

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-516632

(P2023-516632A)

(43)公表日 令和5年4月20日(2023.4.20)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	4 B 0 6 3
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 B 0 6 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	4 H 0 4 5
A 6 1 K	35/545(2015.01)	A 6 1 K	35/545	
		審査請求	未請求	予備審査請求
				未請求 (全58頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-552125(P2022-552125)	(71)出願人	000002934	
(86)(22)出願日	令和3年2月26日(2021.2.26)		武田薬品工業株式会社	
(85)翻訳文提出日	令和4年8月26日(2022.8.26)		大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号	
(86)国際出願番号	PCT/US2021/019917	(74)代理人	100080791	
(87)国際公開番号	WO2021/174004		弁理士 高島 一	
(87)国際公開日	令和3年9月2日(2021.9.2)	(74)代理人	100136629	
(31)優先権主張番号	62/983,511		弁理士 鎌田 光宣	
(32)優先日	令和2年2月28日(2020.2.28)	(74)代理人	100125070	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 土井 京子	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100121212	
			弁理士 田村 弥栄子	
		(74)代理人	100174296	
			弁理士 富麻 博文	
		(74)代理人	100137729	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 多能性幹細胞からナチュラルキラー細胞を産生するための方法

(57)【要約】

本開示は、とりわけ、人工多能性細胞からナチュラルキラー細胞を効率的に産生するための方法を提供する。この方法は、(I)多能性幹細胞を培養培地で培養して、CD56+/CD3-免疫細胞を産生するステップを含む。

【選択図】図1

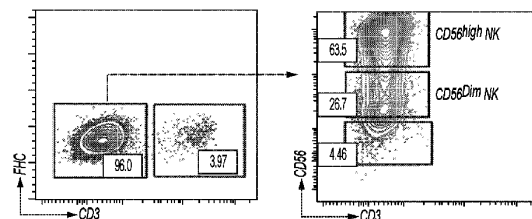


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多能性幹細胞由来NK細胞を産生する方法であって、

(A) 多能性幹細胞に由来する造血前駆細胞 (HPC) (HP細胞バルク) を含むバルク細胞集団を提供することと、

(B) 前記HP細胞バルクを1つ以上の培養培地で培養して、CD56+ / CD3-細胞を産生することと、を含み、

細胞単離ステップを含まない、方法。

【請求項 2】

前記方法が、ステップ (A) 及び (B) において、細胞単離ステップを含まない、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

(A) の前記HP細胞バルクが、CD34+細胞を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記HP細胞バルク中の前記細胞の20%以上が、CD34+細胞である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記HP細胞バルクの20%~90%が、CD34+細胞である、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

ステップ (B) が、

(i) CD4 / CD8 誘導培地中で前記HP細胞バルクを培養して、CD4- / CD8-細胞、CD4- / CD8+細胞、CD4+ / CD8-、及びCD4+ / CD8+細胞を含む中間の異種細胞集団を生成することと、

(ii) NK 誘導培地で前記中間の異種細胞集団を培養して、前記CD56+ / CD3-細胞を産生することと、を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法が、CD4+ / CD8+細胞を単離するステップを含まない、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 8】

ステップ (A) が、HPC 誘導培地において多能性幹細胞を培養して、HP細胞バルクを産生することを含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞 (iPSC) である、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

前記HPC 誘導培地が、骨形成タンパク質-4 (BMP4)、血管内皮成長因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、アスコルビン酸、Flt3リガンド (Flt3L)、トロポポエチン (TPO) 及びTGFβ阻害剤から選択される少なくとも1つの化合物を含む、請求項 8 または 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記HPC 誘導培地が、5 ng / mL ~ 500 ng / mL の濃度で、BMP4を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記BMP4が、濃度50 ng / mLである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

バルク細胞培地が、5 ng / mL ~ 500 ng / mL の濃度で、VEGFを含む、請求項 10 ~ 12 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記 V E G F が、濃度約 5 0 n g / m l である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 H P C 誘導培地が、5 n g / m l ~ 5 0 0 n g / m l の濃度で、b F G F を含む、請求項 1 0 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 b F G F が、濃度 5 0 n g / m l である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記バルク細胞培地が、5 μ g / m l ~ 5 0 0 μ g / m l の濃度でアスコルビン酸を含む、請求項 1 0 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記アスコルビン酸が、濃度 5 0 μ g / m l である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 H P C 誘導培地が、1 n g / m l ~ 1 0 0 n g / m l の濃度で、F l t 3 L を含む、請求項 1 0 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 F l t 3 L が、濃度 5 0 n g / m l である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 H P C 誘導培地が、1 n g / m l ~ 2 0 0 n g / m l の濃度で、T P O を含む、請求項 1 0 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 T P O が、濃度 1 0 0 n g / m l である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 C D 4 / C D 8 誘導培地が、アスコルビン酸、幹細胞因子 (S C F) 、 I L - 7 、 F l t 3 L 、トロンボポエチン (T P O) 、 p 3 8 阻害剤及び S D F - 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの化合物を含む、請求項 6 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 C D 4 / C D 8 誘導培地が、5 μ g / m l ~ 約 5 0 0 μ g / m l の濃度のアスコルビン酸を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記アスコルビン酸が、濃度 5 0 μ g / m l である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 C D 4 / C D 8 誘導培地が、5 n g / m l ~ 1 0 0 n g / m l の濃度で、S C F を含む、請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 S C F が、濃度 5 0 n g / m l である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 C D 4 / C D 8 誘導培地が、1 n g / m l ~ 1 0 0 n g / m l の濃度で、I L - 7 を含む、請求項 2 3 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 I L - 7 が、濃度 5 0 n g / m l である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 C D 4 / C D 8 誘導培地が、1 n g / m l ~ 1 0 0 n g / m l の濃度で、F l t 3 L を含む、請求項 2 3 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記 F l t 3 L が、濃度 5 0 n g / m l の F l t 3 L である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記 C D 4 / C D 8 誘導培地が、1 n g / m l ~ 2 0 0 n g / m l の濃度で、T P O を含む、請求項 2 3 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 33】

前記 TPO が、濃度 100 ng/ml である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記 CD4 / CD8 誘導培地が、 $0.5 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ の濃度で、p38 阻害剤を含む、請求項 23 ～ 33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

前記 p38 阻害剤が、SB203580 である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記 SB203580 が、濃度 $15 \mu\text{M}$ である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 CD4 / CD8 誘導培地が、 $10 \text{ ng/mL} \sim \text{約 } 100 \text{ ng/mL}$ の濃度で、SDF-1 阻害剤を含む、請求項 23 ～ 36 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 38】

前記 SDF-1 阻害剤が、濃度 30 nM である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記 NK 誘導培地が、CD3 活性化因子、IL-2 及び IL7 からなる群から選択される少なくとも 1 つの化合物を含む、請求項 6 ～ 38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

前記 NK 誘導培地が、 $1 \text{ ng/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$ の濃度で、IL-2 を含む、請求項 39 に記載の方法。

20

【請求項 41】

前記 IL-2 が、濃度 10 ng/mL である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記第 2 の誘導培地が、 $1 \text{ ng/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$ の濃度で、IL-7 を含む、請求項 39 ～ 41 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 43】

前記 IL-7 が、濃度 10 ng/mL である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記培養ステップのそれぞれが、約 5 % 酸素で実施される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 45】

前記培養ステップのそれぞれが、14 % を超える酸素で実施される、請求項 1 ～ 43 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 46】

前記培養ステップのそれぞれが、大気中酸素で実施される、請求項 1 ～ 43 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

前記培養ステップのそれぞれが、5 % 未満の酸素で実施される、請求項 1 ～ 43 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 48】

前記バルク細胞培地中で多能性幹細胞を培養して、10 日を超えて持続して、HP 細胞バルクを得る、請求項 8 ～ 47 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 49】

前記バルク細胞培地中で多能性幹細胞を培養して、11 ～ 15 日の間持続して、HP 細胞バルクを得る、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記バルク細胞培地中で多能性幹細胞を培養して、14 日間持続して、HP 細胞バルクを得る、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記 iPSC が、末梢血単核細胞から得られる、請求項 9 ～ 50 のいずれか 1 項に記載

50

の方法。

【請求項 5 2】

濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約 5 0 %、5 5 %、6 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % またはそれ以上が、C D 5 6 + / C D 3 - 細胞である、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

産生された細胞の約 2 5 % 未満が、C D 3 + 細胞である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

産生された細胞のパーセンテージが、フローサイトメトリーによって決定される、請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

産生された細胞のパーセンテージが、単一細胞 R N A シーケンス (s c R N A s e q) によって決定される、請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

C D 5 6 + / C D 3 - 細胞を単離するステップをさらに含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 7】

C D 5 6 + / C D 3 - 細胞が、蛍光活性化セルソーティング (F A C S) または磁気ソーティングによって単離される、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記 C D 5 6 + / C D 3 - 免疫細胞が、N K 細胞である、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記 C D 5 6 + / C D 3 - 細胞が、1 つ以上のキメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように遺伝子改変されている、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記単離された C D 5 6 + / C D 3 - 細胞が、1 つ以上のキメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように遺伝子改変されている、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記抗原が、C D 1 9 である、請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 2】

前記細胞が、I L - 1 5 R α / I L - 1 5 複合体を発現するように、さらに遺伝子改変されている、請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

(1) 血管内皮成長因子 (V E G F)、塩基性線維芽細胞成長因子 (b F G F)、及びアスコルビン酸から選択される少なくとも 1 つの化合物を含む H P C 誘導培地において i P S C を培養し、造血前駆細胞 (H P C) を含む異種細胞集団 (H P 細胞バルク) 得るステップと；

(2) アスコルビン酸、p 3 8 阻害剤及び S D F - 1 のうちの 1 つ以上を含む C D 4 / C D 8 誘導培地において、(1) で得られた前記 H P 細胞バルクを培養し、中間の異種細胞集団を得るステップと；

(3) C D 3 活性化因子、I L - 2 及び I L - 7 からなる群から選択される少なくとも 1 つの化合物を含む N K 誘導培地において、(2) の前記中間の異種細胞集団を培養するステップと、を含む、人工多能性幹細胞 (i P S C) 由来の C D 5 6 + / C D 3 - 免疫細胞を産生する方法。

【請求項 6 4】

前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法を使用して産生された N K 細胞集団。

【請求項 6 5】

多能性幹細胞由来 C D 5 6 + 免疫細胞全体の 6 0 % 以上の比率で、多能性幹細胞由来 C D 5 6 + / C D 3 - 細胞を含む、選別されていない細胞集団。

10

20

30

40

50

【請求項 66】

細胞の25%未満が、CD3+細胞である、請求項65に記載の選別されていない細胞集団。

【請求項 67】

5%未満の細胞が、単球である、請求項65または66に記載の選別されていない細胞集団。

【請求項 68】

5%未満の細胞が、B細胞である、請求項65または66に記載の選別されていない細胞集団。

【請求項 69】

細胞のパーセンテージが、フローサイトメトリーによって決定される、請求項65～68のいずれか1項に記載の選別されていない集団。

【請求項 70】

細胞のパーセンテージが、単一細胞RNAシーケンス(scRNAseq)によって決定される、請求項65～68のいずれか1項に記載の選別されていない集団。

【請求項 71】

細胞療法を必要とする対象を治療する方法であって、前記請求項のいずれか1項に記載のNK細胞を前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 72】

前記対象が、がんを有する、請求項68に記載の方法。

【請求項 73】

前記がんが、白血病またはリンパ腫である、請求項69に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2021年2月28日に提出された米国仮出願番号62/983,511の優先権を主張し、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

【背景技術】

ナチュラルキラー(NK)細胞は、免疫系の細胞傷害性リンパ球である。NK細胞は、がん細胞、病原体感染細胞、その他の損傷を受けた細胞に対して細胞傷害性である。NK細胞は、自然リンパ球(ILC)であり、特に免疫応答の自然アームと適応アームとを架橋する細胞傷害性の大型顆粒リンパ球である。それらは、末梢血中の循環リンパ球の10～15%を構成する。NK細胞はまた、免疫系内で最高レベルの細胞傷害性活性を呈する。したがって、NK細胞の機能及び数の変化は、感染及びがんに対する免疫系の機能に影響を与える。

【0003】

NK細胞は、特定の細胞表面抗原受容体を含まない。このため、NK細胞は、事前の感作なく、がん細胞及び病原体感染細胞を死滅させ得、自然免疫応答の一部にし得る。それらはまた、適応免疫応答に直接影響を与えることにより、腫瘍免疫監視においてある役割を有する。これらの特徴及び他の特徴により、NK細胞は、養子細胞治療で使用するために、特に魅力的な細胞種となる。

【0004】

前駆細胞からNK細胞を得るための様々なプロトコルについて記載されている。しかし、該プロトコルは、労力を要し、細胞単離のステップなど、時間を要する複数のステップを必要とし、NK細胞を産生するための製造/産生時間及び財政上のコストの増大となる。

【発明の概要】

【0005】

本出願は、とりわけ、CD56+/CD3-免疫細胞(すなわち、NK細胞またはNK

10

20

30

40

50

様細胞)の改善された産生方法を提供する。本出願は、細胞単離ステップを必要とせずに、少なくとも部分的には、多能性幹細胞(例えば、人工多能性幹細胞(iPSC))に由来するバルク細胞集団からのCD56+/CD3-免疫細胞の効率的かつ安定な産生の驚くべき発見に基づく。本出願の前に、NK細胞を誘導するための方法は、多くの場合、NK細胞に対する既知の細胞系譜に基づいて、特定の細胞種を単離する必要がある。本明細書に記載されるように、本出願は、予想外に、系譜をベースにした任意の細胞種の単離を必要とすることなく、NK細胞がバルク細胞集団から首尾よく誘導され得ることを示している。したがって、この方法は、例えば、コスト及び時間効率の良い方法でスケールアップして、大量のNK細胞を産生する能力など、NK細胞を産生する既存の方法よりも、多くの利点を有する。したがって、本発明は、細胞療法分野における重要な進歩を表す。

10

【0006】

本明細書に記載の方法によって産生されるiPSC由来のCD56+/CD3-細胞(本明細書では「iNK細胞」とも呼ばれる)は、機能的であり、特定の細胞集団を標的とするために、CARの導入などを通じて、さらに遺伝子改変され得る。

【0007】

いくつかの態様では、多能性幹細胞由来のNK細胞を産生する方法は、(A)多能性幹細胞に由来する造血前駆細胞(HPC)を含むバルク細胞集団(HP細胞バルク)を提供すること、(B)1つ以上の培養培地中で、HP細胞バルクを培養して、CD56+/CD3-細胞を生産することと、を含み、この方法は、細胞単離ステップを含まない。

20

【0008】

いくつかの実施形態では、本方法は、ステップ(A)及び(B)において、細胞単離ステップを含まない。

【0009】

いくつかの実施形態では、(A)のHP細胞バルクは、CD34+細胞を含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、HP細胞バルク中の細胞の20%以上がCD34+細胞である。

【0011】

いくつかの実施形態では、HP細胞バルクの20%~90%がCD34+細胞である。例えば、いくつかの実施形態では、HP細胞バルクの約30%がCD34+細胞である。いくつかの実施形態では、HP細胞バルクの約40%がCD34+細胞である。いくつかの実施形態では、HP細胞バルクの約50%がCD34+細胞である。いくつかの実施形態では、HP細胞バルクの約60%がCD34+細胞である。いくつかの実施形態では、HP細胞バルクの約70%がCD34+細胞である。いくつかの実施形態では、HP細胞バルクの約80%がCD34+細胞である。いくつかの実施形態では、HP細胞バルクの約90%がCD34+細胞である。いくつかの実施形態では、HP細胞バルクの70%超がCD34+細胞である。

30

【0012】

いくつかの実施形態では、ステップ(B)は、(i)CD4/CD8誘導培地中でHP細胞バルクを培養して、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8-、及びCD4+/CD8+細胞を含む中間の異種細胞集団を生成することと、(ii)NK誘導培地で中間の異種細胞集団を培養して、CD56+/CD3-細胞を生産することと、を含む。

40

【0013】

いくつかの実施形態では、ステップ(A)は、HPC誘導培地において多能性幹細胞を培養して、HP細胞バルクを生産することを含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞(iPSC)である。

【0015】

いくつかの実施形態では、HPC誘導培地は、骨形成タンパク質-4(BMP4)、血

50

管内皮成長因子（VEGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、アスコルビン酸、Flt3リガンド（Flt3L）、トロンプオエチン（TPO）及びTGFβ阻害剤から選択される少なくとも1つの化合物、または化合物の任意の組み合わせを含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、HPC誘導培地は、5 ng/mL～500 ng/mLの濃度でBMP4を含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、BMP4は、濃度50 ng/mLである。

【0018】

いくつかの実施形態では、HPC誘導培地は、5 ng/mL～500 ng/mLの濃度でVEGFを含む。 10

【0019】

いくつかの実施形態では、VEGFは、濃度約50 ng/mLである。

【0020】

いくつかの実施形態では、HPC誘導培地は、5 ng/mL～500 ng/mLの濃度でbFGFを含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、bFGFは、濃度50 ng/mLである。

【0022】

いくつかの実施形態では、HPC誘導培地は、5 μg/mL～500 μg/mLの濃度でアスコルビン酸を含む。 20

【0023】

いくつかの実施形態では、アスコルビン酸は、濃度50 μg/mLである。

【0024】

いくつかの実施形態では、HPC誘導培地は、1 ng/mL～100 ng/mLの濃度でFlt3Lを含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、Flt3Lは、濃度50 ng/mLである。

【0026】

いくつかの実施形態では、HPC誘導培地は、1 ng/mL～200 ng/mLの濃度でTPOを含む。 30

【0027】

いくつかの実施形態では、TPOは、濃度100 ng/mLである。

【0028】

いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、アスコルビン酸、幹細胞因子（SCF）、IL-7、Flt3L、トロンプオエチン（TPO）、p38阻害剤及びSDF-1からなる群から選択される少なくとも1つの化合物または化合物の任意の組み合わせを含む。したがって、いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、アスコルビン酸を含む。いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、SCFを含む。いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、IL-7を含む。いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、Flt3Lを含む。いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、TPOを含む。いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、p38阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、SDF-1を含む。 40

【0029】

いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、5 μg/mL～約500 μg/mLの濃度で、アスコルビン酸を含む。

【0030】

いくつかの実施形態では、アスコルビン酸は、濃度50 μg/mLである。 50

【0031】

いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、5 ng／mL～100 ng／mLの濃度でSCFを含む。

【0032】

いくつかの実施形態では、SCFは、濃度50 ng／mLである。

【0033】

いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、1 ng／mL～100 ng／mLの濃度でIL-7を含む。

【0034】

いくつかの実施形態では、IL-7は、濃度50 ng／mLである。

10

【0035】

いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、1 ng／mL～100 ng／mLの濃度でFlt3Lを含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、Flt3Lは、濃度50 ng／mLのFlt3Lである。

【0037】

いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、1 ng／mL～200 ng／mLの濃度でTPOを含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、TPOは、濃度100 ng／mLである。

20

【0039】

いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、0.5 μM～100 μMの濃度で、p38阻害剤を含む。

【0040】

いくつかの実施形態では、p38阻害剤は、SB203580である。いくつかの実施形態では、p38阻害剤は、BIRB796である。いくつかの実施形態では、p38阻害剤は、VX-702である。いくつかの実施形態では、p38阻害剤は、SB239063である。いくつかの実施形態では、p38阻害剤は、SB202190である。いくつかの実施形態では、p38阻害剤は、BMS582949である。

【0041】

いくつかの実施形態では、SB203580は、濃度15 μMである。

30

【0042】

いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、10 ng／mL～約100 ng／mLの濃度でSDF-1阻害剤を含む。

【0043】

いくつかの実施形態では、SDF-1阻害剤は、濃度30 nMである。

【0044】

いくつかの実施形態では、SDF-1阻害剤は、濃度30 nMであり、p38阻害剤、例えば、SB203580は、濃度15 μMである。

【0045】

いくつかの実施形態では、NK誘導培地は、CD3活性化因子、IL-2及びIL7からなる群から選択される少なくとも1つの化合物を含む。したがって、いくつかの実施形態では、NK誘導培地は、CD3活性化因子を含む。いくつかの実施形態では、NK誘導培地は、IL-2を含む。いくつかの実施形態では、NK誘導培地は、IL-7を含む。

40

【0046】

いくつかの実施形態では、NK誘導培地は、1 ng／mL～100 ng／mLの濃度でIL-2を含む。

【0047】

いくつかの実施形態では、IL-2は、濃度10 ng／mLである。

【0048】

50

いくつかの実施形態では、NK誘導培地は、 $1\text{ ng/mL} \sim 100\text{ ng/mL}$ の濃度でIL-7を含む。

【0049】

いくつかの実施形態では、IL-7は、濃度 10 ng/mL である。

【0050】

いくつかの実施形態では、培養ステップの各々は、約5%の酸素で実施される。

【0051】

いくつかの実施形態では、培養ステップの各々は、14%を超える酸素で実施される。

【0052】

いくつかの実施形態では、培養ステップの各々は、大気中酸素で実施される。

10

【0053】

いくつかの実施形態では、培養ステップの各々は、5%未満の酸素で実施される。

【0054】

いくつかの実施形態では、HP細胞バルクを得るためにバルク細胞培地中で多能性幹細胞を培養することは、10日を超えて継続する。

【0055】

いくつかの実施形態では、HP細胞バルクを得るためにバルク細胞培地中で多能性幹細胞を培養することは、11日～15日継続する。

【0056】

いくつかの実施形態では、HP細胞バルクを得るためにバルク細胞培地中で多能性幹細胞を培養することは、14日間継続する。

20

【0057】

いくつかの実施形態では、iPSCは、末梢血単核細胞から得られる。

【0058】

いくつかの実施形態では、産生された細胞の少なくとも約50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97%以上は、濃縮のステップのない、例えば、CD56+ / CD3-細胞のさらなるステップ、選別 / 単離 / 精製のないCD56+ / CD3-細胞である。したがって、いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約50%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約55%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約60%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約65%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約70%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約75%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約80%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約85%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約90%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約95%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。いくつかの実施形態では、濃縮ステップなく、産生された細胞の少なくとも約97%以上が、CD56+ / CD3-細胞である。

30

40

【0059】

いくつかの実施形態では、産生された細胞の約25%未満、20%、15%、10%または5%が、CD3+細胞である。

【0060】

いくつかの実施形態では、産生された細胞の表現型は、当技術分野における様々な手段によって確認することができる。例えば、産生された細胞の表現型は、フローサイトメト

50

リーまたは単一細胞RNAシーケンス (scRNAseq) によって確認できる。

【0061】

いくつかの実施形態では、産生された細胞のパーセンテージは、フローサイトメトリーによって決定される。いくつかの実施形態では、産生された細胞のパーセンテージは、scRNAseqによって決定される。

【0062】

いくつかの実施形態では、この方法は、CD56+ / CD3-細胞を単離するステップをさらに含む。

【0063】

いくつかの実施形態では、CD56+ / CD3-細胞は、蛍光活性化セルソーティング (FACS) または磁気ソーティングによって単離される。したがって、いくつかの実施形態では、細胞は、FACSによって単離される。いくつかの実施形態では、細胞は、磁気ソーティング (MACS) によって単離される。

【0064】

いくつかの実施形態では、CD56+ / CD3-免疫細胞は、NK細胞である。

【0065】

いくつかの実施形態では、CD56+ / CD3-細胞は、1つ以上のキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように遺伝子改変されている。

【0066】

いくつかの実施形態では、単離されたCD56+ / CD3-細胞は、1つ以上のキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように遺伝子改変されている。

【0067】

いくつかの実施形態では、抗原は、CD19である。

【0068】

いくつかの実施形態では、細胞は、IL-15R α / IL-15複合体を発現するようにさらに遺伝子改変されている。

【0069】

いくつかの態様では、人工多能性幹細胞 (iPSC) 由来のCD56+ / CD3-免疫細胞を産生する方法が提供され、本方法は、(1) 血管内皮成長因子 (VEGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、及びアスコルビン酸から選択される少なくとも1つの化合物を含むHPC誘導培地において、iPSCを培養して、造血前駆細胞 (HPC) を含む異種細胞集団 (HPC細胞バルク) を得るステップと；(2) アスコルビン酸、p38阻害剤及びSDF-1のうちの1つ以上を含むCD4 / CD8誘導培地において、(1) で得たHPC細胞バルクを培養して、中間の異種細胞集団を得るステップと；(3) CD3活性化因子、IL-2及びIL-7からなる群から選択される少なくとも1つの化合物を含むNK誘導培地において、(2) の中間の異種細胞集団を培養するステップと、を含む。

【0070】

いくつかの態様では、NK細胞集団が提供され、この集団は、本明細書に記載の方法を使用して産生される。

【0071】

いくつかの態様では、選別されていない細胞集団が提供され、この集団は、多能性幹細胞由来CD56+免疫細胞全体の60%以上の比率で、多能性幹細胞由来CD56+ / CD3-細胞を含む。

【0072】

いくつかの実施形態では、細胞の25%未満が、CD3+細胞である。

【0073】

いくつかの実施形態では、細胞の5%未満が、単球である。

【0074】

いくつかの実施形態では、細胞の5%未満が、B細胞である。

10

20

30

40

50

【0075】

いくつかの態様では、細胞療法を必要とする対象を治療する方法が提供され、本方法は、本明細書に記載のNK細胞を対象に投与することを含む。

【0076】

いくつかの実施形態では、対象は、がんを有する。

【0077】

いくつかの実施形態では、がんは、白血病またはリンパ腫である。

【0078】

いくつかの態様では、多能性幹細胞由来のCD56+/CD3-免疫細胞を産生する方法が提供され、本方法は、(I) 1つ以上の培養培地において、多能性幹細胞を培養して、CD56+/CD3-免疫細胞を産生するステップを含む。

10

【0079】

いくつかの実施形態では、ステップ(I)は、(A) 培養培地において多能性幹細胞を培養して、造血前駆細胞(HP C)(HP細胞バルク)を産生することと；(B) 培養培地においてステップ(A)で得た細胞を培養して、CD56+/CD3-免疫細胞を産生することと、を含む。

【0080】

いくつかの実施形態では、ステップ(B)は、(a) 培養培地において、ステップ(A)で得た細胞を培養して、CD4/CD8二重陽性細胞を含む細胞集団を産生することと；(b) 培養培地において、ステップ(a)で得た細胞を培養して、CD56+/CD3-免疫細胞を産生することと、を含む。

20

【0081】

いくつかの実施形態では、前のステップのいずれも、CD4/CD8二重陽性細胞を含む細胞集団の単離ステップを実施することを含まない。

【0082】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、人工多能性幹細胞(i P S C)である。

【0083】

いくつかの態様では、CD56+/CD3-免疫細胞を産生する方法が提供され、本方法は、(II) 培養培地において、造血前駆細胞(HP C)(HP細胞バルク)を含む細胞を培養して、CD56+/CD3-免疫細胞を産生するステップを含む。

30

【0084】

いくつかの実施形態では、ステップ(II)は、(X) 培養培地において、造血前駆細胞(HP C)を含む細胞を培養して、CD4/CD8二重陽性細胞を産生することと；(Y) 培養培地において、ステップ(X)で得た細胞を培養して、CD56+/CD3-免疫細胞を産生することと、を含む。

【0085】

いくつかの実施形態では、ステップ(II)は、CD4/CD8二重陽性細胞の単離ステップを実施することを含まない。

【0086】

いくつかの実施形態では、ステップ(A)は、骨形成タンパク質-4(BMP4)、血管内皮成長因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、アスコルビン酸、Flt3リガンド(Flt3L)、トロンプオエチン(TPO)及びTGFβ阻害剤から選択される少なくとも1つの化合物を有する培養培地を含む。

40

【0087】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)またはステップ(X)は、アスコルビン酸、幹細胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、トロンプオエチン(TPO)、p38阻害剤及びSDF-1からなる群から選択される少なくとも1つの化合物を有する培養培地を含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、ステップ(b)またはステップ(Y)は、CD3活性化因子

50

、IL-2及びIL7からなる群から選択される少なくとも1つの化合物を有する培養培地を含む。

【0089】

いくつかの実施形態では、本方法は、IL-7及び／またはIL-15を含む培養培地において、ステップ(b)またはステップ(Y)の後に産生された細胞を培養することをさらに含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、培養することは、約5%の酸素で実施される。

いくつかの実施形態では、ステップ(A)は、約10日間継続する。別の実施形態では、ステップ(A)は、約10～18日間継続する。

【0091】

いくつかの実施形態では、iPSCは、末梢血単球細胞から産生される。

【0092】

いくつかの実施形態では、産生された細胞の少なくとも約50%、55%、60%、75%、80%、85%または90%は、CD56+／CD3-細胞である。

【0093】

いくつかの実施形態では、細胞の約25%未満が、CD3+細胞である。

【0094】

いくつかの実施形態では、本方法は、CD56+／CD3-細胞を単離するステップをさらに含む。

【0095】

いくつかの実施形態では、CD56+／CD3-細胞は、蛍光活性化セルソーティング(FACS)によって単離される。

【0096】

いくつかの実施形態では、CD56+免疫細胞は、CD56+／CD3-である。

【0097】

いくつかの実施形態では、任意の多能性、多分化能、または患者由来のHPCを、本明細書に記載の方法で使うことができる。例えば、いくつかの実施形態では、細胞は、胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は成体幹細胞である。様々な成体幹細胞が当技術分野で知られており、例えば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、臍帯由来細胞、骨髓幹細胞、脂肪幹細胞などが挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞は、人工多能性幹細胞(iPSC)である。したがって、本明細書に記載の方法に従って産生されるNK細胞は、ドナーに直接由来する一次HPCなどの任意の多能性、多分化能、または患者由来のHPCから作製することができる。

【0098】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のNK細胞を産生するために使用される細胞は、細胞分化の任意の段階で、遺伝子改変されている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のNK細胞を産生するために使用される細胞は、多能性、多分化能、または単能性の段階で遺伝子改変されている。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のNK細胞を産生するために使用される細胞は、多能性段階で、遺伝子改変されている。例えば、細胞は、胚性幹細胞の段階またはiPSC幹細胞の段階で遺伝子改変され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のNK細胞を産生するために使用される細胞は、多分化能段階で遺伝子改変されている。例えば、細胞は、HSC段階で、遺伝子改変され得る。

【0099】

いくつかの実施形態では、細胞は、1つ以上のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されている。

【0100】

いくつかの実施形態では、単離されたCD56+／CD3-細胞は、1つ以上のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変されている。

10

20

30

40

50

【0101】

いくつかの実施形態では、抗原は、CD19である。

【0102】

いくつかの実施形態では、細胞は、IL-15R α /IL-15複合体を発現するようにさらに遺伝子改変されている。

【0103】

いくつかの態様では、選別されていない細胞集団が提供され、この細胞集団は、多能性幹細胞由来CD56+免疫細胞全体の60%以上の比率で、多能性幹細胞由来CD56+/CD3-細胞を含む。

【0104】

いくつかの実施形態では、細胞の25%未満がCD3+細胞である。

【0105】

いくつかの実施形態では、細胞の5%未満が、単球である。

【0106】

いくつかの実施形態では、細胞の5%未満が、B細胞である。

【0107】

いくつかの態様では、細胞療法を必要とする対象を治療する方法が提供され、本方法は、前記請求項のいずれか1項に記載の多能性幹細胞由来のCD56+/CD3-免疫細胞を対象に投与することを含む。

【0108】

いくつかの実施形態では、対象は、がんを有する。

【0109】

いくつかの実施形態では、がんは、白血病またはリンパ腫である。

【0110】

本明細書に記載の方法では、例えば、HPC誘導培地、CD4/CD8誘導培地、及びNK誘導培地など、様々な培養培地が使用される。

【0111】

いくつかの態様では、人工多能性細胞(iPSC)は、造血前駆細胞を含む細胞集団を生成するために、HPC誘導培地において、ある一定期間培養され、この細胞集団は、本明細書においてHP細胞バルクと呼ばれる。いくつかの実施形態では、この期間は、約10~14日である。いくつかの実施形態では、この期間は、約13日である。いくつかの実施形態では、HPC誘導培地は、BMP4、VEGF、bFGF、アスコルビン酸、TGF β 阻害剤、幹細胞因子(SCF)、トロポポエチンTPO、及びFlt3Lのうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、iPSCは、VEGF、bFGF、アスコルビン酸を含むHPC誘導培地において、1日目から約10日目まで培養される。いくつかの実施形態では、VEGFは、濃度約50ng/mLである。いくつかの実施形態では、bFGFは、濃度約50ng/mLである。いくつかの実施形態では、アスコルビン酸は、濃度約50 μ g/mLである。いくつかの実施形態では、iPSCは、BMP4を含むHPC誘導培地において1日目~約3日目まで培養される。いくつかの実施形態では、BMP4は、濃度約50ng/mLである。いくつかの実施形態では、iPSCは、濃度約6 μ MのSB431542などのTGF β 阻害剤と共に、約2日目~約3日目まで培養される。いくつかの実施形態では、培養の7日目~13日目の間、幹細胞因子(SCF)、トロポポエチンTPO、及びFlt3Lのうちの1つ以上を培養物に添加させる。いくつかの実施形態では、SCFは、濃度約50ng/mLで添加される。いくつかの実施形態では、TPOは、濃度約30ng/mLで添加される。いくつかの実施形態では、Flt3Lは、濃度約10ng/mLで添加される。

【0112】

いくつかの態様では、HP細胞バルク集団は、ある一定期間、CD4/CD8誘導培地で培養され、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8-、及びCD4+/CD8+細胞を含む中間の異種細胞集団を含む細胞の集団を生成する。い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態では、HP細胞バルク集団は、CD4／CD8誘導培地で19～22日間培養させる。いくつかの実施形態では、HP細胞バルク集団は、CD4／CD8誘導培地で約21日間培養させる。いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、アスコルビン酸、SCF、TPO、Flt3L、IL7、p38MAPKi阻害剤、例えば、SB203580、SDF1aなどのうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、アスコルビン酸は、濃度約50μgである。いくつかの実施形態では、SCFは、濃度50ng／mLである。いくつかの実施形態では、TPOは、濃度約100ng／mLである。いくつかの実施形態では、Flt3Lは、濃度約50ng／mLである。いくつかの実施形態では、IL7は、濃度約50ng／mLである。いくつかの実施形態では、SB203580は、濃度約15μMである。いくつかの実施形態では、SDF1aは、濃度約30nMである。いくつかの実施形態では、HP細胞バルクは、hDLL4／RetroNectinがコーティングされた培養ディッシュ上で培養される。

10

【0113】

いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、アスコルビン酸、幹細胞因子（SCF）、IL-7、Flt3L、トロンボポエチン（TPO）、p38阻害剤及びSDF-1からなる群から選択される少なくとも1つの化合物を含む。いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、p38阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、SDF-1を含む。いくつかの実施形態では、CD4／CD8誘導培地は、p38阻害剤及びSDF-1を含む。

20

【0114】

いくつかの態様では、CD4-／CD8-細胞、CD4-／CD8+細胞、CD4+／CD8-、及びCD4+／CD8+細胞を含む異種細胞集団は、ある一定期間、NK誘導培地で培養し、CD56+／CD3-NK細胞を含む細胞集団を生成する。いくつかの実施形態では、異種細胞集団は、NK誘導培地において約5～9日の期間培養する。いくつかの実施形態では、細胞集団は、約7日間培養する。いくつかの実施形態では、NK細胞誘導培地は、IL-7、IL-2及び抗CD3抗体のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、異種細胞集団は、IL-7及びIL-2を含むNK細胞誘導培地において、約7日間培養する。いくつかの実施形態では、IL-7は、濃度約10ng／mLである。いくつかの実施形態では、IL-2は、濃度約10ng／mLである。いくつかの実施形態では、異種集団は、抗CD3を含むNK細胞誘導培地において約3日間培養させる。いくつかの実施形態では、本方法は、50%超、60%、70%、80%、90%、または95%のCD56+／CD3-細胞を生成する。したがって、いくつかの実施形態では、本方法は、50%を超えるCD56+／CD3-細胞を生成する。いくつかの実施形態では、本方法では、60%を超えるCD56+／CD3-細胞を生成する。いくつかの実施形態では、本方法では、70%を超えるCD56+／CD3-細胞を生成する。いくつかの実施形態では、本方法では、80%を超えるCD56+／CD3-細胞を生成する。いくつかの実施形態では、本方法では、90%を超えるCD56+／CD3-細胞を生成する。いくつかの実施形態では、本方法では、95%を超えるCD56+／CD3-細胞を生成する。

30

【図面の簡単な説明】

40

【0115】

【図1】本明細書に記載の方法を使用して得られたNK細胞バルク集団のフローサイトメトリ分析の結果を示す一連のフローサイトメトリプロットである。簡潔に述べると、iPS細胞は、中間の単離ステップなく、本明細書に記載のとおり培養された。フローサイトメトリグラフは、CD56^{high}であるCD3陰性細胞の集団（NK細胞バルク集団の約63.5%）及びCD56^{dim}であるCD3陰性細胞の集団（NK細胞バルク集団の約26.7%）の存在を示している。これらの集団は両方とも、NK細胞である。したがって、得られたCD56陽性、CD3陰性のNK細胞集団の合計は、細胞集団全体の90%を超えている。

【図2】本明細書に記載の方法を使用して得られたNK細胞バルク集団のscRNA分析

50

の結果を示す図である。簡潔に述べると、i P S細胞は、中間の単離ステップなく、本明細書に記載のとおり培養させた。細胞は、単球、B細胞、NK細胞、及びT細胞の4つの細胞集団に分類した。NK細胞バルク集団中の細胞の約75%が、NK細胞として同定され(CD56+/CD3-細胞)、バルク細胞集団中の細胞の約25%が、T細胞として同定された。本明細書に記載のT細胞は、NK T細胞(CD56+/CD3+細胞)を含み得る。

【図3】ルシフェラーゼ発現NaIm6細胞を投与し、その後、iNK-CAR19細胞を投与したNSG(NOD/Shi-scid, IL-2Rガンマヌル)マウスにおける抗腫瘍活性アッセイの結果を示す一連の写真を示す図である。NaIm6細胞を移植したNSGマウスを、(a)PBSバッファー(b)iNK-CAR細胞で処理し、これらの処理の抗腫瘍効果を観察した。データは、iNK-CAR細胞がNaIm6細胞の増殖を減少させたことを示している。

10

【0116】

〔発明の詳細な説明〕

定義

投与：本明細書で使用される場合、「投与する」、「投与すること」、「投与」、「導入すること」または「導入」という用語は、治療用細胞、例えば、iPSCまたはHPC由来CD56+/CD3-免疫細胞を、このような細胞の送達をもたらす方法または経路によって対象に送達する文脈において、互換的に使用される。例えば、静脈内、局所、経口、筋肉内、腹腔内、髄腔内、皮下または経皮など、細胞を投与するための様々な方法が当技術分野で知られている。細胞は、担体の有無にかかわらず投与させ得る。

20

【0117】

養子細胞療法：本明細書で互換的に使用される場合、「養子細胞療法」または「養子細胞移植」または「細胞療法」または「ACT」という用語は、細胞、例えば、本明細書に記載の方法を使用して生成され、必要とする対象または患者に投与されるCD56+/CD3-細胞の集団を移植することを指す。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の方法を使用して作製され、さらにCARを発現するCD56+/CD3-免疫細胞である。

【0118】

動物：本明細書で使用される場合、「動物」という用語は、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、発育の任意の段階におけるヒトを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、発育の任意の段階における非ヒト動物を指す。特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物(例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、及び/またはブタ)である。いくつかの実施形態では、動物としては、これらに限定されないが、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類、及び/または蠕虫が挙げられる。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作動物及び/またはクローンであり得る。

30

【0119】

抗原特異的標的ドメイン：「抗原特異的標的化ドメイン」は、目的の標的抗原に結合する能力をCARにもたらす。いくつかの実施形態では、抗原特異的標的化ドメインは、腫瘍死滅をもたらすエフェクター免疫応答を誘発することが望ましいであろう、臨床的に関心のある抗原を標的とする。抗原特異的標的化ドメインは、生体分子(例えば、細胞表面受容体または腫瘍タンパク質、またはそれらの成分)を特異的に認識して結合する能力を保有する任意のタンパク質またはペプチドであり得る。抗原特異的標的化ドメインには、目的の生体分子に対して、天然に存在する、合成の、半合成の、または組換えにより産生された任意の結合パートナーが含まれる。

40

【0120】

例示的な抗原特異的標的化ドメインとしては、例えば、抗体もしくは抗体断片もしくは誘導体、受容体の細胞外ドメイン、細胞表面分子/受容体のリガンド、またはその受容体結合ドメイン、及び腫瘍結合タンパク質が挙げられる。

50

【0121】

いくつかの実施形態では、抗原特異的標的化ドメインは、抗体であるか、または抗体に由来する。抗体由来標的化ドメインは、抗体の断片、または抗体の1つ以上の断片の遺伝子操作産物であり得、この断片は、抗原との結合に関与している。例としては、可変領域（Fv）、相補性決定領域（CDR）、Fab、一本鎖抗体（scFv）、重鎖可変領域（VH）、軽鎖可変領域（VL）、及びラクダ科抗体（VHH）が挙げられる。

【0122】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、一本鎖抗体（scFv）である。scFvは、マウス、ヒト、またはヒト化scFvであり得る。

【0123】

同種異系：本明細書で使用される「同種異系」は、物質が導入される個体と同じ種の異なる動物に由来する任意の物質を指す。1以上の遺伝子座の遺伝子が同一でない場合、2以上の個体は、互いに同種異系であると言われる。いくつかの態様では、同じ種の個体からの同種異系物質は、抗原的に相互作用するために遺伝的に十分に異なり得る。

【0124】

およそまたは約：本明細書で使用する場合、1つ以上の目的の値に適用される通り、用語「およそ」または「約」は、述べられた基準値と類似する値を指す。ある特定の実施形態において、「およそ」または「約」という用語は、別途記載のない限り、あるいは別様に前後関係から明白な場合を除いて、表示された参照値（を上回るかまたは下回る）のいずれかの25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、もしくはそれ未満の範囲内に含まれる値域を指す（この数が可能な値の100%を超える場合を除く）。「約」または「およそ」という用語が、記載された基準値を修飾するために使用される場合、記載された基準値自体は、記載された基準値のいずれかの側の記載された基準値に近い値と共に網羅されることが理解される。

【0125】

アスコルビン酸またはビタミンC：本明細書で使用する場合、「アスコルビン酸」または「ビタミンC」は、L-アスコルビン酸及びその誘導体を意味し、「L-アスコルビン酸誘導体」は、生体内で酵素反応によりビタミンCになる誘導体を意味する。L-アスコルビン酸の誘導体の例としては、ビタミンCホスフェート、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビルエチル、ビタミンCエステル、アスコルビルテトラヘキシルデカノエート、アスコルビルステアレート、及びアスコルビル2-ホスフェート6-パルミテートが挙げられる。ビタミンCホスフェートの例としては、L-アスコルビン酸ホスフェートの塩、例えば、L-アスコルビン酸ホスフェートNa及びL-アスコルビン酸ホスフェートMgなどが挙げられる。一実施形態では、ビタミンCは、アスコルビン酸2-ホスフェートであり得る。

【0126】

バルク細胞集団：「バルク細胞集団」、「バルク細胞」などの用語は、異種細胞集団を指す。いくつかの実施形態では、バルク細胞集団は、造血細胞を含む。いくつかの実施形態では、バルク細胞集団は、多能性細胞、例えば、人工多能性幹細胞から得ることができる。いくつかの実施形態では、バルク細胞集団は、ドナー組織、例えば、血液などから得られる。

【0127】

CD4/CD8誘導培地：本明細書で使用される用語CD4/CD8誘導培地は、CD4-/CD8-細胞、CD4+/CD8+細胞、CD4+/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞を含む細胞の集団を得るために使用される細胞培養培地を指す。いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、HP細胞バルクをCD4-/CD8-細胞、CD4+/CD8+細胞、CD4+/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞を含む細胞集団に分化させるために使用される。いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、アスコルビン酸、SCF、TPO、Flt3L、IL7、p38MAPKi阻害剤、例

10

20

30

40

50

例えば、SB203580、SDF1aなどのうちの1つ以上またはすべてを含む。

【0128】

キメラ抗原受容体 (CAR) : 本明細書で使用される場合、「キメラ抗原受容体」または「CAR」操作受容体という用語は、細胞 (例えば、NK細胞、ナイーブT細胞などのT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞またはそれらの組み合わせ) に抗原特異性を付与できる受容体である。CARは、「人工T細胞受容体」、「キメラT細胞受容体」、または「キメラ免疫受容体」としても既知である。いくつかの実施形態では、本発明のCARは、抗原特異的標的化ドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、任意により1つ以上の共刺激ドメイン、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、CARは、所望の細胞表面抗原またはMHCペプチド複合体に対する特異性を再配向するように、本明細書に記載の方法を使用して作製されたCD56+ / CD3-免疫細胞 (例えば、NKまたはNK様細胞) に導入されている。これらの合成受容体は、典型的には、単一の融合分子内の柔軟なリンカーを介して1つ以上のシグナル伝達ドメインに関連する標的結合ドメインを含む。標的結合ドメインは、免疫細胞 (例えば、CD56+ / CD3+免疫細胞) を病的細胞 (例えば、がん細胞) の表面上で、特定の標的に配向するために使用され、シグナル伝達ドメインは、免疫細胞 (例えば、CD56+ / CD3-免疫細胞) の活性化及び増殖のための分子機械を含む。通常、免疫細胞を通過する柔軟なリンカー (例えば、CD56+ / CD3-細胞) 膜 (すなわち、膜貫通ドメインの形成) により、CARの標的結合ドメインの細胞膜表示が可能になる。CARは、リンパ腫及び固形腫瘍など、様々な悪性腫瘍の腫瘍細胞の表面に発現する抗原に対して免疫細胞を上手く再配向できている (Gross et al., (1989) Transplant Proc., 21 (1 Pt 1): 127-30; Jena et al., (2010) Blood, 116 (7): 1035-44)。CARの細胞外結合ドメインは、マウスまたはヒト化モノクローナル抗体の可変重鎖領域と軽鎖領域との融合に由来する一本鎖可変断片 (scFv) で構成されていてもよい。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、単一ドメイン抗体を含む。あるいは、(例えば、Fabライブラリーから得られた抗体からではなく) Fabに由来するscFvを使用してもよい。様々な実施形態において、このscFvは、膜貫通ドメインに融合され、次に細胞内シグナル伝達ドメインに融合される。少なくとも3世代のCARを開発した。第1世代のCARは、CD3ゼータの細胞質領域またはFc受容体ガンマ鎖に由来するシグナル伝達ドメインに付着した標的結合ドメインで構成させた。第1世代のCARは、免疫細胞を選択された標的にうまく再配向することが示されたが、in vivoでの長期の拡大及び抗腫瘍活性をもたらすことはできなかった。第2世代及び第3世代のCARでは、CD28、OX-40 (CD134)、及び4-1BB (CD137) などの共刺激分子を含めることにより、改変細胞の生存率を高め、増殖を増加させることに重点を置いている。

【0129】

培養: 「培養」または「細胞培養」または「培養すること」という用語は、in vitro環境での細胞の維持、成長、及び／または分化を指す。本明細書に記載の様々な方法において、細胞は、ある種の細胞の異なる種の細胞への成長または分化を容易にするかまたは促進する特定の細胞培養培地 (複数可) で培養される。例えば、本明細書に記載の特定の実施形態では、細胞培養培地中でiPSCを培養することにより、細胞集団全体の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%の80%の細胞が、CD34+細胞 (すなわち、HPC) になる。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、または80%の30% HPCは、CD4- / CD8-細胞、CD4- / CD8+細胞、CD4+ / CD8-、及びCD4+ / CD8+細胞を含む細胞集団をもたらす。さらに他の実施形態では、CD4- / CD8-細胞、CD4- / CD8+細胞、CD4+ / CD8-、及びCD4+ / CD8+細胞を含む細胞集団を培養することにより、濃縮したCD56+ / CD3-細胞集団がもたらされる (すなわち、細胞集団全体の少なくとも50%の細胞が、CD56+ / CD3-

である)。細胞培養培地は、栄養素、ホルモン、及び／または細胞の伝播及び／または維持に役立つ他の因子の供給源として作用する。

【0130】

分化すること：「分化すること」、「誘導すること」、「変換すること」、「由来すること」などの用語は、ある表現型の細胞が別の表現型の細胞に変化するプロセスを指す。

【0131】

操作：本明細書で使用される「操作」という用語は、設計または改変され、その存在及び産生に、介入及び／または活性を必要とするポリヌクレオチド、ポリペプチド、または細胞を表す。例えば、操作細胞は、特定の効果を引き出すように意図的に設計されており、かつ同じ種の天然に存在する細胞の効果とは異なる。いくつかの実施形態では、操作細胞は、本明細書に記載の方法を使用した、iPSCまたはHPC由来のCD56+／CD3-細胞であり、キメラ抗原受容体をさらに発現する。

10

【0132】

濃縮：特定の細胞種に関して本明細書で使用される「濃縮された」という用語は、フローサイトメトリーまたは他の分析方法によって判断したときに、細胞集団内の特定の細胞種の少なくとも20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%を有する細胞集団を意味する。

【0133】

Ex vivo：本明細書で使用される場合、「ex vivo」という用語は、細胞が生物から除去され、生物の外部で増殖するプロセスを意味する（例えば、試験管内、培養バッグ内、バイオリクター内）。

20

【0134】

機能的同等物または派生物：本明細書で使用される場合、「機能的同等物」または「機能的誘導体」という用語は、アミノ酸配列の機能的誘導体の文脈において、元の配列と実質的に類似している生物学的活性（機能または構造のいずれか）を保持している分子を意味する。機能性誘導体または同等物は、天然誘導体であり得るか、または合成的に調製される。例示的な機能的誘導体としては、タンパク質の生物学的活性が保存されているという条件で、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、または付加を有するアミノ酸配列が挙げられる。置換アミノ酸は、望ましくは、置換アミノ酸と同様の化学的物物理的特性を有する。望ましい類似の化学的物物理的特性としては、電荷の類似性、かさ高さ、疎水性、親水性などが挙げられる。

30

【0135】

造血前駆細胞：「造血前駆細胞（複数可）」または「HPC（複数可）」という用語は、造血系譜に関与しているが、さらなる造血分化が可能であり、造血幹細胞、多分化能造血幹細胞、一般的な骨髓系前駆細胞、巨核球前駆細胞、赤血球前駆細胞、及びリンパ系前駆細胞を含むCD34+細胞を指す。

【0136】

HPCバルク：「HPCバルク」、「造血前駆細胞バルク」、または「HP細胞バルク」という用語は、造血前駆細胞を含む異種細胞集団を意味する。いくつかの実施形態では、HPCバルクは、iPSCに由来する。いくつかの実施形態では、HPCバルクは、血液に由来する。

40

【0137】

HPC由来NK細胞：「HPC由来NK細胞」という用語は、細胞培養培地での培養後にHPCバルク集団から得られるCD56+／CD3-免疫細胞（例えば、NKまたはNK様細胞）を意味する。

【0138】

HPC誘導培地：本明細書で使用される用語HPC誘導培地は、開始細胞集団から、造血細胞を含む細胞集団を産生するために使用される培養培地を指す。いくつかの実施形態では、開始細胞集団は、iPSCである。いくつかの実施形態では、HPC誘導培地は、BMP4、VEGF、bFGF、アスコルビン酸、TGFβ阻害剤、幹細胞因子（SCF

50

）、トロンボポエチン TPO、及び Flt3L のうちの 1 つ以上を含む。

【0139】

免疫細胞：本明細書で使用される場合、「免疫細胞（複数可）」という用語は、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、肥満細胞、好中球、及びそれらの任意の組み合わせなどの免疫系の細胞を指す。様々な実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して産生される免疫細胞は、NK 細胞であり、CD56+/CD3-細胞を特徴とする。

【0140】

人工多能性幹細胞 (iPSC)：本明細書で使用される場合、「人工多能性幹細胞」または「iPSC」という用語は、例えば、1 つ以上の遺伝子 (POU4F1/OCT4 (遺伝子 ID ; 5460) と、これらに限定されないが、SOX2 (遺伝子 ID ; 6657)、KLF4 (遺伝子 ID ; 9314)、cMYC (遺伝子 ID ; 4609)、NANOG (遺伝子 ID ; 79923)、LIN28/LIN28A (遺伝子 ID ; 79727)) との組み合わせの発現を誘導することによって、非多能性細胞、典型的には成体細胞から人工的由来である (例えば、人工) 多能性幹細胞を指す。幹細胞は、マーカーまたは遺伝子が培養の任意の段階まで保持されるように、マーカーまたは遺伝子を用いて任意の段階で遺伝子改変させ得る。マーカーは、培養の任意の段階で、分化したまたは未分化の幹細胞集団を精製または濃縮するために使用してもよい。

【0141】

誘導培地：「誘導培地」という用語は、一般に、細胞の集団を第 1 の細胞表現型から第 2 の細胞表現型に分化するために使用される細胞培養培地を指す。いくつかの実施形態では、第 1 の細胞表現型及び第 2 の細胞表現型は、異種細胞集団を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の細胞表現型は、異種細胞集団を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の細胞表現型は、異種細胞集団を含む。いくつかの実施形態では、誘導培地は、異種細胞集団を実質的に同種である細胞の集団に分化させるために使用される。

【0142】

In vitro：本明細書で使用する場合、「in vitro」という用語は、多細胞生物の内部ではなく人工環境、例えば、試験管内または反応容器内、細胞培養内などで生じる事象を指す。

【0143】

In vivo：本明細書で使用される場合、「in vivo」という用語は、ヒト及び非ヒト動物などの多細胞生物内で発生する事象を指す。細胞ベースの系の文脈では、この用語は、生細胞内で生じる事象を指すために使用され得る (例えば、in vitro 系の反対である)。

【0144】

単離ステップ：本明細書で使用される「単離ステップ」または「細胞単離ステップ」という用語は、細胞の混合物から特定の細胞種を分離するステップを意味する。細胞の混合物から特定の細胞種を分離する様々な方法が当技術分野で知られており、例えば、蛍光活性化セルソーティング (FACS) 及び磁気活性化セルソーティング (MACS) などの磁気ビーズベースのソーティング戦略が挙げられる。

【0145】

ナチュラルキラー (NK) 細胞：本明細書で使用される場合、「ナチュラルキラー細胞」または NK 細胞は、そのマーカー発現及び機能/活性によって定義されるリンパ系細胞である。例えば、ヒトでは、NK 細胞は、CD56 を発現する。さらなる実施形態では、このような NK 細胞は、CD56 及び CD16 を発現し得る。別の例では、このような NK 細胞は、CD56+/CD3-細胞であり得る。NK 細胞は、様々なレベルの CD56 を発現し得る。例えば、NK 細胞は、「CD56^{high}」であり得、これは、当技術分野の方法によって評価されたときに、例えばフローサイトメトリーによって評価されたときに、NK 細胞が高レベルの CD56 を発現することを意味する。別の例として、NK 細胞は「CD56^{dim}」であり得、これは、当技術分野の方法によって評価されたときに

、例えばフローサイトメトリーによって評価されたときに、NK細胞が低いが発現可能なレベルであるCD56を発現することを意味する。

【0146】

NK誘導培地：いくつかの実施形態では、「NK誘導培地」という用語は、CD56+ / CD3-細胞を含む細胞の集団を生成するために使用される細胞培養培地を指す。いくつかの実施形態では、NK細胞誘導培地は、1つ以上のIL-7、IL-2及び抗CD3抗体を含む。

【0147】

iPS NK細胞：本明細書で使用される場合、「iPS NK細胞」は、iPSC由来NK細胞、例えば、出発物質として、iPSCに由来するNK細胞である。このようなiPS NK細胞は、CD56を発現する。さらなる実施形態では、このようなiPS NK細胞は、CD56及びCD16を発現し得る。別の例では、このようなiPS NK細胞は、CD56を発現し得るか、CD3- (CD56+ / CD3-) であり得る。iPS NK細胞は、本明細書では「iNK細胞」とも呼ばれる。

【0148】

T細胞：本明細書で使用される場合、「T細胞」は、そのマーカー発現及び機能／活性によって定義されるリンパ系細胞である。例えば、ヒトでは、T細胞は、CD3を発現する。CD56+ / CD3+細胞は、NKT細胞として知られている。

【0149】

「一本鎖Fv抗体」または「scFv」は、直接またはペプチドリンカー配列を介して互いに接続されている軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む操作された抗体を指す。

【0150】

対象：本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、または霊長類）を指す。ヒトは、出生前及び出生後の形態を含む。多くの実施形態では、対象はヒトである。対象は、患者であり得、患者は、疾患の診断または治療のために医療提供者を訪れるヒトを指す。「対象」という用語は、本明細書において、「個体」または「患者」と互換的に使用される。対象は、疾患もしくは障害に罹患しているか、またはそれに対して感受性であるが、疾患または障害の症状を表していても、表していなくてもよい。

【0151】

に罹患している：疾患、障害、及び／または状態に「罹患している」個体は、疾患、障害、及び／または状態の1つ以上の症状があると診断されているか、またはそれらを示す。この疾患には、がん、例えばリンパ腫及び白血病が含まれ得る。

【0152】

治療的有効量：本明細書で使用される場合、治療剤（例えば、細胞療法）の「治療的有効量」という用語は、疾患、障害及び／または状態に罹患しているかまたはそれらに対して感受性があるそれらにかかり易い対象へ投与するときに、疾患、障害及び／または状態の症状（複数可）の発現を治療、診断、予防及び／または遅延させるために十分な量（例えば、特定の種または複数の種の細胞（複数可）の特定のパーセンテージで濃縮された特定の数の細胞または細胞集団）を意味する。治療的有効量は典型的に、少なくとも1回用量を含む投与計画によって投与されるものであることが当業者には分かるであろう。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCD56+ / CD3-細胞は、1つ以上の導入遺伝子を発現するように改変されている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCD56+ / CD3-細胞は、例えばCD19などのキメラ抗原受容体を発現するように改変されている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の約1億～9億のCD56+ / CD3-細胞は、それを必要とする対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の約1億～7億のCD56+ / CD3-細胞は、それを必要とする対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の約1億～5億のCD56+ / CD3-細胞は、それを必要とする対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の約2億～9億のCD56+ / CD3-細胞は、それを必要とする対象に投与される。いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態では、本明細書に記載の約 2 億～7 億の CD56+ / CD3- 細胞は、それを必要とする対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の約 2 億～5 億の CD56+ / CD3- 細胞は、それを必要とする対象に投与される。

【0153】

治療すること：本明細書で使用する場合、「治療する」、「治療」または「治療すること」という用語は、特定の疾患、傷害及び／または状態の 1 つ以上の症状もしくは特徴を部分的にまたは完全に軽減、改善、緩和、阻害もしくは予防するために、それらの開始を遅らせるために、その重症度を軽減するために、及び／またはそれらの発生率を低下させるために用いられる任意の方法を指す。治療は、疾患に関連する病状の発症リスクを低下させる目的で、疾患の兆候を示さない及び／または疾患の初期兆候のみを示す対象へも施されてよい。

10

【0154】

本明細書でのエンドポイントによる数値範囲の列挙には、その範囲内に含まれるすべての数値及び分数が含まれる（例えば、1～5 には、1、1.5、2、2.75、3、3.9、4、及び 5 が含まれる）。また、そのすべての数及び分数は、「約」という用語によって修飾されると推定されることも理解されたい。

【0155】

本発明の様々な態様は、以下の節において詳細に記載される。節の使用は、本発明を限定するものではない。各節は、本発明の任意の態様に適用できる。本出願において、「または」の使用は、別途記載のない限り、「及び／または」を意味する。本明細書で 사용되는場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が別段であると明確に指示しない限り、単数及び複数の指示対象を両方とも含む。

20

【0156】

本発明の様々な態様は、以下の節において詳細に記載される。節の使用は、本発明を限定するものではない。各節は、本発明の任意の態様に適用できる。本出願において、「または」の使用は、別途記載のない限り、「及び／または」を意味する。

【発明を実施するための形態】

【0157】

本開示は、iPS 細胞または造血前駆細胞（HPC）などの多能性細胞から NK 細胞を産生する方法を提供する。iPSC から産生された NK 細胞は、本明細書では、iPS 由来 NK 細胞、iPS NK 細胞または iNK 細胞と称する。本開示は、単離ステップを必要とすることなく、iPSC または HPC などの前駆細胞を NK 細胞または iPS NK 細胞に高効率で分化させることができる細胞培養方法を提供する。本開示はまた、得られた iPS NK 細胞が機能的であり、例えば、がんなどの様々な疾患または障害の治療に有用なキメラ抗原受容体（CAR）の導入を通じて、さらに遺伝子改変され得ることを示す。

30

【0158】

CD56+ / CD3- 細胞（NK 細胞）の様々な産生方法については、以下にさらに詳述する。

【0159】

単離ステップなく、多能性細胞から NK または iPS 由来 NK 細胞を産生する方法
いくつかの実施形態では、NK 細胞または iPS 由来 NK 細胞を産生する方法が提供され、この方法では、単離ステップを必要としない。

40

【0160】

培養法の概説

本明細書で提供される方法は、いかなる単離ステップも介在させずに、CD56+ / CD3- 細胞の産生が可能である。いくつかの実施形態では、本方法は、造血細胞（HPC）（HPC 細胞バルク）を含む細胞の集団を得るために、HPC 誘導培地において、iPSC などの多能性幹細胞を培養することを含む。HPC 細胞バルク集団は、その後、CD4 / CD8 二重陽性細胞を含む細胞集団を得るために、単離ステップを実施することなく、C

50

D 4 / C D 8 誘導培地において培養される。いくつかの実施形態では、C D 4 / C D 8 二重陽性細胞を含む細胞集団はまた、C D 4 + / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 - 細胞、及び C D 4 - / C D 8 + 細胞を含む。その後、培養期間において、C D 5 6 + / C D 3 - 免疫細胞が豊富な集団を得るために、単離ステップを実施することなく、細胞を N K 誘導培地で培養する。したがって、いくつかの実施形態では、C D 5 6 + / C D 3 - 細胞を産生する方法は、1) 造血細胞を含む集団 (H P 細胞バルク) を得るために、H P C 誘導培地で多能性細胞を培養することと; 2) C D 4 + / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 - 細胞、及び C D 4 - / C D 8 + 細胞を含む細胞の集団を得るための C D 4 / C D 8 誘導培地において、H P 細胞バルクを培養することと; 及び 3) 一定期間、N K 誘導において、C D 4 + / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 - 細胞、及び C D 4 - / C D 8 + 細胞を含む細胞の集団を培養して、C D 5 6 + / C D 3 - 細胞を得ることと、を含む。

10

【0161】

いくつかの実施形態では、N K 細胞または i P S N K 細胞を産生する方法は、造血前駆細胞を含む細胞 (例えば、H P 細胞バルク) を培養して、C D 4 / C D 8 二重陽性細胞を含む細胞集団を産生することを含み、その後の培養期間、単離ステップを実施することなく、細胞集団を培地で培養して、C D 5 6 + / C D 3 - 免疫細胞で濃縮された集団を得る。いくつかの実施形態では、多能性幹細胞由来 C D 5 6 + / C D 3 - 免疫細胞を産生する方法は、1つ以上の培地で多能性幹細胞を培養することを含む。いくつかの実施形態では、C D 5 6 + / C D 3 - 免疫細胞を産生する方法は、1つ以上の培地で造血前駆細胞を培養することを含む。いくつかの実施形態では、C D 5 6 + / C D 3 - 免疫細胞を産生する方法は、1つ以上の培地において、C D 4 / C D 8 二重陽性細胞を含む細胞の混合物または集団を培養することを含む。いくつかの実施形態では、C D 5 6 + / C D 3 - 免疫細胞を豊富に含む集団は、その後、例えば、F A C S ソーティングまたは磁気ビーズベースの単離技術など、当技術分野で知られている任意の好適な方法によって分離することができる。一実施形態では、i P S 細胞は、約 4 ~ 8 週間、5 ~ 7 週間、または約 6 週間で i P S N K 細胞に分化させ得る。したがって、いくつかの実施形態では、i P S 細胞は、約 4 ~ 8 週間で N K 細胞に分化させ得る。いくつかの実施形態では、i P S 細胞は、約 5 ~ 7 週間で N K 細胞に分化させ得る。いくつかの実施形態では、i P S 細胞は、約 6 週間で N K 細胞に分化させ得る。

20

【0162】

細胞分化プロセスは、当技術分野で知られている様々な手段によって評価することができる。例えば、いくつかの実施形態では、培養細胞の細胞分化は、培養細胞のサンプルを得て、培養細胞のそのサンプルを 1つ以上の分析方法に供して、細胞の細胞表現型を確認することによって評価することができる。細胞表現型を確認する既知の方法としては、例えば、フローサイトメトリー及び免疫蛍光イメージングが挙げられる。任意の好適なサンプリング及び表現型アッセイを、本明細書に記載の細胞培養法と共に使用して、細胞分化プロセスの進行を確認することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、所与の時間に細胞表現型を決定するための 1つ以上のサンプリングステップを含む。

30

【0163】

i P S C から H P 細胞バルクへの概説

いくつかの実施形態では、i P S C などの多能性細胞を H P C 誘導培地で培養して、H P 細胞バルクを含む集団を産生する。いくつかの実施形態では、H P C 細胞バルクを得るために H P C 誘導培地において i P S C を培養することは、H P C 誘導培地において i P S C を培養することを含む。H P C 誘導培地は、H P 細胞バルクの生産が可能になる様々な成分を含むことができる。いくつかの実施形態では、H P C 誘導培地は、骨形成タンパク質-4 (B M P 4)、血管内皮成長因子 (V E G F)、塩基性線維芽細胞成長因子 (b F G F)、アスコルビン酸、R O C K 阻害剤、G S K 3 阻害剤、幹細胞因子 (S C F)、トロンプオエチン (T P O)、F l t 3 L、及び T G F β 阻害剤から選択される少なくとも 1つ以上の化合物を含む。したがって、いくつかの実施形態では、i P S C から H P C

40

50

を誘導するためのHPC誘導培地は、BMP4を含む。いくつかの実施形態では、iPSCからHPCを誘導するための培養培地は、VEGFを含む。いくつかの実施形態では、iPSCからHPCを誘導するための培養培地は、bFGFを含む。いくつかの実施形態では、iPSCからHPCを誘導するための培養培地は、TGFβを含む。

【0164】

iPSCは、HPC誘導培地期間で、HP細胞バルクを産生するのに十分な期間培養される。いくつかの実施形態では、iPSCは、約7～21日、または10～18日、または約14日の期間、HPC誘導培地中で培養される。いくつかの実施形態では、iPSCは、約13日間、HPC誘導培地中で培養される。

【0165】

いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、約3%、4%、5%、または6% O₂などの低酸素条件で培養される。したがって、いくつかの実施形態では、細胞は、約3% O₂で培養される。したがって、いくつかの実施形態では、細胞は、約4% O₂で培養される。いくつかの実施形態では、細胞は、約5% O₂で培養される。いくつかの実施形態では、細胞は、約6% O₂で培養される。

【0166】

HP細胞バルクからCD4/CD8への概説

いくつかの実施形態では、HPC細胞バルク、または他の方法で得られたHPC、例えば、ヒトドナーから単離された一次HPCまたは胚性幹細胞由来など他の幹細胞源/種から分化したHPCは、培地中で任意の単離ステップを介在させることなくさらに培養し、CD4/CD8二重陽性(DP)細胞を含む細胞の集団を得る。いくつかの実施形態では、HPC細胞バルク、または他の方法で得られたHPC、例えば、ヒトドナーから単離された一次HPCまたは胚性幹細胞由来など他の幹細胞源/種から分化したHPCは、培地中で任意の単離ステップを介在させることなくさらに培養し、CD4+/CD8細胞を含む細胞集団を得る。いくつかの実施形態では、HPC細胞バルク、または他の方法で得られたHPC、例えば、ヒトドナーから単離された一次HPCまたは胚性幹細胞由来など他の幹細胞源/種から分化したHPCは、培地中で任意の単離ステップを介在させることなくさらに培養し、CD4-/CD8-細胞を含む細胞集団を得る。いくつかの実施形態では、HPC細胞バルク、または他の方法で得られたHPC、例えば、ヒトドナーから単離された一次HPCまたは胚性幹細胞由来など他の幹細胞源/型から分化したHPCは、培地中で任意の単離ステップを介在させることなくさらに培養し、CD4-/CD8+細胞を含む細胞集団を得る。この方法によって得られる細胞集団としては、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞、及びCD4+/CD8-細胞が含まれることを理解されたい。細胞集団には、例えば、リンパ球が含まれる。いくつかの実施形態では、HPC細胞バルクは、アスコルビン酸、幹細胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、TPO、フィブロネクチンまたはそのバリエーション、Notchリガンド(例えば、Jag-1、Jag-2、DLL-1、DLL-3、DLL-4)、p38阻害剤及びSDF-1からなる群から選択される少なくとも1つの化合物を有するCD4/CD8誘導培地で培養させ、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞、及びCD4+/CD8-細胞を含む集団を得る。したがって、いくつかの実施形態では、HPC細胞バルクは、アスコルビン酸を含むCD4/CD8誘導培地で培養させ、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞、及びCD4+/CD8-細胞を含む集団を得る。いくつかの実施形態では、HPC細胞バルクは、SCFを含むCD4/CD8誘導培地で培養させ、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞、及びCD4+/CD8-細胞を含む集団を得る。いくつかの実施形態では、HPC細胞バルクは、IL-7を含むCD4/CD8誘導培地で培養させ、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞、及びCD4+/CD8-細胞を含む集団を得る。いくつかの実施形態では、HPC細胞バルクは、Flt3Lを含むCD4/CD8誘導培地で培養させ、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、CD4+/CD8+細胞、及びCD4

10

20

30

40

50

+ / C D 8 - 細胞を含む集団を得る。いくつかの実施形態では、H P C 細胞バルクは、p 3 8 阻害剤を含むC D 4 / C D 8 誘導培地で培養させ、C D 4 - / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 + 細胞、C D 4 + / C D 8 + 細胞、及びC D 4 + / C D 8 - 細胞を含む集団を得る。いくつかの実施形態では、H P C 細胞バルクは、S D F - 1 を含むC D 4 / C D 8 誘導培地で培養させ、C D 4 - / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 + 細胞、C D 4 + / C D 8 + 細胞、及びC D 4 + / C D 8 - 細胞を含む集団を得る。

【0167】

C D 4 - / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 + 細胞、C D 4 + / C D 8 + 細胞、及びC D 4 + / C D 8 - 細胞を含む集団を得るのに好適な時間までの培養期間。いくつかの実施形態では、C D 4 - / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 + 細胞、C D 4 + / C D 8 + 細胞、及びC D 4 + / C D 8 - 細胞を含む細胞の集団を得るためにH P 細胞バルクを培養することは、約2～6週間、3～5週間または約3週間である。したがって、いくつかの実施形態では、細胞培養期間は、約2～6週間である。いくつかの実施形態では、細胞培養期間は、約3～5週間である。いくつかの実施形態では、細胞培養期間は、約3週間である。

10

【0168】

いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、約3%、4%、5%、または6% O₂などの低酸素条件で培養される。したがって、いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、約3% O₂などの低酸素条件で培養される。いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、約4% O₂などの低酸素条件で培養される。いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、約5% O₂などの低酸素条件で培養される。いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、約6% O₂などの低酸素条件で培養される。

20

【0169】

C D 4 / C D 8 細胞からC D 5 6 + / C D 3 - 細胞への概説

C D 5 6 + / C D 3 - 細胞の集団を得るために、上記のように、C D 4 - / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 + 細胞、C D 4 + / C D 8 + 細胞、及びC D 4 + / C D 8 - 細胞を含む細胞の集団は、細胞培養培地でさらに培養することができる。いくつかの実施形態では、培養培地は、N K 誘導培地である。いくつかの実施形態では、N K 誘導培地は、I L - 7、I L - 2 及び抗C D 3 抗体のうちの1つ以上を含む。

【0170】

いくつかの実施形態では、細胞の集団は、C D 4 - / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 + 細胞、C D 4 + / C D 8 + 細胞、及びC D 4 + / C D 8 - 細胞を含む細胞の集団は、単離ステップの介在なく、培養培地でさらに培養して、C D 5 6 + / C D 3 - 細胞を豊富に含む細胞の集団を得る。このようなC D 5 6 + 細胞には、例えば、ナチュラルキラー (N K) 細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、C D 4 - / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 + 細胞、C D 4 + / C D 8 + 細胞、及びC D 4 + / C D 8 - 細胞を含む集団は、C D 3 活性化因子、I L - 2 及び/またはI L - 7 を含む培地で培養される。したがって、いくつかの実施形態では、C D 4 - / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 + 細胞、C D 4 + / C D 8 + 細胞、及びC D 4 + / C D 8 - 細胞を含む集団は、C D 3 活性化因子を含む培地で培養される。C D 3 活性化因子は、当技術分野で知られており、例えば、C D 3 及び/またはC D 2 8 表面リガンドに結合する抗体複合体を含む。C D 3 活性化因子としては、例えば、抗C D 3 抗体またはそれに結合した断片を使用することができる。いくつかの実施形態では、抗C D 3 抗体が使用される場合、抗C D 3 抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。いくつかの実施形態では、抗C D 3 抗体は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗C D 3 抗体は、モノクローナル抗体である。抗体は、I g G、I g A、I g M、I g D、I g E、またはI g G の任意の免疫グロブリンクラスに属していてもよい。様々な種類の抗C D 3 抗体を使用することができ、例えば、O K T 3 クローンまたはU C H T 1 クローンから産生された抗体を使用することができる。培地中の抗C D 3 抗体の濃度は、例えば、10 n g / m l ~ 1000 n g / m l である。

30

40

50

【0171】

いくつかの実施形態では、CD4- / CD8-細胞、CD4- / CD8+細胞、CD4+ / CD8+細胞、及びCD4+ / CD8-細胞を含む細胞の集団は、CD3活性化因子、IL-2を含む培地で培養される。いくつかの実施形態では、CD4- / CD8-細胞、CD4- / CD8+細胞、CD4+ / CD8+細胞、及びCD4+ / CD8-細胞を含む細胞の集団は、IL-7を含む培地で培養される。いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、約3%、4%、5%、または6% O₂などの低酸素条件で培養される。したがって、いくつかの実施形態では、細胞は、約3% O₂で培養される。したがって、いくつかの実施形態では、細胞は、約4% O₂で培養される。したがって、いくつかの実施形態では、細胞は、約5% O₂で培養される。いくつかの実施形態では、細胞は、約6% O₂で培養される。

10

【0172】

CD56+細胞を含む細胞集団は、NK誘導培地でさらに培養して、CD56+ / CD3-細胞の細胞を豊富に含むように、NK誘導培地で培養され得る。いくつかの実施形態では、CD56+細胞を含む細胞集団は、CD56+細胞をさらに豊富に含むように、IL-7及び／またはIL-15を含むNK誘導培地で培養される。したがって、いくつかの実施形態では、CD56+細胞を含む細胞集団は、IL-7を含むNK誘導培地で培養される。いくつかの実施形態では、CD56+細胞を含む細胞集団は、IL-15を含むNK誘導培地で培養される。いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、約3%、4%、5%、または6% O₂などの低酸素条件で培養される。いくつかの実施形態では、産生されたCD56+ / CD3-細胞は、NK細胞である。産生されるCD56+ / CD3-NK細胞の割合は、少なくとも約50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%または95%超である。したがって、いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも約50%のCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも約55%のCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも約60%のCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも約65%のCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも約70%のCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも約75%のCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも約80%のCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも約85%のCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも約90%のCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、少なくとも約95%のCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、この方法は、約95%を超えるCD56+ / CD3-NK細胞をもたらす。

20

30

【0173】

いくつかの実施形態では、この培養法で産生された細胞の5%、10%、15%、20%、25%、または約30%が、CD3+T細胞である。いくつかの実施形態では、産生された細胞の5%未満が、CD3+T細胞である。いくつかの実施形態では、産生された細胞の約5%が、CD3+T細胞である。いくつかの実施形態では、産生された細胞の約10%が、CD3+T細胞である。いくつかの実施形態では、産生された細胞の約15%が、CD3+T細胞である。いくつかの実施形態では、産生された細胞の約20%が、CD3+T細胞である。いくつかの実施形態では、産生された細胞の約25%が、CD3+T細胞である。いくつかの実施形態では、産生された細胞の約30%が、CD3+T細胞である。

40

【0174】

いくつかの実施形態では、CD56+CD3-細胞を豊富に含む集団は、当技術分野で知られている方法によって単離される。このような方法としては、例えば、フローサイトメトリー（FACS）ベースの選別方法及び磁気ベースの選別方法（MACS）が挙げら

50

れる。

【0175】

いくつかの実施形態では、CD4- / CD8-細胞、CD4- / CD8+細胞、CD4+ / CD8+細胞、及びCD4+ / CD8-細胞を含む集団からのCD56+ / CD3- NK細胞を得るための培養期間は、約4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17または18日である。いくつかの実施形態では、培養期間は、約7日である。

【0176】

いくつかの実施形態では、濃縮されたCD56+細胞集団は、NK細胞を含む。いくつかの実施形態では、濃縮されたCD56+細胞は、CD3-細胞を含む。いくつかの実施形態では、濃縮されたCD56+細胞は、CD3+細胞を含む。

【0177】

CD56+ / CD3-細胞への分化にとって好適である多能性細胞

いくつかの実施形態では、任意の多能性、多分化能、または患者由来のHPCを、本明細書に記載の方法で使うことができる。例えば、いくつかの実施形態では、細胞は、胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、成体幹細胞である。様々な成体幹細胞が当技術分野で知られており、例えば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、臍帯由来細胞、骨髄幹細胞、脂肪幹細胞などが挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞は、人工多能性幹細胞(iPSC)である。したがって、本明細書に記載の方法に従って産生されるNK細胞は、ドナーに直接由来する一次HPCなどの任意の多能性、多分化能、または患者由来のHPCから作製することができる。

【0178】

いくつかの実施形態では、多能性細胞は、例えば、胚性幹(ES)細胞、核移植によって得られたクローン化胚に由来する胚性幹細胞(nteSC細胞)、生殖幹細胞(「GS細胞」)、胚性生殖細胞(「EG細胞」)、iPS細胞、及び培養線維芽細胞または骨髄幹細胞(ミューズ細胞)に由来する多能性細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、iPS細胞は、健康な個体の末梢血単核細胞に由来することができる。iPS細胞を産生するための方法は、当技術分野で知られている。これらの細胞は、任意の体細胞に再プログラミング因子を導入することによって産生することができる。本明細書における再プログラミング因子の例としては、Oct3 / 4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tel1、ベータカテニン、Lin28b、Sal11、Sal14、Esrrb、Nr5a2、Tbx3、及びGlis1などの遺伝子、及びそれらの遺伝子産物が挙げられる。これらの再プログラミング因子は、個別に使用することも、2つ以上を組み合わせることもできる。再プログラミング因子の組み合わせの例としては、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, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26; 795-797, Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2; 525-528, Eminli S, et al. (2008),

10

20

30

40

50

Stem Cells. 26; 2467-2474, Eluangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol. 26; 1269-1275, Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574, Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3; 475-479, Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135, Feng B, et al. (2009), Nat. Cell Biol. 11; 197-203, R. L. Judson et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27; 459-461, Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci US A. 106; 8912-8917, Kim J, et al. (2009), Nature. 461; 649-643, Ichida J K, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5; 491-503, Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6; 167-74, Han J, et al. (2010), Nature. 463; 1096-100, Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28; 713-720、及び Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474; 225-9に記載のものが挙げられる。

10

【0179】

iPSCは、任意の好適な組織から得ることができる。いくつかの実施形態では、iPSCは、末梢血単核細胞から得られる。

20

【0180】

造血前駆細胞（HPC）は、リンパ球、好酸球、好中球、好塩基球、赤血球、及び巨核球などの血液細胞に分化できる細胞である。造血前駆細胞または造血幹細胞は、例えば、CD34及び／またはCD43表面抗原の存在に基づいて、同定することができる。

【0181】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCD56+／CD3-NK細胞を産生するために使用される細胞は、細胞分化の任意の段階で、遺伝子改変されている。いくつかの実施形態では、CD56+／CD3-NK細胞は、所望のキメラ抗原受容体（CAR）、T細胞受容体（TCR）、または他の操作されたタンパク質を含むように遺伝子改変されている。

30

【0182】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCD56+／CD3-NK細胞を産生するために使用される細胞は、多能性、多分化能、または単能性の段階で遺伝子改変されている。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCD56+／CD3-NK細胞を産生するために使用される細胞は、多能性段階で、遺伝子改変されている。例えば、細胞は、胚性幹細胞の段階またはiPSC幹細胞の段階で遺伝子改変させ得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCD56+／CD3-NK細胞を産生するために使用される細胞は、多分化能段階で遺伝子改変されている。例えば、細胞は、造血幹細胞（HSC）の段階で遺伝子改変させ得る。

【0183】

培養条件－iPSCからHPC細胞バルク

40

いくつかの実施形態では、iPSCから造血前駆細胞を産生するための培地（すなわち、HPC誘導培地）は、動物細胞の培養に使用される基礎培地にビタミンCを添加することによって調製され得る。基礎培地の例としては、イスコーブ改変ダルベッコ培地（IMDM）、培地199、イーグル最小必須培地（EMEM）、αMEM培地、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、ハムF12培地、RPMI 1640培地、フィッシャー培地、及び神経基礎培地（Life Technologies）、及びこれらの培地の2つ以上の混合物が挙げられる。いくつかの実施形態では、培地は、血清を含む。いくつかの実施形態では、培地は、無血清である。

【0184】

いくつかの実施形態では、HPC誘導培地は、StemPro商標－34を含み得る。

50

StemPro 商標-34 は、培養中のヒト造血細胞の発育をサポートするために処方された無血清培地である。

【0185】

必要に応じて、いくつかの実施形態では、HPC 誘導培地はまた、アルブミン、ヒトインスリン、ヒトトランスフェリン、セレンまたはセレン酸ナトリウム、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、 α -モノチオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、成長因子、低分子量化合物、抗生物質、抗酸化剤、ビルビン酸、緩衝液、無機塩、及びサイトカインなどの1つ以上の物質を含み得る。

【0186】

いくつかの実施形態では、HPC 誘導培地としては、血清、インスリン、トランスフェリン、セレン、チオールグリセロールまたは α -モノチオールグリセロール、L-グルタミン、及びアスコルビン酸を含むIMDM培地を含む。

【0187】

いくつかの実施形態では、HPC 誘導培地は、骨形成タンパク質4 (BMP4) シグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす1つ以上の物質を含む。このような物質としては、これに限定されないが、BMP4が挙げられる。

【0188】

いくつかの実施形態では、HPC 誘導培地は、血管内皮成長因子 (VEGF) シグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす1つ以上の物質を含む。このような物質としては、これに限定されないが、VEGFが挙げられる。

【0189】

いくつかの実施形態では、HPC 誘導培地は、線維芽細胞成長因子 (FGF) 経路のシグナル伝達を引き起こす1つ以上の物質を含む。このような物質としては、これらに限定されないが、bFGF及びFGF2が挙げられる。

【0190】

いくつかの実施形態では、HPC 誘導培地は、幹細胞因子 / kit のシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす1つ以上の物質を含む。このような物質としては、これに限定されないが、SCFが挙げられる。

【0191】

いくつかの実施形態では、HPC 誘導培地は、Flt3リガンドシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす1つ以上の物質を含む。このような物質としては、これらに限定されないが、Flt3リガンド (Flt3L) が挙げられる。

【0192】

いくつかの実施形態では、HPC 誘導培地は、トロンボポエチンシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす1つ以上の物質を含む。このような物質としては、これに限定されないが、TPOが挙げられる。

【0193】

TGF β 阻害剤は、TGF β ファミリーのシグナル伝達を妨害する低分子阻害剤であり、例えば、SB431542、SB202190 (R. K. Lindemann et al., Mol. Cancer 2:20 (2003))、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories) などが挙げられる。

【0194】

SB431542 は、形質転換成長因子ベータ (TGF β) スーパーファミリーI型アクチビン受容体様キナーゼ (ALK) 受容体ALK4、ALK5、及びALK7の強力かつ特異的な阻害剤である。

【0195】

例えば、TGF β 阻害剤が、SB431542である場合、培地中のその濃度は、好ま

10

20

30

40

50

しくは、 $0.5 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ である。

【0196】

HP細胞バルク集団を産生するためのHPC誘導培地は、BMP4（骨形成タンパク質4）、VEGF（血管内皮成長因子）、bFGF（塩基性線維芽細胞成長因子）、SCF（幹細胞因子）、TPO（トロンボポエチン）、及びFlt3L（Flt3リガンド）からなる群から選択されるサイトカイン（複数可）をさらに添加され得る。

【0197】

一実施形態では、HPC誘導培地は、ヒトインスリン（約 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）、ヒトトランスフェリン（約 $5.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）、亜セレン酸ナトリウム（約 $6.7 \text{ng}/\text{ml}$ ）、L-グルタミン（約 2mM ）、 α -モノチオグリセロール（約 0.4mM ）、及びSB431542（約 $6 \mu\text{M}$ ）が添加されたStemPro34を含み得る。

10

【0198】

いくつかの実施形態では、ビタミンCは、培養期間中、4日ごと、3日ごと、2日ごと、または毎日添加することができる。培地へのビタミンCの添加は、約 $5 \mu\text{g}/\text{ml} \sim$ 約 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ に相当する量で行うことができる。いくつかの実施形態では、ビタミンCは、培地中に約 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ で存在する。

【0199】

本明細書では、「ビタミンC」とは、L-アスコルビン酸及びその誘導体を意味し、「L-アスコルビン酸誘導体」とは、生体内で酵素反応によりビタミンCとなる誘導体を意味する。L-アスコルビン酸の誘導体の例としては、ビタミンCホスフェート（例えば、アスコルビン酸2-ホスフェート）、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビルエチル、ビタミンCエステル、アスコルビルテトラヘキシルデカノエート、アスコルビルステアレート、及びアスコルビル2-ホスフェート6-パルミテートが挙げられる。好ましいのは、ビタミンCホスフェートである。ビタミンCホスフェート（例えば、アスコルビン酸2-ホスフェート）の例としては、L-アスコルビン酸ホスフェートの塩、例えば、L-アスコルビン酸ホスフェートNa及びL-アスコルビン酸ホスフェートMgなどが挙げられる。

20

【0200】

いくつかの実施形態では、骨形成タンパク質4（BMP4）シグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす物質がBMP4である場合、造血前駆細胞を産生するためのHPC誘導培地中でのBMP4の濃度は、約 $5 \text{ng}/\text{ml} \sim 500 \text{ng}/\text{ml}$ 、例えば、 $5 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $10 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $20 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $30 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $40 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $50 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $60 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $70 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $80 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $90 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $100 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $150 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $200 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $250 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $300 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $350 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $400 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $450 \text{ng}/\text{ml}$ または $500 \text{ng}/\text{ml}$ である。

30

【0201】

いくつかの実施形態では、血管内皮成長因子（VEGF）シグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす物質が、VEGFである場合、造血前駆細胞を産生するためのHPC誘導培地中でのVEGFの濃度は、約 $5 \text{ng}/\text{ml} \sim 500 \text{ng}/\text{ml}$ 、例えば、約 $5 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $10 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $20 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $30 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $40 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $50 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $60 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $70 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $80 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $90 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $100 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $150 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $200 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $250 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $300 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $350 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $400 \text{ng}/\text{ml}$ 、 $450 \text{ng}/\text{ml}$ または $500 \text{ng}/\text{ml}$ である。

40

【0202】

いくつかの実施形態では、線維芽細胞成長因子（FGF）シグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす物質が、bFGFである場合、造血前駆細胞を産生するためのHPC誘

50

導培地中でのbFGFの濃度は、約5 ng/ml～500 ng/ml、例えば、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または500 ng/mlである。

【0203】

いくつかの実施形態では、幹細胞因子/kitシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす物質がSCFである場合、造血前駆細胞を産生するためのHPC誘導培地中でのSCFの濃度は、約5 ng/ml～100 ng/ml、例えば、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、または100 ng/mlである。

10

【0204】

いくつかの実施形態では、Flt3リガンドシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす物質がFlt3Lである場合、造血前駆細胞を産生するためのHPC誘導培地中でのFlt3Lの濃度は、約1 ng/ml～100 ng/ml、例えば、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、または100 ng/mlである。

20

【0205】

いくつかの実施形態では、トロンボポエチンシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす物質がTPOである場合、造血前駆細胞を産生するためのHPC誘導培地中でのTPOの濃度は、約1 ng/ml～200 ng/ml、例えば、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、または200 ng/mlである。

【0206】

いくつかの実施形態では、多能性幹細胞は、付着培養または浮遊培養によって培養され得る。付着培養の場合、培養は、コーティング剤でコーティングされた培養容器内で実施してもよく、及び/または他の細胞と共培養してもよい。共培養用の他の細胞の例としては、C3H10T1/2 (Takayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830, 2010) 及び異なる種に由来する間質細胞 (Niwa A et al. J Cell Physiol. 2009 Nov; 221 (2): 367-77) が挙げられる。コーティング剤の例としては、マトリゲル (Nivea A, et al. PLoS One. 6 (7): e22261, 2011)、iMatrix511 (Miyazaki T, et al. Nature Communication 2012; 3: 1236)、ゼラチン、コラーゲン、エラスチンなど、グリコサミノグリカン及びプロテオグリカン、例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸など、細胞接着タンパク質、例えば、フィブロネクチンまたはその変形、ビトロネクチン、ラミニンなどが挙げられる。浮遊培養の方法の例としては、Chadwick et al. Blood 2003, 102: 906-15, Vijayaragavan et al. Cell Stem Cell 2009, 4: 248-62、及びSaeki et al. Stem Cells 2009, 27: 59-67に記載されている方法が挙げられる。

30

40

【0207】

いくつかの実施形態では、HP細胞バルクはまた、多能性幹細胞の培養によって得られたネット様構造（これは、ES-sacまたはiPS-sacとも呼ばれる）から調製され得る。本明細書における「ネット様構造」は、多能性幹細胞に由来する三次元の囊状構

50

造（内部に空間を有する）である。この構造は、内皮細胞集団内で形成されており、内部に造血前駆細胞を含む。

【0208】

いくつかの実施形態では、HP細胞バルクを産生するための培養の温度条件は、約37℃～約42℃である。いくつかの実施形態では、温度は、例えば、約37℃～約42℃、好ましくは約37℃～約39℃である。培養期間は、造血前駆細胞の数を監視することなど、表現型分析のために細胞培養物からサンプルを得ることによって、当業者によって適切に決定され得る。細胞サンプルの表現型分析に関連する様々な種類の方法が当技術分野で知られており、例えば、フローサイトメトリー及び免疫蛍光法が挙げられる。

【0209】

HP細胞バルクを得るための培養期間は、変動し得、例えば、6日～14日であり得る。培養期間の例としては、少なくとも6日、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上、及び14日以上が挙げられる。いくつかの実施形態では、この培養期間は、6日間である。いくつかの実施形態では、この培養期間は、7日間である。いくつかの実施形態では、この培養期間は、8日間である。いくつかの実施形態では、この培養期間は、9日間である。いくつかの実施形態では、この培養期間は、10日間である。いくつかの実施形態では、この培養期間は、11日間である。いくつかの実施形態では、この培養期間は、12日間である。いくつかの実施形態では、この培養期間は、13日間である。いくつかの実施形態では、この培養期間は、14日間である。いくつかの実施形態では、培養期間は、14日を超える。培養は、低酸素条件下で実施することができる。低酸素条件の例としては、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%またはそれ以下が挙げられる。培地交換の頻度は、当業者によって決定することができる。いくつかの実施形態では、培地は、2日ごとに交換することができる。他のいくつかの実施形態では、培地は、3日ごとに交換できる。いくつかの実施形態では、培地は、毎日交換する。

【0210】

いくつかの実施形態では、HP細胞バルクを産生するための培養は、上記の条件のうちの1つ以上を組み合わせることによって実施される。例えば、いくつかの実施形態では、iPSCからHP細胞バルクを得る方法は、(i)多能性幹細胞を低酸素条件下でビタミンCを添加した基礎培地中においてC3H10T1/2上で培養することと；(ii)(1)の培養液にVEGF、SCF、及びFlt3Lをさらに添加することと、通常の酸素条件下で細胞を培養することと、を含む。ステップ(i)が実施される期間は、少なくとも6日以上、好ましくは7日以上、より好ましくは7日である。ステップ(ii)が実施される期間は、少なくとも6日以上、好ましくは7日以上、より好ましくは7日である。

【0211】

いくつかの実施形態では、HP細胞バルク中で得られた造血前駆細胞は、さらなる使用前に単離され得る。いくつかの他の実施形態では、得られた造血前駆細胞は、他の細胞種も含む細胞集団（HP細胞バルク）として使用され得る。HP細胞バルク集団は、分離されていない細胞調製物である。いくつかの実施形態では、この方法は、単離ステップを含まない。

【0212】

培養条件—HP細胞バルクからCD4/CD8細胞

いくつかの実施形態では、CD4/CD8誘導培地は、CD4+/CD8+、CD4-/CD8-細胞、CD4-/CD8+細胞、及びCD4+/CD8-細胞を含む細胞集団をもたらす。「CD4/CD8二重陽性細胞」（DP細胞）とは、CD4及びCD8の両方を発現する細胞を意味する。CD4/CD8二重陽性細胞は、CD4、CD8、CD3、及びCD45陽性の細胞として同定できる。「CD4/CD8二重陰性細胞」（DN細胞）とは、CD4-及びCD8-の両方を発現しない細胞を意味する。「CD4-/CD8+細胞」とは、CD4-を発現しないが、CD8+を発現する細胞を意味する。「CD

4 + / C D 8 - 細胞」とは、C D 4 を発現するが、C D 8 を発現しない細胞を意味する。

【0213】

いくつかの実施形態では、C D 4 + / C D 8 +、C D 4 - / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 + 細胞、及び C D 4 + / C D 8 - 細胞を含む細胞集団は、C D 5 6 + / C D 3 - 細胞に分化するように誘導することができる。

【0214】

いくつかの実施形態では、とりわけ、C D 4 / C D 8 二重陽性細胞を含む細胞集団は、ビタミン C を添加した培地で、造血前駆細胞または H P 細胞バルクを培養するステップを含む方法によって産生することができる。基礎培地に添加されるビタミン C は、H P 細胞バルクの上記の誘導におけるものと同じである。

【0215】

いくつかの実施形態では、H P 細胞バルクから C D 4 + / C D 8 +、C D 4 - / C D 8 - 細胞、C D 4 - / C D 8 + 細胞、及び C D 4 + / C D 8 - 細胞を含む細胞集団を産生するために使用される培地は、C D 4 / C D 8 誘導培地である。いくつかの実施形態では、C D 4 / C D 8 誘導培地は、動物細胞の培養に使用される基礎培地にビタミン C を添加することによって調製され得る。基礎培地の例としては、イスコーブ改変ダルベッコ培地 (I M D M)、培地 1 9 9、イーグル最小必須培地 (E M E M)、 α M E M 培地 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c (G i b c o))、ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M)、ハムの F 1 2 培地、R P M I 1 6 4 0 培地、フィッシャー培地、及び神経基礎培地 (L i f e T e c h n o l o g i e s)、及びこれらの培地の 2 つ以上の混合物が挙げられる。培地は、血清を含めてもよく、無血清を含まなくてもよい。

【0216】

必要に応じて、基礎培地はまた、アルブミン、ヒトインスリン、ヒトトランスフェリン、セレンまたはセレン酸ナトリウム、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、成長因子、低分子量化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝液、無機塩、及びサイトカインなどの物質のうちの 1 つ以上を含み得る。

【0217】

他の細胞の中でも、C D 4 / C D 8 二重陽性細胞を含む細胞集団を産生するための C D 4 / C D 8 誘導培地は、アスコルビン酸、S C F、I L - 7、F l t 3 L、T P O、フィブロネクチンまたはそのバリエーション、N o t c h リガンド、p 3 8 阻害剤及び S D F - 1 からなる群から選択されるサイトカイン (複数可) でさらに添加され得る。

【0218】

いくつかの実施形態では、ビタミン C は、培養期間中、4 日ごと、3 日ごと、2 日ごと、または毎日添加することができる。培地へのビタミン C の添加は、約 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ ~ 約 $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ に相当する量で行うことができる。いくつかの実施形態では、ビタミン C は、培地中に約 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $300 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $400 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、または $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ で存在する。

【0219】

いくつかの実施形態では、基礎培地は、幹細胞因子 / k i t のシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす 1 つ以上の物質を含む。このような物質としては、これに限定されないが、S C F が挙げられる。

【0220】

いくつかの実施形態では、基礎培地は、F l t 3 リガンドのシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす 1 つ以上の物質を含む。このような物質としては、これらに限定されないが、F l t 3 リガンド (F l t 3 L) が挙げられる。

【0221】

いくつかの実施形態では、基礎培地は、トロンボポエチンシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす 1 つ以上の物質を含む。このような物質としては、これに限定されない

10

20

30

40

50

が、TPOが挙げられる。

【0222】

いくつかの実施形態では、基礎培地は、p38 α 及びp38 β の阻害剤である1つ以上のp38阻害剤を含み、これは、MAPKAPキナーゼ-2及び熱ショックタンパク質27の下流の活性化を抑制する。本発明で使用されるp38の化学的阻害剤の例としては、SB203580(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルホニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール)、及びその誘導体、SB202190(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-ヒドロキシフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール)及びその誘導体、SB239063(トランス-4-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(2-メトキシ-4-ピリミジニル)-1H-イミダゾール-1-イル]シクロヘキサノール)及びその誘導体、SB220025及びその誘導体、PD169316、RPR200765A、AMG-548、BIRB-796、SCLO-469、SCIO-323、VX-702及びFR167653が挙げられる。これらの化合物は市販されており、例えば、SB203580、SB202190、SC239063、SB220025及びPD169316は、Calbiochemから入手可能であり、SCLO-469及びSCIO-323は、Sciosなどから入手可能である。p38阻害剤の他の例としては、p38のDNA結合領域にある180位のスレオニンのアラニンへの点突然変異によって得られるp38T180A、ヒト及びマウスにおけるp38の182位のチロシンのフェニルアラニンへの点突然変異によって得られるp38Y182Fなどを含むp38のドミナント陰性突然変異体を含む。p38阻害剤は、例えば、約0.5 μ M～約50 μ Mの培地に含まれる。

10

20

【0223】

いくつかの実施形態では、基礎培地は、SDF-1を含む。

【0224】

いくつかの実施形態では、SDF-1は、SDF-1 α またはその成熟形態のみでなく、SDF-1 β 、SDF-1 γ 、SDF-1 δ 、SDF-1 ϵ 、SDF-1 ϕ などのアイソフォームもしくはそれらの成熟形態でもあり得るか、またはこれらの任意の比率での混合物であり得る。好ましくは、SDF-1 α が使用される。SDF-1は、CXCL-12またはPBSEと呼ばれることもある。

【0225】

いくつかの実施形態では、SDF-1のアミノ酸配列中の1つまたはいくつかのアミノ酸は、ケモカインとしての活性を有する限り、置換され、欠失され、及び／または付加され得る。同様に糖鎖は、置換され、欠失され、及び／または付加され得る。少なくとも4つのシステイン残基(ヒトSDF-1 α 中のCys30、Cys32、Cys55及びCys71)が維持され、天然物質のアミノ酸配列と90%以上の同一性を呈する限り、アミノ酸突然変異は許容される。SDF-1は、哺乳動物、例えば、サル、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどのヒトまたは非ヒト哺乳動物から得ることができる。例えば、GenBankアクセッション番号NP_954637として登録されているタンパク質は、ヒトSDF-1 α として使用でき、GenBankアクセッション番号：NP_000600として登録されているタンパク質は、SDF-1 β として使用できる。いくつかの実施形態では、Flt3リガンドシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす物質がFlt3Lである場合、CD4/CD8二重陽性細胞を含む細胞集団を産生するための培地中のFlt3Lの濃度は、約1ng/ml～100ng/mlであり、例えば、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、または100ng/mlである。

30

40

【0226】

いくつかの実施形態では、幹細胞因子/k α itシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす物質がSCFである場合、SCFは、上記と同じ条件下で、CD4/CD8二重陽

50

性細胞を含む細胞集団の産生に使用される。

【0227】

いくつかの実施形態では、幹細胞因子／k i tシグナル伝達経路のシグナル伝達を引き起こす物質がTPOである場合、TPOは、上記と同じ条件下で、CD4／CD8二重陽性細胞を含む細胞集団の産生に使用される。

【0228】

本発明で使用されるフィブロネクチンまたはそのバリエーションは、それがCD3陽性細胞に結合することができる分子である限り、特に限定されない。フィブロネクチンのバリエーションは、CD3陽性細胞の表面で、VLA-5及びVLA-4に結合できる分子である限り、特に限定されるものではなく、その例としては、Retronectinが挙げられる。フィブロネクチン及びそのバリエーションは、培地中において任意の形態で存在し得る。例えば、これらは、培養中に培地に含まれ得るか、または培養容器に固定化され得、好ましくは培養容器に固定化される。

【0229】

フィブロネクチンまたはそのバリエーションが培地中に含まれる場合、フィブロネクチンまたはそのバリエーションの濃度の下限は、10 ng/ml以上、好ましくは、100 ng/ml以上であり得、上限は、10000 µg/ml以下、好ましくは、1000 µg/ml以下であり得る。

【0230】

いくつかの実施形態では、CD4／CD8二重陽性細胞を含む細胞集団を産生するために使用される培地中のIL-7の濃度は、約1 ng/ml～100 ng/ml、例えば、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、または100 ng/mlである。

【0231】

SDF-1は、市販され得る、自然界から精製され得る、またはペプチド合成もしくは遺伝子工学技術によって産生され得る。SDF-1は、例えば約10 ng/ml～約100 ng/mlの範囲で培地中に含まれる。さらに、SDF-1の代わりに、SDF-1のような活性を有するSDF-1代替物を使用することもできる。そのようなSDF-1代替物の例としては、CXCR4アゴニストが挙げられ、CXCR4アゴニスト活性などを有する低分子量化合物を、SDF-1の代わりに培地に添加してもよい。

【0232】

いくつかの実施形態では、SDF-1がSDF1αである場合、CD4／CD8二重陽性細胞を含む細胞集団を産生するための培地中のSDF-1αの濃度は、約1 nM～100 nM、例えば、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、または100 nMである。

【0233】

いくつかの実施形態では、p38阻害剤がSB203580である場合、CD4／CD8二重陽性細胞の細胞集団を産生するための培地中のSB203580の濃度は、約0.5 µM～100 µM、例えば、0.5 µM、1 µM、2 µM、3 µM、4 µM、5 µM、6 µM、7 µM、8 µM、9 µM、10 µM、15 µM、20 µM、30 µM、40 µM、or 50 µM、60 µM、70 µM、80 µM、90 µM、または100 µMである。

【0234】

いくつかの実施形態では、CD4／CD8二重陽性細胞を含む細胞集団を産生するための基礎培地は、約15% FBS、約4 mMのL-グルタミン、約100 U/mlのペニシリン、約100 µg/mlのストレプトマイシン、約55 µMの2-メルカプトエタノール、約50 µg/mlのアスコルビン酸2-ホスフェート、約10 µg/mlのヒトインスリン、約5.5 µg/mlのヒトトランスフェリン、約6.7 ng/mlのセレン酸ナ

10

20

30

40

50

トリウム、約50 ng/mlのSCF、約50 ng/mlのIL-7、約50 ng/mlのFlt3L、約100 ng/mlのTPO、約15 µMのSB203580、約30 nMのSDF-1αを添加したαMEM培地を含む。

【0235】

CD4/CD8二重陽性細胞を含む細胞集団の生産において、造血前駆細胞は、付着培養または浮遊培養によって培養することができる。いくつかの実施形態では、培養容器/培養ディッシュは、DLL1もしくはDLL4、またはDLL4もしくはDLL1の融合タンパク質、及びFcなどでコーティングされている。DLL1またはDLL4は、組換えヒト(rh)-DLL1またはrh-DLL4であり得る。いくつかの実施形態では、培養容器/培養ディッシュは、rh-DLL4/Fc キメラ(Sino Biological)及びRetroNectin(Takara Bio Inc)でコーティングされている。付着培養の場合、コーティングされた培養容器を使用してもよく、及び/または造血前駆細胞は、フィーダー細胞などと共培養してもよい。共培養用のフィーダー細胞の例としては、骨髄間質細胞株、OP9細胞(Riken BioResource Centerから入手可能)が挙げられる。OP9細胞は、好ましくは、DLL1を絶えず発現するOP-DL1細胞(Holmes R I and Zuniga-Pflucker J C. Cold Spring Harb Protoc. 2009 (2))であり得る。いくつかの実施形態では、OP9細胞が、フィーダー細胞、別々に調製されたDLL1またはDLL1とFcなどとの融合タンパク質として使用される場合、培地に添加されて、共培養を実施し得る。いくつかの実施形態では、DLL1は、ヒトの場合、NCBIアクセッション番号NM#005618、マウスの場合、NCBIアクセッション番号NM#007865のヌクレオチド配列を有する遺伝子によってコードされるタンパク質及びこれらのタンパク質に対して高い配列同一性(例えば、90%以上の配列同一性を有する)を有し、同等の機能を有する天然に存在する突然変異体を含むことができる。フィーダー細胞が、CD4/CD8二重陽性細胞を含む細胞集団を産生するために使用される場合、フィーダー細胞は、培養中に適切に交換できる。フィーダー細胞の交換は、培養されている対象細胞を、予備的にプレーティングされたフィーダー細胞に移すことによって実施することができる。交換は、5日ごと、4日ごと、3日ごと、または2日ごとに実施し得る。

【0236】

いくつかの実施形態では、CD4/CD8二重陽性細胞の細胞集団を産生するためのHP細胞バルクの培養のための培養温度条件は、以下を含む。CD4/CD8二重陽性細胞は、約37℃~約42℃、及び約37℃~約39℃である。いくつかの実施形態では、培養は、低酸素条件下で実施され得る。低酸素状態の例としては、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、及びこれらより低い酸素濃度が挙げられる。培養期間は、CD4/CD8二重陽性細胞などを含む異なる種の細胞の数を監視することによって、当業者によって適切に決定され得る。培養期間の例としては、10日以上、12日以上、14日以上、16日以上、18日以上、20日以上、21日以上、23日以上、25日以上、28日以上、30日以上、35日以上、または42日以上が挙げられる。他のいくつかの実施形態では、培養から得られたCD4/CD8二重陽性細胞は、他の細胞種も含む細胞集団(DP細胞バルク)である。

【0237】

CD4/CD8二重陽性細胞を含む細胞集団から特定の細胞種(例えば、CD4-CD8+細胞)の集団が単離される場合、単離される細胞種に応じて、これらに限定されないが、CD4、CD8、CD3、及びCD45など、任意の1つの指標を使用して単離を実施してもよい。単離方法は、当業者に周知の方法、例えば、細胞を特定の抗体(例えば、CD4、CD8、CD3、またはCD45抗体)で標識し、次いで、フローサイトメータを用いて単離する方法、または所望の抗原を固定化するアフィニティーカラムなどを用いて細胞を精製する方法であり得る。

【0238】

10

20

30

40

50

CD4/CD8二重陽性細胞を含む細胞集団からCD56+/CD3-細胞を誘導するステップ

いくつかの実施形態では、NK細胞は、CD56+/CD3-免疫細胞である。

【0239】

いくつかの実施形態では、NK細胞は、ビタミンCを添加した培地中で、CD4/CD8二重陽性細胞を含む細胞集団またはDP細胞バルクを培養するステップを含む方法によって産生される。いくつかの実施形態では、NK誘導培地を使用して、CD56+/CD3-細胞を産生する。

【0240】

いくつかの実施形態では、培地は、動物細胞の培養に使用される基礎培地にビタミンCを添加することによって調製する。基礎培地の例としては、イスコーブ改変ダルベッコ培地 (IMDM)、培地199、イーグル最小必須培地 (EMEM)、 α MEM培地、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、ハムのF12培地、RPMI 1640培地、フィッシャー培地、及び神経基礎培地 (Life Technologies)、及びこれらの培地の2つ以上の混合物が挙げられる。いくつかの実施形態では、培地は、血清を含む。いくつかの実施形態では、培地は、無血清である。必要に応じて、基礎培地はまた、アルブミン、ヒトインスリン、ヒトトランスフェリン、セレンまたはセレン酸ナトリウム、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、成長因子、低分子量化合物、抗生物質、抗酸化剤、ビルビン酸、緩衝液、無機塩、及びサイトカインなどの物質のうちの1つ以上を含み得る。

10

20

【0241】

いくつかの実施形態では、CD56陽性NK細胞の産生に使用される培地は、抗CD3抗体 (UCHT1) 及びサイトカインをさらに含む。好適なサイトカインの例としては、IL-2及びIL-7が挙げられる。

【0242】

CD3抗体は、CD3を特異的に認識する限り制限されない。いくつかの実施形態では、NK誘導培地中のCD3抗体の濃度は、約10ng/ml~1000ng/ml、例えば、10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/ml、600ng/ml、700ng/ml、800ng/ml、900ng/ml、または1000ng/mlである。

30

【0243】

いくつかの実施形態では、ビタミンCは、上記と同じ条件下でCD56陽性NK細胞を産生するために使用される。

【0244】

いくつかの実施形態では、CD56陽性NK細胞を産生するためのNK誘導培地におけるIL-2の濃度は、約1U/ml~1000U/ml、例えば、約1U/ml、5U/ml、10U/ml、20U/ml、30U/ml、40U/ml、50U/ml、60U/ml、70U/ml、80U/ml、90U/ml、100U/ml、500U/ml、または1000U/mlである。いくつかの実施形態では、CD56陽性NK細胞を産生するためのNK誘導培地におけるIL-2の濃度は、約1ng/ml~100ng/ml、例えば、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、または100ng/mlである。

40

【0245】

いくつかの実施形態では、CD56陽性NK細胞を産生するためのNK誘導培地におけるIL-7の濃度は、約1ng/ml~100ng/ml、例えば、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、または100ng/mlである。

50

【0246】

いくつかの実施形態では、CD56陽性NK細胞を産生するためのCD4／CD8二重陽性細胞を含む集団を培養するための培養温度条件は、約37℃～約42℃、または約37℃～約39℃である。培養期間は、当業者がCD56陽性NK細胞の数などを監視することにより、適切に決定することができる。CD56陽性NK細胞が得ることができる限り、培養日数は制限しない。培養期間の例としては、少なくとも1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、または7日以上が挙げられる。

【0247】

いくつかの実施形態では、得られたCD56＋NK細胞は、さらに使用する前に単離させてもよい。いくつかの他の実施形態では、得られたCD56陽性NK細胞は、T細胞（NK細胞バルク）など、他の細胞種も含む細胞集団として使用され得る。

10

【0248】

いくつかの実施形態では、NK細胞バルクは、50％、55％、60％、75％、80％、85％、90％、または90％以上のNK細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、NK細胞バルクは、約10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、または、50％のT細胞を含む。いくつかの実施形態では、NK細胞バルクは、約75％のCD56＋／CD3－NK細胞及び約25％のCD56＋／CD3＋T細胞を含む。いくつかの実施形態では、NK細胞バルクはまた、B細胞及び単球を含み得る。

【0249】

CD56＋NK細胞が単離される場合、単離方法は、当技術分野で周知の方法、例えば、細胞を抗CD56抗体及び抗CD3抗体で標識し、次に、フローサイトメータ（蛍光活性化セルソーティング）を使用して単離する方法、または所望の抗原を固定化するアフィニティカラムなどを使用して細胞を精製する方法であり得る。

20

【0250】

いくつかの実施形態では、CD56陽性NK細胞は、CD56＋／CD3＋である。いくつかの実施形態では、CD56陽性NK細胞は、CD56＋／CD3－である。

【0251】

CAR－NK細胞の調製

いくつかの実施形態では、NK細胞は、1つ以上の導入遺伝子を含むように操作される。例えば、NK細胞は、腫瘍指向性キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作することができ、それによって抗腫瘍エフェクター細胞を産生する。一例では、NK細胞またはiPS NK細胞は、CARを発現するように操作することができる。いくつかの実施形態では、NK細胞に対する細胞前駆体は、CARを発現するように操作される。例えば、いくつかの実施形態では、iPS細胞は、CARを発現するように操作される。いくつかの実施形態では、HP細胞バルク中の細胞は、CARを発現するように操作される。いくつかの実施形態では、NK細胞は、CARを発現するように操作される。さらに、いくつかの実施形態では、これらのトランスジェニック受容体は、タンパク質由来ではない腫瘍関連抗原に配向させ得る。特定の実施形態では、NK細胞またはiPS NK細胞は、少なくとも1つのCARを含むように改変される。いくつかの実施形態では、単一のCARは、2つ以上の抗原を標的とする。

30

【0252】

いくつかの実施形態では、iNK細胞は、キメラであり、非天然であり、操作された受容体を含む。いくつかの実施形態では、操作されたキメラ抗原受容体（CAR）は、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の成分を有し、いくつかの実施形態では、1つ以上の成分は、リンパ球の1つ以上の腫瘍抗原含有がん細胞への標的化または結合を促進する。

40

【0253】

いくつかの実施形態では、CARは、一般に、少なくとも1つの細胞外リガンド結合ドメインを含む少なくとも1つの膜貫通ポリペプチド及び少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む1つの膜貫通ポリペプチドを含み、これにより、ポリペプチドが互い

50

に集合して、キメラ抗原受容体を形成する。

【0254】

本明細書で使用される「細胞外リガンド結合ドメイン」という用語は、リガンドに結合することができるオリゴまたはポリペプチドとして定義される。好ましくは、ドメインは、細胞表面分子と相互作用することができるであろう。例えば、細胞外リガンド結合ドメインは、特定の病状に関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択され得る。

【0255】

特に、細胞外リガンド結合ドメインは、標的の抗原に対する抗体に由来する抗原結合ドメインを含むことができる。

【0256】

いくつかの実施形態では、NK細胞またはiPS NK細胞は、1つ以上のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変させ得る。いくつかの実施形態では、CARは、CD44、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD89、CD123、CS-1、ROR1、メソセリン、c-Met、PSMA、Her2、GD-2、CEA、MAGE A3、TCR、EGFR、HER2/ERBB2/neu、EPCAM、EphA2、CEA、BCMAのうちの1つ以上から選択される腫瘍抗原を標的とする細胞外リガンド結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、CD19を含む。

【0257】

いくつかの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、柔軟なリンカーによって結合された標的抗原特異的モノクローナル抗体の軽鎖(VL)可変断片及び重鎖(VH)可変断片を含む一本鎖抗体断片(scFv)である。

【0258】

いくつかの実施形態では、CARは、膜貫通ドメインを含む。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞外リガンド結合ドメインと膜貫通ドメインとの間のストーク領域をさらに含む。本明細書で使用される「ストーク領域」という用語は、一般に、膜貫通ドメインを細胞外リガンド結合ドメインに連結するように機能する任意のオリゴまたはポリペプチドを意味する。特に、ストーク領域は、細胞外リガンド結合ドメインにより多くの柔軟性及びアクセス可能性を付与するために使用される。ストーク領域は、最大300アミノ酸、10~100アミノ酸、及び/または25~50アミノ酸を含み得る。ストーク領域は、CD8、CD4またはCD28の細胞外領域の全部もしくは一部、または抗体定常領域の全部もしくは一部など、天然に存在する分子の全部または一部に由来し得る。あるいは、ストーク領域は、天然に存在するストーク配列に対応する合成配列であり得るか、または完全に合成のストーク配列であり得る。好ましい実施形態では、ストーク領域は、ヒトCD8アルファ鎖の一部である。

【0259】

いくつかの実施形態では、CARは、細胞外リガンド結合ドメインの標的への結合後の細胞内シグナル伝達に寄与し、iPS NK細胞の活性化及び免疫応答をもたらすシグナル伝達ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインを含む。「シグナル伝達ドメイン」という用語は、エフェクターシグナル機能シグナルを伝達し、細胞に特殊な機能を実施するように指示するタンパク質の部分の部分を指す。いくつかの実施形態では、iPS NK細胞は、シグナル伝達ドメインを含むCARを有する。

【0260】

いくつかの実施形態では、iPS NK細胞は、IL-15R α /IL-15複合体を発現するように遺伝子改変されている。

【0261】

いくつかの実施形態では、膜貫通ポリペプチドは、免疫細胞の表面に、例えば、iPS NK細胞上に発現し、予め定義された標的細胞に対する免疫細胞の細胞応答を指示するために合わせて相互作用する能力を含む。細胞外リガンド結合ドメイン及び/またはシグナ

10

20

30

40

50

ル伝達ドメインを含むCARの異なる膜貫通ポリペプチドは、合わせて相互作用して、標的リガンドとの結合後にシグナル伝達に関与し、免疫応答を誘導する。膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来し得る。膜貫通ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。

【0262】

いくつかの実施形態では、CARを発現するためのNK細胞の遺伝子改変は、以下のステップを含み得る：（１）特定のCARに対応する遺伝子を合成する；（２）CARに対応する遺伝子を含むベクターを調製する；（３）CAR遺伝子を含むベクターでCD56＋NK細胞を形質導入する。

【0263】

CARをコードする発現ベクターは、１つ以上のDNA分子または構築物として導入することができ、構築物（複数可）を含む宿主細胞の選択を可能にするであろう少なくとも１つのマーカーが存在し得る。

【0264】

構築物は、遺伝子及び調節領域を適宜、単離し、ライゲートし、適切なクローニング宿主にクローン化し、制限もしくは配列決定、または他の簡便な手段によって分析し得る従来の方法で調製することができる。特に、PCRを使用して、機能ユニットの全部または一部を含む個々の断片を単離することができ、必要に応じて、「プライマー修復」、ライゲーション、*in vitro*突然変異誘発などを使用して、１つ以上の突然変異を導入することができる。完成し、適切な配列を有することが実証された構築物（複数可）は、その後、任意の簡便な手段によってCTLに導入することができる。構築物は、感染または細胞への形質導入のために、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、または単純ヘルペスウイルス（HSV）または他のもの（レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターなど）のような非複製欠陥ウイルスゲノムに組み込み、パッケージ化され得る。構築物は、所望に応じて、トランスフェクションのためのウイルス配列を含み得る。あるいは、構築物は、融合、エレクトロポレーション、バイオリスティック、トランスフェクション、リポフェクションなどによって導入され得る。宿主細胞は、構築物（複数可）の導入前に培養物中で成長及び拡大され得、その後、構築物（複数可）の導入及び構築物（複数可）の組み込みのための適切な処理を行う。次に、細胞は、構築物中に存在するマーカーによって拡大され、スクリーニングされる。上手く使用できる様々なマーカーには、hprt、ネオマイシン耐性、チミジンキナーゼ、ハイグロマイシン耐性などが含まれる。

【0265】

場合によっては、構築物が特定の遺伝子座に組み込まれることが望ましい、相同組換えの標的部位を有し得る。例えば、これは、内因性遺伝子をロックアウトし、それを相同組換えについて当技術分野で知られている物質及び方法を使用して、構築物によってコードされる遺伝子に（同じ遺伝子座または他の場所で）置き換えることができる。相同組換えの場合、OMEGAまたはOベクターのいずれかを使用し得る。

【0266】

構築物は、少なくともCAR及び任意により別の遺伝子をコードする単一のDNA分子、または１つ以上の遺伝子を有する異なるDNA分子として導入することができる。他の遺伝子としては、例えば、治療用分子または自殺遺伝子をコードする遺伝子が挙げられる。構築物は、それぞれ、同じまたは異なるマーカーで、同時にまたは連続して導入することができる。

【0267】

構築物DNAのストックを調製するために、及びトランスフェクションを実施するために使用され得る細菌または酵母の複製起点、選択可能及び／または増幅可能なマーカー、プロモーター／エンハンサーエレメントなど、原核生物または真核生物での発現のための有用な要素を含むベクターは、当技術分野で周知であり、多くは市販されている。

【0268】

使用方法

本発明による細胞は、それを必要とする患者において、がん、ウイルス感染または自己免疫障害を治療するために使用することができる。別の実施形態では、本発明による単離された細胞は、それを必要とする患者における、がん、自己免疫障害のウイルス感染の治療のための医薬品の製造において使用され得る。

【0269】

本発明は、それを必要とする患者を治療するための方法に依存し、本方法は、(a) 本発明によるキメラ抗原受容体細胞を提供するステップ、及び (b) 患者に細胞を投与するステップのうちの少なくとも1つを含む。

【0270】

この治療は、改善、治癒、または予防的であり得る。それは、自己免疫療法の一部または同種免疫療法治療の一部のいずれかであり得る。自己とは、患者の治療に使用される細胞、細胞株、または細胞集団が、患者またはヒト白血球抗原 (HLA) 適合ドナーに由来することを意味する。同種異系とは、患者の治療に使用される細胞または細胞集団が、患者に由来するのではなく、ドナーに由来することを意味する。

【0271】

いくつかの実施形態では、記載された細胞は同種異系である。いくつかの実施形態では、記載された細胞は自己由来である。

【0272】

治療は、がん、ウイルス感染、自己免疫障害、または移植片対宿主病 (GVHD) と診断された患者を治療するために使用できる。治療され得るがんとしては、血管新生されていない、または実質的に血管新生されていない腫瘍、ならびに血管新生された腫瘍が挙げられる。がんは、非固形腫瘍 (例えば、白血病及びリンパ腫などの血液腫瘍) を含めてもよく、または固形腫瘍を含めてもよい。本発明のCARで治療されるがんの種類としては、これらに限定されないが、癌腫、芽細胞腫、及び肉腫、ならびに特定の白血病またはリンパ性悪性腫瘍、良性及び悪性腫瘍、ならびに肉腫、癌腫、及び黒色腫などの悪性腫瘍が挙げられる。成人腫瘍／がん及び小児腫瘍／がんも含まれる。

【0273】

いくつかの実施形態では、治療は、抗体療法、化学療法、サイトカイン療法、樹状細胞療法、遺伝子療法、ホルモン療法、レーザー光療法及び放射線療法の群から選択される、がんに対する1つ以上の治療法と組み合わせる。

【0274】

いくつかの実施形態では、治療は、免疫抑制治療を受けている患者に投与することができる。

【0275】

さらなる実施形態では、細胞組成物は、1つ以上の追加の治療法と組み合わせて患者に投与される。例えば、いくつかの実施形態では、細胞組成物は、骨髄移植、フルダラビンなどの化学療法剤、外部ビーム放射線治療 (XRT)、シクロホスファミド、または抗体、例えば、OKT3またはCAMPATHなどのいずれかを使用するT細胞切除療法と併せて (例えば、前に、同時にまたは後に)、患者に投与される。別の実施形態では、本発明の細胞組成物は、CD20と反応する剤、例えばリツキサンなど、B細胞切除療法後に投与される。例えば、一実施形態では、対象は、高用量化学療法及びその後の末梢血幹細胞移植による標準治療を受けることができる。特定の実施形態では、移植後、対象は、本発明の拡大された免疫細胞の注入を受ける。追加の実施形態では、拡大させた細胞は、外科手術の前または後に投与される。本明細書に記載の方法のいずれか1つによって得られる改変細胞は、宿主対移植片 (HV) 拒絶及び移植片対宿主病 (GVHD) に対して、それを必要とする患者を治療するための本発明の特定の態様において使用することができる。したがって、本発明の範囲は、宿主対移植片 (HV) 拒絶及び移植片対宿主病 (GVHD) に対してそれを必要とする患者を治療する方法であり、本方法は、不活化TCRアルファ遺伝子及び／またはTCRベータ遺伝子を含む有効量の改変細胞を患者に投与す

10

20

30

40

50

ることによって患者を治療することを含む。

【0276】

細胞の投与

いくつかの実施形態では、細胞は、多種多様な方法で、宿主生物、例えば、哺乳動物に導入され得る。細胞は、特定の実施形態では、腫瘍の部位に導入され得るが、代替の実施形態では、細胞はがんに行進するか、またはがんに行進するように改変される。使用される細胞の数は、複数の状況、導入の目的、細胞の寿命、使用されるプロトコル、例えば、投与回数、細胞が増殖する能力、組換え構築物などの安定性に依存する。細胞は、分散液として適用してもよく、一般に、目的の部位またはその近くに注入される。細胞は、生理学的に許容される培地中にあり得る。一例では、本発明のNK細胞またはiPS NK細胞は、1つ以上のCAR、TCR、または高親和性CD16など、任意の他の操作されたタンパク質もしくはポリペプチドドメインを発現し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、免疫認識を阻害するために内包化され、腫瘍の部位に配置される。

10

【0277】

細胞は、必要に応じて投与することができる。所望の応答、投与方法、細胞の寿命、存在する細胞の数に応じて、様々なプロトコルを使用することができる。投与回数は、少なくとも部分的に上記の要因に依存する。

【0278】

本発明による細胞または細胞集団の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、輸血、移植 (implantation) または移植 (transplantation) など、任意の簡便な方法で実施され得る。本明細書に記載の組成物は、患者に、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、静脈内またはリンパ内注射による、または腹腔内での投与が可能である。一実施形態では、本発明の細胞組成物は、好ましくは静脈内注射によって投与される。

20

【0279】

核酸ベースの発現系

いくつかの実施形態では、本発明のNK細胞またはiPS NK細胞は、1つ以上のCAR、TCR、または高親和性CD16またはCD19などの任意の他の操作されたタンパク質またはポリペプチドドメインを発現するように操作される。これらのポリペプチドを含む発現ベクターを生成するための組換え技術は、当技術分野で周知であり、以下に一般的に記載されている。

30

【0280】

ベクター

「ベクター」という用語は、複製することができる細胞に導入するために核酸配列を挿入することができる担体核酸分子を指すために使用される。核酸配列は「外因性」であり得、これは、ベクターが導入されている細胞にとって外来性であるか、または配列が細胞内の配列と相同であるが、通常、配列が発見されない宿主細胞の核酸内の任意の位置にあることを意味する。ベクターとしては、プラスミド、コスミド、及びウイルス（例えば、バクテリオファージ、動物ウイルス、及び植物ウイルス）、ならびに人工染色体（例えば、YAC）を挙げることができる。当技術分野の技術のうちの1つは、標準的な組換え技術を介してベクターを構築するために十分に装備されている（例えば、Maniatis et al.、1988及びAusubel et al.、1994を参照、これらは、両方とも参照により本明細書に組み込まれる）。

40

【0281】

「発現ベクター」という用語は、転写可能なRNAをコードする核酸を含む任意の型の遺伝子構築物を指す。場合によっては、RNA分子は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。他の場合、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムの産生においては、これらの配列は翻訳されない。発現ベクターは、様々な「制御配列」を含むことができ、これは、特定の宿主細胞における操作可能に連結されたコード配列の転写及びおそらく翻訳に必要な核酸配列を指す。転写及び翻訳を支配する制御配列に加えて、ベ

50

クター及び発現ベクターは、他の機能にも役立つ核酸配列を含み得、以下に記載する。

【0282】

プロモーター及びエンハンサー

「プロモーター」は、その場所で転写の開始及び速度が制御される核酸配列の領域である制御配列である。この配列は、RNAポリメラーゼ及び他の転写因子などの調節タンパク質及び分子が結合して、核酸配列の特定の転写を開始し得る遺伝子エレメントを含み得る。「操作可能に位置付けられた」、「操作可能に連結された」、「制御下にある」、及び「転写制御下にある」という句は、プロモーターが正しい機能的場所、及び／または転写開始及び／またはその配列の発現を制御するために、核酸配列に関連する配向にあることを意味する。

10

【0283】

プロモーターは一般に、RNA合成の開始部位を位置付けるように機能する配列を含む。この最もよく知られている例は、TATAボックスであるが、TATAボックスを含まない一部のプロモーター、例えば、哺乳動物の末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーター及びSV40後期遺伝子のプロモーターなどでは、開始部位に重なる個別のエレメント自体が、開始場所の固定に役立つ。追加のプロモーターエレメントは、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上流の領域に位置するが、複数のプロモーターが、開始部位の下流にも機能エレメントを含むことが示されている。プロモーターの「制御下にある」コード配列をもたらし、選択されたプロモーターの「下流」（すなわち、3'）の転写リーディングフレームの転写開始部位の5'末端を位置付ける。「上流」プロモーターは、DNAの転写を刺激し、コードされたRNAの発現を促す。

20

【0284】

プロモーターエレメント間の間隔は、多くの場合、順応性があるため、エレメントが互いに反転する、または移動したときにプロモーター機能が保持されるようになる。tkプロモーターでは、活性が低下し始める前に、プロモーターエレメント間の間隔を長くして、50bp離すことができる。プロモーターに応じて、個々のエレメントが協調してまたは独立して機能し、転写を活性化できると考えられる。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調節配列を指す「エンハンサー」と組み合わせて使用されてもされなくてもよい。

30

【0285】

プロモーターは、コードセグメント及び／またはエクソンの上流に位置する5プライム'非コード配列を単離することによって得ることができるので、核酸配列に自然に関連するものであり得る。このようなプロモーターは、「内因性」と呼ばれ得る。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置する、核酸配列に自然に関連するものであり得る。あるいは、特定の利点は、組換えまたは異種プロモーターの制御下にコード核酸セグメントを位置付けることによって得られる。これは、通常、その自然環境では核酸配列と関連しないプロモーターを指す。組換えまたは異種エンハンサーはまた、その自然環境において、核酸配列に通常は関連しないエンハンサーを指す。このようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサー、及び他のウイルス、または原核生物もしくは真核生物細胞から単離されたプロモーターもしくはエンハンサー、及び「天然に存在しない」、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメントを含むプロモーターもしくはエンハンサー、及び／または発現を変える突然変異が含まれ得る。例えば、組換えDNA構築物で最も一般的に使用されるプロモーターとして、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）プロモーター系が挙げられる。プロモーター及びエンハンサーの核酸配列を合成により産生することに加えて、配列は、本明細書に開示の組成物に関連する組換えクロニング及び／またはPCR（商標）などの核酸増幅技術（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,683,202号及び第5,928,906号を参照のこと）を用いて、産生され得る。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などの非核細胞小器官内の配列の転

40

50

写及び／または発現を指示する制御配列も同様に使用できることが企図されている。

【0286】

当然のことながら、発現のために選択された細胞小器官、細胞種、組織、器官、または生物におけるDNAセグメントの発現を効果的に指示するプロモーター及び／またはエンハンサーを使用することが重要であろう。分子生物学の当業者であれば、一般に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー、及び細胞種の組み合わせの使用を知っている（例えば、参照により本明細書に組み込まれるSambrook et al.、1989を参照のこと）。使用されるプロモーターは、構成的、組織特異的、誘導性であり、及び／または組換えタンパク質及び／またはペプチドの大規模生産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発現を指示するために、適切な条件下で有用であり得る。プロモーターは、異種または内因性であり得る。

10

【0287】

さらに、任意のプロモーター／エンハンサーの組み合わせを使用して、発現を駆動することもできる。T3、T7またはSP6細胞質発現系の使用は、別の可能な実施形態である。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として、または追加の遺伝子発現構築物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サポートすることができる。

【0288】

組織特異的プロモーターまたはエレメントの同一性、ならびにそれらの活性の特徴を明らかにするためのアッセイは、当業者に周知である。

20

【0289】

コード配列の効率的な翻訳には、特定の開始シグナルも必要になり得る。これらのシグナルには、ATG開始コドンまたは隣接配列が含まれる。ATG開始コドンなどの外因性翻訳制御シグナルを提供する必要がある。当業者であれば、これを容易に決定し、必要なシグナルを提供することができるであろう。

【0290】

本発明の特定の実施形態では、内部リボソーム侵入部位（IRES）エレメントの使用は、多遺伝子またはポリシストロン性のメッセージを創出するために使用され、これらは、本発明において使用され得る。

【0291】

ベクターは、複数の制限酵素部位を含む核酸領域であるマルチクローニング部位（MCS）を含むことができ、これらのいずれも、ベクターを消化するための標準的組換え技術と併用して使用することができる。「制限酵素消化」とは、核酸分子内の特定の位置でのみ機能する酵素による核酸分子の触媒的切断を指す。これらの制限酵素の多くは、市販されている。このような酵素の使用は、当業者によって広く理解されている。多くの場合、ベクターは、MCS内で切断する制限酵素を使用して、線形化または断片化され、外因性配列をベクターにライゲートさせ得る。「ライゲーション」とは、2つの核酸断片間にホスホジエステル結合を形成するプロセスを指し、これは、互いに隣接している場合と隣接していない場合とがある。制限酵素及びライゲーション反応を伴う技術は、組換え技術の当業者によく知られている。

30

【0292】

スプライシング部位、終結シグナル、複製起点、及び選択可能なマーカーも使用することができる。

【0293】

プラスミドベクター

特定の実施形態では、プラスミドベクターは、宿主細胞を形質転換するための使用が企図される。一般に、宿主細胞と適合性のある種由来のレプリコン及び制御配列を含有するプラスミドベクターが、これらの宿主に関連して使用される。このベクターは、通常、複製部位、及び形質転換細胞において表現型選択を提供することができるマーキング配列を有する。非限定的な例では、E. coliは、多くの場合、E. coli種に由来するプ

50

ラスミドである p B R 3 2 2 の誘導体を使用して形質転換される。p B R 3 2 2 には、アンピシリン及びテトラサイクリンの耐性遺伝子が含まれているため、形質転換細胞を容易に同定する手段をもたらす。p B R プラスミド、または他の微生物プラスミドまたはファージもまた、例えば、微生物がそれ自体のタンパク質の発現のために使用することができるプロモーターを含むか、または含むように改変される必要がある。

【0294】

加えて、宿主微生物と適合性のあるレプリコン及び制御配列を含有するファージベクターは、これらの宿主に関連して形質転換ベクターとして使用され得る。例えば、ファージラムダ G E M (商標) - 1 1 は、例えば、E . c o l i L E 3 9 2 などの宿主細胞を形質転換するために使用することができる組換えファージベクターを作製する際に利用され得る。

10

【0295】

さらに有用なプラスミドベクターとしては、その後の精製及び分離または切断のために、グルタチオン S トランスフェラーゼ (G S T) 可溶性融合タンパク質の生成に使用するための p I N ベクター (Inouye et al., 1985) 及び p G E X ベクターが挙げられる。他の適切な融合タンパク質は、ガラクトシダーゼ、ユビキチンなどを有するものである。

【0296】

発現ベクターを含む細菌宿主細胞、例えば、E . c o l i は、複数の好適な培地のいずれか、例えば、L B で成長させる。特定のベクターにおける組換えタンパク質の発現は、当業者によって理解されるように、宿主細胞を特定のプロモーターに特異的な剤と接触させることによって、例えば、培地に I P T G を加えることによって、またはインキュベーションを高温に切り替えることによって誘導され得る。細菌をさらに一定期間 (通常は 2 ~ 2 4 時間) 培養後、細胞を遠心分離によって収集し、洗浄して、残留培地を除去する。

20

【0297】

ウイルスベクター

特定のウイルスが受容体媒介エンドサイトーシスを介して細胞に感染するかまたは細胞に侵入し、宿主細胞のゲノムに組み込まれて、ウイルス遺伝子を安定的かつ効率的に発現する能力により、外来核酸を細胞 (例えば、哺乳動物細胞) に移すための魅力的な候補となっている。本発明の成分は、1 つ以上の C A R、T C R、または本発明の高親和性 C D 1 6 などの他の任意の操作されたタンパク質またはポリペプチドドメインをコードするウイルスベクターであり得る。本発明の核酸を送達するために使用され得るウイルスベクターの非限定的な例を以下に記載する。

30

【0298】

アデノウイルスベクター

核酸を送達するための特定の方法は、アデノウイルス発現ベクターを使用することを含む。アデノウイルスベクターは、ゲノム D N A に組み込むには、能力が低いことが知られているが、この特徴は、これらのベクターによってもたらされる高効率の遺伝子導入によって相殺される。「アデノウイルス発現ベクター」は、(a) 構築物のパッケージングをサポートする、及び (b) クローン化された組織または細胞特異的構築物を最終的に発現するのに十分なアデノウイルス配列を含む構築物を含むものを意味する。遺伝子構成またはアデノウイルス、3 6 k b、直鎖、二本鎖 D N A ウイルスに関する知識により、大きな片のアデノウイルス D N A を最大 7 k b の外来配列に置換できる (G r u n h a u s a n d H o r w i t z, 1992)。

40

【0299】

A A V ベクター

核酸は、アデノウイルス支援トランスフェクションを用いて、細胞に導入させ得る。アデノウイルス連結系を使用した細胞系では、トランスフェクション効率の向上が報告されている (K e l l e h e r a n d V o s, 1994; C o t t e n e t a l., 1992; C u r i e l, 1994)。アデノ関連ウイルス (A A V) は、高い組み込み

50

頻度を有し、非分裂細胞に感染し得るため、本発明の細胞内で使用するための魅力的なベクター系であり、したがって、例えば、組織培養 (Muzyczka, 1992) または *in vivo* において、哺乳動物細胞への遺伝子の送達に有用である。AAVは、感染性について広い宿主範囲を有する (Tratschin et al., 1984; Laughlin et al., 1986; Lebkowski et al., 1988; McLaughlin et al., 1988)。rAAVベクターの生成及び使用に関する詳細は、例えば、米国特許第5,139,941号及び同第4,797,368号に記載されており、これらは各々、参照により本明細書に組み込まれる。

【0300】

レトロウイルスベクター

レトロウイルスは、遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、大量の外来遺伝物質を移し、広範囲の種及び細胞種に感染させ、特殊な細胞株にパッケージングするその能力により、送達ベクターとして有用である (Miller, 1992)。

【0301】

レトロウイルスベクターを構築するために、特定のウイルス配列の代わりに、核酸 (例えば、所望の配列をコードするもの) をウイルスゲノムに挿入して、複製に欠陥のあるウイルスを産生させる。ビリオンを産生するために、*gag* 遺伝子、*pol* 遺伝子、及び *env* 遺伝子を含むが、LTR及びパッケージング成分を含まないパッケージング細胞株が構築される (Mann et al., 1983)。レトロウイルスLTR及びパッケージング配列と共に、cDNAを含む組換えプラスミドが特別な細胞株に導入されたときに (例えば、リン酸カルシウム沈殿によって)、パッケージング配列により、組換えプラスミドのRNA転写物は、ウイルス粒子にパッケージングさせ得、次いで、培養培地に分泌される (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983)。次に、組換えレトロウイルスを含む培地を収集し、任意により濃縮し、遺伝子導入のために使用される。レトロウイルスベクターは、多種多様な細胞種に感染し得る。しかし、組み込み及び安定した発現には、宿主細胞の分裂が必要である (Paskind et al., 1975)。

【0302】

レンチウイルスは、複雑なレトロウイルスであり、一般的なレトロウイルス遺伝子である *gag*、*pol*、及び *env* に加えて、調節機能または構造機能を含む他の遺伝子を含む。レンチウイルスベクターは、当技術分野において周知である (例えば、Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; 米国特許第6,013,516号及び同第5,994,136号)。レンチウイルスのいくつかの例としては、ヒト免疫不全ウイルス: HIV-1、HIV-2、及びサル免疫不全ウイルス: SIVなどが挙げられる。レンチウイルスベクターは、HIV病原性遺伝子を多重に弱毒化することによって生成され、例えば、遺伝子 *env*、*vif*、*vpr*、*vpu*、*nef* が欠失し、これにより、ベクターが生物学的に安全になる。

【0303】

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ことができ、*in vivo* 及び *ex vivo* の両方での遺伝子導入及び核酸配列の発現に使用可能である。例えば、非分裂細胞に感染することができる組換えレンチウイルスでは、好適な宿主細胞が、パッケージング機能、すなわち、*gag*、*pol* 及び *env*、ならびに *rev* 及び *tat* を担持する2つ以上のベクターでトランスフェクトされることが、5,994,136号 (参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。特定の細胞種の受容体を標的とするために、エンベロープタンパク質を抗体または特定のリガンドと連結させることによって、組換えウイルスを標的にすることができる。特定の標的細胞上の受容体のリガンドをコードする別の遺伝子と共に、目的の配列 (調節領域を含む) をウイルスベクターに挿入することにより、例えば、ここでは、ベクターは、標的特異的となる。

【0304】

組み合わせ療法

本発明の特定の実施形態では、臨床的態様のための本発明の方法は、抗がん剤など、過剰増殖性疾患の治療において有効な他の剤と組み合わせられる。「抗がん剤」剤は、例えば、がん細胞を死滅させること、がん細胞にアポトーシスを誘導すること、がん細胞の成長速度を低下させること、転移の発生率または数を減少させること、腫瘍サイズを減少させること、腫瘍成長を阻害すること、腫瘍またはがん細胞への血液供給を減少させること、がん細胞または腫瘍に対する免疫応答を促進すること、がんの進行を予防することもしくは阻害すること、またはがんを有する対象の寿命を延長させることにより、対象において、がんが悪影響を与え得る。より一般的には、これらの他の組成物は、細胞を死滅させるまたは細胞の増殖を阻害するのに有効な組み合わせ量で提供されるであろう。このプロセスは、がん細胞を発現構築物及び剤（複数可）または複数の因子と同時に接触させることを含み得る。これは、細胞を単一の組成物または両方の剤を含む薬理学的製剤と接触させることによって、または細胞を2つの別個の組成物もしくは製剤と同時に接触させることによって達成することができ、ここで、一方の組成物は、発現構築物を含み、他方の組成物は、第2の剤（複数可）を含む。

10

20

30

40

50

【0305】

化学療法剤及び放射線療法剤に対する腫瘍細胞の耐性は、臨床腫瘍学において主要な問題である。現在のがん研究の1つの目標は、1つの治療法を他の治療法と組み合わせることにより、化学療法及び放射線療法の有効性を改善する方法を見つけることである。本発明の文脈において、細胞療法は、化学療法、放射線療法、または免疫療法の介入の併用、ならびにアポトーシス促進剤または細胞周期調節剤と同様に使用することができると考えている。

【0306】

あるいは、治療法は、数分から数週間の範囲の間隔で、他の剤治療の前にまたは後に行うことができる。他の剤及び本発明が個体に別々に適用される実施形態では、確実に、それぞれの送達時間の間に、有意な期間が終了することがなく、これにより、剤及び本発明の治療法は、依然として、細胞に対して有利に組み合わせられた効果を発揮できるようになる。このような場合、これらが、両方のモダリティで、互いに約12～24時間以内に、より好ましくは、互いに約6～12時間以内に、細胞に接触し得ることを企図している。状況によっては、治療期間を有意に延長させることが望ましい場合があり得るが、この場合、それぞれの投与と投与の間に、数日（2、3、4、5、6、または7日）から数週間（1、2、3、4、5、6、7または8週）経過する。

【0307】

いくつかの実施形態では、治療サイクルは、必要に応じて繰り返される。様々な標準治療、ならびに外科的介入が、本発明の細胞療法と組み合わせで適用され得ることもまた企図される。

【0308】

化学療法

がん治療には、化学療法剤及び放射線治療の両方をベースにした治療との様々な組み合わせ療法も含む。組み合わせ化学療法としては、例えば、アブラキサン、アルトレタミン、ドセタキセル、ハーセプチン、メトトレキサート、ノバントロン、ゾラデックス、シスプラチン（CDDP）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリコマイシン（plicomycin）、マイトマイシン、エトポシド（VP16）、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタビエン、ナベルピン、ファルネシルタンパク質タンسفエラーゼ阻害剤、トランスプラチナ、5-フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン及びメトトレキサート、またはそれらの任意の類似物または誘導バリエーション及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【0309】

特定の実施形態では、個体のための化学療法は、本発明と併用して、例えば、本発明の投与前、本発明の投与中、及び／または本発明の投与後に、使用される。

【0310】

放射線療法

DNA損傷を引き起こし、かつ広く使用されている他の因子としては、一般に、ガンマ線、X線、及び／または腫瘍細胞への放射性同位元素の直接送達である。マイクロ波及び紫外線照射など、他の形態のDNA損傷因子も考えられる。これらの因子はすべて、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製及び修復、ならびに染色体のアセンブリ及び維持に対して、広範囲の損傷を与える可能性が最も高い。X線の線量範囲は、長期間（3～4週間）では1日線量50～200レントゲン、単回線量では2000～6000レントゲンの範囲である。放射性同位元素の線量範囲は、幅広く異なり、同位体の半減期、放出される放射線の強度及び種類、ならびに新生物細胞による取り込みに依存する。

10

【0311】

用語「接触させる」及び「曝露させる」は、細胞に適用されるときに、治療用構築物及び化学療法剤または放射線療法剤が標的細胞に送達されるか、もしくは標的細胞と直接並置される処理を説明するために本明細書で使用される。細胞死滅または停滞を達成するために、例えば、両方の剤が、細胞を死滅させる、または細胞の分裂を防ぐために有効な組み合わせ量で、細胞に送達される。

【0312】

20

免疫療法

免疫療法は、一般に、がん細胞を標的にして破壊させるために、免疫エフェクター細胞及び分子を使用することに依存する。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上にあるいくつかのマーカーに特異的な抗体であり得る。抗体のみが治療のエフェクターとして作用し得る、または他の細胞を動員させて、実際に細胞を死滅させ得る。抗体はまた、薬物または毒素（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）に結合させて、単に標的剤として作用し得る。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接的または間接的に相互作用する表面分子を担持するリンパ球であり得る。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞及びNK細胞が含まれる。

【0313】

30

したがって、本明細書に記載の本発明の療法以外の免疫療法は、本細胞療法と併用して、組み合わせ療法の一部として使用できる。組み合わせ療法の一般的なアプローチについては、以下に論ずる。一般に、腫瘍細胞は、標的化に対応する、すなわち他の細胞の大部分には存在しない多少のマーカーを保持している必要がある。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらのいずれも、本発明の文脈において、標的化に好適であり得る。一般的な腫瘍マーカーとしては、PD-1、PD-L1、CTLA4、がん胚性抗原、前立腺特異抗原、尿路腫瘍関連抗原、胎児抗原、チロシナーゼ（p97）、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、エストロゲン受容体、ラミニン受容体、erbB及びp155が挙げられる。

【0314】

40

遺伝子

さらに別の実施形態では、二次治療は、治療用ポリヌクレオチドが、本発明の臨床実施形態の前、後、または同時に投与される遺伝子療法である。細胞増殖の誘導物質、細胞増殖の阻害剤、またはプログラム細胞死の調節因子など、様々な発現産物が本発明に含まれる。

【0315】

外科手術

がん患者の約60%は、予防的、診断的または病期分類、治療的及び姑息的手術など、ある種の外科手術を受ける。治療的手術は、本発明の治療、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法及び／または代替療法などの他の療法と併用して使用さ

50

れ得るがん治療である。

【0316】

治療的手術としては、がん性組織の全部または一部を物理的に除去する、摘出すること、及び／または破壊すること、切除することを含む。腫瘍切除とは、腫瘍の少なくとも一部を物理的に除去することを指す。外科手術による治療としては、腫瘍の切除に加えて、レーザー手術、凍結手術、電気外科、及び顕微鏡制御手術（モース術）が挙げられる。さらに、本発明は、表在性がん、前がん、または付随的な量の正常組織の除去と併用して、使用され得ることが企図される。

【0317】

すべてのがん性細胞、組織、または腫瘍の一部を切除したときに、身体内に空洞が形成され得る。治療は、灌流、直接注射、または追加の抗がん療法を伴うその領域の局所適用によって達成することができる。このような治療は、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日ごと、または1週、2週、3週、4週、及び5週ごと、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、または12ヶ月ごとに繰り返してもよい。これらの治療は、投薬量も変動し得る。

【実施例】

【0318】

本発明の他の特徴、目的、及び利点は、以下の実施例において明らかである。しかしながら、本発明の実施形態を示しながら、実施例が、限定ではなく、例示としてのみ、与えられることを理解するべきである。実施例から、本発明の範囲内での様々な変更及び修正が、当業者に明らかになるであろう。

【0319】

実施例1．iPS細胞のHP細胞バルクへの分化

iPS細胞株であるFfI-01s04株は、健康な個体の末梢血単核細胞から得た。StemFit完全培地に分散したFfI-01s04細胞を、 6×10^5 細胞／ウェル、低酸素（5% O_2 ）条件下（「0日目」）で、超低接着処理6ウェルプレートに播種した。StemFit完全培地には、 $10 \mu M$ CHIR99021及び $50 \mu M$ Y-27632を含めた。翌日（すなわち、1日目）、FfI-01s04細胞をBMP4（ $50 ng/ml$ ）、VEGF（ $50 ng/ml$ ）、bFGF（ $50 ng/ml$ ）、及びアスコルビン酸2-ホスフェート（ $50 \mu g/ml$ ）を含む造血前駆細胞（HPC）分化培地に分散した。HPC誘導培養培地には、ヒトインスリン（ $10 \mu g/ml$ ）、ヒトトランスフェリン（ $5.5 \mu g/ml$ ）、亜セレン酸ナトリウム（ $6.7 ng/ml$ ）、L-グルタミン（ $2 mM$ ）及び α -モノチオグリセロール（ $0.4 mM$ ）を添加したStemPro34を含めた。2日目に、SB431542（培地中 $6 \mu M$ ）を培養培地（すなわち、細胞を含むHPC分化培地）に添加し、細胞を2日間培養した。4日目に、細胞をVEGF（ $50 ng/ml$ ）、bFGF（ $50 ng/ml$ ）、SCF（ $50 ng/ml$ ）、及びアスコルビン酸2-ホスフェート（ $50 \mu g/ml$ ）を含む別の培地に再分散させ、さらに3日間培養した。7日目に、細胞をVEGF（ $50 ng/ml$ ）、bFGF（ $50 ng/ml$ ）、SCF（ $50 ng/ml$ ）、アスコルビン酸2-ホスフェート（ $50 \mu g/ml$ ）、TPO（ $30 ng/ml$ ）及びFlt3L（ $10 ng/ml$ ）を含む別の培地に曝露し、この培地を使用してさらに7日間培養した。この7日間の培養期間中、培地は、2～3日ごとに交換した。

【0320】

実施例2．HP細胞バルクのCD4／CD8細胞を含む集団への分化

14日目に、いかなる細胞単離も受けずに、実施例1から得られた細胞集団（「HP細胞バルク」）を $15 cm$ ディッシュに 3.12×10^6 細胞／ディッシュで播種し、 $37^\circ C$ 、5% O_2 で培養した。様々な播種密度を使用してよく、該播種密度は、一実施形態であることに留意されたい。各 $15 cm$ ディッシュは、rh-DLL4／Fc キメラ（Sino Biological）及びRetroNectin（Takara Bio

I n c) でコーティングした。この培養期間中、培地は2～3日ごとに交換した。15% FBS、4mM L-グルタミン、100U/ml ペニシリン、100μg/ml ストレプトマイシン、55μM 2-メルカプトエタノール、50μg/ml アスコルビン酸2-ホスフェート、10μg/ml ヒトインスリン、5.5μg/ml ヒトトランスフェリン、6.7ng/ml 亜セレン酸ナトリウム、50ng/ml SCF、50ng/ml IL-7、50ng/ml Flt3L、100ng/ml TPO、15μM SB203580、30nM SDF-1αを添加したMEMα (ThermoFisher Scientific (Gibco)) を、これらの細胞を培養するための培地として使用した。21日目に、新たにhDLL4/RetroNectinをコーティングした新しい15cmディッシュに細胞を継代させた。28日目に、新たにhDLL4/RetroNectinをコーティングした新しい15cmディッシュに細胞をさらに継代させた。35日目に、CD4/CD8細胞などのすべての細胞(「DP細胞バルク」)を回収した。

10

【0321】

実施例3. DP細胞バルクからNK細胞バルクへの分化

35日目に、DP細胞バルク、すなわち、細胞単離を受けることなく実施例2で得られた細胞を、 1×10^6 細胞/ウェルで、48ウェルプレートに播種し、5%CO₂、37℃で3日間培養した。15%FBS、4mM L-グルタミン、100U/ml ペニシリン、100ng/ml ストレプトマイシン、50μg/ml アスコルビン酸2-ホスフェート、10μg/ml ヒトインスリン、5.5μg/ml ヒトトランスフェリン、6.7ng/ml 亜セレン酸ナトリウム、500ng/ml 抗CD3抗体(UCHT1)、10ng/ml IL-2、及び10ng/ml IL-7を添加したMEMα培地を、培養培地として使用した。38日目に、15%FBS、4mM L-グルタミン、100U/ml ペニシリン、100ng/ml ストレプトマイシン、50μg/ml アスコルビン酸2-ホスフェート、10μg/ml ヒトインスリン、5.5μg/ml ヒトトランスフェリン、6.7ng/ml 亜セレン酸ナトリウム、10ng/ml IL-2、及び10ng/ml IL-7を添加した別のMEMα培地に細胞を分散させ、培養培地として使用した。42日目に、NK細胞を含むすべての細胞(「NK細胞バルク」)を回収した。

20

【0322】

実施例4. フローサイトメトリー分析

次に、NK細胞バルクを表1に記載の抗体のセットで染色し、フローサイトメトリーにより分析した。図1に示すとおり、CD3陰性NK細胞バルクの一部は、CD56(「CD56陽性免疫細胞」)を発現した。図1CD56陽性免疫細胞及びCD3陰性免疫細胞は、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)である。したがって、CD56陽性免疫細胞及びCD3陰性免疫細胞は、iPS細胞(FfI-01s04株)由来のHP細胞バルクから調製した。上記のプロセスで得られたCD56を発現する細胞は、iPS NK細胞と呼ばれることもある。フローサイトメトリーに使用した抗体を表1に示す。

30

【0323】

【表1】

表1:

抗CD3抗体	CD3BioLegend APC/Cy7
抗CD56抗体	CD56 Biolegend PE

40

【0324】

実施例5. 単一細胞RNA配列(scRNAseq)分析

NK細胞バルク集団(すなわち、実施例3で得られた細胞)中の異なる細胞種を同定するために、非線形次元圧縮法(単一細胞RNA-seq(scRNAseq))をベースにしたUMAP(uniform manifold approximation and projection))を適用した。

【0325】

GenewizのIlluminaNextSeq500で、NK細胞バルクの1万個の

50

細胞に対して、単一細胞RNAシーケンスを行った。SingleRアルゴリズム及び手動クラスターラベリングを使用して、イベントを4つの幅広い細胞集団（PBMCサンプル中の単球、B細胞、NK細胞、及びT細胞）に分類した。10X Genomicsから無料で入手できるPBMCのデータセットを、データ分析の対照として使用した。

【0326】

図2に示すとおり、NK細胞バルク中の細胞の約75%が、NK細胞として同定され、NK細胞バルク中の細胞の約25%が、T細胞として同定された。したがって、NK細胞バルクには、単一細胞RNAシーケンスによるmRNAプロファイリングに基づいて、NK細胞及びT細胞の両方が含まれていた。

【0327】

10

実施例6. CAR-NK細胞の調製

NK細胞は、1つ以上のCARを発現するようにさらに改変させた。NK細胞の改変には、(1)抗CD19CAR遺伝子及びIL-15R α /IL-15遺伝子を合成するステップと；(2)抗CD19CAR遺伝子及びIL-15R α /IL-15遺伝子を含むレトロウイルスベクターを調製するステップと；(3)抗CD19CAR遺伝子及びIL-15R α /IL-15遺伝子を含むレトロウイルスベクターでNK細胞を形質導入するステップと、を含む。

【0328】

CAR/IL15-NK細胞の調製

抗CD19CAR遺伝子は、表2に示すとおり、N末端から配置されるように設計されたオリゴペプチドを合成することによって調製した。

20

【0329】

【表2】

表2：

N末端からの配列	遺伝子	アミノ酸の数
1	免疫グロブリンの重鎖のリード配列	22
2	抗CD19抗体(FMC60)の軽鎖中の可変ドメイン	104
3	GGGS リンカー	15
4	抗CD19抗体(FMC60)の重鎖中の可変ドメイン	120
5	CD8由来配列(膜貫通ドメインを含む)	83
6	4-1BBの細胞内ドメイン	47
7	CD3ゼータの細胞内ドメイン	112

30

【0330】

抗CD19CARは、WO2014/153270（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に従って構築した。

【0331】

IL-15R α /IL-15遺伝子の調製

IL-15R α /IL-15遺伝子は、N末端から配置されるように設計されたオリゴペプチドを合成することによって調製した。IL-15R α /IL-15は、Mortier et al., 2006, The Journal of Biological Chemistry, Vol 281, No 3, pages 1612-1619, January 20, 2006; Chertova et al., The Journ

40

50

al of Biological Chemistry, Vol. 288, No. 25, Pages 18093-18103, June 21, 2013; 及び Rowley et al., Eur J Immunol, 2009 February; 39 (2) : 491-506 に従って構築した（それぞれ、その全体が、参照によって、組み込まれる）。

【0332】

【表3】

表4:

N末端からの配列	遺伝子	アミノ酸残基数
1	ヒトIL-2のリード配列	23
2	ヒトIL-15のC末端配列	114
3	GGGS リンカー	24
4	ヒトIL-15RAのC末端配列	239

10

【0333】

抗CD19CAR遺伝子を含むレトロウイルスベクターの調製

抗CD19CAR遺伝子は、pMYレトロウイルスベクターのマルチクロニング部位に組み込ませた。レトロウイルスベクターは、レトロウイルスベクターを産生するために、FRY-RD18細胞を使用して生成した。

20

【0334】

IL-15R α /IL-15遺伝子を含むレトロウイルスベクターの調製

IL-15R α /IL-15遺伝子は、別のpMYレトロウイルスベクターのマルチクロニング部位に組み込ませた。レトロウイルスベクターは、レトロウイルスベクターを生産するために、FRY-RD18細胞を使用して生成した。

【0335】

抗CD19CAR遺伝子及びIL-15R α /IL-15遺伝子のiPS NK細胞への形質導入

30

iPS NK細胞は、抗CD19CAR遺伝子を含むレトロウイルスベクター、及びIL-15R α /IL-15遺伝子を含むレトロウイルスベクターで形質導入させて、抗CD19CAR発現iPSNK細胞（「iNK-CAR19」）を生成した。

【0336】

実施例7. iNK-CAR19のin vivo抗腫瘍活性

ルシフェラーゼ発現NaIm6細胞(ATCC; がん細胞) (5×10^5 細胞) を、尾静脈を介して、NOD/Shi-scidIL-2Rガンマヌルマウス（「NSGマウス」）に移植した。NSGマウス（雄、4~5週齢）は、Jackson Laboratoryから入手した。NaIm6細胞移植の4日後、0.2mlのPBSまたは細胞を含まないわずか0.2mlのPBSに分散させたiNK-CAR19 (1×10^7 細胞) を、尾静脈を介してNaIm6移植NSGマウスに投与した。iNK-CAR19細胞またはPBSを投与後、尾静脈を介してルシフェリンをマウスに投与した。ルシフェラーゼ活性は、IVISイメージングシステム(PerkinElmer)を使用して、70日以上測定した。

40

【0337】

図3は、未処理（バッファーのみで処理）及びiNK-CAR19細胞で処理したNaIm6移植NSGマウスの抗腫瘍効果を示している。3日後、D-PBSバッファーで処理したすべてのマウスにおいて、発光が検出された。対照的に、他のマウス（初代CAR T細胞またはiNK-CAR細胞のいずれかで処理）では、投与後28日まで、発光は検出されず、また、処理後70日目でも、iNK-CAR19細胞で処理された1匹のマウ

50

スでは、発光は検出されなかった。したがって、iNK-CAR19細胞は、NALM6がん細胞に対する毒性の増強を明確に示した。

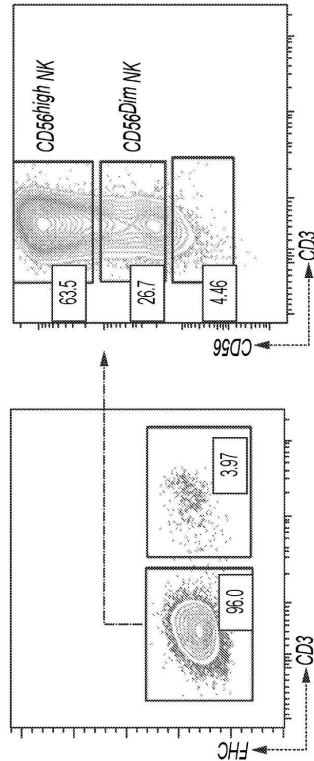
【0338】

添加均等物及び特許請求の範囲

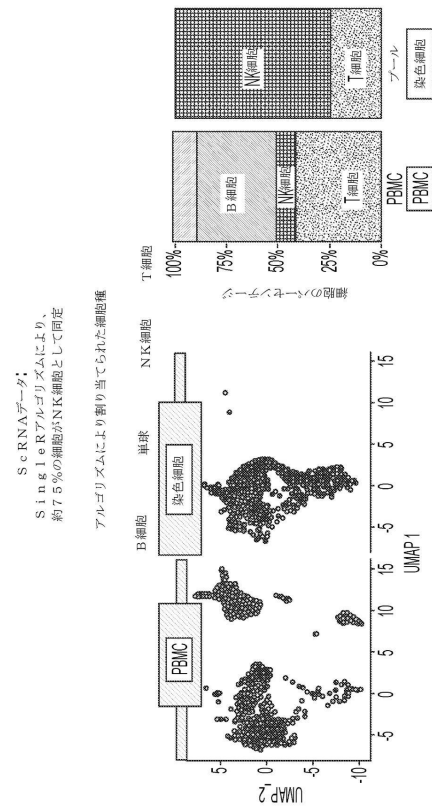
当業者は、日常的な実験のみを用いて、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの添加均等物を認識する、または確認することができるだろう。本発明の特許請求の範囲は、上記説明に限定されることを意図するものではなく、むしろ以下の特許請求の範囲に記載される通りである。

【図面】

【図1】



【図2】



10

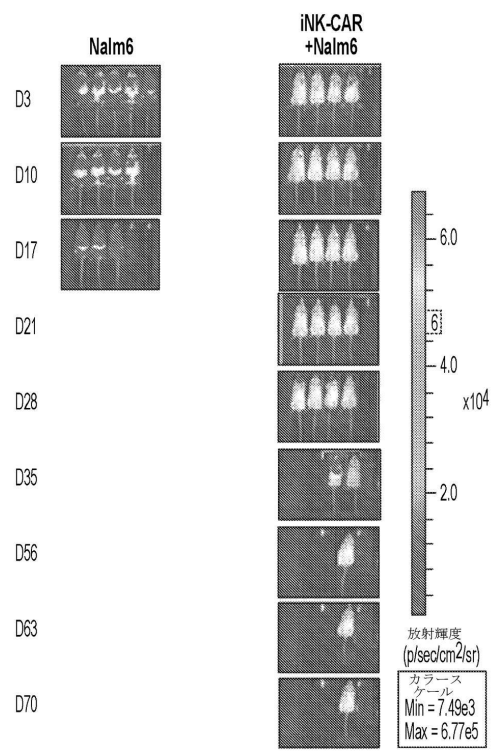
20

30

40

50

【 図 3 】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/019917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/0789 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 C07K14/725 C12N5/0783 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C07K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	YE LI ET AL: "Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity", CELL STEM CELL, vol. 23, no. 2, 28 June 2018 (2018-06-28), pages 181-192.e5, XP055700643, AMSTERDAM, NL ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2018.06.002 the whole document table 1 STAR*METHODS -----	1-10,23, 48,59, 60,64-73		
Y		1-73		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.				
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
26 May 2021		11/06/2021		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bayer, Martin		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/019917

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2017/078807 A1 (FATE THERAPEUTICS INC [US]) 11 May 2017 (2017-05-11) example 8 tables 6, 7 claims 1-19, 110, 131	1-10,23, 48,64-73 1-73
X	----- JIEMING ZENG ET AL: "Generation of "Off-the-Shelf" Natural Killer Cells from Peripheral Blood Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells", STEM CELL REPORTS, vol. 9, no. 6, 1 January 2017 (2017-01-01) , pages 1796-1812, XP055534970, United States ISSN: 2213-6711, DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.10.020	1-10,23, 48,64-73
Y	the whole document figure 1 Experimental Procedures	1-73
X	----- BERNARREGGI DAVIDE ET AL: "Development of innate immune cells from human pluripotent stem cells", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 71, 1 March 2019 (2019-03-01), pages 13-23, XP085616261, ISSN: 0301-472X, DOI: 10.1016/J.EXPHEM.2018.12.005	1-10,23, 48,64-73
Y	the whole document table 1	1-73
X	----- CRISTINA EGUIZABAL ET AL: "Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy: Pluripotent Stem Cells-Derived NK Cells as an Immunotherapeutic Perspective", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 5, 15 September 2014 (2014-09-15), XP055482576, CH ISSN: 1664-3224, DOI: 10.3389/fimmu.2014.00439	1-10,23, 48,64-73
Y	the whole document figure 1	1-73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/019917

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017078807 A1	11-05-2017	AU 2016348342 A1	10-05-2018
		CA 3003152 A1	11-05-2017
		CN 108473961 A	31-08-2018
		EP 3371301 A1	12-09-2018
		JP 2018533363 A	15-11-2018
		KR 20180066263 A	18-06-2018
		SG 11201803145R A	30-05-2018
		US 2018320137 A1	08-11-2018
		US 2021024891 A1	28-01-2021
		US 2021062151 A1	04-03-2021
		WO 2017078807 A1	11-05-2017

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 1 2 N	5/0789	(2010.01)	C 1 2 N	5/0789	
C 1 2 Q	1/6869	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(74)代理人 100152308

弁理士 中 正道

(74)代理人 100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(72)発明者 チャン、ユ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、ランズダウン ストリート 4
0、ミレニアム ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド内

(72)発明者 チャン、フイーシン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、ランズダウン ストリート 4
0、ミレニアム ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド内

(72)発明者 シー、シー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、ランズダウン ストリート 4
0、ミレニアム ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド内

(72)発明者 フー、チェンシン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、ランズダウン ストリート 4
0、ミレニアム ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド内

(72)発明者 カオ、ラン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 0 2 1 3 9、ケンブリッジ、ランズダウン ストリート 4
0、ミレニアム ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR62 QR77 QS24 QS34

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BB19 CA44

4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB64 CA04 CA12 NA14 ZB21 ZB26

ZB27

4H045 AA10 AA30 CA40 EA20 FA74