1 0、G A G E - 1、- 2、- 8、G A G E - 3、- 4、- 5、- 6、- 7 B、N A 8 8 - A、M A R T - 1、M C 1 R、G p 1 0 0、P S A、P S M、チロシナーゼ、T R P - 1、T R P - 2、A R T - 4、C A M E L、C E A、C y p - B、h T E R T、h T R T、i C E、M U C 1、M U C 2、ホスホイノシチド3-キナーゼ (P I 3 K)、T R K 受容体、P R A M E、P 1 5、R U 1、R U 2、S A R T - 1、S A R T - 3、ウィルムス腫瘍抗原 (W T 1)、A F P、- カテニン / m、カスパーゼ- 8 / m、C E A、C D K - 4 / m、E L F 2 M、G n T - V、G 2 5 0、H S P 7 0 - 2 M、H S T - 2、K I A A 0 2 0 5、M U M - 1、M U M - 2、M U M - 3、ミオシン / m、R A G E、S A R T - 2、T R P - 2 / I N T 2、7 0 7 - A P、アネキシン I I、C D C 2 7 / m、T P I / m b c r - a b l、B C R - A B L、インターフェロン制御因子4 (I R F 4)、E T V 6 / A M L、L D L R / F U T、P m l / R A R、腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー1 (T A C S T D 1)、T A C S T D 2、受容体チロシンキナーゼ (例えば、上皮成長因子受容体 (E G F R) (特に E G F R v I I I)、血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R)、血管内皮増殖因子受容体 (V E G F R))、細胞質チロシンキナーゼ (例えば、s r c - ファミリー、s y k - Z A P 7 0 ファミリー)、インテグリン結合キナーゼ (I L K)、転写のシグナルトランスデューサー及びアクチベーター S T A T 3、S T A T 5、及び S T A T 6、低酸素症誘導因子 (例えば、H I F - 1 及び H I F - 2)、核内因子- κ B (N F - κ B)、ノッチ受容体 (例えば、N o t c h 1 ~ 4)、c - M e t、ラパマイシンの哺乳動物標的 (m T O R)、W N T、細胞外シグナル制御キナーゼ (E R K)、及びそれらの調節サブユニット、P M S A、P R - 3、M D M 2、メソセリン、腎細胞がん- 5 T 4、S M 2 2 - α、炭酸脱水酵素 I (C A I) 及び I X (C A I X) (G 2 5 0 としても公知)、S T E A D、T E L / A M L 1、G D 2、プロテインキナーゼ3、h T E R T、肉腫の転座限界点、E p h A 2、M L - I A P、E p C A M、E R G (T M P R S S 2 E T S 融合遺伝子)、N A 1 7、P A X 3、A L K、アンドロゲン受容体、サイクリン B 1、ポリシアル酸、M Y C N、R h o C、G D 3、フコシル G M 1、m e s o t h e l i a n、P S C A、s L e、P L A C 1、G M 3、B O R I S、T n、G L o b o H、N Y - B R - 1、R G s S、S A R T 3、S T n、P A X 5、O Y - T E S 1、精子タンパク質 1 7、L C K、H M W M A A、A K A P - 4、S S X 2、X A G E 1、B 7 H 3、レグマイン、T I E 2、P a g e 4、M A D - C T - 1、F A P、M A D - C T - 2、f o s 関連抗原 1、C B X 2、C L D N 6、S P A N X、T P T E、A C T L 8、A N K R D 3 0 A、C D K N 2 A、M A D 2 L 1、C T A G 1 B、S U N C 1、L R R N 1 及びイディオタイプの任意の1つ以上に由来する、又はそれらを含む腫瘍抗原が挙げられる。

【0175】

抗原は、正常細胞と比べて腫瘍細胞内で突然変異した遺伝子又は腫瘍細胞内で異なるレベルで転写された遺伝子由来するエピトープ領域又はエピトープペプチドを含んでもよく、例えば、テロメラーゼ酵素、サバイビン、メソセリン、突然変異 r a s、b c r / a

10

20

30

40

50

b l 再配列、Her 2 / neu、突然変異型又は野生型 p 5 3、チトクロム P 4 5 0 1 B 1、及び異常に発現されたイントロン配列、例えば N - アセチルグルコサミン転移酵素 V ; 骨髄腫及び B 細胞リンパ腫における特有のイディオタイプを生成する免疫グロブリン遺伝子のクローン再配列 ; 腫瘍ウイルスプロセスに由来するエピトープ領域又はエピトープペプチドを含む腫瘍抗原、例えばヒトパピローマウイルスタンパク質 E 6 及び E 7 ; エプスタイン・バーウイルスタンパク質 L M P 2 ; 腫瘍選択的発現を伴う非突然変異がん胎児性タンパク質、例えばがん胎児性抗原及び α フェトプロテインが挙げられる。

【 0 1 7 6 】

他の実施形態では、抗原は、病原性微生物又は日和見病原性微生物（本明細書で感染症微生物とも称される）、例えば、ウイルス、真菌、寄生虫、及び細菌から得られる、又はそれに由来する。特定の実施形態では、かかる微生物に由来する抗原は、完全長タンパク質を含む。

【 0 1 7 7 】

III. 免疫エフェクター細胞

A. 造血前駆細胞

抗原受容体、例えば CAR を発現するように改変された本開示の PSC は、当該技術分野で公知の方法により、HPC に分化されてもよい。一方法では、CAR-PSC は、指向された分化誘導を通じて CD 3 4⁺ HPC に分化される。もう一つの方法では、CAR-PSC は、フォワードプログラミングを通じて CD 3 4⁺ HPC に分化される。

【 0 1 7 8 】

1. 指向された分化誘導

本開示の特定の実施形態は、CAR-PSC の HPC への分化に関する。CAR-PSC は、例えば米国特許第 8, 372, 642 号明細書（参照により本明細書中に援用される）に記載される当該技術分野で公知の方法により HPC に分化されうる。一方法では、造血分化を促進するため、BMP 4、VEGF、Flt 3 リガンド、IL-3、及び GM-CSF の組み合わせが用いられてもよい。特定の実施形態では、細胞培養物の、分化用の PSC を調製するための第 1 の培地、BMP 4、VEGF、及び FGF を含む第 2 の培地、次いで Flt 3 リガンド、SCF、TPO、IL-3、及び IL-6 を含む第 3 の培地中の培養物への逐次的曝露により、多能性細胞が HPC 及び造血細胞に分化されうる。第 2 の限定培地はまた、ヘパリンを含みうる。さらに、BMP 4 及び VEGF を含有する培地への FGF-2 (50 ng/ml) の封入は、多能性細胞からの造血前駆細胞の生成の効率を増強しうる。さらに、第 1 の限定培地へのグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (GSK3) 阻害剤（例えば、CHIR99021、BIO、及び SB-216763）の封入は、HPC の生成をさらに増強しうる。

【 0 1 7 9 】

一般に、多能性細胞の造血前駆細胞への分化は、定義された条件又は定義されていない条件を用いて実施されてもよい。定義された条件が、得られる細胞がヒト対象への投与が意図される場合の実施形態では一般に好ましいことは理解されるであろう。造血幹細胞は、定義された条件下で（例えば TeSR 培地を用いて）多能性幹細胞から誘導されてもよく、また造血細胞は、多能性細胞由来の胚様体から作製されてもよい。他の実施形態では、多能性細胞は、OP9 細胞又はマウス胚性線維芽細胞上で共培養され、次いで分化されてもよい。

【 0 1 8 0 】

多能性細胞は、分化プロセスの一部として胚様体又は凝集体を形成することが可能であってもよい。分化を誘導するための「胚様体」（EB）、又は増殖細胞群の形成は、一般にはヒト多能性幹細胞の EB へのインビトロ凝集を含み、ヒト多能性幹細胞の内胚葉、外胚葉、及び中胚葉起源を表す複数の組織型への自発的及びランダム分化を可能にする。したがって、三次元の EB は、いくつかの造血細胞及び内皮細胞画分を生成するため、使用可能である。

【 0 1 8 1 】

EBは、以下のプロトコルを用いて形成されてもよい。MATRIGEL（商標）でコーティングされたプレート上でのフィーダーフリーでの増殖に適応した未分化iPSCは、室温で約8～10分間の0.5MEDTA処理を用いた培養密度で収集されてもよい。EDTAは、インキュベーション後に吸引され、EBは、ROCK阻害剤又はプレビスタチンを含むSFD培地中の該細胞を収集することにより形成されてもよい。該培地は翌日、異なるサイトカイン製剤を含むEB1分化培地に変更されてもよい。該細胞は、凝集体形成を促進するため、25～50万個の細胞/mlの密度で蒔かれる。

【0182】

凝集体形成を促進するため、該細胞は、75%IMDM（Gibco）、RA添加物を有しない0.05%N2及びB-27が添加された25%ハム改変F12（Cellgro）、200mMの1-グルタミン、0.05mg/mlのアスコルビン酸-2-リン酸マグネシウム塩（Asc2-P）（WAKO）、及び 4.5×10^{-4} のMTGからなる無血清分化（SFD）培地中での一晚インキュベーションのため、低吸着プレートに移されてもよい。翌日、細胞は、各ウェルから収集され、遠心分離されてもよい。次に、該細胞は、分化から最初の4日間、約50ng/mlの骨形成因子（BMP4）、約50ng/mlの血管内皮増殖因子（VEGF）、及び50ng/mlのzbFGFが添加されたSFD基礎培地からなる「EB分化培地」に再懸濁されてもよい。該細胞は、48時間ごとに半分供給される。分化から5日目、培地は、50ng/mlの幹細胞因子（SCF）、約50ng/mlのFlt-3リガンド（Flt-3L）、50ng/mlのインターロイキン-6（IL-6）、50ng/mlのインターロイキン-3（IL-3）、50ng/mlのトロポポエチン（TPO）が添加されたSFD培地からなる第2の培地と交換される。該細胞は、新しい分化培地が48時間ごとに半分供給される。培地変更は、分化培養物を300gで5分間沈降させ、分化培養物から体積の半分を吸引し、それに新しい培地を補充することにより実施される。特定の実施形態では、EB分化培地は、概ねBMP4（例えば約50ng/ml）、VEGF（例えば約50ng/ml）、また任意選択的にはFGF-2（例えば約25～75ng/ml又は約50ng/ml）を含んでもよい。上清は、吸引され、新しい分化培地と交換されてもよい。或いは、該細胞は、新しい培地に2日ごとに半分供給されてもよい。該細胞は、分化プロセス中の異なる時点で収集されてもよい。

【0183】

HPCは、限定培地を用いて多能性幹細胞から培養されてもよい。限定培地を用いての多能性細胞の造血CD34⁺幹細胞への分化のための方法は、例えば、米国特許出願第12/715,136号明細書（その全体が参照により援用される）に記載されている。これらの方法は、本開示で用いられてもよいことが期待される。

【0184】

例えば、造血CD34⁺分化を誘導するため、限定培地が用いられてもよい。限定培地は、増殖因子BMP4、VEGF、Flt3リガンド、IL-3及び／又はGMCSFを含む第1の限定培地中で培養され、次いで、（Flt3リガンド、IL-3、及びGMCSF）又は（Flt3リガンド、IL-3、IL-6、及びTPO）のいずれかを含む第2の培地中で培養されてもよい。第1及び第2の培地はまた、SCF、IL-6、G-CSF、EPO、FGF-2、及び／又はTPOの1つ以上を含んでもよい。実質的な低酸素条件（例えば20%未満のO₂）が、造血又は内皮分化をさらに促進してもよい。

【0185】

細胞は、機械的又は酵素的手段を介して（例えばトリプシン又はTrypLE（商標）を用いて）実質的に個別化されてもよい。ROCK阻害剤（例えばH1152又はY-27632）も、該培地中に含まれてもよい。これらの手法は、例えばロボティックオートメーションを用いて自動化されてよいことが期待される。

【0186】

特定の実施形態では、多能性細胞の造血前駆細胞への分化を促進するため、実質的な低

10

20

30

40

50

酸素条件が用いられてもよい。当業者によって理解されるであろうが、約 20.8% 未満の大気酸素含量は低酸素性と考えられることになる。培養下でのヒト細胞は、外気と比べて低下した酸素含量を有する大気条件下で増殖しうる。この相対的低酸素は、培地に曝露された大気酸素を低減することにより、達成されてもよい。胚細胞は、典型的には、一般に二酸化炭素が環境レベルで大気酸素が約 1%～約 6% の間での低下した酸素条件下で、インビトロで発生する。理論によって拘束されることを望まないが、低酸素条件が特定の胚発生条件の態様を再現することがあると期待される。下の例に示されるように、特定の実施形態では、多能性細胞、例えば i P S C 又は h E S C の、より分化した細胞型、例えば H P C へのさらなる分化を促進するため、低酸素条件を用いることができる。

【0187】

多能性細胞の造血前駆細胞への分化を促進するため、以下の低酸素条件が用いられてもよい。特定の実施形態では、造血前駆細胞への分化を促進するため、約 20% 未満、約 19% 未満、約 18% 未満、約 17% 未満、約 16% 未満、未満約 15%、約 14% 未満、約 13% 未満、約 12% 未満、約 11% 未満、未満約 10%、約 9% 未満、約 8% 未満、約 7% 未満、約 6% 未満、約 5% 未満、約 5%、約 4%、約 3%、約 2%、又は約 1% の大気酸素含量が用いられてもよい。特定の実施形態では、低酸素大気は、約 5% の酸素ガスを含む。

【0188】

任意の所与の造血前駆細胞の拡大において特定の培地が用いられることに無関係に、用いられる培地は、好ましくは、少なくとも 1 つのサイトカインが約 0.1 ng/mL～約 500 ng/mL、より通常的には 10 ng/mL～100 ng/mL の濃度で添加される。好適なサイトカインとして、限定はされないが、c-キットリガンド (K L) (造血幹細胞因子 (S t I)、マスト細胞増殖因子 (M G F)、及び幹細胞因子 (S C F) とともに称される)、I L-6、G-C S F、I L-3、G M-C S F、I L-1 α 、I L-11、M I P-1 α 、L I F、c-m p l リガンド/T P O、及び f l k 2/f l k 3 リガンド (F l t 2 L 又は F l t 3 L) が挙げられる。特に、培養物は、S C F、F l t 3 L 及び T P O の少なくとも 1 つを含むことになる。より詳細には、培養物は、S C F、F l t 3 L 及び T P O を含むことになる。

【0189】

一実施形態では、サイトカインは、培地に含有され、培地灌流により補充される。或いは、バイオリアクターシステムを用いるとき、サイトカインは、別々の入口を通じて、濃縮溶液として、培地灌流なしに、別々に添加されてもよい。サイトカインが灌流なしに添加されるとき、それらは典型的には、バイオリアクター内の容積の 1/10～1/100 に等しい量で 10 倍～100 倍溶液として添加され、新しいサイトカインは約 2～4 日ごとに添加されることになる。さらに、新しい濃縮されたサイトカインはまた、灌流培地中のサイトカインに、さらに別々に添加されうる。

【0190】

いくつかの実施形態では、H P C は、破壊されたメチル-C p G 結合タンパク質 2 (M e C P 2) を示し、骨髄分化又はリンパ系分化を促進するための条件下で培養される。いくつかの態様では、H P C は、メチル化 DNA への結合性を本質的に有しない非機能的 M e C P 2 を発現する。特定の態様では、H P C は、M e C P 2 DNA 結合活性をもたらすのに十分なレベルで M e C P 2 を発現しない。特定の態様では、M e C P 2 は、M e C P 2 遺伝子における切断又は突然変異の理由で非機能的である。いくつかの態様では、破壊された M e C P 2 を示す H P C を得ることは、H P C を s i R N A、s h R N A 又は M e C P 2 の小分子阻害剤と接触させることを含む。

【0191】

(i) 例示的な三次元分化法

H P C への P S C 分化のための例示的方法は、フィーダーフリー条件下、例えば、E s s e n t i a l 8 (E 8) 培地中、M A T R I G E L (商標) 又はビトロネクチンでコーティングされたプレート上での維持を含む。凝集体は、50 ng/mL の F G F 2、5

10

20

30

40

50

0 ng/mlのVEGF、2 μMのCHIR99021（GSK-3阻害剤）、及びブレビスタチン（ミオシンII阻害剤）（例えば2～10 μM、例えば10 μM）が添加されたEssential 3（E3）培地（例えば、E8培地の8中3の成分のみを含有する：DMEM/F12基礎培地、アスコルビン酸（例えば100～500 μM）、2-リン酸マグネシウム及び亜セレン酸ナトリウム）中、特にサブコンフルエント、0.5～1百万細胞/mlの密度で例えば80%未満のコンフルエンスでのPSCから作られる。凝集体形成、及びその後のステップは、連続攪拌下、超低付着（ULA）フラスコ内での24時間の培養中、実施される。

【0192】

形成された細胞凝集体（即ちEB）は、サイトカイン（25 ng/mlのBMP4、50 mg/mlのVEGF及び50 ng/mlのFGF2）を誘導する造血中胚葉が添加された無血清分化培地（例えば、50%IMDM、50%Hams F12培地、100 μg/mlのポリビニルアルコール、100 μg/mlの組換えヒト血清アルブミン、1×非必須アミノ酸添加物（Invitrogen）、0.1×既知組成の脂質添加物（Invitrogen）、125 μMのアスコルビン酸2-リン酸マグネシウム、0.25 μMのリノール酸、微量元素添加物A（0.3×）、B（0.2×）及びC（0.1×）（Corning）、5 mMの塩化ナトリウム、100 μMのモノチオグリセロール、20 μMのエタノールアミン、100 ng/mlのヘパリン、及び10 ng/mlのIGF1）にさらに移される。培養は、2日目の完全培地変更を伴い、例えば4日間継続される。

【0193】

造血CD34⁺前駆細胞の分化及び拡大を支持するため、細胞凝集体が、造血支持サイトカイン、例えば、50 ng/mlのSCF、20 mg/mlのTPO、10 ng/mlのFLT3L、20 ng/mlのIL-3、及び25 ng/mlのBMP4が添加された無血清分化培地（上記）にさらに移される。培養は、2日目の完全培地変更を伴い、例えば4日間継続される。

【0194】

培養物は、分化プロセス後、例えば9日後、収集される。単一の細胞懸濁液が、例えばアクターゼ中に、分化細胞凝集体の消化を通じて得られる。次に、例えばMACSによって単離された単離CD34⁺細胞がT/NK分化培養物に蒔かれる、又は単離後1時間以内の後の使用のため、凍結保存される。

【0195】

（ii）例示的な二次元分化法

代替的な例示的方法では、PSCは、HPCの生成用の二次元分化プロトコルを受ける。まず、PSCが、Essential 8（E8）培地中、例えばMATRIGEL（商標）又はビトロネクチンでコーティングされて、フィーダーフリー条件下で、例えば5～10継代にわたり、低酸素条件に気候順応される。PSCは、個別化され、5 μMのブレビスタチン（例えば2～10 μM、例えば10 μM）が添加された無血清限定（SFD）培地の存在下、25000/cm²の密度で、Pure Coatアミンでコーティングされた6ウェルプレート（Corning Inc.）上に蒔かれる。SFD基礎培地は、75%IMDM（Invitrogen 12200-069）（グルタミン及び25 mMヘプス+P/Sを有する）、25%Hams F12（Mediatech 10-080-CV）、0.5%N2添加物（Invitrogen 17502-048）、レチノイン酸を有しない1%B27添加物（Invitrogen 12587-010）、0.05%BSA、50 μg/mlのアスコルビン酸、及び4.5×10⁻⁴ Mのモノチオグリセロールで、50 ng/mlのBMP-4、VEGF、及びbFGFが添加されたものを含有してもよい。

【0196】

造血分化の誘導は、1日目、例えば、75%IMDM（Invitrogen 12200-069）（グルタミン及び25 mMヘプス+P/Sを有する）、25%Hams F12（Mediatech 10-080-CV）、0.5%N2添加物（Invit

10

20

30

40

50

rogen 17502-048)、レチノイン酸を有しない1% B27添加物 (Invitrogen 12587-010)、0.05% BSA、50 µg/mlのアスコルビン酸、及び 4.5×10^{-4} Mのモノチオグリセロールで、50 ng/mlのBMP4、VEGF、及びbFGFが添加されたものを含有するSFD基礎培地中で培養することにより開始される。2日目、培地は吸引され、細胞は、さらに48時間、新しいEB1培地 (例えば、75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (グルタミン及び25 mMヘプス+P/Sを有する)、25% Hams F12 (Mediatech 10-080-CV)、0.5% N2添加物 (Invitrogen 17502-048)、レチノイン酸を有しない1% B27添加物 (Invitrogen 12587-010)、0.05% BSA、50 µg/mlのアスコルビン酸、及び 4.5×10^{-4} Mのモノチオグリセロールで、50 ng/mlのBMP4、VEGF、及びbFGFが添加されたものを含有するSFD基礎培地) に配置された。

【0197】

5~10日目、培地は吸引され、細胞は、次の48時間、EB2培地に配置された。EB2培地は、75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (グルタミン及び25 mMヘプス+P/Sを有する)、25% Hams F12 (Mediatech 10-080-CV)、0.5% N2添加物 (Invitrogen 17502-048)、レチノイン酸を有しない1% B27添加物 (Invitrogen 12587-010)、0.05% BSA、50 µg/mlのアスコルビン酸、及び 4.5×10^{-4} Mのモノチオグリセロールで、50 ng/mlのFlt-3リガンド、IL3、IL6、SCF、及びTPO (各々、50 ng/ml及び5000 U/mlのヘパリン) が添加されたものを含有する新しいSFD基礎培地を含んでもよい。該細胞は、分化の7、8、9、10日目にTrypLEを用いて収集され、HPCマーカー及びリンパ系前駆細胞の存在について染色される。

【0198】

2. フォワードプログラミング

本開示の特定の実施形態は、造血細胞の分化/機能にとって重要なプログラミング遺伝子の組み合わせの発現を介したCAR-PSCのフォワードプログラミングにより、HPCを提供する。一方法では、PSCは、例えば国際出願PCT/US2016/057893号明細書 (その全体が参照により本明細書中に援用される) に記載の、ETS遺伝子 (例えば、ETC2又はERG)、造血発生遺伝子 (例えば、GATA2)、及びホメオボックス遺伝子 (例えば、HOXA9) などの少なくとも3つの造血前駆体プログラミング遺伝子を発現するように修飾される。特定の態様では、ETV2/ERG、GATA2、及びHOXA9遺伝子は、1つのベクター、例えば誘導性PiggyBacベクターにより、CAR-PSCにトランスフェクトされた双方向Tightプロモーターを用いて、同時発現される。

【0199】

さらに、EGH-CAR-PSCは、長期生着能のための追加的な遺伝子を発現するようにさらに修飾されてもよい。例示的な遺伝子として、HMGA2、MYCN、NR4A2、SOX17、TFEC、MEIS1、HOXA4、ZNF414、KLF4、ZNF131、BCL2、ETV6、ZNF350、及び/又はRBAKが挙げられる。例えば、PSCは、HMGA2、MYCN、NR4A2、SOX17、TFEC、MEIS1、及びHOXA4を発現するための1つ以上のベクターがトランスフェクトされてもよい。

【0200】

好ましくは、ETV2/GAT2/HOXA9遺伝子は、PSCを造血前駆細胞にフォワードプログラムするのに十分な期間に限って発現される。したがって、造血前駆体プログラミング遺伝子は、誘導性プロモーターの制御下でありうる。したがって、造血前駆体プログラミング遺伝子の発現は、多系統造血前駆細胞にフォワードプログラムするのに十分な期間、PSCにおいて誘導されうる。その期間は、約1日~約20日、例えば、約3、4、5、6、7、8、9、又は10日でありうる。或いは、造血前駆体プログラミング

10

20

30

40

50

遺伝子は、エピソームベクターによりPSCに導入されうる。したがって、造血前駆体プログラミング遺伝子の場合、PSCにおいて一過性に発現されうる。

【0201】

B. リンパ系細胞分化

次に、HPCは、T細胞、NK細胞、及びT/NK細胞を含むリンパ系細胞にさらに分化されうる。いくつかの態様では、分化中のHPCは、リンパ系細胞への分化のため、7～12日目、例えば8～11日目、単離される。この段階でのHPCは、CD34及びCD43の発現により同定されてもよい。さらに、リンパ系能力を有するHPCは、CD144、DLL4、CD7及びCD235を、11日目に低下する低いレベルで発現しうるが、これらのマーカーの発現の特定の閾値レベルが、細胞をDLL4の存在下でリンパ系分化に向けて予備刺激するのに必要であることを意味する。

10

【0202】

いくつかの態様では、分化プロセスの7～11日目、例えば、7日目、8日目、9日目、10日目又は11日目に単離したHPCは、T及びNK細胞などのリンパ系細胞に分化されうる。いくつかの態様では、リンパ系前駆細胞における起源のタイミングは、HPC分化中の血液内皮前駆細胞の減少及び赤血球前駆細胞の出現に一致する。特定の態様では、9日目のHPCは、T細胞生成時の効率上昇を有してもよい。リンパ系分化の能力があるHPCは、特定マーカーの発現により、単離及び／又は同定されうる。例えば、CD34及び／又はCD43の表面発現、特にCD34及びCD43の双方の発現を伴う細胞は、リンパ系分化について、例えばMACS選別により選択されてもよい。

20

【0203】

リンパ系前駆細胞を検出するための追加的なマーカーとして、DLL4、CD144、CD31、CD34、CD43^{lo}、CD45^{lo/-}、CD235、CD7、Flk-1、APNLRが挙げられる。特定の態様では、CD34/CD7、CD235/CD7、DLL4/CD34、DLL4/CD31、DLL4/CD144、又はCD34/CD43^{lo}二重陽性集団の存在が、リンパ系前駆細胞を同定するため、用いられる。HPC上でのCD144の発現は、CD31、CD34及びDLL4と共染色される。HPC上でのCD7の発現では、CD235、CD34及びCD43との共染色がなされる。それ故、CD144及びCD7を同時発現するHPCは、リンパ系能力により、膜結合ノッチリガンド(DLL4)を血液内皮マーカーと共に発現する前駆体が捕捉され、インビトロで最終的な造血発生の系列を生成する能力があるリンパ系前駆細胞を出現させるための表現型シグネチャーが作出されることを示す。特定の態様では、HPCは、CD31、CD34、CD144、CD43、CD45、CD6、CD335、Flk-1、及びDLL4を含む表面マーカーの選別により、増強されたリンパ系能力を有する細胞にさらに選別されてもよい。いくつかの態様では、HPCのCD114/CD34、CD144/CD45、CD144/CD7、及びCD144/CD34/CD45/CD7の陽性画分は、リンパ系細胞に分化される。特定の態様では、HPCのCD144/CD7陽性画分は、リンパ系細胞に分化される。

30

【0204】

HPCは、リンパ系分化のための規定されたフィーダーフリー条件下で培養されてもよい。培地は、1つ以上のマトリックス成分、例えば、レトロネクチン、フィブロネクチン又はRGDペプチドを含有してもよい。いずれの理論にも拘束されたくないが、マトリックス成分は、胚性幹細胞の増殖用の固体支持体を提供することがある。特定の実施形態では、マトリックス成分は、培養表面に適用され、細胞を培地に播種する前に、培地と接触されてもよい。例えば、細胞は、細胞を凝集塊に機械的に分離するか又は細胞を個別化し、且つ造血前駆細胞に分化誘導する前、フィブロネクチン又はMATRIGEL(商標)でコーティングされたプレート上の限定培地(例えばTESR培地)中で培養されてもよい。

40

【0205】

様々なマトリックス成分が、多能性細胞を培養するため、用いられてもよく、例えば、

50

コラーゲン（例えば、コラーゲンⅤ）、ラミニン、ビトロネクチン、MATRIGEL（商標）、ゼラチン、ポリリジン、トロンボスポンジン（例えば、TSP-1、-2、-3、-4及び／又は-5）、及び／又はPRONECTIN-F（商標）が挙げられる。特定の実施形態では、TESRを用いて予め培養された細胞でのMATRIGEL（商標）、コラーゲンⅤ、又はラミニンのみの使用は、細胞生存度に対して生じうる有害作用が理由で回避されてもよいが、これらの組成物は、有利には他のマトリックス成分と併用されてもよい。これらマトリックス成分の組み合わせは、細胞増殖及び細胞生存度を促進するためのさらなる利益をもたらすことがある。特定の実施形態では、細胞を例えば造血分化前に培養するため、上記マトリックス成分の1、2、3、4、5、6、又はそれ以上が用いられてもよい。

10

【0206】

いくつかの実施形態では、リンパ系分化を増強するため、アスコルビン酸が用いられてもよい。限定培地は、約10 µM～約1 mM、例えば100～500 µM、例えば約50 µM～約100 µM、例えば約95 µMのアスコルビン酸が添加されてもよい。アスコルビン酸は、様々なアスコルビン酸塩、例えばリン酸アスコルビン酸マグネシウムから選択されてもよい。いくつかの実施形態では、リンパ系分化を増強するため、ニコチンアミド（例えばニコチン酸）が、例えば約0.1 mM～約5 mMの濃度で用いられてもよい。

【0207】

いくつかの態様では、HPCは、対象におけるノッチリガンドの生成を増強する物質を投与することによってノッチリガンドの内因性活性を改変することにより、リンパ系細胞、例えばT細胞に分化される。方法はまた、ノッチリガンド並びにIL-7、IL-15、SCF、Flt-3及びIL-3からなる群から選択される1つ以上のサイトカインを有効量で含む培地中で該細胞を培養することを含む。いくつかの特定の実施形態では、該培地は、IL-6をさらに含む。いくつかの実施形態では、ノッチリガンドは、δ4ノッチリガンド(DLL4)、例えばDLL4:Fcキメラである。

20

【0208】

T細胞系列の細胞の分化及び増殖を促進及び維持するノッチリガンドが選択される。ノッチリガンドは、起源がヒトであってもよい、又は齧歯類、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、雌ウシ、ヤギ、及び霊長類などの哺乳動物種を含む他種に由来してもよい。ノッチリガンドの特定例として、デルタファミリーが挙げられる。デルタファミリーは、δ-1（ジェンバンク受入番号AF003522、ヒト（Homo sapiens））、δ-3（ジェンバンク受入番号AF084576、ラット（Rattus norvegicus））、δ様1（ジェンバンク受入番号NM_005618及びNP_005609、ヒト（Homo sapiens）；ジェンバンク受入番号X80903、I48324、ハツカネズミ（M. musculus））、δ様3（ジェンバンク受入番号NM_053666、N_446118、ラット（Rattus norvegicus））、δ-4（ジェンバンク受入番号AF273454、BAB18580、ハツカネズミ（Mus musculus）；ジェンバンク受入番号AF279305、AAF81912、ヒト（Homo sapiens））、及びδ様4（ジェンバンク受入番号Q9NR61、AAF76427、AF253468、NM_019074、ヒト（Homo sapiens）；ジェンバンク受入番号NM_019454、ハツカネズミ（mus musculus））を含む。ノッチリガンドは、市販されている、又は組換えDNA技術により生成され、様々な程度に精製される。

30

40

【0209】

方法は、上記の培養下で分化されたNK細胞を生成するのに十分な持続時間にわたりHPC細胞を維持するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、分化されたNK細胞は、T細胞を伴う培養下で出現するが、NK細胞は、6週間後、増殖を停止することがある。一般に、NK細胞の数における増加及び／又はそれらの分化状態についての判定は、当業者に公知の通常の方法を用いて評価される。例えば、該培養細胞は、NK細胞の発現について、該細胞を抗CD56及び抗CD3抗体で染色することにより、フローサイト

50

メトリーによって監視されてもよい。抗CD3抗体、例えばOKT3は、0.5～2 μgの濃度で存在してもよい。CD56⁺/CD3⁻である細胞であれば、分化されたNK細胞を示すことになる。

【0210】

特定の態様では、CD3⁺T細胞又はCD56⁺CD3⁻NK細胞へのリンパ系分化は、レトロネクチン及びDLL4でコーティングされたプレート上での二次元低酸素培養により実施される。特定の態様では、非組織培養処理プレートは、HPCのリンパ系分化における使用を意図して、DLL4：Fcキメラタンパク質及びRetroNectin（フィブロネクチン断片CH-296；宝酒造株式会社、日本）でコーティングされてもよい。該分化は、T/NK細胞分化の第1の期間、それに続くT又はNK細胞拡大の第2の期間を含んでもよい。分化の第1の期間は約1週間～約2週間であってもよく、また拡大の第2の期間もまた約1週間～約2週間であってもよい。したがって、リンパ系分化及び拡大の全期間は、約2～4週間であってもよい。

10

【0211】

いくつかの実施形態では、リンパ系分化プロセスは、T細胞及びNK細胞の細胞傷害性活性を増強するため、抗原特異的標的細胞、例えば抗原特異的腫瘍細胞との共培養を含んでもよい。特定の態様では、リンパ系分化の拡大期間は、抗原特異的標的細胞との共培養を含んでもよい。例えば、CD19⁻CAR-T細胞又はNK細胞は、拡大期間中、例えば1～3週間、特に2週間、CD19⁺腫瘍細胞（例えば、CD19⁺Daudi細胞）と共培養されてもよい。いくつかの態様では、拡大期間は、拡大を改善するため、サイトカイン、例えばIL2、IL15、及び/又はIL21、特にIL2の添加をさらに含んでもよい。該サイトカインの濃度は、例えば10～50 μMに最適化されてもよい。

20

【0212】

C. 細胞培養

特定の実施形態では、HPCの骨髄又はリンパ系への分化を促進するため、実質的な低酸素条件が用いられてもよい。特定の実施形態では、造血前駆細胞への分化を促進するため、約20%未満、約19%未満、約18%未満、約17%未満、約16%未満、約15%未満、約14%未満、約13%未満、約12%未満、約11%未満、約10%未満、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約5%、約4%、約3%、約2%、又は約1%の大気酸素含量が用いられてもよい。特定の実施形態では、低酸素大気は、約5%の酸素ガスを含む。

30

【0213】

本明細書に記載の通り、HPCの骨髄及びリンパ系への分化を促進するため、有利には1つ以上の限定培地が用いられてもよく；特に、血清及びマウス支持細胞層などの動物産物の除去により、細胞の動物産物への曝露に伴うリスクが低減され、ヒト対象により安全に投与可能と思われる細胞の作製が可能になる。伝統的な幹細胞の培養発現が、幹細胞を種々の細胞型に分化させるための血清産物及びマウス支持細胞層に依存していることから、これらの伝統的方法は、分化が実施可能な規模を制限し、生物学的可変性及び潜在的汚染を増加させ、且つ通常であれば有用性が明らかであるかもしれないトランスレーショナル療法（translational therapies）におけるES細胞の使用を妨害している。

40

【0214】

一般に、本開示の細胞は、細胞増殖を持続可能な栄養素に富んだ緩衝液である培地中で培養される。本明細書に記載の方法に従う、多能性幹細胞の単離、拡大並びに造血前駆細胞及び造血細胞への分化に適した培地として、限定はされないが、高グルコースダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、DMEM/F-15、RPMI 1640、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）、及びOpti-MEM SFM（Invitrogen Inc.）が挙げられる。合成培地は、ヒト血清アルブミン、ヒトExCyteリポタンパク質、トランスフェリン、インスリン、ビタミン、必須及び非必須アミノ酸、ビルビン酸ナトリウム、グルタミン及びマイトジェンが添加された、イスコフ改変ダルベッコ培地

50

(IMDM) (Gibco)などの最小必須培地を含むだけでなく、好適である。本明細書で用いられるとき、マイトジェンは、細胞の分裂を刺激する作用剤を指す。作用剤は、化学物質でありえ、通常は細胞が細胞分裂を開始することを促進し、有糸分裂を誘発するタンパク質の一部の形態でありうる。一実施形態では、米国特許出願第08/464,599号明細書及び国際公開第96/39487号パンフレットに記載の場合などの無血清培地、及び米国特許第5,486,359号明細書に記載のような「完全培地」が、本明細書に記載の方法での使用を意図して検討される。いくつかの実施形態では、該培地は、10%ウシ胎仔血清(FBS)、ヒト自家血清、ヒトAB血清又は血小板リッチ血漿(ヘパリン(2U/ml)が添加される)が添加される。

【0215】

免疫細胞は、多能性幹細胞又は造血前駆細胞を、該細胞の骨髄又はリンパ系への分化を促進するのに十分な因子の細胞内レベルを増加させる条件下の培地中で培養することにより作製されうる。該培地はまた、増殖因子の様々な種類のような1つ以上の造血細胞分化及び成熟化剤を含有してもよい。これらの作用剤は、細胞のより成熟した表現型への関与の誘導を補助する(又は成熟細胞の生存を優先的に促進する)、又はこれの効果のいずれの組み合わせも有することがある。分化剤及び成熟化剤は、造血細胞系列の細胞の増殖を促進する能力がある可溶性増殖因子(ペプチドホルモン、サイトカイン、リガンド-受容体複合体、及び他の化合物)を含んでもよい。かかる作用剤の非限定例として、限定はされないが、造血又は内皮増殖因子、例えば、線維芽細胞増殖因子(FGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、幹細胞因子(SCF)、トロンボポエチン(TPO)、FLT-3リガンド(FLT3L)、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-9(IL-9)、又は顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、又はそのアイソフォーム若しくは変異体が挙げられる。

【0216】

IV. 抗原特異的免疫細胞の使用

特定の態様の方法及び組成物によって提供される抗原特異的免疫エフェクター細胞は、種々の用途において使用可能である。これらは、限定はされないが、ほんの数例を挙げれば、インビボでの細胞の移植又は注入；細胞傷害性化合物、発がん物質、突然変異原の増殖/制御因子、医薬化合物などのインビトロでのスクリーニング；血液学的疾患及び損傷の機構の解明；作用剤及び/又は増殖因子が機能する機構の研究；患者におけるがんの診断及び監視；遺伝子治療；並びに生物活性生成物の生成を含む。

【0217】

A. 試験化合物のスクリーニング

本開示の免疫細胞は、本明細書に提供されるリンパ系細胞の特徴に影響を及ぼす因子(溶媒、小分子薬、ペプチド、及びポリヌクレオチドなど)又は環境条件(培養条件又は操作など)をスクリーニングため、使用可能である。

【0218】

本開示の特定のスクリーニング用途は、薬剤研究における医薬化合物の試験に関する。読者は、一般には、標準教科書の*In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, 1997、及び米国特許第5,030,015号明細書を参照する。特定の態様では、骨髄及びリンパ系細胞は、短期間培養下、造血細胞及び前駆体で以前に実施されている通り、標準的薬剤スクリーニング及び毒性アッセイにおける試験用細胞の役割を担う。候補医薬化合物の活性の評価は、一般に、特定の態様に提供される造血細胞又は前駆体を候補化合物と組み合わせること、形態における任意の変化、マーカー表現型、又は(不活性化合物で処置された1又は複数の未処置細胞と比べての)該化合物に起因し得る細胞の代謝活性を判定すること、次に該化合物の効果を観察された変化と相関させることを含む。該スクリーニングは、該化合物が造血細胞又は前駆体に対する薬理学的効果を有するように設計される、又は他の効果を有するように設計された化合物が造血細胞又は前駆体に対して意図されない効果を有してもよい、のいずれかの理由で実施されてもよい。2以上の薬剤は、考えられる薬

10

20

30

40

50

剤－薬剤相互作用効果を検出するため、（同時的又は経時的のいずれかにしても該細胞と組み合わせることにより）組み合わせて試験されうる。

【0219】

B．養子細胞療法

いくつかの実施形態では、本開示は、免疫療法のための方法であって、本開示の免疫細胞を有効量で投与することを含む、方法を提供する。一実施形態では、内科疾患又は障害は、免疫応答を誘発する免疫細胞集団の導入により治療される。本開示の特定の実施形態では、がん又は感染は、免疫応答を誘発する免疫細胞集団の導入により治療される。本明細書では、個体におけるがんの進行を治療する、又は遅延させるための方法であって、を含む、抗原特異的細胞療法剤を有効量で個体に投与することを含む、方法が提供される。本方法は、免疫異常、固形がん、血液がん、及びウイルス感染の治療に適用されてもよい。

10

【0220】

本治療方法が有用である場合の腫瘍は、任意の悪性細胞タイプ、例えば固形腫瘍又は血液腫瘍に見出されるものを含む。例示的な固形腫瘍として、限定はされないが、脾臓、結腸、盲腸、胃、脳、頭、首、卵巣、腎臓、喉頭、肉腫、肺、膀胱、メラノーマ、前立腺、及び乳房からなる群から選択される臓器の腫瘍を挙げることができる。例示的な血液腫瘍として、骨髄の腫瘍、T又はB細胞悪性腫瘍、白血病、リンパ腫、芽細胞腫、骨髄腫などが挙げられる。本明細書に提供される方法を用いて治療されてもよいがんのさらなる例として、限定はされないが、肺がん（小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺がん、及び肺の扁平上皮がんを含む）、腹膜のがん、胃（*g a s t r i c*）又は胃（*s t o m a c h*）がん（胃腸がん及び胃腸間質がんを含む）、膵がん、子宮頸がん、卵巣がん、肝がん、膀胱がん、乳がん、大腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜又は子宮がん、唾液腺がん、腎（*k i d n e y*）又は腎（*r e n a l*）がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、様々なタイプの頭頸部がん、及びメラノーマが挙げられる。

20

【0221】

がんは、詳細には、限定はされないが、以下の組織学的タイプ：悪性新生物；がん腫；未分化がん腫；巨細胞がん及び紡錘細胞がん；小細胞がん；乳頭がん；扁平上皮がん；リンパ上皮がん；基底細胞がん；毛母がん；移行上皮がん；乳頭状移行上皮がん；腺がん；悪性ガストリン産生腫瘍；胆管がん；肝細胞がん；肝細胞がん及び胆管がんの合併；索状腺がん；腺様嚢胞がん；腺腫性ポリープにおける腺がん；腺がん、家族性結腸ポリポーシス；固形がん；悪性カルチノイド腫瘍；細気管支肺胞腺がん；乳頭状腺がん；色素嫌性がん；好酸性がん；好酸性腺がん；好塩基性がん；明細胞腺がん；顆粒細胞がん；濾胞腺がん；乳頭腺がん及び濾胞腺がん；非被包性硬化性がん；副腎皮質がん；類内膜がん；皮膚付属器がん；アポクリン腺がん；皮脂腺がん；耳垢腺がん；粘膜表皮がん；嚢胞腺がん；乳頭嚢胞腺がん；乳頭漿液性嚢胞腺がん；粘液性嚢胞腺がん；粘液性腺がん；印環細胞がん；浸潤性導管がん；髄様がん；小葉がん；炎症性がん；乳房のパジェット病；腺房細胞がん；腺扁平上皮がん；扁平上皮化生を伴う腺がん；悪性胸腺腫；悪性の卵巣間質腫；悪性莢膜細胞腫；悪性顆粒膜細胞腫；悪性アンドロblastoma；セルトリ細胞腫；悪性ライディッヒ細胞腫；悪性脂質細胞腫瘍；悪性傍神経節腫；悪性乳房外傍神経節腫；褐色細胞腫；血管球血管肉腫；悪性黒色腫；無色素性黒色腫；表在拡大型黒色腫；悪性黒子由来黒色腫；末端黒子型黒色腫；結節性黒色腫；巨大色素性母斑における悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；悪性青色母斑；肉腫；線維肉腫；悪性線維性組織球腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；胞巣状横紋筋肉腫；間質肉腫；悪性混合腫瘍；ミュー管混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；がん肉腫；悪性間葉腫；悪性ブレンナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胎児性がん；悪性奇形腫；悪性卵巣甲状腺腫；絨毛がん；悪性中腎腫；血管肉腫；悪性血管内皮腫；カボジ肉腫；悪性血管外皮腫；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；悪性軟骨芽細胞腫；間葉性軟骨肉腫；骨巨細胞腫；ユーイング肉腫；悪性歯源性腫瘍；エナメル芽細胞歯牙肉腫；悪性エナメル上皮腫；エナメル芽細胞線維肉腫；悪性松果体腫；脊索腫；悪性神経膠腫；上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；線維性星細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽

30

40

50

腫；乏突起細胞腫；乏突起膠芽細胞腫；原始神経外胚葉性；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽細胞腫；網膜芽細胞腫；嗅神経原性腫瘍；悪性髄膜腫；神経線維肉腫；悪性神経鞘腫；悪性顆粒細胞腫；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキンリンパ腫；側肉芽腫；小リンパ球性悪性リンパ腫；びまん性大細胞悪性リンパ腫；濾胞性悪性リンパ腫；菌状息肉腫；他の特定された非ホジキンリンパ腫；B細胞リンパ腫；低グレード／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中間グレード／濾胞性NHL；中間グレードびまん性NHL；高グレード免疫芽球性NHL；高グレードリンパ芽球性NHL；高グレード小非切断細胞NHL；バルキー病NHL；マントル細胞リンパ腫；エイズ関連リンパ腫；ワルデンシュトレームマクログロブリン血症；悪性組織球増殖症；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞性白血病；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞性白血病；巨核芽球性白血病；骨髄肉腫；ヘアリー細胞白血病；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；急性骨髄性白血病（AML）；並びに慢性骨髄芽球性白血病であってもよい。

【0222】

治療用途として本明細書に提供される細胞の適合性を判定するため、該細胞はまず、好適な動物モデルにおいて試験されうる。1つのレベルで、細胞は、インビボで生存し、それらの表現型を維持するそれらの能力について評価される。本明細書に提供される細胞は、免疫不全動物（例えばNOGマウス、又は化学的に若しくは放射線照射により免疫不全にされた動物）のさらなる観察が許容される部位、例えば腎臓カプセルの下、脾臓内、肝小葉内、又は骨髄内に投与される。組織は、数日から数週又はそれ以上の期間後、収集され、赤血球などの開始細胞型がさらに存在するか否かについて評価される。これは、投与された細胞に検出可能な標識（例えば緑色蛍光タンパク質、又はβ-ガラクトシダーゼ）を提供することにより；又は投与されたヒト細胞に特異的な構成的マーカーを測定することにより、実施されうる。本明細書に提供される細胞が齧歯類モデルにおいて試験中である時、投与された細胞の存在及び表現型は、ヒト特異抗体を用いる免疫組織化学又はELISAにより、又はヒトポリヌクレオチド配列に特異的であるような増幅を引き起こすプライマー及びハイブリダイゼーション条件を用いるRT-PCR分析により、評価可能である。mRNA又はタンパク質レベルでの遺伝子発現を評価するのに適したマーカーが、本開示における他の箇所に提供される。

【0223】

本開示の方法によって提供される免疫細胞は、様々な動物モデルにおいて、血液学的障害及び損傷を治療するそれらの能力について試験されてもよい。例えば、鎌状赤血球貧血マウスモデル又はT/B細胞欠損Rag-2ノックアウトマウスが、本明細書に開示される骨髄及びリンパ系細胞を試験するための特に有用な動物モデルであってもよい。

【0224】

動物モデルにおける望ましい機能特性又は有効性を示す、本開示の特定の態様に提供される免疫細胞はまた、それを必要とするヒト対象への直接投与に適してもよい。止血を目的として、該細胞は、循環に対して十分な接近性を有する任意の部位に投与されうる。造血細胞又はその前駆体はまた、損傷又は疾患の部位に送達されてもよい。

【0225】

本開示の特定の態様に提供される細胞は、それを必要とする任意の対象の治療に使用可能である。かかる治療に適することがあるヒト状態は、様々な貧血及び異常ヘモグロビン症、並びに造血細胞数の減少によって特徴づけられる疾患（例えば、骨髄異形成症候群、骨髄線維症、好中球減少症、無顆粒球症、グランツマン血小板無力症、血小板減少症、及び後天性免疫不全症候群など）を含む。ヒト治療においては、用量は、一般に、対象の体重、苦痛の性質及び重症度、並びに投与された細胞の複製能について調節して、約 $10^9 \sim 10^{12}$ 個の細胞、典型的には約 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ 個の細胞である。治療方法及び適切な用量を決定するための究極的責任は、監督臨床医（managing clinician）とともにある。

10

20

30

40

50

【0226】

治療有効量の免疫細胞は、非経口投与、例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、胸骨内、若しくは関節内注射、又は注入を含むいくつかの経路により投与されうる。

【0227】

養子細胞療法における使用を意図した治療有効量の免疫細胞は、治療中の対象において所望される効果を達成する量である。例えば、これは、進行を阻害する、若しくは自己免疫若しくは同種免疫疾患の退行を引き起こすのに必要である、又は自己免疫性疾患、例えば疼痛及び炎症によって引き起こされる症状を軽減する能力がある免疫細胞の量でありうる。それは、炎症、例えば、疼痛、浮腫及び体温上昇に関連する症状を軽減するのに必要な量でありうる。それはまた、移植された臓器の拒絶を低減又は予防するのに必要な量でありうる。

10

【0228】

免疫細胞集団は、疾患に合致する治療計画、例えば、病態を寛解するための1日～数日にわたる単回若しくは数回用量、又は疾患の進行を阻害し、疾患の再発を予防するための延長期間にわたる定期的用量で投与されうる。製剤中に用いられるべき正確な用量はまた、投与経路や、疾患又は障害の重症度に依存することになり、また施術者の判断及び各患者の環境に応じて決定されるべきである。免疫細胞の治療有効量は、治療中の対象、苦痛の重症度及びタイプ、並びに投与の様式に依存することになる。いくつかの実施形態では、ヒト対象の治療において使用可能な用量は、少なくとも 3.8×10^4 から、少なくとも 3.8×10^5 、少なくとも 3.8×10^6 、少なくとも 3.8×10^7 、少なくとも 3.8×10^8 、少なくとも 3.8×10^9 、又は少なくとも 3.8×10^{10} の免疫細胞/ m^2 の範囲である。特定の実施形態では、ヒト対象の治療において用いられる用量は、約 3.8×10^9 ～約 3.8×10^{10} の免疫細胞/ m^2 の範囲である。さらなる実施形態では、免疫細胞の治療有効量は、約 5×10^6 細胞/kg体重～約 7.5×10^8 細胞/kg体重、例えば約 2×10^7 細胞～約 5×10^8 細胞/kg体重、又は約 5×10^7 細胞～約 2×10^8 細胞/kg体重で変動しうる。免疫細胞の正確な量は、対象の年齢、体重、性別、及び生理学的状態に基づいて当業者により容易に測定される。有効用量は、インビトロ又は動物モデル試験システムから得られる用量反応曲線から外挿されうる。

20

【0229】

免疫細胞は、免疫介在性障害の治療用の1以上の他の治療薬と組み合わせて投与されてもよい。併用療法剤は、限定はされないが、1つ以上の抗微生物剤（例えば、抗生物質、抗ウイルス剤及び抗真菌剤）、抗腫瘍剤（例えば、フルオロウラシル、メトトレキサート、パクリタキセル、フルダラビン、エトポシド、ドキソルビシン、又はビンクリスチン）、免疫枯渇剤（immune-depleting agents）（例えば、フルダラビン、エトポシド、ドキソルビシン、又はビンクリスチン）、免疫抑制剤（例えば、アザチオプリン、又はグルココルチコイド、例えばデキサメタゾン若しくはプレドニゾン）、抗炎症剤（例えば、グルココルチコイド、例えば、ヒドロコルチゾン、デキサメタゾン若しくはプレドニゾン、又は非ステロイド性抗炎症剤、例えば、アセチルサリチル酸、イブプロフェン若しくはナプロキセンナトリウム）、サイトカイン（例えば、インターロイキン-10又はトランスフォーミング増殖因子 β ）、ホルモン（例えば、エストロゲン）、又はワクチンを含みうる。さらに、限定はされないが、カルシニューリン阻害剤（例えば、シクロスポリン及びタクロリムス）；mTOR阻害剤（例えばラパマイシン）；ミコフエノール酸モフェチル、（例えば、CD3、CD4、CD40、CD154、CD45、IVIG、又はB細胞を認識する）抗体；化学療法剤（例えば、メトトレキサート、トレオスルファン、ブスルファン）；放射線照射；又はケモカイン、インターロイキン若しくはそれらの阻害剤（例えば、BAFF、IL-2、抗IL-2R、IL-4、JAKキナーゼ阻害剤）を含む免疫抑制剤又は免疫寛容誘発剤（tolerogenic agents）が投与可能である。かかる追加的な医薬品は、所望される効果に応じて、免疫細胞の投与の前、間、又は後に投与可能である。細胞及び薬剤のこの投与は、同じ経路により、又は異なる経路により、また同じ部位又は異なる部位のいずれかに可能である。

30

40

50

【0230】

C. 医薬組成物

さらに、本明細書では、免疫細胞（例えばT細胞又はNK細胞）及び薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物及び製剤が提供される。投与は、自家又は非自家でありうる。例えば、T細胞及び／又はNK細胞並びにそれらを含む組成物は、1つの対象から入手され、且つ同じ対象又は異なる適合する対象に投与されうる。本開示の免疫細胞は、カテーテル投与、全身注射、局所注射、静脈内注射、又は非経口投与を含む局所注射を介して投与されうる。本開示の治療組成物を投与するとき、それは一般に、単位用量の注射剤型（例えば、溶液、懸濁液、乳濁液）で配合されることになる。

【0231】

本明細書に記載のような医薬組成物及び製剤は、所望される純度を有する活性成分（抗体又はポリペプチドなど）を、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で、1つ以上の任意選択的な薬学的に許容できる担体と混合することにより調製されうる（Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012）。薬学的に許容できる担体は、一般に、用いられる用量及び濃度でレシピエントに対して非毒性であり、限定はされないが、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（塩化オクタデシルジメチルベンジル；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジンなどのアミノ酸；単糖、二糖、及び他の炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、又はデキストリン；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び／又はポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤、を含む。本明細書中の例示的な薬学的に許容できる担体は、間質薬物分散剤、例えば可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えばヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）をさらに含む。特定の例示的なrHuPH20を含むsHASEGP及び使用方法は、米国特許出願公開第2005/0260186号明細書及び米国特許出願公開第2006/0104968号明細書に記載されている。一態様では、sHASEGPは、コンドロイチナーゼなど、1つ以上の追加的なグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【実施例】

【0232】

V. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するため、含められる。以下の実施例中に開示される技術が、本発明の実施において十分に機能するような発明者によって発見された技術を表し、ひいてはその実施のための好ましい方法を構成すると考えることができることは、当業者によって理解されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、開示される具体的な実施形態において多くの変更を設けられることを理解するだけでなく、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく同様又は類似の結果を得る必要がある。

【0233】

実施例1-抗CD19 CARを発現するPSC由来T/NK細胞の誘導

キメラ抗原受容体（CAR）を発現する多能性幹細胞を作製するため、2つの別々の方法を用いた。一方法では、導入遺伝子を含まないPSCを、レトロウイルスベクターを用いて1C細胞を生成し（米国特許出願公開第20160257939号明細書；その全体

10

20

30

40

50

が参照により本明細書中に援用される)又はエピソームベクターを用いてE11細胞を生成することで、T細胞から誘導した。第2の方法では、PSCに造血プログラミング遺伝子(hematopoietic programming genes)ETV2/ERG、GATA2、及びHOXA9をコードするPiggyBac発現ベクターをトランスフェクトし(H1 ESCをDOX誘導性ETV2-GATA2-HOXA9(EGH)造血プログラミング遺伝子の導入により改変し)、A16細胞を生成した。次に、両方法からのPSCを遺伝子組換えし、FMC63 mAb由来のヒトCD19に結合するscFvドメイン、CD28同時刺激ドメイン及びCD3ζシグナル伝達ドメインからなる第2世代の抗ヒトCD19キメラ抗原受容体(CAR)を構成的に発現した。

【0234】

非修飾及びCAR修飾PSCを、サイトカイン分化誘導(1C、E11)又はEGH誘導プログラミング(A16)を通じて、CD34⁺T/NK前駆細胞に分化させた(図1A~B)。単離したCD34⁺前駆細胞を、リン酸アスコルビン酸マグネシウム(0.25mM)、ニコチンアミド(2mM)及びサイトカイン(SCF、TPO、FLT3L、IL7、IL2)を添加したStemSpan SFEM(Stem Cell Technologies)中、DLL4/レトロネクチンでコーティングしたプレート上での4週の低酸素培養物を用いて、CD3⁺T(1C、E11)及びCD3⁺CD56⁺NK(A16)細胞にさらに分化させた。並行して、T/NK培養物に、マイトマイシンCで処理したDaudi細胞(β2ミクログロブリン欠損HLAクラスI陰性CD19⁺Bリンパ芽球様細胞株)を、抗原(CD19)に特異的なCAR活性化の供給源として、分化の最後2週の間に加した。作製したT/NK細胞を次のように名づけた:1C又はE11由来T細胞-T、CAR-T、CAR-T/Ag(Daudi共培養);A16由来NK細胞-NK、CAR-NK、CAR-NK/Ag(Daudi共培養)。

【0235】

分化段階全体を通じたCARの発現を、プロテインL染色を用いてフローサイトメトリにより評価した。CD3⁺T細胞を、λ鎖マウス抗ヒトCD3 mAb(クローンSP34-2)と共染色した。T/NK細胞への分化後、CARの発現が有意に抑制されたが、CAR陽性T及びNK細胞は、CARに特異的な抗原との活性化培養(Ag;CD19⁺Daudi細胞と共培養)後、選択的に拡大可能であった。

【0236】

PSC由来T(1C)及びNK(A16)細胞の細胞傷害性機能を、ルシフェラーゼを発現するCD19⁺Daudi及びRaji標的細胞を用いるインビトロ細胞傷害性アッセイにより評価した。標的を1:1の比でのT/NKエフェクターとともに24時間インキュベートし、ルシフェラーゼ活性を、Steady-Gloルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)により、培養ライセート中で定量化した。式:(1-(ET/T))×100(式中、ET=エフェクター+標的培養物、T=標的のみ)により、パーセント細胞傷害性を算出した。

【0237】

非修飾T/NK細胞が何らかの検出可能な活性が欠如していた一方で、両方のCARを発現するT(1C)及びNK(A16)細胞は、CD19⁺標的に対する細胞傷害性を示した。CAR依存性細胞傷害性活性は、CD19⁺標的(Daudi)細胞との2週のT/NK共培養(CAR/Ag変異体)後、有意に増強された(図3A)。

【0238】

CAR-T細胞の細胞溶解能を、Incucyte S3生細胞分析システム(Essen Bioscience)を用いるリアルタイム標的細胞計数により確認した。GFPを発現するCD19⁺Raji標的細胞を、非修飾及びCARトランスフェクトPSC(E11 TiPSC)由来T細胞とともに1:1比でインキュベートした。GFP⁺Raji細胞のタイムラプスイメージング及び計数を、9時間にわたり実施した。生存可能(GFP+)Raji細胞の有意な減少が、CAR-T細胞のみとの培養下で検出された(図3B)。

10

20

30

40

50

【0239】

2週のT/NK分化とそれに続くPSC (E11 TiPSC) 由来CD34⁺HPCからの1週の抗CD3誘導T細胞の拡大培養により作製したCAR-T細胞を、ヒトCD19抗原をトランスフェクトしたマウスP815マスト細胞腫細胞 (CD19⁺P815) 及び非トランスフェクトP815とともに24時間インキュベートし、CAR誘導性及び構成的サイトカイン産生を各々評価した。LEGENDplexフローサイトメトリー多重サイトカインアッセイ (BioLegend) を用いて、培養上清中のサイトカインを測定した (図4)。CAR-T細胞は、IFN γ 、TNF α 、IL2、IL13及びGM-CSFの特異的なCAR誘導性産生を示した。PSC由来CAR-T細胞の細胞傷害性特性についても、構成的なグランザイムB分泌により示された。

10

【0240】

インビボでCAR-T細胞の有効性を試験するため、8週齢NSGマウスに、 5×10^4 のルシフェラーゼを発現するRaji細胞を腹腔内 (ip) 注射した。翌日 (1日目)、T (1C由来) 及びNK (A16由来) 細胞を、 10^7 /マウスの用量で注射した (ip)。3日目及び5日目、T/NK注射を反復した。T/NK注射の間 (1~5日目)、すべてのマウスに、IL2及びIL15サイトカインの組み合わせを (双方とも500 ng/マウスで) 追加注射した (ip)。マウスにおける腫瘍増殖を、2週ごとにインビボ生物発光イメージングにより監視した (図5A)。150 mg/kgのIn Vivo-Glo ルシフェリン (Promega) を注射した (ip) 麻酔マウスを、ルシフェリン注射後15分以内に、Pearl Trilogyインビボイメージャー (Licor) を用いて分析した。PSC由来T (1C) 又はNK (A16) 細胞のいずれかで処置した異なるマウス群における生存曲線を図5Bに示す。

20

【0241】

2週目に検出された腫瘍は有意に抑制され、平均マウス生存は、CARを発現するPSC由来T又はNK細胞を用いた1回の処置期間 (2日間隔で3回注射) で約2倍延長された。インビボでの腫瘍溶解能は、CARを発現するPSC由来T又はNK細胞のインビトロでの抗原陽性腫瘍細胞との先行的な共培養により、有意に改善されうる。

【0242】

実施例2-指向された分化誘導の方法

CD34⁺リンパ造血前駆細胞へのPSC分化：実施例1のT細胞由来PSC (レトロウイルス及びエピソームリプログラミングの各々により末梢血T細胞から誘導された1C及びE11 TiPSC) は、凝集体懸濁培養を通じて、CD34⁺造血前駆細胞に分化した。PSCは、Essential 8 (E8) 培地中、Matrigel (商標) 又はビトロネクチンでコーティングされた6ウェルプレート上、フィーダーフリー条件下で維持した。2 μ MのCHIR99021 (GSK-3阻害剤) 及び5 μ Mのブレビスタチン (ミオシン-II阻害剤) を添加したE8培地中、50万細胞/mlの密度でのサブコンフルエントなPSC (<80%のコンフルエンス) から凝集体が作られた。(あらゆるその後の培養ステップを含む) 15~20 rpmで、ロッカープラットフォーム上、連続攪拌下、超低付着 (ULA) フラスコ内での6時間培養中、凝集体の形成を実施した。

30

【0243】

細胞凝集体形成を伴う培養物を、6及び24時間後、2 μ MのCHIR99021、50 ng/mlのVEGF及び50 ng/mlのFGF2を等しい培地容量の添加により添加した無血清造血分化培地 (HDM: 50% IMDM、50% Hams F12 培地、100 μ g/mlのポリビニルアルコール、100 μ g/mlの組換えヒト血清アルブミン、1 $\times$ 非必須アミノ酸添加物 (Invitrogen)、0.1 $\times$ 既知組成脂質添加物 (Invitrogen)、125 μ Mのアスコルビン酸2-リン酸マグネシウム、0.25 μ Mのリノール酸、微量元素添加物A (0.3 $\times$)、B (0.2 $\times$) 及びC (0.1 $\times$) (Corning)、5 mMの塩化ナトリウム、100 μ Mのモノチオグリセロール、20 μ Mのエタノールアミン、100 ng/mlのヘパリン、及び10 ng/mlのIGF1) に徐々に移した。2日目、細胞凝集体が15分間の沈降により沈殿し、培地を吸引

40

50

し、造血中胚葉誘導性サイトカイン（ 25 ng/ml のBMP4、 50 ng/ml のVEGF及び 50 ng/ml のFGF2）を添加したHDMに培養物を移した。完全培地を毎日変更しながら、培養を3日間継続した。

【0244】

造血CD34⁺前駆細胞の分化及び拡大を支持するため、細胞凝集体を、造血支持サイトカイン（ 50 ng/ml のSCF、 50 ng/ml のTPO、 20 ng/ml のFLT3L及び 20 ng/ml のIL-3）を添加したHDMにさらに移した。完全培地を毎日変更しながら、培養を3～5日間継続した。造血移行プロセスを改善するため、以下の増強成分：IL11（ $5 \sim 20 \text{ ng/ml}$ ）、8Br-cAMP（ $100 \sim 300 \mu\text{M}$ ）、及び/又はVEGF（ $20 \sim 50 \text{ ng/ml}$ ）が添加可能である。

【0245】

浮遊する個別の細胞又は小集団として懸濁液中で同定されたHPCを、2+3+3～5日の分化プロセス（全体で8～10日）後、収集した。HPCを、 $70 \mu\text{m}$ 及び $30 \mu\text{m}$ のセルストレーナー（Corning）による全分化培養物の濾過により単離した。遠心分離により濾液から収集したHPCを、HDMで1回洗浄し、TCDM（T細胞分化培地）に再懸濁した。T/NKの能力を有するHPCを濃縮するため、CD34⁺HPC画分の単離は、製造業者からの推奨に従い、直接CD34マイクロビーズ（Myltenyi Biotec）を用いる磁気活性化細胞選別（MACS）により実施可能である。HPCをT/NK分化培養物に蒔くか、又は後の使用のため、単離から1時間以内に凍結保存した。

【0246】

T/NK分化培養物：T/NK分化のため、非組織培養処理したプラスチックプレート（ノッチリガンドhDLL4-Fcキメラタンパク質及びレトロネクチンのPBSで希釈したもの（各々、 $0.5 \mu\text{g/cm}^2$ ）でコーティングした。細胞プレーティング前、コーティング溶液を吸引し、プレートを、PBSで1回洗浄し、StemSpan SFE M（Stem Cell Technologies）、GlutaMax（1/100）、リン酸アスコルビン酸マグネシウム（ $250 \mu\text{M}$ ）、ニコチンアミド（ 2 mM ）、並びにサイトカインSCF、TPO、FLT3L及びIL7（各々、 50 ng/ml ）からなる 0.25 ml/cm^2 のT細胞分化培地（TCDM）を充填した。PSC由来HPCを 5000 細胞/cm^2 の密度で蒔き、低酸素（ $5\% \text{ O}_2$ ）CO₂インキュベーター内で2週間培養し、3日目に等しいTCDM培養容量を添加し、半分の培養容量を翌々日ごとに交換した。穏やかな再懸濁と、非接着性細胞の収集と、それに続くPBS-EDTA（ 0.5 mM ）による5～10分処理による緩く付着した細胞の収集とにより、全分化細胞を収集した。分化プロセスを継続し、T/NK細胞の収量を改善するため、T細胞分化培養は、T/NK細胞の所望される収量が達成されるまで、収集した細胞を新規に調製したDLL4/レトロネクチンプレートに 10000 細胞/cm^2 の密度で再び蒔くことにより反復可能である。T/NK分化の効率もまた、以下の増強成分：CHIR99021（ $1 \sim 3 \mu\text{M}$ ）、IL2（ $2 \sim 10 \text{ ng/ml}$ ）、IL12（ $10 \sim 50 \text{ ng/ml}$ ）のTCDMへの添加により改善することができる。

【0247】

T細胞拡大培養物：T細胞拡大のため、非組織培養処理プレートを、抗CD3 mAb（クローンOKT3）、hDLL4-Fc及びレトロネクチンをPBSで希釈したもの（各々、 $0.5 \mu\text{g/cm}^2$ ）でコーティングした。細胞プレーティング前、コーティング溶液を吸引し、プレートを、PBSで1回洗浄し、StemSpan SFEM（Stem Cell Technologies）、Glutamax（1/100）、リン酸アスコルビン酸マグネシウム（ $250 \mu\text{M}$ ）、ニコチンアミド（ 2 mM ）、並びにサイトカインSCF、TPO、FLT3L、IL7（各々、 50 ng/ml ）及びIL2、IL15（各々、 10 ng/ml ）からなる 0.25 ml/cm^2 のT細胞拡大培地（TCM）で充填した。拡大を改善するため、IL21（ $5 \sim 20 \text{ ng/ml}$ ）も添加することができた。T/NK分化培養物から収集した細胞を、 10000 細胞/cm^2 の密度で蒔き、低酸素（ $5\% \text{ O}_2$ ）CO₂インキュベーター内で最大2週間培養し、3日目に等しいTCM培

10

20

30

40

50

養容量を添加し、半分の培養容量を翌々日ごとに交換した。拡大したT細胞を、穏やかな再懸濁と非接着性細胞の収集により収集した。

【0248】

実施例3－指向された分化誘導方法の特徴づけ

まずPSCを、懸濁細胞凝集体の培養下、8～10日間、WNT誘導性の分化プライミング、中胚葉誘導及びHPC分化の連続ステップを通じて、 $CD34^+HPC$ に分化させた(図1B)。HPC画分を濾過により単離した。 $CD34^+HPC$ のMACs選別は、実施しなかったが、任意選択的には直接 $CD34$ 常磁性ビーズ(Mylenyi Biotech)を用いて実施してもよい。次に、HPCを、T/NK分化のため、2～4週間、ヒトDLL4-Fc⁺レトロネクチンでコーティングしたプレートに移した。T細胞は、抗CD3 mAb (OKT3クローン)でコーティングしたプレート上での培養下で1～2週間、さらに拡大することができた。

【0249】

PSC (1C T i PSC) 由来 $CD34^+$ 細胞は、T/NK分化条件下で2週後、低FSC/SSCパラメータで規定される典型的なリンパ系細胞集団を発現した(図1D、左側のドットプロット)。このリンパ系集団は、大部分の $CD3^+T$ 及び $CD56^+CD3^-NK$ 細胞を含有した(図1D、中間のドットプロット)。T細胞集団は、 $CD4^+$ 及び $CD8^+$ の単一及び二重陽性細胞、並びに有意な割合の二重陰性細胞を含んだ(図1D、右側のドットプロット)。

【0250】

各個別の細胞型の収量を、細胞誘導の各段階での絶対細胞数のインプットに対するアウトプットの比として算出した。例えば、1.5 $CD34^+HPC$ の収量は、平均で1.5 (アウトプット) $CD34^+HPC$ が1 (インプット) PSCから誘導可能であることを示す。したがって、102 T細胞の収量は、102 (アウトプット) T細胞が1 (インプット) $CD34^+HPC$ から誘導可能であることを示す(図1E)。

【0251】

PSC (1C T i PSC) 由来T細胞($CD3^+$)は、4週間かけて分化及び拡大し、 $\alpha/\beta TCR$ (γ/δ でない、又は不変 $V\alpha 24$ NKT TCR)並びに典型的なT細胞マーカー $CD5$ 、 $CD27$ 、及び $CD7$ を発現した(図1F)。それらはまた、細胞傷害性T/NK関連($CD161$ 、 $CD94$)マーカー及び活性化($CD69$)マーカーを発現した。

【0252】

固定化された抗 $CD3$ 抗体($iCD3$)は、PSC由来T細胞の拡大を達成するため、最低限必要であり、十分であった(図1G、棒グラフ)。 $CD3$ 及び $CD28$ mAb ($sCD3$ 、 $sCD28$)での可溶性刺激は、単独又は組み合わせ($sCD3+sCD28$)のいずれか、又は $iCD3$ に添加するとき($iCD3+sCD28$)、有効でなかった。拡大培養下で増殖するT細胞は、不規則な形状のリンパ芽球の特徴的形態を得た(図1G、写真)。比較的異質なインプット細胞集団と対照的に、2週間のT細胞拡大から収集した細胞は、本質的に純粋な $CD3^+T$ 細胞であり、それはまた、 $CD56$ を発現し、 $CD8$ の発現を得た(図1G、フローサイトメトリーのドットプロット)。したがって、この指向された分化誘導方法は、T細胞を効率的に生成した。

【0253】

本明細書に開示及び主張される方法のすべては、本開示に照らして過度の実験を行うことなく作成し、実施することができる。本発明の組成物及び方法が好ましい実施形態に関して記載されている一方、バリエーションが、方法に、また本明細書に記載の方法のステップ又は一連のステップにおいて、本発明の概念、精神及び範囲から逸脱することなく適用されてもよいことは当業者に明らかになるであろう。より詳細には、化学的に且つ生理的に関連がある特定の薬剤が本明細書に記載の薬剤と置き換えられてもよい一方で、同じ又は類似の結果が得られることになることは明らかになるであろう。当業者にとって明白

10

20

30

40

50

なすべてのかかる類似の代替及び修飾は、添付の特許請求の範囲によって定義されるような本発明の精神、範囲、及び概念の範囲内に含まれると思われる。

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に示されるものを補足する例示的な手順又はその他の詳細を提供する程度に、参照により本明細書中に具体的に援用される。

Akkina et al., J. Virol., 70:2581-2585, 1996.
Alexander et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5092-5096, 1988.

Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., MA, 1996.

Biswas et al., Annals NY Acad. Sci., 590:582-583, 1990.

Biswas, et al., J. Clin. Microbiol., 29:2228-2233, 1991.

Blomer et al., J. Virol., 71(9):6641-6649, 1997.

Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987.

Chen et al., Nature Methods 8:424-429, 2011.

Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988.

Doulatov et al., Cell Stem Cell. 10:120-36, 2012.

Ercolani et al., J. Biol. Chem., 263:15335-15341, 1988.

Evans, et al., In: Cancer Principles and Practice of Oncology, Devita et al. (Eds.), Lippincott-Raven, NY, 1054-1087, 1997.

Fechheimer et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.

Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.

Frisan et al., Epstein-Barr Virus Protocols, Part III, 125-127, 2001

Furie and Furie, Cell 53:505-518, 1988.

Graham and Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.

国際公開番号、国際公開第2007/069666号パンフレット

国際公開番号、国際出願PCT/US2016/057893号明細書

国際公開番号、国際出願PCT/US2016/057899号明細書

国際公開番号、国際公開第94/09699号パンフレット

国際公開番号、国際公開第95/06128号パンフレット

国際公開番号、国際公開第96/39487号パンフレット

Jores et al., PNAS U. S. A. 87:9138, 1990.

Kaeppler et al., Plant Cell Reports 9:415-418, 1990.

Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989.

Karin et al. Cell, 36:371-379, 1989.

Kato et al, J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.

10

20

30

40

50

- Kim et al., J. Virol., 66:3879-3882, 1992.
- Knust et al., EMBO J. 761-766, 1987.
- Ladi et al., Nature Immunology, 7:338-343, 2006.
- Langle-Rouault et al., J. Virol., 72(7):6181-6185, 1998.
- Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003.
- Levitskaya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23):12616-12621, 1997.
- Linnemann, C. et al. Nat Med 21, 81-85, 2015.
- Ludwig et al., Nat. Biotechnol., 24(2):185-187, 2006b.
- Ludwig et al., Nat. Methods, 3(8):637-46, 2006a.
- Macejak and Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991.
- Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988.
- Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983.
- Nabel et al., Science, 244(4910):1342-1344, 1989.
- Naldini et al., Science, 272(5259):263-267, 1996. Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15(9):871-875,
- Ng, Nuc. Acid Res., 17:601-615, 1989.
- Nicola, et al., Blood, 54:614-627, 1979.
- Nicolas and Rubenstein, In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Lab. Press, 2001.
- Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.
- Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982.
- Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.
- Notta et al., Science, 218-221, 2011.
- Paskind et al., Virology, 67:242-248, 1975.
- 特許公開番号、欧州特許1507865号明細書
- Pelletier and Sonenberg, Nature, 334(6180):320-325, 1988.
- Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199(2):169-177, 1985.
- Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7161-7165, 1984.
- Quitsche et al., J. Biol. Chem., 264:9539-9545, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences 22^d edition, 2012.
- Reubinoﬀ et al., Nat. Biotechnol., 18:399-4

10

20

30

40

50

04, 2000.

Richards et al., Cell, 37:263-272, 1984.

Rippe, et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990.

Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor 1997.

Suzuki et al, EMBO J. 6:1891-1897, 1987.

Takahashi et al., Cell, 131:861-872, 2007.

Temin, In: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.) , NY, Plenum Press, 149-188, 1986.

Thomson and Marshall, Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165, 1998.

Thomson and Odorico, J. Trends. Biotechnol., 18:53-57, 2000.

Thomson et al. Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 92:7844-7848, 1995.

Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716-718, 1986.

米国特許出願第08／464, 599号明細書

米国特許出願第12／715, 136号明細書

米国特許出願第61／088, 054号明細書

米国特許第4, 683, 202号明細書

米国特許第5, 030, 015号明細書

米国特許第5, 302, 523号明細書

米国特許第5, 322, 783号明細書

米国特許第5, 384, 253号明細書

米国特許第5, 464, 765号明細書

米国特許第5, 486, 359号明細書

米国特許第5, 538, 877号明細書

米国特許第5, 538, 880号明細書

米国特許第5, 550, 318号明細書

米国特許第5, 556, 954号明細書

米国特許第5, 563, 055号明細書

米国特許第5, 580, 859号明細書

米国特許第5, 589, 466号明細書

米国特許第5, 591, 616号明細書

米国特許第5, 610, 042号明細書

米国特許第5, 656, 610号明細書

米国特許第5, 702, 932号明細書

米国特許第5, 736, 524号明細書

米国特許第5, 780, 448号明細書

米国特許第5, 789, 215号明細書

米国特許第5, 843, 780号明細書

米国特許第5, 843, 780号明細書

米国特許第5, 928, 906号明細書

米国特許第5, 945, 100号明細書

米国特許第5, 981, 274号明細書

米国特許第5, 994, 136号明細書

米国特許第5, 994, 624号明細書

10

20

30

40

50

米国特許第 6, 0 1 3, 5 1 6 号明細書
米国特許第 6, 2 0 0, 8 0 6 号明細書
米国特許第 6, 2 2 5, 0 4 2 号明細書
米国特許第 6, 3 5 5, 4 7 9 号明細書
米国特許第 6, 3 6 2, 0 0 1 号明細書
米国特許第 6, 5 4 4, 5 1 8 号明細書
米国特許第 6, 7 9 0, 6 6 2 号明細書
米国特許第 7, 0 2 9, 9 1 3 号明細書
米国特許第 8, 0 5 8, 0 6 5 号明細書
米国特許第 8, 1 2 9, 1 8 7 号明細書
米国特許第 8, 2 6 8, 6 2 0 号明細書
米国特許第 8, 2 6 8, 6 2 0 号明細書
米国特許第 8, 3 7 2, 6 4 2 号明細書
米国特許第 8, 7 4 1, 6 4 8 号明細書

米国特許出願公開第 2 0 0 2 0 0 5 5 1 4 4 号明細書
米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 2 6 0 1 8 6 号明細書
米国特許出願公開第 2 0 0 6 0 1 0 4 9 6 8 号明細書
米国特許出願公開第 2 0 0 9 0 1 4 8 4 2 5 号明細書
米国特許出願公開第 2 0 0 9 0 2 4 6 8 7 5 号明細書
米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 1 0 0 1 4 号明細書
米国特許出願公開第 2 0 1 2 0 2 7 6 6 3 6 号明細書
米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 1 5 3 0 4 号明細書
米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 2 5 7 9 3 9 号明細書

Wilson et al., Nature Reviews Immunology, 9 : 91-105, 2009.

Wilson et al., Science, 244 : 1344-1346, 1989.

Wong et al., Gene, 10 : 87-94, 1980.

Wynn, Nature Immunology, 6 : 1069-1070, 2005.

Xu et al., Nat. Biotechnol., 19 : 971-974, 2001.

Yamanaka et al., Cell, 131 (5) : 861-72, 2007.

10

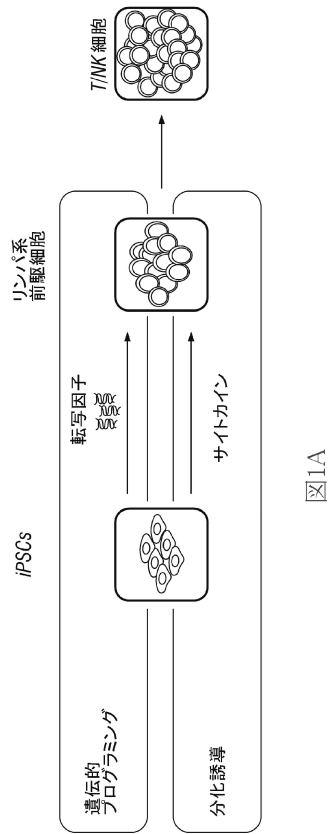
20

30

40

50

【図面】
【図 1 A】



【図 1 B】

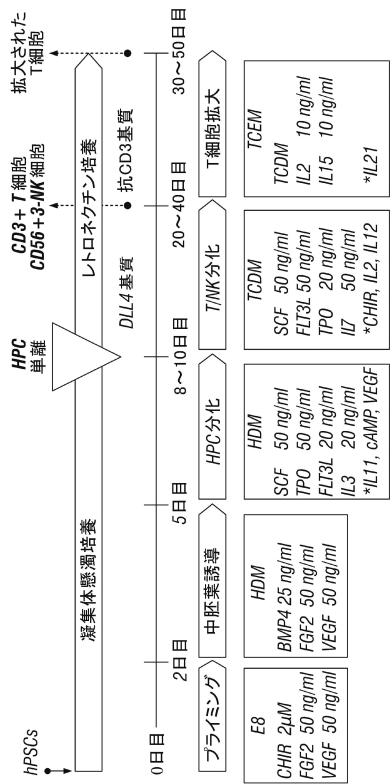


図1B

【図 1 C】

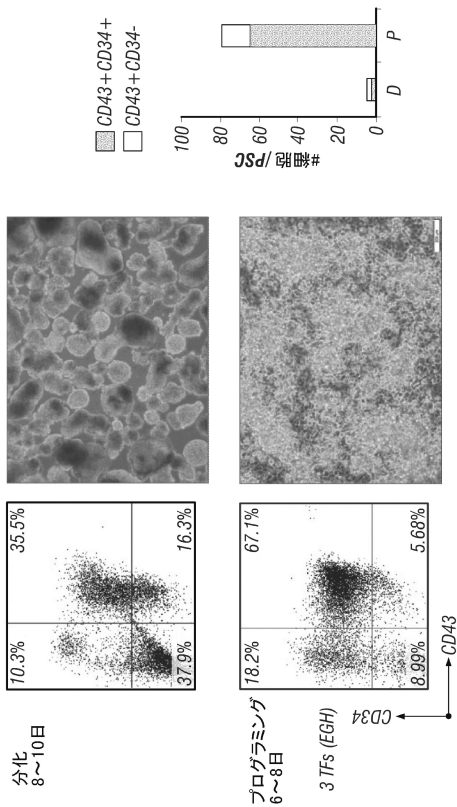


図1C

【図 1 D】

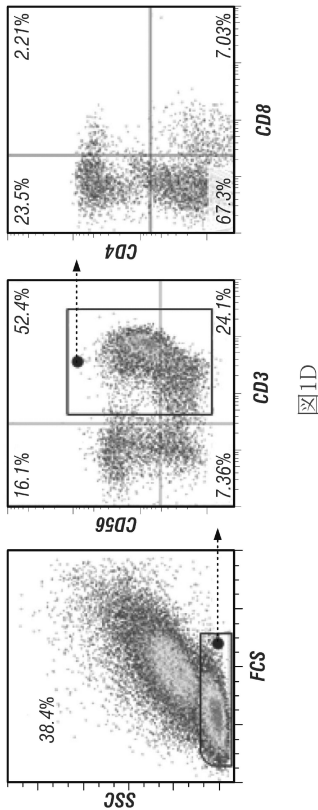
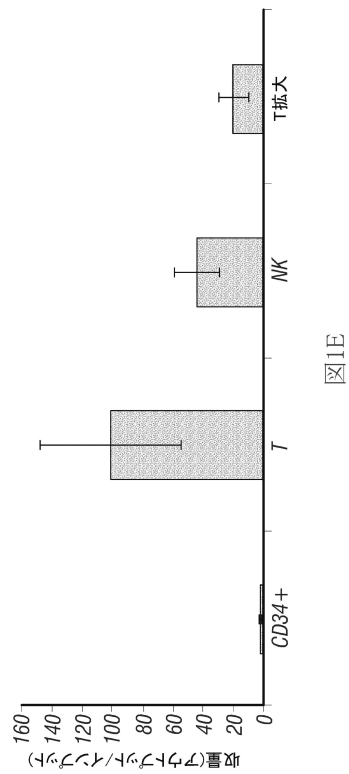
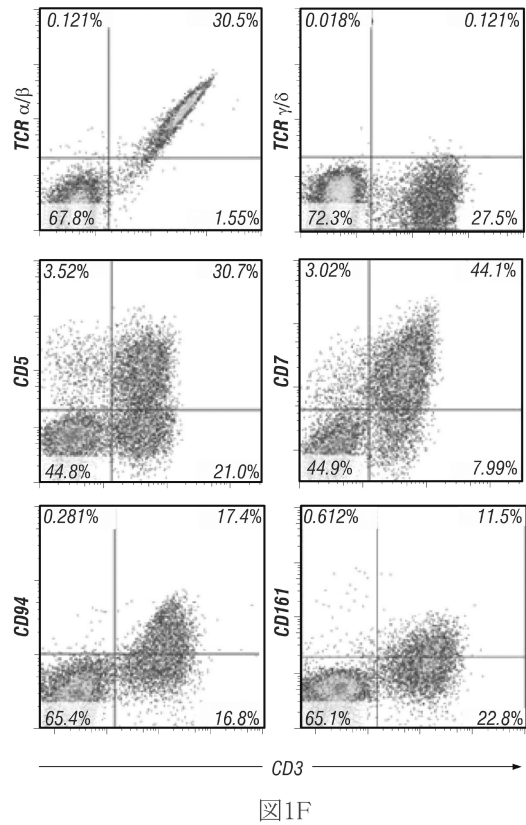


図1D

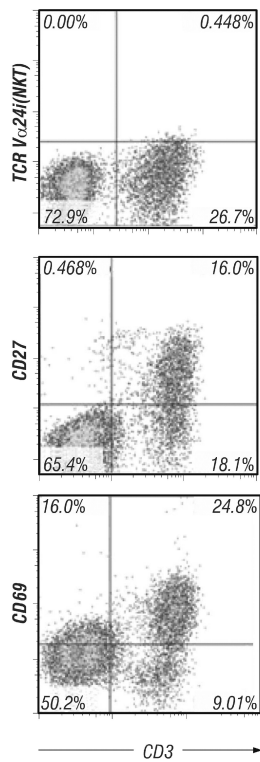
【図 1 E】



【図 1 F - 1】



【図 1 F - 2】



【図 1 G - 1】

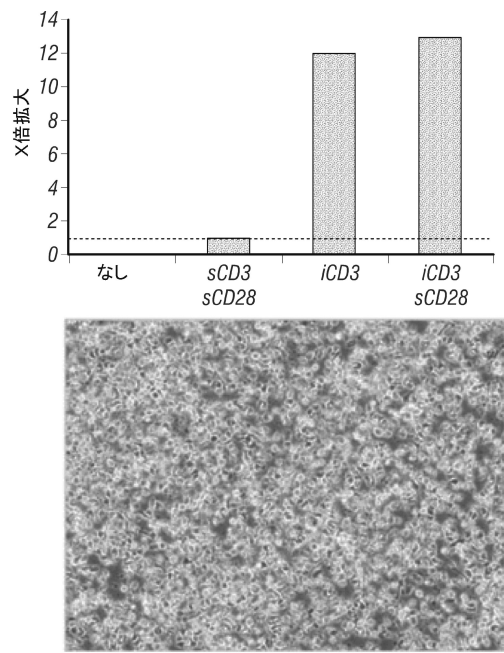


図1G

図1F-1

10

20

30

40

50

【図 1 G - 2】

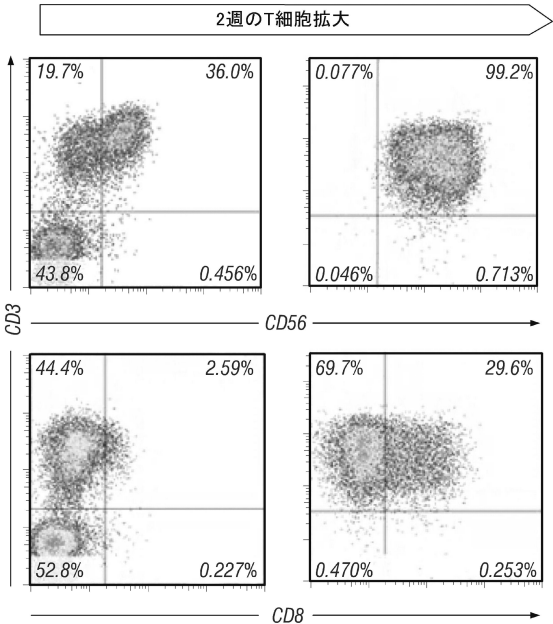


図1G-1

【図 2 - 1】

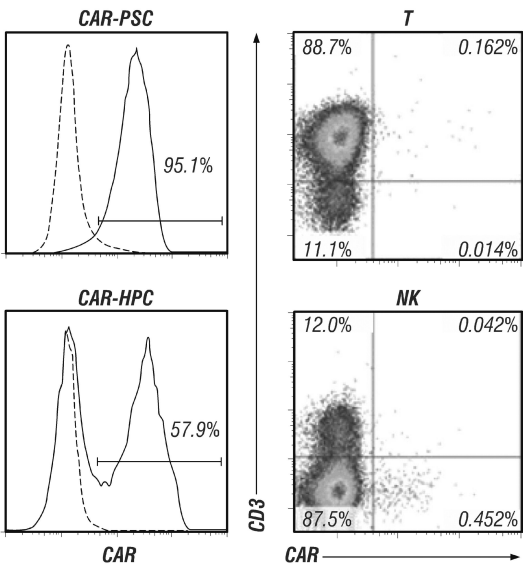


図2

【図 2 - 2】

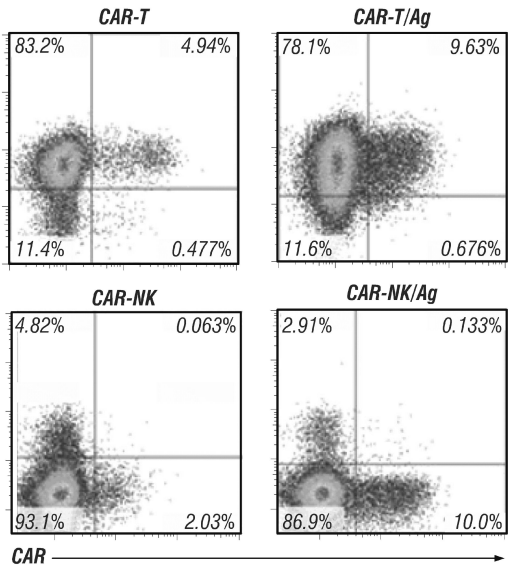


図2-1

【図 3 A - 3 B】

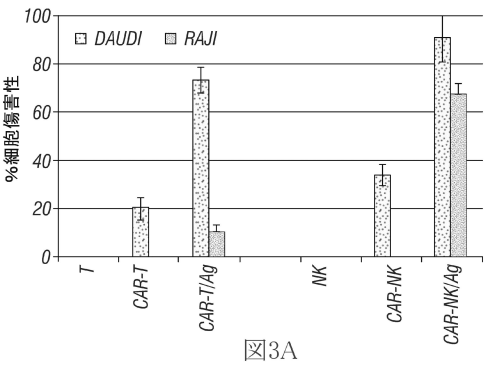


図3A

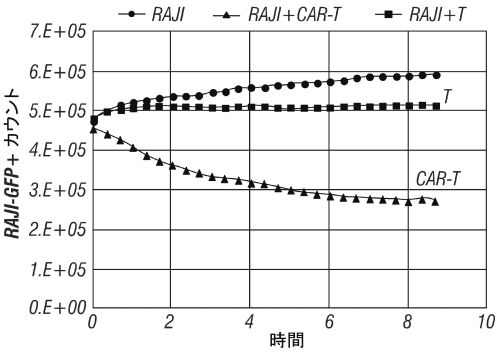
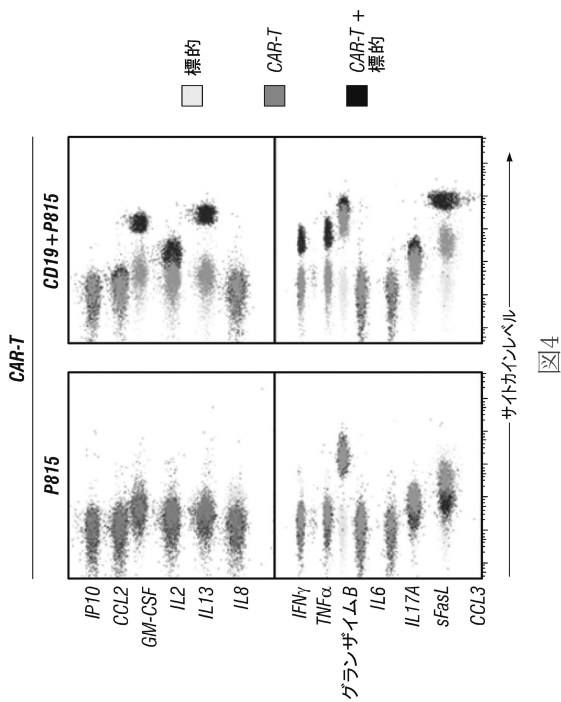
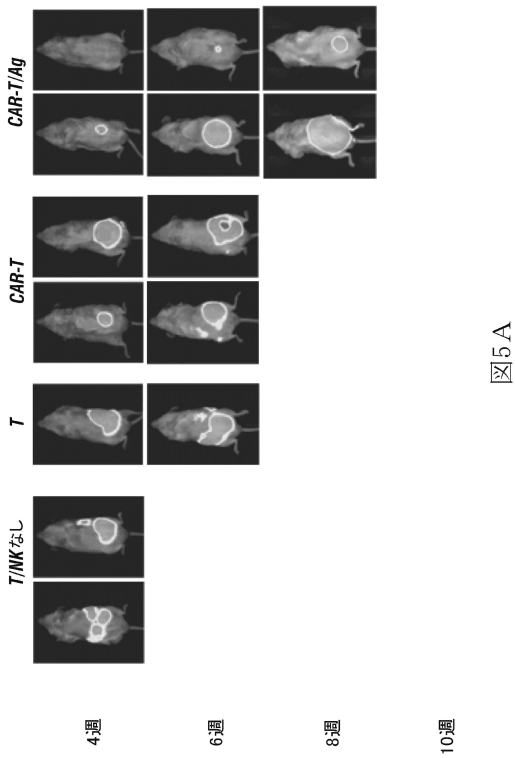


図3B

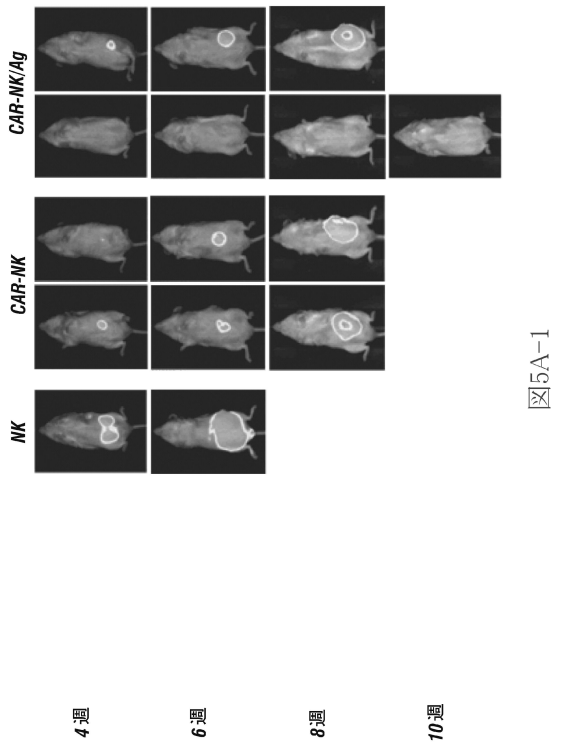
【図 4】



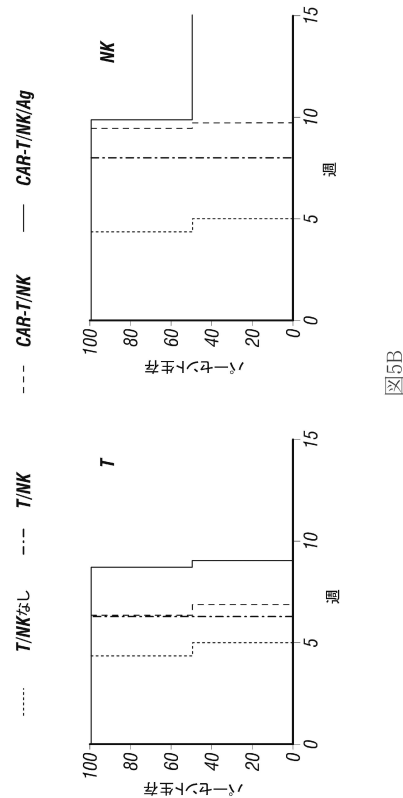
【図 5 A - 1】



【図 5 A - 2】



【図 5 B】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/13

(72)発明者 ツァン シン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 スイート
2 0 0 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ブランドル アンドリュウ ジェイ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 スイート
2 0 0 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ラジェシュ ディーピカ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 スイート
2 0 0 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 スワンソン ブラッドリー

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 スイート
2 0 0 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 マン クリスティー

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 スイート
2 0 0 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 バートン サラ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 スイート
2 0 0 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ワン ウェン ボ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 スイート
2 0 0 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 マクラウド イーサン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 5 3 7 1 1 マディソン サイエンス ドライブ 5 2 5 スイート
2 0 0 フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド内

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 1 6 5 7 0 7 (WO, A 2)

特表 2 0 1 3 - 5 3 2 4 9 2 (JP, A)

Themeli M. et al., Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy, Nat. Biotechnol., 2013年, Vol. 31(10), pp. 928-933

Themeli M. et al., New cell sources for T cell engineering and adoptive immunotherapy, Cell Stem Cell, 2015年, Vol. 16(4), pp. 357-366

Shin JW. et al., Contractile forces sustain and polarize hematopoiesis from stem and progenitor cells, Cell Stem Cell, 2014年, Vol. 14(1), pp. 81-93

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d