202130807

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202130807 A

(43)公開日： 中華民國 110 (2021) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：109137206 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 10 月 27 日

(51)Int. Cl.： *C12N5/0783 (2010.01)* *A61K38/17 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01) *A61P31/00 (2006.01)*
A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/10/28 日本 2019-195206

(71)申請人：日商第一三共股份有限公司 (日本) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (JP)
日本
學校法人慶應義塾 (日本) KEIO UNIVERSITY (JP)
日本

(72)發明人：富里亘 TOMISATO, WATARU (JP) ；吉村昭彥 YOSHIMURA, AKIHIKO (JP) ；近藤泰介 KONDO, TAISUKE (JP) ；安藤真 ANDO, MAKOTO (JP)

(74)代理人：丁國隆；黃政誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：14 共 59 頁

(54)名稱

具有ＣＤ４５ＲＡ 及ＣＣＲ７ 之細胞表面標誌的Ｔ細胞之製造方法

(57)摘要

本發明的課題係提供一種解決於Ｔ細胞輸入療法(adoptive T cell therapy)等中成為問題之Ｔ細胞的衰竭(exhaustion)並使Ｔ細胞的活性提升的技術。可藉由在(a)基質細胞的細胞培養上清液或(b) CXCL12 的存在下培養已活化的Ｔ細胞，而製造具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的Ｔ細胞。

202130807

【發明摘要】

【中文發明名稱】

具有 CD45RA⁺及 CCR7⁺之細胞表面標誌的 T 細胞之製造方法

【中文】

本發明的課題係提供一種解決於 T 細胞輸入療法(adoptive T cell therapy)等中成為問題之 T 細胞的衰竭(exhaustion)並使 T 細胞的活性提升的技術。可藉由在(a)基質細胞的細胞培養上清液或(b) CXCL12 的存在下培養已活化的 T 細胞，而製造具有 CD45RA⁺及 CCR7⁺之細胞表面標誌的 T 細胞。

【指定代表圖】

無。

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【特徵化學式】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

具有 CD45RA$^+$及 CCR7$^+$之細胞表面標誌的 T 細胞之製造方法

【技術領域】

【0001】本發明係關於製造具有 CD45RA$^+$及 CCR7$^+$之細胞表面標誌的 T 細胞之方法。更詳細而言，若依據本發明，則可藉由使用基質細胞的細胞培養上清液或 CXCL12 來培養 T 細胞，而製造具有 CD45RA$^+$及 CCR7$^+$之細胞表面標誌的 T 細胞。

【先前技術】

【0002】於癌症治療中，過繼 T 細胞療法(adoptive T-cell therapy)被視為有希望的(非專利文獻 1)。例如，腫瘤浸潤淋巴球(tumor infiltrating lymphocyte：TIL)療法被報告於惡性黑色素瘤患者中顯著奏效(非專利文獻 2 及 3)。於此療法中，係將所單離的 TILs 藉由呈現腫瘤相關抗原(tumor associated antigen：TAA)的抗原呈現細胞而進行再刺激、擴大培養，並將該 TILs 對患者進行投予。

【0003】另一方面，應用基因導入技術之新的過繼 T 細胞療法亦顯示戲劇性的治療效果。其係將 TAA、或者被人為地設計成會辨識成為治療標的之分子的 T 細胞受體(T cell receptor：TCR)、或者嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor：CAR)基因導入至患者 T 細胞，並進一步將藉由 TCR 刺激而擴大培養的 T 細胞送回

患者之方法(非專利文獻 4)。

【0004】然而，於此等療法中，有被輸入的 T 細胞有時會失去其功能，治療效果為限定性的問題(非專利文獻 1 及 5)。這是因為於 TIL 所存在的腫瘤微小環境或擴大培養過程中，T 細胞會衰竭(exhaustion)並發生功能異常的緣故(非專利文獻 6 及 7)。因此，若能使該已衰竭的 T 細胞之功能或滯留性恢復，則可期待能改善過繼 T 細胞療法的治療效果。

【0005】記憶 T 細胞(memory T-cell)迄今被分類為兩個亞族群：效應記憶 T 細胞(effector memory T：T_{EM})及中樞性記憶 T 細胞(central memory T：T_{CM})(非專利文獻 8)。近年來，鑑定出為新的記憶 T 細胞的亞族群之幹細胞記憶 T 細胞(stem cell memory T：T_{SCM})。人類的情形，T_{SCM} 係以細胞表面標誌 $CD45RA^+CD45RO^-CCR7^+CD62L^+$定義(非專利文獻 9 及 10)。已知 T_{SCM}在活體內具有更高的增殖性、長期生存能力，並會產生具備強力抗腫瘤活性的效應 T 細胞(effector T cell)(非專利文獻 11 及 12)。實際上，亦已報告患者的 CAR 導入 T(CAR-T)細胞中的 T_{SCM}/早期記憶表現型(early memory phenotypes)之表現頻率的上升，係與 CAR-T 細胞療法的持續性緩解相關(非專利文獻 13 及 14)。

【0006】本發明人等已報告：藉由與表現 Notch 配體的餵養細胞(feeder cell)之共同培養，而可從已完全活化的記憶 T 細胞或更為分化的記憶 T 細胞得到細胞表面標誌為 $CD45RA^+CD45RO^-CCR7^+CD62L^+$的誘導性記憶

幹細胞樣 T 細胞(induced stem cell memory T：iT_{SCM})(非專利文獻 12 及 15)。藉由本研究，亦可認定相較於初始 T 細胞(naive T cell)或其他的記憶 T 細胞亞族群，此等功能性 iT_{SCM} 細胞(functional iT_{SCM})係顯示更優異的抗腫瘤能力。此外，藉由本發明人等後續的研究，而已達成在 $CD45RA^+CD45RO^-CCR7^+CD62L^+$ 之中，若作為最低限度可確認為 $CD45RA^+CCR7^+$，則判斷為已製造該 T 細胞。然而，將該 iT_{SCM} 細胞製作方法應用於過繼 T 細胞療法的情形，有難以完全除去共同培養的餵養細胞等的問題。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0007】

[非專利文獻 1] June, C.H. (2007). Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. J Clin Invest 117, 1466-1476.

[非專利文獻 2] Wu, R., Forget, M.A., Chacon, J., Bernatchez, C., Haymaker, C., Chen, J.Q., Hwu, P., and Radvanyi, L.G. (2012). Adoptive T-cell therapy using autologous tumor-infiltrating lymphocytes for metastatic melanoma: current status and future outlook. Cancer J 18, 160-175.

[非專利文獻 3] Rosenberg, S.A. and Dudley, M.E. (2009). Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. Curr Opin Immunol

21, 233-240.

[非專利文獻 4] Fesnak, A.D., June, C.H., and Levine, B.L. (2016). Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 16, 566-581.

[非專利文獻 5] Klebanoff, C.A., Acquavella, N., Yu, Z., and Restifo, N.P. (2011). Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? Immunol Rev 239, 27-44.

[非專利文獻 6] Jiang, Y., Li, Y.,and Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. Cell Death Dis 6, e1792.

[非專利文獻 7] Gattinoni, L., Klebanoff, C.A., Palmer, D.C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S.E., Theoret, M.R., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2005). Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred $CD8^+$ T cells. J Clin Invest 115, 1616-1626.

[非專利文獻 8] Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2005). Understanding the generation and function of memory T cell subsets. Curr Opin Immunol 17, 326-332.

[非專利文獻 9] Gattinoni, L. (2014). Memory T cells officially join the stem cell club. Immunity 41, 7-9.

[非專利文獻 10] Gattinoni, L., Speiser, D.E., Lichterfeld, M., and Bonini, C. (2017). T memory stem

cells in health and disease. Nat Med 23, 18-27.

[非專利文獻 11] Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., et al. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nat Med 17, 1290-1297.

[非專利文獻 12] Kondo, T., Morita, R., Okuzono, Y., Nakatsukasa, H., Sekiya, T., Chikuma, S., Shichita, T., Kanamori, M., Kubo, M., Koga, K., et al. (2017). Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy. Nat Commun 8, 15338.

[非專利文獻 13] Fraietta, J.A., Lacey, S.F., Orlando, E.J., Pruteanu-Malinici, I., Gohil, M., Lundh, S., Boesteanu, A.C., Wang, Y., O'Connor, R.S., Hwang, W.T., et al. (2018a). Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. Nat Med 24, 563-571.

[非專利文獻 14] Xu, Y., Zhang, M., Ramos, C.A., Durett, A., Liu, E., Dakhova, O., Liu, H., Creighton, C.J., Gee, A.P., Heslop, H.E., et al. (2014). Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. Blood 123, 3750-3759.

[非專利文獻 15] Kondo, T., Imura, Y., Chikuma, S., Hibino, S., Omata-Mise, S., Ando, M., Akanuma, T., Iizuka, M., Sakai, R., Morita, R., and Yoshimura, A. (2018). Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy. Cancer Sci 109, 2130-2140.

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

【0008】本發明係以解決於 T 細胞輸入療法(adoptive T cell therapy)中成為問題之 T 細胞的衰竭，並提升 T 細胞的活性為目的。更具體而言，係以製造具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的 T 細胞為目的。

[用以解決課題之手段]

【0009】本發明人等為了解決上述課題而專心進行研究，結果發現藉由使用基質細胞的細胞培養上清液或 CXCL12 來培養已活化的 T 細胞，而可得到具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的 T 細胞，終至完成本發明。

【0010】本發明雖不限定於此，但包含以下的發明[1]～[13]。

[1] 一種方法，其係製造細胞表面標誌為 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$的 T 細胞之方法，其包含使用基質細胞的細胞培養上清液來培養 T 細胞的步驟。

[2] 如[1]所記載之方法，其進一步包含將 T 細胞予以活化而得到活化 T 細胞的步驟。

[3] 如[1]或[2]所記載之方法，其中基質細胞係選自包含OP9細胞、TSt-4細胞及已於此等細胞表現Notch配體的細胞之群組的任1種以上。

[4] 如[1]～[3]中任一項所記載之方法，其中基質細胞為OP9-DLL1細胞。

[5] 如[1]～[4]中任一項所記載之方法，其進一步包含Notch傳訊(signaling)步驟。

[6] 如[5]所記載之方法，其中Notch傳訊步驟係使用選自包含DLL4、DLL1、JAG1、JAG2及彼等的重組體之群組的任1種以上的Notch配體來進行。

[7] 如[5]或[6]所記載之方法，其中Notch傳訊步驟係使用重組DLL1來進行。

[8] 如[5]～[7]中任一項所記載之方法，其中Notch傳訊步驟係使用FOXM1或NICD的強制表現來進行。

[9] 如[1]～[8]中任一項所記載之方法，其中細胞表面標誌為$CD45RA^+$且$CCR7^+$的T細胞係具有$CD45RO^-$及$CD62L^+$之細胞表面標誌。

[10]如[1]～[9]中任一項所記載之方法，其中T細胞係CAR-T細胞。

[11]一種T細胞，其係藉由如[1]～[10]中任一項所記載之方法所製造。

[12]一種細胞醫藥，其含有如[11]所記載之T細胞。

[13]如[12]所記載之細胞醫藥，其係用於選自包含癌症、感染症、自體免疫疾病及過敏之群組的1種以上

的治療。

【0011】作為本發明的另一態樣，包含以下的發明[1A]～[14A]。

[1A] 一種方法，其係製造具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的T細胞之方法，其包含在(a)基質細胞的細胞培養上清液或(b) CXCL12的存在下培養作為原料之T細胞的步驟。

[2A] 如[1A]所記載之方法，其於前述培養步驟之前，進一步包含將作為原料之T細胞予以活化的步驟。

[3A] 如[1A]或[2A]所記載之方法，其中基質細胞係選自包含 OP9 細胞、TSt-4 細胞及已於此等細胞表現Notch配體的細胞之群組的任1種以上。

[4A] 如[1A]～[3A]中任一項所記載之方法，其中基質細胞為 OP9-DLL1 細胞。

[5A] 如[1A]～[4A]中任一項所記載之方法，其於前述培養步驟之前或前述培養步驟中，進一步包含將Notch訊息予以活化。

[6A] 如[5A]所記載之方法，其中 Notch 訊息的活化係使用選自包含 DLL4、DLL1、JAG1、JAG2 及彼等的重組體之群組的任1種以上的 Notch 配體來進行。

[7A] 如[5A]或[6A]所記載之方法，其中 Notch 訊息的活化係使用重組 DLL1 來進行。

[8A] 如[5A]～[7A]中任一項所記載之方法，其中Notch訊息的活化係使用 FOXM1 或 NICD 的強制表現來進行。

[9A] 如[1A]～[8A]中任一項所記載之方法，其中具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的 T 細胞係具有 $CD45RO^-$及 $CD62L^+$之細胞表面標誌。

[10A] 如[1A]～[9A]中任一項所記載之方法，其中作為原料之 T 細胞係 CAR-T 細胞。

[11A] 如[1A]～[10A]中任一項所記載之方法，其於在 CXCL12 的存在下培養的步驟中添加 IGF-I。

[12A] 一種 T 細胞，其係藉由如[1A]～[11A]中任一項所記載之方法所製造。

[13A] 一種細胞醫藥，其含有如[12A]所記載之 T 細胞。

[14A] 如[13A]所記載之細胞醫藥，其係用於選自包含癌症、感染症、自體免疫疾病及過敏之群組的 1 種以上的治療。

[發明之效果]

【0012】若依據本發明之製造方法，則藉由在基質細胞的細胞培養上清液(條件培養基(conditioned medium)：CM)或 CXCL12 的存在下培養已活化的 T 細胞，而可簡便且效率佳地得到具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的 T 細胞。

【0013】若依據本方法，則因為不同於藉由與餵養細胞的共同培養所製作之以往的 iT_{SCM} 細胞，並不需要除去餵養細胞的步驟，而有利於對例如 CAR-T 療法及過繼 T 細胞療法等的應用。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖1顯示用以在T細胞中使NICD過度表現的實驗設計流程圖(TCR stimuli：TCR刺激，Prime：預備刺激，Expansion：擴大培養，T_{SCM}-like induction：T_{SCM}樣細胞的誘導)。

圖2顯示為了製作NICD強制表現的T細胞所使用之過度表現NICD的反轉錄病毒載體之構築體的示意圖。

圖3顯示在誘導成記憶幹細胞樣T細胞的前後之空載體導入的人類$CD8\alpha^+$T細胞(Empty)或NICD強制表現的人類$CD8\alpha^+$T細胞(NICD)中之CD45RA及CCR7的表現(左圖)、以及在誘導成記憶幹細胞樣T細胞的前後之$CD45RA^+CCR7^+$細胞的細胞數(%)(右圖)。

圖4顯示為了製作FOXM1強制表現的T細胞所使用之過度表現FOXM1的反轉錄病毒載體之構築體的示意圖。

圖5顯示空載體導入的T細胞(Empty)或FOXM1基因強制表現的T細胞(FOXM1ΔN)中之在誘導成記憶幹細胞樣T細胞的前後之CD45RA、CCR7及CD27表現、以及在誘導成記憶幹細胞樣T細胞的前後之$CD45RA^+CCR7^+$及$CD45RA^+CCR7^+CD27^{high}$細胞的細胞數(%)。

圖6顯示空載體導入的T細胞(Empty)或FOXM1基因強制表現的T細胞(FOXM1ΔN)中之在誘導成記憶幹細胞樣T細胞的前後之CD45RA、CCR7及CD27表現、以

及在誘導成記憶幹細胞樣 T 細胞的前後之 $CD45RA^{+}CCR7^{+}$及 $CD45RA^{+}CCR7^{+}CD27^{high}$ 細胞的細胞數(%)。

圖 7 顯示第 0 日(左圖)或第 11 日(右圖)之空載體或 FOXM1 強制表現的 T 細胞中的 FOXM1 表現。FOXM1 基因表現係使用 18SrRNA 表現水準予以正規化(normalization)。

圖 8 顯示在添加為 FOXM1 抑制劑的硫鏈絲菌肽(Thiostrepton)、或 DMSO 的情形下，進行與 OP9-hDLL1 細胞的共同培養之人類 $CD8\alpha^{+}$T 細胞(on FC)、進行與 OP9-hDLL1 細胞的共同培養之空載體導入的 T 細胞(Empty on FC)、在 OP9-hDLL1 細胞的培養上清液中進行培養的 FOXM1 強制表現的 T 細胞(FOXM1ΔN in CM)中之 CD45RA 及 CCR7 的表現(各群 n=3)。

圖 9 顯示在添加為 FOXM1 抑制劑的硫鏈絲菌肽、或 DMSO 的情形下，進行與 OP9-hDLL1 細胞的共同培養之人類 $CD8\alpha^{+}$T 細胞(on FC)、進行與 OP9-hDLL1 細胞的共同培養之空載體導入的 T 細胞(Empty on FC)、在 OP9-hDLL1 細胞的培養上清液中進行培養的 FOXM1 強制表現的 T 細胞(FOXM1ΔN in CM)中之 CD45RA 及 CCR7 的表現(各群 n=3)。

圖 10 係顯示 CD45RA 及 CCR7 的表現狀況的圖表(左：陰性對照，右：陽性對照)。

圖 11 顯示關於 HPRT、CXCL12、SCF、IL-7、FLT3L 的基因表現(gene expression)之電泳的結果(實施

例 6)。

圖 12 係定量 CXCL12 的濃度(concentration)的結果(實施例 6)。

圖 13 係顯示 CD45RA 及 CCR7 皆為陽性的細胞之比例的圖表(實施例 7)。

圖 14 係顯示自小鼠所採集的血液中(blood)之 NALM6 癌細胞數的圖表(實施例 8)。

【實施方式】

[用以實施發明的形態]

【0015】本發明的一態樣為具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的 T 細胞之製造方法，其包含在基質細胞的細胞培養上清液的存在下培養 T 細胞的步驟。本發明的另一態樣為具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的 T 細胞之製造方法，其包含在 CXCL12 的存在下培養 T 細胞的步驟。若依據本態樣的方法，則可不進行與餵養細胞的共同培養而得到具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的 T 細胞。

【0016】本發明之方法只要包含在基質細胞的細胞培養上清液或 CXCL12 的存在下培養 T 細胞的步驟，則未特別限定，其他的步驟可組合周知的步驟來進行，本發明可包含例如下述：

(1)將 T 細胞予以活化的步驟(活化步驟)；

(2)對 T 細胞進行基因導入的步驟(基因導入步驟)；

(3)Notch 訊息的活化步驟(Notch 傳訊步驟)；及/或

(4)具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的記憶

幹細胞樣T細胞之細胞回收、分離及/或純化的步驟。

此等步驟的順序，於以下只要未特別限定，則視為當業者可適宜選擇者，(3)步驟亦可與(1)或(2)步驟同時進行。

【0017】一般而言，T細胞意指於細胞表面具有TCR的細胞，但於本說明書中，所謂「T細胞」係除了T細胞本身以外，亦可為包含其他的細胞種類之細胞群，可為包含例如60%以上、70%以上、80%以上、90%以上或95%以上的T細胞之細胞群。又，T細胞係包含所有分化階段的T細胞，亦可為使細胞表面帶有抗原或標誌者。

【0018】於本說明書中，所謂「記憶幹細胞樣T細胞」意指具有$CD45RA^+$及$CCR7^+$之細胞表面標誌的T細胞。於較佳的態樣中，記憶幹細胞樣T細胞除了$CD45RA^+$及$CCR7^+$之外，亦具有$CD45RO^-$及$CD62L^+$之細胞表面標誌。記憶幹細胞樣T細胞中可包含例如作為T_{SCM}細胞或iT_{SCM}細胞而周知的細胞。

【0019】於本說明書中，所謂「活化T細胞」意指具有$CD4^+CCR7^-CD45RA^-$或$CD8^+CCR7^-CD45RA^-$之細胞表面標誌的T細胞。於較佳的態樣中，活化T細胞具有$CD8^+CCR7^-CD45RA^-$之細胞表面標誌。於一態樣中，於在基質細胞的細胞培養上清液或CXCL12的存在下培養T細胞的步驟中，作為原料之T細胞可為活化T細胞，在該情形，作為原料之T細胞與活化T細胞為同義。

【0020】活化T細胞的取得、製備能以當業者所周

知的方法進行，例如，作為原料，可使用市售的 T 細胞群、自人類(例如健康的供給者、罹患特定疾病的供給者、患者本身)所採集的 T 細胞群、或自此等 T 細胞群所分離、濃縮之所欲的 T 細胞。例如，可將作為人類末梢血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cell)(Precision Bioservices 公司製)而市售的細胞，藉由抗 CD3/CD28 抗體進行刺激，以作為活化 T 細胞使用。

【0021】於本發明中可使用的活化 T 細胞，除了以上述手法所得到的 T 細胞之外，亦可為將 ES 細胞或誘導性富潛能幹細胞(induced pluripotent stem cell)(iPS 細胞)等之經初始化的未分化細胞進行分化誘導、或者將初始 T 細胞等之未成熟 T 細胞進行分化誘導所製作者，亦可為藉由基因導入步驟而被改造成會表現特定的 T 細胞受體(TCR)或嵌合抗原受體(CAR)的活化 T 細胞，亦可為藉由施加 Notch 訊息的活化處理而已表現 Notch 相關基因的活化 T 細胞。

【0022】基質細胞(Stromal cell)亦稱為間質細胞，係提供幹細胞、芽細胞維持生存或進行分化之環境的細胞，被認為於作為餵養細胞使用的情形會提供、產生細胞彼此的接觸刺激或營養因子。於本說明書中，所謂「基質細胞」意指基質細胞或將其改造的細胞，包含例如源自骨髓的 OP9 細胞、TSt-4 細胞、及已於此等細胞表現 Notch 配體的細胞(例如 OP9-DLL1 細胞、TSt-4-DLL1 細胞)，較佳為 OP9 細胞或其之已表現 Notch 配體的細胞，更佳為 OP9-hDLL1 細胞。

【0023】作為於基質細胞表現的 Notch 配體，係包含例如 DLL1、DLL4、JAG1、JAG2 或此等的組合，可為完全、部分的或經改造者，較佳為 DLL1，更佳為 hDLL1(人類 DLL1 (Human DLL1))。

【0024】已知可藉由使用已表現 Notch 配體的 OP9 細胞，而使富潛能幹細胞分化成各式各樣組織的細胞。例如，源自小鼠的 OP9-DLL1 細胞常被使用於在試管內免疫細胞的發生或從 iPS 細胞分化誘導 T 細胞，亦被報告藉由使用 OP9-DLL1 細胞的細胞培養上清液之培養，而可從未成熟 T 細胞分化為成熟 T 細胞。然而，尚未知曉使用基質細胞的細胞培養上清液或 CXCL12 可從成熟 T 細胞誘導成記憶幹細胞樣 T 細胞。

【0025】本說明書中的「基質細胞的細胞培養上清液」，係可藉由在培養基中培養基質細胞且得到其細胞培養上清液而製備。例如，可將基質細胞在包含 αMEM (Gibco 公司)、胎牛血清(20%，FBS)、青黴素-鏈黴素溶液(1%，ThermoFisher 公司)等之培養基中，在 37℃、5 體積% CO_2 的條件下培養 1 日～2 日後，回收培養上清液，並通過 0.45 微米的過濾器進行過濾而得。培養中之培養基的更換可適宜進行，例如，在細胞達到 100%長滿(100% confluent)時進行更換。培養液中所包含之基質細胞的濃度並未特別限定，但較佳為 1～2×10^5 個/10ml/10cm 培養皿。

【0026】所謂「CXCL12」為 CXC 模體趨化介素(CXC motif chemokine)的一種，CXCL12 及為其受體的

CXCR4係參與B細胞及骨髓系細胞的發生、或造血幹細胞往骨髓的回歸(homing)。已由 Janas 等人報告：OP9-DLL1細胞會產生CXCL12；CXCL12/CXCR4傳訊有助於前驅 T 細胞(pre-T cell)的增殖及分化(Michelle L. Janas et al. J Exp Med. 2010 Jan 18; 207(1): 247-261)。

【0027】於本說明書中，「在基質細胞的細胞培養上清液的存在下培養 T 細胞的步驟」只要為使用基質細胞的細胞培養上清液之培養步驟，則未特別限定，可使用當業者所周知的培養方法來進行。又，於本說明書中，「在 CXCL12 的存在下培養 T 細胞的步驟」只要為使用 CXCL12 之培養步驟，則未特別限定，可使用當業者所周知的培養方法來進行。(以下，關於在基質細胞的細胞培養上清液的存在下培養 T 細胞的步驟、及在 CXCL12 的存在下培養 T 細胞的步驟，亦有僅稱為培養步驟的情形。)

【0028】於培養步驟中所使用的培養基及添加物並未特別限定，可將一般已知適於細胞黏著、細胞誘導的培養基及添加物塗布、添加至市售的培養容器而使用。例如，作為培養基，可使用 αMEM (Gibco 公司)；作為添加物，可使用例如人類 IL-7 (PeproTech 公司)等之各種細胞介素。

【0029】本步驟的培養方法、條件，只要為可從 T 細胞(特別是活化 T 細胞)製造記憶幹細胞樣 T 細胞的條件，則未特別限定，可採用當業者所周知的培養方法、條件。例如，將活化 T 細胞接種於添加有上述添加劑的

培養基，並加入基質細胞的細胞培養上清液或CXCL12，以約37℃的溫度，培養9～11日、更佳為10～11日。培養上清液的更換，可每2～5日、更佳為每2～4日進行。例如，對T細胞添加OP9-hDLL1細胞培養上清液(1～10ml)或CXCL12，以37℃的溫度，進行培養11日，每2～4日進行培養上清液的更換。

【0030】於一態樣中，培養步驟不需要餵養細胞(feeder cell)。於本說明書中，「不需要餵養細胞」意指在實質上不包含餵養細胞的培養條件下進行，特別是意指在與餵養細胞的共同培養以外的條件下進行。

【0031】本發明可包含Notch訊息的活化步驟(亦稱為Notch傳訊步驟)。藉由Notch訊息的活化，而引起或媒介與Notch配體相關的訊息傳遞。Notch訊息的活化並未特別限定，但較佳為使用選自包含重組DLL1、FOXM1強制表現、NICD強制表現及此等的組合之群組的至少1種來進行。

【0032】已知「Notch訊息的活化」在發生過程之各式各樣的組織構築過程中，對決定細胞的增殖、分化等細胞的命運扮演重要的角色。有被稱為NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3及NOTCH4之4種不同的Notch受體存在。Notch受體係藉由與相鄰細胞上的Delta(於人類中被稱為Delta樣(Delta-like))及Serrate(於人類中被稱為Jagged)等之跨膜配體(transmembrane ligand)進行相互作用而傳達短距離訊息的細胞表面受體。亦即，存在於遞送訊息側的細胞之Delta樣(DLL1、DLL3、

DLL4)及 Jagged (JAG1、JAG2)家族的成員，係作為對於 Notch 受體的配體而作用。

【0033】Notch 訊息的活化中之「Notch 配體」係與關於基質細胞的上述 Notch 配體同樣地，包含 DLL4、DLL1、JAG1、JAG2 或此等的組合，可為完全、部分的或經改造者，較佳為 DLL1，更佳為 hDLL1。

【0034】「Notch 受體」的種類並未特別限定，但較佳為 NOTCH1、NOTCH2 或此等的組合。

【0035】Notch 訊息的活化可在固定化有 Notch 配體胜肽的固體材料(基材)上進行，例如，可使用各種 Notch 配體的可溶性胜肽作為 Notch 配體胜肽，並結合/固定化至聚苯乙烯製盤或珠粒等之固體材料來進行。使用「重組 DLL1」的情形，例如，使用人類 Fc-DLL1 (Adipogen 公司製)，並固定化至聚苯乙烯製盤上來進行。在此情形下，可同時進行培養步驟與 Notch 訊息的活化。藉由與培養步驟同時進行，而於變得不需要預先製作已使參與 Notch 訊息的活化之基因強制表現的 T 細胞之點上有利。

【0036】Notch 訊息的活化亦可使用已使參與 Notch 訊息之基因強制表現的 T 細胞來進行。亦即，Notch 訊息的活化，係包含使參與 Notch 傳訊之基因於活化 T 細胞強制表現。基因的種類並未特別限定，可列舉例如 FOXM1 及 NICD，此等可具有完全的、部分的或經改造的序列，例如可具有 N 末端缺損 FOXM1 (FOXM1ΔN)。基因的強制表現可依照當業者所周知的方法進行。

【0037】「NICD」意指 Notch 胞內域(intracellular domain)，已知其藉由 Notch 配體結合而被切斷及放出，之後 NICD 移動至核，並活化 Notch 的標的基因。

【0038】已知「FOXM1」(叉頭匣蛋白 M1 (forkhead box protein M1))調節細胞週期進程 G2/M 檢查點(check point)與其他的細胞週期相關基因，亦已知其於各種腫瘤中，不僅是細胞週期，亦調節幹細胞性(stemness)、粒線體功能、氧化還原網(redox network)。雖尚未知曉其參與 Notch 傳訊，但藉由下述實驗 3 及 4 所示之本發明人等的研究，而初次發現 FOXM1 為 Notch 傳訊中的主要下游基因，以及其有正向(positive)控制 T_{SCM} 樣表現型之誘導的可能性。

【0039】本發明亦可在 CXCL12 及 IGF-I 的存在下培養 T 細胞。「IGF-I」係與胰島素具有類似分子結構的單鏈多肽。IGF-I 係生長激素依賴性地於肝臟產生，參與各式各樣細胞的增殖或骨形成。已被報告於前驅 T 細胞的分化中亦扮演重要的角色(O Kecha et al. Endocrinology. 2000 Mar;141(3):1209-17)。

【0040】「SCF」、「IL-7」及「FLT3L」皆為參與包含前驅 T 細胞的淋巴球之發生及分化的細胞介素及增殖因子(P J Morrissey et al. Cell Immunol. 1994 Aug;157(1):118-31.、T A Moore and A Zlotnik J Immunol. 1997 May 1;158(9):4187-92)。於本說明書中，係使用 HPRT(次黃嘌呤磷酸核糖基轉移酶(hypoxanthine phosphoribosyltransferase))作為對照的持家基因。

【0041】於本說明書中，「將 T 細胞予以活化的步驟」典型而言係於培養步驟之前進行的步驟，可包含為了得到活化 T 細胞而進行的所有步驟。於本步驟中，例如可包含藉由分化誘導而得到以抗 CD3/CD28 抗體珠粒 EB 病毒轉形的 B 細胞、經導入 CAR 基因或 TCR 基因的細胞等活化 T 細胞之步驟；對 T 細胞進行基因導入之基因導入步驟；及此等的組合，且此等步驟能以適於得到作為目的之活化 T 細胞的順序來進行。

【0042】於本說明書中，「對 T 細胞進行基因導入之基因導入步驟」意指得到基因改造 T 細胞的步驟。基因導入可對所有發生階段的 T 細胞進行，基因的種類或基因導入方法並未特別限定，可因應作為目的之記憶幹細胞樣 T 細胞所應具備的性質或功能，而導入 1 個或複數個基因。例如，藉由基因導入步驟所得到的活化 T 細胞為 CAR-T細胞。由於所導入的基因資訊即使經過本態樣的培養步驟亦被維持，因此可藉由使用具有所欲基因資訊的活化 T 細胞，而得到可用於作為目的之細胞療法的記憶幹細胞樣 T 細胞。T 細胞可為源自自體的細胞，亦可為源自異體的細胞。

【0043】基因導入可包含例如(i)B2M、TAP1、TAP2、TAP 結合素(tapasin)、NLRC5、LAG3、TIM3、RFXANK、CITTA、RFX5 或 RFXAP 之表現的缺失或減少；(ii)PD-1、SOCS1/3、HLA-E、HLA-G、HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD137、CD80、PDL1、A2AR、活化 STAT3、CAR、TCR、或對於雙特

異性(bispecific)或者多特異性(multispecific)銜接抗體(engager)的表面觸發受體之表現的導入或增加中之1個或複數個，但特佳為CAR之表現導入。

【0044】CAR(嵌合抗原受體)係藉由T細胞膜的內側的胞內域、外側的胞外域(extracellular domain)、連接此等的間隔區(spacer)與跨膜域(transmembrane domain)所構成。胞內域係CD3ζ鏈結合至CD28或4-1BB等之共刺激域(costimulatory domain)，共刺激域係增強CAR-T細胞的細胞增殖，且扮演保護原本即存在之內源性T細胞的抗細胞凋亡功能的角色。CD3ζ鏈係主導訊息的活化與CAR-T的增幅。為胞外域之單鏈可變片段scFv，係連同靶向元件(targeting element)一起與腫瘤抗原結合。於本發明中，CAR構築體可使用該技術領域中已知的任意構築體。作為CAR中的抗原結合域，可使用例如CD19或CD20等，較佳為使用CD19。

【0045】為了得到CAR-T細胞之基因操作，可藉由當業者所周知的方法進行，且為了應用於本發明之方法而適宜改變操作亦為容易。例如，將CAR構築體組入表現載體。於該技術領域中已知有各式各樣的表現載體，可利用任意的該種載體。於較佳的實施形態中，載體為反轉錄病毒或慢病毒(lentivirus)載體。亦可使用利用電穿孔或脂質轉染法(lipofection)的轉染。

【0046】於本發明的實施中，關於分子生物學或重組DNA技術等之基因工程的方法及一般的細胞生物學的方法、以及先前技術，只要未特別指明，則實施者可

參照該領域之標準性書籍。作為此種書籍，可列舉例如下述，此等係藉由參照而併入本說明書中。

「Molecular Cloning:A Laboratory Manual」(Sambrook & Russell，Cold Spring Harbor Laboratory Press，第3版，2001)

「Current Protocols in Molecular biology」(Ausubel et al.編，John Wiley & Sons，1987)

「Methods in Enzymology」系列(Academic Press)

「PCR Protocols: Methods in Molecular Biology」(Bartlett & Striling編，Humana Press，2003)

「Animal Cell Culture: A Practical Approach」(Masters編，Oxford University Press，第3版，2000)

「Antibodies:A Laboratory Manual」(Harlow et al. & Lane編，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1987)

「Optimization of Methods for the Genetic Modification of Human T Cells」(Mahmood Y. Bilal, Aldo Vacaflores, and Jon C.D. Houtman; Immunol Cell Biol. 2015 Nov; 93(10): 896-908.)

【0047】又，於本說明書中所參照之用於細胞培養、細胞生物學實驗的試劑及套組類，可由Sigma公司或Invitrogen公司、Clontech公司、R&D systems公司、BD Bioscience公司、Lonza公司、eBioScience公司、Thermo Fisher公司、PeproTech公司、BioLegend公司、Gibco公司、Nacalai Tesque公司等之業者取得。

【0048】藉由本態樣的方法所得之記憶幹細胞樣 T 細胞，可接著進行利用周知的方法之細胞回收、分離、純化。記憶幹細胞樣 T 細胞的鑑定可藉由確認 $CD45RA^+$ 及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的表現來進行。標誌的表現，其手法雖未特別限定，但可藉由使用抗體的免疫染色法或反轉錄酶中介性聚合酶連鎖反應(RT-PCR)、雜合分析等之周知的細胞組織生物學的手法以及分子生物學的方法而確認。

【0049】純化記憶幹細胞樣 T 細胞的方法，只要為已成為周知的細胞的分離純化法，則任一者皆可使用，但作為其具體例，可列舉流動式細胞測量術(flow cytometry)；磁珠、淘選法(panning method)等根據抗原-抗體反應的方法；藉由使用蔗糖、Percoll 等撐體之密度梯度離心的細胞分離(cell fractionation)法。

【0050】關於本發明中所使用之各種細胞的製作、繼代、保存法或細胞生物學實驗之一般的方法，實施者可參照該領域之標準性書籍。作為此等之例，可列舉「細胞培養步驟準則」(中村幸夫編；羊土公司)，其係藉由參照而併入本說明書中。於本說明書中所參照之用於細胞培養、發生・細胞生物學實驗的試劑及套組類，可由 Invitrogen 公司或 Sigma 公司等之販賣業者取得。

【0051】於另一態樣，本發明係關於具有 $CD45RA^+$ 及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的 CAR-T 細胞，CAR-T 細胞較佳為記憶幹細胞樣 CAR-T 細胞。

【0052】本態樣之「CAR-T 細胞」只要具有上述表

現型，則並未特別限定為自體 CAR-T 細胞或異體 CAR-T 細胞，其之取得、製作亦可藉由當業者所周知的方法，但關於記憶幹細胞樣 T 細胞的製造方法，可藉由上述得到 CAR-T 細胞的方法製作。本態樣之 CAR-T 細胞可使用於對疾病為特異性之過繼 T 細胞療法，能作為對於 CAR 中的抗原成分域之配體而作用的細胞表面標誌之例，係包含與癌症、病毒性、細菌性及寄生生物感染、自體免疫疾病及過敏相關者。

【0053】例如，CAR-T 細胞可為了治療選自包含各種的癌症、感染症、自體免疫疾病及過敏之群組的 1 種以上的疾病而進行移植或投予；例如，作為癌症，可列舉造血細胞惡性腫瘤及實體癌(solid cancer)；作為造血細胞惡性腫瘤，可列舉急性淋巴母細胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性嗜酸性球白血病(CEL)、骨髓發育不良症候群(myelodysplastic syndrome) (MDS)、非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma) (NHL)及多發性骨髓瘤；作為實體癌，可列舉膽管癌、膀胱癌、骨及軟組織的癌腫、腦腫瘤、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸腺癌、結腸直腸癌、硬纖維瘤、胚胎性癌(embryonal carcinoma)、子宮內膜癌、食道癌、胃癌、胃腺癌、多形性神經膠質母細胞瘤、婦科腫瘤、頭頸部鱗狀上皮細胞癌、肝癌、肺癌、惡性黑色素瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、胰管腺癌、原發性星狀細胞瘤、原發性甲狀腺癌、前列腺癌、腎癌、腎細胞癌、橫紋肌肉瘤、皮膚

癌、軟組織肉瘤、睪丸生殖細胞腫瘤、泌尿上皮癌(urothelial carcinoma)、子宮肉瘤或子宮癌。

【0054】CAR-T細胞係例如能以磷酸緩衝生理食鹽水進行擴大培養、清洗及濃縮，並使用補充有人類白蛋白(例如 5% Albumex 20，商標)之滅菌生理食鹽水而製劑化。CAR-T細胞能以當業者所決定之適當的細胞用量進行投予。於一態樣中，CAR-T細胞係投予 1.2×10^6 個～6×10^8 個以上的活細胞。所再注入或移植的T細胞之最大數量可於當業者所進行的臨床試驗之際決定。

【0055】於再另一態樣，本發明係關於細胞療法藥劑，其含有以上述製造方法所得到的記憶幹細胞樣T細胞、或具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的CAR-T細胞。例如，可作成包含記憶幹細胞樣T細胞或CAR-T細胞作為實質的有效成分之醫藥組成物而進行投予，更具體而言，可為了治療人類免疫疾病或癌症而進行投予。

[實施例]

【0056】以下，藉由實施例更具體地說明本發明，但本發明不限定於下述具體例。此外，於本說明書中，只要未特別指明，則數值範圍係作為包含其端點者而記載，濃度等係以重量為基準。

[抗體及試劑]

【0057】抗小鼠 Notch1 抗體(HMN1-12)、抗小鼠 Notch2 抗體(HMN2-35)、抗小鼠 Notch3 抗體(HMN3-133)、抗人類 CD8a 抗體(HIT8a)、抗人類 CD45RA 抗體

(HI100)、抗人類 CD45RO 抗體(UCHL1)、抗人類 CCR7 抗體(G043H7)、抗人類 CD62L 抗體(DREG-56)、抗人類 CD27 抗體(M-T271)係使用由 eBioscience 公司(San Diego，CA，USA)或 BioLegend 公司(San Diego，CA，USA)所購入者。重組人類 DLL1 蛋白可由 Adipogen 公司(San Diego，CA，USA)購入。

[統計解析]

【0058】於各圖式中，「**」表示 $p<0.01$，「*」表示 $p<0.05$，「n.s.」表示不顯著的(not significant)，誤差槓表示平均標準誤差(s.e.m.)，且圖 7、圖 8、圖 9 中係使用單因子變異數分析(one-way ANOVA)進行統計分析，圖 4、圖 6 中係使用二因子變異數分析(two-way ANOVA)進行統計分析。又，未特別指明之情形，各數據係表示來自 2 名不同的健康的供給者之至少 2 次獨立的實驗的代表。

[流動式細胞測量術解析及細胞分選(cell sorting)]

【0059】為了將細胞表面標誌的表現予以定量化，收集細胞並再懸浮於含有 0.5%的牛血清白蛋白(BSA)及 2mM 的乙二胺四乙酸(EDTA)之磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)中，在 Fc 阻斷抗體(Fc blocking antibody) (2.4G2)的存在下進行表面染色。抗體係由 BioLegend 公司、eBioscience 公司、R&D Systems 公司、Beckman Coulter 公司、BD Biosciences 公司及 Cell Signaling Technology 公司購入。各自進行 1：100 稀釋，針對各抗體進行細胞內染色。以 FACS Canto II 細胞計數器(BD Biosciences

公司製，San Jose，CA，USA)進行流動式細胞測量術，使用 FlowJo 軟體(Tree Star 公司製，Ashland，OR，USA)解析數據。使用 FACS Aria II、FACS Aria III 細胞分選儀(BD Biosciences 公司製)及 SH800 細胞分選儀(Sony 公司製，東京，日本)選出小鼠及人類 T 細胞。

<實施例 1：在 OP9-hDLL1 細胞培養上清液的存在下之記憶幹細胞樣 T 細胞的製作>

1-1. OP9-hDLL1 細胞培養上清液的製備

【0060】製備 OP9-hDLL1 細胞(由理化學研究所取得)的細胞培養上清液(OP9-hDLL1 CM)。將 1.5×10^5 個 OP9-hDLL1 細胞接種於細胞培養用 10cm 培養皿(Falcon 公司製 353003)，使其在添加有胎牛血清(20%，FBS，Sigma 公司製)、青黴素-鏈黴素溶液(1%，Thermo Fisher 公司)之 αMEM 培養基(Gibco 公司製，10mL)中增殖。細胞的增殖係在 37℃及 5 體積% CO_2 的條件下進行。於細胞達到 100%長滿時收集培養基，通過無菌膜(孔徑：0.45μm)進行過濾，得到培養上清液並儲存於 4℃。

1-2. 活化 T 細胞(活化 $CD8\alpha^+$T 細胞)的製備

【0061】[原料 T 細胞的選出步驟] 藉由比重離心法，從艾司坦氏-巴爾氏病毒(Epstein-Barr virus) (EBV)血清反應陽性(VCA-IgG[+]、EBNA[+])之健康的供給者 3 人所提供的末梢血液，製備人類末梢血液單核細胞(PBMC)。使用人類 $CD8\alpha^+$T 細胞單離套組(#130-096-495，Miltenyi Biotec 公司製)，自 PBMC 除去 $CD8\alpha^+$T 細胞以外的細胞而製備人類 $CD8\alpha^+$T 細胞。

【0062】[預備刺激步驟(Prime步驟)] 使用接合有抗CD3抗體及抗CD28抗體的微珠(CD3/CD28 Dynabeads，Veritas公司製)，在T細胞/珠粒比1：1的條件下，使所得到的人類CD8α⁺T細胞進行活化6日。

【0063】[擴大培養步驟(Expansion步驟)] 於Prime步驟的6日後，對已活化的CD8α⁺T細胞進行TCR刺激，以CD8α⁺CD45RA⁻進行螢光激發細胞分選(FACS)的選出，得到活化CD8α⁺T細胞。

1-3. 在OP9-hDLL1細胞培養上清液的存在下之記憶幹細胞樣T細胞的製備

【0064】將所得到的活化T細胞接種於盤，在添加有人類IL-7 (PeproTech公司製，10ng/mL)之OP9-hDLL1 CM (0.4mL)中培養11日，得到記憶幹細胞樣T細胞(T_{SCM}) (CM)。

【0065】作為對照而將活化T細胞與OP9-hDLL1細胞(2×10^3個，餵養細胞)及人類IL-7 (PeproTech公司製，10ng/mL)共同培養11日，得到誘導性記憶幹細胞樣T細胞(iT_{SCM}) (FC)。

1-4. 表面標誌的表現解析

【0066】藉由上述流動式細胞測量術解析，而針對以使用OP9-hDLL1細胞培養上清液之培養所得到的記憶幹細胞樣T細胞調查表面抗原標誌的表現，結果確認到表現CD45RA⁺及CCR7⁺(表1)。

<實施例2：在OP9、TSt-4細胞的細胞培養上清液的存在下之記憶幹細胞樣T細胞的製作>

2-1. OP9、TSt-4 細胞培養上清液(OP9 CM、TSt-4 CM)的製備

【0067】製備 OP9 細胞(由理化學研究所取得)及 TSt-4 細胞(由理化學研究所取得)的細胞培養上清液(OP9 CM、TSt-4 CM)。將 1.5×10^5 個 OP9 細胞或 1.5×10^5 個 TSt-4 細胞接種於細胞培養用 10cm 培養皿(Falcon 公司製 353003),使其在添加有 FBS(20%,Sigma 公司製)、青黴素-鏈黴素溶液(1%,Thermo Fisher 公司)之 αMEM 培養基(Gibco 公司製,10mL)中增殖。細胞的增殖係在 37℃及 5 體積% CO_2 的條件下進行。於細胞達到 100%長滿時收集培養基,通過無菌膜(孔徑:0.45μm)進行過濾,得到培養上清液(OP9 CM 或 TSt-4 CM)並儲存於 4℃。

2-2. 活化 T 細胞(活化 $CD8\alpha^+$T 細胞)的製備

【0068】[原料 T 細胞的選出步驟] 使用人類 $CD8\alpha^+$T 細胞單離套組(#130-096-495,Miltenyi Biotec 公司製),自 PBMC 除去 $CD8\alpha^+$T 細胞以外的細胞而製備人類 $CD8\alpha^+$T 細胞。

【0069】[Prime 步驟] 使用接合有抗 CD3 抗體及抗 CD28 抗體的微珠(CD3/28 Dynabeads,Veritas 公司製),在 T 細胞/珠粒比 1:1 的條件下,使所得到的人類 $CD8\alpha^+$T 細胞進行活化 6 日。

【0070】[Expansion 步驟] 於 Prime 步驟的 6 日後,對已活化的 $CD8\alpha^+$T 細胞進行 TCR 刺激,以 $CD8\alpha^+CD45RA^-$ 進行 FACS 的選出,得到活化 $CD8\alpha^+$T 細

胞。

2-3. 在 OP9 CM、TSt-4 CM 的存在下之記憶幹細胞樣 T 細胞的製備

【0071】將所得到的活化 T 細胞接種於盤，在添加有人類 IL-7 (PeproTech 公司製，10ng/mL)之 OP9 CM (0.4mL)或者 TSt-4 CM (0.4mL)中培養 11 日，得到記憶幹細胞樣 T 細胞。

2-4. 表面標誌的表現解析

【0072】藉由上述流動式細胞測量術解析，而針對以使用基質細胞的細胞培養上清液(OP9 CM 或者 TSt-4 CM)之培養所得到的記憶幹細胞樣 T 細胞調查表面抗原標誌的表現，結果皆確認到表現 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$(表 1)。

<實施例 3：利用 OP9-hDLL1 細胞培養上清液/Notch 訊息的活化(NICD 強制表現)之記憶幹細胞樣 T 細胞的製作>

3-1. 已強制表現 NICD 之活化 T 細胞(活化的 NICD 強制表現的 $CD8\alpha^+$T 細胞)的製備

【0073】依照圖 1 所示之用以在活化 T 細胞中使 Notch 胞內域(NICD，序列識別號 1)過度表現的實驗設計流程圖，製作圖 2 所示之過度表現 NICD 的反轉錄病毒載體(pMEI-5 DNA，Takara Bio 公司製)。使用所製作的反轉錄病毒載體，而製作活化的 NICD 強制表現的 T 細胞。

【0074】具體而言，藉由與實施例 1 所記載之 Prime 步驟同樣的方法，使人類 $CD8\alpha^+$T 細胞活化。接著，於

活化的24小時後，進行使用NICD的反轉錄病毒強制表現。於T細胞活化的6日後，將NICD強制表現的T細胞作為Venus⁺細胞而選出，使用CD3/28微珠使其再活化。

【0075】藉由與實施例1所記載之Expansion步驟同樣的方法，以CD8α⁺CD45RA⁻進行FACS的選出，得到活化的NICD強制表現的CD8α⁺T細胞。

3-2. 在OP9-hDLL1細胞培養上清液的存在下之培養

【0076】從所得到的活化的NICD強制表現的CD8α⁺T細胞，藉由與實施例1同樣的方法，在OP9-hDLL1 CM中進行培養，得到NICD強制表現的記憶幹細胞樣T細胞。

【0077】作為對照而以相同的條件培養將空載體導入所製作的活化CD8α⁺T細胞，製作記憶幹細胞樣T細胞。

3-3. 表面標誌的表現解析

【0078】針對所得到的NICD強制表現的記憶幹細胞樣T細胞(NICD)及將空載體導入所得的記憶幹細胞樣T細胞(Empty)，調查對於對與實施例1相同的標誌為特異性的抗體之反應性。並且，作為陽性對照，亦針對藉由將導入有NICD或空載體的活化T細胞與OP9-hDLL1細胞共同培養所得到的iT_{SCM}細胞進行表現解析。

【0079】將結果示於圖3及表1，然確認到藉由組合利用NICD的強制表現之Notch訊息活化與在OP9-hDLL1細胞培養上清液的存在下之培養，而和與OP9-

hDLL1 細胞進行共同培養的情形(FC)同樣地，表現 CD45RA$^+$及 CCR7$^+$作為表面抗原標誌(CM)。

<實施例 4：利用 OP9-hDLL1 細胞培養上清液/Notch 訊息活化(FOXM1 強制表現)之記憶幹細胞樣 T 細胞的製作>

4-1. 已強制表現 FOXM1 之活化 T 細胞(活化的 FOXM1ΔN 強制表現的 CD8α$^+$T 細胞)的製備

【0080】使用圖 4 所示之過度表現 FOXM1ΔN(序列識別號 2)的反轉錄病毒載體來代替過度表現 NICD 的反轉錄病毒載體，藉由與實施例 3 之活化的 NICD 強制表現的 CD8α$^+$T 細胞的製備方法同樣的方法，而製備於 T 細胞強制表現 N 末端缺損 FOXM1 之活化的 FOXM1ΔN 強制表現的 CD8α$^+$T 細胞。

4-2. 在 OP9-hDLL1 細胞培養上清液的存在下之培養

【0081】從所得到的活化的 FOXM1ΔN 強制表現的 CD8α$^+$T 細胞，藉由與實施例 1 同樣的方法，在 OP9-hDLL1 CM 中進行培養，得到記憶幹細胞樣 FOXM1ΔN 強制表現的 T 細胞。與實施例 3 同樣地，作為對照而將空載體導入而製作記憶幹細胞樣 T 細胞。

4-3. 表面標誌的表現解析

【0082】針對所得到的 FOXM1ΔN 強制表現的記憶幹細胞樣 T 細胞(FOXM1ΔN)及記憶幹細胞樣 T 細胞(Empty)，調查對於對與實施例 1 相同的標誌、及對早期 T 細胞標誌的 CD27 為特異性的抗體之反應性。並且，作為陽性對照，亦針對藉由將導入有 FOXM1ΔN 或空載體的活化 T 細胞與 OP9-hDLL1 細胞共同培養所得到的

iT_{SCM} 細胞(FOXM1ΔN、Empty)進行表現解析(表 1 及圖 5、圖 6)。又，針對此等細胞進行 FOXM1 的表現解析(圖 7)。

【0083】再者，進行在下述情形下的 CD45RA 及 CCR7 的表現解析：於將導入有 FOXM1ΔN 或空載體的活化 T 細胞與 OP9-hDLL1 細胞共同培養之際，進行添加有 FOXM1 抑制劑的硫鏈絲菌肽(Thiostrepton)時之處理的情形(圖 8、圖 9)。

【0084】從圖 8、9 及表 1，可認定藉由組合利用 FOXM1 的強制表現之 Notch 訊息活化與在 OP9-hDLL1 細胞培養上清液的存在下之培養，而和進行共同培養的情形(FC)同樣地表現 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$，進一步亦可確認到 FOXM1 強制表現的細胞係高度地表現早期 T 細胞標誌的 CD27 (CM)。

【0085】從圖 7 亦確認到藉由將 FOXM1 導入至 T 細胞，而 FOXM1 的表現量相較於僅使用已表現 Notch 配體的基質細胞(OP9-hDLL1 細胞)的培養上清液的情形係顯著增加。

【0086】又，從圖 8、9 的結果，可確認到藉由抑制共同培養系統中 FOXM1 的作用而抑制 $CD45RA^+CCR7^+$的誘導，且即使為利用培養上清液的培養系統亦藉由 FOXM1 的誘導而抑制 $CD45RA^+CCR7^+$的誘導，得到暗示 FOXM1 為 Notch 傳訊中的下游基因、FOXM1 係誘導 $CD45RA^+CCR7^+$的結果。

<記憶幹細胞樣 T 細胞的表面標誌的表現解析結果>

【0087】針對實施例 1～4 所製作之組合 Notch 訊息活化與在 OP9-hDLL1 細胞培養上清液的存在下之培養所製作的記憶幹細胞樣 T 細胞，進行表面標誌的表現解析，將結果彙整而示於表 1。

【0088】[表 1]

表 1. T 細胞之各種表面標誌的表現

實施例	手法	CD45RA	CCR7
1	OP9-hDLL1 細胞培養上清液(CM)	+	+
	與 OP9-hDLL1 細胞共同培養(FC)	+	+
2	OP9 細胞的細胞培養上清液(CM)	+	+
	TSt-4 細胞的細胞培養上清液(CM)	+	+
3	OP9-hDLL1 細胞培養上清液、NICD 強制表現(NICD in CM)	+	+
	OP9-hDLL1 細胞培養上清液、空載體(Empty in CM)	+	+
	與 OP9-hDLL1 細胞共同培養、NICD 強制表現(NICD on FC)	+	+
	與 OP9-hDLL1 細胞共同培養、空載體(Empty on FC)	+	+
4	OP9-hDLL1 細胞培養上清液、FOXM1ΔN 強制表現(NICD in CM)	+	+
	OP9-hDLL1 細胞培養上清液、空載體(Empty in CM)	+	+
	與 OP9-hDLL1 細胞共同培養、FOXM1ΔN 強制表現(NICD on FC)	+	+
	與 OP9-hDLL1 細胞共同培養、空載體(Empty on FC)	+	+

【0089】可確認到藉由將在基質細胞培養上清液的存在下之培養步驟、與利用使用已強制表現 NICD 或 FOXM1ΔN 的活化 T 細胞之 Notch 訊息活化組合，而可得到表現 $CD45RA^+$且 $CCR7^+$的 T 細胞。

【0090】又，從圖 3 及圖 5、6 的結果，亦可認定相較於將共同培養與 Notch 訊息活化組合的情形，將培養上清液與 Notch 訊息活化組合的情形所得到的 $CD45RA^+CCR7^+$細胞的細胞數係大幅增加。亦即，暗示藉由於本發明的製造方法中採用 Notch 訊息的活化，而相較於共同培養系統，可更有效率地製作記憶幹細胞樣 T 細胞。

<實施例 5：利用 OP9-hDLL1 細胞培養上清液/Notch 訊息活化(重組 DLL1)之記憶幹細胞樣 T 細胞的製作方法>

5-1. 活化的抗 CD19 CAR-T 細胞的製備

【0091】使用包含抗 CD19 scFv(源自 FMC63)、人類 CD8α 鉸鏈域(hinge domain)及跨膜域、以及人類 4-1BB-CD3z 細胞內訊息模體之過度表現抗 CD19 CAR 的反轉錄病毒載體，藉由與實施例 3 之活化的 NICD 強制表現的 $CD8\alpha^+$T 細胞的製備方法同樣的方法，而製備抗 CD19 CAR 強制表現的 $CD8\alpha^+$T 細胞。具體而言，藉由與實施例 1 所記載之預備刺激步驟(Prime 步驟)同樣的方法，使人類 $CD8\alpha^+$T 細胞活化。接著，於活化的 24 小時後，進行使用反轉錄病毒的抗 CD19 CAR 強制表現。於 T 細胞活化的 6 日後，將抗 CD19 CAR 強制表現的 T 細胞作為 $Venus^+$細胞而選出，使用經 X 射線照射的人類 CD19 強制表現的白血病細胞(K562-hCD19)而使抗 CD19 CAR-T 細胞再活化。亦即，將含有抗 CD19 CAR-T 細胞與 K562-hCD19 細胞的細胞懸浮液(抗 CD19 CAR-T 細胞：2.5×10^5 個/mL、K562-hCD19 細胞：0.625×10^5 個/mL)接種於 U 底 96 孔盤(每 1 孔 200μL)。培養 4 日後，進行同樣的活化作業，進一步培養 4 日。以 $CD8\alpha^+Venus^+CD45RA^-$選出抗 CD19 CAR 強制表現的 $CD8\alpha^+$T 細胞，得到活化的抗 CD19 CAR 強制表現的 $CD8\alpha^+$T 細胞。

5-2. hDLL1-Fc 蛋白質的製備

【0092】藉由將自人類 cDNA 選殖之人類 DLL1 的胞

外區域以 PCR 增幅，並進行次選殖(subcloning)至 pcDNA3-hIgG1-Fc 載體，而製作 pcDNA3-hDLL1-hIgG1-Fc 載體。將 Expi293F 細胞(Thermo Fisher Scientific)接種於 0.1%明膠塗布的培養皿(10^7 個/26mL/15cm 培養皿(Falcon，353025))。24 小時後，使用 PEI MAX (Polysciences，24765-1)，將 pcDNA3-hDLL1-hIgG1-Fc 載體轉染至 Expi293F 細胞。轉染起 16 小時後，以杜爾貝寇改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(DMEM，Nacalai Tesque，0845964)清洗 1 次，更換成所製備的無血清培養基(26mL)。作為此無血清培養基，係使用包含下述之 DMEM/F12 (Nacalai Tesque，11581-15)：牛血清白蛋白(BSA，Nacalai Tesque，01863-48，0.5%)、青黴素-鏈黴素(Nacalai Tesque，26253-84，1%)、HEPES (Nacalai Tesque，17557-94，1mM)、丙酮酸鈉(Nacalai Tesque，06977-34，1mM)、MEM 非必須胺基酸溶液(Nacalai Tesque，06344-56，100 倍稀釋)、L-麩醯胺酸(Nacalai Tesque，16948-04，2mM)、ITS-X (Gibco，51500-056，100 倍稀釋)、脂質濃縮物(化學成分確定脂質濃縮物(Chemically defined Lipid Concentrate)，Gibco，11905-031，1000 倍稀釋)。培養基更換起 72 小時後，回收培養上清液，以無菌膜(孔徑：0.22μm)過濾，保存於 4℃。

5-3. 重組 DLL1 盤的製作

【0093】使經磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)稀釋的蛋白質 A (protein A)(Sigma-Aldrich，P6031，10μg/mL)與纖

網蛋白(fibronectin)(FUJIFILM Wako Pure Chemical，063-05591，5μg/mL)在4℃、O/N下吸附於無處理12孔盤(Falcon，351143，800μL/孔)。將孔以PBS清洗2次，使用阻斷緩衝液(blocking buffer) (HBSS/2% BSA)於25℃進行45分鐘阻斷。藉由以PBS清洗2次而除去阻斷緩衝液後，對蛋白質A/纖網蛋白塗布的孔添加hDLL1-Fc (4mL)，在37℃、5體積% CO_2的存在下培養2小時。於細胞接種之前，將孔以PBS清洗2次。

5-4. 活化的抗CD19 CAR-T細胞的培養

【0094】將所製備的活化的抗CD19 CAR強制表現的CD8α$^+$T細胞，以1×10^5個/孔的密度接種於所製作的重組DLL1盤，在添加有人類IL-7 (Peprotech，200-07，10ng/mL)之OP9-hDLL1細胞培養上清液(CM，1mL)的存在下培養11日，得到記憶幹細胞樣抗CD19 CAR-T細胞。

5-5. 表面標誌的表現解析

【0095】針對所得到的記憶幹細胞樣抗CD19 CAR-T細胞，與實施例1同樣地，調查對於對標誌為特異性的抗體之反應性。亦同時解析作為陰性對照之未使用重組DLL1及培養上清液而培養的細胞、作為陽性對照之與餵養細胞(FC)所共同培養的細胞。將結果示於圖10。

【0096】從圖10確認到藉由組合利用重組DLL1之Notch訊息活化與在OP9-hDLL1細胞培養上清液的存在下之培養，而和與OP9-hDLL1細胞進行共同培養的情形同樣地，可得到表現CD45RA及CCR7作為表面抗原標

誌的 T 細胞。

<實施例 6：基質細胞所產生的活性因子的解析>

6-1. 利用即時 PCR (real-time PCR)之 OP9-hDLL1 細胞的基因表現解析

【0097】從 10^5 個 OP9-hDLL1 細胞，使用 ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega，Z6012)而純化總 RNA (total RNA)。從所得到的 OP9-hDLL1 之總 RNA，使用 PCT 套組(高容量 cDNA 反轉錄套組(High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit)，Applied Biosystems，4368813)進行即時 PCR，得到單股 cDNA。將所得到的 OP9-hDLL1 之 cDNA 進行連續稀釋(serial dilution) (1：1、1：16、1：256)，將其作為模版，使用 SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad，172-5203)，進行利用嵌入劑(intercalator)法之即時 PCR (CFX Connect (BioRad))，將各目的基因(HPRT、CXCL12、SCF、IL-7、FLT3L)予以增幅。為了將所得到的目的基因之 PCR 增幅產物予以可視化，而加入色素(追蹤染劑(Loading dye)，TOYOBO，RE-DYE)，施加於 1%瓊脂糖凝膠，進行電泳。將結果示於圖 11。

【0098】

(所使用的引子)

・小鼠 HPRT

正向引子：CTTTGCTGACCTGCTGGATT (序列識別號 4)

反向引子：TATGTCCCCCGTTGACTGAT (序列識別

號 5)

・小鼠 CXCL12

正向引子：GCCAACGTCAAGCATCTGAAA (序列識別號 6)

反向引子：TGTCTGTTGTTGTTCTTCAGCC (序列識別號 7)

・小鼠 SCF

正向引子：GCGGGAATCCTGTGACTGAT (序列識別號 8)

反向引子：CATCCCGGCGACATAGTTGA (序列識別號 9)

・小鼠 IL-7

正向引子：ACATCATCTGAGTGCCACATT (序列識別號 10)

反向引子：GGGCAATTACTATCAGTTCCTGT (序列識別號 11)

・小鼠 FLT3L

正向引子：TGTTACTTCAGCCACAGTCCC (序列識別號 12)

反向引子：GAAGATTGACGGCCACAGTGA (序列識別號 13)

6-2. 基質細胞培養上清液中 CXCL12 的測定

【0099】製備 OP9 細胞、OP9-hDLL1 細胞及 TSt-4 細胞的培養上清液(OP9 CM、OP9-hDLL1 CM、TSt-4 CM)。將 1.5×10^5 個之各細胞接種於細胞培養用培養皿

(10cm，Falcon，353003)，使其在添加有胎牛血清(FBS，20%，Sigma-Aldrich，172012)、青黴素-鏈黴素(1%，Nacalai Tesque，26253-84)之 α-MEM 培養基(Gibco，11900-024，1.5mL)中增殖。細胞的增殖係在37℃及 5 體積% CO_2的條件下進行。於細胞達到 100%長滿時回收培養基(OP9 CM、OP9-hDLL1 CM、TSt-4 CM)，以無菌膜(孔徑：0.45μm)過濾並保存於 4℃。將所得到的細胞培養上清液中所包含的 CXCL12，藉由酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)進行定量解析(invitrogen，EMCXCL12)。將結果示於圖 12。

【0100】從圖 11 的結果，暗示在所調查的候補活性因子當中，CXCL12 係特別高度地表現。從圖 12 確認到實際上在 OP9-hDLL1 細胞培養上清液中有 CXCL12 存在。又，確認到在 OP9 細胞及 TSt4 細胞的培養上清液中亦有 CXCL12 存在。

<實施例 7：利用 CXCL12/IGF-I/Notch 訊息活化之記憶幹細胞樣抗 CD19 CAR-T 細胞的製作方法>

7-1. 活化 T 細胞的培養

【0101】將所製備的活化的抗 CD19 CAR 強制表現的 $CD8\alpha^+$T 細胞，以 1×10^5 個/孔的密度接種於與實施例 5 同樣地製作的重組 DLL1 盤(hDLL1-Fc/FN)或者無處理的盤。以圖 13 所示之組合，在包含人類 IL-7(Peprotech，200-07，10ng/mL)、胎牛血清(FBS，20%，Sigma-Aldrich，172012)及青黴素-鏈黴素(1%，Nacalai Tesque，26253-84)之 α-MEM 培養基(Gibco，

11900-24，1mL)中添加人類 CXCL12 (Peprotech，300-28A，100ng/mL)及人類 IGF-I (Peprotech，100-11，50ng/mL)並培養 11 日，藉此得到記憶幹細胞樣抗 CD19 CAR-T 細胞。

7-2. 表面標誌的表現解析

【0102】針對所得到的記憶幹細胞樣抗 CD19 CAR-T 細胞，與實施例 1 同樣地，調查對於對標誌為特異性的抗體之反應性。將結果示於圖 13。

【0103】從圖 13 確認到藉由即使使用添加 CXCL12 的培養基來代替基質細胞的培養上清液，亦可誘導記憶幹細胞樣 T 細胞。又，確認到該記憶幹細胞樣 T 細胞的誘導係藉由 IGF-I 添加及重組 DLL1 處理而被增強。

<實施例 8：藉由 CXCL12/IGF-I/Notch 訊息活化所製作之記憶幹細胞樣抗 CD19 CAR-T 細胞的抗腫瘤效果>

8-1. 使用人類白血病模式小鼠之由抗 CD19 CAR-T 細胞所致之抗腫瘤效果的評價

【0104】將 NALM6 細胞以成為 5×10^6 個/mL 的方式懸浮於 PBS，對 NSG 小鼠(NOD-SCID IL-2Rγ^{null} 小鼠)進行尾靜脈注射 200μL 的細胞懸浮液。NALM6 細胞移植起 7 日後，將與實施例 7 同樣地製備的記憶幹細胞樣抗 CD19 CAR-T 細胞(FF CAR-iT_{SCM})、或者未誘導成記憶幹細胞樣抗 CD19 CAR-T 細胞(CAR-T)，以成為 2.5×10^6 個/mL 的方式懸浮於 PBS，並對 NSG 小鼠進行尾靜脈注射 200μL 的細胞懸浮液。自各抗 CD19 CAR-T 細胞移殖起 14 日後的 NSG 小鼠採集 40μL 的血液，得到經以緩

衝液(ACK Lysis buffer)進行溶血處理的細胞懸浮液。

【0105】藉由流動式細胞測量術解析，針對所得到的細胞懸浮液調查表面抗原標誌的表現，計量 $FVD^{-}mCD45^{-}hCD19^{+}$的 NALM6 癌細胞數。亦設定 CAR-T 細胞非投予組、及藉由與餵養細胞的共同培養所製作的記憶幹細胞樣抗 CD19 CAR-T 細胞(FC CAR-iT_{SCM})投予組，一併進行評價。將結果示於圖 14。

【0106】

(所使用的抗體及試劑)

BV421 抗小鼠 CD45 抗體(BV421 anti-mouse CD45 Antibody) (BioLegend，103133) (Clone: 30-F11)

PE抗人類 CD19抗體(PE anti-human CD19 Antibody) (BioLegend，302208) (Clone: 4G7)

可固定的生存力染劑(Fixable Viability Dye) eFluor™ 780 (eBiosciences，65-0865-18)

【0107】從圖 14確認到藉由 CXCL12/IGF-I/Notch訊息活化所製作之記憶幹細胞樣抗 CD19 CAR-T 細胞係顯示強的抗腫瘤活性。

[產業上利用之可能性]

【0108】本發明因為可解決於 T 細胞輸入療法等中成為問題之 T 細胞的衰竭並提升 T 細胞的活性，而可期待對於過繼 T 細胞療法、CAR-T 細胞療法的應用。

【符號說明】

無。

SEQUENCE LISTING

<110> 第一三共股份有限公司(Daiichi Sankyo Company, Limited)
學校法人慶應義塾(Keio University)

<120> 具有 CD45RA$^+$及 CCR7$^+$之細胞表面標誌的 T 細胞之製造方法

<130> FA1511-20195

<150> JP2019-195206
<151> 2019-10-28

<160> 13

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 2412
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1
atggtgctgc tgtcacgcaa aaggaggaga caacacggac agctgtggtt tcccgaaggt 60

tttaaggtga gtgaagcctc taagaagaaa cggcgcgagc cactgggcga agattccgtt 120

ggacttaagc ctttgaagaa tgcctcagat ggagcgctta tggacgacaa ccagaacgag 180

tggggagacg aggaccttga gacgaagaag ttccgattcg aagaaccggt ggtcctgcca 240

gacctcgatg accagacaga ccaccgtcag tggacacagc agcacctgga cgcagctgat 300

ctccggatgt cagccatggc ccccactcca ccccagggcg aagtggatgc cgattgcatg 360

gatgtcaatg tgaggggtcc cgatggtttc acacctctga tgattgcctc ttgcagtgga 420

gggggcctgg agacaggcaa ttccgaggag gaggaagatg caccggccgt catctcggat 480

ttcatctacc aaggggcatc cctccacaat cagaccgata gaacaggcga gactgcgctg 540

cacctggcgg ctcggtattc ccgctcagat gccgccaaaa ggctattaga agcaagcgct 600

gacgccaata tccaagacaa catgggcaga actcccctgc atgccgcggt gtctgccgat 660

gcgcagggtg tgttccagat tctgattagg aatagagcga ctgatctcga tgcaagaatg 720

cacgatggta ctacccctct catcctggca gccagacttg ccgttgaagg gatgttggag 780

gacttaatca actcacatgc ggacgtgaat gctgtggacg atctcggcaa aagtgcactc 840

cattgggccg ccgctgtgaa caacgtcgat gccgcagtgg tgctcttgaa gaacggagcc 900

aataaggaca tgcagaataa tcgggaggag actccattgt ttctggcagc tagggagggg 960

tcctatgaga cagccaaagt cctgcttgat cacttcgcta atcgagacat cacagaccac 1020

atggatcgcc tgccgagaga catagctcaa gagcgaatgc accacgacat tgtacggttg 1080

ctggacgagt acaacttggt gcgctctcct cagttgcatg gcgcacctct gggcggtact 1140

ccaaccctga gccccccact gtgtagcccc aatggctacc tgggcagcct taagccaggc 1200

gtccagggca aaaaggtcag gaagccctcc agcaaaggcc tggcatgtgg gagtaaggag 1260

gccaaagatc tcaaagcccg acggaaaaaa tcccaggacg gcaaaggatg cctcttggac 1320

tcctcaggga tgctgagccc cgttgactcc ctcgagtccc ctcatgggta ccttagcgac 1380

gttgcttctc cacccctatt gccttcaccc tttcagcaaa gcccctctgt tcctctgaat 1440

cacctacccg gcatgccaga tacccatctg ggaataggcc acctcaatgt ggctgccaag 1500

ccagaaatgg ctgctctggg agggggagga cgcttggcct ttgaaaccgg acctcctcgt 1560

ctaagtcatc ttcccgtggc atctggcaca agtacggtgt taggatcttc gtcgggcgga 1620

gcacttaact tcaccgttgg gggcagcacc agcttgaatg ggcaatgtga gtggctgtcc 1680

agactccagt ctggtatggt acccaaccag tataaccctt tacggggtag tgttgctcct 1740

ggccccctgt ctacgcaggc cccaagtctc cagcacggaa tggtaggtcc tctgcattct 1800

agcttagctg cctccgctct cagccagatg atgagctatc aggggctgcc ttcaaccagg 1860

ctcgctaccc aaccccatct cgtccaaacc cagcaagtgc aaccacagaa cttgcagatg 1920

cagcagcaaa accttcagcc agccaacatt cagcagcagc agagcctgca gcctccgcct 1980

ccaccaccgc aaccacacct gggggtgtct tcagccgcgt ccggacatct ggggcgcagt 2040

ttcctaagcg gggaacctag tcaggctgac gtccaaccac ttggtccgag ctcgttagcc 2100

gtgcacacca tactgcctca ggaatctccc gctctaccta ctagcctgcc gtcctccctg 2160

gtacccccg tgacagcagc ccaattctta acgccaccgt cccagcattc ctactcctca 2220

cctgtggaca acacccctag tcatcagctg caggttcccg aacacccgtt tcttacaccc 2280

tcacccgaat ctcctgatca gtggagcagc tcctcgccac actcaaacgt aagtgactgg 2340

tctgaggggg tcagcagtcc accaacctct atgcagtcac agatcgctcg tattcccgag 2400

gcatttaagt ga 2412

<210> 2
<211> 1560
<212> DNA
<213> 智人

<400> 2
atgaactctg tgtctgagcg gccaccctac tcttacatgg ccatgataca attcgccatc 60

aacagcactg agaggaagcg catgactttg aaagacatct atacgtggat tgaggaccac 120

tttccctact ttaagcacat tgccaagcca ggctggaaga actccatccg ccacaacctt 180

tccctgcacg acatgtttgt ccgggagacg tctgccaatg gcaaggtctc cttctggacc 240

attcacccca gtgccaaccg ctacttgaca ttggaccagg tgtttaagca gcagaaacga 300

ccgaatccag agctccgccg gaacatgacc atcaaaaccg aactcccccct gggcgcacgg 360

cggaagatga agccactgct accacgggtc agctcatacc tggtacctat ccagttcccg 420

gtgaaccagt cactggtgtt gcagccctcg gtgaaggtgc cattgccccct ggcggcttcc 480

ctcatgagct cagagcttgc ccgccatagc aagcgagtcc gcattgcccc caaggtgctg 540

ctagctgagg aggggatagc tcctctttct tctgcaggac cagggaaaga ggagaaactc 600

ctgtttggag aagggttttc tcctttgctt ccagttcaga ctatcaagga ggaagaaatc 660

cagcctgggg aggaaatgcc acacttagcg agacccatca aagtggagag ccctcccttg 720

gaagagtggc cctccccggc cccatctttc aaagaggaat catctcactc ctgggaggat 780

tcgtcccaat ctcccacccc aagacccaag aagtcctaca gtgggcttag gtccccaacc 840

cggtgtgtct cggaaatgct tgtgattcaa cacagggaga ggagggagag gagccggtct 900

cggaggaaac agcatctact gcctccctgt gtggatgagc cggagctgct cttctcagag 960

gggcccagta cttcccgctg ggccgcagag ctcccgttcc cagcagactc ctctgaccct 1020

gcctcccagc tcagctactc ccaggaagtg ggaggacctt ttaagacacc cattaaggaa 1080

acgctgccca tctcctccac cccgagcaaa tctgtcctcc ccagaacccc tgaatcctgg 1140

aggctcacgc ccccagccaa agtaggggga ctggatttca gcccagtaca aacctcccag 1200

ggtgcctctg acccccttgcc tgacccccctg gggctgatgg atctcagcac cactcccttg 1260

caaagtgctc ccccccttga atcaccgcaa aggctcctca gttcagaacc cttagacctc 1320

atctccgtcc cctttggcaa ctcttctccc tcagatatag acgtccccaa gccaggctcc 1380

ccggagccac aggtttctgg ccttgcagcc aatcgttctc tgacagaagg cctggtcctg 1440

gacacaatga atgacagcct cagcaagatc ctgctggaca tcagctttcc tggcctggac 1500

gaggacccac tgggccctga caacatcaac tggtcccagt ttattcctga gctacagtag 1560

<210> 3
<211> 1479
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 抗 CD19 scFv(源自 FMC63)、人類 CD8α 鉸鏈域及跨膜域、
以及人類 CD28-CD3z 細胞內訊息模體

<400> 3
atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60

atcccagaca tccagatgac acagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga 120

gtcaccatca gttgcagggc aagtcaggac attagtaaat atttaaattg gtatcagcag 180

aaaccagatg gaactgttaa actcctgatc taccatacat caagattaca ctcaggagtc 240

ccatcaaggt tcagtggcag tgggtctgga acagattatt ctctcaccat tagcaacctg 300

gagcaagaag atattgccac ttacttttgc caacagggta atacgcttcc gtacacgttc 360

ggaggggga ctaagttgga ataacaggc tccacctctg ggagtggcaa gcccggatct 420

ggcgagggaa gcaccaaggg cgaggtgaaa ctgcaggagt caggacctgg cctggtggcg 480

ccctcacaga gcctgtccgt cacatgcact gtctcagggg tctcattacc cgactatggt 540

gtaagctgga ttcgccagcc tccacgaaag ggtctggagt ggctgggagt aatatggggt 600

agtgaaacca catactataa ttcagctctc aaatccagac tgaccatcat caaggacaac 660

tccaagagcc aagttttctt aaaaatgaac agtctgcaaa ctgatgacac agccatttac 720

tactgtgcca aacattatta ctacggtggt agctatgcta tggactactg gggtcaagga 780

acctcagtca ccgtctcctc agcggccgca accacaaccc cagcacctcg cccaccaaca 840

ccagcaccaa ccatcgcatc ccagccactg tctctgcggc ccgaggcctg taggcctgca 900

gcaggaggag cagtgcacac caggggcctg gactttgcct gcgatatcta tatctgggca 960

ccactggcag gaacatgtgg cgtgctgctg ctgtccctgg tcatcaccct gtattgcagg 1020

agtaagagga gcaggctcct gcacagtgac tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg 1080

cccacccgca agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgctcc 1140

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 1200

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 1260

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 1320

gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 1380

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 1440

tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgctaa 1479

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 HPRT 的正向引子

<400> 4
ctttgctgac ctgctggatt 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 HPRT 的反向引子

<400> 5
tatgtccccc gttgactgat 20

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 CXCL12 的正向引子

<400> 6
gccaacgtca agcatctgaa a 21

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 CXCL12 的反向引子

<400> 7
tgtctgttgt tgttcttcag cc 22

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 SCF 的正向引子

<400> 8
gcgggaatcc tgtgactgat 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 SCF 的反向引子

<400> 9
catcccggcg acatagttga 20

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 IL-7 的正向引子

<400> 10
acatcatctg agtgccacat t 21

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 IL-7 的反向引子

<400> 11
gggcaattac tatcagttcc tgt 23

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 FLT3L 的正向引子

<400> 12
tgttacttca gccacagtcc c 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 FLT3L 的反向引子

<400> 13
gaagattgac ggccacagtg a 21

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種製造具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的 T 細胞之方法，其包含在(a)基質細胞的細胞培養上清液或(b) CXCL12 的存在下培養作為原料之 T 細胞的步驟。

【請求項 2】如請求項 1 之方法，其於該培養步驟之前，進一步包含將作為原料之 T 細胞予以活化的步驟。

【請求項 3】如請求項 1 或 2 之方法，其中基質細胞係選自包含 OP9 細胞、TSt-4 細胞及已於此等細胞表現 Notch 配體的細胞之群組的任 1 種以上。

【請求項 4】如請求項 1 至 3 中任一項之方法，其中基質細胞為 OP9-DLL1 細胞。

【請求項 5】如請求項 1 至 4 中任一項之方法，其於該培養步驟之前或該培養步驟中，進一步包含將 Notch 訊息予以活化。

【請求項 6】如請求項 5 之方法，其中 Notch 訊息的活化係使用選自包含 DLL4、DLL1、JAG1、JAG2 及彼等的重組體之群組的任 1 種以上的 Notch 配體來進行。

【請求項 7】如請求項 5 或 6 之方法，其中 Notch 訊息的活化係使用重組 DLL1 來進行。

【請求項 8】如請求項 5 至 7 中任一項之方法，其中 Notch 訊息的活化係使用 FOXM1 或 NICD 的強制表現來進行。

【請求項 9】如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中具有 $CD45RA^+$及 $CCR7^+$之細胞表面標誌的 T 細胞係具有

$CD45RO^-$及 $CD62L^+$之細胞表面標誌。

【請求項 10】如請求項 1 至 9 中任一項之方法，其中作為原料之 T 細胞係 CAR-T 細胞。

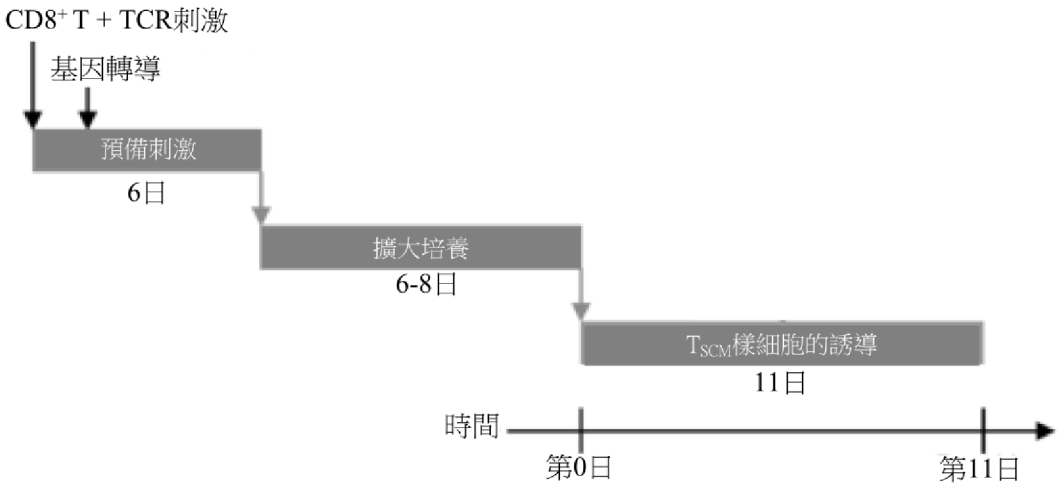
【請求項 11】如請求項 1 至 10 中任一項之方法，其於在 CXCL12 的存在下培養的步驟中添加 IGF-I。

【請求項 12】一種 T 細胞，其係藉由如請求項 1 至 11 中任一項之方法所製造。

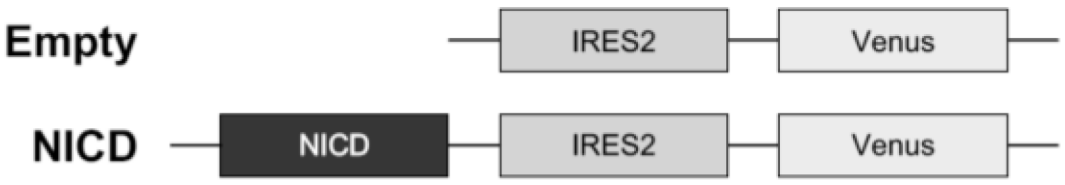
【請求項 13】一種細胞醫藥，其含有如請求項 12 之 T 細胞。

【請求項 14】如請求項 13 之細胞醫藥，其係用於選自包含癌症、感染症、自體免疫疾病及過敏之群組的 1 種以上的治療。

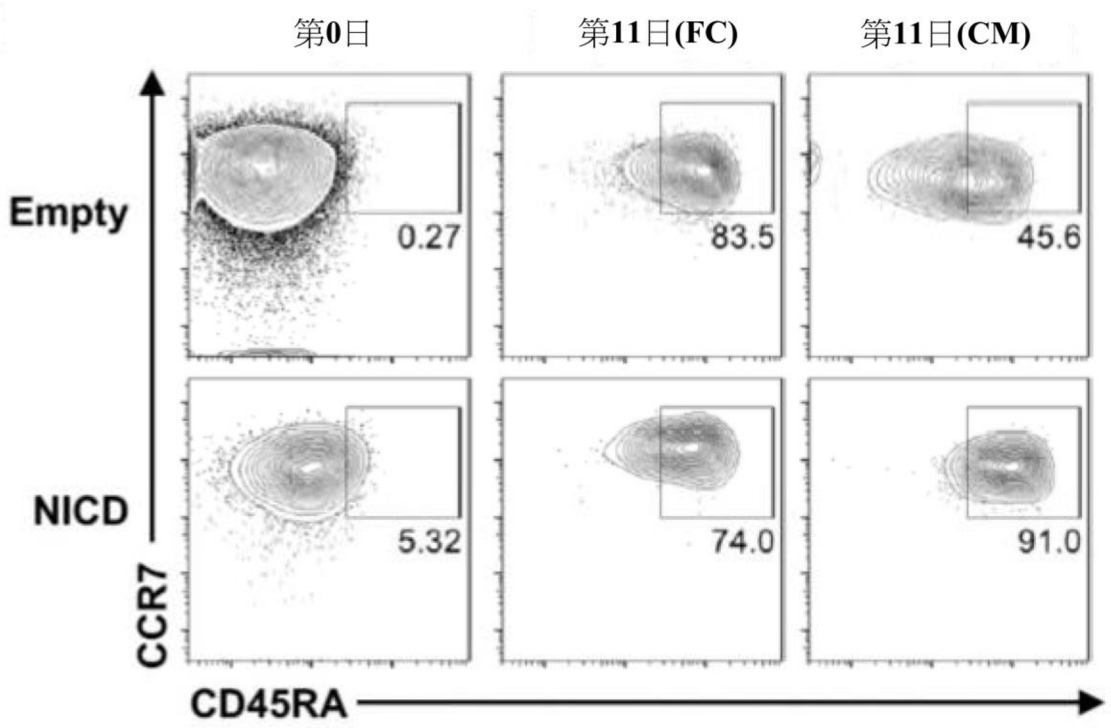
【發明圖式】


CD8+ T + TCR刺激
基因轉導
預備刺激
6日
擴大培養
6-8日
TSCM樣細胞的誘導
11日
時間
第0日
第11日

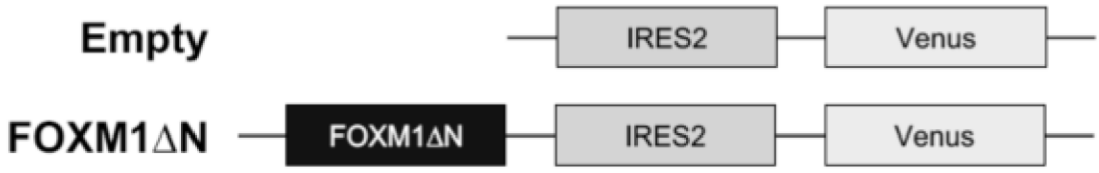
【 圖 1 】


Empty
IRES2
Venus
NICD
NICD
IRES2
Venus

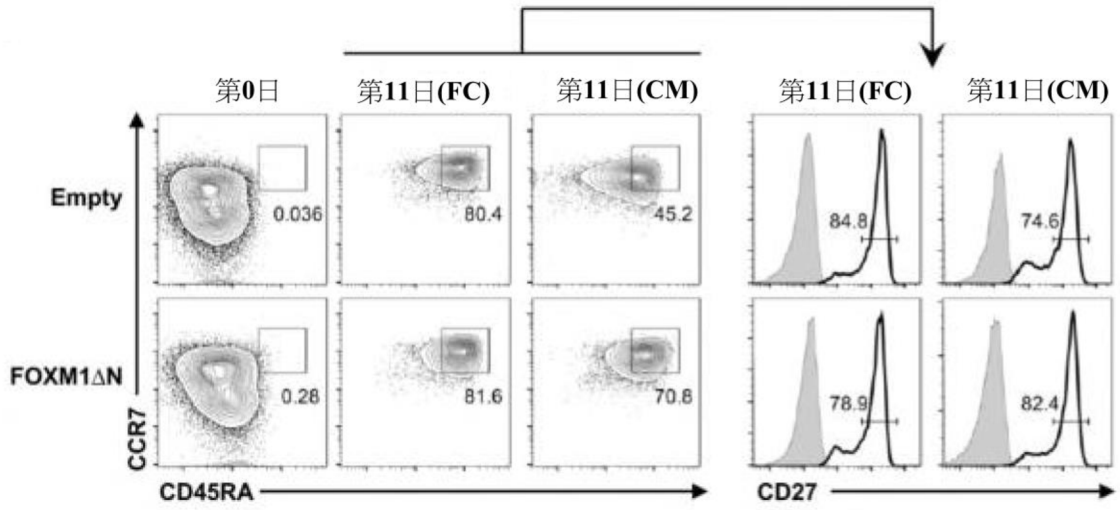
【 圖 2 】


第0日
第11日(FC)
第11日(CM)
Empty
NICD
0.27
83.5
45.6
5.32
74.0
91.0
CCR7
CD45RA

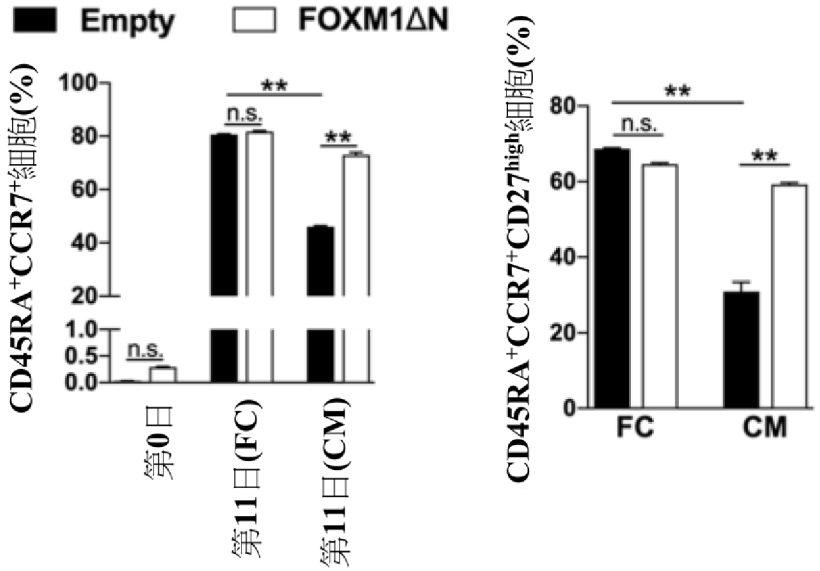
【圖 3】


Empty
IRES2
Venus
FOXM1ΔN
FOXM1ΔN
IRES2
Venus

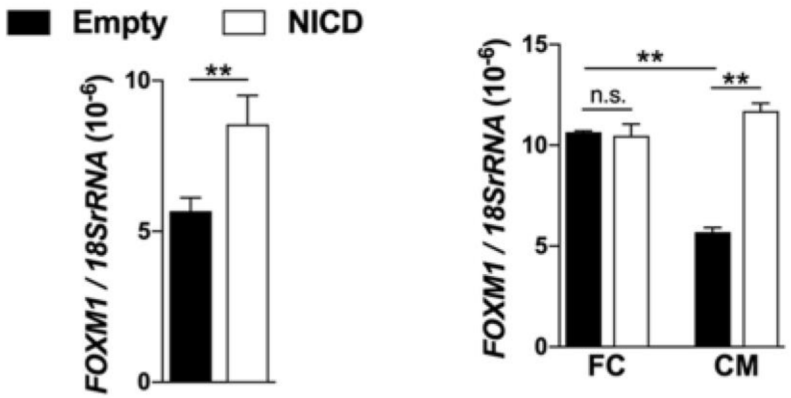
【圖 4】


第0日
第11日(FC)
第11日(CM)
第11日(FC)
第11日(CM)
Empty
FOXM1ΔN
0.036
80.4
45.2
84.8
74.6
0.28
81.6
70.8
78.9
82.4
CCR7
CD45RA
CD27

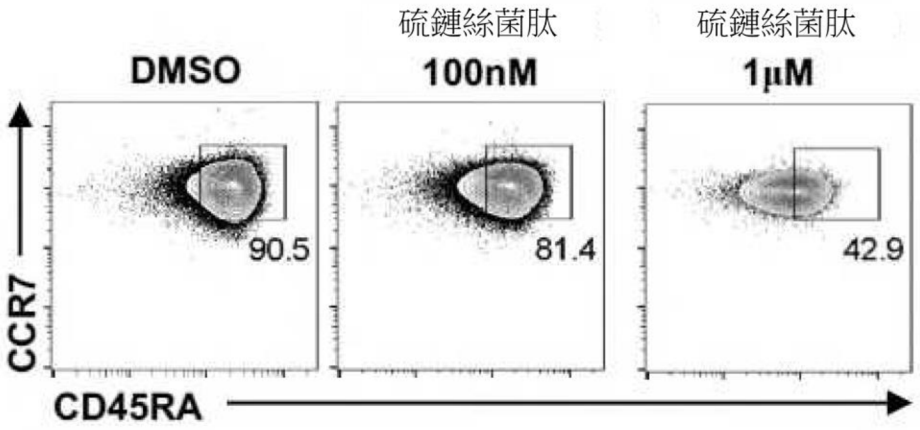
【 圖 5 】


Empty
FOXM1ΔN
CD45RA+CCR7+細胞(%)
100
80
60
40
20
1.0
0.5
0.0
n.s.
**
n.s.
**
第0日
第11日(FC)
第11日(CM)
CD45RA+CCR7+CD27high細胞(%)
80
60
40
20
0
n.s.
**
**
FC
CM

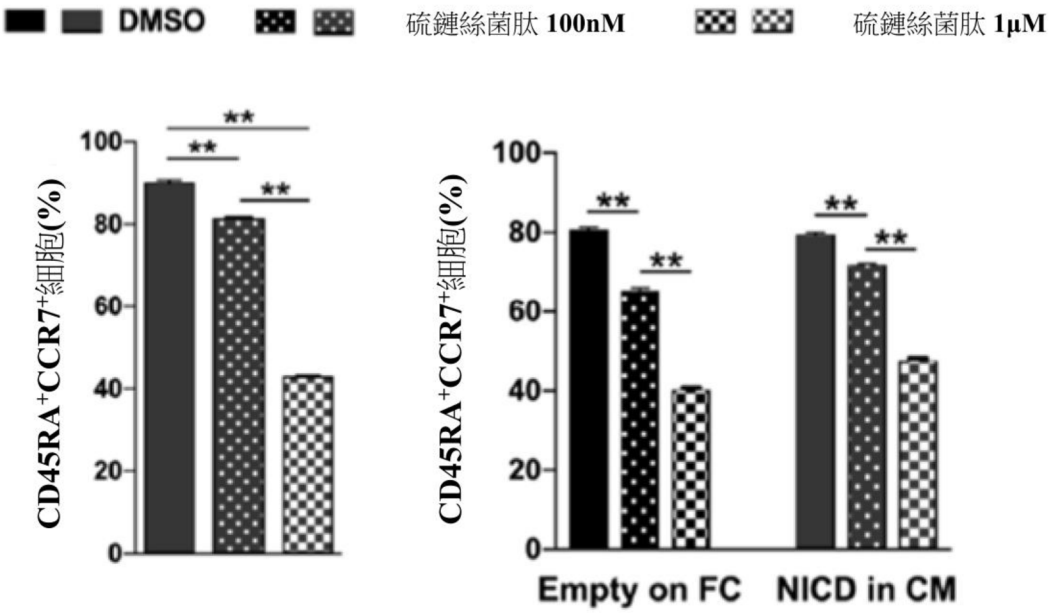
【 圖 6 】


Empty
NICD
FOXM1 / 18SrRNA (10-6)
10
5
0
**
15
n.s.
FC
CM

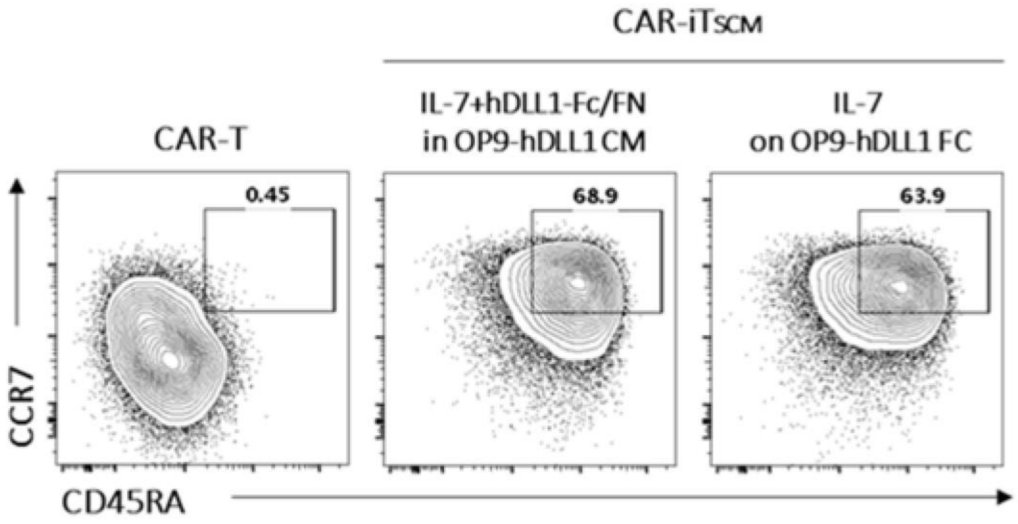
【圖 7】


硫鏈絲菌肽
100nM
硫鏈絲菌肽
1μM
DMSO
90.5
81.4
42.9
CCR7
CD45RA

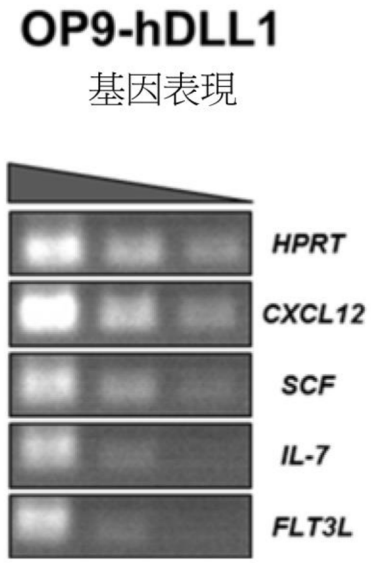
【圖 8】


DMSO
硫鏈絲菌肽 100nM
硫鏈絲菌肽 1μM
CD45RA+CCR7+細胞(%)
100
80
60
40
20
0
**
**
**
**
**
**
Empty on FC
NICD in CM

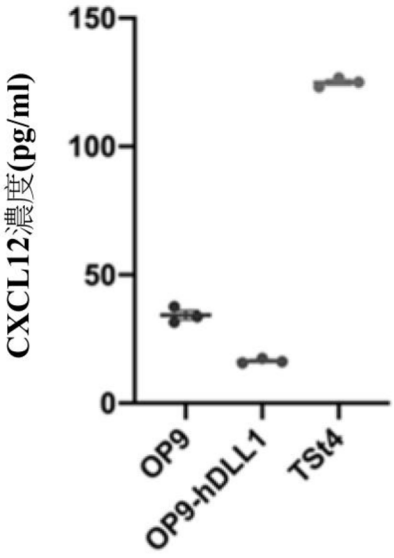
【圖 9】


CAR-iTSCM
CAR-T
IL-7+hDLL1-Fc/FN
in OP9-hDLL1 CM
IL-7
on OP9-hDLL1 FC
0.45
68.9
63.9
CCR7
CD45RA

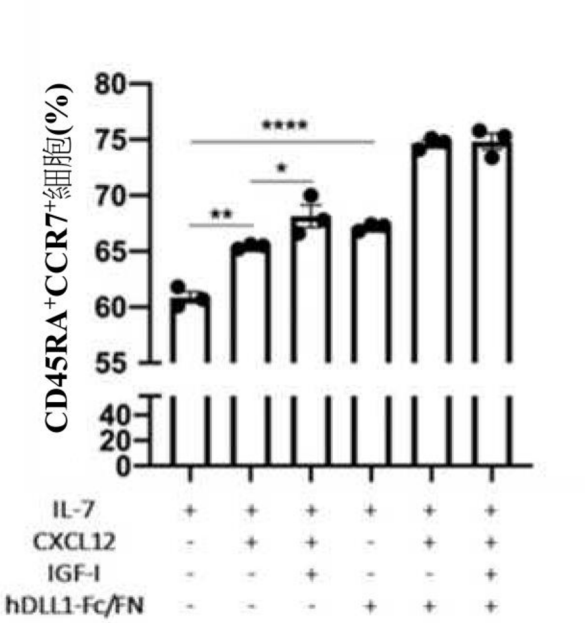
【圖 10】


OP9-hDLL1
基因表現
HPRT
CXCL12
SCF
IL-7
FLT3L

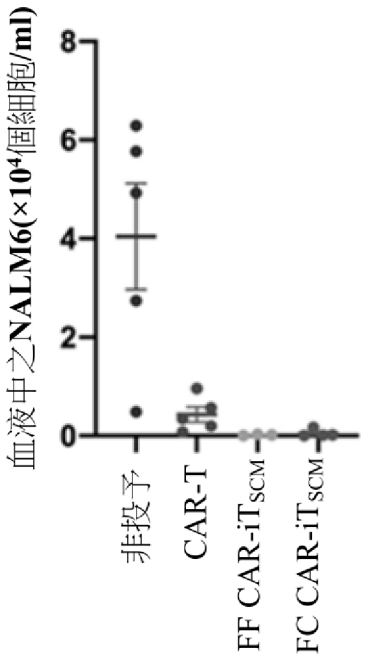
【圖 11】


CXCL12濃度(pg/ml)
150
100
50
0
OP9
OP9-hDLL1
TSt4

【圖 12】


CD45RA+CCR7+細胞(%)
80
75
70
65
60
55
40
20
0
****
*
**
IL-7 + + + + + +
CXCL12 - + + - + +
IGF-I - - + - - +
hDLL1-Fc/FN - - - + + +

【圖 13】


血液中之NALM6(×10⁴個細胞/ml)
8
6
4
2
0
非投予
CAR-T
FF CAR-iTSCM
FC CAR-iTSCM

【圖 14】