



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I886220 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：110107162

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 02 月 26 日

(51)Int. Cl.：

*C12N5/0783 (2010.01)**C12N5/0789 (2010.01)**C07K14/725 (2006.01)**A61P31/00 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**A61P37/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/02/28 美國

62/983,511

(71)申請人：美商千禧製藥公司 (美國) MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國(72)發明人：錢玉 QIAN, YU (CN)；張慧欣 CHANG, HUI-HSIN (CN)；石璽 SHI, XI (US)；
胡建新 HU, JIANXIN (CN)；曹瀾 CAO, LAN (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 108350429A

CN 109415699A

期刊 Zhu, Huang, and Dan S Kaufman. Engineered human pluripotent stem cell-derived natural killer cells: the next frontier for cancer immunotherapy. Blood science (Baltimore, Md.) vol. 1 17 Sep. 2019 4-11

期刊 Li, Ye et al. Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. Cell stem cell vol. 23 Cell Press 2018 181-192

期刊 Carlens, S et al. A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3-CD56+ natural killer cells. Human immunology vol. 62 2001 1092-8

審查人員：陳婷好

申請專利範圍項數：51 項 圖式數：3 共 91 頁

(54)名稱

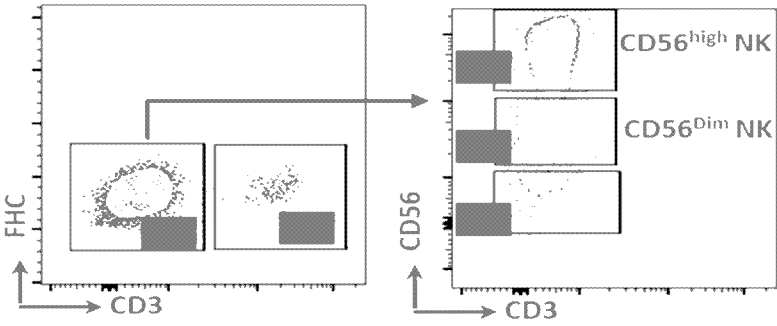
用於自富潛能幹細胞生產自然殺手細胞之方法

(57)摘要

本發明尤其提供一種自經誘導之富潛能細胞有效生產自然殺手細胞的方法。該方法包括以下步驟：(I)在培養基中培養富潛能幹細胞，以生產 CD56+/CD3-免疫細胞。

The present disclosure provides, among other things, a method for efficiently producing natural killer cells from induced pluripotent cells. The method includes the steps of: (I) culturing pluripotent stem cells in a culture medium to produce CD56+/CD3- immune cells.

指定代表圖：



【圖1】



I886220

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於自富潛能幹細胞生產自然殺手細胞之方法

【英文發明名稱】

METHOD FOR PRODUCING NATURAL KILLER CELLS FROM
PLURIPOTENT STEM CELLS

【中文】

本發明尤其提供一種自經誘導之富潛能細胞有效生產自然殺手細胞的方法。該方法包括以下步驟：(I)在培養基中培養富潛能幹細胞，以生產CD56+/CD3-免疫細胞。

【英文】

The present disclosure provides, among other things, a method for efficiently producing natural killer cells from induced pluripotent cells. The method includes the steps of: (I) culturing pluripotent stem cells in a culture medium to produce CD56+/CD3- immune cells.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於自富潛能幹細胞生產自然殺手細胞之方法

【英文發明名稱】

METHOD FOR PRODUCING NATURAL KILLER CELLS FROM
PLURIPOTENT STEM CELLS

【技術領域】

【0001】 本發明尤其提供一種自經誘導之富潛能細胞有效生產自然殺手細胞的方法。該方法包括以下步驟：(I)在培養基中培養富潛能幹細胞，以生產CD56+/CD3-免疫細胞。

【先前技術】

【0002】 自然殺手(NK)細胞為免疫系統之細胞毒性淋巴球。NK細胞對癌細胞、病原體感染之細胞及其他受損細胞具有細胞毒性。NK細胞為先天性淋巴細胞(ILC)，特定言之橋接免疫反應之先天性及適應性臂的大顆粒細胞毒性淋巴球。其構成周邊血液中循環淋巴球之10-15%。NK細胞在免疫系統內亦展現最高含量的細胞毒性活性。因此，經更改之NK細胞功能或數目影響免疫系統抵抗感染及癌症之功能。

【0003】 NK細胞缺乏特異性細胞表面抗原受體。由此，NK細胞可殺死癌細胞及病原體感染之細胞而無需預先敏感化，從而使得其成為先天性免疫反應之部分。其亦藉由直接影響適應性免疫反應而在腫瘤免疫監視中起作用。此等特徵及其他特徵使得NK細胞成為用於過繼細胞療法中之特別有吸引力的細胞類型。

【0004】 已描述自祖細胞獲得NK細胞之各種方案。然而，先前所

描述之方案為勞力密集的且需要多個耗時的步驟(包括細胞分離之步驟)，此反過來增加生產NK細胞之製造/生產時間及貨幣成本。

【發明內容】

【0005】 本申請案尤其提供生產CD56+/CD3-免疫細胞(亦即，NK或NK樣細胞)之經改良方法。本申請案至少部分地基於自衍生自富潛能幹細胞(例如，經誘導之富潛能幹細胞(iPSC))之成堆細胞群體有效且穩健的生產CD56+/CD3-免疫細胞而無需細胞分離步驟的出人意料的發現。在本申請案之前，用於誘導NK細胞之方法常常需要基於NK細胞之已知細胞譜系分離特定細胞類型。如本文中所描述，本申請案出乎意料地展示，NK細胞可成功地衍生自成堆細胞群體而無需基於譜系分離任何細胞類型。因此，相比於生產NK細胞之現有方法，此方法具有許多益處，包括例如以具有成本及時間效益之方式按比例增加及生產大量NK細胞的能力。因此，本發明代表細胞療法領域中之顯著突破。

【0006】 藉由本文所描述之方法生產的iPSC衍生之CD56+/CD3-細胞(在本文中亦稱為「iNK細胞」)為功能性的且可進一步經基因修飾，諸如經由將CAR引入至目標特異性細胞群體。

【0007】 在一些態樣中，提供一種生產富潛能幹細胞衍生之NK細胞的方法，其包含：(A)提供包含衍生自富潛能幹細胞之造血祖細胞(HPC) (HP細胞堆)的成堆細胞群體；(B)在一或多個培養基中培養HP細胞堆以生產CD56+/CD3-細胞，其中該方法不包括細胞分離步驟。

【0008】 在一些實施例中，該方法不在步驟(A)及(B)中包括細胞分離步驟。

【0009】 在一些實施例中，(A)中之HP細胞堆包含CD34+細胞。

【0010】 在一些實施例中，HP細胞堆中20%或更多之細胞為CD34+細胞。

【0011】 在一些實施例中，20%與90%之間的HP細胞堆為CD34+細胞。舉例而言，在一些實施例中，約30%之HP細胞堆為CD34+細胞。在一些實施例中，約40%之HP細胞堆為CD34+細胞。在一些實施例中，約50%之HP細胞堆為CD34+細胞。在一些實施例中，約60%之HP細胞堆為CD34+細胞。在一些實施例中，約70%之HP細胞堆為CD34+細胞。在一些實施例中，約80%之HP細胞堆為CD34+細胞。在一些實施例中，約90%之HP細胞堆為CD34+細胞。在一些實施例中，大於70%之HP細胞堆為CD34+細胞。

【0012】 在一些實施例中，步驟(B)包含：(i)在CD4/CD8誘導培養基中培養HP細胞堆以產生包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8-及CD4+/CD8+細胞之中間異質細胞群體；及(ii)在NK誘導培養基中培養中間異質細胞群體以生產CD56+/CD3-細胞。

【0013】 在一些實施例中，步驟(A)包含在HPC誘導培養基中培養富潛能幹細胞以生產HP細胞堆。

【0014】 在一些實施例中，富潛能幹細胞為經誘導之富潛能幹細胞(iPSC)。

【0015】 在一些實施例中，HPC誘導培養基包含至少一種選自以下的化合物或化合物之任何組合：骨形態發生蛋白-4 (BMP4)、血管內皮生長因子(VEGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、抗壞血酸、Flt3配體(Flt3L)、血小板生成素(TPO)及TGFβ抑制劑。

【0016】 在一些實施例中，HPC誘導培養基包含濃度在5 ng/mL至

500 ng/ml之間的BMP4。

【0017】 在一些實施例中，BMP4之濃度為50 ng/ml。

【0018】 在一些實施例中，HPC誘導培養基包含濃度在5 ng/ml至500 ng/ml之間的VEGF。

【0019】 在一些實施例中，VEGF之濃度為約50 ng/ml。

【0020】 在一些實施例中，HPC誘導培養基包含濃度在5 ng/ml至500 ng/ml之間的bFGF。

【0021】 在一些實施例中，bFGF之濃度為50 ng/ml。

【0022】 在一些實施例中，HPC誘導培養基包含濃度在5 µg/ml至500 µg/ml之間的抗壞血酸。

【0023】 在一些實施例中，抗壞血酸之濃度為50 µg/ml。

【0024】 在一些實施例中，HPC誘導培養基包含濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的Flt3L。

【0025】 在一些實施例中，Flt3L之濃度為50 ng/ml。

【0026】 在一些實施例中，HPC誘導培養基包含濃度在1 ng/ml至200 ng/ml之間的TPO。

【0027】 在一些實施例中，TPO之濃度為100 ng/ml。

【0028】 在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含至少一種選自由以下組成之群的化合物或化合物之任何組合：抗壞血酸、幹細胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、血小板生成素(TPO)、p38抑制劑及SDF-1。因此，在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含抗壞血酸。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含SCF。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含IL-7。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含Flt3L。在一

些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含TPO。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含p38抑制劑。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含SDF-1。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含p38抑制劑及SDF-1。

【0029】 在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含濃度在5 $\mu\text{g/ml}$ 至約500 $\mu\text{g/ml}$ 之間的抗壞血酸。

【0030】 在一些實施例中，抗壞血酸之濃度為50 $\mu\text{g/ml}$ 。

【0031】 在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含濃度在5 ng/ml 至100 ng/ml 之間的SCF。

【0032】 在一些實施例中，SCF之濃度為50 ng/ml 。

【0033】 在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含濃度在1 ng/ml 至100 ng/ml 之間的IL-7。

【0034】 在一些實施例中，IL-7之濃度為50 ng/ml 。

【0035】 在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含濃度在1 ng/ml 至100 ng/ml 之間的Flt3L。

【0036】 在一些實施例中，Flt3L之濃度為50 ng/ml 。

【0037】 在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含濃度在1 ng/ml 至200 ng/ml 之間的TPO。

【0038】 在一些實施例中，TPO之濃度為100 ng/ml 。

【0039】 在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含濃度在0.5 μM 至100 μM 之間的p38抑制劑。

【0040】 在一些實施例中，p38抑制劑為SB203580。在一些實施例中，p38抑制劑為BIRB 796。在一些實施例中，p38抑制劑為VX-702。在

一些實施例中，p38抑制劑為SB239063。在一些實施例中，p38抑制劑為SB202190。在一些實施例中，p38抑制劑為BMS 582949。

【0041】 在一些實施例中，SB203580之濃度為15 μ M。

【0042】 在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含濃度在10 ng/ml至約100 ng/ml之間的SDF-1抑制劑。

【0043】 在一些實施例中，SDF-1抑制劑之濃度為30 nM。

【0044】 在一些實施例中，SDF-1抑制劑之濃度為30 nM且p38抑制劑(例如，SB203580)之濃度為15 μ M。

【0045】 在一些實施例中，NK誘導培養基包含至少一種選自由以下組成之群的化合物：CD3活化劑、IL-2及IL7。因此，在一些實施例中，NK誘導培養基包含CD3活化劑。在一些實施例中，NK誘導培養基包含IL-2。在一些實施例中，NK誘導培養基包含IL-7。

【0046】 在一些實施例中，NK誘導培養基包含濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的IL-2。

【0047】 在一些實施例中，IL-2之濃度為10 ng/ml。

【0048】 在一些實施例中，NK誘導培養基包含濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的IL-7。

【0049】 在一些實施例中，IL-7之濃度為10 ng/ml。

【0050】 在一些實施例中，各培養步驟在約5%氧氣下執行。

【0051】 在一些實施例中，各培養步驟在大於14%的氧氣下執行。

【0052】 在一些實施例中，各培養步驟在大氣氧氣下執行。

【0053】 在一些實施例中，各培養步驟在小於5%的氧氣下執行。

【0054】 在一些實施例中，在成堆細胞培養基中培養富潛能幹細胞

以獲得HP細胞堆持續大於10天。

【0055】 在一些實施例中，在成堆細胞培養基中培養富潛能幹細胞以獲得HP細胞堆持續11天與15天之間。

【0056】 在一些實施例中，在成堆細胞培養基中培養富潛能幹細胞以獲得HP細胞堆持續14天。

【0057】 在一些實施例中，iPSC係獲自周邊血液單核細胞。

【0058】 在一些實施例中，至少約50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟，例如無需分選/分離/純化CD56+/CD3-細胞之其他步驟。因此，在一些實施例中，至少約50%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。在一些實施例中，至少約55%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。在一些實施例中，至少約60%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。在一些實施例中，至少約65%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。在一些實施例中，至少約70%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。在一些實施例中，至少約75%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。在一些實施例中，至少約80%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。在一些實施例中，至少約85%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。在一些實施例中，至少約90%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。在一些實施例中，至少約95%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。在一些實施例中，至少約97%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步

驟。

【0059】 在一些實施例中，小於約25%、20%、15%、10%或5%之所生產細胞為CD3+細胞。

【0060】 在一些實施例中，可藉由此項技術中之各種方法來確定所生產細胞之表型。舉例而言，可藉由流式細胞量測術或單細胞RNA定序(scRNAseq)來確定所生產細胞之表型。

【0061】 在一些實施例中，藉由流式細胞量測術來測定所生產細胞之百分比。在一些實施例中，藉由scRNAseq來測定所生產細胞之百分比。

【0062】 在一些實施例中，方法進一步包含分離CD56+/CD3-細胞之步驟。

【0063】 在一些實施例中，藉由螢光活化細胞分選(FACS)或磁性分選來分離CD56+/CD3-細胞。因此，在一些實施例中，藉由FACS來分離細胞。在一些實施例中，藉由磁性分選(MACS)來分離細胞。

【0064】 在一些實施例中，CD56+/CD3-免疫細胞為NK細胞。

【0065】 在一些實施例中，CD56+/CD3-細胞經基因修飾以表現一或多個嵌合抗原受體(CAR)。

【0066】 在一些實施例中，經分離CD56+/CD3-細胞經基因修飾以表現一或多個嵌合抗原受體(CAR)。

【0067】 在一些實施例中，抗原為CD19。

【0068】 在一些實施例中，細胞進一步經基因修飾以表現IL-15R α /IL-15複合物。

【0069】 在一些態樣中，提供一種生產經誘導之富潛能幹細胞

(iPSC)衍生之CD56+/CD3-免疫細胞的方法，其包含以下步驟：(1)在包含至少一種選自血管內皮生長因子(VEGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)及抗壞血酸之化合物的HPC誘導培養基中培養iPSC，以獲得包含造血祖細胞(HPC) (HP細胞堆)之異質細胞群體；(2)在包含抗壞血酸、p38抑制劑及SDF-1中之一或多者的CD4/CD8誘導培養基中培養(1)中獲得之HP細胞堆以獲得中間異質細胞群體；及(3)在包含至少一種選自由CD3活化劑、IL-2及IL-7組成之群之化合物的NK誘導培養基中培養來自(2)之中間異質細胞群體。

【0070】 在一些態樣中，提供一種NK細胞群體，該群體使用本文所描述之方法生產。

【0071】 在一些態樣中，提供一種未分選細胞群體，該群體包含富潛能幹細胞衍生之CD56+/CD3-細胞，其在總富潛能幹細胞衍生之CD56+免疫細胞中之占比不低於60%。

【0072】 在一些實施例中，小於25%之細胞為CD3+細胞。

【0073】 在一些實施例中，小於5%之細胞為單核球。

【0074】 在一些實施例中，小於5%之細胞為B細胞。

【0075】 在一些態樣中，提供一種治療需要細胞療法之個體的方法，該方法包含向個體投與本文所描述之NK細胞。

【0076】 在一些實施例中，個體患有癌症。

【0077】 在一些實施例中，癌症為白血病或淋巴瘤。

【0078】 在一些態樣中，提供一種生產富潛能幹細胞衍生之CD56+/CD3-免疫細胞的方法，該方法包含以下步驟：(I)在一或多個培養基中培養富潛能幹細胞以生產CD56+/CD3-免疫細胞。

【0079】 在一些實施例中，步驟(I)包含：(A)在培養基中培養富潛能幹細胞以生產造血祖細胞(HPC) (HP細胞堆)；及(B)在培養基中培養步驟(A)中獲得之細胞以生產CD56+/CD3-免疫細胞。

【0080】 在一些實施例中，步驟(B)包含：(a)在培養基中培養步驟(A)中獲得之細胞以生產包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體；及(b)在培養基中培養步驟(a)中獲得之細胞以生產CD56+/CD3-免疫細胞。

【0081】 在一些實施例中，前述步驟中之任一者不包含對包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體執行分離步驟。

【0082】 在一些實施例中，富潛能幹細胞為誘導富潛能幹細胞(iPSC)。

【0083】 在一些態樣中，提供一種生產CD56+/CD3-免疫細胞之方法，該方法包含以下步驟：(II)在培養基中培養包含造血祖細胞(HPC) (HP細胞堆)之細胞以生產CD56+/CD3-免疫細胞。

【0084】 在一些實施例中，步驟(II)包含：(X)在培養基中培養包含造血祖細胞(HPC)之細胞以生產CD4/CD8雙陽性細胞；及(Y)在培養基中培養步驟(X)中獲得之細胞以生產CD56+/CD3-免疫細胞。

【0085】 在一些實施例中，步驟(II)不包含對CD4/CD8雙陽性細胞執行分離步驟。

【0086】 在一些實施例中，步驟(A)包含培養基，該培養基具有選自以下各者之至少一種化合物：骨形態發生蛋白-4(BMP4)、血管內皮生長因子(VEGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、抗壞血酸、Flt3配體(Flt3L)、血小板生成素(TPO)及TGFβ抑制劑。

【0087】 在一些實施例中，步驟(a)或步驟(X)包含培養基，該培養

基具有選自由以下各者組成之群的至少一種化合物：抗壞血酸、幹細胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、血小板生成素(TPO)、p38抑制劑及SDF-1。

【0088】 在一些實施例中，步驟(b)或步驟(Y)包含培養基，該培養基具有選自由CD3活化劑、IL-2及IL7組成之群的至少一種化合物。

【0089】 在一些實施例中，方法進一步包含在包含IL-7及/或IL-15之培養基中培養在步驟(b)或步驟(Y)之後生產的細胞。

【0090】 在一些實施例中，培養在約5%之氧氣下執行。在一些實施例中，步驟(A)持續約10天。在另一實施例中，步驟(A)持續約10-18天。

【0091】 在一些實施例中，iPSC由周邊血液單核細胞生產。

【0092】 在一些實施例中，至少約50%、55%、60%、75%、80%、85%或90%之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞。

【0093】 在一些實施例中，小於約25%之所生產細胞中為CD3+細胞。

【0094】 在一些實施例中，方法進一步包含分離CD56+/CD3-細胞之步驟。

【0095】 在一些實施例中，藉由螢光活化細胞分選(FACS)來分離CD56+/CD3-細胞。

【0096】 在一些實施例中，CD56+免疫細胞為CD56+/CD3-。

【0097】 在一些實施例中，任何富潛能、多潛能或患者衍生之HPC可與本文所描述之方法一起使用。舉例而言，在一些實施例中，細胞為胚胎幹細胞。在一些實施例中，細胞為成體幹細胞。各種成體幹細胞為此項技術中已知的，且包括例如間葉幹細胞、造血幹細胞、臍帶衍生之細胞、骨髓幹細胞、脂肪幹細胞及其類似者。在一些實施例中，細胞為經誘導之

富潛能幹細胞(iPSC)。因此，根據本文所描述之方法生產的NK細胞可由任何富潛能、多潛能或患者衍生之HPC (諸如直接來源於供體之原代HPC) 製得。

【0098】 在一些實施例中，在細胞分化之任何階段對本文所描述之用於生產NK細胞的細胞進行基因修飾。在一些實施例中，在富潛能、多潛能或單潛能階段對本文所描述之用於生產NK細胞的細胞進行基因修飾。舉例而言，在一些實施例中，在富潛能階段對本文所描述之用於生產NK細胞的細胞進行基因修飾。舉例而言，可在胚胎幹細胞階段或iPSC幹細胞階段對細胞進行基因修飾。在一些實施例中，在多潛能階段對本文所描述之用於生產NK細胞的細胞進行基因修飾。舉例而言，可在HSC階段對細胞進行基因修飾。

【0099】 在一些實施例中，其中細胞經基因修飾以表現一或多個嵌合抗原受體(CAR)。

【0100】 在一些實施例中，經分離CD56+/CD3-細胞經基因修飾以表現一或多個嵌合抗原受體(CAR)。

【0101】 在一些實施例中，抗原為CD19。

【0102】 在一些實施例中，細胞進一步經基因修飾以表現IL-15R α /IL-15複合物。

【0103】 在一些態樣中，提供一種未分選細胞群體，該細胞群體包含富潛能幹細胞衍生之CD56+/CD3-細胞，其在總富潛能幹細胞衍生之CD56+免疫細胞中之占比不低於60%。

【0104】 在一些實施例中，小於25%之細胞為CD3+細胞。

【0105】 在一些實施例中，小於5%之細胞為單核球。

【0106】 在一些實施例中，小於5%之細胞為B細胞。

【0107】 在一些態樣中，提供一種治療需要細胞療法之個體的方法，該方法包含向個體投與前述技術方案中任一項的富潛能幹細胞衍生之CD56+/CD3-免疫細胞。

【0108】 在一些實施例中，個體患有癌症。

【0109】 在一些實施例中，癌症為白血病或淋巴瘤。

【0110】 各種培養基用於本文所描述之方法中，包括例如HPC誘導培養基、CD4/CD8誘導培養基及NK誘導培養基。

【0111】 在一些態樣中，將經誘導之富潛能細胞(iPSC)在HPC誘導培養基中培養一段時間以產生包含造血祖細胞之細胞群體，此細胞群體在本文中稱為HP細胞堆。在一些實施例中，此時間期在約10天與14天之間。在一些實施例中，此時間期持續約13天。在一些實施例中，HPC誘導培養基包含BMP4、VEGF、bFGF、抗壞血酸、TGFβ抑制劑、幹細胞因子(SCF)、血小板生成素TPO及Flt3L中之一或多者。在一些實施例中，自第1天至約第10天在包含VEGF、bFGF、抗壞血酸之HPC誘導培養基中培養iPSC。在一些實施例中，VEGF之濃度為約50 ng/mL。在一些實施例中，bFGF之濃度為約50 ng/mL。在一些實施例中，抗壞血酸之濃度為約50 μg/mL。在一些實施例中，自第1天至約第3天在包含BMP4之HPC誘導培養基中培養iPSC。在一些實施例中，BMP4之濃度為約50 ng/mL。在一些實施例中，自約第2天至約第3天，用濃度為約6 μM之TGFβ抑制劑(諸如SB431542)培養iPSC。在一些實施例中，在培養之第7天至第13天之間，向培養物中添加幹細胞因子(SCF)、血小板生成素TPO及Flt3L中之一或多者。在一些實施例中，以約50 ng/mL之濃度添加SCF。在一些實施例

中，以約30 ng/mL之濃度添加TPO。在一些實施例中，以約10 ng/mL之濃度添加Flt3L。

【0112】 在一些態樣中，將HP細胞堆群體在CD4/CD8誘導培養基中培養一段時間以產生包含中間異質細胞群體之細胞群體，該中間異質細胞群體包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8-及CD4+/CD8+細胞。在一些實施例中，將HP細胞堆群體在CD4/CD8誘導培養基中培養19-22天。在一些實施例中，將HP細胞堆群體在CD4/CD8誘導培養基中培養約21天。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含抗壞血酸、SCF、TPO、Flt3L、IL7、p38MAPKi抑制劑(諸如SB203580)、SDF1a中之一或多者。在一些實施例中，抗壞血酸之濃度為約50 µg。在一些實施例中，SCF之濃度為50 ng/mL。在一些實施例中，TPO之濃度為約100 ng/mL。在一些實施例中，Flt3L之濃度為約50 ng/mL。在一些實施例中，IL7之濃度為約50 ng/mL。在一些實施例中，SB203580之濃度為約15 µM。在一些實施例中，SDF1a之濃度為約30 nM。在一些實施例中，在塗覆有hDLL4/重組人纖維蛋白片段(RetroNectin)之培養皿上培養HP細胞堆。

【0113】 在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含至少一種選自由以下組成之群的化合物：抗壞血酸、幹細胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、血小板生成素(TPO)、p38抑制劑及SDF-1。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含p38抑制劑。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含SDF-1。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含p38抑制劑及SDF-1。

【0114】 在一些態樣中，將包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細

胞、CD4+/CD8-及CD4+/CD8+細胞之異質細胞群體在NK誘導培養基中培養一段時間以產生包含CD56+/CD3- NK細胞之細胞群體。在一些實施例中，將異質細胞群體在NK誘導培養基中培養約5-9天。在一些實施例中，將細胞群體培養約7天。在一些實施例中，NK細胞誘導培養基包含IL-7、IL-2及抗CD3抗體中之一或多者。在一些實施例中，將異質細胞群體在包含IL-7及IL-2之NK細胞誘導培養基中培養約7天。在一些實施例中，IL-7之濃度為約10 ng/mL。在一些實施例中，IL-2之濃度為約10 ng/mL。在一些實施例中，將異質群體在包含抗CD3之NK細胞誘導培養基中培養約3天。在一些實施例中，此方法產生大於50%、60%、70%、80%、90%或95%之CD56+/CD3-細胞。因此，在一些實施例中，此方法產生大於50%之CD56+/CD3-細胞。在一些實施例中，此方法產生大於60%之CD56+/CD3-細胞。在一些實施例中，此方法產生大於70%之CD56+/CD3-細胞。在一些實施例中，此方法產生大於80%之CD56+/CD3-細胞。在一些實施例中，此方法產生大於90%之CD56+/CD3-細胞。在一些實施例中，此方法產生大於95%之CD56+/CD3-細胞。

【圖式簡單說明】

【0115】 圖1為展示使用本文所描述之方法獲得的NK細胞堆群體之流式細胞量測術分析之結果的一系列流式細胞量測術圖。簡言之，如本文所描述培養iPS細胞，而無需中間物分離步驟。流式細胞量測術圖展示作為CD56^{high}之CD3陰性細胞群體(NK細胞堆群體之大致63.5%)及作為CD56^{dim}之CD3陰性細胞群體(NK細胞堆群體之大致26.7%)的存在。此等群體均為NK細胞。因此，所獲得之總CD56陽性NK細胞群體、CD3陰性

NK細胞群體大於總細胞群體之90%。

【0116】圖2展示使用本文所描述之方法獲得的NK細胞堆群體之scRNA分析之結果。簡言之，如本文所描述培養iPS細胞，而無需中間物分離步驟。將細胞分為四個細胞群體：單核球、B細胞、NK細胞及T細胞。NK細胞堆群體中大致75%之細胞經鑑別為NK細胞(CD56+/CD3-細胞)，而成堆細胞群體中大致25%之細胞經鑑別為T細胞。本文所描述之T細胞可包括NKT細胞(CD56+/CD3+細胞)。

【0117】圖3描繪展示在投與表現螢光素酶之Nalm6細胞，隨後投與iNK-CAR19細胞之NSG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ 剔除型)小鼠中之抗腫瘤活性分析之結果的一系列像片。用(a) PBS緩衝液，(b) iNK-CAR細胞治療Nalm6細胞移植之NSG小鼠，且觀測此等治療之抗腫瘤功效。資料展示iNK-CAR細胞減少Nalm6細胞之增殖。

【實施方式】

相關申請案

【0118】本申請案主張2021年2月28日申請之美國臨時申請案第62/983,511號的優先權，該申請案之揭示內容以引用之方式併入本文中。

定義

【0119】投與：如本文所使用，術語「投與(administer/administering/administration)」、「引入(introducing/introduction)」在藉由使得遞送此類細胞之方法或途徑將治療性細胞(例如，iPSC或HPC衍生之CD56+/CD3-免疫細胞)遞送至個體中之情形下可互換使用。此項技術中已知用於投與細胞之各種方法，包括例如經靜脈內、體表、經口、肌內、腹膜內、鞘內、皮下或經皮。細胞可與

載劑或不與載劑一起投與。

【0120】 *過繼細胞療法*：如本文中可互換地使用，術語「過繼細胞療法」或「過繼細胞轉移」或「細胞療法」或「ACT」係指細胞(例如，使用本文所描述之方法產生且投與至需要其之個體或患者中的CD56/CD3-細胞群體)之轉移。在一些實施例中，細胞為使用本文所描述之方法製得且另外表現CAR的CD56+/CD3-免疫細胞。

【0121】 *動物*：如本文所使用，術語「動物」係指動物界之任何成員。在一些實施例中，「動物」係指處於任何發育階段之人類。在一些實施例中，「動物」係指處於任何發育階段之非人類動物。在某些實施例中，非人類動物為哺乳動物(例如，啮齒動物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、貓、綿羊、牛、靈長類動物及/或豬)。在一些實施例中，動物包括(但不限於)哺乳動物、鳥類、爬行動物、兩棲動物、魚類、昆蟲及/或蠕蟲。在一些實施例中，動物可為基因轉殖動物、基因工程改造動物及/或純系。

【0122】 *抗原特異性靶向域*：「抗原特異性靶向域」為CAR提供與相關目標抗原結合的能力。在一些實施例中，抗原特異性靶向域靶向臨床相關抗原，期望針對該臨床相關抗原觸發引起腫瘤殺滅之效應子免疫反應。抗原特異性靶向域可為具有特異性識別及結合於生物分子(例如，細胞表面受體或腫瘤蛋白，或其組分)之能力的任何蛋白質或肽。抗原特異性靶向域包括相關生物分子的任何天然存在、合成、半合成或以重組方式生產之結合搭配物。

【0123】 說明性抗原特異性靶向域包括例如抗體或抗體片段或衍生物、受體之胞外域、細胞表面分子/受體之配體或其受體結合域及腫瘤結

合蛋白。

【0124】 在一些實施例中，抗原特異性靶向域為抗體或衍生自抗體。抗體衍生之靶向域可為抗體之片段或抗體之一或多個片段之基因工程改造產物，該片段參與與抗原結合。實例包括可變區(Fv)、互補決定區(CDR)、Fab、單鏈抗體(scFv)、重鏈可變區(VH)、輕鏈可變區(VL)及駱駝抗體(VHH)。

【0125】 在一些實施例中，結合域為單鏈抗體(scFv)。scFv可為鼠類、人類或人源化scFv。

【0126】 *同種異體*：如本文所使用之「同種異體」係指來源於與引入物質之個體相同的物種之不同動物的任何物質。當一或多個基因座處之基因不相同時，據稱兩個或更多個個體為彼此同種異體。在一些態樣中，來自相同物種之個體的同種異體物質在基因上可足夠不同，從而以抗原方式相互作用。

【0127】 *大致或約*：如本文所使用，如應用於相關之一或多個值之術語「大致」或「約」係指類似於所陳述參考值之值。在某些實施例中，除非另有說明或另外自上下文顯而易見，否則術語「大致」或「約」係指在所陳述參考值之任一方向(大於或小於)處於25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小百分比內的一系列值(此類數字超出可能值之100%的情況除外)。應理解，當術語「約」或「大致」用於修改所陳述參考值時，所陳述參考值本身連同在所陳述參考值之任一側上接近所陳述參考值的值一起涵蓋。

【0128】 *抗壞血酸或維生素C*：如本文所使用，「抗壞血酸」或「維

生素C」意謂L-抗壞血酸及其衍生物，且「L-抗壞血酸衍生物」意謂在活體內藉由酶促反應變成維生素C的衍生物。L-抗壞血酸之衍生物之實例包括維生素C磷酸鹽、抗壞血酸葡萄糖苷、抗壞血酸乙基、維生素C酯、四己基癸酸抗壞血酸酯(ascorbyl tetrahexyldecanoate)、硬脂酸抗壞血酸酯(ascorbyl stearate)及6-棕櫚酸抗壞血酸2-磷酸鹽(ascorbyl 2-phosphate 6-palmitate)。維生素C磷酸鹽之實例包括L-抗壞血酸磷酸鹽之鹽，諸如L-抗壞血酸磷酸鈉及L-抗壞血酸磷酸鎂。在一個實施例中，維生素C可為抗壞血酸2-磷酸鹽。

【0129】 *成堆細胞群體*：術語「成堆細胞群體」、「成堆細胞」及其類似物係指異質細胞群體。在一些實施例中，成堆細胞群體包含造血細胞。在一些實施例中，成堆細胞群體可獲自富潛能細胞(例如，經誘導之富潛能幹細胞)。在一些實施例中，成堆細胞群體獲自供體組織(包括例如血液)。

【0130】 *CD4/CD8誘導培養基*：如本文所使用之術語CD4/CD8誘導培養基係指用於獲得包含CD4-/CD8-細胞、CD4+/CD8+細胞、CD4+/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞之細胞群體的細胞培養基。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基用於將HP細胞堆分化成包含CD4-/CD8-細胞、CD4+/CD8+細胞、CD4+/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞之細胞群體。在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基包含抗壞血酸、SCF、TPO、Flt3L、IL7、p38MAPKi抑制劑(諸如SB203580)及SDF1a中之一或多者或全部。

【0131】 *嵌合抗原受體(CAR)*：如本文所使用，術語「嵌合抗原受體」或「CAR」係指能夠賦予細胞(例如，NK細胞、T細胞(諸如初始T細胞

胞)、中樞記憶T細胞、效應記憶T細胞或其組合)抗原特異性的經工程改造之受體。CAR亦稱為人工T細胞受體、嵌合T細胞受體或嵌合免疫受體。在一些實施例中，本發明之CAR包含抗原特異性靶向域、胞外域、跨膜域、視情況存在之一或多個共刺激域及胞內傳訊域。在本文所描述之一些實施例中，將CAR引入至使用本文所描述之方法製得之CD56+/CD3-免疫細胞(例如，NK或NK樣細胞)中，使得重定向對所需細胞表面抗原或MHC-肽複合物之特異性。此等合成受體通常含有經由單個融合分子中之可撓性連接子與一或多個傳訊域相關的目標結合域。目標結合域用於將免疫細胞(例如，CD56+/CD3+免疫細胞)導引至病理性細胞(例如，癌細胞)之表面上的特定目標，且傳訊域含有用於免疫細胞(例如，CD56+/CD3-免疫細胞)活化及增殖之分子機制。通常穿過免疫細胞(例如，CD56+/CD3-細胞)膜之可撓性連接子(亦即，形成跨膜域)允許CAR之目標結合域之細胞膜呈現。CAR已成功地使免疫細胞針對在來自各種惡性病(包括淋巴瘤及實體腫瘤)的腫瘤細胞之表面處表現的抗原進行重定向(Gross等人, (1989) Transplant Proc., 21(1 Pt 1): 127-30; Jena等人, (2010) Blood, 116(7):1035-44)。CAR之胞外結合域可由衍生自鼠類或人源化單株抗體之可變重鏈及輕鏈區融合的單鏈可變片段(scFv)構成。在一些實施例中，胞外結合域包含單域抗體。替代地，可使用衍生自Fab之scFv (而非衍生自例如獲自Fab文庫之抗體)。在各種實施例中，此scFv與跨膜域融合且接著與胞內傳訊域融合。已研發出至少三代CAR。第一代CAR包含附著至衍生自CD3 ζ 或Fc受體 γ 鏈之細胞質區之傳訊域的目標結合域。已展示第一代CAR成功地將免疫細胞重定向至選定目標，但其未能在活體內提供延長的擴增及抗腫瘤活性。第二代及第三代CAR致力於藉由包

括共刺激分子(諸如CD28、OX-40 (CD134)及4-1BB (CD137))來增強經修飾細胞存活率及增加增殖。

【0132】 培養：術語「培養(culture)」或「細胞培養」或「培養(culturing)」係指細胞在活體外環境中之維持、生長及/或分化。在本文所描述之各種方法中，細胞在有助於或促進一種類型之細胞生長或分化為不同類型之細胞的特定細胞培養基(medium) (或在複數情況下為「培養基(media)」)中培養。舉例而言，在本文所描述之某些實施例中，在細胞培養基中培養iPSC使得總細胞群體中至少20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%之細胞變成CD34+細胞(亦即，HPC)。在本文所描述之一些實施例中，培養含有至少20%、30%、40%、50%、60%、70%或80% HPC之細胞群體產生包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8-及CD4+/CD8+細胞的細胞群體。在又其他實施例中，培養含有CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8-及CD4+/CD8+細胞之細胞的細胞群體產生富集的CD56+/CD3-細胞群體(亦即，總細胞群體中至少50%之細胞為CD56+/CD3-)。細胞培養基充當營養物質、激素及/或有助於細胞繁殖及/或維持之其他因子的來源。

【0133】 分化：術語「分化」、「誘導」、「轉化」、「衍生」及類似者係指其中一種表型之細胞經歷變為另一種表型之細胞的過程。

【0134】 工程改造：如本文所使用，術語「工程改造」描述多核苷酸、多肽或已經設計或修飾及/或其存在及生產需要干預及/或活性之細胞。舉例而言，一經工程之改造細胞，其經精心設計以誘發特定效果，且與相同類型之天然存在之細胞之效果不同。在一些實施例中，經工程改造之細胞為使用本文所描述之方法衍生自iPSC或HPC之CD56+/CD3-細胞，

且進一步表現嵌合抗原受體。

【0135】 **富集**：如本文所使用，關於特定細胞類型之術語「富集」意謂如藉由流式細胞量測術或其他分析方法所測定，在細胞群體內具有至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%之特定細胞類型的細胞群體。

【0136】 **離體**：如本文所使用，術語「離體」意謂細胞自活生物體中移除且在生物體外(例如，在試管中、在培養袋中、在生物反應器中)繁殖的過程。

【0137】 **功能等效物或衍生物**：如本文所使用，術語「功能等效物」或「功能衍生物」在胺基酸序列之功能衍生物之情形下指示保持與原始序列之生物活性實質上類似之生物活性(功能或結構)的分子。功能衍生物或等效物可為天然衍生物或以合成方式製備。例示性功能衍生物包括具有一或多個胺基酸之取代、缺失或添加之胺基酸序列，其限制條件為蛋白質之生物活性係保守的。取代胺基酸合乎需要地具有與經取代胺基酸之化學-物理特性類似的化學-物理特性。所需類似化學-物理特性包括電荷類似性、膨鬆度、疏水性、親水性及其類似特性。

【0138】 **造血祖細胞**：術語「造血祖細胞(hematopoietic progenitor cell)」或「造血祖細胞(hematopoietic progenitor cells)」或「HPC」或「HPCs」係指致力於造血譜系但能夠進一步造血分化且包括造血幹細胞、多潛能造血幹細胞、常見骨髓祖細胞、巨核細胞祖細胞、紅血球祖細胞及淋巴祖細胞的CD34⁺細胞。

【0139】 **HPC堆**：術語「HPC堆」、「造血祖細胞堆」或「HP細胞堆」意謂包含造血祖細胞之異質細胞群體。在一些實施例中，HPC堆衍生

自iPSC。在一些實施例中，HPC堆衍生自血液。

【0140】 *HPC衍生之NK細胞*：術語「HPC衍生之NK細胞」意謂在細胞培養基中培養之後自HPC堆群體獲得的CD56+/CD3-免疫細胞(例如，NK或NK樣細胞)。

【0141】 *HPC誘導培養基*：如本文所使用之術語HPC誘導培養基係指用於自起始細胞群體產生包含造血細胞之細胞群體的培養基。在一些實施例中，起始細胞群體為iPSC。在一些實施例中，HPC誘導培養基包含BMP4、VEGF、bFGF、抗壞血酸、TGFβ抑制劑、幹細胞因子(SCF)、血小板生成素TPO及Flt3L中之一或多者。

【0142】 *免疫細胞*：如本文所使用，術語「免疫細胞(immune cell)」或「免疫細胞(immune cells)」係指免疫系統之細胞，包括(但不限於) T細胞、NK細胞、T/NK細胞、樹突狀細胞、巨噬細胞、B細胞、嗜中性白血球、紅血球、單核球、嗜鹼性球、肥大細胞、嗜酸性白細胞及其任何組合。在各種實施例中，使用本文所描述之方法生產的免疫細胞為NK細胞，其表徵為CD56+/CD3-細胞。

【0143】 *經誘導之富潛能幹細胞(iPSC)*：如本文所使用，術語「經誘導之富潛能幹細胞」或「iPSC」係指例如藉由誘導一或多個基因(包括POU4F1/OCT4 (基因ID；5460)以及(但不限於) SOX2 (基因ID；6657)、KLF4 (基因ID；9314)、cMYC (基因ID；4609)、NANOG (基因ID；79923)、LIN28/LIN28A (基因ID；79727))之表現而自非富潛能細胞(通常為成年體細胞)人工衍生(例如，誘導)的富潛能幹細胞。幹細胞可在任何階段處用標記物或基因進行基因修飾，使得標記物或基因攜帶至任何培養階段。標記物可用於在任何培養階段純化或富集分化或未分化之幹細胞

群體。

【0144】 *誘導培養基*：術語「誘導培養基」一般係指用於將細胞群體自第一細胞表型分化成第二細胞表型之細胞培養基。在一些實施例中，第一細胞表型及第二細胞表型包含異質細胞群體。在一些實施例中，第一細胞表型包含異質細胞群體。在一些實施例中，第二細胞表型包含異質細胞群體。在一些實施例中，誘導培養基用於將異質細胞群體分化成實質上均質的細胞群體。

【0145】 *活體外*：如本文所使用，術語「活體外」係指在人工環境中，例如在試管或反應容器中、在細胞培養物中等，而非在多細胞生物體內發生的事件。

【0146】 *活體內*：如本文所使用，術語「活體內」係指在多細胞生物體(諸如人類及非人類動物)內發生的事件。在基於細胞之系統的情形下，該術語可用於指在活細胞(相較於例如活體外系統)內發生的事件。

【0147】 *分離步驟*：如本文所使用之術語「分離步驟」或「細胞分離步驟」意謂自細胞混合物中分離特定細胞類型的步驟。自細胞混合物中分離特定細胞類型之各種方法為此項技術中已知，且包括例如螢光活化細胞分選(FACS)及基於磁珠之分選策略，諸如磁性活化細胞分選(MACS)。

【0148】 *自然殺手(NK)細胞*：如本文所使用，「自然殺手細胞」或NK細胞係由其標記物表現及功能/活性定義的淋巴細胞。舉例而言，在人類中，NK細胞表現CD56。在另一實施例中，此類NK細胞可表現CD56及CD16。在另一實例中，此類NK細胞可為CD56+/CD3-細胞。NK細胞可表現可變含量之CD56。舉例而言，NK細胞可為「CD56^{high}」，其意謂NK細胞表現高含量之CD56，如藉由此項技術中之方法所評定，例如如藉由

流式細胞量測術所評定。作為另一實例，NK細胞可為「CD56^{dim}」，其意謂NK細胞表現較低但可偵測含量之CD56，如藉由此項技術中之方法所評定，例如如藉由流式細胞量測術所評定。

【0149】 *NK誘導培養基*：在一些實施例中，術語「NK誘導培養基」係指用於產生包含CD56+/CD3-細胞之細胞群體的細胞培養基。在一些實施例中，NK細胞誘導培養基包含IL-7、IL-2及抗CD3抗體中之一或多者。

【0150】 *iPS NK細胞*：如本文所使用，「iPS NK細胞」係iPSC衍生之NK細胞，例如衍生自作為起始物質之iPSC的NK細胞。此類iPS NK細胞表現CD56。在另一實施例中，此類iPS NK細胞可表現CD56及CD16。在另一實例中，此類iPS NK細胞可表現CD56且為CD3- (CD56+/CD3-)。iPS NK細胞在本文中亦稱為「iNK細胞」。

【0151】 *T細胞*：如本文所使用，「T細胞」為由其標記物表現及功能/活性定義的淋巴細胞。舉例而言，在人類中，T細胞表現CD3。CD56+/CD3+細胞被稱為NKT細胞。

【0152】 「單鏈Fv抗體」或「scFv」係指包括直接或經由肽連接子序列彼此連接之輕鏈可變區及重鏈可變區的經工程改造之抗體。

【0153】 *個體*：如本文所使用，術語「個體」係指人類或任何非人類動物(例如，小鼠、大鼠、兔、狗、貓、牛、豬、綿羊、馬或靈長類動物)。人類包括產前及產後形式。在許多實施例中，個體為人類。個體可為患者，其係指呈遞給醫療提供者以診斷或治療疾病之人類。術語「個體」在本文中可與「個體」或「患者」互換地使用。個體可患有或易患疾病或病症，但可能會或可能不會顯示疾病或病症之症狀。

【0154】 **罹患**：「罹患」疾病、病症及/或病狀之個體已診斷患有該疾病、病症及/或病狀之一或多種症狀或顯示出該疾病、病症及/或病狀之一或多種症狀。該疾病可包括癌症，例如淋巴瘤及白血病。

【0155】 **治療有效量**：如本文所使用，當向罹患或易患疾病、病症及/或病狀之個體投與時，術語治療劑(例如，細胞療法)之「治療有效量」意謂足以治療、診斷、預防疾病、病症及/或病狀之症狀及/或延遲其發作的量(例如，富集某一百分比之一或多種特定類型之一或多種細胞的某一數目之細胞或細胞群體)。一般熟習此項技術者應瞭解，通常經由包含至少一個單位劑量之給藥方案來投與治療有效量。在一些實施例中，本文所描述之CD56+/CD3-細胞經修飾以表現一或多個轉殖基因。在一些實施例中，本文所描述之CD56+/CD3-細胞經修飾以表現嵌合抗原受體，諸如(例如) CD19。在一些實施例中，向有需要之個體投與本文所描述之約100百萬與900百萬之間的CD56+/CD3-細胞。在一些實施例中，向有需要之個體投與本文所描述之約100百萬與700百萬之間的CD56+/CD3-細胞。在一些實施例中，向有需要之個體投與本文所描述之約100百萬與500百萬之間的CD56+/CD3-細胞。在一些實施例中，向有需要之個體投與本文所描述之約200百萬與900百萬之間的CD56+/CD3-細胞。在一些實施例中，向有需要之個體投與本文所描述之約200百萬與700百萬之間的CD56+/CD3-細胞。在一些實施例中，向有需要之個體投與本文所描述之約200百萬與500百萬之間的CD56+/CD3-細胞。

【0156】 **治療**：如本文所使用，術語「治療(treat/treatment/treating)」係指用於部分或完全減輕、改善、緩解、抑制、預防特定疾病、病症及/或病狀之一或多種症狀或特徵、延遲其發

作、降低其嚴重程度及/或降低其發病率的任何方法。向未展現疾病之徵象及/或僅展現疾病之早期徵象的個體投與治療，以降低罹患與該疾病相關之病變的風險。

【0157】 本文中藉由端點對數值範圍之列舉包括該範圍內之所有數字及分數(例如，1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.9、4及5)。亦應理解，假定所有數字及其分數均由術語「約」修飾。

【0158】 本發明之各種態樣在以下章節中加以詳細描述。章節之使用並不意欲限制本發明。各章節可適用於本發明之任何態樣。在本申請案中，除非另有說明，否則「或」之使用意謂「及/或」。如本文所使用，除非上下文另外明確規定，否則單數形式「一(a/an)」及「該」包括單數及複數種指代物二者。

【0159】 本發明之各種態樣在以下章節中加以詳細描述。章節之使用並不意欲限制本發明。各章節可適用於本發明之任何態樣。在本申請案中，除非另有說明，否則「或」之使用意謂「及/或」。

【0160】 本發明提供自富潛能細胞(諸如iPS細胞或造血祖細胞(HPC))生產NK細胞之方法。由iPSC生產之NK細胞在本文中稱為iPS衍生之NK細胞、iPS NK細胞或iNK細胞。本發明提供細胞培養方法，其中諸如iPSC或HPC之祖細胞可以高效率分化成NK細胞或iPS NK細胞而無需分離步驟。本發明亦展示，所獲得之iPS NK細胞為功能性的，且可例如經由引入可用於治療各種疾病或病症(諸如癌症)之嵌合抗原受體(CAR)而進一步經基因修飾。

【0161】 下文更詳細地描述生產CD56+/CD3-細胞(NK細胞)之各種方法。

自富潛能細胞生產NK或iPS衍生之NK細胞而無需分離步驟的方法

【0162】 在一些實施例中，提供一種生產NK細胞或iPS衍生之NK細胞的方法，該方法不需要分離步驟。

培養方法之綜述

【0163】 本文所提供之方法允許生產CD56+/CD3-細胞，而無需任何干預分離步驟。在一些實施例中，方法包含在HPC誘導培養基中培養富潛能幹細胞(諸如iPSC)以獲得包含造血細胞(HPC) (HP細胞堆)之細胞群體。隨後培養HP細胞堆群體而無需在CD4/CD8誘導培養基中執行分離步驟，以獲得包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體。在一些實施例中，包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體亦包含CD4+/CD8-細胞、CD4-/CD8-細胞及CD4-/CD8+細胞。此後為後續培養時間期而無需執行分離步驟，其中細胞在NK誘導培養基中培養以獲得富集CD56+/CD3-免疫細胞之群體。因此，在一些實施例中，生產CD56+/CD3-細胞之方法包含：1)在HPC誘導培養基中培養富潛能細胞以獲得包含造血細胞(HP細胞堆)之群體；2)在CD4/CD8誘導培養基中培養HP細胞堆以獲得包含CD4+/CD8-細胞、CD4-/CD8-細胞及CD4-/CD8+細胞之細胞群體；及3)在NK誘導中培養包含CD4+/CD8-細胞、CD4-/CD8-細胞及CD4-/CD8+細胞之細胞群體持續一段時間以獲得CD56+/CD3-細胞。

【0164】 在一些實施例中，生產NK細胞或iPS NK細胞之方法包含培養包含造血祖細胞(例如，HP細胞堆)之細胞以生產包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體，隨後為後續培養時間期，而無需執行分離步驟，其中在培養基中培養細胞群體以獲得富集CD56+/CD3-免疫細胞之群體。在一些實施例中，生產富潛能幹細胞衍生之CD56+/CD3-免疫細胞之方法包含

在一或多種培養基中培養富潛能幹細胞。在一些實施例中，生產CD56+/CD3-免疫細胞之方法包含在一或多種培養基中培養造血祖細胞。在一些實施例中，生產CD56+/CD3-免疫細胞之方法包含在一或多種培養基中培養包含CD4/CD8雙陽性細胞之混合物或細胞群體。在一些實施例中，富集CD56+/CD3-免疫細胞之群體可隨後藉由此項技術中已知之任何適合方法(例如諸如藉由FACS分選或基於磁珠之分離技術)來分離。在一個實施例中，iPS細胞可在約4-8週、5-7週或約6週內分化成iPS NK細胞。因此，在一些實施例中，iPS細胞可在約4-8週內分化成NK細胞。在一些實施例中，iPS細胞可在約5-7週內分化成NK細胞。在一些實施例中，iPS細胞可在約6週內分化成NK細胞。

【0165】 可藉由此項技術中已知之各種方法來評定細胞分化過程。舉例而言，在一些實施例中，可藉由獲得經培養細胞之樣品且使該經培養細胞之樣品經受一或多種分析方法以確定細胞之細胞表型來評定經培養細胞之細胞分化。確定細胞表型之已知方法包括例如流式細胞量測術及免疫螢光成像。任何適合的取樣及表型分析可與本文所描述之細胞培養方法一起使用以確定細胞分化過程之進展。在一些實施例中，本文所描述之方法包括一或多個取樣步驟以在給定時間測定細胞表型。

iPSC至HP細胞堆之綜述

【0166】 在一些實施例中，在HPC誘導培養基中培養富潛能細胞(諸如iPSC)以生產包含HP細胞堆之群體。在一些實施例中，在HPC誘導培養基中培養iPSC以獲得HPC細胞堆包含在HPC誘導培養基中培養iPSC。HPC誘導培養基可包含允許生產HP細胞堆之各種組分。在一些實施例中，HPC誘導培養基包含至少一或多種選自以下之化合物：骨形態發生蛋

白-4 (BMP4)、血管內皮生長因子(VEGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、抗壞血酸、ROCK抑制劑、GSK3抑制劑、幹細胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、Flt3L及TGF β 抑制劑。因此，在一些實施例中，自iPSC誘導HPC之HPC誘導培養基包含BMP4。在一些實施例中，自iPSC誘導HPC之培養基包含VEGF。在一些實施例中，自iPSC誘導HPC之培養基包含bFGF。在一些實施例中，自iPSC誘導HPC之培養基包含TGF β 。

【0167】 將iPSC在HPC誘導培養基中培養足以生產HP細胞堆的一段時間。在一些實施例中，將iPSC在HPC誘導培養基中培養約7-21天，或10-18天，或約14天之時間。在一些實施例中，將iPSC在HPC誘導培養基中培養約13天之時間。

【0168】 在一些實施例中，在諸如(例如)約3%、4%、5%或6% O₂之低氧條件下培養細胞。因此，在一些實施例中，在約3% O₂中培養細胞。在一些實施例中，在約4% O₂中培養細胞。在一些實施例中，在約5% O₂中培養細胞。在一些實施例中，在約6% O₂中培養細胞。

HP細胞堆至CD4/CD8之綜述

【0169】 在一些實施例中，在無任何干預分離步驟之情況下在培養基中進一步培養HPC細胞堆或以其他方式獲得之HPC (例如，自人類供體分離的原代HPC或自其他幹細胞源/類型分化，諸如胚胎幹細胞衍生的HPC)，以獲得包含CD4/CD8雙陽性(DP)細胞之細胞群體。在一些實施例中，在無任何干預分離步驟之情況下在培養基中進一步培養HPC細胞堆或以其他方式獲得之HPC (例如，自人類供體分離的原代HPC或自其他幹細胞源/類型分化，諸如胚胎幹細胞衍生的HPC)，以獲得包含CD4+/CD8細胞之細胞群體。在一些實施例中，在無任何干預分離步驟之情況下在培養

基中進一步培養HPC細胞堆或以其他方式獲得之HPC (例如，自人類供體分離的原代HPC或自其他幹細胞源/類型分化，諸如胚胎幹細胞衍生的HPC)，以獲得包含CD4-/CD8-細胞之細胞群體。在一些實施例中，在無任何干預分離步驟之情況下在培養基中進一步培養HPC細胞堆或以其他方式獲得之HPC(例如，自人類供體分離的原代HPC或自其他幹細胞源/類型分化，諸如胚胎幹細胞衍生的HPC)，以獲得包含CD4-/CD8+細胞之細胞群體。應理解，藉由此方法獲得之細胞群體包括CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞。細胞群體包括例如淋巴球。在一些實施例中，將HPC細胞堆在具有至少一種選自由以下組成之群之化合物的CD4/CD8誘導培養基中培養：抗壤血酸、幹細胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、TPO、纖維結合蛋白或其變體、Notch配體(例如，Jag-1、Jag-2、DLL-1、DLL-3、DLL-4)、p38抑制劑及SDF-1，以獲得包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。因此，在一些實施例中，將HPC細胞堆在包含抗壤血酸之CD4/CD8誘導培養基中培養，以獲得包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。在一些實施例中，將HPC細胞堆在包含SCF之CD4/CD8誘導培養基中培養，以獲得包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。在一些實施例中，將HPC細胞堆在包含IL-7之CD4/CD8誘導培養基中培養，以獲得包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。在一些實施例中，將HPC細胞堆在包含Flt3L之CD4/CD8誘導培養基中培養，以獲得包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。在一些實施例

中，將HPC細胞堆在包含p38抑制劑之CD4/CD8誘導培養基中培養，以獲得包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。在一些實施例中，將HPC細胞堆在包含SDF-1之CD4/CD8誘導培養基中培養，以獲得包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。

【0170】使培養時間期持續適合於獲得包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之細胞群體的時間。在一些實施例中，培養HP細胞堆以獲得包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之細胞群體為約2-6週、3-5週或約3週。因此，在一些實施例中，使細胞培養時間期持續約2-6週。因此，在一些實施例中，使細胞培養時間期持續約3-5週。因此，在一些實施例中，使細胞培養時間期持續約3週。

【0171】在一些實施例中，在諸如(例如)約3%、4%、5%或6% O₂之低氧條件下培養細胞。因此，在一些實施例中，在諸如(例如)約3% O₂之低氧條件下培養細胞。在一些實施例中，在諸如(例如)約4% O₂之低氧條件下培養細胞。在一些實施例中，在諸如(例如)約5% O₂之低氧條件下培養細胞。在一些實施例中，在諸如(例如)約6% O₂之低氧條件下培養細胞。

CD4/CD8細胞至CD56+/CD3-細胞之綜述

【0172】如上文所描述之包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-之細胞群體可在細胞培養基中進一步培養以獲得CD56+/CD3-細胞之群體。在一些實施例中，培養基為NK誘導培養基。在一些實施例中，NK誘導培養基包含IL-7、IL-2及抗CD3抗體中

之一或多者。

【0173】 在一些實施例中，在無干預分離步驟之情況下在培養基中進一步培養包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-之細胞群體，以獲得富集CD56+/CD3-細胞之細胞群體。此類CD56+細胞包括例如自然殺手(NK)細胞。在一些實施例中，在包括CD3活化劑、IL-2及/或IL-7之培養基中培養包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。因此，在一些實施例中，在包括CD3活化劑之培養基中培養包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。CD3活化劑為此項技術中已知的且包括例如結合CD3及/或CD28表面配體之抗體複合物。CD3活化劑包括例如可使用之抗CD3抗體或其結合之片段。在一些實施例中，當使用抗CD3抗體時，抗CD3抗體可為多株抗體或單株抗體。在一些實施例中，抗CD3抗體為多株抗體。在一些實施例中，抗CD3抗體為單株抗體。抗體可屬於IgG、IgA、IgM、IgD、IgE或IgG之任何免疫球蛋白類別。可使用各種類型之抗CD3抗體，包括(例如)可使用由OKT3純系或UCHT1純系生產之抗體。培養基中抗CD3抗體之濃度例如在10 ng/ml至1000 ng/ml之間。

【0174】 在一些實施例中，在包括IL-2之培養基中培養包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。在一些實施例中，在包括IL-7之培養基中培養包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之群體。在一些實施例中，在諸如(例如)約3%、4%、5%或6% O₂之低氧條件下培養細胞。因此，在一些實施例中，在約3% O₂中培養細胞。在一些實施例中，在約

4% O₂中培養細胞。在一些實施例中，在約5% O₂中培養細胞。在一些實施例中，在約6% O₂中培養細胞。

【0175】 可在NK誘導培養基中進一步培養包含CD56+細胞之細胞群體以富集CD56+/CD3-細胞之群體。在一些實施例中，在包含IL-7及/或IL-15之NK誘導培養基中培養包含CD56+細胞之細胞群體以進一步富集CD56+細胞。因此，在一些實施例中，在包含IL-7之NK誘導培養基中培養包含CD56+細胞之細胞群體。在一些實施例中，在包含IL-15之NK誘導培養基中培養包含CD56+細胞之細胞群體。在一些實施例中，在諸如(例如)約3%、4%、5%或6% O₂之低氧條件下培養細胞。在一些實施例中，所生產之CD56+/CD3-細胞為NK細胞。所生產之CD56+/CD3- NK細胞之百分比為至少約50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%或超過95%。因此，在一些實施例中，方法產生至少約50% CD56+/CD3- NK細胞。在一些實施例中，方法產生至少約55% CD56+/CD3- NK細胞。在一些實施例中，方法產生至少約60% CD56+/CD3- NK細胞。在一些實施例中，方法產生至少約65% CD56+/CD3- NK細胞。在一些實施例中，方法產生至少約70% CD56+/CD3- NK細胞。在一些實施例中，方法產生至少約75% CD56+/CD3- NK細胞。在一些實施例中，方法產生至少約80% CD56+/CD3- NK細胞。在一些實施例中，方法產生至少約85% CD56+/CD3- NK細胞。在一些實施例中，方法產生至少約90% CD56+/CD3- NK細胞。在一些實施例中，方法產生至少約95% CD56+/CD3- NK細胞。在一些實施例中，方法產生超過95% CD56+/CD3- NK細胞。

【0176】 在一些實施例中，約5%、10%、15%、20%、25%或約

30%的藉由此培養方法生產之細胞為CD3+ T細胞。在一些實施例中，小於約5%的所生產之細胞為CD3+ T細胞。在一些實施例中，約5%的所生產之細胞為CD3+ T細胞。在一些實施例中，約10%的所生產之細胞為CD3+ T細胞。在一些實施例中，約15%的所生產之細胞為CD3+ T細胞。在一些實施例中，約20%的所生產之細胞為CD3+ T細胞。在一些實施例中，約25%的所生產之細胞為CD3+ T細胞。在一些實施例中，約30%的所生產之細胞為CD3+ T細胞。

【0177】 在一些實施例中，藉由此項技術中已知之方法分離富集CD56+/CD3-細胞之群體。此類方法包括例如基於流式細胞量測術(FACS)之分選方法及基於磁珠之分選方法(MACS)。

【0178】 在一些實施例中，自包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞及CD4+/CD8細胞之群體獲得CD56+/CD3- NK細胞之培養時間期為約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18天。在一些實施例中，培養時間期為約7天。

【0179】 在一些實施例中，富集CD56+細胞群體包含NK細胞。在一些實施例中，富集CD56+細胞包含CD3-細胞。在一些實施例中，富集CD56+細胞包含CD3+細胞。

用於分化成CD56+/CD3-細胞之適合的富潛能細胞

【0180】 在一些實施例中，任何富潛能、多潛能或患者衍生之HPC可與本文所描述之方法一起使用。舉例而言，在一些實施例中，細胞為胚胎幹細胞。在一些實施例中，細胞為成體幹細胞。各種成體幹細胞為此項技術中已知的，且包括例如間葉幹細胞、造血幹細胞、臍帶衍生之細胞、骨髓幹細胞、脂肪幹細胞及其類似者。在一些實施例中，細胞為經誘導之

富潛能幹細胞(iPSC)。因此，根據本文所描述之方法生產的NK細胞可由任何富潛能、多潛能或患者衍生之HPC (諸如直接來源於供體之原代HPC) 製得。

【0181】 在一些實施例中，富潛能細胞包括例如胚胎幹(ES)細胞、衍生自藉由核轉移獲得之經選殖胚胎的胚胎幹細胞(ntES細胞)、生殖系幹細胞(「GS細胞」)、胚胎生殖細胞(「EG細胞」)、iPS細胞及衍生自經培養纖維母細胞或骨髓幹細胞之富潛能細胞(Muse細胞)。在一些實施例中，iPS細胞可來源於健康個體之周邊血液單核細胞。用於生產iPS細胞之方法為此項技術中已知的。可藉由將程式改寫因子引入任意體細胞中來生產此等細胞。本文中的程式改寫因子之實例包括基因(諸如Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tel1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3及Glisl)及其基因產物。此等程式改寫因子可單獨使用，或可組合使用此等中之兩者或更多者。程式改寫因子之組合之實例包括描述於以下中之彼等：WO2007/069666；WO2008/118820；WO2009/007852；WO2009/032194；WO2009/058413；WO2009/057831；WO2009/075119；WO2009/079007；WO2009/091659；WO2009/101084；WO2009/101407；WO2009/102983；WO2009/114949；WO2009/117439；WO2009/126250；WO2009/126251；WO2009/126655；WO2009/157593；WO2010/009015；WO2010/033906；WO2010/033920；WO2010/042800；WO2010/050626；WO2010/056831；WO2010/068955；

WO2010/098419 ; WO2010/102267 ; WO2010/111409 ;
 WO2010/111422 ; WO2010/115050 ; WO2010/124290 ;
 WO2010/147395 ; WO2010/147612 ; Huangfu D等 人 (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797 , Shi Y等人 (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528 ; Eminli S, 等人 (2008), Stem Cells. 26: 2467-2474 ; Eluangfu D等 人 (2008), Nat. Biotechnol. 26: 1269-1275 ; Shi Y等人 (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574 ; Zhao Y等人 (2008), Cell Stem Cell, 3: 475-479 ; Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135 ; Feng B等人 (2009), Nat. Cell Biol. 11: 197-203 ; R. L. Judson等人, (2009), Nat. Biotechnol., 27: 459-461 ; Lyssiotis CA等人 (2009), Proc Natl Acad Sci US A. 106: 8912-8917 ; Kim J等人 (2009), Nature. 461: 649-643 ; Ichida J K等人 (2009), Cell Stem Cell. 5: 491-503 ; Heng JC等人 (2010), Cell Stem Cell. 6: 167-74 ; Han J等人 (2010), Nature. 463: 1096-100 ; Mali P等人 (2010), Stem Cells. 28: 713-720 ; 及Maekawa M等人 (2011), Nature. 474: 225-9 。

【0182】 iPSC可獲自任何適合的組織。在一些實施例中，iPSC係獲自周邊血液單核細胞。

【0183】 造血祖細胞(HPC)為能夠分化成血細胞(諸如淋巴球、嗜伊紅血球、嗜中性白血球、嗜鹼性球、紅血球及巨核細胞)的細胞。可基於例如CD34及/或CD43表面抗原之存在來鑑別造血祖細胞或造血幹細胞。

【0184】 在一些實施例中，用於生產本文中所描述之CD56+/CD3-NK細胞之細胞在細胞分化之任何階段經基因修飾。在一些實施例中，CD56+/CD3- NK細胞經基因修飾以包括所需嵌合抗原受體(CAR)、T細胞受體(TCR)或其他經工程改造之蛋白質。

【0185】 在一些實施例中，在富潛能、多潛能或單潛能階段對本文所描述之用於生產CD56+/CD3- NK細胞之細胞進行基因修飾。舉例而言，在一些實施例中，在富潛能階段對本文所描述之用於生產CD56+/CD3- NK細胞之細胞進行基因修飾。舉例而言，可在胚胎幹細胞階段或iPSC幹細胞階段對細胞進行基因修飾。在一些實施例中，在多潛能階段對本文所描述之用於生產CD56+/CD3- NK細胞之細胞進行基因修飾。舉例而言，可在造血幹細胞(HSC)階段對細胞進行基因修飾。

培養條件-iPSC至HPC細胞堆

【0186】 在一些實施例中，用於自iPSC生產造血祖細胞(亦即，HPC誘導培養基)之培養基可藉由將維生素C添加至用於培養動物細胞之基本培養基來製備。基本培養基之實例包括伊斯科夫氏改良杜爾貝科氏培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium ; IMDM)、培養基199、伊格爾氏最低必需培養基(Eagle's Minimum Essential Medium ; EMEM)、 α MEM培養基、杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's modified Eagle's Medium ; DMEM)、哈姆氏F12培養基(Ham's F12 medium)、RPMI 1640培養基、費舍爾氏培養基(Fischer's medium)及神經基質培養基(Life Technologies)，及此等培養基中之兩者或更多者之混合物。在一些實施例中，培養基含有血清。在一些實施例中，培養基不含血清。

【0187】 在一些實施例中，HPC誘導培養基可包括StemPro™ -34。StemPro™ -34為無血清培養基，其經調配以支持培養物中人類造血細胞之發育。

【0188】 必要時，在一些實施例中，HPC誘導培養基亦可含有一或多種物質，諸如白蛋白、人類胰島素、人類運鐵蛋白、硒或亞硒酸鈉、脂

肪酸、微量元素、2-巰基乙醇、硫醇甘油、 α -單硫代甘油、脂質、胺基酸、L-麩醯胺酸、非必需胺基酸、維生素、生長因子、低分子量化合物、抗生素、抗氧化劑、丙酮酸、緩衝液、無機鹽及細胞介素。

【0189】 在一些實施例中，HPC誘導培養基包括含有血清、胰島素、運鐵蛋白、硒、硫醇甘油或 α -單硫代甘油、L-麩醯胺酸及抗壞血酸之IMDM培養基。

【0190】 在一些實施例中，HPC誘導培養基含有引起骨形態發生蛋白4 (BMP4)傳訊路徑之訊息轉導的一或多種物質。此類物質包括(但不限於) BMP4。

【0191】 在一些實施例中，HPC誘導培養基含有引起血管上皮生長因子(VEGF)傳訊路徑之訊息轉導的一或多種物質。此類物質包括(但不限於) VEGF。

【0192】 在一些實施例中，HPC誘導培養基含有引起纖維母細胞生長因子(FGF)路徑之傳訊的一或多種物質。此類物質包括(但不限於) bFGF及FGF2。

【0193】 在一些實施例中，HPC誘導培養基含有引起幹細胞因子/*kit*傳訊路徑之訊息轉導的一或多種物質。此類物質包括(但不限於) SCF。

【0194】 在一些實施例中，HPC誘導培養基含有引起Flt3配體傳訊路徑之訊息轉導的一或多種物質。此類物質包括(但不限於) Flt3配體(Flt3L)。

【0195】 在一些實施例中，HPC誘導培養基含有引起血小板生成素傳訊路徑之訊息轉導的一或多種物質。此類物質包括(但不限於) TPO。

【0196】 TGF β 抑制劑為干擾TGF β 家族之訊息轉導的小分子抑制劑，且包括例如SB431542、SB202190 (R.K. Lindemann等人, Mol. Cancer 2:20 (2003))、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)及類似者。

【0197】 SB431542為轉化生長因子 β (TGF β)超家族I型活化素受體樣激酶(ALK)受體ALK4、ALK5及ALK7之強效及特異性抑制劑。

【0198】 舉例而言，當TGF β 抑制劑為SB431542時，其在培養基中之濃度較佳為0.5 μ M至100 μ M。

【0199】 用於生產HP細胞堆群體之HPC誘導培養基可進一步補充有選自由以下組成之群的細胞介素：BMP4 (骨形態發生蛋白4)、VEGF (血管內皮生長因子)、bFGF (鹼性纖維母細胞生長因子)、SCF (幹細胞因子)、TPO (血小板生成素)及Flt3L (Flt3配體)。

【0200】 在一個實施例中，HPC誘導培養基可包括補充有人類胰島素(約10 μ g/ml)、人類運鐵蛋白(約5.5 μ g/ml)、亞硒酸鈉(約6.7 ng/ml)、L-麩醯胺酸(約2 mM)、 α -單硫代甘油(約0.4 mM)及SB431542 (約6 μ M)之StemPro34。

【0201】 在一些實施例中，在培養時間期期間，可每四天、每三天、每兩天或每天添加維生素C。可以對應於約5 μ g/ml至約500 μ g/ml之量實行維生素C至培養基中之添加。在一些實施例中，維生素C以約5 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml、300 μ g/ml、400 μ g/ml或500 μ g/ml存在於培養基中。

【0202】 在本說明書中，「維生素C」意謂L-抗壞血酸及其衍生物，

且「L-抗壞血酸衍生物」意謂在活體內藉由酶促反應變成維生素C的衍生物。L-抗壞血酸之衍生物之實例包括維生素C磷酸鹽(例如，抗壞血酸2-磷酸鹽)、抗壞血酸葡萄糖苷、抗壞血酸乙基、維生素C酯、四己基癸酸抗壞血酸酯、硬脂酸抗壞血酸酯及6-棕櫚酸抗壞血酸酯2-磷酸鹽。較佳的為維生素C磷酸鹽。維生素C磷酸鹽(例如，抗壞血酸2-磷酸鹽)之實例包括L-抗壞血酸磷酸鹽，諸如L-抗壞血酸磷酸鈉及L-抗壞血酸磷酸鎂。

【0203】 在一些實施例中，當引起骨形態發生蛋白4 (BMP4)傳訊路徑之訊息轉導的物質為BMP4時，BMP4在用於生產造血祖細胞之HPC誘導培養基中的濃度為約5 ng/ml至500 ng/ml，例如5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、150 ng/ml、200 ng/ml、250 ng/ml、300 ng/ml、350 ng/ml、400 ng/ml、450 ng/ml或500 ng/ml。

【0204】 在一些實施例中，當引起血管上皮生長因子(VEGF)傳訊路徑之訊息轉導的物質為VEGF時，VEGF在用於生產造血祖細胞之HPC誘導培養基中的濃度為約5 ng/ml至500 ng/ml，例如約5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、150 ng/ml、200 ng/ml、250 ng/ml、300 ng/ml、350 ng/ml、400 ng/ml、450 ng/ml或500 ng/ml。

【0205】 在一些實施例中，當引起纖維母細胞生長因子(FGF)路徑之訊息轉導的物質為bFGF時，bFGF在用於生產造血祖細胞之HPC誘導培養基中的濃度為約5 ng/ml至500 ng/ml，例如5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、150 ng/ml、200 ng/ml、250 ng/ml、300

ng/ml、350 ng/ml、400 ng/ml、450 ng/ml或500 ng/ml。

【0206】 在一些實施例中，當引起幹細胞因子/*kit*傳訊路徑之訊息轉導的物質為SCF時，SCF在用於生產造血祖細胞之HPC誘導培養基中的濃度為約5 ng/ml至100 ng/ml，例如5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml或100 ng/ml。

【0207】 在一些實施例中，當引起Flt3配體傳訊路徑之訊息轉導的物質為Flt3L時，Flt3L在用於生產造血祖細胞之HPC誘導培養基中的濃度為約1 ng/ml至100 ng/ml，例如1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、50 ng/ml或100 ng/ml。

【0208】 在一些實施例中，當引起血小板生成素傳訊路徑之訊息轉導的物質為TPO時，TPO在用於生產造血祖細胞之HPC誘導培養基中的濃度為約1 ng/ml至200 ng/ml，例如1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100、125 ng/ml、150 ng/ml、175 ng/ml或200 ng/ml。

【0209】 在一些實施例中，富潛能幹細胞可藉由貼壁培養或懸浮培養來培養。在貼壁培養之情況下，培養可在塗佈有塗佈劑之培養容器中實行，及/或可與其他細胞共同培養。用於共同培養之其他細胞之實例包括C3H10T1/2 (Takayama N.等人 J Exp Med. 2817-2830, 2010)及來源於不同物種之基質細胞(Niwa A等人 J Cell Physiol. 2009 Nov; 221(2): 367-77)。塗佈劑之實例包括基質膠(Nivea A等人 PLoS One. 6(7): e22261,

2011)、iMatrix 511 (Miyazaki T等 人 Nature Communication 2012 ;3 :1236)、明膠、膠原蛋白、彈性蛋白及類似者、葡糖胺聚醣及蛋白聚醣(諸如玻尿酸、硫酸軟骨素及類似者)、細胞黏附蛋白(諸如纖維結合蛋白或其變體)、玻璃連結蛋白、層黏連蛋白及類似者，及類似者。懸浮培養之方法之實例包括描述於Chadwick等人 Blood 2003, 102: 906-15, Vijayaragavan等人 Cell Stem Cell 2009, 4: 248-62及Saeki等人 Stem Cells 2009, 27: 59-67中的方法。

【0210】 在一些實施例中，亦可由藉由培養富潛能幹細胞獲得之網狀結構(其亦稱為ES-sac或iPS-sac)來製備HP細胞堆。本文中之「網狀結構」為衍生自富潛能幹細胞之三維囊狀結構(在內側具有空間)。該結構由內皮細胞群體或其類似者形成，且在內側含有造血祖細胞。

【0211】 在一些實施例中，用於生產HP細胞堆之培養物的溫度條件為約37℃至約42℃。在一些實施例中，溫度為例如約37℃至約42℃，較佳約37℃至約39℃。熟習此項技術者可藉由自細胞培養物中獲得樣品以用於表型分析來監測造血祖細胞及/或類似物之數目來適當地確定培養時間期。此項技術中已知與細胞樣品之表型分析相關之各種方法且包括例如流式細胞量測術及免疫螢光方法。

【0212】 獲得HP細胞堆之培養時間期可變化且包括例如6天與14天之間。培養時間期之實例包括至少6天、不低於7天、不低於8天、不低於9天、不低於10天、不低於11天、不低於12天、不低於13天及不低於14天。在一些實施例中，培養時間期持續六天。在一些實施例中，培養時間期為7天。在一些實施例中，培養時間期為8天。在一些實施例中，培養時間期為9天。在一些實施例中，培養時間期為10天。在一些實施例中，培

養時間期為10天。在一些實施例中，培養時間期為11天。在一些實施例中，培養時間期為12天。在一些實施例中，培養時間期為13天。在一些實施例中，培養時間期為14天。在一些實施例中，培養時間期大於14天。培養可在低氧條件下實行。低氧條件之實例包括15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%或更低。培養基更換之頻率可由熟習此項技術者決定。在一些實施例中，可每2天後更換培養基。在一些其他實施例中，可每3天後更換培養基。在一些實施例中，每天更換培養基。

【0213】 在一些實施例中，藉由組合上述條件中之一或多者來實行用於生產HP細胞堆的培養。舉例而言，在一些實施例中，自iPSC獲得HP細胞堆之方法包含：(i)在低氧條件下在補充有維生素C之基本培養基中在C3H10T1/2上培養富潛能幹細胞；及(ii)進一步將VEGF、SCF及Flt3L添加至(1)之培養液體，且在正常氧氣條件下培養細胞。實行步驟(i)之時間期至少不低於六天，較佳不低於七天，更佳為七天。實行步驟(ii)之時間期至少不低於六天，不低於七天，且為七天。

【0214】 在一些實施例中，可在進一步使用之前分離HP細胞堆中獲得之造血祖細胞。在一些其他實施例中，所獲得之造血祖細胞可用作亦含有其他細胞物種(HP細胞堆)之細胞群體。HP細胞堆群體為未分離的細胞製劑。在一些實施例中，該方法不包含分離步驟。

培養條件-HP細胞堆至CD4/CD8細胞

【0215】 在一些實施例中，CD4/CD8誘導培養基產生包含CD4+/CD8+、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之細胞群體。「CD4/CD8雙陽性細胞」(DP細胞)意謂表現CD4及CD8兩者之細胞。可將CD4/CD8雙陽性細胞鑑別為CD4、CD8、CD3及CD45陽性細

胞。「CD4/CD8雙陰性細胞」(DN細胞)意謂不表現CD4-及CD8-兩者之細胞。「CD4-/CD8+細胞」意謂不表現CD4-但表現CD8+之細胞。「CD4+/CD8-細胞」意謂表現CD4但不表現CD8之細胞。

【0216】 在一些實施例中，包含CD4+/CD8+、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之細胞群體可經誘導以分化成CD56+/CD3-細胞。

【0217】 在一些實施例中，包含CD4/CD8雙陽性細胞以及其他細胞之細胞群體可藉由包括在補充有維生素C之培養基中培養造血祖細胞或HP細胞堆之步驟的方法生產。待添加至基本培養基中之維生素C與HP細胞堆之上文描述之誘導中的維生素C相同。

【0218】 在一些實施例中，用於自HP細胞堆生產包含CD4+/CD8+、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞及CD4+/CD8-細胞之細胞群體的培養基為CD4/CD8誘導培養基。在一些實施例中，可藉由將維生素C添加至用於培養動物細胞之基本培養基中來製備CD4/CD8誘導培養基。基本培養基之實例包括伊斯科夫氏改良杜爾貝科氏培養基(IMDM)、培養基199、伊格爾氏最低必需培養基(EMEM)、 α MEM培養基(Thermo Fisher Scientific(Gibco))、杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、哈姆氏F12培養基、RPMI 1640培養基、費舍爾氏培養基及神經基質培養基(Life Technologies)，及此等培養基中之兩者或更多者之混合物。培養基可含有血清，或可不含血清。

【0219】 必要時，基本培養基亦可含有諸如以下物質中之一或多者：白蛋白、人類胰島素、人類運鐵蛋白、硒、亞硒酸鈉、脂肪酸、微量元素、2-巰基乙醇、硫醇甘油、脂質、胺基酸、L-麩醯胺酸、非必需胺基

酸、維生素、生長因子、低分子量化合物、抗生素、抗氧化劑、丙酮酸、緩衝液、無機鹽及細胞介素。

【0220】 用於生產包含CD4/CD8雙陽性細胞以及其他細胞之細胞群體的CD4/CD8誘導培養基可以進一步補充有選自由以下組成之群的細胞介素：抗壞血酸、SCF、IL-7、Flt3L、TPO、纖維結合蛋白或其變體、Notch配體、p38抑制劑及SDF-1。

【0221】 在一些實施例中，在培養時間期期間，可每四天、每三天、每兩天或每天添加維生素C。可以對應於約5 µg/ml至約500 µg/ml之量實行維生素C至培養基中之添加。在一些實施例中，維生素C以約5 µg/ml、10 µg/ml、25 µg/ml、50 µg/ml、100 µg/ml、200 µg/ml、300 µg/ml、400 µg/ml或500 µg/ml存在於培養基中。

【0222】 在一些實施例中，基本培養基含有引起幹細胞因子/kit傳訊路徑之訊息轉導的一或多種物質。此類物質包括(但不限於) SCF。

【0223】 在一些實施例中，基本培養基含有引起Flt3配體傳訊路徑之訊息轉導的一或多種物質。此類物質包括(但不限於) Flt3配體(Flt3L)。

【0224】 在一些實施例中，基本培養基含有引起血小板生成素傳訊路徑之訊息轉導的一或多種物質。此類物質包括(但不限於) TPO。

【0225】 在一些實施例中，基本培養基含有一或多種p38抑制劑，該p38抑制劑為p38 α 及p38 β 之抑制劑，其轉而抑制MAPKAP激酶-2及熱休克蛋白27之下游活化。本發明中所使用之p38化學抑制劑之實例包括(但不限於) SB203580 (4-(4-氟苯基)-2-(4-甲基磺醯基苯基)-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑)及其衍生物、SB202190 (4-(4-氟苯基)-2-(4-羥基苯基)-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑)及其衍生物、SB239063 (反式-4-[4-(4-氟苯基)-5-(2-甲氧基-4-

嘧啶基)-1H-咪唑-1-基]環己醇)及其衍生物、SB220025及其衍生物、PD169316、RPR200765A、AMG-548、BIRB-796、SCIO-469、SCIO-323、VX-702及FR167653。此等化合物為可商購的，且例如SB203580、SB202190、SC239063、SB220025及PD169316可購自Calbiochem，且SCIO-469及SCIO-323可購自Scios及其類似者。p38抑制劑之其他實例包含p38之顯性陰性突變體，其包括藉由將位於p38之DNA結合區中之180位蘇胺酸點突變為丙胺酸而獲得的p38T180A、藉由將人類和小鼠中之p38之182位酪胺酸點突變為苯丙胺酸而獲得的p38Y182F，及其類似者。p38抑制劑以例如約0.5 μ M至約50 μ M含於培養基中。

【0226】 在一些實施例中，基本培養基含有SDF-1。

【0227】 在一些實施例中，SDF-1不僅可為SDF-1 α 或其成熟形式，且亦可為同功異型物，諸如SDF-1 β 、SDF-1 γ 、SDF-1 δ 、SDF-1 ϵ 、SDF-1 ϕ 及其類似物或成熟形式，或呈任何比率或類似比率之此等之混合物。較佳地，使用SDF-1 α 。SDF-1有時稱為CXCL-12或PBSF。

【0228】 在一些實施例中，SDF-1之胺基酸序列中之一個或若干個胺基酸可經取代、缺失及/或添加，只要其具有如趨化介素之活性即可，且類似地，糖鏈可經取代、缺失及/或添加。只要維持至少4個半胱胺酸殘基(人類SDF-1 α 中之Cys30、Cys32、Cys55及Cys71)且展現不低於90%的與天然物質之胺基酸序列之一致性，則胺基酸突變為可接受的。SDF-1可獲自哺乳動物，例如人類或非人類哺乳動物，諸如猴、綿羊、牛、馬、豬、狗、貓、兔、大鼠、小鼠及其類似者。舉例而言，註冊為GenBank寄存編號：NP_954637之蛋白質可用作人類SDF-1 α ，且註冊為GenBank寄存編號：NP_000600之蛋白質可用作SDF-1 β 。在一些實施例中，當引起

Flt3配體傳訊路徑之訊息轉導的物質為Flt3L時，Flt3L在用於生產包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體之培養基中的濃度為約1 ng/ml至100 ng/ml，例如1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml或100 ng/ml。

【0229】 在一些實施例中，當引起幹細胞因子/kit傳訊路徑之訊息轉導的物質為SCF時，在與如上文所描述相同之條件下，SCF係用於生產包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體。

【0230】 在一些實施例中，當引起血小板生成素傳訊路徑之訊息轉導的物質為TPO時，在與如上文所描述相同之條件下，TPO係用於生產包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體。

【0231】 本發明中所使用之纖維結合蛋白或其變體不受特定限制，只要其為能夠與CD3陽性細胞結合之分子即可。纖維結合蛋白之變體不受特定限制，只要其為能夠與CD3陽性細胞之表面上的VLA-5及VLA-4結合之分子即可，且其實例包括重組人纖維蛋白片段。纖維結合蛋白及其變體可以任何形式存在於培養基中。舉例而言，其可在培養期間含於培養基中，或可固定於培養容器上，且較佳地固定於培養容器上。

【0232】 當纖維結合蛋白或其變體含於培養基中時，纖維結合蛋白或其變體之濃度之下限可不低於10 ng/ml，較佳不低於100 ng/ml，且上限可不超過10000 µg/ml，較佳不超過1000 µg/ml。

【0233】 在一些實施例中，IL-7在用於產生包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體之培養基中的濃度為約1 ng/ml至100 ng/ml，例如1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、9

ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml或100 ng/ml。

【0234】 SDF-1可為可商購的、自自然界中純化的或藉由肽合成或基因工程改造技術生產的。SDF-1包含於例如約10 ng/ml至約100 ng/ml之範圍內的培養基中。另外，亦可使用具有SDF-1類似活性之SDF-1替代物代替SDF-1。此類SDF-1替代物之實例包括CXCR4促效劑，且可將具有CXCR4促效劑活性之低分子量化合物及其類似者添加至培養基中以代替SDF-1。

【0235】 在一些實施例中，當SDF-1為SDF1 α 時，SDF-1 α 在用於生產包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體之培養基中的濃度為約1 nM至100 nM，例如1 nM、2 nM、3 nM、4 nM、5 nM、6 nM、7 nM、8 nM、9 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM或100 nM。

【0236】 在一些實施例中，當p38抑制劑為SB203580時，SB203580在用於生產包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體之培養基中的濃度為約0.5 μ M至100 μ M，例如0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M或50 μ M、60 μ M、70 μ M、80 μ M、90 μ M或100 μ M。

【0237】 在一些實施例中，用於生產包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體的基本培養基包括補充有約15% FBS、約4 mM L-麩醯胺酸、約100 U/ml青黴素、約100 μ g/ml鏈黴素、約55 μ M 2-巰基乙醇、約50 μ g/ml抗壞血酸2-磷酸鹽、約10 μ g/ml人類胰島素、約5.5 μ g/ml人類運鐵蛋白、約6.7 ng/ml亞硒酸鈉、約50 ng/ml SCF、約50 ng/ml IL-7、約50 ng/ml

Flt3L、約100 ng/ml TPO、約15 μ M SB203580、約30 nM SDF-1 α 的 α MEM培養基。

【0238】 在生產包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體時，造血祖細胞可藉由貼壁培養或懸浮培養來培養。在一些實施例中，培養容器/培養皿塗佈有DLL1或DLL4，或DLL4或DLL1與Fc之融合蛋白或其類似物。DLL1或DLL4可為重組人類(rh)-DLL1或rh-DLL4。在一些實施例中，培養容器/培養皿塗佈有rh-DLL4/Fc嵌合體(Sino Biological)及重組人纖維蛋白片段(RetroNectin)(Takara Bio Inc)。在貼壁培養之情況下，可使用經塗佈之培養容器，及/或造血祖細胞可與飼養細胞及/或其類似者共同培養。用於共同培養之飼養細胞之實例包括骨髓基質細胞株OP9細胞(可購自Riken BioResource Center)。OP9細胞可較佳地為OP-DL1細胞，其恆定地表現Dl11 (Holmes R I及Zuniga-Pflucker JC. Cold Spring Harb Protoc. 2009(2))。在一些實施例中，在OP9細胞用作飼養細胞之情況下，可將單獨製備之Dl11或Dl11與Fc之融合蛋白或其類似物添加至培養基中以執行共同培養。在一些實施例中，Dl11可包括由具有NCBI寄存編號NM#005618 (在人類的情況下)或NCBI寄存編號NM#007865 (在小鼠的情況下)之核苷酸序列之基因編碼的蛋白質；及與此等蛋白質具有高序列一致性(例如，具有不低於90%之序列一致性)且具有等效功能的天然存在之突變體。在飼養細胞用於生產包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體的情況下，可在培養期間適當地置換飼養細胞。可藉由將經培養之個體細胞轉移至預先塗覆之飼養細胞上來實行飼養細胞之置換。可每五天、每四天、每三天或每兩天實行置換。

【0239】 在一些實施例中，用於培養用於生產包含CD4/CD8雙陽性

細胞之細胞群體之HP細胞堆的培養溫度條件為約37℃至約42℃，及約37℃至約39℃。在一些實施例中，可在低氧條件下實行培養。低氧條件之實例包括15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%及低於此等之氧濃度。熟習此項技術者可藉由監測包括CD4/CD8雙陽性細胞及/或其類似者的不同類型之細胞之數目來適當地確定培養時間期。培養時間期之實例包括不低於10天、不低於12天、不低於14天、不低於16天、不低於18天、不低於20天、不低於21天、不低於23天、不低於25天、不低於28天、不低於30天、不低於35天或不低於42天。在一些其他實施例中，自培養獲得之CD4/CD8雙陽性細胞為亦含有其他細胞物種(DP細胞堆)之細胞群體。

【0240】 在自包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體分離特定細胞類型(例如，CD4-/CD8+細胞)之群體的情況下，可使用包括(但不限於)CD4、CD8、CD3及CD45之任何一個指數實行分離，此視所分離之細胞類型而定。分離方法可為熟習此項技術者熟知之方法，例如其中用特定抗體(例如，CD4、CD8、CD3或CD45抗體)標記細胞且接著使用流式細胞儀分離的方法，或其中使用固定所需抗原之親和管柱或其類似者純化細胞的方法。

自包含CD4/CD8雙陽性細胞之細胞群體誘導CD56+/CD3-細胞的步驟

【0241】 在一些實施例中，NK細胞為CD56+/CD3-免疫細胞。

【0242】 在一些實施例中，NK細胞係藉由包含在補充有維生素C之培養基中培養包含CD4/CD8雙陽性細胞或DP細胞堆之細胞群體之步驟的方法生產。在一些實施例中，NK誘導培養基係用於生產CD56+/CD3-細胞。

【0243】 在一些實施例中，藉由將維生素C添加至用於培養動物細

胞之基本培養基來製備培養基。基本培養基之實例包括伊斯科夫氏改良杜爾貝科氏培養基(IMDM)、培養基199、伊格爾氏最低必需培養基(EMEM)、 α MEM培養基、杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、哈姆氏F12培養基、RPMI 1640培養基、費舍爾氏培養基及神經基質培養基(Life Technologies)，及此等培養基中之兩者或更多者之混合物。在一些實施例中，培養基含有血清。在一些實施例中，培養基不含血清。必要時，基本培養基亦可含有諸如以下物質中之一或多者：白蛋白、人類胰島素、人類運鐵蛋白、硒或亞硒酸鈉、脂肪酸、微量元素、2-巰基乙醇、硫醇甘油、脂質、胺基酸、麩醯胺酸、非必需胺基酸、維生素、生長因子、低分子量化合物、抗生素、抗氧化劑、丙酮酸、緩衝液、無機鹽及細胞介素。

【0244】 在一些實施例中，用於生產CD56陽性NK細胞之培養基進一步含有抗CD3抗體(UCHT1)及細胞介素。適合細胞介素之實例包括IL-2及IL-7。

【0245】 CD3抗體不受限制，只要其特異性識別CD3即可。在一些實施例中，CD3抗體在NK誘導培養基中之濃度為約10 ng/ml至1000 ng/ml，例如10 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/ml、600 ng/ml、700 ng/ml、800 ng/ml、900 ng/ml或1000 ng/ml。

【0246】 在一些實施例中，在與如上文所描述相同之條件下，維生素C係用於生產CD56陽性K細胞。

【0247】 在一些實施例中，IL-2在用於生產CD56陽性NK細胞之NK誘導培養基中的濃度為約1 U/ml至1000 U/ml，例如約1 U/ml、5 U/ml、

10 U/ml、20 U/ml、30 U/ml、40 U/ml、50 U/ml、60 U/ml、70 U/ml、80 U/ml、90 U/ml、100 U/ml、500 U/ml或1000 U/ml。在一些實施例中，IL-2在用於生產CD56陽性NK細胞之NK誘導培養基中的濃度為約1 ng/ml至100 ng/ml，例如1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml或100 ng/ml。

【0248】 在一些實施例中，IL-7在用於生產CD56陽性NK細胞之NK誘導培養基中的濃度為約1 ng/ml至100 ng/ml，例如1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml或100 ng/ml。

【0249】 在一些實施例中，用於培養包含用於生產CD56陽性NK細胞之CD4/CD8雙陽性細胞之群體的培養溫度條件為約37°C至約42°C，或約37°C至約39°C。熟習此項技術者可藉由監測CD56陽性NK細胞及/或其類似者之數目來適當地確定培養時間期。培養天數不受限制，只要可獲得CD56陽性NK細胞即可。培養時間期之實例包括至少不低於1天、不低於2天、不低於3天、不低於4天、不低於5天、不低於6天或不低於7天。

【0250】 在一些實施例中，可在進一步使用之前分離所獲得之CD56+ NK細胞。在一些其他實施例中，所獲得之CD56陽性NK細胞可用作亦含有其他細胞物種，包括T細胞(HP細胞堆)的細胞群體。

【0251】 在一些實施例中，NK細胞堆可包括50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%或超過90% NK細胞。在一些實施例中，NK細胞堆包括約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50% T細胞。在一些實施例中，NK細胞堆包括約75% CD56+/CD3- NK細胞及約

25% CD56+/CD3+ T細胞。在一些實施例中，NK細胞堆亦可包括B細胞及單核球。

【0252】 在分離CD56+ NK細胞之情況下，分離方法可為熟習此項技術者熟知之方法，例如其中用抗CD56抗體及抗CD3抗體標記細胞且接著使用流式細胞儀(螢光活化細胞分選)分離的方法，或其中使用固定所需抗原之親和管柱或其類似者純化細胞的方法。

【0253】 在一些實施例中，CD56陽性NK細胞為CD56+/CD3+。在一些實施例中，CD56陽性NK細胞為CD56+/CD3-。

CAR-NK細胞製備

【0254】 在一些實施例中，NK細胞經工程改造以包含一或多種轉殖基因。舉例而言，NK細胞可經基因工程改造以表現腫瘤定向嵌合抗原受體(CAR)，藉此生產抗腫瘤效應細胞。在一個實例中，NK細胞或iPS NK細胞可經工程改造以表現CAR。在一些實施例中，NK細胞之細胞前驅物經工程改造以表現CAR。舉例而言，在一些實施例中，iPS細胞經工程改造以表現CAR。在一些實施例中，HP細胞堆中之細胞經工程改造以表現CAR。在一些實施例中，NK細胞經工程改造以表現CAR。此外，在一些實施例中，此等轉殖基因受體可定向至非蛋白質衍生之腫瘤相關抗原。在某些實施例中，NK細胞或iPS NK細胞經修飾以包含至少一種CAR。在一些實施例中，單個CAR靶向兩種或更多種抗原。

【0255】 在一些實施例中，iNK細胞包括嵌合、非天然及經工程改造的受體。在一些實施例中，經工程改造之嵌合抗原受體(CAR)具有一種、兩種、三種、四種或更多種組分，且在一些實施例中，一或多種組分有助於淋巴球靶向或結合於一或多個包含腫瘤抗原之癌細胞。

【0256】 在一些實施例中，CAR一般包含至少一種包含至少一個胞外配體結合域的跨膜多肽及一種包含至少一個胞內傳訊域的跨膜多肽；使得多肽組裝在一起以形成嵌合抗原受體。

【0257】 如本文所使用，術語「胞外配體結合域」定義為能夠結合配體之寡肽或多肽。較佳地，該域將能夠與細胞表面分子相互作用。舉例而言，可選擇胞外配體結合域以識別在與特定疾病狀態相關之目標細胞上充當細胞表面標記物的配體。

【0258】 特定言之，胞外配體結合域可包含衍生自針對目標抗原之抗體的抗原結合域。

【0259】 在一些實施例中，NK細胞或iPS NK細胞可經基因修飾以表現一或多個嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，CAR包括靶向選自以下中之一或多者之腫瘤抗原的胞外配體結合域：CD44、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD89、CD123、CS-1、ROR1、間皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2、CEA、MAGE A3、TCR、EGFR、HER2/ERBB2/neu、EPCAM、EphA2、CEA、BCMA。在一些實施例中，腫瘤抗原為CD19。

【0260】 在一些實施例中，胞外配體結合域為包含藉由可撓性連接子接合的目標抗原特異性單株抗體之輕鏈(VL)及重鏈(VH)可變片段的單鏈抗體片段(scFv)。

【0261】 在一些實施例中，CAR包括跨膜域。在一些實施例中，跨膜域進一步包含胞外配體結合域與跨膜域之間的莖區。本文所使用之術語「莖區」一般意謂用於將跨膜域連接至胞外配體結合域的任何寡肽或多肽。特定言之，莖區係用於為胞外配體結合域提供更高的可撓性及可接近

性。莖區可包含至多300個胺基酸、10至100個胺基酸及/或25至50個胺基酸。莖區可衍生自天然存在之分子之全部或部分，諸如衍生自CD8、CD4或CD28之胞外區之全部或部分，或衍生自抗體恆定區之全部或部分。可替代地，莖區可為對應於天然存在之莖序列的合成序列，或可為完全合成的莖序列。在一較佳實施例中，該莖區為人類CD8 α 鏈之一部分。

【0262】 在一些實施例中，CAR含有訊息轉導域或胞內傳訊域，其在胞外配體結合域結合於目標之後促成胞內傳訊，從而引起iPS NK細胞之活化及免疫反應。術語「訊息轉導域」係指轉導效應子訊息功能訊息且導引細胞執行特定功能的蛋白質之部分。在一些實施例中，iPS NK細胞具有包括訊息轉導域之CAR。

【0263】 在一些實施例中，iPS NK細胞進一步經基因修飾以表現IL-15R α /IL-15複合物。

【0264】 在一些實施例中，跨膜多肽包含在免疫細胞之表面處(例如在iPS NK細胞上)表現的能力及一起相互作用以導引免疫細胞針對預定目標細胞之細胞反應的能力。包含胞外結和域及/或訊息轉導域的CAR之不同跨膜多肽一起相互作用以在與目標配體結合之後參與訊息轉導且誘導免疫反應。跨膜域可衍生自天然來源或合成來源。跨膜域可衍生自任何膜結合蛋白或跨膜蛋白。

【0265】 在一些實施例中，對NK細胞進行基因修飾以表現CAR可包括以下步驟：(1)合成對應於特定CAR之基因；(2)製備含有對應於CAR之基因的載體；及(3)用含有CAR基因之載體轉導CD56⁺ NK細胞。

【0266】 可引入編碼CAR之表現載體作為一或多個DNA分子或構築體，其中可存在將允許選擇含有構築體之宿主細胞的至少一種標記物。

【0267】 可以習知方式製備構築體，其中基因及調節區可在適當時分離、接合、在適當選殖宿主中選殖、藉由限制或定序或其他便利方式分析。特定言之，使用PCR，可分離包括功能單元之全部或部分的個別片段，其中可在適當時使用「引子修復」、接合、活體外突變誘發等引入一或多個突變。構築體一旦完成且顯示為具有適當序列，則可藉由任何便利方式引入至CTL中。構築體可整合且封裝於非複製缺陷型病毒基因體(如腺病毒、腺相關病毒(AAV)或單純疱疹病毒(HSV)或其他病毒，包括反轉錄病毒載體或慢病毒載體)中，以感染或轉導至細胞中。視需要，構築體可包括用於轉染之病毒序列。替代地，構築體可藉由融合、電穿孔、基因槍(biolistics)、轉染、脂質體轉染或其類似者引入。宿主細胞可在引入構築體之前在培養物中生長及擴增，隨後為用於引入構築體及整合構築體之適當處理。細胞接著擴增且藉助於構築體中存在之標記物進行篩選。可成功使用之各種標記物包括hprt、新黴素抗性、胸苷激酶、潮黴素抗性等。

【0268】 在一些情形下，可具有用於同源重組之目標位點，其中需要在特定基因座處整合構築體。舉例而言，可使用如此項技術中已知的用於同源重組的物質和方法基因敲除內源基因且用構築體編碼之基因(在相同的基因座或其他地方)置換該內源基因。對於同源重組，可使用OMEGA或O-載體。

【0269】 可引入構築體作為編碼至少CAR及視情況存在之另一基因的單個DNA分子，或具有一或多個基因的不同DNA分子。其他基因包括例如編碼治療性分子或自殺基因的基因。構築體可同時或連續引入，各自具有相同或不同標記物。

【0270】 可用於製備構築體DNA之儲備液且用於實行轉染的含有有

用元件(諸如細菌或酵母複製起點、可選及/或可擴增標記物、用於在原核生物或真核生物中表現之啟動子/強化子元件等)的載體為此項技術中已知的，且許多為可商購的。

使用方法

【0271】 根據本發明之細胞可用於治療有需要之患者的癌症、病毒感染或自體免疫病症。在另一實施例中，根據本發明之該經分離細胞可用於製造用於治療有需要之患者的癌症、病毒感染或自體免疫病症的藥物。

【0272】 本發明依賴於用於治療有需要之患者的方法，該方法包含以下步驟中之至少一者：(a)提供根據本發明之嵌合抗原受體細胞，及(b)向該患者投與細胞。

【0273】 該治療可為改善性、治癒性或預防性的。其可為自體免疫療法之部分或為同種異體免疫療法治療之部分。自體意謂用於治療患者之細胞、細胞株或細胞群體係源自該患者或源自人類白血球抗原(HLA)相容性供體。同種異體意謂用於治療患者之細胞或細胞群體並非源自該患者，而是源自供體。

【0274】 在一些實施例中，所描述細胞為同種異體的。在一些實施例中，所描述細胞為自體的。

【0275】 治療可用於治療診斷患有癌症、病毒感染、自體免疫性病症或移植物抗宿主疾病(GvHD)之患者。可治療之癌症包括並未血管化、尚未實質上血管化之腫瘤，以及血管化腫瘤。癌症可包含非實體腫瘤(諸如血液腫瘤，例如白血病及淋巴瘤)或可包含實體腫瘤。待用本發明之CAR治療的癌症之類型包括(但不限於)癌瘤、母細胞瘤及肉瘤，及某些白血病或淋巴惡性病、良性及惡性腫瘤及例如肉瘤、癌瘤與黑色素瘤之惡性

病。成人腫瘤/癌症及小兒腫瘤/癌症亦包括在內。

【0276】 在一些實施例中，治療與一或多種選自以下之群的針對癌症之療法組合：抗體療法、化學療法、細胞介素療法、樹突狀細胞療法、基因療法、激素療法、雷射光療法及輻射療法。

【0277】 在一些實施例中，可向經歷免疫抑制治療之患者投與該治療。

【0278】 在另一實施例中，與一或多種額外療法組合向患者投與細胞組合物。舉例而言，在一些實施例中，(例如，在投與之前、同時或之後)結合骨髓移植、使用化學治療劑(諸如氟達拉濱)、外部射線輻射療法(XRT)、環磷醯胺或抗體(諸如OKT3或CAM PATH)之T細胞消融療法向患者投與細胞組合物。在另一實施例中，在B細胞消融療法(諸如與CD20反應之試劑，例如美羅華(Rituxan))之後投與本發明之細胞組合物。舉例而言，在一個實施例中，個體可經歷使用高劑量化學療法之標準治療，隨後為周邊血液幹細胞移植。在某些實施例中，在移植後，個體接受本發明之擴增免疫細胞之輸注。在一額外實施例中，在手術之前或之後投與擴增之細胞。藉由本文所描述之方法中之任一者獲得的該等經修飾細胞可在本發明之特定態樣中用於治療有需要抵抗移植物抗宿主(HvG)排斥反應及移植物抗宿主疾病(GvHD)之患者；因此，在本發明之範圍內的為一種治療有需要抵抗移植物抗宿主(HvG)排斥反應及移植物抗宿主疾病(GvHD)之患者的方法，該方法包含藉由向該患者投與有效量的包含失活TCR α 及/或TCR β 基因之經修飾細胞來治療該患者。

投與細胞

【0279】 在一些實施例中，細胞可以廣泛多種方式引入至宿主生物

體，例如哺乳動物中。在特定實施例中，細胞可在腫瘤位點處引入，但在替代實施例中，細胞靶向癌症或經修飾以靶向癌症。所採用之細胞數目將視多種情況、引入目的、細胞壽命、所使用方案，例如投與次數、細胞繁殖能力、重組構築體之穩定性及其類似者而定。細胞可以分散液形式施加，通常在相關位點處或附近注射。細胞可在生理學上可接受的培養基中。在一個實例中，本發明之NK細胞或iPS NK細胞可表現一或多種CAR、TCR，或任何其他經工程改造之蛋白質或多肽域，諸如高親和力CD16。在一些實施例中，細胞經囊封以抑制免疫識別且置放於腫瘤位點處。

【0280】細胞可視需要投與。視所需反應、投與方式、細胞壽命、存在之細胞數目而定，可採用各種方案。投與次數將至少部分的視上文所描述之因素而定。

【0281】根據本發明之細胞或細胞群體之投與可以任何便利方式實行，包括藉由氣霧劑吸入、注射、攝取、輸注、植入或移植。可經皮下、皮內、瘤內、結節內、髓內、肌肉內、藉由靜脈內或淋巴管內注射，或經腹膜內向患者投與本文所描述之組合物。在一個實施例中，較佳地藉由靜脈內注射投與本發明之細胞組合物。

基於核酸之表現系統

【0282】在一些實施例中，本發明之NK細胞或iPS NK細胞可經工程改造以表現一或多種CAR、TCR，或任何其他經工程改造之蛋白質或多肽域，諸如高親和力CD16或CD19。產生包含此等多肽之表現載體的重組技術為此項技術中熟知且一般描述於下文中。

載體

【0283】術語「載體」用於指核酸序列可插入其中以引入至細胞中的載體核酸分子，在該細胞中，核酸序列可複製。核酸序列可為「外源的」，其意謂該核酸序列對於其中引入載體之細胞而言為外來的或該序列與細胞中之序列同源，但位於宿主細胞核酸中通常找不到該序列之位置。載體包括質體、黏質體、病毒(噬菌體、動物病毒及植物病毒)及人工染色體(例如，YAC)。熟習此項技術者將充分配備以經由標準重組技術構築載體(參見例如，Maniatis等人, 1988及Ausubel等人, 1994，兩者均以引用之方式併入本文中)。

【0284】術語「表現載體」係指包含編碼能夠轉錄之RNA之核酸的任何類型之基因構築體。在一些情況下，RNA分子接著轉譯成蛋白質、多肽或肽。在其他情況下，此等序列未轉譯，例如在生產反義分子或核糖核酸酶中。表現載體可含有多種「控制序列」，其係指用於轉錄及有可能轉譯特定宿主細胞中的可操作地連接之編碼序列所必需的核酸序列。除管控轉錄及轉譯之控制序列以外，載體及表現載體亦可含有發揮其他功能之核酸序列，且在下文描述。

啟動子及強化子

【0285】「啟動子」為控制序列，其核酸序列之區域，在該區域中，轉錄之起始及速率受到控制。其可含有調節蛋白質及分子可結合之基因元件，諸如RNA聚合酶及其他轉錄因子，以起始核酸序列之特異性轉錄。片語「以操作方式定位」、「以操作方式連接」、「在控制下」及「在轉錄控制下」意謂啟動子在相對於核酸序列的正確功能位置及/或定向中，以控制該序列之轉錄起始及/或表現。

【0286】啟動子一般包含用於定位RNA合成之起始位點的序列。此

之最佳已知實例為TATA盒，但在缺乏TATA盒之一些啟動子(諸如(例如)哺乳動物末端脫氧核苷酸轉移酶基因之啟動子及SV40晚期基因之啟動子)中，上覆於起始位點本身之離散元件有助於固定起始之位置。額外啟動子元件調節轉錄起始之頻率。通常，此等元件位於起始位點上游之30 110 bp區中，儘管已展示多個啟動子亦含有在起始位點下游之功能元件。為使編碼序列「在啟動子之控制下」，吾人將轉錄閱讀框架之轉錄起始位點之5'端置於所選擇啟動子之「下游」(亦即，3'端)。「上游」啟動子刺激DNA之轉錄且促進經編碼RNA之表現。

【0287】 啟動子元件之間的間距通常為靈活的，使得當元件相對於彼此倒置或移動時保留啟動子功能。在tk啟動子中，啟動子元件之間的間距可在活性開始下降之前增加至相隔50 bp。視啟動子而定，個別元件似乎可協作地或獨立地起活化轉錄作用。啟動子可或可不與「強化子」結合使用，該強化子係指涉及核酸序列之轉錄活化的順式作用調節序列。

【0288】 啟動子可為與核酸序列天然相關之一種啟動子，如可藉由分離位於編碼區段及/或外顯子上游之5'非編碼序列獲得。此類啟動子可稱為「內源的」。類似地，強化子可為與核酸序列天然相關，位於彼序列下游或上游之一種強化子。替代地，某些優勢將藉由將編碼核酸區段置放於重組或異源啟動子控制下來獲得，該重組或異源啟動子係指在其天然環境中通常不與核酸序列相關之啟動子。重組或異源強化子亦係指在其天然環境中通常不與核酸序列相關之強化子。此類啟動子或強化子可包括其他基因之啟動子或強化子，及自任何其他病毒或原核或真核細胞分離之啟動子或強化子，及不「天然存在」之啟動子或強化子，亦即含有不同轉錄調節區之不同元件，及/或更改表現之突變。舉例而言，最常用於重組DNA構

築中之啟動子包括內醯胺酶(青黴素酶)、乳糖及色胺酸(trp)啟動子系統。除合成地生產啟動子及強化子之核酸序列以外，可結合本文所揭示之組合物使用重組選殖及/或核酸擴增技術(包括PCR.TM.)來產生序列(參見美國專利第4,683,202號及第5,928,906號，各自以引用之方式併入本文中)。此外，經考慮，亦可採用導引非核細胞器(諸如粒線體、葉綠體及其類似物)內之序列之轉錄及/或表現的控制序列。

【0289】 自然地，使用有效導引DNA區段在選擇用於表現之細胞器、細胞類型、組織、器官或生物體中之表現的啟動子及/或強化子很重要。熟習分子生物學技術者一般知道啟動子、強化子及細胞型組合用於蛋白質表現之用途(參見例如，Sambrook等人1989，其以引用之方式併入本文中)。所採用啟動子可為組成性的、組織特異性的、誘導性的及/或適用於在適當條件下導引所引入之DNA區段的高含量表現，諸如在重組蛋白質及/或肽的大規模生產方面有利。啟動子可為異源或內源的。

【0290】 另外，亦可使用任何啟動子/強化子組合來驅動表現。另一可能實施例為使用T3、T7或SP6細胞質表現系統。若提供適當細菌聚合酶，則真核細胞可支援自某些細菌啟動子之細胞質轉錄，作為遞送複合物之部分或作為額外基因表現構築體。

【0291】 組織特異性啟動子或元件之一致性以及表徵其活性之分析為熟習此項技術者所熟知。

【0292】 亦可需要特定起始訊息以高效轉譯編碼序列。此等訊息包括ATG起始密碼子或相鄰序列。可能需要提供包括ATG起始密碼子之外源轉譯控制訊息。一般熟習此項技術者將容易地能夠判定此情形且提供必需的訊息。

【0293】 在本發明之某些實施例中，內部核糖體入口位點(IRES)元件之使用係用於產生多基因或多順反子信息，且此等元件可用於本發明中。

【0294】 載體可包括多選殖位點(MCS)，其為含有多個限制酶位點之核酸區域，其中任一者可與標準重組技術結合使用以消化載體。「限制酶消化」係指用僅在核酸分子中之特定位置處起作用的酶對核酸分子進行之催化裂解。許多此等限制酶為可商購的。此類酶之用途為熟習此項技術者廣泛理解。通常，使用在MCS內切割以使得外源序列能夠接合至載體的限制酶將載體線性化或片段化。「接合」係指在兩個核酸片段之間形成磷酸二酯鍵之過程，該等核酸片段可彼此鄰接或可不彼此鄰接。涉及限制酶及接合反應之技術為重組技術之熟習此項技術者所熟知。

【0295】 亦可採用剪接位點、終止訊息、複製起點及可選標記物。

質體載體

【0296】 考慮將質體載體用於轉型宿主細胞。一般而言，含有衍生自與宿主細胞相容之物種的複製子及控制序列的質體載體將與此等宿主結合使用。載體通常攜帶複製位點以及能夠在轉型細胞中提供表型選擇之標記序列。在非限制性實例中，大腸桿菌(*E. coli*)常常使用pBR322之衍生物(衍生自大腸桿菌物種之質體)轉型。pBR322含有安比西林(ampicillin)及四環素抗性基因且因此提供用於鑑別轉型細胞的簡單方法。pBR質體或其他微生物質體或噬菌體亦必須含有或經修飾含有例如可供微生物體使用以供表現其自身蛋白質的啟動子。

【0297】 此外，含有與宿主微生物相容之複製子及控制序列的噬菌體載體可作為轉型載體與此等宿主結合使用。舉例而言，噬菌體 λ

GEM.TM. 11可用於製備重組噬菌體載體，該重組噬菌體載體可用於轉型宿主細胞，諸如大腸桿菌LE392。

【0298】 其他有用的質體載體包括pIN載體(Inouye等人, 1985)；及pGEX載體，以用於產生麩胱甘肽S轉移酶(GST)可溶性融合蛋白以進行後續純化及分離或裂解。其他適合的融合蛋白為具有半乳糖苷酶、泛素及其類似物之彼等。

【0299】 包含表現載體之細菌宿主細胞(例如，大腸桿菌)在多種適合的培養基(例如，LB)中之任一者中生長。如熟習此項技術者將理解，可藉由使宿主細胞與對某些啟動子具有特異性之試劑接觸，例如藉由將IPTG添加至培養基或藉由將培育切換至更高溫度來誘導重組蛋白在某些載體中之表現。在培養細菌持續一段時間之後，一般在2與24小時之間，藉由離心收集細胞且洗滌該等細胞以移除殘餘培養基。

病毒載體

【0300】 某些病毒經由受體介導之內吞作用感染細胞或進入細胞且整合至宿主細胞基因體中並穩定且有效表現病毒基因的能力使其成為用於將外源核酸轉移至細胞(例如，哺乳動物細胞)中的有吸引力的候選者。本發明之組分可為編碼一或多種CAR、TCR之病毒載體，或任何其他工程改造之蛋白質或多肽域，諸如本發明之高親和力CD16。下文描述可用於遞送本發明之核酸的病毒載體之非限制性實例。

腺病毒載體

【0301】 遞送核酸之特定方法涉及使用腺病毒表現載體。儘管已知腺病毒載體整合至基因體DNA中之能力較低，但此特徵由此等載體提供之高效基因轉移配衡。「腺病毒表現載體」意欲包括含有腺病毒序列之彼

等構築體，該等腺病毒序列足以(a)支援構築體封裝及(b)最終表現已選殖於其中之組織或細胞特異性構築體。對基因組織或腺病毒(36 kb線性雙股DNA病毒)之瞭解允許用至多7 kb外來序列取代腺病毒DNA之大片段(Grunhaus及Horwitz, 1992)。

AAV載體

【0302】 可使用腺病毒輔助轉染將核酸引入至細胞中。已在使用腺病毒偶合系統之細胞系統中報導了增加的轉染效率(Kelleher及Vos, 1994；Cotten等人, 1992; Curiel, 1994)。腺相關病毒(AAV)為用於本發明之細胞中的有吸引力的載體系統，因為其具有高整合頻率且其可感染非分裂細胞，因此使得其可用於例如在組織培養(Muzyczka, 1992)或活體內將基因遞送至哺乳動物細胞中。AAV具有廣泛的感染性宿主範圍(Tratschin等人, 1984；Laughlin等人, 1986；Lebkowski等人, 1988；McLaughlin等人, 1988)。關於rAAV載體之產生及使用的細節描述於美國專利第5,139,941號及第4,797,368號，其各自以引用之方式併入本文中。

反轉錄病毒載體

【0303】 反轉錄病毒由於其將其基因整合至宿主基因體中、轉移大量外來基因物質、感染廣泛範圍之物種及細胞類型及封裝於特殊細胞株中的能力而用作遞送載體(Miller, 1992)。

【0304】 為構築反轉錄病毒載體，將核酸(例如，一種編碼所需序列之核酸)代替某些病毒序列插入至病毒基因體中，以生產複製缺陷型病毒。為生產病毒粒子，構築含有gag、pol及env基因但無LTR及封裝組分的封裝細胞株(Mann等人, 1983)。當將含有cDNA之重組質體連同反轉錄病毒LTR及封裝序列一起引入至特殊細胞株中(例如，藉由例如磷酸鈣沈

澱)時，封裝序列使得重組質體之RNA轉錄物封裝於病毒顆粒中，該等病毒顆粒接著分泌於培養基中(Nicolas及Rubenstein, 1988；Temin, 1986；Mann等人, 1983)。接著收集含有重組反轉錄病毒之培養基，視情況濃縮且用於基因轉移。反轉錄病毒載體能夠感染廣泛多種細胞類型。然而，整合及穩定表現需要分裂宿主細胞(Paskind等人, 1975)。

【0305】 慢病毒為複合反轉錄病毒，除常見反轉錄病毒基因gag、pol及env以外，該等慢病毒含有其他具有調節或結構性功能之基因。慢病毒載體為此項技術中所熟知的(參見例如，Naldini等人, 1996；Zufferey等人, 1997；Blomer等人, 1997；美國專利第6,013,516號及第5,994,136號)。慢病毒之一些實例包括人類免疫缺乏病毒：HIV-1、HIV-2，及猿猴免疫缺乏病毒：SIV。慢病毒載體已藉由多次緩解HIV毒性基因產生，例如基因env、vif、vpr、vpu及nef缺失使得載體在生物學上為安全的。

【0306】 重組慢病毒載體能夠感染非分裂細胞，且可用於活體內及離體基因轉移及核酸序列之表現。舉例而言，美國專利第5,994,136號中描述了能夠感染非分裂細胞之重組慢病毒，其中適合的宿主細胞經兩個或更多個攜帶封裝功能之載體轉染，亦即gag、pol及env，以及rev及tat，該專利以引用之方式併入本文中。吾人可藉由將包膜蛋白與用於靶向特定細胞類型之受體的抗體或特定配體連接來靶向重組病毒。舉例而言，藉由將相關序列(包括調節區)連同編碼特定目標細胞上之受體之配體的另一基因一起插入至病毒載體中，載體目前為目標特異性的。

組合療法

【0307】 在本發明之某些實施例中，將用於臨床態樣之本發明方法與有效治療過度增殖性疾病之其他試劑(諸如抗癌試劑)組合。「抗癌」試

劑能夠不利地影響個體中之癌症，例如藉由殺死癌細胞、誘導癌細胞之細胞凋亡、降低癌細胞之生長速率、降低轉移瘤之發生率或數目、減小腫瘤大小、抑制腫瘤生長、減少對腫瘤或癌症細胞之血液供應、促進針對癌細胞或腫瘤之免疫反應、預防或抑制癌症進展或增加患有癌症之個體之壽命。更一般而言，此等其他組合物將以有效殺死或抑制細胞增殖之組含量提供。此方法可涉及使癌細胞與表現構築體及試劑或多個因子同時接觸。此可藉由使細胞與單一組合物或包括兩種試劑之藥理學調配物接觸，或藉由使細胞與兩種不同組合物或調配物同時接觸來實現，其中一種組合物包括表現構築體且另一種包括第二試劑。

【0308】 腫瘤細胞對化學療法及放射療法試劑具有抗性代表臨床腫瘤學中之主要問題。當前癌症研究之一個目標為找到藉由將化學療法及放射療法與其他療法組合來改良化學療法及放射療法之功效的方法。在本發明之上下文中，預期細胞療法可類似地與化學治療、放射性治療或免疫治療干預以及促凋亡或細胞週期調節劑結合使用。

【0309】 替代地，療法可以範圍介於數分鐘至數週之時間間隔在其他試劑治療之前或之後。在將其他試劑及本發明單獨施加至個體的實施例中，吾人將通常確保顯著時間期不會在各遞送之時間之間到期，使得試劑及本發明療法將仍能夠對細胞發揮有利的組合作用。在此類情形下，經考慮，吾人可在彼此的約12-24小時內，且更佳在彼此的約6-12小時內以兩種模態接觸細胞。然而，在一些情況下，可能需要顯著地延長治療時間期，其中在各別投與之間會流逝若干天(2、3、4、5、6或7天)至若干週(1、2、3、4、5、6、7或8週)。

【0310】 在一些實施例中，視需要重複治療週期。亦預期，各種標

準療法以及手術干預可與本發明細胞療法組合施加。

化學療法

【0311】 癌症療法亦包括具有基於化學及輻射治療之多種組合療法。組合化學療法包括例如阿布拉生(abraxane)、六甲蜜胺(altretamine)、多西他賽(docetaxel)、赫賽汀(herceptin)、甲胺喋呤(methotrexate)、諾凡特龍(novantrone)、諾雷德(zoladex)、順鉑(cisplatin) (CDDP)、卡鉑(carboplatin)、丙卡巴肼(procarbazine)、甲氯芥(mechlorethamine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、喜樹鹼(camptothecin)、異環磷醯胺(ifosfamide)、美法侖(melphalan)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、白消安(busulfan)、亞硝基脲(nitrosurea)、放線菌素(dactinomycin)、道諾黴素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、博萊黴素(bleomycin)、普卡黴素(plicomycin)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide) (VP16)、他莫昔芬(tamoxifen)、雷諾昔酚(raloxifene)、雌激素受體結合劑、紫杉醇(taxol)、吉西他濱(gemcitabine)、溫諾平(navelbine)、法呢基蛋白轉移酶(farnesyl-protein transferase)抑制劑、反鉑(transplatinum)、5-氟尿嘧啶、長春新鹼(vincristin)及長春鹼(vinblastin)，或前述之任何類似物或衍生物變體，及其組合。

【0312】 在特定實施例中，用於個體之化學療法與本發明結合使用，例如在本發明投與之前、期間及/或之後。

放射療法

【0313】 引起DNA損傷且已廣泛使用的其他因素包括通常稱為 γ 射線、X射線及/或將放射性同位素定向遞送至腫瘤細胞的因素。亦涵蓋其他

形式之DNA損傷因素，諸如微波及UV輻照。最可能之情形為，所有此等因素對DNA、DNA之前驅物、DNA之複製及修復，及染色體之組裝及維持造成大範圍損傷。X射線之劑量範圍在延長的時間期(3至4週)期間50至200倫琴(roentgen)日劑量至2000至6000倫琴之單次劑量範圍內。放射性同位素之劑量範圍變化極大，且視同位素之半衰期、所發射輻射之強度及類型及贅生性細胞之吸收而定。

【0314】 當應用於細胞時，術語「接觸」及「暴露」在本文中用於描述治療性構築體及化學治療劑或放射性治療劑藉以遞送至目標細胞或與目標細胞直接併接地置放的過程。為達成細胞殺死或鬱滯，兩種藥劑均以有效殺死細胞或防止其分裂之組合量遞送至細胞。

免疫療法

【0315】 免疫治療劑通常依賴於使用免疫效應細胞及分子以靶向及摧毀癌細胞。免疫效應子可為例如對腫瘤細胞表面上之一些標記物具有特異性的抗體。單獨的抗體可充當療法之效應子或其可募集其他細胞以實際上實現細胞殺死。抗體亦可共軛至藥物或毒素(化學治療劑、放射性核種、蓖麻毒素A鏈、霍亂毒素、百日咳毒素等)且僅用作靶向劑。替代地，效應子可為攜帶直接或間接與腫瘤細胞目標相互作用之表面分子的淋巴球。各種效應細胞包括細胞毒性T細胞及NK細胞。

【0316】 因此，除本文所描述之本發明療法以外的免疫療法可與本發明細胞療法結合用作組合療法之部分。下文論述用於組合療法之通用方法。一般而言，腫瘤細胞必須帶有一些適合於標靶，亦即不存在於大部分其他細胞上的標記物。存在許多腫瘤標記物，且任何此等標記物可適用於在本發明之情形下標靶。常見腫瘤標記物包括PD-1、PD-L1、CTLA4、

癌胚抗原、前列腺特異性抗原、泌尿腫瘤相關抗原、胚胎抗原、酪胺酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸路易斯抗原(Sialyl Lewis Antigen)、MucA、MucB、PLAP、雌激素受體、層黏連蛋白受體、erb B及p155。

基因

【0317】在又一實施例中，輔助治療為基因療法，其中在本發明臨床實施例之前、之後或同時投與治療性聚核苷酸。本發明涵蓋多種表現產物，包括細胞增殖之誘導劑、細胞增殖之抑制劑或程式化細胞死亡之調節劑。

手術

【0318】大致60%患有癌症的人將經歷一些類型之手術，其包括預防性、診斷或分期、治癒性及姑息性手術。治癒性手術為可與其他療法結合使用之癌症治療，諸如本發明之治療、化學療法、放射療法、激素療法、基因療法、免疫療法及/或替代療法。

【0319】治癒性手術包括切除，其中物理上移除、切除及/或破壞癌組織之全部或部分。腫瘤切除係指物理移除腫瘤之至少部分。除腫瘤切除以外，手術治療包括雷射手術、冷凍手術、電手術及顯微鏡控制手術(莫氏手術(Mohs'surgery))。進一步預期，本發明可與移除淺表癌症、初癌或附帶量之正常組織結合使用。

【0320】在切除一部分或所有癌細胞、組織或腫瘤後，可在體內形成空腔。治療可藉由用額外抗癌療法對該區域灌注、直接注射或局部施用來實現。可例如每1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天，或每1週、2週、3週、4週及5週，或每1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個

月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月或12個月重複此類治療。此等治療亦可具有不同劑量。

實例

【0321】 本發明之其他特徵、目標及優勢在以下實例中顯而易見。然而，應理解，實例雖然指示本發明之實施例，但僅以說明而非限制之方式給出。對於熟習此項技術者而言，本發明之範疇內的各種改變及修改將自實例變得顯而易見。

實例1. 將iPS細胞分化成HP細胞堆

【0322】 FfI-01s04菌株(iPS細胞菌株)係來源於健康個體之周邊血液單核細胞。在低氧(5% O₂)條件下，將分散於StemFit完全培養基中之FfI-01s04細胞以 6×10^5 個細胞/孔接種於超低黏附治療之6孔盤中(「第0天」)。StemFit完全培養基包括10 μ M CHIR99021及50 μ M Y-27632。次日(亦即，第1天)，將FfI-01s04細胞分散於含有BMP4 (50 ng/ml)、VEGF (50 ng/ml)、bFGF (50 ng/ml)及抗壞血酸2-磷酸鹽(50 μ g/ml)之造血祖細胞(HPC)分化培養基中。HPC誘導培養基包括補充有人類胰島素(10 μ g/ml)、人類運鐵蛋白(5.5 μ g/ml)、亞硒酸鈉(6.7 ng/ml)、L-麩醯胺酸(2 mM)及 α -單硫代甘油(0.4 mM)之StemPro34。在第2天，將SB431542 (在培養基中以6 μ M)添加至培養基(亦即，含有細胞之HPC分化培養基)中，且將細胞培養2天。第4天，將細胞再分散於含有VEGF (50 ng/ml)、bFGF (50 ng/ml)、SCF (50 ng/ml)及抗壞血酸2-磷酸鹽(50 μ g/ml)之另一培養基中，且再培養3天。在第7天，使細胞暴露於含有VEGF (50 ng/ml)、bFGF(50 ng/ml)、SCF(50 ng/ml)、抗壞血酸2-磷酸鹽(50 μ g/ml)、TPO (30 ng/ml)及Flt3L (10 ng/ml)之另一培養基，且使用此培養基培養額外7

天。在此7天培養時間期期間，每2-3天更換培養基。

實例2. 將HP細胞堆分化成包含CD4/CD8細胞之群體

在第14天，將自實例1獲得且未經歷任何細胞分離之細胞群體(「HP細胞堆」)以 3.12×10^6 個細胞/培養皿接種於15 cm培養皿中，且在5% O₂下在37°C下培養。應注意，可使用各種接種密度，且前述接種密度為一個實施例。各15 cm培養皿塗佈有rh-DLL4/Fc嵌合體(Sino Biological)及重組人纖維蛋白片段(Takara Bio Inc)。在此培養時間期期間，每2-3天更換培養基。將補充有15% FBS、4 mM L-麩醯胺酸、100 U/ml青黴素、100 µg/ml鏈黴素、55 µM 2-巰基乙醇、50 µg/ml抗壞血酸2-磷酸鹽、10 µg/ml人類胰島素、5.5 µg/ml人類運鐵蛋白、6.7 ng/ml亞硒酸鈉、50 ng/ml SCF、50 ng/ml IL-7、50 ng/ml Flt3L、100 ng/ml TPO、15 µM SB203580、30 nM SDF-1 α 之MEM α (Thermo Fisher Scientific (Gibco))用作培養基以培養此等細胞。在第21天，使細胞繼代至新的15 cm新近塗佈有hDLL4/重組人纖維蛋白片段之培養皿。在第28天，使細胞進一步繼代至新的15 cm新近塗佈有hDLL4/重組人纖維蛋白片段之培養皿。在第35天，尤其收穫包括CD4/CD8細胞(「DP細胞堆」)之所有細胞。

實例3. 將DP細胞堆分化成NK細胞堆

【0323】 在第35天，將DP細胞堆(亦即，自實例2獲得且未經歷任何細胞分離之細胞)以 1×10^6 個細胞/孔接種於48孔盤中，且在5% CO₂下在37°C下培養三天。將補充有15% FBS、4 mM L-麩醯胺酸、100 U/ml青黴素、100 ng/ml鏈黴素、50 µg/ml抗壞血酸2-磷酸鹽、10 µg/ml人類胰島素、5.5 µg/ml人類運鐵蛋白、6.7 ng/ml亞硒酸鈉、500 ng/ml抗CD3抗體(UCHT1)、10 ng/ml IL-2及10 ng/ml IL-7之MEM α 培養基用作培養基。在

第38天，將細胞分散於用作培養基的補充有15% FBS、4 mM L-麩醯胺酸、100 U/ml青黴素、100 ng/ml鏈黴素、50 µg/ml抗壞血酸2-磷酸鹽、10 µg/ml人類胰島素、5.5 µg/ml人類運鐵蛋白、6.7 ng/ml亞硒酸鈉、10 ng/ml IL-2及10 ng/ml IL-7之另一MEMα培養基中。在第42天，收穫包括NK細胞(「NK細胞堆」)之所有細胞。

實例4. 流式細胞量測術分析

【0324】 接著用表1中所列出之一組抗體對NK細胞堆進行染色且藉由流式細胞量測術進行分析。如圖1中所展示，CD3陰性NK細胞堆之一部分表現CD56 (「CD56陽性免疫細胞」)。圖1. CD56陽性及CD3陰性免疫細胞為自然殺手細胞(NK細胞)。因此，CD56陽性及CD3陰性免疫細胞係由衍生自iPS細胞(FfI-01s04菌株)之HP細胞堆製備。在上述方法中獲得的表現CD56之細胞有時稱為iPS NK細胞。用於流式細胞量測術之抗體展示於表1中。

表1：

抗CD3抗體	CD3 BioLegend APC/Cy7
抗CD56抗體	CD56 Biolegend PE

實例5. 單細胞RNA序列(scRNAseq)分析

【0325】 為鑑別NK細胞堆群體(亦即，實例3中獲得之細胞)中之不同細胞類型，應用非線性降維技術(基於單細胞RNA-seq (scRNAseq)之均勻流形近似及投影(uniform manifold approximation and projection；UMAP))。

【0326】 使來自NK細胞堆之一萬個細胞在Genewiz之Illumina NextSeq 500上經受單細胞RNA-定序。使用SingleR演算法及人工集群標記，將事件分為PBMC樣品中之四個廣泛細胞群體：單核球、B細胞、NK

細胞及T細胞。可自10X Genomics自由獲得之PBMC資料集用作用於資料分析之對照。

【0327】 如圖2中所展示，NK細胞堆中約75%之細胞經鑑別為NK細胞，而NK細胞堆中約25%之細胞經鑑別為T細胞。因此，基於藉由單細胞RNA-定序之mRNA分析，NK細胞堆包括NK細胞及T細胞兩者。

實例6. CAR-NK細胞製備

【0328】 NK細胞進一步經修飾以表現一或多種CAR。NK細胞修飾包括以下步驟：(1)合成抗CD19 CAR基因及IL-15R α /IL-15基因；(2)製備含有抗CD19 CAR基因及IL-15R α /IL-15基因之反轉錄病毒載體；及(3)用含有抗CD19 CAR基因及IL-15R α /IL-15基因之反轉錄病毒載體轉導NK細胞。

CAR/IL15-NK細胞製備

【0329】 藉由合成經設計以自N端排列之寡肽來製備抗CD19 CAR基因，如表2中所展示。

表2：

自N端之序列	基因	胺基酸數目
1	免疫球蛋白之重鏈之前導序列	22
2	抗CD19抗體(FMC60)之輕鏈中之可變域	104
3	GGGS連接子	15
4	抗CD19抗體(FMC60)之重鏈中之可變域	120
5	CD8衍生之序列(含有跨膜域)	83
6	4-1BB之胞內域	47
7	CD3 ζ 之胞內域	112

【0330】 根據WO2014/153270構築抗CD19 CAR，其以全文引用之方式併入本文中。

製備IL-15R α /IL-15基因

【0331】 藉由合成經設計以自N端排列之寡肽來製備IL-15R α /IL-15

基因。IL-15R α /IL-15係根據以下來構築：Mortier等人, 2006, The Journal of Biological Chemistry, 第281卷, 第3期, 第1612-1619頁, 2006年1月20日；Chertova等人, The Journal of Biological Chemistry, 第288卷, 第25期, 第18093-18103頁, 2013年6月21日；及Rowley等人, Eur J Immunol, 2009年2月; 39(2):491-506，其中之每一者以其全文引用之方式併入本文中。

表4：

自N端之序列	基因	胺基酸數目
1	人類IL-2之前導序列	23
2	人類IL-15之C端序列	114
3	GGGS連接子	24
4	人類IL-15RA之C端序列	239

製備含有抗CD19 CAR基因之反轉錄病毒載體

【0332】 將抗CD19 CAR基因併入至pMY反轉錄病毒載體之多選殖位點中。使用FRY-RD18細胞產生反轉錄病毒載體以用於生產反轉錄病毒載體。

製備含有抗IL-15R α /IL-15基因之反轉錄病毒載體

【0333】 將IL-15R α /IL-15基因併入至另一pMY反轉錄病毒載體之多選殖位點中。使用FRY-RD18細胞產生反轉錄病毒載體以用於生產反轉錄病毒載體。

將抗CD19 CAR基因及IL-15R α /IL-15基因轉導成iPS NK細胞

【0334】 用含有抗CD19 CAR基因之反轉錄病毒載體及含有IL-15R α /IL-15基因之反轉錄病毒載體轉導iPS NK細胞，以產生表現抗CD19 CAR之iPS NK細胞(「iNK-CAR19」)。

實例7. iNK-CAR19之活體內抗腫瘤活性

【0335】 將表現螢光素酶之Nalm6細胞(ATCC；癌細胞) (5×10^5 個

細胞)經由尾部靜脈移植至NOD/Shi-scid, IL-2R γ 剔除型小鼠(「NSG小鼠」)中。NSG小鼠，雄性，4-5週齡，來源於傑克遜實驗室(Jackson Laboratory)。移植Nalm6細胞後四天，經由尾部靜脈向移植Nalm6之NSG小鼠投與分散於0.2 ml PBS或僅0.2 ml無細胞之PBS中的iNK-CAR19 (1×10^7 個細胞)。在投與iNK-CAR19細胞或PBS之後，經由尾部靜脈向小鼠投與螢光素。使用IVIS成像系統(PerkinElmer)量測螢光素酶活性超過70天。

【0336】 圖3展示未經治療(僅用緩衝液治療)及經iNK-CAR19細胞治療之Nalm6-移植之NSG小鼠的抗腫瘤功效。僅在三天之後，在用D-PBS緩衝液治療之所有小鼠中偵測到發光。相反，直至投與後28天，在其他小鼠(用原代CAR T細胞或iNK-CAR細胞治療)中未偵測到發光，且甚至在治療後70天，在用iNK-CAR19細胞治療之一隻小鼠中未偵測到發光。因此，iNK-CAR19細胞清楚地顯示增強的針對Nalm6癌細胞之毒性。

等效物及範疇

【0337】 熟習此項技術者將認識到或能夠僅使用常規實驗即可確定本文所描述之本發明特定實施例之許多等效物。本發明之範疇並不意欲限於以上描述，而是如以下申請專利範圍中所闡述。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種生產富潛能幹細胞衍生之NK細胞的方法，其包含：

(A)於成堆細胞培養基(bulk cell medium)中提供包含衍生自富潛能幹細胞之造血祖細胞(HPC)之成堆細胞群體(HP細胞堆)，

(B)在包含p38抑制劑及SDF-1之CD4+/- CD8+/-誘導培養基中培養該HP細胞堆以獲得CD4+/-及CD8+/-之異質細胞群體(DP細胞堆)，及

(C)在選自由CD3活化劑、IL-2及IL7組成之群之至少一種化合物存在下培養該DP細胞堆以獲得NK細胞，

其中步驟(C)不包括自該DP細胞堆分離CD4+/CD8+細胞之步驟，且步驟(C)產生大於50%之NK細胞。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該方法不在步驟(A)及(B)中包括細胞分離步驟。

【請求項3】

如請求項1之方法，其中(A)中之該HP細胞堆包含CD34+細胞。

【請求項4】

如請求項3之方法，其中該HP細胞堆中20%或更多之細胞為CD34+細胞。

【請求項5】

如請求項4之方法，其中20%與90%之間的該HP細胞堆為CD34+細胞。

【請求項6】

如請求項1之方法，其中：

步驟(B)包含在CD4/CD8誘導培養基中培養該HP細胞堆以產生包含CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8-及CD4+/CD8+細胞之中間異質細胞群體；及

步驟(C)包含在NK誘導培養基中培養該中間異質細胞群體以生產該等CD56+/CD3-細胞。

【請求項7】

如請求項1之方法，其中步驟(B)不包括分離CD4+/CD8+細胞之步驟。

【請求項8】

如請求項1之方法，其中步驟(A)包含在HPC誘導培養基中培養富潛能幹細胞以生產HP細胞堆。

【請求項9】

如請求項1之方法，其中該等富潛能幹細胞為經誘導之富潛能幹細胞(iPSC)。

【請求項10】

如請求項8之方法，其中該HPC誘導培養基包含至少一種選自以下之化合物：骨形態發生蛋白-4 (BMP4)、血管內皮生長因子(VEGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、抗壞血酸、Flt3配體(Flt3L)、血小板生成素(TPO)及TGF β 抑制劑。

【請求項11】

如請求項10之方法，其中該HPC誘導培養基包含骨形態發生蛋白-4 (BMP4)、血管內皮生長因子(VEGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、

抗壞血酸、Flt3配體(Flt3L)、血小板生成素(TPO)及TGFβ抑制劑。

【請求項12】

如請求項11之方法，其中該HPC誘導培養基包含：

濃度在5 ng/mL至500 ng/ml之間的BMP4；

濃度在5 ng/ml至500 ng/ml之間的VEGF；

濃度在5 ng/ml至500 ng/ml之間的bFGF；

濃度在5 µg/ml至500 µg/ml之間的抗壞血酸；

濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的Flt3L；及

濃度在1 ng/ml至200 ng/ml之間的TPO。

【請求項13】

如請求項12之方法，其中：

該BMP4之濃度為50 ng/ml；

該VEGF之濃度為50 ng/ml；

該bFGF之濃度為50 ng/ml；

該抗壞血酸之濃度為50 µg/ml；

該Flt3L之濃度為50 ng/ml；及

該TPO之濃度為100 ng/ml。

【請求項14】

如請求項1之方法，其中步驟(B)的該CD4/CD8誘導培養基進一步包含抗壞血酸、幹細胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L及血小板生成素(TPO)。

【請求項15】

如請求項14之方法，其中該CD4/CD8誘導培養基包含：

濃度在5 µg/ml至500 µg/ml之間的抗壞血酸；

濃度在5 ng/ml至100 ng/ml之間的SCF；
濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的IL-7；
濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的Flt3L；及
濃度在1 ng/ml至200 ng/ml之間的TPO。

【請求項16】

如請求項15之方法，其中：
該抗壞血酸之濃度為50 µg/ml；
該SCF之濃度為50 ng/ml；
該IL-7之濃度為50 ng/ml；
該Flt3L之濃度為50 ng/ml；及
該TPO之濃度為100 ng/ml。

【請求項17】

如請求項1之方法，其中步驟(B)的該CD4/CD8誘導培養基包含：
濃度在0.5 µM至100 µM之間的p38抑制劑；及
濃度在10 ng/ml至100 ng/ml之間的SDF-1抑制劑。

【請求項18】

如請求項17之方法，其中該p38抑制劑為SB203580。

【請求項19】

如請求項18之方法，其中該SB203580之濃度為15 µM。

【請求項20】

如請求項17之方法，其中該SDF-1抑制劑之濃度為30 nM。

【請求項21】

如請求項1之方法，其中步驟(C)包含使用包含CD3活化劑、IL-2及

IL7之NK誘導培養基。

【請求項22】

如請求項21之方法，其中該NK誘導培養基包含：

濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的IL-2；及

濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的IL-7。

【請求項23】

如請求項22之方法，其中：

該IL-2之濃度為10 ng/ml；及

該IL-7之濃度為10 ng/ml。

【請求項24】

如請求項1之方法，其中各培養步驟在約5%氧氣下執行。

【請求項25】

如請求項1之方法，其中各培養步驟在3%至6%之間的氧氣下執行。

【請求項26】

如請求項8之方法，其中在該成堆細胞培養基中培養富潛能幹細胞以獲得HP細胞堆持續大於10天。

【請求項27】

如請求項26之方法，其中在該成堆細胞培養基中培養富潛能幹細胞以獲得HP細胞堆持續11天與15天之間。

【請求項28】

如請求項27之方法，其中在該成堆細胞培養基中培養富潛能幹細胞以獲得HP細胞堆持續14天。

【請求項29】

如請求項9之方法，其中該等iPSC係獲自周邊血液單核細胞。

【請求項30】

如請求項1之方法，其中至少50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或更多之所生產細胞為CD56+/CD3-細胞，而無需富集步驟。

【請求項31】

如請求項30之方法，其中小於25%之所生產細胞為CD3+細胞。

【請求項32】

如請求項30之方法，其中藉由流式細胞量測術來測定所生產細胞之百分比。

【請求項33】

如請求項30之方法，其中藉由單細胞RNA定序(scRNAseq)來測定所生產細胞之百分比。

【請求項34】

如請求項1之方法，其中該等NK細胞經基因修飾以表現一或多個嵌合抗原受體(CAR)。

【請求項35】

如請求項34之方法，其中表現一或多個嵌合抗原受體(CAR)之該等NK細胞係經分離。

【請求項36】

如請求項35之方法，其中該抗原為CD19。

【請求項37】

如請求項34之方法，其中該等細胞進一步經基因修飾以表現IL-

15R α /IL-15複合物。

【請求項38】

一種生產經誘導之富潛能幹細胞(iPSC)衍生之NK細胞的方法，其包含以下步驟：

(1)在包含血管內皮生長因子(VEGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)及抗壞血酸之HPC誘導培養基中培養iPSC，以獲得包含造血祖細胞(HPC)之異質細胞群體(HP細胞堆)；

(2)在包含抗壞血酸、p38抑制劑及SDF-1的CD4/CD8誘導培養基中培養(1)中獲得之該HP細胞堆以獲得CD4 $^{+/-}$ 及CD8 $^{+/-}$ 之中間異質細胞群體 (DP細胞堆)；及

(3)在包含IL-2及/或IL-7的NK誘導培養基中培養來自(2)之該中間異質細胞群體以獲得NK細胞，

其中步驟(3)不包括自該DP細胞堆分離CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 細胞之步驟，且步驟(3)產生大於50%之NK細胞。

【請求項39】

如請求項38之方法，其中該HPC誘導培養基進一步包含選自骨形態發生蛋白-4 (BMP4)、Flt3配體(Flt3L)、血小板生成素(TPO)及TGF β 抑制劑之至少一種化合物。

【請求項40】

如請求項39之方法，其中該HPC誘導培養基進一步包含骨形態發生蛋白-4 (BMP4)、Flt3配體(Flt3L)、血小板生成素(TPO)及TGF β 抑制劑。

【請求項41】

如請求項40之方法，其中該HPC誘導培養基包含：

濃度在5 ng/mL至500 ng/ml之間的BMP4；
濃度在5 ng/ml至500 ng/ml之間的VEGF；
濃度在5 ng/ml至500 ng/ml之間的bFGF；
濃度在5 µg/ml至500 µg/ml之間的抗壞血酸；
濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的Flt3L；及
濃度在1 ng/ml至200 ng/ml之間的TPO。

【請求項42】

如請求項41之方法，其中：
該BMP4之濃度為50 ng/ml；
該VEGF之濃度為50 ng/ml；
該bFGF之濃度為50 ng/ml；
該抗壞血酸之濃度為50 µg/ml；
該Flt3L之濃度為50 ng/ml；及
該TPO之濃度為100 ng/ml。

【請求項43】

如請求項38之方法，其中該CD4/CD8誘導培養基進一步包含幹細胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L及血小板生成素(TPO)。

【請求項44】

如請求項43之方法，其中該CD4/CD8誘導培養基包含：
濃度在5 µg/ml至500 µg/ml之間的抗壞血酸；
濃度在5 ng/ml至100 ng/ml之間的SCF；
濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的IL-7；
濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的Flt3L；及

濃度在1 ng/ml至200 ng/ml之間的TPO。

【請求項45】

如請求項44之方法，其中：

該抗壞血酸之濃度為50 µg/ml；

該SCF之濃度為50 ng/ml；

該IL-7之濃度為50 ng/ml；

該Flt3L之濃度為50 ng/ml；及

該TPO之濃度為100 ng/ml。

【請求項46】

如請求項38之方法，其中該CD4/CD8誘導培養基包含：

濃度在0.5 µM至100 µM之間的p38抑制劑；及

濃度在10 ng/ml至100 ng/ml之間的SDF-1抑制劑。

【請求項47】

如請求項46之方法，其中該p38抑制劑為SB203580。

【請求項48】

如請求項47之方法，其中該SB203580之濃度為15 µM。

【請求項49】

如請求項38之方法，其中該SDF-1抑制劑之濃度為30 nM。

【請求項50】

如請求項38之方法，其中該NK誘導培養基包含：

濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的IL-2；及

濃度在1 ng/ml至100 ng/ml之間的IL-7。

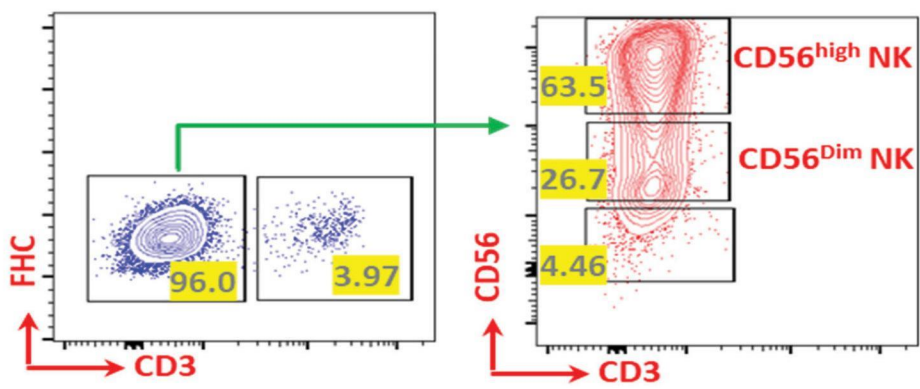
【請求項51】

如請求項50之方法，其中：

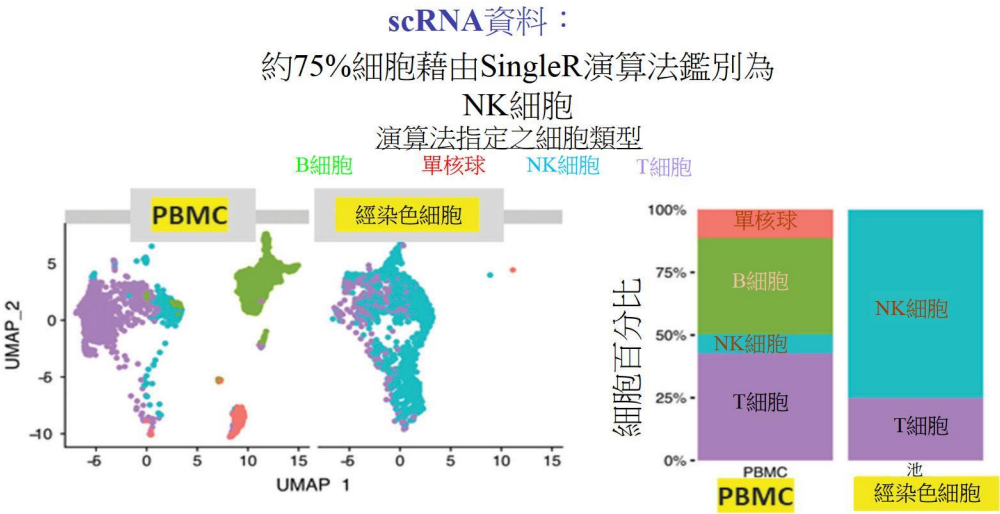
該IL-2之濃度為10 ng/ml；及

該IL-7之濃度為10 ng/ml。

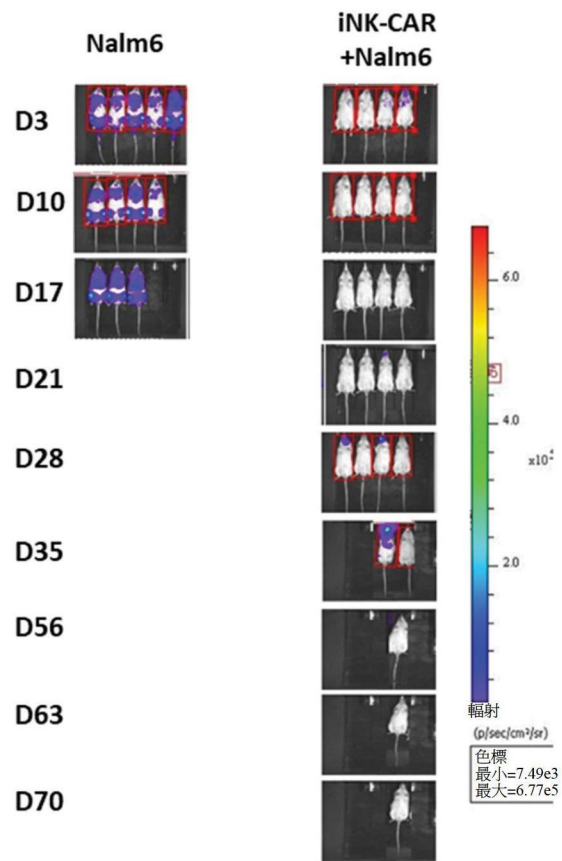
【發明圖式】



【圖1】



【圖2】



【圖3】