(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-507864
(P2025-507864A)
(43)公表日　令和7年3月21日(2025.3.21)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	ＺＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		
Ｃ１２Ｎ	*1/15 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15		
Ｃ１２Ｎ	*1/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全107頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-552028(P2024-552028)
(86)(22)出願日　令和5年3月2日(2023.3.2)
(85)翻訳文提出日　令和6年10月25日(2024.10.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/063587
(87)国際公開番号　WO2023/168341
(87)国際公開日　令和5年9月7日(2023.9.7)
(31)優先権主張番号　63/315,579
(32)優先日　令和4年3月2日(2022.3.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/315,581
(32)優先日　令和4年3月2日(2022.3.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/442,966
最終頁に続く

(71)出願人　506115514
ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
Ｔｈｅ Ｒｅｇｅｎｔｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４６０７－５２００，オークランド，フランクリン ストリート １１１１，１２番 フロア
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100160923
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　操作された細胞および使用方法

(57)【要約】
本開示により、インビトロT細胞分化方法によるT細胞分化に対する有害な効果を伴うことなく幹細胞または前駆細胞内への導入遺伝子の挿入をもたらす方法および組成物を提供する。これを達成するため、本発明者らは、グランザイムAなどのプロモーター領域の制御下での導入遺伝子の発現により、以下の両方をもたらす協調的発現パターンが可能となることを見出した:（1）成熟T細胞における導入遺伝子の高発現、および（2）インビトロ分化方法全体を通して、成熟T細胞集団の生成を可能にする協調的レベルの導入遺伝子の発現。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
プロモーター領域と、該プロモーター領域の転写開始部位の下流に導入遺伝子とを含む核酸であって、該プロモーター領域が表1の遺伝子のプロモーター領域を含む、核酸。
【請求項２】
該プロモーター領域がグランザイム遺伝子のプロモーター領域を含む、請求項1記載の核酸。
【請求項３】
グランザイムプロモーター領域が、グランザイムA、B、H、K、またはMの遺伝子のプロモーター領域を含む、請求項2記載の核酸。
【請求項４】
前記プロモーター領域がグランザイムA遺伝子のプロモーターを含む、請求項3記載の核酸。
【請求項５】
前記プロモーター領域が内在性プロモーター領域を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の核酸。
【請求項６】
導入遺伝子がキメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の核酸。
【請求項７】
導入遺伝子がFOXP3を含む、請求項1～6のいずれか一項記載の核酸。
【請求項８】
導入遺伝子がBCL11bを含む、請求項1～7のいずれか一項記載の核酸。
【請求項９】
ゲノムDNAを含む、請求項1～8のいずれか一項記載の核酸。
【請求項１０】
前記プロモーター領域がRAG1またはRAG2プロモーター領域を含む、請求項1～9のいずれか一項記載の核酸。
【請求項１１】
前記ゲノムDNAが、機能性のRAG1および/またはRAG2タンパク質のうちの一方または両方をコードしている遺伝子に関して不完全である、請求項10記載の核酸。
【請求項１２】
導入遺伝子が、RAG1もしくはRAG2のコード領域内に挿入されている、および/または導入遺伝子が少なくとも部分的にRAG1もしくはRAG2のコード領域と置き換えられている、請求項10または11記載の核酸。
【請求項１３】
前記プロモーター領域の転写開始部位の下流に表1の遺伝子のコード領域を含む、請求項1～12のいずれか一項記載の核酸。
【請求項１４】
導入遺伝子および表1の遺伝子の転写がどちらも表1の遺伝子のプロモーターによって調節される、請求項13記載の核酸。
【請求項１５】
導入遺伝子と表1の遺伝子とが、同じmRNAで発現される、請求項13または14記載の核酸。
【請求項１６】
自己切断ペプチド部位またはIRESを含む、請求項13～15のいずれか一項記載の核酸。
【請求項１７】
導入遺伝子が表1の遺伝子に対して3'近位にある、請求項13～16のいずれか一項記載の核酸。
【請求項１８】

導入遺伝子が表1の遺伝子に対して5'近位にある、請求項13～16のいずれか一項記載の核酸。
【請求項１９】
表1の遺伝子のコード領域および/または導入遺伝子の下流に3'UTR領域をさらに含む、請求項1～18のいずれか一項記載の核酸。
【請求項２０】
3'UTRが内在性3'UTRを含む、請求項19記載の核酸。
【請求項２１】
前記プロモーター領域、3'UTR、導入遺伝子、および/または表1の遺伝子のコード領域が、該ゲノムDNA内において表1の遺伝子の内在性遺伝子座にある、請求項1～20のいずれか一項記載の核酸。
【請求項２２】
前記ゲノムDNAが、機能性の内在性TCR-アルファ（TCR-a）タンパク質、機能性の内在性TCR-ベータ（TCR-b）タンパク質、機能性の内在性TCR-ガンマ（TCR-g）タンパク質、または機能性の内在性TCR-デルタ（TCR-d）タンパク質のうちの1つまたは複数をコードしている遺伝子に関して不完全である、請求項9～21のいずれか一項記載の核酸。
【請求項２３】
前記ゲノムDNAが、機能性CD3ガンマタンパク質、機能性CD3デルタタンパク質、機能性CD3イプシロンタンパク質、または機能性CD3ゼータタンパク質のうちの1つまたは複数をコードしている遺伝子に関して不完全である、請求項9～22のいずれか一項記載の核酸。
【請求項２４】
請求項1～22のいずれか一項記載の少なくとも1つの核酸を含む、細胞。
【請求項２５】
第1のプロモーター領域と、該プロモーター領域の転写開始部位の下流に第1の導入遺伝子とを含む、第1の核酸であって、該プロモーター領域が遺伝子:RAG1またはRAG2のプロモーター領域を含む、第1の核酸、および
第2のプロモーター領域と、該プロモーター領域の転写開始部位の下流に第2の導入遺伝子とを含む第2の核酸であって、該プロモーター領域が、遺伝子:GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD、またはXCL1から選択されるプロモーター領域を含む、第2の核酸
を含む、請求項24記載の細胞。
【請求項２６】
第2のプロモーター領域がグランザイム遺伝子のプロモーター領域を含む、請求項25記載の細胞。
【請求項２７】
グランザイムプロモーター領域が、グランザイムA、B、H、KまたはMの遺伝子のプロモーター領域を含む、請求項26記載の細胞。
【請求項２８】
第2のプロモーター領域がグランザイムA遺伝子のプロモーターを含む、請求項27記載の細胞。
【請求項２９】
第1および/または第2のプロモーター領域が内在性プロモーター領域を含む、請求項25～28のいずれか一項記載の細胞。
【請求項３０】
第1または第2の導入遺伝子がCARまたはTCRを含む、請求項25～29のいずれか一項記載の細胞。
【請求項３１】
第1の導入遺伝子がTCRを含み、第2の導入遺伝子がCARを含む、請求項30記載の細胞

。
【請求項３２】
第1および/または第2の導入遺伝子がFOXP3を含む、請求項25～31のいずれか一項記載の細胞。
【請求項３３】
第1および/または第2の導入遺伝子がBCL11bを含む、請求項25～32のいずれか一項記載の細胞。
【請求項３４】
第1のプロモーター領域がRAG1プロモーター領域を含む、請求項25～33のいずれか一項記載の細胞。
【請求項３５】
機能性のRAG1および/またはRAG2タンパク質のうちの一方または両方をコードしている遺伝子に関して不完全である、請求項25～34のいずれか一項記載の細胞。
【請求項３６】
第1の導入遺伝子が、RAG1もしくはRAG2のコード領域内に挿入されている、および/または該導入遺伝子が少なくとも部分的にRAG1もしくはRAG2のコード領域と置き換えられている、請求項25～35のいずれか一項記載の細胞。
【請求項３７】
第1のプロモーター領域が、RAG1プロモーター領域またはRAG2プロモーター領域を含み、第1の核酸が、それぞれ該RAG1プロモーター領域またはRAG2プロモーター領域の転写開始部位の下流にRAG1遺伝子またはRAG2遺伝子を含む、請求項25～36のいずれか一項記載の細胞。
【請求項３８】
第2のプロモーター領域が、GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD、またはXCL1のプロモーター領域を含み、第2の核酸が、それぞれ該GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD、またはXCL1のプロモーター領域の転写開始部位の下流に、GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD、またはXCL1の遺伝子を含む、請求項25～37のいずれか一項記載の細胞。
【請求項３９】
第1の導入遺伝子とRAG1またはRAG2遺伝子とが、同じmRNAで発現される、請求項37記載の細胞。
【請求項４０】
第2の導入遺伝子と、GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD、またはXCL1の遺伝子とが、同じmRNAで発現される、請求項38記載の細胞。
【請求項４１】
第1または第2の核酸が自己切断ペプチド部位またはIRESを含む、請求項25～40のいずれか一項記載の細胞。
【請求項４２】
第1または第2の導入遺伝子が表1の遺伝子に対して3'近位にある、請求項25～41のいずれか一項記載の細胞。
【請求項４３】
第1または第2の導入遺伝子が表1の遺伝子に対して5'近位にある、請求項25～41のいずれか一項記載の細胞。
【請求項４４】
第1または第2の核酸が、前記遺伝子のコード領域および/または第1もしくは第2の導入遺伝子の下流に3'UTR領域をさらに含む、請求項25～41のいずれか一項記載の細胞。
【請求項４５】
3'UTRが内在性3'UTRを含む、請求項44記載の細胞。

【請求項４６】
機能性の内在性TCR-アルファ（TCR-a）タンパク質、機能性の内在性TCR-ベータ（TCR-b）タンパク質、機能性の内在性TCR-ガンマ（TCR-g）タンパク質、または機能性の内在性TCR-デルタ（TCR-d）タンパク質のうちの1つまたは複数をコードしている遺伝子に関して不完全である、請求項24～45のいずれか一項記載の細胞。
【請求項４７】
前記ゲノムDNAが、機能性CD3ガンマタンパク質、機能性CD3デルタタンパク質、機能性CD3イプシロンタンパク質、または機能性CD3ゼータタンパク質のうちの1つまたは複数をコードしている遺伝子に関して不完全である、請求項24～46のいずれか一項記載の細胞。
【請求項４８】
幹細胞、造血幹もしくは前駆細胞（HSPC）、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、ヒト胚性中胚葉前駆細胞、または多能性幹細胞（PSC）を含む、請求項24～47のいずれか一項記載の細胞。
【請求項４９】
多能性幹細胞を含む、請求項48記載の細胞。
【請求項５０】
胚性幹細胞または人工多能性幹細胞（iPSC）を含む、請求項48記載の細胞。
【請求項５１】
臍帯血、末梢血、骨髄、末梢血、臍帯の血液、胎盤、脂肪組織、または臍帯組織から単離されたかまたはそれらに由来するものである、請求項24～50のいずれか一項記載の細胞。
【請求項５２】
T細胞を含む、請求項24～51のいずれか一項記載の細胞。
【請求項５３】
成熟細胞を含む、請求項24～51のいずれか一項記載の細胞。
【請求項５４】
成熟細胞が、成熟T細胞、成熟制御性T細胞（Treg）、iNKT細胞、自然リンパ球、またはNK細胞を含む、請求項53記載の細胞。
【請求項５５】
CD4＋ CD8-またはCD8ab＋ CD4- T細胞を含む、請求項53記載の細胞。
【請求項５６】
インビトロ分化させたT細胞、成熟Treg、iNKT細胞、自然リンパ球、またはNK細胞を含む、請求項52～55のいずれか一項記載の細胞。
【請求項５７】
同種異系としてさらに定義される、請求項24～56のいずれか一項記載の細胞。
【請求項５８】
請求項24～57のいずれか一項記載の細胞を、該細胞の成熟細胞へのインビトロ分化に適した条件下で培養する工程を含む、細胞を作製するための方法。
【請求項５９】
成熟細胞が、成熟T細胞、成熟制御性T細胞（Treg）、iNKT細胞、自然リンパ球、またはNK細胞を含む、請求項58記載の方法。
【請求項６０】
前記細胞が、CD4＋ CD8-、CD8ab＋ CD4- T細胞、CD8aa＋ T細胞、TCRgd T細胞、または自然免疫細胞を含む、請求項59記載の方法。
【請求項６１】
前記細胞を三次元（3D）細胞凝集塊において培養する工程を含み、
該細胞凝集塊が、Notchリガンドを発現する間質細胞の選択された集団をさらに含み、
該3D細胞凝集塊が、インスリン、ビオチン、トランスフェリンおよびアルブミンを含む無血清培地中で、幹細胞または前駆細胞のT細胞へのインビトロ分化に十分な期間、培

養される、
請求項58～60のいずれか一項記載の方法。
【請求項６２】
前記間質細胞がMS5間質細胞を含む、請求項61記載の方法。
【請求項６３】
Notchリガンドが外来性Notchリガンドである、請求項61または62記載の方法。
【請求項６４】
3D細胞凝集塊を形成するために前記幹細胞または前駆細胞と前記間質細胞の遠心分離をさらに含む、請求項61～63のいずれか一項記載の方法。
【請求項６５】
前記培地が、外部から添加したFLT3リガンド（FLT3L）、インターロイキン7（IL-7）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、トロンボポエチン（TPO）、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-アルファ、TGF-ベータ、インターフェロン-ガンマ、インターフェロン-ラムダ、TSLP、チモペンチン、プレオトロフィン、プレイオトロフィン、ミッドカインのうちの1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項61～64のいずれか一項記載の方法。
【請求項６６】
前記間質細胞が、インタクトな、一部の、または修飾されたNotchリガンドをコードしている外来性ヌクレオチド配列を有し、該Notchリガンドが、DLL4、DLL1、JAG1、JAG2、またはそれらの組み合わせである、請求項61～65のいずれか一項記載の方法。
【請求項６７】
請求項24～57のいずれか一項記載の細胞を投与する工程を含む、対象を処置するための方法。
【請求項６８】
前記細胞が同種異系である、請求項67記載の方法。
【請求項６９】
対象ががんを有する、請求項67または68記載の方法。
【請求項７０】
対象においてがんを処置するためのものである、請求項69記載の方法。
【請求項７１】
がんが、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、精巣がん、脳腫瘍、皮膚がん、黒色腫、結腸がん、直腸がん、胃がん、食道がん、気管がん、頭頸部がん、膵がん、肝臓がん、乳がん、卵巣がん、リンパ腫および多発性骨髄腫を含むリンパ球系のがん、白血病、骨または軟部組織の肉腫、子宮頸がん、ならびに外陰がんから選択される、請求項69または70記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、2022年3月2日に出願された米国特許仮出願第63/315,579号;2022年3月2日に出願された米国特許仮出願第63/315,581号;および2023年2月2日に出願された米国特許仮出願第63/442,966号の優先権を主張するものであり、これらは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。
【０００２】
配列表
本出願はST.26形式に準拠して作成した配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。2023年3月1日に作成した前記配列表は名称がUCLAP0162WOであり、サイズは61,982バイトである。
【０００３】
1．発明の分野

本発明は一般的に細胞の培養および発生の分野に関する。

【背景技術】

【０００４】

2．関連技術の説明

養子細胞療法のためのT細胞の供給源としての幹細胞または前駆細胞の使用は、成熟した末梢血T細胞の操作に依存する現在使用されているアプローチの代替法となる潜在的可能性をもたらす。PSCおよびHSPCからのT細胞の作製は、インビボ（HSPCの場合）またはインビトロ（PSCの場合）のいずれでも無限に自己再生できる幹細胞の能力のため、血液から採取された初代成熟T細胞の使用と比べて利点をもたらす。幹細胞または前駆細胞のゲノム内への生物活性遺伝子の挿入により、改変された機能的特性を有するT細胞へのインビトロまたはインビボでの分化が可能となり得る。しかしながら、一部の特定の生物活性遺伝子は、成熟T細胞より前の発生ステージで発現された場合、T細胞発生に対して有害である場合があり得る。したがって当技術分野において、幹細胞または前駆細胞を、導入遺伝子を保有することができ、成熟T細胞に成功裡に分化され得るものに操作する必要性が存在する。

【発明の概要】

【０００５】

簡単な概要

本開示により、T細胞分化に対する有害な効果を伴うことなく幹細胞または前駆細胞内への導入遺伝子の挿入をもたらす、インビトロまたはインビボでのT細胞分化の際に導入遺伝子を構成的に発現させる方法および組成物を提供する。これを達成するため、本発明者らは、グランザイムAなどのプロモーター領域の制御下での導入遺伝子の発現により、以下の両方をもたらす協調的発現パターンが可能となることを見出した:（1）成熟T細胞における導入遺伝子の高発現、および（2）インビトロ分化方法全体を通して、成熟T細胞集団の生成を可能にする協調的レベルの導入遺伝子の発現。

【０００６】

本開示において、プロモーター領域と、該プロモーター領域の転写開始部位の下流に導入遺伝子とを含む核酸を記載し、該プロモーター領域は、表1の遺伝子のプロモーター領域を含む。また、本開示の核酸を含む細胞も記載する。本開示の細胞は、本開示の複数の核酸を含むものであってもよい。細胞は、以下を含んでもよい：第1のプロモーター領域と、該プロモーター領域の転写開始部位の下流に第1の導入遺伝子とを含む第1の核酸であって、該プロモーター領域が表1の遺伝子のプロモーター領域を含む、第1の核酸；および第2のプロモーター領域と、該プロモーター領域の転写開始部位の下流に第2の導入遺伝子とを含む第2の核酸であって、該プロモーター領域が、表1の遺伝子から選択されるプロモーター領域を含む、第2の核酸。該細胞は、以下を含んでもよい：第1のプロモーター領域および該プロモーター領域の転写開始部位の下流に第1の導入遺伝子（該プロモーター領域は、遺伝子:RAG1またはRAG2のプロモーター領域を含む）；ならびに第2のプロモーター領域と、該プロモーター領域の転写開始部位の下流に第2の導入遺伝子とを含む、第2の核酸（該プロモーター領域は、遺伝子:GZMA、GZMB、GZMH、GZMK、GZMM、TNFSF14、XCL2、PTGDS、SAMD3、NCALD、またはXCL1から選択されるプロモーター領域を含む）。また、本開示の細胞を該細胞の成熟細胞へのインビトロ分化に適した条件下で培養する工程を含む、細胞を作製するための方法も記載する。また、本開示の細胞を投与する工程を含む、対象を処置するための方法も記載する。

【０００７】

（表１）プロモーター領域

グランザイムA (GZMA)	腫瘍壊死因子リガンド スーパーファミリーメンバー14 (TNFSF14)
グランザイムB (GZMB)	X-C モチーフケモカインリガンド2 (XCL2)
グランザイムH (GZMH)	プロスタグランジンD2合成酵素 (PTGDS)
グランザイムK (GZMK)	ステライルアルファモチーフ ドメイン含有3 (SAMD3)
グランザイムM (GZMM)	ニューロカルシンデルタ (NCALD)
X-C モチーフケモカインリガンド 1 (XCL1)	組換え活性化遺伝子 1 (RAG1)
組換え活性化遺伝子 2 (RAG2)	

【０００８】

表１の１つもしくは複数の遺伝子および/またはそのプロモーター領域は、本開示の方法、核酸、細胞、または組成物において除外されてもよい。該プロモーター領域、第１のプロモーター領域、または第２のプロモーター領域は、グランザイム遺伝子のプロモーター領域であり得る。該プロモーター領域、第１のプロモーター領域、または第２のプロモーター領域は、グランザイムＡ、Ｂ、Ｈ、Ｋ、またはＭの遺伝子のものであり得る。該プロモーター領域、第１のプロモーター領域、または第２のプロモーター領域は、グランザイムＡ、Ｂ、Ｈ、Ｋ、またはＭの遺伝子のうちの１つまたは複数のプロモーター領域が除外されたものであってもよい。該プロモーター、第１のプロモーター領域、または第２のプロモーター領域領域は、グランザイムＡ遺伝子のプロモーター領域であり得る。該プロモーター領域、第１のプロモーター領域、または第２のプロモーター領域は、グランザイムＢ遺伝子のプロモーター領域であり得る。該プロモーター領域、第１のプロモーター領域、または第２のプロモーター領域は、グランザイムＨ遺伝子のプロモーター領域であり得る。該プロモーター領域、第１のプロモーター領域、または第２のプロモーター領域は、グランザイムＫ遺伝子のプロモーター領域であり得る。該プロモーター領域、第１のプロモーター領域、または第２のプロモーター領域は、グランザイムＭ遺伝子のプロモーター領域であり得る。該プロモーター領域、第１のプロモーター領域、または第２のプロモーター領域は、ＲＡＧ１またはＲＡＧ２プロモーター領域を含み得る。ＲＡＧ１プロモーター領域またはＲＡＧ２プロモーター領域のいずれかが本開示の諸態様において除外されてもよい。該ゲノムＤＮＡは、機能性のＲＡＧ１および/またはＲＡＧ２タンパク質のうちの一方または両方をコードしている遺伝子に関して不完全であり得る。該ゲノムＤＮＡは、機能性のＲＡＧ１および/またはＲＡＧ２タンパク質のうちの一方または両方をコードするものであり得る。該導入遺伝子、第１の導入遺伝子、もしくは第２の導入遺伝子は、ＲＡＧ１もしくはＲＡＧ２のコード領域内に挿入されていてもよい、および/または該導入遺伝子、第１の導入遺伝子、もしくは第２の導入遺伝子は、少なくとも部分的にＲＡＧ１もしくはＲＡＧ２のコード領域と置き換えられていてもよい。該プロモーター領域、第１のプロモーター領域、または第２のプロモーター領域は、内在性プロモーター領域を含み得る。内在性プロモーター領域とは、該プロモーター領域がその内在性ゲノム環境に存在し、そのため該プロモーターの上流の配列（すなわち、5'領域）が野生型細胞のものと実質的に同じであるという状況

を示す。実質的に同じとは、ある領域が野生型の上流領域に対して少なくとも80、85、90、95、96、97、98、または99％同一であること、と示すことができよう。また、内在性プロモーター領域とは、該プロモーターが野生型プロモーターと同じゲノム上の場所にあるという状況も示す。内在性プロモーターは、非修飾型である細胞または野生型プロモーターに対して70、75、80、85、90、95、96、97、98、もしくは99％同一であるか、または少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、もしくは99％同一である細胞におけるプロモーターを示し得る。

【０００９】

該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、キメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）を含み得る。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、FOXP3を含み得る。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、BCL11bを含み得る。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、T細胞受容体（TCR）を含み得る。TCRは、腫瘍抗原特異的TCR、ウイルス特異的TCR、異物特異的TCR、がん細胞特異的TCR、細菌特異的TCR、またはがん精巣抗原特異的TCRであり得る。TCRは、腫瘍抗原特異的TCR（すなわち、腫瘍抗原を認識するTCR）であり得る。TCRは、ウイルス抗原特異的TCR（すなわち、ウイルス抗原を認識するTCR）であり得る。CARは、例えば腫瘍抗原特異的CAR、ウイルス特異的CAR、異物特異的CAR、または細菌特異的CARであり得る。CARは、腫瘍抗原特異的CAR（すなわち、腫瘍抗原を認識するCARであり得る。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、転写因子であり得る。

【００１０】

該導入遺伝子はサイトカイン受容体またはサイトカインであり得る。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、キメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）が除外されたものであってもよい。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、FOXP3が除外されたものであってもよい。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、BCL11bが除外されたものであってもよい。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、T細胞受容体（TCR）が除外されたものであってもよい。TCRは、腫瘍抗原特異的TCR、ウイルス特異的TCR、異物特異的TCR、がん細胞特異的TCR、細菌特異的TCR、またはがん精巣抗原特異的TCRが除外されたものであってもよい。TCRは、腫瘍抗原特異的TCR（すなわち、腫瘍抗原を認識するTCR）が除外されたものであってもよい。TCRは、ウイルス抗原特異的TCR（すなわち、ウイルス抗原を認識するTCR）が除外されたものであってもよい。CARは、例えば腫瘍抗原特異的CAR、ウイルス特異的CAR、異物特異的CAR、または細菌特異的CARが除外されたものであり得る。CARは、腫瘍抗原特異的CAR（すなわち、腫瘍抗原を認識するCARが除外されたものであってもよい。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、転写因子が除外されたものであってもよい。該導入遺伝子は、サイトカイン受容体またはサイトカインが除外されたものであってもよい。

【００１１】

該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、もしくは第2の導入遺伝子の大きさは、500、505、510、515、520、525、530、535、540、545、550、555、560、565、570、575、580、585、590、595、600、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、730、735、740、745、750、755、760、765、770、775、780、785、790、795、800、805、810、815、820、825、830、835、840、845、850、855、860、865、870、875、880、885、890、895、900、905、910、915、920、925、930、935、940、945、950、955、960、965、970、975、980、985、990、995、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4500、5000、5500、6000

、もしくは7000個（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）のアミノ酸長もしくは核酸長であり得る、少なくとも該アミノ酸長もしくは核酸長であり得る、もしくは多くとも該アミノ酸長もしくは核酸長であり得る、および/または、該アミノ酸長もしくは核酸長であるか、少なくとも該アミノ酸長もしくは核酸長であるか、もしくは多くとも該アミノ酸長もしくは核酸長であるタンパク質をコードし得る。

【００１２】

該核酸、第1の核酸、または第2の核酸は、ゲノムDNAを含み得る。該核酸、第1の核酸、または第2の核酸、該プロモーター領域、第1のプロモーター領域、または第2のプロモーター領域の転写開始部位の下流の遺伝子のコード領域または表1。導入遺伝子および表1の遺伝子の転写はどちらも表1の遺伝子のプロモーターによって調節され得る。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子と、表1の遺伝子とは、同じmRNAで発現される。該核酸、第1の核酸、または第2の核酸は、自己切断ペプチド部位またはIRESを含み得るか、あるいはさらに含み得る。該核酸は自己切断ペプチドまたはIRESが除外されたものであってもよい。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、表1の遺伝子に対して3'近位にあり得る。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子は、表1の遺伝子に対して5'近位にあり得る。第1の領域が、第2の領域の3'末端の核酸に結合している場合、第1の領域は、第2の領域に対して3'近位にあり得る。第1および第2の領域間にさらなる介在アミノ酸残基が存在していてもよい。また、第1および第2の領域間の介在アミノ酸残基は除外されてもよい。したがって、これらの領域は、介在アミノ酸残基を有していないとはっきり明記されていない限り直接隣接している必要はなく、このことも想定される。用語「5'近位の」も同様に、第1の領域が第2の領域の5'末端の核酸に結合している場合、第1の領域は第2の領域に対して5'近位にあると定義される。同様に、特に記載のない限り、第1および第2の領域間にさらなる介在アミノ酸残基が存在していてもよい。該核酸、第1の核酸、または第2の核酸は、表1の遺伝子のコード領域および/または該導入遺伝子、第1の導入遺伝子または第2の導入遺伝子の下流に3'UTR領域を含み得るか、あるいはさらに含み得る。3'UTRは内在性3'UTRを含み得る。該プロモーター領域、第1のプロモーター領域、第2のプロモーター領域、3'UTR、導入遺伝子、第1の導入遺伝子、第2の導入遺伝子、および/または表1の遺伝子のコード領域は、該ゲノムDNA内において表1の遺伝子の内在性遺伝子座にある。

【００１３】

該核酸、第1の核酸、第2の核酸、ゲノムDNA、および/または該細胞は、機能性の内在性TCR-アルファ（TCR-a）タンパク質、機能性の内在性TCR-ベータ（TCR-b）タンパク質、機能性の内在性TCR-ガンマ（TCR-g）タンパク質、または機能性の内在性TCR-デルタ（TCR-d）タンパク質のうちの1つまたは複数をコードしている遺伝子に関して不完全であり得る。該核酸、第1の核酸、第2の核酸、ゲノムDNA、および/または該細胞は、機能性CD3ガンマタンパク質、機能性CD3デルタタンパク質、機能性CD3イプシロンタンパク質、または機能性CD3ゼータタンパク質のうちの1つまたは複数をコードしている遺伝子に関して不完全であり得る。

【００１４】

該核酸、第1の核酸、第2の核酸、ゲノムDNA、および/または該細胞は、機能性の内在性TCR-アルファ（TCR-a）タンパク質、機能性の内在性TCR-ベータ（TCR-b）タンパク質、機能性の内在性TCR-ガンマ（TCR-g）タンパク質、または機能性の内在性TCR-デルタ（TCR-d）タンパク質のうちの1つまたは複数をコードしている遺伝子に関して有能であり得る。該核酸、第1の核酸、第2の核酸、ゲノムDNA、および/または該細胞は、機能性CD3ガンマタンパク質、機能性CD3デルタタンパク質、機能性CD3イプシロンタンパク質、または機能性CD3ゼータタンパク質のうちの1つまたは複数をコードしている遺伝子に関して有能であり得る。

【００１５】

該細胞は多能性幹細胞（PSC）を含み得る。該細胞は、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞（iPSC）を含み得る。該細胞は、幹細胞、造血幹もしくは前駆細胞（HSPC）、

胚性幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、ヒト胚性中胚葉前駆細胞、または多能性幹細胞（PSC）を含み得る。該細胞は、臍帯血、末梢血、骨髄、末梢血、臍帯の血液、胎盤、脂肪組織もしくは臍帯組織から単離されたか、またはそれらに由来するものであり得る。該細胞はT細胞を含み得る。成熟細胞は、成熟T細胞、成熟制御性T細胞（Treg）、iNKT細胞、自然リンパ球、またはNK細胞を含み得る。該細胞は、CD4シングルポジティブ（SP）細胞またはCD8 SP細胞を含み得る。該細胞は、CD4＋ CD8-またはCD8ab＋ CD4- T細胞を含み得る。該細胞は、インビトロ分化させた細胞を含み得る。インビトロ分化させた細胞は、T細胞、成熟Treg細胞、iNKT細胞、自然リンパ球、またはNK細胞であり得る。該細胞は、インビボであり得る、および/または対象に投与されている。該細胞はインビトロであってもよい。該細胞は、インビトロで分化を行なったものであり得る。該細胞は、インビボで（すなわち、ヒト対象において）分化を行なったものであり得る。

【００１６】

本開示の細胞は、PSC、iPSC、HSPC、胚性幹細胞、iPSC、ヒト胚性中胚葉前駆細胞、または臍帯血、末梢血、骨髄、末梢血、臍帯の血液、胎盤、脂肪組織もしくは臍帯組織から単離されたかもしくはそれらに由来する細胞が除外されたものであってもよい。成熟細胞は、成熟T細胞、成熟制御性T細胞（Treg）、iNKT細胞、自然リンパ球、またはNK細胞のうちの1つまたは複数が除外されたものであってもよい。該細胞は、CD4シングルポジティブ（SP）細胞またはCD8 SP細胞を含み得る。該細胞は、CD4＋ CD8-またはCD8ab＋ CD4- T細胞を含み得る。該細胞は、インビトロ分化させた細胞および/または成熟Treg、iNKT細胞、自然リンパ球、もしくはNK細胞が除外されたものであってもよい。

【００１７】

本方法は、細胞を三次元（3D）細胞凝集塊において培養する工程もまた含み得るか、またはさらに含み得、該細胞凝集塊は、Notchリガンドを発現する間質細胞の選択された集団をさらに含み、該3D細胞凝集塊は、インスリン、ビオチン、トランスフェリン、およびアルブミンを含む無血清培地中で、該幹細胞または前駆細胞の成熟T細胞などの成熟細胞へのインビトロ分化に十分な期間、培養される。該間質細胞はMS5間質細胞を含み得る。該間質細胞はヒト間質細胞であり得る。Notchリガンドは外来性Notchリガンドを含み得る。該間質細胞は、Notchリガンドを発現する導入遺伝子を含むものであり得る。該方法は、3D細胞凝集塊を形成するために該幹細胞または前駆細胞と該間質細胞の遠心分離を含み得るか、あるいはさらに含み得る。細胞培養培地は、外部から添加したFLT3リガンド（FLT3L）、インターロイキン7（IL-7）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、トロンボポエチン（TPO）、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-アルファ、TGF-ベータ、インターフェロン-ガンマ、インターフェロン-ラムダ、TSLP、チモペンチン、プレオトロフィン、プレイオトロフィン、ミッドカインのうちの1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含み得るか、あるいはさらに含み得る。該間質細胞は、インタクトな、一部の、または修飾されたNotchリガンドをコードしている外来性ヌクレオチド配列を有してもよく、該Notchリガンドは、DLL4、DLL1、JAG1、JAG2、またはそれらの組み合わせである。細胞培養培地は、外部から添加したFLT3リガンド（FLT3L）、インターロイキン7（IL-7）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、トロンボポエチン（TPO）、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-アルファ、TGF-ベータ、インターフェロン-ガンマ、インターフェロン-ラムダ、TSLP、チモペンチン、プレオトロフィン、プレイオトロフィン、ミッドカインのうちの1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせが除外されたものであってもよい。該間質細胞は、インタクトな、一部の、または修飾されたNotchリガンドをコードしている外来性ヌクレオチド配列のうちの1つまたは複数が除外されていてもよく、該NotchリガンドはDLL4、DLL1、JAG1、JAG2、またはそれらの組み合わせである。

【００１８】

該細胞は同種異系であり得る。また、該細胞は自己由来であるとさらに定義されてもよ

い。対象は、がんを有する対象であり得る。該方法はがんを処置するためのものであり得る。該方法は自己免疫性疾患を処置するためのものであり得る。がんまたは自己免疫性疾患は、本明細書において列挙したものであり得る。がんは、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、精巣がん、脳腫瘍、皮膚がん、黒色腫、結腸がん、直腸がん、胃がん、食道がん、気管がん、頭頸部がん、膵がん、肝臓がん、乳がん、卵巣がん、リンパ腫および多発性骨髄腫を含むリンパ球系のがん、白血病、骨または軟部組織の肉腫、子宮頸がん、ならびに外陰がんから選択され得る。がんは、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、精巣がん、脳腫瘍、皮膚がん、黒色腫、結腸がん、直腸がん、胃がん、食道がん、気管がん、頭頸部がん、膵がん、肝臓がん、乳がん、卵巣がん、リンパ腫および多発性骨髄腫を含むリンパ球系のがん、白血病、骨または軟部組織の肉腫、子宮頸がん、ならびに外陰がんのうちの1つまたは複数が除外されてもよい。

【００１９】

該細胞のうちの1つまたは複数、特にストローマ細胞は外来性Notchリガンドを発現し得る。培地に、外部から添加したNotchリガンドを含めてもよい。外部から添加したNotchリガンドは固相支持体に結合され得るか、または固定化され得る。Notchリガンドの非限定的な例としては、インタクトな（完全長）、一部の（短縮型形態）、または修飾された（1つもしくは複数の変異、例えば保存的変異を含む）DLL4、DLL1、JAG1、JAG2、またはそれらの組み合わせが挙げられる。例えば、該間質細胞は、トランスフェクションまたは形質導入によって該細胞内に導入され得るNotchリガンドをコードしている外来性ヌクレオチド配列を有する。培養組成物はNotchリガンドを含まなくてもよく、またはNotchリガンドが除外されていてもよく、または外部から添加したNotchリガンドを含まなくてもよい。NotchリガンドはヒトNotchリガンドであり得る。NotchリガンドはヒトDLL1またはDLL4 Notchリガンドであり得る。

【００２０】

間質細胞は、マウス間質細胞株、ヒト間質細胞株、初代間質細胞の選択された集団、多能性幹細胞からインビトロで分化させた間質細胞の選択された集団、またはそれらの組み合わせであり得る。該間質細胞は、MS5、OP9、S17、HS-5、またはHS-27a細胞であり得る。MS5、OP9、S17、HS-5、またはHS-27a細胞などの間質細胞株は、本開示の方法および組成物において除外されてもよい。該間質細胞はヒト細胞から分化させたものであり得る。該間質細胞はヒト多能性幹細胞から分化させたものであり得る。該間質細胞はヒトまたは非ヒトのHSPCまたはPSC細胞から分化させたものであり得る。

【００２１】

培地は、動物細胞を培養するために基礎培地として使用される培地、例えばAIM V、X-VIVO-15、NeuroBasal、EGM2、TeSR、BME、BGJb、CMRL 1066、Glasgow MEM、Improved MEM Zinc Option、IMDM、Medium 199、Eagle MEM、αMEM、DMEM、Ham、RPMI-1640、およびFischer社の培地のうちのいずれか、ならびに任意のそれらの組み合わせを用いて調製され得るが、培地は、動物細胞を培養するために使用できる限り、特にこれらに限定されなくてよい。特に、培地はゼノフリーまたは既知組成であり得る。

【００２２】

培地は血清含有もしくは無血清の培地、またはゼノフリー培地であり得る。異種動物由来の成分の混入を防ぐ観点から、血清は幹細胞のものと同じ動物に由来するものであるのがよい。無血清培地は、未処理または未精製の血清を含んでいない培地を示し、したがって、精製された血液由来成分または動物組織由来成分（例えば、成長因子）を含む培地が包含され得る。

【００２３】

培地は血清の任意の代替品を含有しているものであってもよく、含有していないものであってもよい。血清の代替品としては、アルブミン（例えば、脂質高配合アルブミン、ウシアルブミン、アルブミン置換液、例えば組換えアルブミンもしくはヒト化アルブミン、植物のデンプン、デキストランおよびタンパク質加水分解物）、トランスフェリン（もし

くは他の鉄トランスポーター）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールまたはその等価物を適切に含有している物質が挙げられ得る。血清の代替品は、例えば国際特許出願公開公報第98/30679号（その全体が本明細書に組み入れられる）に開示された方法によって調製され得る。あるいはまた、より便利にするために任意の市販品が使用され得る。市販品としては、Knockout Serum Replacement（KSR）、Chemically-Defined Lipid Concentrated（Gibco）およびGlutamax（Gibco）が挙げられる。

【００２４】

培地は、神経細胞の発生に適した無血清培地であってもよい。例えば、培地は、B-27（登録商標）サプリメント、ゼノフリーB-27（登録商標）サプリメント（http://www.thermofisher.com/us/en/home/technical-resources/media-formulation.250.htmlのワールドワイドウェブにて入手可能）、NS21サプリメント（Chen et al.,J Neurosci Methods,2008 Jun 30;171（2）:239-247、その全体が本明細書に組み入れられる）、GS21（商標）サプリメント（amsbio.com/B-27.aspxのワールドワイドウェブにて入手可能）、またはそれらの組み合わせを、3D細胞凝集塊から成熟細胞を生成させるのに有効な濃度で含むものであり得る。

【００２５】

培地は、以下のB-27サプリメント含有成分:ビタミン類、例えばビオチン;酢酸DLアルファトコフェロール;DLアルファ-トコフェロール;ビタミンA（アセテート）;タンパク質、例えばBSA（ウシ血清アルブミン）またはヒトアルブミン、脂肪酸不含フラクションV;カタラーゼ;ヒト組換えインスリン;ヒトトランスフェリン;スーパーオキシドジスムターゼ;他の成分、例えばコルチコステロン;D-ガラクトース;エタノールアミンHCl;グルタチオン（還元型）;L-カルニチンHCl;リノール酸;リノレン酸;プロゲステロン;プトレシン2HCl;亜セレン酸ナトリウム;およびT3（トリオド（triodo）-I-チロニン）のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20種類またはそれより多くを含んでもよい。

【００２６】

培地は、外部から添加したアスコルビン酸を含んでもよい。また、培地は、外部から添加したの脂肪酸または脂質、アミノ酸（例えば、非必須アミノ酸）、単糖、ビタミン、成長因子、サイトカイン、抗酸化物質、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機イオンおよび無機塩類を含有することもできる。ビタミン類はビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファ-トコフェロール、ビタミンA、塩化コリン、パントテン酸カルシウム、パントテン酸、葉酸、ニコチンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、イノシトール、ビタミンB12、またはそれらの組み合わせもしくはその塩を含み得る。アミノ酸は、アルギニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、グルタミン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシンもしくはバリン、またはそれらの組み合わせを含み得る。無機イオンは、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素もしくはリン、またはそれらの組み合わせもしくは塩を含み得る。また、培地は、モリブデン、バナジウム、鉄、亜鉛、セレン、銅もしくはマンガン、またはそれらの組み合わせを含有することもできる。

【００２７】

培地は、以下:B-27サプリメント、ビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファ-トコフェロール、ビタミンA（アセテート）、BSA（ウシ血清アルブミン）、ヒトアルブミン、脂肪酸不含フラクションV、カタラーゼ、ヒト組換えインスリン、ヒトトランスフェリン、スーパーオキシドジスムターゼ、コルチコステロン、D-ガラクトース、エタノールアミンHCl、グルタチオン（還元型）、L-カルニチンHCl、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、プトレシン2HCl、亜セレン酸ナトリウム、T3（トリオド-I-チロニン）、アスコルビン酸、脂肪酸、脂質、アミノ酸、単糖、ビタミン、成長因子、サイトカイン、抗酸化物質、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機イオン、無機塩類、塩化コリン、パントテン酸カルシウム、パントテン酸、葉酸、ニコチンア

ミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、イノシトール、ビタミンB12、アルギニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、グルタミン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン、バリン、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素、リン、モリブデン、バナジウム、鉄、亜鉛、セレン、銅および/またはマンガンのうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20種類またはそれより多くが除外されていてもよい。

【００２８】

1つまたは複数の培地成分は、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/L、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/L、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/L、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/ml、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000μg/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000μg/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000μg/ml、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000mg/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000mg/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000mg/ml、あるいはこれらの中で導き出せる任意の範囲の濃度で添加され得る。

【００２９】

使用される培地には、少なくとも1種類の外部から添加したの成長因子またはサイトカインが、約0.1ng/mL～約500ng/mL、より特別には1ng/mL～100ng/mL、あるいは少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/L、多くとも

0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/L、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/L、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000ng/ml、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000μg/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000μg/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000μg/ml、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000mg/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000mg/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900もしくは1000mg/ml、あるいはこれらの中で導き出せる任意の範囲の濃度で補給され得る。好適なサイトカインとしては、限定するわけではないが、FLT3リガンド（FLT3L）、インターロイキン7（IL-7）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-アルファ、TGF-ベータ、インターフェロン-ガンマ、インターフェロン-ラムダ、TSLP、チモペンチン、プレオトロフィンおよびミッドカインが挙げられる。特に、培養培地にはFLT3LおよびIL-7のうちの少なくとも1つが含められ得る。より特別には、培養液にFLT3LとIL-7の両方が含められ得る。FLT3リガンド（FLT3L）、インターロイキン7（IL-7）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-アルファ、TGF-ベータ、インターフェロン-ガンマ、インターフェロン-ラムダ、TSLP、チモペンチン、プレオトロフィン、およびミッドカインのうちの1つまたは複数が除外される場合もあり得る。

【００３０】

他の培養条件は適切に規定され得る。例えば、培養温度は約20～40℃、例えば、少なくとも20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40℃、高くとも20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40℃、または約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40℃（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）であり得るが、特にこれらに

限定されなくてよい。CO_2濃度は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10％（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）、例えば約2％～10％、例えば約2～5％、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲であり得る。酸素分圧は、少なくとも1、5、8、10、20％、または約1、5、8、10、20％、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲であり得る。

【００３１】

間質細胞、および成熟細胞に分化するように誘導されるPSCは、例えば、約20:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:20、あるいはこれらの中で導き出せる任意の範囲の任意の比率で存在し得る。

【００３２】

任意の細胞集団、例えば間質細胞、成熟細胞、幹細胞、前駆細胞、または成熟細胞に分化するように誘導されるPSCは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1×10^3、2×10^3、3×10^3、4×10^3、5×10^3、6×10^3、7×10^3、8×10^3、9×10^3、1×10^4、2×10^4、3×10^4、4×10^3、5×10^4、6×10^4、7×10^4、8×10^4、9×10^4、1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6もしくは2×10^6個、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1×10^3、2×10^3、3×10^3、4×10^3、5×10^3、6×10^3、7×10^3、8×10^3、9×10^3、1×10^4、2×10^4、3×10^4、4×10^3、5×10^4、6×10^4、7×10^4、8×10^4、9×10^4、1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6もしくは2×10^6個、または多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1×10^3、2×10^3、3×10^3、4×10^3、5×10^3、6×10^3、7×10^3、8×10^3、9×10^3、1×10^4、2×10^4、3×10^4、4×10^3、5×10^4、6×10^4、7×10^4、8×10^4、9×10^4、1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6もしくは2×10^6個の細胞を含んでもよい。

【００３３】

培養は任意の長さの時間、例えば約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25時間、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25日間、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25週間、あるいはこれらの中で導き出せる任意の範囲であり得る。培養は細胞の継代を伴っても伴わなくてもよい。

【００３４】

対象は臨床試験用動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、またはブタを含み得る。対象はヒトであり得る。

【００３５】

任意の遺伝子修飾組成物または遺伝子修飾方法、例えば遺伝子編集、相同的組換えもしくは非相同的組換え、RNA媒介性遺伝子送達、または任意の慣用的な核酸送達方法が、外来性核酸を細胞内に導入するために使用され得る。遺伝子修飾方法の非限定的な例としては、例えばCRISPR/CAS9、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、またはTALEN技術による遺伝子編集方法が挙げられ得る。

【００３６】

本明細書に記載の組成物および方法は、該方法が、ある特定の表現型を有する細胞を調製するためのものになるように修正されてもよい。該方法は、表現型:$CD4^+CD8^-$ T細胞、$CD4^-CD8^+$ T細胞、$CD34^+$ $CD7^+$ $CD1a^+$細胞、CD3＋ TCRab＋、CD3＋ TCRgd＋、CD3＋ TCRab＋ CD4＋ CD8-、CD3＋ TCRab＋ CD8＋ CD4-、CD3＋ TC

Rab＋ CD4＋ CD8- CD45RO- CD45RA＋、CD3＋ TCRab＋ CD8＋ CD4- CD45RO- CD45RA＋、CD3＋ TCRab＋ CD4＋ CD8- CD45RO- CD45RA＋ CCR7＋、CD3＋ TCRab＋ CD8＋ CD4- CD45RO- CD45RA＋ CCR7＋、CD3＋ TCRab＋ CD4＋ CD8- CD45RO- CD45RA＋ CD27＋、CD3＋ TCRab＋ CD8＋ CD4- CD45RO- CD45RA＋ CD27＋、CD34＋ CD7＋ CD1a＋細胞、CD34＋CD5＋CD7＋、CD34＋CD5＋CD7-、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞、抗原特異的T細胞、上皮内リンパ球T細胞を有するT細胞、あるいはCD45＋、CD11b＋、CD11b-、CD15＋、CD15-、CD24＋、CD24-、CD114＋、CD114-、CD182＋、CD182-、CD4＋、CD4-、CD14＋、CD14-、CD11a＋、CD11a-、CD91＋、CD91-、CD16＋、CD16-、CD3＋、CD3-、CD25＋、CD25-、Foxp3＋、Fox3p-、CD8＋、CD8-、CD19＋、CD19-、CD20＋、CD20-、CD24＋、CD24、CD38＋、CD38-、CD22＋、CD22-、CD61＋、CD61-、CD16＋、CD16-、CD56＋、CD56-、CD31＋、CD31-、CD30＋、CD30-、CD38＋、および/またはCD38-である細胞、あるいはそれらの組み合わせを調製するためのものである。一例として、上皮内リンパ球（IEL）は、間質細胞において同種抗原を発現させることによって調製され得る。

【００３７】

該細胞は、CD4、CD8、CD34、CD7、CD1a、CD3、TCRab、TCRgd、CD45RO、CD45RA、CCR7、CD27、CD45、CD11b、CD15、CD24、CD114、CD182、CD91、CD99、CD16、CD25、Foxp3、CD20、CD38、CD22、CD61、CD56、CD31およびCD30のうちの1つまたは複数が陽性または陰性であり得る、および/または択一的に、あるいは組み合わせでCD4、CD8、CD34、CD7、CD1a、CD3、TCRab、TCRgd、CD45RO、CD45RA、CCR7、CD27、CD45、CD11b、CD15、CD24、CD114、CD182、CD91、CD99、CD16、CD25、Foxp3、CD20、CD38、CD22、CD61、CD56、CD31およびCD30のうちの1つまたは複数が陰性であり得る。

【００３８】

該方法、細胞、および組成物は、表現型:$CD4^{+}CD8^{-}$ T細胞、$CD4^{-}CD8^{+}$ T細胞、$CD34^{+}$ $CD7^{+}$ $CD1a^{+}$細胞、CD3＋ TCRab＋、CD3＋ TCRgd＋、CD3＋ TCRab＋ CD4＋ CD8-、CD3＋ TCRab＋ CD8＋ CD4-、CD3＋ TCRab＋ CD4＋ CD8- CD45RO- CD45RA＋、CD3＋ TCRab＋ CD8＋ CD4- CD45RO- CD45RA＋、CD3＋ TCRab＋ CD4＋ CD8- CD45RO- CD45RA＋ CCR7＋、CD3＋ TCRab＋ CD8＋ CD4- CD45RO- CD45RA＋ CCR7＋、CD3＋ TCRab＋ CD4＋ CD8- CD45RO- CD45RA＋ CD27＋、CD3＋ TCRab＋ CD8＋ CD4- CD45RO- CD45RA＋ CD27＋、$CD34^{+}$ $CD7^{+}$ $CD1a^{+}$細胞、CD34＋CD5＋CD7＋、CD34＋CD5＋CD7-、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞、抗原特異的T細胞、上皮内リンパ球T細胞を有するT細胞、あるいはCD45＋、CD11b＋、CD11b-、CD15＋、CD15-、CD24＋、CD24-、CD114＋、CD114-、CD182＋、CD182-、CD4＋、CD4-、CD14＋、CD14-、CD11a＋、CD11a-、CD91＋、CD91-、CD16＋、CD16-、CD3＋、CD3-、CD25＋、CD25-、Foxp3＋、Fox3p-、CD8＋、CD8-、CD19＋、CD19-、CD20＋、CD20-、CD24＋、CD24、CD38＋、CD38-、CD22＋、CD22-、CD61＋、CD61-、CD16＋、CD16-、CD56＋、CD56-、CD31＋、CD31-、CD30＋、CD30-、CD38＋および/またはCD38-である細胞が除外されたものであってもよい。

【００３９】

該細胞は、典型的な成熟細胞、例えばCD4＋CD8-（SP4）またはCD4-CD8abの表現型を有する典型的な成熟T細胞であり得る。また、該細胞は、NK細胞、iNKT細胞、Treg、TCRgd T細胞、自然免疫細胞であってもよく、CD8aaを発現するものであってもよい。

【００４０】

また、遺伝子修飾は、インビトロまたはインビボでの選択またはスクリーニングまたはイメージングを補助する選択可能またはスクリーニング可能なマーカーの導入も包含し得る。特に、インビボイメージング剤または自殺遺伝子が外来的に発現され得るか、または

出発細胞もしくは子孫細胞に添加され得る。該方法は、画像誘導養子細胞療法を伴うものであってもよい。

【００４１】

用語「対象」および「患者」は互換的に使用され得、ヒト対象を示し得る。対象は哺乳動物対象であると定義されてもよい。また対象は、マウス、ラット、ブタ、ウマ、非ヒト霊長類、ネコ、イヌ、ウシなどであってもよい。

【００４２】

本出願全体を通して、用語「約」は、ある値が、その値を測定するために使用されるデバイスまたは方法の誤差の標準偏差を含むことを示すために、分子細胞生物学の分野におけるその平易で通常の意味に従って使用される。

【００４３】

「a」または「an」という語の使用は、用語「～を含む」とともに使用される場合、「1つ」を意味し得るが、これはまた、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは1つより多く」の意味とも両立する。

【００４４】

本明細書において使用する場合、用語「または」および「および/または」は、複数の構成要素が組み合わせであるか、または互いに排他的であるかを記載するために使用される。例えば、「x、yおよび/またはz」は、「x」だけ、「y」だけ、「z」だけ、「x、yおよびz」、「（xおよびy）またはz」、「xまたは（yおよびz）」、あるいは「xまたはyまたはz」を示し得る。ある態様または局面ではx、yまたはzが具体的に除外されてもよいことが具体的に想定される。

【００４５】

「～を含む（comprising）」（および「comprising」の任意の形態、例えば「comprise」および「comprises」）、「～を有する（having）」（および「having」の任意の形態、例えば「have」および「has」）、「～を含む（including）」（および「including」の任意の形態、例えば「includes」および「include」）、「～を特徴とする（characterized by）」（および「including」の任意の形態、例えば「characterized as」）または「～を含む（containing）」（および「containing」の任意の形態、例えば「contains」および「contain」）という語は包含的またはオープンエンドであり、記載されていない追加の要素も方法工程も排除しない。

【００４６】

該組成物およびその使用のための方法は、本明細書全体を通して開示している任意の含有成分もしくは工程を「含む」、それら「から本質的にからなる」、またはそれら「からなる」ものであり得る。語句「～からなる」は、明記されていない要素も、工程も、含有成分もいずれも排除する。語句「本質的に～からなる」は、記載の主題の範囲を明記された材料または工程ならびにその基本的および新規な特徴に実質的に影響しないものに限定する。用語「～を含む」との関連において記載された態様および局面はまた、用語「～からなる」または「本質的に～からなる」との関連においても実施され得ることを想定している。

【００４７】

治療上、診断上または生理学的な目的または効果との関連における任意の方法はまた、「使用（use）」の請求項の文言、例えば、記載の治療上、診断上または生理学的な目的または効果を達成または実施するための本明細書において論考された任意の化合物、組成物または薬剤「の使用」に示され得る。

【００４８】

該1つまたは複数のシーケンスまたは組成物の使用は、本明細書に記載の任意の方法に対して使用され得る。他の態様および局面は、本出願全体において論考される。本開示のある1つの局面に関して論考された任意の態様は、本開示の他の局面にも同様に適用され、その逆も同じである。さらに、本発明の任意の組成物は、本発明の任意の方法において使用され得、本発明の任意の方法は、本発明の任意の組成物を作製または利用するために

使用され得る。実施例に示された一態様の諸局面はまた、異なる実施例のどこか、または本出願、例えば発明の概要、態様の詳細な説明、特許請求の範囲、および図の説明文の記載のどこかに論考された態様との関連において実施され得る態様でもある。

【００４９】

本発明の他の目的、特徴および利点は以下の詳細な説明から明らかとなろう。しかしながら、詳細な説明および具体的な実施例は本発明の具体的な態様を示しているが、当業者にはこの詳細な説明から本発明の趣旨および範囲の範囲内の種々の変更および修正が明らかとなるため、実例として示しているにすぎないことは理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【００５０】

以下の図面は、本明細書の一部を構成し、本開示の一部の特定の局面をさらに示すために含めている。本開示は、これらの図面のうちの1つまたは複数を本明細書に提示した具体的な態様の詳細な説明と併せて参照することによってよりよく理解され得よう。

【００５１】

【図１】図1A～B：内在性遺伝子の発現の後に続いて起こるステージ特異的発現を実現するための全般的な導入遺伝子ノックインアプローチの一例。（A）生物活性導入遺伝子（すなわち、レポーター、キメラ抗原受容体）は内在性遺伝子の3'非翻訳領域に、CRISPR/Cas9媒介性相同組換え修復を用いてインフレームに挿入される。このプロセスにおいて、終止コドンは、セリン-アルギニンリンカーおよび自己切断ペプチド配列（P2A）と置き換えられる。このアプローチにより、挿入された導入遺伝子の内在性プロモーターによる発現調節が可能になり、内在性遺伝子の翻訳は未改変のままである。また、編集された多能性幹細胞の濃縮を補助するために、ピューロマイシン耐性遺伝子カセットが挿入される。（B）iPSCステージでのCRE-TAT処理後、ピューロマイシン耐性カセットは除去され得、loxp3配列だけになる。

【図２Ａ】図2A～B：レンチウイルスベクター媒介性のCAR19の構成的高発現により多能性幹細胞からの通常の分化がブロックされる。H1 hESCを、CAR19LHとレポーターeGFPを共発現するレンチウイルスベクターにより形質導入した。細胞を高eGFP発現に関して選択し、クローニングした。クローン2を人工胸腺オルガノイド（ATO）に分化させ、2、3、4および5週目に解析した。低頻度の（A）CD3＋TCRab＋ 細胞およびSP4とSP8、ならびに（B）大半がCD4-CD8-「DN」細胞の集団という、通常とは異なる分化が示されている。

【図２Ｂ】図2Aの説明を参照のこと。

【図３】図3：GZMAの下流に挿入された外来遺伝子のステージ特異的発現の実証。CRISPR/Cas9編集をH1 hESC細胞株において行ない、GZMAレポーター細胞株を作製した。mCitrineのノックイン（KI）を、未分化H1 hESC内の内在性GZMA遺伝子の下流において行ない、細胞をクローニングした：次いでクローンをATOに分化させ、1、3、および5週目に解析し、特異的T細胞集団におけるレポーター発現をアセスメントした。ヘテロ接合型クローンの解析を示す。mCitrineは、23％のSP8および2％のSP4において発現されているが、前駆体ステージISP4でもDPでも発現されていない。

【図４Ａ】図4A～B：CAR19発現開始の遅延により通常のT細胞分化が可能になることの実証。成熟T細胞における外来遺伝子CAR19LHの発現は、内在性GZMAの下流への挿入によって実現された。ホモ接合型クローンを、T-iPSC株「n11」の未分化細胞内のGZMA遺伝子座へのCAR19LHのノックインにより作製した。次いで、編集されたT-iPSCのクローンを、ATOシステムに分化させた。図は、（3a）DP（1週目）ならびにSP8およびSP4細胞（3および4週目）の通常の分化を示す。（3b）4週目、67％のSP8および6％のSP4細胞がCARを発現した。

【図４Ｂ】図4Aの説明を参照のこと。

【図５Ａ】図5A～D。（A）hPSCから成熟T細胞を生成させるためのプロトコルのスキーム。レンチウイルスによる形質導入またはCRISPR/Cas9を用いた遺伝子修飾はすべて、多能性ステージにおいて行なった。（B）ユビキチン構成的プロモーター下で第2世代

抗CD19 CAR（CAR19）を発現するレンチウイルスベクターの略図。（C）WTおよびCAR19レンチ形質導入hPSC ATOの代表的なフローサイトメトリープロット。形質導入されたATOは、DP T細胞の劇的な減少およびDNの濃縮を示した。（D）CAR19レンチ形質導入ATOにおけるDNのさらなる解析により2型自然リンパ球（ILC2）マーカーの上方調節が示された。FACSプロットはすべて、CD45＋CD56-に対してゲーティングしている。

【図５Ｂ】図5Aの説明を参照のこと。

【図５Ｃ】図5Aの説明を参照のこと。

【図５Ｄ】図5Aの説明を参照のこと。

【図６Ａ】図6A～B。（A）選択した候補遺伝子および各T細胞分化ステージでの発現レベル（RPKM）の表によるまとめ。この解析により、PSCからDP後期ステージまではゼロから低発現だがSP8およびSP4の両方においては高発現を示す候補遺伝子を特定した。（B）GZMA-mCitrineレポーターPSCのT細胞分化の速度論。レポーターの発現は、内在性GZMAプロモーターを用いて駆動した。レポーターmCitrineの発現は、成熟SPにおいてのみ存在したが、T細胞の初期ステージには存在しなかった。

【図６Ｂ】図6Aの説明を参照のこと。

【図７Ａ】図7A～D。（A）GZMA遺伝子座の3'非翻訳領域（UTR）内へのCAR19の特異的CRISPR/Cas9媒介性HDRノックインを実現するために使用したドナーテンプレートデザインの概略図。（B）GZMA-CAR19LH T-iPSCのT細胞分化の代表的なフローサイトメトリープロット。（C）5週目のATO由来T細胞のフローサイトメトリープロット。（D）GZMA-CAR19LH T-iPSC由来のT細胞を用いたインビトロ共培養アッセイの代表的なフローサイトメトリープロット。

【図７Ｂ】図7Aの説明を参照のこと。

【図７Ｃ】図7Aの説明を参照のこと。

【図７Ｄ】図7Aの説明を参照のこと。

【図８】図8A～B：RAG1/RAG2ダブルノックアウト（DKO）により、T細胞発生のダブルポジティブステージでのT細胞の発生が停止される。

【図９】図9A～B：外来性TCRの構成的発現により、RAG1/2 DKO hPSC T細胞の分化がレスキューされる。

【図１０】図10：RNAシーケンシングデータ。

【図１１Ａ】図11A～B。（A）2、4、および5週目に解析され、WT T-iPSCおよびTRAC破壊のみの対照ATOと比較した、TRAC破壊後のGZMA-CAR19LH T-iPSCのFACS解析。TRAC破壊は、T-iPSCからの分化全体を通してTCRαβの表面発現およびCD3発現を妨げる。（B）2、4、および5週目に解析され、野生型およびTRAC破壊のみの対照と比較した、TRAC破壊GZMA-CAR19LH T-iPSC ATOのT細胞の発生のFACS解析。TCRαβおよびCD3の発現が存在しない結果として、T細胞は正の選択を受けることができず、DPステージで発生が停止した。（C）GZMAの細胞内染色により、5週目の両方のTRAC破壊DP T細胞で、GZMA発現の非存在が示された。野生型（WT）対照から生成した成熟SP8 T細胞を、アイソタイプ陽性対照を作製するために使用した。（D）5週目のCD19 CAR発現のFACS解析。DP T細胞はGZMAを発現しないためCAR発現は非存在であった。

【図１１Ｂ】図11Aの説明を参照のこと。

【図１１Ｃ】図11Aの説明を参照のこと。

【図１１Ｄ】図11Aの説明を参照のこと。

【図１２Ａ】図12A～C。（A）各T細胞発生ステージにおけるRAG1-mCitrine T-iPSC ATOのFACS解析。mCitrine蛍光レポータータンパク質を、RAG1の3'UTR内にノックインした。レポーター発現を1、2、および7週目に解析し、DN、ISP4、DP、およびSP T細胞ステージをキャプチャーした。mCitrine発現は、T細胞拘束の前（すなわち、T-iPSC、hEMP）では非存在であった（データ示さず）が、DNからDPステージまでは増大した。正の選択がなされたら、ナイーブ成熟SP8およびSP4 T細胞において、レポータ

ー発現は完全に非存在であった。（B）RAG1-mCitrine T-iPSC ATOでのmCitrineレポーター発現のヒストグラムおよび定量。レポーター発現は、DNからDPステージまでででのみ存在したが、T細胞拘束前（すなわち、T-iSPCおよびhEMP）ならびに正の選択後（すなわち、SP8およびSP4 T細胞）では非存在であった。（C）エクスビボ培養および人為的刺激時のRAG1-mCitrine SP8およびSP4 T細胞の解析。RAG1-mCitrine T-iPSC ATOを7週目に解離させた。SP8およびSP4 T細胞をIL-2およびIL-7とともに培養し、サブセットをPMA/PTIで最大限に刺激し、活性化時に起こり得る任意の異常RAG1発現を測定した。どちらの条件の場合も、SP8でもSP4でもいずれにおいても検出可能なmCitrine発現はなかった。

【図１２Ｂ】図12Aの説明を参照のこと。

【図１２Ｃ】図12Aの説明を参照のこと。

【図１３Ａ】図13A～D。2、4、および6週目に解析され、野生型およびTRAC破壊のみの対照と比較した、TRAC破壊RAG1-NYESO TCR T-iPSC ATOのTCRαβおよびCD3のFACS解析。外来性NYESO（1G4）TCRを、RAG1の3'UTR内にノックインした。その結果、外来性TCR発現は、RAG1の発現プロファイルに的確に反映された。6週間にわたる過程で、発生するT細胞が正の選択を受け、TCRαβもCD3も発現しないSP8およびSP4 T細胞の生成がもたらされるにつれて、NYESO TCRは下方調節された（図13Bも参照）。（B）2、4、および6週目に解析された、TRAC破壊RAG1-NYESO TCR T-iPSC ATOから誘導されたT細胞の発生のFACS解析。6週目、約40％のT細胞が正の選択を受け、その後、TCRαβおよびCD3を下方調節した。成熟SP8およびSP4 T細胞はTCRαβ-CD3- 集団においてのみ存在し、一方、残りのTCRαβ＋CD3＋ 細胞はDPステージで進展が止まった。（C）6週目に解析された、TRAC破壊RAG1-NYESO TCR T-iPSC ATOのTCRαβ発現の解析。発生過程において、細胞が正の選択を受けるにつれて、TCRαβ発現は消失した。（D）6週目の野生型対照と比較した、TRAC破壊RAG1-NYESO TCR T-iPSC ATOから生成されたTCR-SP8 T細胞の特性評価。得られたTCRαβ-CD3- SP8 T細胞は、CD45RA＋およびCD62L＋を口バストに発現し、CD8α＋/CD8β＋であった。

【図１３Ｂ】図13Aの説明を参照のこと。

【図１３Ｃ】図13Aの説明を参照のこと。

【図１３Ｄ】図13Aの説明を参照のこと。

【図１４Ａ】図14A～E。（A）2週目および6週目に解析された、TRAC破壊RAG1-NYESO TCR、GZMA-CAR19LH T-iPSC ATOのFACS解析。この3つの遺伝子修飾により以下のことが遂行された:（1）TRAC破壊により内在性TCR発現が妨げられた、（2）RAG1-NYESO TCRにより正の選択を受けるための一過性TCR発現がもたらされ、続いて消失した、（3）次いで、得られた成熟SP8 T細胞はGZMAプロモーターによりCARを発現した。これらのストラテジーの組み合わせにより、最終的にTCRαβ-CD3- SP8 CAR T細胞の口バストな生成がもたらされた。（B）6週目のATOから生成したTCRαβ-CD3- SP CAR T細胞の特性評価。成熟T細胞は、典型的なナイーブ成熟T細胞マーカーおよびCD19 CARを口バストに発現した。（C）TCRαβ-CD3- SP8 CAR T細胞の機能の特性評価。T細胞を6週目のATOから解離させ、抗原陽性（CD19＋ K562）または陰性（K562 WT）のいずれかのaAPCとともに共培養し、抗原特異的応答を評価した。抗原に応答して、CAR T細胞は活性化マーカーCD25および4-1BB（CD137）を上方調節し、（D）また、T細胞は複数のサイトカインおよび脱顆粒マーカーCD107aを発現した。プロットはすべて、CD45＋CD7＋CD8＋に対してゲーティングしている。（E）同じトリプル遺伝子ノックインストラテジーを用いて生成させたが異なるCAR構築物を発現するTCRαβ-CD3- SP8 CAR T細胞の特性評価。第1のT-iPSC株は、GZMAによりロングヒンジスペーサー（LH）およびCD28共刺激ドメイン（CD28CS）を含むCD19 CARを発現する。第2のT-iPSC株、はGZMAによりロングスペーサーなし（SH＝ショートヒンジ）および4-1BB共刺激ドメイン（41BB）を含むCD19 CARを発現する。どちらの細胞株も、同様のレベルの典型的なナイーブ成熟T細胞マーカーを発現するTCRαβ-CD

3-SP8 CAR T細胞を生成させることができた。
【図１４Ｂ】図14Aの説明を参照のこと。
【図１４Ｃ】図14Aの説明を参照のこと。
【図１４Ｄ】図14Aの説明を参照のこと。
【図１４Ｅ】図14Aの説明を参照のこと。
【発明を実施するための形態】
【００５２】
実例的態様の説明
I. 序論
本開示により、外来遺伝子の発現を成熟T細胞に制限することによる、通常のT細胞分化に有害である導入遺伝子、例えばFOXP3およびCARを発現させることの問題の解決策を提供する。本発明者らは、グランザイムA（GZMA）を、インビトロおよび正常胸腺内でのT細胞分化の際に緊密に調節されるステージ特異的発現を有する内在性遺伝子と特定した。本発明者らは、多能性幹細胞（PSC）内においてGZMAの下流にレポーター遺伝子を挿入し、分化の際の発現が成熟CD8＋CD3＋TCRab＋CD4-（SP8）および成熟CD4＋ CD3＋TCRab＋CD8-（SP4）T細胞に高度に制限されることを実証した（図3）。また、本発明者らは、CAR19構築物をPSCのGZMA遺伝子座に挿入し、高レベルの該CAR構築物を発現する成熟T細胞の通常の分化を実証している（図4）。したがって、このアプローチは、本明細書に記載の、および当技術分野において公知の成熟T細胞の前駆体である任意の型の多能性細胞もしくは多分化能細胞またはリンパ球系細胞を使用するインビトロ分化手法に適用することができよう。
【００５３】
II. 定義
用語「導入遺伝子」は、細胞内にインビトロで移入される（すなわち、遺伝子導入/形質導入/トランスフェクション手法により）遺伝子を示す。導入遺伝子は、細胞内で天然に発現されない遺伝子、例えばCARまたは操作されているTCRであり得る。
【００５４】
用語「キメラ抗原受容体」または「CAR」は、免疫エフェクター細胞に自由裁量の特性部分がグラフトされている操作されている受容体を示す。このような受容体は、T細胞にモノクローナル抗体の特異性部分をグラフトするために使用され;そのコード配列の移入は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によって容易になされる。該受容体は、異なる供給源に由来する部分から構成されるためキメラと称される。このような分子の最も一般的な形態は、モノクローナル抗体に由来する単鎖可変領域フラグメント（scFv）がCD3-ゼータ膜貫通ドメインおよびエンドドメイン;CD28もしくは41BB細胞内ドメインまたはそれらの組み合わせと融合された融合体である。かかる分子により、scFvによるその標的の認識に応答したシグナルの伝達がもたらされる。かかる構築物の一例は、ハイブリドーマ14g2a（これはジシアロガングリオシドGD2を認識する）に由来するscFvの融合体である14g2a-ゼータである。T細胞がこの分子を発現すると（通常、オンコレトロウイルスベクターでの形質導入によりなされる）、該細胞は、GD2を発現する標的細胞（例えば、神経芽細胞腫細胞）を認識して死滅させる。悪性B細胞を標的とするため、研究者らは、T細胞の特異性部分を、B細胞系統分子であるCD19に特異的なキメラ免疫受容体を用いて再指向させた。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の可変部分をフレキシブルリンカーによって融合させてscFvを形成する。このscFvの前に、生成中のタンパク質を小胞体に指向し、その後の表面発現を指令するシグナルペプチド（これは切断される）が存在する。フレキシブルスペーサーは、抗原結合が可能となるようにscFvがいろいろな方向に向くことを可能にする。膜貫通ドメインは、通常、細胞内に突き出て所望のシグナルを伝達するシグナル伝達エンドドメインの元の分子に由来する典型的な疎水性アルファヘリックスである。
【００５５】
用語「抗原」は、免疫系に抗体を産生させることを引き起こす任意の物質またはT細胞

が応答する任意の物質を示す。抗原は、5～50個のアミノ酸の長さであるペプチド、または少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250もしくは300個、多くとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250もしくは300個、または厳密に5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250もしくは300個のアミノ酸、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲であるペプチドであり得る。

【００５６】

用語「レシピエントに対して同種異系」とは、該レシピエントから単離されたものでない細胞を示すことを意図する。該細胞は、患者から単離されたものでない細胞であり得る。該細胞は、遺伝的にマッチした個体（例えば、適合性の遺伝子型を有する親類）から単離されたものでない細胞であり得る。

【００５７】

用語「ゼノフリー（XF）」または「動物性成分フリー（ACF）」または「アニマルフリー」は、培地、細胞外マトリックス、または培養条件に関して使用する場合、本質的に異種動物由来の成分がない培地、細胞外マトリックスまたは培養条件を示す。ヒト細胞の培養では、非ヒト動物、例えばマウスの任意のタンパク質が異物成分となり得る。ゼノフリーマトリックスは任意の非ヒト動物由来の成分を本質的に含まなくてもよく、したがって、マウスフィーダー細胞またはMatrigel（商標）は除外される。Matrigel（商標）は、ラミニン（主成分）、IV型コラーゲン、ヘパリン硫酸プロテオグリカンおよびエンタクチン/ニドゲンを含む、細胞外マトリックスタンパク質が豊富な腫瘍であるEngelbreth-Holm-Swarm（EHS）マウス肉腫から抽出された可溶化基底膜調製物である。

【００５８】

用語「規定された（defined）」とは、培地、細胞外マトリックスまたは培養条件に関して使用する場合、ほぼすべての成分の性質および量が既知である培地、細胞外マトリックス、または培養条件を示す。

【００５９】

「既知組成（chemically defined）培地」は、ほぼすべての含有成分の化学的性質およびその量が既知である培地を示す。また、このような培地は合成培地とも称される。既知組成培地の例としてはTeSR（商標）が挙げられる。

【００６０】

細胞が、ある特定の試薬または要素、例えば血清、シグナル伝達阻害剤、動物性成分またはフィーダー細胞、外来性遺伝要素またはベクター要素を「実質的に含まない」とは、本明細書において使用する場合、該細部が10％未満の該要素を有する場合であり、ある特定の試薬または要素を「本質的に含まない」とは、該細胞が1％未満の該要素（1つまたは複数）を有する場合である。しかしながら、さらにより望ましいのは、外来性遺伝要素またはベクター要素を構成しているのが全細胞集団の0.5％未満または0.1％未満である細胞集団である。

【００６１】

培養物、マトリックスまたは培地が、ある特定の試薬または要素、例えば血清、シグナル伝達阻害剤、動物性成分、またはフィーダー細胞を「本質的に含まない」とは、該培養物、マトリックス、または培地がそれぞれ、当業者に公知の慣用的な検出方法を用いて検出可能なレベルより低いレベルのこのような試薬を有する場合、あるいはこのような薬剤が該培養物、マトリックス、または培地に外因的に添加されていない場合である。無血清培地は、血清を本質的に含まなくてもよい。

【００６２】

「末梢血細胞」は、循環血液プール内にみられる血液の細胞性成分、例えば赤血球、白血球および血小板を示す。

【００６３】

「造血幹および前駆細胞」または「造血前駆体細胞」は、造血細胞系統になるように決められているが造血系へのさらなる分化を行なうことができる細胞を示し、造血幹細胞、多重潜在能造血幹細胞（血球芽細胞）、骨髄球系前駆細胞、巨核球前駆細胞、赤血球前駆細胞およびリンパ球系前駆細胞が挙げられる。「造血幹細胞（ＨＳＣ）」は、あらゆる血液細胞型、例えば骨髄球系（単球およびマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球/血小板、樹状細胞）ならびにリンパ球系の細胞系統（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）をもたらす多分化能幹細胞である。

【００６４】

「ベクター」または「構築物」（場合によっては、遺伝子送達または遺伝子導入の「媒体」と称される）は、宿主細胞にインビトロまたはインビボのいずれかで送達されるポリヌクレオチドを含む巨大分子、分子の複合体またはウイルス粒子を示す。該ポリヌクレオチドは線状分子であっても環状分子であってもよい。

【００６５】

「プラスミド」は、一般的な型のベクターであり、染色体ＤＮＡとは独立して複製することができる染色体ＤＮＡとは別個の染色体外ＤＮＡ分子である。一部の特定の場合では、これは環状および二本鎖である。

【００６６】

「発現構築物」または「発現カセット」により、転写を指令することができる核酸分子を意図する。発現構築物は少なくとも、プロモーターまたはプロモーターと機能的に等価な構造物を含む。また、さらなる要素、例えばエンハンサーおよび/または転写終結シグナルも含められ得る。

【００６７】

用語「～に対応する」とは、本明細書において、ポリヌクレオチド配列が参照ポリヌクレオチド配列の全部または一部分と相同である（すなわち、厳密に進化的に関連していないが同一である）こと、あるいはポリペプチド配列が参照ポリペプチド配列と同一であることを意味するために使用される。これに対して、用語「～に相補的な」とは、本明細書において、相補的な配列が参照ポリヌクレオチド配列の全部または一部分と相同であることを意味するために使用される。実例として、ヌクレオチド配列「ＴＡＴＡＣ」は参照配列「ＴＡＴＡＣ」に対応し、参照配列「ＧＴＡＴＡ」に相補的である。

【００６８】

ある特定のタンパク質「をコードする」「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「コード領域」、「配列」、「セグメント」、「断片」、または「導入遺伝子」は、適切な調節配列の制御下に配置されている場合、インビトロまたはインビボで転写され、また任意で遺伝子産物、例えばポリペプチドに翻訳される核酸分子である。コード領域はｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡまたはＲＮＡのいずれかの形態で存在し得る。ＤＮＡの形態で存在する場合、核酸分子は一本鎖（すなわち、センス鎖）であっても二本鎖であってもよい。コード領域の境界部は5'（アミノ）末端の開始コドンと3'（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンによって決定される。遺伝子としては、限定するわけではないが、原核生物または真核生物のｍＲＮＡのｃＤＮＡ、原核生物または真核生物のＤＮＡのゲノムＤＮＡ配列および合成ＤＮＡ配列が挙げられ得る。転写終結配列は通常、遺伝子配列の3'側に位置する。

【００６９】

用語「細胞」は、本明細書において当技術分野におけるその最も広い意味で使用され、多細胞生物体の組織の構造単位であり、外部と隔離する膜構造に囲まれており、自己複製できる能力を有し、遺伝情報およびそれを発現させる機構を有する生体物を示す。本明細書において使用される細胞は天然に存在する細胞であってもよく、人為的に修飾された細胞（例えば、融合細胞、遺伝子修飾された細胞など）であってもよい。

【００７０】

本明細書において使用する場合、用語「幹細胞」は、自己複製および多能性または多分化能の能力をもつ細胞を示す。典型的には、幹細胞は損傷した組織を再生させることができる。本明細書における幹細胞は、限定するわけではないが、胚性幹（ＥＳ）細胞、人工

多能性幹細胞、または組織幹細胞（組織特異的幹細胞もしくは体性幹細胞とも称される）であり得る。

【００７１】

「胚性幹（ＥＳ）細胞」は、初期胚に由来する多能性幹細胞である。ＥＳ細胞は１９８１年に最初に樹立され、また、１９８９年からノックアウトマウスの作製に応用されている。１９９８年に、ヒトＥＳ細胞が樹立され、現在、再生医療に利用可能となっている。

【００７２】

ＥＳ細胞とは異なり、組織幹細胞が有する分化潜在能は限定的である。組織幹細胞は組織内の特定の場所に存在し、未分化細胞内構造を有する。したがって、組織幹細胞の多能性は典型的には低い。組織幹細胞は高い核/細胞質比を有し、細胞内オルガネラが少ない。ほとんどの組織幹細胞は、個体の生涯を超えて低い多能性、長い細胞周期および増殖能力を有する。組織幹細胞は、その細胞が由来する部位に基づいて、例えば皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などのカテゴリーに分けられる。皮膚系の組織幹細胞としては、表皮幹細胞、毛包幹細胞などが挙げられる。消化器系の組織幹細胞としては、膵（共通）幹細胞、肝臓幹細胞などが挙げられる。骨髄系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞などが挙げられる。神経系の組織幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。

【００７３】

「人工多能性幹細胞」は、一般的にｉＰＳ細胞またはｉＰＳＣと略記され、非多能性細胞、典型的には成体の成体体細胞または最終分化細胞、例えば線維芽細胞、造血細胞、筋細胞、神経細胞、表皮細胞などから、リプログラミング因子と称される特定の因子を導入することによって人為的に調製された型の多能性幹細胞を示す。

【００７４】

「多能性」は、幹細胞が1つまたは複数の組織もしくは器官または特に3つの胚葉:内胚葉（胃の内膜、消化管、肺）、中胚葉（筋肉、骨、血液、尿生殖）もしくは外胚葉（表皮組織および神経系）のうちのいずれかを構成するあらゆる細胞に分化する潜在能を有することを示す。本明細書において使用される「多能性幹細胞」は、この3つの胚葉のうちのいずれかに由来する細胞に分化し得る細胞、例えば全能性細胞の直系の子孫または人工多能性細胞を示す。

【００７５】

本明細書において使用される「胚性中胚葉前駆細胞」または「ＥＭＰ細胞」は、中胚葉に拘束されている造血幹および前駆細胞、胚性幹細胞（ＥＳＣ）ならびに人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を含み得る多能性幹細胞（ＰＳＣ）を示す。中胚葉への拘束は上皮間葉転換（ＥＭＴ）によって、および細胞表面タンパク質ＥｐＣＡＭ/ＣＤ３２６とＮＣＡＭ/ＣＤ５６の発現における相互変化によって起始される。ＥＭＰ細胞は、ＥＭＰ ＣＤ３２６-ＣＤ５６＋であるとさらに定義され得る。ＥＭＰ ＣＤ３２６$^{-}$ＣＤ５６$^{+}$細胞は、ＰＳＣを、限定するわけではないがアクチビンＡ、ＢＭＰ４、ＶＥＧＦ、ＦＧＦ２のうちの1つまたは複数、およびそれらの組み合わせなどの成分の存在下で培養することによって生成し得る。

【００７６】

核酸分子に対して「機能的に連結される」ことにより、2つ以上の核酸分子（例えば、転写される核酸分子、プロモーターおよびエンハンサーエレメント）が、該核酸分子の転写を可能にするような様式で連結されることを意図する。ペプチドおよび/またはポリペプチド分子に対して「機能的に連結される」とは、2つ以上のペプチドおよび/またはポリペプチド分子が、単一のポリペプチド鎖、すなわち融合ポリペプチドであって該融合体の各ペプチドおよび/またはポリペプチド成分の少なくとも1つの特性を有するものをもたらすような様式で連結されることを意図する。該融合ポリペプチドは特にキメラである、すなわち異種分子で構成される。

【００７７】

III. 導入遺伝子

該導入遺伝子、第1の導入遺伝子または第2の導入遺伝子は抗原ターゲティング分子、

例えばCARまたはTCRを含み得る。本開示のCARおよび/またはTCRによって標的とされ得る腫瘍抗原の非限定的な例としては、少なくとも以下のもの:分化抗原、例えばチロシナーゼ、TRP-1、TRP-2および腫瘍特異的多重細胞系統抗原、例えばMAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、pi 5;過剰発現される胚性抗原、例えばCEA;過剰発現される癌遺伝子および変異型腫瘍抑制遺伝子、例えばp53、Ras、HER-2/neu;染色体転座により生じるユニークな腫瘍抗原;例えばBCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;ならびにウイルス抗原、例えばエプスタイン-バーウイルス抗原EBVAおよびヒトパピローマウイルス（HPV）抗原E6とE7が挙げられる。他の大型タンパク質主体の抗原としては、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm- 23H1、PSA、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、ベータ-カテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、アルファ-フェトプロテイン、ベータ-HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3＼CA 27.29＼BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68＼P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733＼EpCAM、HTgp- 175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCASI、SDCCAG1 6、TA- 90＼Mac-2結合タンパク質＼シクロフィルム（cyclophilm）C結合型タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、GPC3、MUC16、MUC18、LMP1、EBMA-1、BARF-1、CS1、CD319、HER1、B7H6、L1 CAM、IL6およびMETが挙げられる。

【００７８】

また腫瘍抗原としては、例えば、神経膠腫関連抗原、癌胎児性抗原（CEA）、EGFRvlll、IL-IIRa、IL-13Ra、EGFR、FAP、B7H3、Kit、CA LX、CS-1、MUC1、BCMA、bcr-abl、HER2、b-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン（AFP）、ALK、CD19、サイクリンBl、レクチン反応性AFP、Fos関連抗原1、ADRB3、サイログロブリン、EphA2、RAGE-1、RUI、RU2、SSX2、AKAP-4、LCK、OY-TESI、PAX5、SART3、CLL-1、フコシルGM1、GloboH、MN-CA IX、EPCAM、EVT6- AML、TGS5、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、ポリシアル酸、PLAC1、RUI、RU2（AS）、腸のカルボキシルエステラーゼ、ルイスY、sLe、LY6K、mut hsp70-2、M-CSF、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIBI、BORIS、プロスターゼ、前立腺特異的抗原（PSA）、PAX3、PAP、NY-ESO-1、LAGE-la、LMP2、NCAM、p53、p53変異型、Ras変異型、gpl00、プロステイン、OR51 E2、PANX3、PSMA、PSCA、Her2/neu、hTERT、HMWMAA、HAVCR1、VEGFR2、PDGFR-ベータ、サバイビンおよびテロメラーゼ、レグマイン、HPV E6,E7、精子タンパク質17、SSEA-4、チロシナーゼ、TARP、WT1、前立腺癌腫瘍抗原-1（PCTA-1）、ML-IAP、MAGE、MAGE-A1.MAD-CT-1、MAD-CT-2、メランA/MART 1、XAGE1、ELF2M、ERG（TMPRSS2 ETS融合遺伝子）、NA17、好中球エラスターゼ、肉腫の転座切断点、NY-BR-1、ephnnB2、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD97、CD171、CD179a、アンドロゲン受容体、FAP、インスリン成長因子（IGF）-I、IGFII、IGF-I受容体、GD2、o-アセチル-GD2、GD3、GM3、GPRC5D、GPR20、CXORF61、葉酸受容体（FRa）、葉酸受容体ベータ、ROR1、Flt3、TAG72、TN Ag、Tie 2、TEM1、TEM7R、CLDN6、TSHR、UPK2、メソテリンならびにその任意の組み合わせも挙げられる。

【００７９】

CARおよび/またはTCRが指向され得る腫瘍細胞抗原のさらなる例としては、例えば、少なくとも5T4、8H9、$\alpha_v\beta_6$インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CD133、CEA、c-Met、CSPG4、EGFR、EGFRファミリー、例えばErbB2（HER2）、EGFRvIII、EGP2、EGP40、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、EPCAM、EphA2、EpCAM、葉酸受容体-a、FAP、FBP、胎児性AchR、FRα、GD2、G250/CAIX、GD3、グリピカン-3（GPC3）、GUCY2C、HER1、HER2、ICAM-1、IL-13Rα2、IL-11Rα、Kras、Kras G12D、L1CAM、ラムダ、ルイス-Y、カッパ、KDR、MAGE、MCSP、MET、メソテリン、Muc1、Muc16、MUC

18、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSC1、PSCA、PSMA、ROR1、SP17、サバイビン、TAG72、TEM、癌胎児性抗原、HMW-MAA、AFP、CA-125、ETA、チロシナーゼ、MAGE、ラミニン受容体、HPV E6、E7、BING-4、カルシウム活性化クロライドチャネル2、サイクリン-B1、9D7、EphA3、テロメラーゼ、SAP-1、BAGEファミリー、CAGEファミリー、GAGEファミリー、MAGEファミリー、SAGEファミリー、XAGEファミリー、NY-ESO-1/LAGE-1、PAME、SSX-2、メラン-A/MART-1、GP100/pmel17、TRP-1/-2、P.ポリペプチド、MC1R、前立腺特異的抗原、β-カテニン、BRCA1/2、CML66、フィブロネクチン、MART-2、TGF-βRII、WT-1またはVEGF受容体（例えば、VEGFR2）が挙げられる。CARは第1、第2、第3またはそれ以降の世代のCARであり得る。CARは任意の2つの非同一抗原に対して二重特異性であってもよく、2つより多くの非同一抗原に対して特異的であってもよい。

【００８０】

本開示のCARおよび/またはTCRによって標的とされ得る細菌抗原の非限定的な例としては、少なくとも以下のもの:エロモナスアミノペプチダーゼ;アルスロバクター・グロビフォルミス（Arthrobacter globiformis）モザイクタンパク質;アルスロバクター・グロビフォルミスDMGOタンパク質;A.グロビフォルミスジメチルグリシンオキシダーゼ;バチルス属菌のインテイン;バチルス属菌のサーモリシン;炭疽菌（Bacillus anthracis）の致死因子;炭疽菌の防御抗原PA63;B.アンシラシス（B. anthracis）の防御抗原;B.サーキュランス（B. circulans）のインテイン;B.ポリミキシンBペプチド;B.アンシラシスの浮腫因子;B.アンシラシスの浮腫因子（S447N変異型形態）;B.アンシラシスの防御抗原PA20;B.アンシラシスの防御抗原PA 63（活性型）;B.チューリンゲンシスのCry1Ab毒素;ボレリア属菌のOspA;ボレリア・ブルグドルフェリ（Borrelia Burgdorferi）のNapA;ボレリア属菌のBmpA;ボレリア属菌のP41;ボレリア属菌のp45;B.ブルグドルフェリのOspC;B.ブルグドルフェリのOspA;B.ブルグドルフェリのP41;B.ブルグドルフェリのP41;B.ブルグドルフェリのB31;B.ブルグドルフェリのP100;B.ブルグドルフェリのDbpA;B.ブルグドルフェリのBmpA;B.ブルグドルフェリのDbpB;B.ガリニ（B. garinii）;B.ガリニのP58;B.スピエルマニ（spielmanii）のOspC;B.ブルグドルフェリグレード2;B.アボルタス（B. abortus）;B.パーツシス（B. pertussis）の毒素;B.パーツシス;B.パーツシスのFHA;B.パーツシスの165 LPS;B.パーツシスのアデニル酸シクラーゼ抗原;B.パーツシスの百日咳毒素サブユニット、Aプロモーター;B.パーツシスのパータクチン;B.パーツシスのフィムブリエ2/3;B.パーツシスのアデニル酸シクラーゼトキソイド;百日咳菌（Bordetella pertussis）の全菌体（東浜I株）;百日咳菌、リポ多糖;C.ジェジュニ（C. jejuni）;C.アルビカンス（C. albicans）のエノラーゼ;カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）;C.ニューモニエ（C. Pneumoniae）の外膜タンパク質VD3;C.ニューモニエ（C. pneumoniae）;クラミジア・トラコマチス（Chlamydia trachomatis）のMOMP;クラミジア・トラコマチス（Chlamydia Trachomatis）抗原;クラミジア・トラコマチスのHSP70タンパク質;C.トラコマチス（C. Trachomatis）の外膜タンパク質;C.トラコマチスのHSP70;C.トラコマチス;C.トラコマチスのMOMP;C.トラコマチスのLGV II;C.トラコマチスのPGP-3D;C.トラコマチスの活性MOMP;クラミジア・トラコマチスのMOMPタンパク質;C.トラコマチスの活性MOMP;C.トラコマチスの活性HSP70;C.トラコマチスのW4 MOMP;C.トラコマチスのW5 MOMP;C.トラコマチスのMOMP、E78;クロストリジウム・ディフィシル（Clostridium difficile）トキソイドA;クロストリジウム・ディフィシルのバイナリートキシンAサブユニット;クロストリジウム・ディフィシルのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ;クロストリジウム・ディフィシルトキソイドB;C.ボツリナム（C. botulinum）のBoNT-A軽鎖;C.ボツリナムのBoNT-B軽鎖;C.ボツリナムのBoNT-E軽鎖;C.ディフィシル（C. difficile）毒素B、TcdB;C.ボツリナムのBoNT-F軽鎖;C.ディフィシル毒素B;Cl.パラプトリフィカム（Cl. Paraputrificum）のキチナーゼ;C.ボツリナムのC3トキソイド;C.ディフィシル毒素A;C.ディフィシル毒素A（リボタイプ027）;C.ディフィシル毒素A（リボタイプ078）;C.ディフィシル毒素B（リボタイプ027）;C.ディフィシル毒素B（リボタイプ078）;

C.ジフテリアエ（C. diphtheriae）のジフテリアトキソイド;C.ジフテリアエ毒素（変異CRM197）;C.ジフテリアエ毒素;大腸菌（E. Coli）のシャペロンタンパク質fimC;大腸菌GroEL、HSP60;大腸菌GroES、HSP10;大腸菌シャペロンSURA;大腸菌O 158;大腸菌DnaJタンパク質;大腸菌HSP60;大腸菌熱ショックタンパク質1;大腸菌Eco;大腸菌AmpC;大腸菌CoaA;大腸菌GroL;大腸菌GroSタンパク質;大腸菌DnaK;大腸菌DsbAタンパク質;HIV OmpP2;H.ピロリ（H. pylori）;H.ピロリの外膜タンパク質;H.ピロリのCag抗原;H.ピロリのフラジェリンA抗原;H.ピロリのウレアーゼ小サブユニット抗原;H.ピロリのVac（毒素）抗原;ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）のタンパク質;ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼ大サブユニットタンパク質;L.ニューモフィラ（L. pneumophila）;L.インテロガンス（L. interrogans）のLipL32リポタンパク質;L.ビフレクサ（L. biflexa）;L.モノサイトゲネス（L. monocytogenes）のインターナリン;L.モノサイトゲネスのフラジェリン;活性リステリオリシン;マイコバクテリウム属菌;マイコバクテリウム属菌の熱ショックタンパク質65;マイコバクテリウム属菌の熱ショックタンパク質70;マイコバクテリウム属菌のPstS1;マイコバクテリウム属菌の分泌タンパク質;マイコバクテリウム属菌のDESAT6;マイコバクテリウム属菌の熱ショックタンパク質DnaK;マイコバクテリウム属菌のTB Ag85A;結核菌（Mycobacterium Tuberculosis）の早期分泌標的6タンパク質;結核菌（Mycobacterium tuberculosis）のESAT-6;M.ツベルクローシス（M. tuberculosis）のFbpA;M.ツベルクローシス;M.ツベルクローシスのPPDタンパク質;M.ツベルクローシスのオールドツベルクリン;M.ボビス（M. bovis）のHSP65;M.ツベルクローシスの熱ショックタンパク質70;M.ツベルクローシスの熱ショックタンパク質65;M.ツベルクローシスのMTB熱ショックタンパク質;M.ツベルクローシスのMTBリポタンパク質;M.ツベルクローシスのMTB断片およびesat6断片;P.エルギノーサ（P. aeruginosa）の外毒素A;ウレアリチカム（Urealyticum）（血清型3）;チフス菌（Salmonella typhi）のOMP;サルモネラ・ティフィウリウム（Salmonella Typhiurium）;パラチフスA菌（Salmonella paratyphi A）抗原;パラチフスB菌（Salmonella paratyphi B）抗原;サルモネラ・ティフィムリウム（Salmonella typhimurium）抗原;サルモネラ属菌のベータラクタマーゼ;チフス菌のpagC抗原;チフス菌のflag;サルモネラ・ティフィムリウムのウリジンホスホリラーゼ;サルモネラ・ティフィムリウムのフラジェリンタンパク質;サルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota）（R595）リピドA モノホスホリル;サルモネラ・ティフィムリウムのLPS;S.エンテリカ（S. enterica）のフラジェリン;S.ミネソタ（S. minnesota）のLPS;黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）のデルタ溶血毒;黄色ブドウ球菌のプロテアーゼタンパク質;スタフィロコッカス属菌のプロテインA;S.アウレウス（S. aureus）亜種のペニシリン 結合タンパク質2;S.アウレウスのスタフィロキナーゼ;S.アウレウスのプロテインA;S.アウレウス;S.アウレウスのエンテロトキシンB型トキソイド;S.アウレウスのHLA;S.アウレウスのHlg B;S.アウレウスのロイコシジン-D;S.アウレウスのロイコシジン-E;S.アウレウスのLukF-PV;S.アウレウスのLukS-PV;S.アウレウスのフェノール可溶性モジュリンアルファ3;S.アウレウスの毒素性ショック症候群毒素-1;S.ニューモニエ（S. pneumoniae）の細胞壁多糖抗原;S.ニューモニエの細胞壁多糖抗原;S.ニューモニエのB（1-4）-ガラクトシダーゼ;ストレプトマイセス・アビジニのストレプトアビジン;C.テタニ（C. tetani）の破傷風トキソイド抗原;C.テタニのTeNT軽鎖;C.テタニ毒素C-フラグメント;T.パリズム（T. Pallidum）のトレポネーマ膜タンパク質A;T.パリズム（T. pallidum）の活性p41;T.パリズムの活性p47;T.パリズムのP17;トレポネーマ膜タンパク質A;T.パリズムの活性p15;T.パリズム抗原;T.パリズムのTp0453抗原;T.パリズムのtpp17;Y.エンテロコリチカ（Y. enterocolitica）（サブタイプO:3）;Y.エンテロコリチカ（血清型O:8）;Y.エンテロコリチカ（血清型O:9）;アルスロデルマ・ベンハミエ（Arthroderma benhamiae）のMEP4;アルスロデルマ・ベンハミエのMEP5;アルスロデルマ・ベンハミエのMEP3;アルスロデルマ・ギプセウム（Arthroderma gypseum）のVPS10;アルスロデルマ・ギプセウムのAMPP;アルスロデルマ・ギプセウムのDAPB;アルスロデルマ・オタエ（Arthroderma otae）のCHO2;ア

ルスロデルマ・オタエのSEY1;アルスロデルマ・オタエのVPS10;スピルリナ・マキシマ（Spirulina maxima）のフェレドキシン;アルスロスピラ・プラテンシス（Arthrospira platensis）のdesA;アスカリス・スーム（Ascaris suum）のATP6;アスカリス・スームのND5;アスカリス・スームのND4L;アスカリス・スームのV型プロトンATPase;アシュビア・ゴシピー（Ashbya gossypii）のPET8;アシュビア・ゴシピーのTIM21;ならびにアシュビア・ゴシピーのATG22が挙げられる。

【００８１】

本開示のCARおよび/またはTCRによって標的とされ得るウイルス抗原の非限定的な例としては、少なくとも以下のもの:アデノウイルス（ADV）;ADV 3型;ADV 5型;ADV 2型ヘキソン;ADV 5型ヘキソン;ADV 40型;ADVグレード2;サイトメガロウイルス（CMV）;CMV AD169;CMVグレード2;CMV Pp28;CMV;CMV Pp38;CMV Pp150;CMV糖タンパク質B;CMV UL80a;CMV P38、P65、P150、P52;コロナウイルススパイク糖タンパク質;ヒトSARSコロナウイルス核タンパク質;コロナウイルスヌクレオカプシド229Eタンパク質;SARSコロナウイルススパイク糖タンパク質2;イヌコロナウイルス（1-71株）抗原;ネココロナウイルス（WSU 79-1146株）抗原;SARSコロナウイルスモザイクスパイク糖タンパク質2;SARS Mタンパク質;SARSヌクレオカプシド;SARSスパイクタンパク質;SARSエンベロープタンパク質;SARS S1;SARS S2;SARSコアタンパク質;SARSマトリックスタンパク質;コクサッキーウイルス（B5）;コクサッキーウイルス（B1）;コクサッキーウイルス（B6）;コクサッキーウイルスB1（ツーソン（tucson）株）VP1;コクサッキーウイルスB6タンパク質（シュミット株）;デングウイルス（DENV）;デングウイルスサブタイプ-2エンベロープタンパク質;DENV;DENV 2型前駆膜;DENV 2型;DENV 1型カプシド;DENV 2型カプシド;DENV 3型カプシド;DENV 4型カプシド;DENV 4型PreM/M;DENV 1型PreM/M;DENV 2型PreM/M;DENV 3型PreM/M;DENVエンベロープタンパク質1;DENV 1型エンベロープタンパク質;DENV 2型エンベロープタンパク質;DENV 3型エンベロープタンパク質;DENV 4型エンベロープタンパク質;エプスタイン-バーウイルス（EBV）;EBV NA1;EBVモザイクEBNA1タンパク質;EBV;EBV 1型;EBV pg350/220;EBV p18;EBV P23;EBV早期抗原D;EBV 1型核抗原;EBV BFRF3;EBV BMRF1;EBV EBNA1;EBV早期抗原;エンテロウイルス71（EV71）;EV71 VP1;EV71 VP0;エンテロウイルスA Cox A16タンパク質;エンテロウイルスD EV70タンパク質;ザイールエボラ核タンパク質;エボラ-Z核タンパク質;エボラ-S核タンパク質;エボラ-Z糖タンパク質;エボラ-Z VP40;エボラウイルス様粒子;エボラウイルス糖タンパク質;エボラウイルス VP40マトリックスタンパク質;レストンエボラウイルス糖タンパク質;エボラNP抗原;エボラGP（スーダン-ナキサマタ（Nakisamata））;エボラGP（ザイール型）;A型肝炎（HAV）;HAV抗原;HAV P3C;HAV P2C-P3A;HAV VP2-VP4;HAV VP3;HAV VP1-P2A;HAV P2C;HAV P2C-P3B;HAV P2C-P3A;HAV P3C;HAV VP1;HAV VP3;HAV VP4;B型肝炎（HBV）;HBV表面抗原;HBVコア抗原;HBV Pre S1/S2;HBV E抗原;HBV 3型PreS1;HBV 2型PreS2;HBV 3型PreS2;HBV Xタンパク質;HBV表面抗原preS2;HBV PreS1;HBV PreS2;ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）;HCMVインターロイキン10;C型肝炎（HCV）;HCV多重抗原;HCV非構造タンパク質3-3;HCV 1型CORE＋NS3抗原（Cap）;HCV 1型CORE＋NS3抗原（Det）;HCVコア、非構造タンパク質3、非構造タンパク質4、非構造タンパク質5;HCV 2型非構造タンパク質5;HCV 1型コア抗原;HCV 3型コア抗原;HCV 5型コア抗原;HCV 6型コア抗原;HCV 1a型非構造タンパク質5;HCV 1a型非構造タンパク質3;HCV 1a型非構造タンパク質5;HCVヌクレオカプシド、非構造タンパク質3、非構造タンパク質4、非構造タンパク質5;D型肝炎（HDV）;E型肝炎（HEV）;HEV ORF3;HEV ORF2、ORF3;HEVモザイクORF2、ORF3;HEVモザイク-S ORF2、ORF3;HEVモザイクタンパク質;HEVモザイク-Sタンパク質;HEV ORF2;ヒト免疫不全ウイルス（HIV）;HIV-O抗原;HIV-1 IIIB gp120タンパク質;HIV-1 IIIB gp160タンパク質;HIV-1 451 gp120タンパク質;HIV-1 451 gp160タンパク質;HIV-1 IIIB p24タンパク質;HIV-1 gp120およびgp41キメラ抗原;HIV-1 Gp160タンパク質;HIV-1 Gagポリタンパク質Pr55;HIV-1 p1

7タンパク質;HIV-1 p24タンパク質;ヒトパピロームウイルス（Papillomvirus）（HPV）;HPV 16型;HPV16 E6タンパク質;HPV16 E7タンパク質;HPV18 E6タンパク質;HPV18 E7タンパク質;HPV 18型L1タンパク質;HPV 2型、HPV 3型;HPV 18型;HPV 11型;HPV 16型L1タンパク質;HPV 33型L1タンパク質;HPV 6型L1タンパク質;HPV 16型L1タンパク質;単純ヘルペスウイルス（HSV）;HSV 1型;HSV-2 gGペプチド;HSV8 ORF8＆ORF65タンパク質;HSV 1型糖タンパク質;HSV2型糖タンパク質;HSVモザイクタンパク質;HSV 2型;HSV 1型糖タンパク質D;HSV 1型糖タンパク質G;HSV 2型糖タンパク質G;HSV糖タンパク質D;HSV 1型糖タンパク質G1;HSV 1型MacIntyre;HSV 1型グレードIII抗原;ヒトTリンパ向性ウイルス（HTLV）;HTLV 1型、2型;HTLV gp21抗原;HTLV 1型糖タンパク質21;HTLV 1型エンベロープタンパク質;HTLV 1型糖タンパク質46;HTLV 1型モザイク;HTLV 1型p24タンパク質;HTLV糖タンパク質46モザイクタンパク質;HTLVモザイクタンパク質;ヒトT細胞リンパ向性ウイルスI型gp21＋gp46キメラ抗原;ヒトT細胞リンパ向性ウイルスII型gp21＋gp46キメラ抗原;ヒトT細胞リンパ向性ウイルスI＆II型キメラ抗原;インフルエンザA型（IAV）;IAV H2N2核タンパク質タンパク質;組換えIAV H2N2ヘマグルチニンタンパク質;IAV H3N2ヘマグルチニンタンパク質;組換えIAV H3N2ノイラミニダーゼ;IAV HIN1グレード2抗原;IAV H3N2マトリックスタンパク質1;IAV H4N4ヘマグルチニンタンパク質;IAV H4N6ヘマグルチニンタンパク質;組換えIAV H4N8ヘマグルチニンタンパク質;インフルエンザB型（IBV）;インフルエンザB型ウイルス抗原;IBVヘマグルチニン;IBVヘマグルチニン1;IBVマトリックスタンパク質1;IBV核タンパク質;日本脳炎（JEV）;JEVコアタンパク質;JEV PreM/M;MMLV白血病ウイルス逆転写酵素;麻疹ウイルス（MeV）;麻疹ウイルスCタンパク質;麻疹ウイルスラージポリメラーゼ;麻疹ウイルスモザイクタンパク質;MeVヘマグルチニンモザイク;MeVラージポリメラーゼ;MeVポリメラーゼ;MeVヘマグルチニン融合タンパク質;MeVヌクレオカプシド;麻疹グレード2;伝染性軟属腫ウイルス（MCV）;MCV MC148タンパク質;MCV 2型ケモカイン様タンパク質;オルフウイルスVEGFE;パルボウイルスVP2 VLP;パルボウイルスVP2;パルボウイルスVP1;パルボウイルスPep D;パルボウイルスPep C;パルボウイルスPep B;パルボウイルスPep A;パルボウイルスNS1;パルボウイルスB19 VLP VP2;パルボウイルスB19 VP2;パルボウイルスB19非構造タンパク質;パルボウイルスB19、VP1、VP2;パルボウイルスB19;パルボウイルスB19型VLP VP1/VP2コ-カプシド（Co-Capsid）タンパク質;パルボウイルスB19 VP1/2;パルボウイルスB19 VP1;狂犬病ウイルス（RV）;狂犬病ウイルス糖タンパク質;RV M2;RV（MRV株）核タンパク質;RV核タンパク質;呼吸器合胞体ウイルス（RSV）;呼吸器合胞体ウイルス（long株）抗原;Y.エンテロコリチカのGタンパク質;RSV Src;RSV Srcキナーゼ;RSV糖タンパク質;RSV糖タンパク質G;RSV核タンパク質;リフトバレー熱ウイルス（RVFV）;RVFV糖タンパク質;RVFV核タンパク質;RVFV非構造タンパク質;風疹ウイルス（RuV）;RuVグレードIV;RuVエンベロップ（Envelop）タンパク質1;RuVグレード2;RuV K1S;RuV K2S;RuVヌクレオカプシド;RuVカプシド;RuV E1タンパク質;RuV E2タンパク質;RuV E1モザイク;RuVカプシドC;ロタウイルスグレード3;ロタウイルス;ダニ媒介脳炎ウイルス（TBEV）;TBEV gE、TBEV NEタンパク質;TBEV gE、TBEV NE、TBEV GE、TBEV CEタンパク質;TBEV糖タンパク質E;TBEV PreM;TBEVコア抗原;TBEV非構造タンパク質3;TBEV Eペプチド;ダニ媒介脳炎ウイルスgEタンパク質;サル免疫不全ウイルス（SIV）;SIV糖タンパク質120;SIV Gag;SIV P27;SIV Polタンパク質;SIV 1型Nefタンパク質;タバコエッチウイルス（TEV）;TEV N1aタンパク質;TEVコアタンパク質;TEV PreM/M;TEVプロテアーゼタンパク質;EN-TEV活性EN-TEVプロテアーゼ;水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）;VZV糖タンパク質E;VZV ORF9;VZV ORF26;VZV糖タンパク質;VZVグレード2;天然痘ウイルス天然痘CRMB;西ナイルウイルス（WNV）;西ナイルウイルス抗原;西ナイルウイルスpreMタンパク質;西ナイルウイルスNS3プロテアーゼタンパク質;WNVエンベロープタンパク質;WNV PreM;WNV E抗原;WNV非構造タンパク質1;WNV Eタンパク質ペプチド;WNV Eタンパク質ブロックペプチド;WNV Mタンパク質ブロックペプチド;WNV preMブロックペプチド;ジカウイルス

;ジカウイルスエンベロープタンパク質;ジカウイルスNS1タンパク質;ジカウイルス抗原;ジカウイルスH/PF/2013;ジカカプシド;ジカE（ドメインIII）;ジカPre-M;チクングニアウイルス（CHIKV）;チクングニアウイルスgp E1;チクングニアウイルスgp E2;チクングニアウイルスgp VLP;CHIKV E1タンパク質;チクングニアE1抗原;チクングニアE2抗原;チクングニアE1 E2複合抗原;CHIKVカプシドタンパク質;CHIKVエンベロープ抗原2;HTNV Nタンパク質;FIVコア抗原;アストロウイルス1型;hMPV;ムンプスウイルス;HRV 3Cプロテアーゼ;CDV HA;CDVマトリックスタンパク質;フアイヤンシャンウイルスヌクレオカプシド;シュマレンベルクウイルスヌクレオカプシド;CDVヌクレオカプシド;MMTV Pr77;ウイルス性MIP MIP-I;ウイルス性MIP MIP-II;VACV Fcキメラ;CCI Fcキメラ;フィトラッカ・アシノーサ（Phytolacca acinosa）ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質;エコーウイルス9型;MuV;アフリカ豚熱ウイルス（ASFV）;アフリカ豚熱ウイルスp30タンパク質;およびアフリカ豚熱ウイルスp54タンパク質が挙げられる。

【００８２】

IV．本開示の細胞

本開示の細胞には、多能性幹細胞または造血幹もしくは前駆細胞、および成熟T細胞などの成熟細胞などの細胞が含まれる。該導入遺伝子、第1の導入遺伝子、または第2の導入遺伝子を、該プロモーター領域、第1のプロモーター領域、または第2のプロモーター領域、例えば表1の遺伝子のプロモーター領域の転写開始部位の下流に含む多能性幹細胞は、インビトロで成熟細胞型に分化され得る。該細胞の成熟細胞への分化を助長する系および方法では、該幹細胞または前駆細胞とともに共培養される間質細胞が使用され得る。本開示の細胞を以下にさらに説明する。

【００８３】

A．間質細胞

間質細胞は、任意の器官、例えば骨髄、胸腺、子宮粘膜（子宮内膜）、前立腺、および卵巣の結合組織の細胞である。これは、その器官の実質細胞の機能を支える細胞である。中でも線維芽細胞（間葉間質細胞/MSCとしても公知）と周皮細胞は最も一般的な型の間質細胞である。

【００８４】

間質細胞および腫瘍細胞間の相互作用は、がんの増殖および進行に主要な役割を果たすことが知られている。また、局所サイトカインネットワーク（例えば、M-CSF、LIF）を調節することにより、骨髄間質細胞は、ヒトの造血および炎症プロセスに関与することが報告されている。

【００８５】

骨髄、胸腺、および他の造血器官の間質細胞は、細胞-細胞リガンド-受容体の相互作用を介して、かつサイトカインおよびケモカインを含む可溶性因子の放出を介して、造血細胞および免疫細胞の発生を調節する。これらの組織の間質細胞は、幹細胞の維持、細胞系統の特異性および拘束、ならびにエフェクター細胞型への分化を調節するニッチを形成する。

【００８６】

間質は非悪性宿主細胞で構成されている。また、間質細胞は、組織特異的細胞型が、いくつかの場合では腫瘍が増殖し得る細胞外マトリックスを提供する。

【００８７】

B．造血幹および前駆細胞

造血幹および前駆細胞の有意義な医学的潜在能により、胚性幹細胞からの造血前駆細胞の分化のための方法の改善を試みるため、かなりの研究が行なわれてきた。ヒト成人において、主に骨髄に存在する造血幹細胞は、血液系のあらゆる細胞に分化する造血（CD34＋）前駆細胞の異種集団を生じさせる。成人ヒトにおいて、造血前駆細胞は毎日、増殖および分化して数千億個の成熟血液細胞の生成をもたらす。また、造血前駆細胞は臍帯血中にも存在する。インビトロでは、ヒト胚性幹細胞を造血前駆細胞に分化させ得る。また、造血前駆細胞は、後述するように末梢血の試料から拡大増殖または濃縮させてもよい。造

血細胞は、ヒト起源、マウス起源、または任意の他の哺乳動物種のものであり得る。

【００８８】

造血前駆細胞の単離は、任意の選択方法、例えばセルソーター、抗体コート磁性ビーズを用いた磁気分離、充填カラム;アフィニティークロマトグラフィー;モノクローナル抗体と連接されているか、もしくはモノクローナル抗体とともに使用される細胞傷害剤、例えば限定するわけではないが、補体および細胞毒素;ならびに固相マトリックス、例えばプレートに結合させた抗体を用いた「パニング」または任意の他の簡便な手法を含む。

【００８９】

分離または単離手法の使用は、限定するわけではないが、物理における差に基づいたもの（密度勾配遠心分離および対向流遠心溶出法）、細胞表面の差に基づいたもの（レクチンおよび抗体の親和性）、ならびに生体染色特性の差に基づいたもの（ミトコンドリア結合色素rho123およびDNA結合色素Hoechst 33342）を含む。精密な分離をもたらす手法としては、限定するわけではないが、FACS（蛍光活性化細胞選別）またはMACS（磁気活性化細胞選別）が挙げられ、これらはさまざまな精巧度、例えば複数のカラーチャネル、小角および鈍角光散乱検出チャネル、インピーダンスチャネルなどを有し得る。

【００９０】

先の手法または細胞型の純度をアセスメントするために使用される手法（例えば、フローサイトメトリー）において利用される抗体は、同定可能な薬剤、例えば限定するわけではないが、酵素、磁性ビーズ、コロイド状の磁性ビーズ、ハプテン、蛍光色素、金属化合物、放射性の化合物、薬物またはハプテンにコンジュゲートされ得る。抗体にコンジュゲートされ得る酵素としては、限定するわけではないが、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼおよびβ-ガラクトシダーゼが挙げられる。抗体にコンジュゲートされ得る蛍光色素としては、限定するわけではないが、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、フィコエリトリン、アロフィコシアニン、およびテキサスレッドが挙げられる。抗体にコンジュゲートされ得るさらなる蛍光色素については、Haugland, Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals（1992-1994）を参照されたい。抗体にコンジュゲートされ得る金属化合物としては、限定するわけではないが、フェリチン、金コロイド、および特にコロイド状の超常磁性ビーズが挙げられる。抗体にコンジュゲートされ得るハプテンとしては、限定するわけではないが、ビオチン、ジゴキシゲニン、オキサザロン、およびニトロフェノールが挙げられる。抗体にコンジュゲートされ得るかまたは組み込まれ得る放射性化合物は当技術分野で公知であり、限定するわけではないが、テクネチウム99m（99TC）、125I、ならびに任意の放射性核種、例えば限定するわけではないが、14C、3H、および35Sを含むアミノ酸が挙げられる。

【００９１】

精密な分離を可能にする正の選択のための他の手法、例えばアフィニティーカラムなどが使用されてもよい。該方法は、非標的細胞集団の残存量が約20％未満、好ましくは約5％未満になるまでの除去を可能にするべきである。

【００９２】

細胞は、光散乱特性ならびにその種々の細胞表面抗原の発現に基づいて選択され得る。精製される幹細胞は、FACS解析によって、低度の側方散乱および低度から中程度の前方散乱プロファイルを有する。サイトスピン調製物は、成熟リンパ球系細胞と成熟顆粒球との間のサイズを有する濃縮された幹細胞を示す。

【００９３】

また、$CD34^+$細胞の播種集団を、培養前に、例えばSutherland et al.（1992）の米国特許第4,714,680号に記載された方法を用いて濃縮することも可能である。例えば、細胞は、細胞系統特異的マーカーを発現する細胞を除去するための負の選択に供される。細胞集団は、非$CD34^+$造血細胞および/または特定の造血細胞サブセットの枯渇のための負の選択に供され得る。負の選択は、さまざまな分子、例えば、T細胞マーカー、例えばCD2、CD4、およびCD8;B細胞マーカー、例えばCD10、CD19、およびCD20;単

球マーカーCD14;NK細胞マーカーCD2、CD16、およびCD56、または任意の細胞系統特異的マーカーの細胞表面発現を基準にして行なわれ得る。負の選択は、例えばMACSまたはカラム分離による他の細胞型の分離のために使用され得る抗体のカクテル（例えば、CD2、CD3、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123、およびCD235a）などのさまざまな分子の細胞表面発現を基準にして行なわれ得る。

【００９４】

本明細書において使用する場合、細胞系統陰性（LIN-）は、細胞系統拘束細胞と関連している少なくとも1つのマーカー、例えば、T細胞と関連しているマーカー（例えば、CD2、3、4、および8）、B細胞と関連しているマーカー（例えば、CD10、19、および20）、骨髄球系細胞と関連しているマーカー（例えば、CD14、15、16、および33）、ナチュラルキラー（「NK」）細胞と関連しているマーカー（例えば、CD2、16、および56）、RBCと関連しているマーカー（例えば、グリコホリンA）、巨核球と関連しているマーカー（CD41）、肥満細胞、好酸球もしくは好塩基球と関連しているマーカーまたは他のマーカー、例えばCD38、CD71、およびHLA-DRがない細胞を示す。好ましくは、細胞系統特異的マーカーとしては、限定するわけではないが、CD2、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD33、CD38、HLA-DR、およびCD71のうちの少なくとも1つが挙げられる。より好ましくは、LIN-としては、少なくともCD14およびCD15が挙げられよう。例えば、c-kit＋またはThy-1＋の正の選択により、さらなる精製を行なってもよい。さらなる濃縮は、ミトコンドリア結合色素ローダミン123の使用およびローダミン＋細胞の選択により、当技術分野において公知の方法によって得られ得る。高度に濃縮された組成物は、$CD34^{+}$、好ましくは$CD34^{+}LIN^{-}$、最も好ましくは$CD34^{+}$ Thy-1^{+} LIN^{-}である細胞の選択的な単離によって得られ得る。幹細胞において高度に濃縮される集団およびそれを得るための方法は当業者に周知であり、例えばPCT/US94/09760、PCT/US94/08574、およびPCT/US94/10501に記載の方法を参照されたい。

【００９５】

細胞系統が特化された細胞を最初に除去することにより細胞を分離するための種々の手法が使用され得る。モノクローナル抗体は、特定の細胞系統および/または分化ステージと関連しているマーカーを同定するのに特に有用である。該抗体は、粗分離を可能にするために固相支持体に結合され得る。使用される分離手法は、収集される画分の生存性の保持を最大限にするものであるのがよい。いろいろな有効性の種々の手法が「比較的粗な」分離を得るために使用され得る。かかる分離は、保持されるべき細胞集団を伴ったままである所望でない細胞が、存在する全細胞の最大10％、通常、約5％以下、好ましくは約1％以下である場合である。使用される具体的な手法は、分離の効率、付随する細胞傷害性、実行の容易さおよびスピード、ならびに精巧な機器および/または技術的熟練の必要性に依存する。

【００９６】

造血前駆細胞の選択は、細胞に特異的なマーカーを用いることのみで行なわれる必要はない。負の選択と正の選択の組み合わせを使用することにより、濃縮された細胞集団を得てもよい。

【００９７】

C. 血液細胞の供給源

造血幹細胞（HSC）は通常、骨髄中に存在するが、末梢血から大量数のHSCを採取するために臨床的に使用される動員と称されるプロセスで、血液中に押し出すことができる。第一選択の動員剤の一例は顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）である。

【００９８】

末梢血中を循環している$CD34^{+}$造血幹細胞または前駆細胞はアフェレーシス手法により非摂動状態で、またはG-CSFなどの造血成長因子の外部投与後の動員後のいずれかで収集され得る。動員後に収集される幹細胞または前駆細胞の数はアフェレーシス後、非摂動状態で得られる数より多い。細胞集団の供給源は、造血幹細胞または前駆細胞がインビ

ボで濃縮される必要がないため、細胞が外因的に適用された因子によって動員されていない対象であり得る。

【００９９】

本明細書に記載の方法における使用のための細胞集団は哺乳動物細胞、例えばヒト細胞、非ヒト霊長類細胞、齧歯類細胞（例えば、マウスもしくはラット）、ウシ細胞、ヒツジ（ovine）細胞、ブタ細胞、ウマ細胞、ヒツジ（sheep）細胞、イヌ細胞およびネコ細胞またはその混合物であり得る。非ヒト霊長類細胞としてはアカゲザル細胞が挙げられる。細胞は動物、例えばヒト患者から得られ得てもよく、細胞株由来のものであってもよい。細胞を動物から得る場合、これはそのまま、例えば非分離状態の細胞（すなわち、混合集団）として使用してもよく;例えば形質転換により培養状態で最初に樹立されたものであってもよく;予備精製方法に供されたものであってもよい。例えば、細胞集団は、細胞表面マーカーの発現に基づいた正または負の選択によって操作されたもの;インビトロもしくはインビボで1つもしくは複数の抗原により刺激されたもの;インビトロもしくはインビボで1つもしくは複数の生物学的修飾剤により処理されたもの;またはこれらのうちのいずれか、もしくは全部の組み合わせであり得る。

【０１００】

細胞集団としては、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、全血または混合集団を含むその分画物、脾臓細胞、骨髄細胞、腫瘍浸潤リンパ球、白血球アフェレーシスによって得られた細胞、生検組織、リンパ節、例えば腫瘍流入リンパ節が挙げられる。好適なドナーとしては、免疫処置されたドナー、免疫処置されていない（未処置）ドナー、処置済または未処置のドナーが挙げられる。「処置済の」ドナーは、1種または複数種の生物学的修飾剤に曝露されたことがあるドナーである。「未処置の」ドナーは、1種または複数種の生物学的修飾剤に曝露されたことがない。

【０１０１】

例えば、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は既報のとおりに、当技術分野において公知の方法に従って得られ得る。かかる方法の例は、Kim et al.（1992）;Biswas et al.（1990）;Biswas et al.（1991）に論考されている。

【０１０２】

また、造血前駆体細胞を細胞集団から得る方法も当技術分野において周知である。造血前駆体細胞を、種々のサイトカイン、例えばhSCF、hFLT3および/またはIL-3（Akkina et al.,1996）を用いて拡大増殖させてもよく、$CD34^+$細胞を、MACSまたはFACSを用いて濃縮してもよい。また、上記のように、負の選択手法を用いて$CD34^+$細胞を濃縮してもよい。

【０１０３】

また、対象から細胞試料を得、次いで所望の細胞型を濃縮することも可能である。例えば、ＰＢＭＣおよび/または$CD34^+$造血細胞は血液から本明細書に記載のようにして単離され得る。また、細胞は他の細胞から、さまざまな手法、例えば、所望の細胞型の細胞表面上のエピトープへの抗体結合による単離および/または活性化を用いて単離することもできる。使用され得る別の方法としては、細胞表面マーカーに対する抗体を使用し、受容体連結による細胞の活性化を伴うことなく特異的細胞型を選択的に濃縮するための負の選択が挙げられる。

【０１０４】

骨髄細胞は、腸骨稜、大腿骨、脛骨、脊椎、肋骨、または他の髄腔から得られ得る。骨髄は患者から取り出され、種々の分離および洗浄手順によって単離され得る。骨髄細胞の単離のための例示的な手順の一例は、以下の工程:（a）骨髄懸濁液の3つの画分への遠心分離および中間画分またはバフィーコートの収集;（b）工程（a）のバフィーコート画分を、分離液、一般的にはFicoll（Pharmacia Fine Chemicals AB社の商標）中にもう一度遠心分離し、骨髄細胞を含む中間画分を収集する;ならびに（c）工程（b）で収集した画分を、再輸血可能な骨髄細胞の回収のために洗浄することを含む。

【０１０５】

D．多能性幹細胞

造血幹および前駆細胞はまた、インビトロでの多能性幹細胞の分化によっても調製され得る。本明細書に記載の方法において使用される細胞は、細胞を成熟細胞に分化させる細胞分化系、例えば人工胸腺オルガノイド（ATO）に直接播種される多能性幹細胞（造血幹および前駆細胞、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞）であり得る。本明細書に記載の方法および組成物に使用される細胞は、PSCの誘導細胞または子孫、例えば限定するわけではないが、中胚葉前駆細胞、血管内皮前駆細胞または造血前駆細胞であり得る。

【０１０６】

多能性幹細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚性幹（ES）細胞であり得る。多能性幹細胞は、体細胞のリプログラミングによって誘導された人工多能性幹細胞であり得る。多能性幹細胞は、体細胞核移植によって誘導された胚性幹細胞であり得る。

【０１０７】

胚性幹（ES）細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性細胞である。ES細胞は、発生中の胚の外側層である栄養外胚葉を除去し、次いで、内部の細胞塊を非増殖細胞のフィーダー層上で培養することによって単離され得る。適切な条件下では、増殖性の未分化ES細胞のコロニーが生じる。このコロニーは取り出され、個々の細胞に解離され、次いで新たなフィーダー層上に再プレーティングされ得る。再プレーティングされた細胞は増殖し続け、未分化ES細胞の新たなコロニーが生じ得る。次いで、この新たなコロニーが取り出され、解離され、再度、再プレーティングされ、培養増殖され得る。未分化ES細胞の「継代培養」または「継代」のこのプロセスが数回反復され、未分化ES細胞を含む細胞株が作製され得る（米国特許第5,843,780号;同第6,200,806号;同第7,029,913号）。「初代細胞培養物」は、組織、例えば胚盤胞の内部細胞塊から直接得られた細胞の培養物である。「継代培養物」は初代細胞培養物に由来する任意の培養物である。

【０１０８】

マウスES細胞を得るための方法は周知である。一例の方法では、129系統のマウス由来の着床前の胚盤胞をマウス抗血清で処理して栄養外胚葉を除去し、内部細胞塊を、化学的に不活化されたマウス胚性線維芽細胞のフィーダー細胞層上で、ウシ胎仔血清を含む培地中にて培養する。発生する未分化ES細胞のコロニーをマウス胚性線維芽細胞のフィーダー層上でウシ胎仔血清の存在下にて継代培養するとES細胞の集団が作製される。いくつかの方法では、サイトカイン白血病抑制因子（LIF）を血清含有培養培地に添加することにより、マウスES細胞をフィーダー層の非存在下で培養増殖させ得る（Smith,2000）。他の方法では、マウスES細胞を、無血清培地中で、骨形成タンパク質およびLIFの存在下で培養増殖させてもよい（Ying et al.,2003）。

【０１０９】

ヒトES細胞は胚盤胞から既報の方法を用いて得られ得る（Thomson et al.,1995;Thomson et al.,1998;Thomson and Marshall,1998;Reubinoff et al.,2000）。一例の方法では、5日目のヒト胚盤胞をウサギ抗ヒト脾臓細胞抗血清に曝露し、次いでモルモット補体の1:5の希釈物に曝露し、栄養外胚葉細胞を溶解させる。溶解した栄養外胚葉細胞をインタクトな内部細胞塊から除去した後、内部細胞塊をガンマ線照射不活性化マウス胚性線維芽細胞のフィーダー層上でウシ胎仔血清の存在下にて培養する。9～15日後、内部細胞塊に由来する細胞の集塊は、化学的（すなわち、トリプシンに曝露）または機械的に解離され、ウシ胎仔血清およびマウス胚性線維芽細胞のフィーダー層を含む新鮮培地中に再プレーティングされ得る。さらに増殖したら、未分化の形態構造を有するコロニーはマイクロピペットによって選択され、機械的に集塊に解離され、再プレーティングされる（米国特許第6,833,269号参照）。ES様形態構造は、明白に高い核細胞質比および顕著な核小体を有するコンパクトなコロニーと特徴付けられる。得られたES細胞は、短時間のトリプシン処理によって、またはマイクロピペットによる個々のコロニーの選択によって常套的に継代され得る。いくつかの方法では、ヒトES細胞は、ES細胞を線維芽細胞のフィーダー層上で塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下にて培養することにより血清なしで培養増殖され得る（Amit et al.,2000）。他の方法では、ヒトES細胞は、細

胞をタンパク質マトリックス上、例えばMatrigel（商標）またはラミニン上で、塩基性線維芽細胞増殖因子を含む「馴化」培地の存在下で培養することによりフィーダー細胞層なしで培養増殖され得る（Xu et al.,2001）。培地は、線維芽細胞とともに共培養することによって事前に馴化させる。

【０１１０】

また、アカゲザルおよびコモンマーモセットのES細胞の単離のための方法も公知である（Thomson,and Marshall,1998;Thomson et al.,1995;Thomson and Odorico,2000）。

【０１１１】

ES細胞の別の供給源は、樹立されたES細胞株である。種々のマウス細胞株およびヒトES細胞株が公知であり、その培養増殖および増殖伝播のための条件は規定されている。例えば、マウスCGR8細胞株は、マウス129系統の胚の内部細胞塊から樹立され、CGR8細胞の培養物はLIFの存在下でフィーダー層なしで培養増殖され得る。さらなる一例として、ヒトES細胞株H1、H7、H9、H13、およびH14は、Thompson et al.によって樹立された。また、H9細胞株のサブクローンH9.1およびH9.2が開発されている。

【０１１２】

ES細胞の供給源は、胚盤胞、胚盤胞の内部細胞塊を培養することにより誘導される細胞、または樹立された細胞株の培養物から得られる細胞であり得る。したがって、本明細書において使用する場合、用語「ES細胞」は、胚盤胞の内部細胞塊の細胞、内部細胞塊の培養物から得られるES細胞、およびES細胞株の培養物から得られるES細胞を示し得る。

【０１１３】

人工多能性幹（iPS）細胞は、ES細胞の特徴を有するが、分化した体細胞のリプログラミングによって得られる細胞である。人工多能性幹細胞は種々の方法によって得られている。一例の方法では、成人ヒト皮膚線維芽細胞が転写因子Oct4、Sox2、c-MycおよびKlf4で、レトロウイルスによる形質導入を用いてトランスフェクトされる（Takahashi et al.,2007）。トランスフェクトされた細胞は、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）が補給された培地中のSNLフィーダー細胞（LIFを産生するマウス細胞の線維芽細胞細胞株）上にプレーティングされる。およそ25日後、ヒトES細胞コロニーに似たコロニーが培養中に出現する。ES細胞様コロニーを採取し、フィーダー細胞上でbFGFの存在下にて拡大増殖させる。

【０１１４】

細胞の特徴に基づくと、ES細胞様コロニーの細胞は人工多能性幹細胞である。人工多能性幹細胞はヒトES細胞と形態学的に類似しており、種々のヒトES細胞マーカーを発現する。また、ヒトES細胞の分化がもたらされることがわかっている条件下で培養増殖させた場合、人工多能性幹細胞は、それに応じて分化する。例えば、人工多能性幹細胞は、神経細胞の構造および神経細胞マーカーを有する細胞に分化し得る。

【０１１５】

別の方法では、ヒト胎児または新生児の線維芽細胞が4つの遺伝子Oct4、Sox2、Nanog、およびLin28で、レンチウイルスによる形質導入を用いてトランスフェクトされる（Yu et al.,2007）。感染後12～20日目、ヒトES細胞の形態構造を有するコロニーが視認可能になる。このコロニーを採取し、拡大増殖させる。このコロニーを構成している人工多能性幹細胞はヒトES細胞と形態学的に類似しており、種々のヒトES細胞マーカーを発現し、マウスに注射後、神経組織、軟骨、および腸管上皮を有する奇形腫を形成する。

【０１１６】

また、マウスから人工多能性幹細胞を調製する方法も公知である（Takahashi and Yamanaka, 2006）。iPS細胞の誘導は典型的には、Soxファミリーのメンバーの少なくとも1つおよびOctファミリーのメンバーの少なくとも1つの発現または該メンバーの少なくとも1つへの曝露を必要とする。SoxおよびOctは、ES細胞の実体を特定する転写調

節ヒエラルキーに対して中心的であると考えられている。例えば、SoxはSox-1、Sox-2、Sox-3、Sox-15、またはSox-18であり得;OctはOct-4であり得る。Nanog、Lin28、Klf4またはc-Mycなどのさらなる因子によってリプログラミング効率が高められ得;具体的なリプログラミング因子セットはSox-2、Oct-4、Nanogおよび任意でLin-28を含むセット;またはSox-2、Oct4、Klf、および任意でc-Mycを含むセットであり得る。

【０１１７】

ES細胞などのiPS細胞は免疫組織化学またはフローサイトメトリーにより、SSEA-1、SSEA-3およびSSEA-4に対する抗体（Developmental Studies Hybridoma Bank, National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda Md.）ならびにTRA-1-60およびTRA-1-81に対する抗体（Andrews et al.,1987）を用いて同定または確認することができる特徴的な抗原を有する。胚性幹細胞の多能性は、およそ$0.5～10\times10^{6}$個の細胞を8～12週齢の雄SCIDマウスの後肢筋内に注射することにより確認することができる。3つの胚葉の各々の少なくとも1つの細胞型を示す奇形腫が発生する。

【０１１８】

E. 胚性中胚葉前駆細胞

胚性中胚葉前駆体（EMP）細胞はPSCに由来する細胞である。EMP細胞は、PSC、例えばESCを、至適濃度のヒトVEGF、bFGF、BMP4および任意でアクチビンAが補給された基礎培地中で培養することにより調製され得る。EMP細胞は、CD326を下方調節し、培養の3.5日目にCD56の細胞表面発現を獲得する細胞集団であり、$CD326^{-}CD56^{+}$ EMPはEMTのプロセスを受けている。カギとなる転写調節因子EMT、Snail-1、Snail-2およびTwistの有意な上方調節は、E-カドヘリンおよびCD326ならびにタイトジャンクション関連遺伝子、例えばクローディン、シンデカンおよびオクルディンの下方調節と整合する。細胞骨格タンパク質の有意な再組織化はビメンチンの上方調節を根拠に記録され得る。また、フィブロネクチン発現の上方調節もみられ得、この細胞外マトリックスタンパク質が細胞遊走の助長において果たす役割と整合する。さらに、$CD326^{-}CD56^{+}$ EMPは、未分化細胞を同定するために多くの場合で使用される細胞表面マーカーCD9およびSSEA-4ならびにESCの多能性と関連している3つのカギとなる転写因子Nanog、Sox-2およびOct-4/Pou5f1の下方調節によって明示されるように、多能性を失っている。$CD326^{-}CD56^{+}$ EMPによる公知の中胚葉マーカーKDR、PDGFR-αおよびCD34の発現は中胚葉誘導後2週間に至るまで増大し続ける。したがって、$CD326^{-}CD56^{+}$ EMPは、PSCから上皮間葉転換のプロセスによって生成する原始細胞集団である。$CD326^{-}CD56^{+}$細胞は、より細胞系統制限された中胚葉集団より前の、中胚葉の完全な潜在能がまだ存在しているときに出現する。

【０１１９】

中胚葉誘導後、$CD326^{-}CD56^{+}$細胞は3.5日目に蛍光活性化細胞選別（FACS）によって単離され、任意で、血管内皮幹細胞、心臓幹細胞または間葉系幹細胞の条件で中胚葉細胞系統にさらに分化させ得る。

【０１２０】

V. 導入遺伝子

A. 抗原ターゲティング導入遺伝子

該導入遺伝子、第1の導入遺伝子または第2の導入遺伝子は抗原ターゲティング分子、例えばCARまたはTCRを含み得る。本開示のCARおよび/またはTCRによって標的とされ得る腫瘍抗原の非限定的な例としては、少なくとも以下のもの:分化抗原、例えばチロシナーゼ、TRP-1、TRP-2および腫瘍特異的多重細胞系統抗原、例えばMAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、pi 5;過剰発現される胚性抗原、例えばCEA;過剰発現される癌遺伝子および変異型腫瘍抑制遺伝子、例えばp53、Ras、HER-2/neu;染色体転座により生じるユニークな腫瘍抗原;例えばBCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;ならびにウイルス抗原、例えばエプスタイン-バーウイルス抗原EBVAおよびヒトパピローマウイルス（HPV）抗原E6とE7が挙げられる。他の大型タンパク質主

体の抗原としては、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm- 23H1、PSA、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、ベータ-カテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、アルファ-フェトプロテイン、ベータ-HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3＼CA 27.29＼BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68＼P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733＼EpCAM、HTgp- 175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCASI、SDCCAG1 6、TA- 90＼Mac-2結合タンパク質＼シクロフィルムC結合型タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、GPC3、MUC16、MUC18、LMP1、EBMA-1、BARF-1、CS1、CD319、HER1、B7H6、L1 CAM、IL6およびMETが挙げられる。

【０１２１】

また腫瘍抗原としては、例えば、神経膠腫関連抗原、癌胎児性抗原（CEA）、EGFRvlll、IL-IIRa、IL-13Ra、EGFR、FAP、B7H3、Kit、CA LX、CS-1、MUC1、BCMA、bcr-abl、HER2、b-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン（AFP）、ALK、CD19、サイクリンBl、レクチン反応性AFP、Fos関連抗原1、ADRB3、サイログロブリン、EphA2、RAGE-1、RUI、RU2、SSX2、AKAP-4、LCK、OY-TESI、PAX5、SART3、CLL-1、フコシルGM1、GloboH、MN-CA IX、EPCAM、EVT6- AML、TGS5、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、プライシアル酸、PLAC1、RUI、RU2（AS）、腸のカルボキシルエステラーゼ、ルイスY、sLe、LY6K、mut hsp70-2、M-CSF、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIBI、BORIS、プロスターゼ、前立腺特異的抗原（PSA）、PAX3、PAP、NY-ESO-1、LAGE-la、LMP2、NCAM、p53、p53変異型、Ras変異型、gpl00、プロステイン、OR51 E2、PANX3、PSMA、PSCA、Her2/neu、hTERT、HMWMAA、HAVCR1、VEGFR2、PDGFR-ベータ、サバイビンおよびテロメラーゼ、レグマイン、HPV E6,E7、精子タンパク質17、SSEA-4、チロシナーゼ、TARP、WT1、前立腺癌腫瘍抗原-1（PCTA-1）、ML-IAP、MAGE、MAGE-A1.MAD-CT-1、MAD-CT-2、メランA/MART 1、XAGE1、ELF2M、ERG（TMPRSS2 ETS融合遺伝子）、NA17、好中球エラスターゼ、肉腫の転座切断点、NY-BR-1、ephnnB2、CD20、CD22、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD97、CD171、CD179a、アンドロゲン受容体、FAP、インスリン成長因子（IGF）-I、IGFII、IGF-I受容体、GD2、o-アセチル-GD2、GD3、GM3、GPRC5D、GPR20、CXORF61、葉酸受容体（FRa）、葉酸受容体ベータ、ROR1、Flt3、TAG72、TN Ag、Tie 2、TEM1、TEM7R、CLDN6、TSHR、UPK2、メソテリンならびにその任意の組み合わせも挙げられる。

【０１２２】

CARおよび/またはTCRが指向され得る腫瘍細胞抗原のさらなる例としては、例えば、少なくとも5T4、8H9、αvβ6インテグリン、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CD133、CEA、c-Met、CSPG4、EGFR、EGFRファミリー、例えばErbB2（HER2）、EGFRvIII、EGP2、EGP40、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、EPCAM、EphA2、EpCAM、葉酸受容体-a、FAP、FBP、胎児性AchR、FR□、GD2、G250/CAIX、GD3、グリピカン-3（GPC3）、GUCY2C、HER1、HER2、ICAM-1、IL-13R□2、IL-11Rα、Kras、Kras G12D、L1CAM、ラムダ、ルイス-Y、カッパ、KDR、MAGE、MCSP、MET、メソテリン、Muc1、Muc16、MUC18、NCAM、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、PRAME、PSC1、PSCA、PSMA、ROR1、SP17、サバイビン、TAG72、TEM、癌胎児性抗原、HMW-MAA、AFP、CA-125、ETA、チロシナーゼ、MAGE、ラミニン受容体、HPV E6、E7、BING-4、カルシウム活性化クロライドチャネル2、サイクリン-B1、9D7、EphA3、テロメラーゼ、SAP-1、BAGEファミリー、CAGEファミリー、GAGEファミリー、MAGEファミリー、SAGEファミリー、XAGEファミリー、NY-ESO-1/LAGE-1、PAME、SSX-2、メラン-A/MART-1、GP100/pmel17、TRP-1/-2、P.ポリペプチド、MC1R、前立腺特異的抗原、β-カテニン、BRCA1/2、CML66、フィブロネクチン、MART-2、TGF-βRII、WT-1

またはVEGF受容体（例えば、VEGFR2）が挙げられる。CARは第1、第2、第3またはそれ以降の世代のCARであり得る。CARは任意の2つの非同一抗原に対して二重特異性であってもよく、2つより多くの非同一抗原に対して特異的であってもよい。

【０１２３】

本開示のCARおよび/またはTCRによって標的とされ得る細菌抗原の非限定的な例としては、少なくとも以下のもの:エロモナスアミノペプチダーゼ;アルスロバクター・グロビフォルミスモザイクタンパク質;アルスロバクター・グロビフォルミスDMGOタンパク質;A.グロビフォルミスジメチルグリシンオキシダーゼ;バチルス属菌のインテイン;バチルス属菌のサーモリシン;炭疽菌の致死因子;炭疽菌の防御抗原PA63;B.アンシラシスの防御抗原;B.サーキュランスのインテイン;B.ポリミキシンBペプチド;B.アンシラシスの浮腫因子;B.アンシラシスの浮腫因子（S447N変異型形態）;B.アンシラシスの防御抗原PA20;B.アンシラシスの防御抗原PA 63（活性型）;B.チューリンゲンシスのCry1Ab毒素;ボレリア属菌のOspA;ボレリア・ブルグドルフェリのNapA;ボレリア属菌のBmpA;ボレリア属菌のP41;ボレリア属菌のp45;B.ブルグドルフェリのOspC;B.ブルグドルフェリのOspA;B.ブルグドルフェリのP41;B.ブルグドルフェリのP41;B.ブルグドルフェリのB31;B.ブルグドルフェリのP100;B.ブルグドルフェリのDbpA;B.ブルグドルフェリのBmpA;B.ブルグドルフェリのDbpB;B.ガリニ;B.ガリニのP58;B.スピエルマニのOspC;B.ブルグドルフェリグレード2;B.アボルタス;B.パーツシスの毒素;B.パーツシス;B.パーツシスのFHA;B.パーツシスの165 LPS;B.パーツシスのアデニル酸シクラーゼ抗原;B.パーツシスの百日咳毒素サブユニット、Aプロモーター;B.パーツシスのパータクチン;B.パーツシスのフィムブリエ2/3;B.パーツシスのアデニル酸シクラーゼトキソイド;百日咳菌の全菌体（東浜I株）;百日咳菌　リポ多糖;C.ジェジュニ;C.アルビカンスのエノラーゼ;カンジダ・アルビカンス;C.ニューモニエの外膜タンパク質VD3;C.ニューモニエ;クラミジア・トラコマチスのMOMP;クラミジア・トラコマチス抗原;クラミジア・トラコマチスのHSP70タンパク質;C.トラコマチスの外膜タンパク質;C.トラコマチスのHSP70;C.トラコマチス;C.トラコマチスのMOMP;C.トラコマチスのLGV II;C.トラコマチスのPGP-3D;C.トラコマチスの活性MOMP;クラミジア・トラコマチスのMOMPタンパク質;C.トラコマチスの活性MOMP;C.トラコマチスの活性HSP70;C.トラコマチスのW4 MOMP;C.トラコマチスのW5 MOMP;C.トラコマチスのMOMP、E78;クロストリジウム・ディフィシルトキソイドA;クロストリジウム・ディフィシルのバイナリートキシンAサブユニット;クロストリジウム・ディフィシルのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ;クロストリジウム・ディフィシルトキソイドB;C.ボツリナムのBoNT-A軽鎖;C.ボツリナムのBoNT-B軽鎖;C.ボツリナムのBoNT-E軽鎖;C.ディフィシル毒素B、TcdB;C.ボツリナムのBoNT-F軽鎖;C.ディフィシル毒素B;Cl.パラプトリフィカムのキチナーゼ;C.ボツリナムのC3トキソイド;C.ディフィシル毒素A;C.ディフィシル毒素A（リボタイプ027）;C.ディフィシル毒素A（リボタイプ078）;C.ディフィシル毒素B（リボタイプ027）;C.ディフィシル毒素B（リボタイプ078）;C.ジフテリアエのジフテリアトキソイド;C.ジフテリアエ毒素（変異CRM197）;C.ジフテリアエ毒素;大腸菌のシャペロンタンパク質fimC;大腸菌GroEL、HSP60;大腸菌GroES、HSP10;大腸菌シャペロンSURA;大腸菌O 158;大腸菌DnaJタンパク質;大腸菌HSP60;大腸菌熱ショックタンパク質1;大腸菌Eco;大腸菌AmpC;大腸菌CoaA;大腸菌GroL;大腸菌GroSタンパク質;大腸菌DnaK;大腸菌DsbAタンパク質;HIV OmpP2;H.ピロリ;H.ピロリの外膜タンパク質;H.ピロリのCag抗原;H.ピロリのフラジェリンA抗原;H.ピロリのウレアーゼ小サブユニット抗原;H.ピロリのVac（毒素）抗原;ヘリコバクター・ピロリのタンパク質;ヘリコバクター・ピロリのウレアーゼ大サブユニットタンパク質;L.ニューモフィラ;L.インテロガンスのLipL32リポタンパク質;L.ビフレクサ;L.モノサイトゲネスのインターナリン;L.モノサイトゲネスのフラジェリン;活性リステリオリシン;マイコバクテリウム属菌;マイコバクテリウム属菌の熱ショックタンパク質65;マイコバクテリウム属菌の熱ショックタンパク質70;マイコバクテリウム属菌のPstS1;マイコバクテリウム属菌の分泌タンパク質;マイコバクテリウム属菌のDESAT6;マイコバクテリウム属菌の熱ショックタンパク質DnaK;マイコバクテリウム属菌のTB Ag8

5A;結核菌の早期分泌標的6タンパク質;結核菌のESAT-6;M.ツベルクローシスのFbpA;M.ツベルクローシス;M.ツベルクローシスのPPDタンパク質;M.ツベルクローシスのオールドツベルクリン;M.ボビスのHSP65;M.ツベルクローシスの熱ショックタンパク質70;M.ツベルクローシスの熱ショックタンパク質65;M.ツベルクローシスのMTB熱ショックタンパク質;M.ツベルクローシスのMTBリポタンパク質;M.ツベルクローシスのMTB断片およびesat6断片;P.エルギノーサの外毒素A;ウレアリチカム（血清型3）;チフス菌のOMP;サルモネラ・ティフィウリウム;パラチフスA菌抗原;パラチフスB菌抗原;サルモネラ・ティフィムリウム抗原;サルモネラ属菌のベータラクタマーゼ;チフス菌のpagC抗原;チフス菌のflag;サルモネラ・ティフィムリウムのウリジンホスホリラーゼ;サルモネラ・ティフィムリウムのフラジェリンタンパク質;サルモネラ・ミネソタ（R595）リピドA モノホスホリル;サルモネラ・ティフィムリウムのLPS;S.エンテリカのフラジェリン;S.ミネソタのLPS;黄色ブドウ球菌のデルタ溶血毒;黄色ブドウ球菌のプロテアーゼタンパク質;スタフィロコッカス属菌のプロテインA;S.アウレウス亜種のペニシリン　結合タンパク質2;S.アウレウスのスタフィロキナーゼ;S.アウレウスのプロテインA;S.アウレウス;S.アウレウスのエンテロトキシンB型トキソイド;S.アウレウスのHLA;S.アウレウスのHlg B;S.アウレウスのロイコシジン-D;S.アウレウスのロイコシジン-E;S.アウレウスのLukF-PV;S.アウレウスのLukS-PV;S.アウレウスのフェノール可溶性モジュリンアルファ3;S.アウレウスの毒素性ショック症候群毒素-1;S.ニューモニエの細胞壁多糖抗原;S.ニューモニエの細胞壁多糖抗原;S.ニューモニエのB（1-4）-ガラクトシダーゼ;ストレプトマイセス・アビジニのストレプトアビジン;C.テタニの破傷風トキソイド抗原;C.テタニのTeNT軽鎖;C.テタニ毒素C-フラグメント;T.パリズムのトレポネーマ膜タンパク質A;T.パリズムの活性p41;T.パリズムの活性p47;T.パリズムのP17;トレポネーマ膜タンパク質A;T.パリズムの活性p15;T.パリズム抗原;T.パリズムのTp0453抗原;T.パリズムのtpp17;Y.エンテロコリチカ（サブタイプO:3）;Y.エンテロコリチカ（血清型O:8）;Y.エンテロコリチカ（血清型O:9）;アルスロデルマ・ベンハミエのMEP4;アルスロデルマ・ベンハミエのMEP5;アルスロデルマ・ベンハミエのMEP3;アルスロデルマ・ギプセウムのVPS10;アルスロデルマ・ギプセウムのAMPP;アルスロデルマ・ギプセウムのDAPB;アルスロデルマ・オタエのCHO2;アルスロデルマ・オタエのSEY1;アルスロデルマ・オタエのVPS10;スピルリナ・マキシマのフェレドキシン;アルスロスピラ・プラテンシスのdesA;アスカリス・スームのATP6;アスカリス・スームのND5;アスカリス・スームのND4L;アスカリス・スームのV型プロトンATPase;アシュビア・ゴシピーのPET8;アシュビア・ゴシピーのTIM21;ならびにアシュビア・ゴシピーのATG22が挙げられる。

【０１２４】

本開示のCARおよび/またはTCRによって標的とされ得るウイルス抗原の非限定的な例としては、少なくとも以下のもの:アデノウイルス（ADV）;ADV 3型;ADV 5型;ADV 2型ヘキソン;ADV 5型ヘキソン;ADV 40型;ADVグレード2;サイトメガロウイルス（CMV）;CMV AD169;CMVグレード2;CMV Pp28;CMV;CMV Pp38;CMV Pp150;CMV糖タンパク質B;CMV UL80a;CMV P38、P65、P150、P52;コロナウイルススパイク糖タンパク質;ヒトSARSコロナウイルス核タンパク質;コロナウイルスヌクレオカプシド229Eタンパク質;SARSコロナウイルススパイク糖タンパク質2;イヌコロナウイルス（1-71株）抗原;ネココロナウイルス（WSU 79-1146株）抗原;SARSコロナウイルスモザイクスパイク糖タンパク質2;SARS Mタンパク質;SARSヌクレオカプシド;SARSスパイクタンパク質;SARSエンベロープタンパク質;SARS S1;SARS S2;SARSコアタンパク質;SARSマトリックスタンパク質;コクサッキーウイルス（B5）;コクサッキーウイルス（B1）;コクサッキーウイルス（B6）;コクサッキーウイルスB1（ツーソン株）VP1;コクサッキーウイルスB6タンパク質（シュミット株）;デングウイルス（DENV）;デングウイルスサブタイプ-2エンベロープタンパク質;DENV;DENV 2型前駆膜;DENV 2型;DENV 1型カプシド;DENV 2型カプシド;DENV 3型カプシド;DENV 4型カプシド;DENV 4型PreM/M;DENV 1型PreM/M;DENV 2型PreM/M;DENV 3型PreM/M;DENVエンベロープタンパク質1;DENV 1型エンベロープタンパク質;DENV 2型エンベロープタンパ

ク質;DENV 3型エンベロープタンパク質;DENV 4型エンベロープタンパク質;エプスタイン-バーウイルス（EBV）;EBV NA1;EBVモザイクEBNA1タンパク質;EBV;EBV 1型;EBV pg350/220;EBV p18;EBV P23;EBV早期抗原D;EBV 1型核抗原;EBV BFRF3;EBV BMRF1;EBV EBNA1;EBV早期抗原;エンテロウイルス71（EV71）;EV71 VP1;EV71 VP0;エンテロウイルスA Cox A16タンパク質;エンテロウイルスD EV70タンパク質;ザイールエボラ核タンパク質;エボラ-Z核タンパク質;エボラ-S核タンパク質;エボラ-Z糖タンパク質;エボラ-Z VP40;エボラウイルス様粒子;エボラウイルス糖タンパク質;エボラウイルス VP40マトリックスタンパク質;レストンエボラウイルス糖タンパク質;エボラNP抗原;エボラGP（スーダン-ナキサマタ）;エボラGP（ザイール型）;A型肝炎（HAV）;HAV抗原;HAV P3C;HAV P2C-P3A;HAV VP2-VP4;HAV VP3;HAV VP1-P2A;HAV P2C;HAV P2C-P3B;HAV P2C-P3A;HAV P3C;HAV VP1;HAV VP3;HAV VP4;B型肝炎（HBV）;HBV表面抗原;HBVコア抗原;HBV Pre S1/S2;HBV E抗原;HBV 3型PreS1;HBV 2型PreS2;HBV 3型PreS2;HBV Xタンパク質;HBV表面抗原preS2;HBV PreS1;HBV PreS2;ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）;HCMVインターロイキン10;C型肝炎（HCV）;HCV多重抗原;HCV非構造タンパク質3-3;HCV 1型CORE＋NS3抗原（Cap）;HCV 1型CORE＋NS3抗原（Det）;HCVコア、非構造タンパク質3、非構造タンパク質4、非構造タンパク質5;HCV 2型非構造タンパク質5;HCV 1型コア抗原;HCV 3型コア抗原;HCV 5型コア抗原;HCV 6型コア抗原;HCV 1a型非構造タンパク質5;HCV 1a型非構造タンパク質3;HCV 1a型非構造タンパク質5;HCVヌクレオカプシド、非構造タンパク質3、非構造タンパク質4、非構造タンパク質5;D型肝炎（HDV）;E型肝炎（HEV）;HEV ORF3;HEV ORF2、ORF3;HEVモザイクORF2、ORF3;HEVモザイク-S ORF2、ORF3;HEVモザイクタンパク質;HEVモザイク-Sタンパク質;HEV ORF2;ヒト免疫不全ウイルス（HIV）;HIV-O抗原;HIV-1 IIIB gp120タンパク質;HIV-1 IIIB gp160タンパク質;HIV-1 451 gp120タンパク質;HIV-1 451 gp160タンパク質;HIV-1 IIIB p24タンパク質;HIV-1 gp120およびgp41キメラ抗原;HIV-1 Gp160タンパク質;HIV-1 Gagポリタンパク質Pr55;HIV-1 p17タンパク質;HIV-1 p24タンパク質;ヒトパピローマウイルス（HPV）;HPV 16型;HPV16 E6タンパク質;HPV16 E7タンパク質;HPV18 E6タンパク質;HPV18 E7タンパク質;HPV 18型L1タンパク質;HPV 2型、HPV 3型;HPV 18型;HPV 11型;HPV 16型L1タンパク質;HPV 33型L1タンパク質;HPV 6型L1タンパク質;HPV 16型L1タンパク質;単純ヘルペスウイルス（HSV）;HSV 1型;HSV-2 gGペプチド;HSV8 ORF8＆ORF65タンパク質;HSV 1型糖タンパク質;HSV2型糖タンパク質;HSVモザイクタンパク質;HSV 2型;HSV 1型糖タンパク質D;HSV 1型糖タンパク質G;HSV 2型糖タンパク質G;HSV糖タンパク質D;HSV 1型糖タンパク質G1;HSV 1型MacIntyre;HSV 1型グレードIII抗原;ヒトTリンパ向性ウイルス（HTLV）;HTLV 1型、2型;HTLV gp21抗原;HTLV 1型糖タンパク質21;HTLV 1型エンベロープタンパク質;HTLV 1型糖タンパク質46;HTLV 1型モザイク;HTLV 1型p24タンパク質;HTLV糖タンパク質46モザイクタンパク質;HTLVモザイクタンパク質;ヒトT細胞リンパ向性ウイルスI型gp21＋gp46キメラ抗原;ヒトT細胞リンパ向性ウイルスII型gp21＋gp46キメラ抗原;ヒトT細胞リンパ向性ウイルスI&II型キメラ抗原;インフルエンザA型（IAV）;IAV H2N2核タンパク質タンパク質;組換えIAV H2N2ヘマグルチニンタンパク質;IAV H3N2ヘマグルチニンタンパク質;組換えIAV H3N2ノイラミニダーゼ;IAV HIN1グレード2抗原;IAV H3N2マトリックスタンパク質1;IAV H4N4ヘマグルチニンタンパク質;IAV H4N6ヘマグルチニンタンパク質;組換えIAV H4N8ヘマグルチニンタンパク質;インフルエンザB型（IBV）;インフルエンザB型ウイルス抗原;IBVヘマグルチニン;IBVヘマグルチニン1;IBVマトリックスタンパク質1;IBV核タンパク質;日本脳炎（JEV）;JEVコアタンパク質;JEV PreM/M;MMLV白血病ウイルス逆転写酵素;麻疹ウイルス（MeV）;麻疹ウイルスCタンパク質;麻疹ウイルスラージポリメラーゼ;麻疹ウイルスモザイクタンパク質;MeVヘマグルチニンモザイク;MeVラージポリメラーゼ;MeVポリメラーゼ;MeVヘマグルチニン融合タンパク質;MeVヌクレオカプシド;麻疹グレード2;伝染性軟属腫ウイルス（MCV）;MCV MC148タンパク質;MCV 2型ケモカ

イン様タンパク質;オルフウイルスVEGFE;パルボウイルスVP2 VLP;パルボウイルスVP2;パルボウイルスVP1;パルボウイルスPep D;パルボウイルスPep C;パルボウイルスPep B;パルボウイルスPep A;パルボウイルスNS1;パルボウイルスB19 VLP VP2;パルボウイルスB19 VP2;パルボウイルスB19非構造タンパク質;パルボウイルスB19、VP1、VP2;パルボウイルスB19;パルボウイルスB19型VLP VP1/VP2コ-カプシドタンパク質;パルボウイルスB19 VP1/2;パルボウイルスB19 VP1;狂犬病ウイルス（RV）;狂犬病ウイルス糖タンパク質;RV M2;RV（MRV株）核タンパク質;RV核タンパク質;呼吸器合胞体ウイルス（RSV）;呼吸器合胞体ウイルス（long株）抗原;Y.エンテロコリチカのGタンパク質;RSV Src;RSV Srcキナーゼ;RSV糖タンパク質;RSV糖タンパク質G;RSV核タンパク質;リフトバレー熱ウイルス（RVFV）;RVFV糖タンパク質;RVFV核タンパク質;RVFV非構造タンパク質;風疹ウイルス（RuV）;RuVグレードIV;RuVエンベロップタンパク質1;RuVグレード2;RuV K1S;RuV K2S;RuVヌクレオカプシド;RuVカプシド;RuV E1タンパク質;RuV E2タンパク質;RuV E1モザイク;RuVカプシドC;ロタウイルスグレード3;ロタウイルス;ダニ媒介脳炎ウイルス（TBEV）;TBEV gE、TBEV NEタンパク質;TBEV gE、TBEV NE、TBEV GE、TBEV CEタンパク質;TBEV糖タンパク質E;TBEV PreM;TBEVコア抗原;TBEV非構造タンパク質3;TBEV Eペプチド;ダニ媒介脳炎ウイルスgEタンパク質;サル免疫不全ウイルス（SIV）;SIV糖タンパク質120;SIV Gag;SIV P27;SIV Polタンパク質;SIV 1型Nefタンパク質;タバコエッチウイルス（TEV）;TEV N1aタンパク質;TEVコアタンパク質;TEV PreM/M;TEVプロテアーゼタンパク質;EN-TEV活性EN-TEVプロテアーゼ;水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）;VZV糖タンパク質E;VZV ORF9;VZV ORF26;VZV糖タンパク質;VZVグレード2;天然痘ウイルス天然痘CRMB;西ナイルウイルス（WNV）;西ナイルウイルス抗原;西ナイルウイルスpreMタンパク質;西ナイルウイルスNS3プロテアーゼタンパク質;WNVエンベロープタンパク質;WNV PreM;WNV E抗原;WNV非構造タンパク質1;WNV Eタンパク質ペプチド;WNV Eタンパク質ブロックペプチド;WNV Mタンパク質ブロックペプチド;WNV preMブロックペプチド;ジカウイルス;ジカウイルスエンベロープタンパク質;ジカウイルスNS1タンパク質;ジカウイルス抗原;ジカウイルスH/PF/2013;ジカカプシド;ジカE（ドメインIII）;ジカPre-M;チクングニアウイルス（CHIKV）;チクングニアウイルスgp E1;チクングニアウイルスgp E2;チクングニアウイルスgp VLP;CHIKV E1タンパク質;チクングニアE1抗原;チクングニアE2抗原;チクングニアE1 E2複合抗原;CHIKVカプシドタンパク質;CHIKVエンベロープ抗原2;HTNV Nタンパク質;FIVコア抗原;アストロウイルス1型;hMPV;ムンプスウイルス;HRV 3Cプロテアーゼ;CDV HA;CDVマトリックスタンパク質;フアイヤンシャンウイルスヌクレオカプシド;シュマレンベルクウイルスヌクレオカプシド;CDVヌクレオカプシド;MMTV Pr77;ウイルス性MIP MIP-I;ウイルス性MIP MIP-II;VACV Fcキメラ;CCI Fcキメラ;フィトラッカ・アシノーサヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質;エコーウイルス9型;MuV;アフリカ豚熱ウイルス（ASFV）;アフリカ豚熱ウイルスp30タンパク質;およびアフリカ豚熱ウイルスp54タンパク質が挙げられる。

【０１２５】

本明細書に開示の導入遺伝子、第1の導入遺伝子または第2の導入遺伝子は、そのポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列に含められ得る。本明細書において使用する場合、「タンパク質」または「ポリペプチド」は、少なくとも5個のアミノ酸残基を含む分子を示す。本明細書において使用する場合、用語「野生型」は、生物体に天然に存在する分子の内在性の型を示す。免疫応答を生じさせるために野生型の型のタンパク質またはポリペプチドが使用されるが、修飾型のタンパク質またはポリペプチドも使用される。上記の用語は互換的に使用され得る。「修飾型のタンパク質」もしくは「修飾型のポリペプチド」または「バリアント」は、その化学構造、特にアミノ酸配列が野生型タンパク質またはポリペプチドと比べて改変されているタンパク質またはポリペプチドを示す。修飾型/バリアントのタンパク質またはポリペプチドは少なくとも1つの修飾された活性または機能を有し得る（該タンパク質またはポリペプチドが複数の活性または機能を有する場合もあり得ることを認める）。修飾型/バリアントのタンパク質またはポリペプチドは、あ

る1つの活性または機能に関して改変されているが他の点での野生型の活性または機能、例えば免疫原性はまだ保持しているものであり得ることが具体的に想定される。

【０１２６】

導入遺伝子（野生型または修飾型）の大きさは、限定するわけではないが、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500個もしくはそれより多い、およびこれらの中で導き出せる任意の範囲のアミノ酸残基または本明細書に記載の、もしくは本明細書において参照される対応アミノ配列の誘導体を含み得る。

【０１２７】

B. T細胞受容体（TCR）、および操作されたTCRを作製するための方法

T細胞受容体またはTCRは、抗原の断片を主要組織適合性複合体（MHC）分子に結合されたペプチドとして認識することを担う、Tリンパ球（T細胞）の表面上にみられる分子である。TCRは2つの異なるタンパク質鎖で構成されている（すなわち、これはヘテロ二量体である）。ヒトのT細胞95％では、TCRはアルファ（α;本明細書において「a」とも称する）およびベータ（β-本明細書において「b」とも称する）鎖からなり、一方、T細胞の5％ではTCRはガンマおよびデルタ（γ/δ）鎖からなる。この比は個体発生中、および疾患状態ならびに異なる種で変化する。

【０１２８】

TCRが抗原ペプチドおよびMHC（ペプチド/MHC）と連結すると、Tリンパ球は、シグナル伝達、すなわち関連酵素、共受容体、特化されたアダプター分子および活性化または放出された転写因子によって媒介される一連の生化学的事象によって活性化される。TCRは、通常、インバリアントCD3鎖分子との複合体の一部として発現される高度に可変性のアルファ（α）およびベータ（β）鎖からなるジスルフィド結合膜アンカー型ヘテロ二量体タンパク質である。この受容体を発現しているT細胞はα:β（またはαβもしくはab）T細胞と称されるが、少数派のT細胞は、可変性のガンマ（γ-本明細書において「g」とも称する）およびデルタ（δ-本明細書において「d」とも称する）鎖によって形成された別の受容体を発現し、γδ（またはgd）T細胞と称される。

【０１２９】

各鎖は、2つの細胞外ドメイン:可変（V）領域および定常（C）領域で構成されており、どちらも免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）ドメインであり逆平行β-シートを形成している。定常領域は細胞膜に対して近位であり、続いて膜貫通領域と短い細胞質尾部が存在し、一方、可変領域はペプチド/MHC複合体に結合する。

【０１３０】

TCRのα-鎖およびβ-鎖のどちらの可変ドメインも各々、3つの超可変または相補性決定領域（CDR）を有し、一方、β-鎖の可変領域は、通常、抗原とは接触せず、したがってCDRとみなされない超可変性のさらなる領域（HV4）を有する。

【０１３１】

残基は、TCRの2つの領域、α-鎖とβ-鎖のインターフェース部およびCD3シグナル伝達複合体に近接していると考えられるβ-鎖フレームワーク領域内に位置する。CDR3は、プロセッシングされた抗原の認識を担う主要CDRであるが、アルファ鎖のCDR1もまた抗原ペプチドのN末端部分と相互作用することが示されており、一方、β-鎖のCDR1は

該ペプチドのC末端部分と相互作用する。CDR2はMHCを認識すると考えられている。β-鎖のCDR4は抗原認識に関与すると考えられていないが、スーパー抗原と相互作用することが示されている。TCRドメインの定常ドメインは、システイン残基がジスルフィド結合を形成し、これが2つの鎖間の連結部を形成している短い連結配列からなる。

【０１３２】

TCRがIgSFタンパク質のメンバーであるとは、抗体およびBCRと比較され得ることを意味する。類似性の観点から、TCRは、重鎖に結晶化可能部分（Fc）がないこと以外、重鎖と軽鎖を有する半分の抗体のようなものである（注:個体発生的にTCRアルファはVJ組換えを行ない、そのためこれは軽鎖のようであり;TCRベータはVDJ組換えを行ない、そのためこれは重鎖のようである）。そのため、TCRは存在論的には抗体の一方の抗体結合断片のようなものである。TCRのこの2つのサブユニットは一体的にねじれている。抗体は自身のFc領域を用いて自然白血球上のFc受容体に結合するが、TCRは既に細胞膜上にドッキングされている。しかしながら、細胞質尾部が短いためシグナル伝達自体を媒介することができず、そのため、TCRは、ちょうど抗体がシグナル伝達を開始するのにFcRへの結合を必要とするように、しかるべくシグナル伝達が行なわれるためにはなおCD3およびゼータが必要とされる。このように、T細胞でのMHC-TCR-CD3間相互作用は、骨髄性白血球でのAg-Ig-FcR間相互作用およびB細胞でのAg-Ig-CD79間相互作用と機能的に類似している。

【０１３３】

外来性TCRは、TCR-アルファ遺伝子およびTCR-ベータ遺伝子から発現され得るタンパク質を含む。外来性TCRは、TCR-ガンマ遺伝子およびTCR-デルタ遺伝子から発現されるタンパク質を含むものであり得る。外来性TCRは、TCR-アルファ遺伝子およびTCR-ベータ遺伝子から発現されるタンパク質を含むものであり得、抗原認識受容体は、TCR-ガンマ遺伝子およびTCR-デルタ遺伝子から発現されるタンパク質を含む。外来性TCRは、TCR-ガンマ遺伝子およびTCR-デルタ遺伝子から発現されるタンパク質を含むものであり得、抗原認識受容体は、TCR-アルファ遺伝子およびTCR-ベータ遺伝子から発現されるタンパク質を含む。

【０１３４】

抗原特異的TCRを作製する方法は当技術分野において公知である。該方法は、例えば、（1）関心対象のタンパク質（例えば、シーケンシングデータでの腫瘍抗原、ネオ抗原など）に由来する公知の、または予測されるHLA拘束性ペプチドエピトープを合成すること;（2）これを、抗原提示細胞（拡大増殖のため）またはテトラマー（直接選別のため）により、TCR配列を抽出するT細胞プール（例えば、腫瘍抗原特異的T細胞の場合は腫瘍浸潤リンパ球）に提示させること;（3）抗原特異的T細胞を選択またはスクリーニングすること（例えば、テトラマー結合に基づいた抗原特異的T細胞のFACS選別）;（4）TCR遺伝子（すなわち、TCRのアルファ鎖とベータ鎖またはガンマ鎖とデルタ鎖）をクローニング（RT-PCRにより）してシーケンシングすること;クローニングおよびシーケンシングはm集団レベルまたは単一細胞レベルのいずれかで行なわれ得る;ならびに（5）TCRの特異性を、例えば、末梢血T細胞をこのような配列により形質導入し、同種ペプチド-MHC複合体を発現する標的細胞に対するその反応性をアセスメントするによりTCRクローンの機能を試験することによって確認して解析することを含み得る。反応性は通常、サイトカイン産生（例えば、インターフェロンガンマ）に基づいて測定される。

【０１３５】

C. キメラ抗原受容体（CAR）およびCARの作製方法

用語「キメラ抗原受容体」または「CAR」は、免疫エフェクター細胞に自由裁量の特性部分がグラフトされた操作されている受容体を示す。このような受容体は、免疫細胞にモノクローナル抗体の特異性部分をグラフトするために使用され;そのコード配列の移入は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によって容易になされる。該受容体は、異なる供給源に由来する部分から構成されるためキメラと称される。

【０１３６】

このような分子の最も一般的な形態は、モノクローナル抗体に由来する単鎖可変領域フラグメント（scFv）がCD3-ゼータ膜貫通ドメインおよびエンドドメイン、CD28もしくは41BB細胞内ドメイン、またはそれらの組み合わせと融合された融合体である。かかる分子により、scFvによるその標的の認識に応答したシグナルの伝達がもたらされる。かかる構築物の一例は、ハイブリドーマ14g2a（これはジシアロガングリオシドGD2を認識する）に由来するscFvの融合体である14g2a-ゼータである。免疫細胞がこの分子を発現すると（一例として、オンコレトロウイルスベクターでの形質導入によりなされる）、該細胞は、GD2を発現する標的細胞（例えば、神経芽細胞腫細胞）を認識して死滅させる。

【０１３７】

免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の可変部分をフレキシブルリンカーによって融合させてscFvを形成する。このscFvの前に、生成中のタンパク質を小胞体に指向し、その後の表面発現を指令するシグナルペプチド（これは切断される）が存在する。フレキシブルスペーサーは、抗原結合が可能となるようにscFvがいろいろな方向に向くことを可能にする。膜貫通ドメインは、通常、細胞内に突き出て所望のシグナルを伝達するシグナル伝達エンドドメインの元の分子に由来する典型的な疎水性アルファヘリックスである。

【０１３８】

CARは少なくとも1つの細胞外ドメインと、少なくとも1つの細胞内ドメインとを含み得る。細胞外ドメインは、任意の特定の関心対象の抗原に特異的に結合する標的特異的結合エレメント、あるいは抗原結合部分またはリガンド結合部分と称される部分を含み得る。

【０１３９】

細胞内ドメインあるいは細胞質ドメインは1つまたは複数の共刺激シグナル伝達領域およびゼータ鎖部分を含み得る。共刺激シグナル伝達領域は、CARの共刺激分子の細胞内ドメインを構成する部分を示す。共刺激分子は、抗原に対する免疫細胞の効率的な応答に必要とされる、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子であり得る。

【０１４０】

1．シグナルペプチド

本開示のポリペプチドはシグナルペプチドを含み得る。「シグナルペプチド」は、細胞内の該タンパク質の、例えば特定の細胞オルガネラ（例えば、小胞体）および/または細胞表面への輸送および局在化を指令するペプチド配列を示す。シグナルペプチドは、生成中のタンパク質を小胞体内へと指向させ得る。これは、受容体がグリコシル化され、細胞膜にアンカリングされる場合、必須である。一般的に、最もアミノ末端の構成要素に天然状態で結合しているシグナルペプチドが使用される（例えば、軽鎖-リンカー-重鎖の配置を有するscFvでは、軽鎖の天然状態のシグナルが使用される）。

【０１４１】

シグナルペプチドは、小胞体（ER）通過後に切断され得る、すなわち切断可能なシグナルペプチドである。制限部位は、切断を容易にするためにシグナルペプチドのカルボキシ末端に存在させ得る。

【０１４２】

2．抗原結合ドメイン

本開示のポリペプチドは1つまたは複数の抗原結合ドメインを含み得る。「抗原結合ドメイン」は、適切な条件下で抗原に結合することができるポリペプチドの一領域を示す。抗原結合ドメインは、1つまたは複数の抗体（例えば、CD20抗体）ベースの単鎖可変領域フラグメント（scFv）であり得る。抗原結合ドメインは重鎖可変（VH）領域と軽鎖可変（VL）領域を含み得、VH領域とVL領域は同じポリペプチド上に存在する。抗原結合ドメインは、VH領域とVL領域との間にリンカーを含み得る。リンカーは、抗原結合ドメインが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にし得る。

【０１４３】

本開示のポリペプチドの抗原結合ドメインの可変領域は、抗体の1つまたは複数の結合

特性（例えば、親和性）を改善するために、VHおよび/またはVLのCDR 1、CDR 2および/またはCDR 3領域内のアミノ酸残基を変異させることにより修飾され得る。用語「CDR」は、それぞれB細胞およびT細胞によって生成される免疫グロブリン（抗体）およびT細胞受容体の可変鎖の一部をベースにした相補性決定領域を示し、ここで、この分子はその特異的抗原に結合する。免疫グロブリンおよびT細胞受容体に伴うほとんどの配列バリエーションはCDR内にみられるため、この領域は、場合によっては超可変領域と称される。変異は部位特異的変異導入またはPCR媒介性変異導入によって導入され得、抗体結合に対する効果または関心対象の他の機能的特性が適切なインビトロまたはインビボでのアッセイにおいて評価され得る。好ましくは、保存的修飾が導入され、CDR領域内の典型的には1個より多く、2、3、4、または5個の残基が改変される。変異はアミノ酸の置換、付加、または欠失であり得る。

【０１４４】

フレームワーク修飾は、抗体に対して免疫原性を低減させるために、例えば、1個または複数のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系列の配列「逆変異させること」によって行なわれ得る。

【０１４５】

また、抗原結合ドメインは、抗原結合ドメインを、同じ抗原（多価の）または異なる抗原（多重特異的）のいずれかに結合するVH領域とVL領域のペアと多量体化することにより、多重特異的または多価となり得ることが想定される。

【０１４６】

抗原結合領域、例えば可変領域（重鎖および/または軽鎖の可変領域）あるいはCDRの結合親和性は少なくとも10-5M、10-6M、10-7M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M、または10^{-13}Mであり得る。抗原結合領域、例えば可変領域（重鎖および/または軽鎖の可変領域）あるいはCDRのKDは少なくとも10^{-5}M、10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M、または10^{-13}M（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）であり得る。

【０１４７】

結合親和性、KAまたはKDは当技術分野において公知の方法により、例えば表面プラズモン共鳴（SRP）ベースのバイオセンサー、結合平衡除外法（KinExA）、偏光変調斜入射反射率差（OI-RD）に基づいたマイクロアレイ検出用のオプティカルスキャナまたはELISAによって求められ得る。

【０１４８】

ヒト化結合領域を含むポリペプチドは宿主細胞において、非ヒト化結合領域、例えばマウス由来の結合領域を含むポリペプチドと比べて80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、104、106、106、108、109、110、115もしくは120％である、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、104、106、106、108、109、110、115もしくは120％より良好な、または少なくとも80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、104、106、106、108、109、110、115もしくは120％の結合親和性および/または発現レベルを有し得る。

【０１４９】

ヒトフレームワークのフレームワーク領域、例えばFR1、FR2、FR3、および/またはFR4は、各々または合わせて、マウスフレームワークと比べて少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89

、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199もしくは200個、多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199もしくは200個、または厳密に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199もしくは200個（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）のアミノ酸置換、連続アミノ酸付加または連続アミノ酸欠失を有し得る。

【０１５０】

マウスフレームワークのフレームワーク領域、例えばFR1、FR2、FR3、および/またはFR4は、各々または合わせて、ヒトフレームワークと比べて少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、

143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199もしくは200個、多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199もしくは200個、または厳密に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199もしくは200個（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）のアミノ酸置換、連続アミノ酸付加または連続アミノ酸欠失を有し得る。

【０１５１】

置換は、重鎖または軽鎖の可変領域のFR1、FR2、FR3、またはFR4の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100位に存在し得る。

【０１５２】

3. 細胞外ペプチドスペーサー

CARの細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間および/またはCARの細胞質ドメインと膜貫通ドメインとの間にスペーサードメインが組み込まれていてもよい。本明細書において使用する場合、用語「スペーサードメイン」は一般的に、膜貫通ドメインをポリペプチド鎖内の細胞外ドメインまたは細胞質ドメインのいずれかと連結させる機能を果たす任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。細胞外スペーサーは抗原結合ドメインを膜貫通ドメインに連結させ得る。ペプチドスペーサーは、抗原結合が容易になるように

抗原結合ドメインがいろいろな方向に向くことが可能となるのに十分に柔軟性であり得る。

【０１５３】

スペーサーは、IgG由来のヒンジ領域を含み得る。スペーサーは、免疫グロブリンのCH2CH3領域およびCD3の一部分を含み得るか、あるいはさらに含み得る。CH2CH3領域は、L235E/N297QもしくはL235D/N297Q修飾、またはCH2CH3領域と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは100%のアミノ酸配列同一性を有し得る。スペーサーはIgG4由来のものであり得る。細胞外スペーサーはヒンジ領域を含み得る。

【０１５４】

本明細書において使用する場合、用語「ヒンジ」は、構造的柔軟性およびフランキングしているポリペプチド領域とのスペーシングをもたらす柔軟性のポリペプチド連結部領域（本明細書において「ヒンジ領域」または「スペーサー」とも称する）を示し、天然または合成のポリペプチドからなるものであり得る。免疫グロブリン（例えば、IgGl）に由来する「ヒンジ」または「スペーサー」は一般的に、ヒトIgGlのGlu216からPro230までの鎖部分と規定され、例えば（Burton（1985）Molec.Immunol.,22:161-206）。重鎖間ジスルフィド（S-S）結合を形成している最初と最後のシステイン残基を同じ位置に配置することにより他のIgGアイソタイプのヒンジ領域をIgGl配列と一致させてもよい。ヒンジ領域は天然存在物であっても非天然存在物であってもよく、例えば限定するわけではないが、米国特許第5,677,425号に記載のような改変型のヒンジ領域であり得る。ヒンジ領域としては、CH1ドメインのものと異なるクラスまたはサブクラスの抗体に由来する完全ヒンジ領域が挙げられ得る。用語「ヒンジ」には、柔軟性およびフランキング領域とのスペーシングの提供において同様の機能をもたらすCD8および他の受容体に由来する領域もまた含まれ得る。他の択一例としては、免疫グロブリンのCH2CH3領域およびCD3の一部分が挙げられる。

【０１５５】

細胞外スペーサーは、少なくとも4、5、6、7、8、9、10、12、15、16、17、18、19、20、20、25、30、35、40、45、50、75、100、110、119、120、130、140、150、160、170、180、190、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、260、270、280、290、300、325、350もしくは400個、多くとも4、5、6、7、8、9、10、12、15、16、17、18、19、20、20、25、30、35、40、45、50、75、100、110、119、120、130、140、150、160、170、180、190、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、260、270、280、290、300、325、350もしくは400個、または厳密に4、5、6、7、8、9、10、12、15、16、17、18、19、20、20、25、30、35、40、45、50、75、100、110、119、120、130、140、150、160、170、180、190、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、260、270、280、290、300、325、350もしくは400個（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）のアミノ酸の長さを有し得る。細胞外スペーサーは免疫グロブリン（例えば、IgG）由来のヒンジ領域からなるもの、または免疫グロブリン（例えば、IgG）由来のヒンジ領域を含むものであり得る。免疫グロブリンヒンジ領域のアミノ酸配列は当技術分野において公知であり;例えば、Tan et al.

（１９９０）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:162およびHuck et al.（１９８６）Nucl. Acids Res.を参照のこと。

【０１５６】

細胞外スペーサーの長さは、CARのシグナル伝達活性および/または抗原刺激性CARシグナル伝達に応答したCAR-T細胞の拡大増殖特性に対して影響を有し得る。例えば50個未満、45、40、30、35、30、25、20、15、14、13、12、11または10個のアミノ酸の短いスペーサーが使用され得る。例えば少なくとも50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、260、270、280または290個のアミノ酸のものである長いスペーサーは、インビボまたはインビトロで拡大増殖が増大するという利点を有し得る。

【０１５７】

非限定的な例として、免疫グロブリンヒンジ領域は以下のアミノ酸配列のうちの1つを含むものであり得る。

（表）例示的なヒンジ領域

配列	SEQ ID NO:
DKTHT	1
CPPC	2
CPEPKSCDTPPPCPR	3
ELKTPLGDTTHT	4
KSCDKTHTCP	5
KCCVDCP	6
KYGPPCP	7
EPKSCDKTHTCPPCP	8
ELKTPLGDTTHTCPRCP	9
SPNMVPHAHHAQ	10
ESKYGPPCPPCP	11
EPKSCDKTYTCPPCP	12

【０１５８】

細胞外スペーサーは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のヒンジ領域のアミノ酸配列を含み得る。また、細胞外スペーサーは、野生型（天然に存在する）ヒンジ領域と比べて1個または複数のアミノ酸の置換および/または挿入および/または欠失を含んでいてもよい。例えば、ヒトIgG1のヒンジのHis229は、ヒンジ領域が配列

EPKSCDKTYTCPPCP (SEQ ID NO:12)

を含むようにTyrで置換され得る。

【０１５９】

細胞外スペーサーはヒトCD8に由来するアミノ酸配列を含み得;例えば、ヒンジ領域はアミノ酸配列:

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:13)

またはそのバリアントを含むものであり得る。

【０１６０】

細胞外スペーサーはCH2領域を含み得るか、またはさらに含み得る。例示的なCH2領域は、

APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK (SEQ

ID NO:14)

である。細胞外スペーサーは、CH3領域を含み得るか、またはさらに含み得る。例示的なCH3領域は、

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV

LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID

NO:15)

である。

【０１６１】

細胞外スペーサーが複数の部分を含む場合、その種々の部分間のアミノ酸は0～50個の間のいずれであってもよい。例えば、ヒンジおよびCH2もしくはCH3領域の間、またはCH2領域およびCH3の領域間には、両者が存在する場合、少なくとも0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45もしくは50個、多くとも0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45もしくは50個、または厳密に0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45もしくは50個（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）のアミノ酸が存在し得る。細胞外スペーサーは本質的にヒンジ、CH2および/またはCH3領域からなるものであってもよく、これは、該ヒンジ、CH2および/またはCH3領域のみが存在している同定可能な領域であり、他のあらゆるドメインまたは領域は排除されず、同定可能な領域の一部でないさらなるアミノ酸が存在してもよいことを意味する。

【０１６２】

4．膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、CARは、該CARの細胞外ドメインと融合された膜貫通ドメインを含むように設計され得る。膜貫通ドメインは、膜を貫く疎水性アルファヘリックスであり得る。異なる膜貫通ドメインにより異なる受容体安定性がもたらされ得る。

【０１６３】

CARのドメインのうちの1つと天然状態で結合している膜貫通ドメインが使用され得る。いくつかの場合では、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限にするためにかかるドメインが同じか、または異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合することを回避するためのアミノ酸置換によって選択または修飾され得る。

【０１６４】

膜貫通ドメインは天然の供給源または合成の供給源のいずれに由来するものであってもよい。供給源が天然である場合、該ドメインは任意の膜結合型または膜貫通型のタンパク質に由来するものであり得る。本明細書において想定されるCAR構築物において具体的に使用される膜貫通領域の実例だが非限定的な例はT細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に由来する（すなわち、少なくともその膜貫通領域（1つまたは複数）を含む）ものであり得る。あ

るいはまた、膜貫通ドメインは合成であってもよく、その場合、これは主として疎水性残基、例えばロイシンおよびバリンを含み得る。合成の膜貫通ドメインの各末端にフェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットがみられる場合があり得る。任意で、例えば2～約10個のアミノ酸の長さの短いオリゴペプチドまたはポリペプチドリンカーがCARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結部を形成していてもよい。グリシン-セリンダブレットにより特に好適なリンカーがもたらされ得る。

【０１６５】

膜貫通ドメインは、細胞外スペーサーと細胞質領域との間に挟まれている。膜貫通ドメインは、細胞外スペーサーと1つまたは複数の共刺激領域との間に挟まれていてもよい。リンカーは膜貫通ドメインと該1つまたは複数の共刺激領域との間にあってもよい。

【０１６６】

真核生物（例えば、哺乳動物）細胞の細胞膜内へのポリペプチドの挿入をもたらす任意の膜貫通ドメインが使用に適し得る。膜貫通ドメインはCD28、CD8、CD4、CD3-ゼータ、CD134、またはCD7に由来するものであり得る。

【０１６７】

本開示の任意の組成物および方法に有用な例示的な膜貫通ドメインとしては、以下の表のものが挙げられる。

（表）例示的な膜貫通ドメインの配列

説明	配列	SEQ ID NO:
CD28由来	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	16
CD8 ベータ由来	LGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC	17
CD4 由来	ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC	18
CD3 ゼータ由来	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	19
CD28 由来	WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	20
CD134 (OX40) 由来	VAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL	21
CD7 由来	ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA	22

【０１６８】

5. 細胞質ドメイン

CARの細胞質ドメインあるいは細胞内シグナル伝達ドメインは、該CARが配置されている免疫細胞の通常のエフェクター機能のうちの少なくとも1つの活性化を担う。抗原および/またはリガンドの認識後、受容体クラスターおよびシグナルが細胞に細胞質領域を介して伝達される。細胞質領域は細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。細胞内シグナル伝達ドメインは主シグナル伝達ドメインと1つまたは複数の共刺激ドメインとを含み得る。本明細書に記載の共刺激ドメインは細胞質領域の一部であり得る。

【０１６９】

用語「エフェクター機能」は細胞の特化された機能を示す。例えばT細胞のエフェクター機能は細胞傷害活性またはヘルパー活性、例えばサイトカインの分泌であり得る。したがって、用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、タンパク質の、エフェクター機能シグナルを伝達して細胞に特化された機能を発揮することを指令する部分を示す。通常は、細胞内シグナル伝達ドメイン全体が使用され得るが、多くの場合、鎖全体を使用することは必要でない。細胞内シグナル伝達ドメインの短縮型の一部分が使用される範囲において、かかる短縮型の一部分は、エフェクター機能シグナルが伝達される限りインタクトな鎖の

代わりに使用され得る。したがって、細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内シグナル伝達ドメインの任意の短縮型の一部分を含むことを意図する。

【０１７０】

本開示のCARにおける使用に適した細胞質領域および/または共刺激領域は、抗原が抗原結合ドメインに結合することによる活性化に応答して明確で検出可能なシグナル（例えば、細胞による1つまたは複数のサイトカインの産生の増大;標的遺伝子の転写の変化;タンパク質の活性の変化;細胞挙動の変化、例えば細胞死;細胞の増殖;細胞の分化;細胞の生存;細胞シグナル伝達応答の変調;など）をもたらす任意の所望のシグナル伝達ドメインを含む。細胞質領域は、少なくとも1個（例えば、1、2、3、4、5、6個など）の本明細書に記載のようなITAMモチーフを含むものであってもよい。細胞質領域は、DAP10/CD28型のシグナル伝達鎖を含むものであってもよい。細胞質領域は、CD3-ゼータ、DAP10、CD28、2B4、DNAM-1、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHTおよびNKG2C型のシグナル伝達鎖を含むものであってもよい。

【０１７１】

本開示のポリペプチドにおける使用に適した細胞質領域は、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）含有細胞内シグナル伝達ポリペプチドを含む。ITAMモチーフはYX1X2（L/I）であり、ここでX1およびX2は独立して、任意のアミノ酸である。いくつかの場合では、細胞質領域が1、2、3、4または5つのITAMモチーフを含む。いくつかの場合では、ITAMモチーフがエンドドメイン内で2回繰り返されており、ここで、ITAMモチーフの第1のものと第2のものとは6～8個のアミノ酸で互いに離れている、例えば（YX1X2（L/I））（X3）n（YX1X2（L/I））であり、ここでnは6～8の整数であり、6～8個の各X3は任意のアミノ酸であり得る。

【０１７２】

好適な細胞質領域は、ITAMモチーフを含有しているポリペプチドに由来するITAMモチーフ含有部分であり得る。例えば、好適な細胞質領域は、任意のITAMモチーフ含有タンパク質由来のITAMモチーフ含有ドメインであり得る。したがって、好適なエンドドメインは、これが由来するタンパク質全体の配列全体を含有している必要はない。好適なITAMモチーフ含有ポリペプチドの例としては、限定するわけではないが:DAP12、DAP10、FCER1G（Fcイプシロン受容体Iガンマ鎖）;CD3D（CD3デルタ）;CD3E（CD3イプシロン）;CD3G（CD3ガンマ）;CD3-ゼータ;およびCD79A（抗原受容体複合体関連タンパク質アルファ鎖）が挙げられる。

【０１７３】

例示的な細胞質領域は当技術分野において公知である。また、以下に示す細胞質領域も、本開示のCARに組み込まれ得る領域の例を示す。

【０１７４】

いくつかの場合では、細胞質領域が、DAP12（TYROBP;TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質;KARAP;PLOSL;DN AX活性化タンパク質12;KAR関連タンパク質;TYROタンパク質チロシンキナーゼ-結合タンパク質;キラー活性化受容体関連タンパク質;キラー活性化受容体関連タンパク質;などとしても公知）に由来する。好適な細胞質領域は完全長のDAP12のアミノ酸配列のITAMモチーフ含有部分を含み得る。

【０１７５】

細胞質領域は、FCER1G（FCRG;Fcイプシロン受容体Iガンマ鎖;Fc受容体ガンマ鎖;fc-イプシロンRl-ガンマ;fcRガンマ;fceRIガンマ;高親和性免疫グロブリンイプシロン受容体サブユニットガンマ;免疫グロブリンE受容体、高親和性、ガンマ鎖;などとしても公知）に由来するものであってもよい。好適な細胞質領域は完全長のFCER1G アミノ酸配列のITAMモチーフ含有部分を含み得る。

【０１７６】

細胞質領域は、T細胞表面糖タンパク質CD3デルタ鎖（CD3D;CD3-DELTA;T3D;CD

3抗原、デルタサブユニット;CD3デルタ;CD3d抗原、デルタポリペプチド（TiT3複合体）;OKT3、デルタ鎖;T細胞受容体T3デルタ鎖;T細胞表面糖タンパク質CD3デルタ鎖;などとしても公知）に由来するものであってもよい。好適な細胞質領域は完全長のCD3デルタアミノ酸配列のITAMモチーフ含有部分を含み得る。

【０１７７】

細胞質領域は、T細胞表面糖タンパク質CD3イプシロン鎖（CD3e、T細胞表面抗原T3/Leu-4イプシロン鎖、T細胞表面糖タンパク質CD3イプシロン鎖、AI504783、CD3、CD3イプシロン、T3eなどとしても公知）に由来するものであってもよい。好適な細胞質領域は完全長のCD3イプシロンアミノ酸配列のITAMモチーフ含有部分を含み得る。

【０１７８】

細胞質領域は、T細胞表面糖タンパク質CD3ガンマ鎖（CD3G、T細胞受容体T3ガンマ鎖、CD3-GAMMA、T3G、ガンマポリペプチド（TiT3複合体）などとしても公知）に由来するものであってもよい。好適な細胞質領域は完全長のCD3ガンマアミノ酸配列のITAMモチーフ含有部分を含み得る。

【０１７９】

細胞質領域は、T細胞表面糖タンパク質CD3ゼータ鎖（CD3Z、T細胞受容体T3ゼータ鎖、CD247、CD3-ZETA、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZなどとしても公知）に由来するものであってもよい。好適な細胞質領域は完全長のCD3ゼータアミノ酸配列のITAMモチーフ含有部分を含み得る。

【０１８０】

細胞質領域は、CD79A（B細胞抗原受容体複合体関連タンパク質アルファ鎖;CD79a抗原（免疫グロブリン関連アルファ）;MB-1膜糖タンパク質;ig-アルファ;膜結合型免疫グロブリン関連タンパク質;表面IgM関連タンパク質;などとしても公知）に由来するものであってもよい。好適な細胞質領域は完全長のCD79Aアミノ酸配列のITAMモチーフ含有部分を含み得る。

【０１８１】

好適な細胞質領域はCD28の型のシグナル伝達鎖を含み得る。本開示のCARにおける使用に適したさらなる細胞質領域としてはZAP70ポリペプチドが挙げられる。

【０１８２】

具体的な例示的細胞質領域は当技術分野において公知であり、以下の表にさらに示す。

（表）細胞質領域

配列	SEQ ID NO:
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVM GDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQG QRSDVYSDLNTQRPYYK	23
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVM GDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQ RSDVYSDLNTQRPYYK	24
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALA VYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ RPYYK	25
MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALA VYFLGRLVPRGRGAAEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQR PYYK	26
MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQV RKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ	27
DGVYTGLSTRNQETYETLKHE	28
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGT LLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVEL DPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQ VYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK	29
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGT LLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALL RNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK	30
DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN	31
MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVIL TCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGY YVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGG LLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYE PIRKGQRDLYSGLNQRRI	32
NPDYEPIRKGQRDLYSGLNQR	33
MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDA EAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKS	34

配列	SEQ ID NO:
KPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVR QSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN	
DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN	35
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALF LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	36
MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALF LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	37
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR	38
NQLYNELNLGRREEYDVLDKR	39
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK	40
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ	41
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLG EDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQ NVNKSHGGIYVCRVQEGNESYQQSCGTYLRVRQPPPRPFLDMGEGTK NRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEG LNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	42
MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLG EDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNEPPPRP FLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCAVVPGTLLLFRKRWQNEKLGLDAGDE YEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	43
ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG	44
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	45

【０１８３】

６．共刺激領域

用語「共刺激リガンド」は、この用語を本明細書において使用する場合、免疫エフェクター細胞上の同種共刺激分子または同種共刺激ドメインに特異的に結合し、それにより、免疫エフェクター細胞応答を媒介する主シグナルに加えてシグナル、例えば限定するわけではないが、増殖、活性化、分化などをもたらす、抗原提示細胞（例えば、ＡＰＣ、樹状細胞、Ｂ細胞など）上の分子を含む。共刺激リガンドはまた、とりわけ、免疫エフェクター細胞上に存在する共刺激分子と特異的に結合する抗体も包含する。「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それにより、免疫エフェクターによる共刺激応答、例

えば限定するわけではないが、増殖および/または活性化を媒介する免疫エフェクター細胞上の同種結合パートナーを示す。「共刺激シグナル」は、本明細書において使用する場合、主シグナルとの組み合わせで、免疫細胞の活性化、増殖および/またはカギとなる分子の上方調節もしくは下方調節をもたらすシグナルを示す。

【０１８４】

用語「刺激」により、刺激分子がその同種リガンドと結合し、それにより、シグナル伝達事象を媒介することによって誘導される主応答、例えば限定するわけではないが、シグナル伝達を意図する。刺激は、特定の分子の発現の改変を媒介し得る。「刺激分子」は、この用語を本明細書において使用する場合、抗原提示細胞上に存在する同種刺激リガンドと特異的に結合する、免疫エフェクター細胞上の分子を意味する。「刺激リガンド」は、本明細書において使用する場合、抗原提示細胞（例えば、APC、樹状細胞、B細胞など）上に存在している場合、免疫エフェクター細胞上の同種結合パートナー（本明細書において「刺激分子」と称する）と特異的に結合し、それにより、免疫エフェクター細胞による主応答、例えば限定するわけではないが、活性化、免疫応答の開始、増殖などを媒介し得るリガンドを意味する。

【０１８５】

好適な共刺激領域、例えば細胞質領域に含められるものの非限定的な例としては、限定するわけではないが、4-1BB（CD137）、CD28、ICOS、OX-40、BTLA、CD27、CD30、CD40、GITR、2B4、DNAM-1、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2CおよびHVEM由来のポリペプチドが挙げられる。

【０１８６】

共刺激領域は、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200もしくは300個、多くとも10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200もしくは300個、または厳密に10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200もしくは300個のアミノ酸あるいはこれらの中で導き出せる任意の範囲の長さを有し得る。

【０１８７】

共刺激領域は、DAP10（HCST、DAP10、KAP10、PIK3AP、造血細胞シグナル伝達因子;などとしても公知）に由来するものであり得る。共刺激領域は、膜貫通タンパク質4-1BB（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9、TNFRSF9;CD137;CDwl37;ILA;などとしても公知）の細胞内部分に由来するものであってもよい。共刺激領域は、膜貫通タンパク質CD28（Tp44としても公知）の細胞内部分に由来するものであってもよい。共刺激領域は、膜貫通タンパク質ICOS（誘導性T細胞共刺激AILIM、CD278およびCVID1としても公知）の細胞内部分に由来するものであってもよい。共刺激領域は、膜貫通タンパク質OX-40（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー4、TNFRSF4、RP5-902P8.3、ACT35、CD134、OX40、TXGP1Lとしても公知）の細胞内部分に由来するものであってもよい。共刺激領域は、膜貫通タンパク質BTLA（B-およびT-リンパ球関連タンパク質、BTLA1ならびにCD272としても公知）の細胞内部分に由来するものであってもよい。共刺激領域は、膜貫通タンパク質CD27（S152、T14、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー7、TNFRSF7およびTp55としても公知）の細胞内部分に由来するものであってもよい。共刺激領域は、膜貫通タンパク質CD30（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー8、TNFRSF8、D1S166EおよびKi-1としても公知）の細胞内部分に由来するものであってもよい。共刺激領域は、膜貫通タンパク質GITR（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー18、TNFRSF18、RP5-902P8.2、AITR、CD357、ENERGENおよびGITR-Dとしても公知）の細胞内部分に由来するものであってもよい。共刺激領域は、膜貫通タンパク質HVEM（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー14、TNFRSF14、RP3-395M20.6、ATAR、CD270、HVEA、LIGHTRおよびTR2としても公知）の細胞内部分に由来するものであってもよい。共刺激領域は、2B4（CD244、NAIL、NKR2B4、Nmrk、SLAMF4、CD244分子などとしても公知）に由来するものであってもよい。共刺激領域は、DNA

M-1（CD226、DNAM1、PTA1、TLiSA1、CD226分子などとしても公知）に由来するものであってもよい。共刺激領域は、CD40（Bp50、CDW40、TNFRSF5、p50、CD40（タンパク質）、CD40分子などとしても公知）に由来するものであってもよい。共刺激領域は、LFA-1（リンパ球機能関連抗原1、インテグリンアルファL、ITGAL、CD11A、LFA1A、インテグリンサブユニットアルファLなどとしても公知）に由来するものであってもよい。共刺激領域は、CD2（リンパ球機能抗原-2、LFA-2、SRBC、T11、CD2分子などとしても公知）に由来するものであってもよい。共刺激領域は、CD7（GP40、LEU-9、TP41、Tp40、CD7分子などとしても公知）に由来するものであってもよい。共刺激領域は、LIGHT（TNFSF14、CD258、HVEML、LIGHT、LTg、TR2、TNLG1D、腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー14などとしても公知）に由来するものであってもよい。共刺激領域は、NKG2C（KLRC2、CD159c、NKG2-C、キラー細胞レクチン様受容体C2などとしても公知）に由来するものであってもよい。

【０１８８】

具体的な例示的共刺激ドメインを以下のアミノ酸配列によって示す:

（表）共刺激ドメイン

配列	SEQ ID NO:
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	46
FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	47
TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL	48
RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI	49
CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS	50
HQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP	51
RRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESLPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK	52
HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV	53
CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH	54
RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	55

【０１８９】

7．検出ペプチド

本明細書に記載のCARは、検出ペプチドまたは検出分子をさらに含み得る。好適な検出ペプチドとしては、ヘマグルチニン（HA;例えば、YPYDVPDYA;SEQ ID NO:56）;FLAG（例えば、DYKDDDDK;SEQ ID NO:57）;c-myc（例えば、EQKLISEEDL;SEQ

ID NO:58）などが挙げられる。他の好適な検出ペプチドは当技術分野において公知である。

【０１９０】

8．ペプチドリンカー

本開示のポリペプチドはペプチドリンカー（場合によっては、リンカーと称される）を含むものであってもよい。ペプチドリンカーは、本明細書に記載の任意のペプチドドメイン/領域同士を離すために使用され得る。一例として、リンカーはシグナルペプチドと抗原結合ドメインとの間、抗原結合ドメインのVHとVLとの間、抗原結合ドメインとペプチドスペーサーとの間、ペプチドスペーサーと膜貫通ドメインとの間、共刺激領域のフランキング部もしくは共刺激領域のN-もしくはC-領域、および/または膜貫通ドメインとエンドドメインとの間に存在し得る。ペプチドリンカーは任意のさまざまなアミノ酸配列を有し得る。ドメインおよび領域同士は、一般的には柔軟性の性質のものであるペプチドリンカーによって連接され得るが、他の化学結合を排除しない。リンカーは、約6～約40個のアミノ酸の長さ、または約6～約25個のアミノ酸の長さのペプチドであり得る。このようなリンカーは、合成のリンカーコードオリゴヌクレオチドを使用することによって作製され、タンパク質にカップリングされ得る。

【０１９１】

ある程度の柔軟性を有するペプチドリンカーが使用され得る。ペプチドリンカーは事実上、任意のアミノ酸配列を有し得るが、好適なペプチドリンカーは一般的にフレキシブルペプチドをもたらす配列を有することに留意されたい。小型のアミノ酸、例えばグリシンおよびアラニンの使用はフレキシブルペプチドの作製において有用である。かかる配列の作製は当業者にとって常套的である。

【０１９２】

好適なリンカーは容易に選択され得、任意の適当な長さ、例えば1個のアミノ酸（例えば、Gly）～20個のアミノ酸、2個のアミノ酸～15個のアミノ酸、3個のアミノ酸～12個のアミノ酸、例えば4個のアミノ酸～10個のアミノ酸、5個のアミノ酸～9個のアミノ酸、6個のアミノ酸～8個のアミノ酸、または7個のアミノ酸～8個のアミノ酸のものであり得、1、2、3、4、5、6または7個のアミノ酸であってもよい。

【０１９３】

好適なリンカーは容易に選択され得、任意の適当ないろいろな長さ、例えば1個のアミノ酸（例えば、Gly）～20個のアミノ酸、2個のアミノ酸～15個のアミノ酸、3個のアミノ酸～12個のアミノ酸、例えば4個のアミノ酸～10個のアミノ酸、5個のアミノ酸～9個のアミノ酸、6個のアミノ酸～8個のアミノ酸、または7個のアミノ酸～8個のアミノ酸のものであり得、1、2、3、4、5、6または7個のアミノ酸であってもよい。

【０１９４】

例としてのフレキシブルリンカーとしては、グリシンポリマー（G）n、グリシン-セリンポリマー（例えば、
(GS)n, (GSGGS)n (SEQ ID NO:59), (G4S)n および (GGGS)n (SEQ ID NO:60)

などが挙げられ、ここで、nは少なくとも1の整数である。nは少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10、多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10、または厳密に1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）であり得る。グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、および当技術分野において公知の他のフレキシブルリンカー。グリシンポリマーおよびグリシン-セリンポリマーが使用され得;GlyおよびSerはどちらも比較的非構造化性であり、したがって、構成要素間のニュートラルなテザリング部としての機能を果たし得る。グリシンポリマーが使用され得;グリシンは、アラニンよりもなお有意に大きいφ-ψ空間に到達し、長い側鎖の残基よりずっと拘束が少ない。例示的なスペーサーは、例えば限定するわけではないが、

GGSG

(SEQ ID NO:61), GGSGG (SEQ ID NO:62), GSGSG (SEQ ID NO:63), GSGGG (SEQ ID NO:64), GGGSG (SEQ ID NO:65), GSSSG (SEQ ID NO:66)

などのアミノ酸配列を含み得る。リンカーは、反復構造、例えばSEQ ID NO:61～66のうちの1つまたは複数の連続反復構造を含み得、例えばリンカーは、SEQ ID NO:61～66のうちの1つに対応するアミノ酸配列が少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10回、多くとも2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10回、または厳密に2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10回あるいはこれらの中で導き出せる任意の範囲で反復されたものを含む。

【０１９５】

リンカーは、（EAAAK）n（SEQ ID NO:67）を含むものであってもよく、ここで、nは少なくとも1の整数である。nは少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10、多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10、または厳密に1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）であり得る。

【０１９６】

B．治療コントロール

該導入遺伝子、第1の導入遺伝子または第2の導入遺伝子は治療コントロールとともに共発現され得る。治療コントロールは、細胞増殖を調節するもの、細胞の選択（例えば本発明のキメラ抗原受容体を発現する細胞の選択）を容易にするもの、またはそれらの組み合わせである。細胞増殖の調節は、細胞増殖伝播を促進させるために細胞増殖を上方調節することを含み得る。細胞増殖の調節は、細胞増殖伝播が低減または抑止されるように細胞増殖を下方調節することを含み得る。治療コントロールとしての機能を果たす薬剤は、該キメラ抗原受容体を発現する細胞の濃縮を促進させるものであってもよく、これにより治療上の利点がもたらされる。治療コントロールとしての機能を果たす薬剤は、治療コントロールの機能発揮が調節されるようにさらなる組成物と生化学的に相互作用するものであってもよい。例えば、EGFRt（治療コントロール）は、選択、追跡、細胞除去、またはそれらの組み合わせにおけるEGFRtの機能が調節されるようにセツキシマブと生化学的に相互作用し得る。

【０１９７】

例示的な治療コントロールとしては、短縮型の上皮成長因子受容体（EGFRt）、キメラサイトカイン受容体（CCR）および/またはジヒドロキシ葉酸受容体（DHFR）（例えば、変異型DHFR）が挙げられる。CARおよび治療コントロールをコードしているポリヌクレオチドがIRES配列を介して、または切断可能リンカーをコードしているポリヌクレオチド配列を介して連結され得る。本発明のCARは、細胞内で発現され、これによりさらに、少なくとも1つの抗原特異的ターゲティング領域と相互作用する少なくとも1つの分子、例えば抗原の存在に応答して増殖し得るように構築される。治療コントロールは、細胞内シグナル伝達ドメインがない細胞表面タンパク質を含み得る。細胞内シグナル伝達がないか、または細胞内シグナル伝達がなくなるように修飾された（例えば、短縮によって）任意の細胞表面タンパク質が使用され得ることが想定される。治療コントロールのさらなる例としては短縮型LNGFR、短縮型CD19などが挙げられ、この場合、短縮型のタンパク質には細胞内シグナル伝達ドメインがない。

【０１９８】

「共発現する」とは、本明細書において使用する場合、2つ以上の遺伝子の同時発現を示す。遺伝子は、例えば単一のタンパク質または単一のポリペプチド鎖としてのキメラタンパク質をコードしている核酸であり得る。例えば、本開示の導入遺伝子は治療コントロール（例えば、短縮型上皮成長因子（EGFRt））とともに共発現され得、このとき、CARは第1のポリヌクレオチド鎖によってコードされ、治療コントロールは第2のポリヌクレオチド鎖によってコードされる。第1と第2のポリヌクレオチド鎖は、切断可能リンカ

ーをコードする核酸配列によって連結され得る。CARをコードしているポリヌクレオチドと治療コントロール系をコードしているポリヌクレオチドはIRES配列によって連結されてもよい。あるいはまた、CARと治療コントロールは、リンカーを介して連結されるのではなく例えば2つの異なるベクターによってコードされる2つの異なるポリヌクレオチドによってコードされる。さらに、本開示のCARは、治療コントロールとCCR、治療コントロールとDHFR（例えば変異型DHFR）または治療コントロールとCCRとDHFR（例えば変異型DHFR）とともに共発現され得る。CAR、治療コントロールおよびCCRが共発現され得、それぞれ第1、第2および第3のポリヌクレオチド配列によってコードされ、このとき第1、第2および第3のポリヌクレオチド配列は、IRES配列または切断可能リンカー（例えば、T2A）をコードしている配列を介して連結される。あるいはまた、これらの配列はリンカーによって連結されるのではなく例えば別々のベクターによってコードされる。CAR、治療コントロールおよびDHFR（例えば変異型DHFR）が共発現され得、それぞれ第1、第2および第4のポリヌクレオチド配列によってコードされ、このとき第1、第2および第4のポリヌクレオチド配列はIRES配列を介して、または切断可能リンカーをコードしている配列を介して連結される。あるいはまた、これらの配列はリンカーによって連結されるのではなく例えば別々のベクターによってコードされる。CAR、治療コントロール、CCRおよびDHFR（例えば変異型DHFR）が共発現され得、それぞれ第1、第2、第3および第4のポリヌクレオチド配列によってコードされ、このとき第1、第2、第3および第4のポリヌクレオチド配列はIRES配列を介して、または切断可能リンカーをコードしている配列を介して連結される。あるいはまた、これらの配列はリンカーによって連結されるのではなく例えば別々のベクターによってコードされる。前述の配列が別々のベクターによってコードされる場合、これらのベクターは同時に、または逐次トランスフェクトされ得る。

【０１９９】

本開示の組成物に有用な治療コントロール、CAR分子および方法のさらなる局面は、米国特許第:9447194号をみるとよく、これは参照によりあらゆる目的のために本明細書に組み入れられる。

【０２００】

VI. 遺伝子導入手法

A. 遺伝子編集

操作されているヌクレアーゼは、導入遺伝子を前駆細胞、幹細胞、HSPC、ES細胞、iPSCおよびヒト胚性中胚葉前駆細胞などの細胞内に導入するために使用され得る。細胞が、例えば1つまたは複数の特徴を追加または削減するために遺伝子修飾される場合、遺伝子修飾は任意の適当な方法によって行なわれ得る。例えば、任意の遺伝子修飾組成物または遺伝子修飾方法、例えば遺伝子編集、相同的組換えもしくは非相同的組換え、RNA媒介性遺伝子送達または任意の慣用的な核酸送達方法が外来性核酸を細胞内に導入するため、またはゲノムDNAを編集するために使用され得る。遺伝子導入手法は細胞のゲノムの内在性遺伝子座内、例えば表1の遺伝子の遺伝子座内への標的化組込みを含み得る。遺伝子修飾方法の非限定的な例としては、例えばCRISPR/CAS9、ジンクフィンガーヌクレアーゼまたはTALEN技術による遺伝子編集方法が挙げられ得る。

【０２０１】

ゲノム編集または操作ヌクレアーゼを用いるゲノム編集（GEEN）は、人為的に操作されているヌクレアーゼまたは「分子のハサミ」を用いてDNAをゲノムに挿入する、ゲノム内で置き換える、またはゲノムから除去するタイプの遺伝子操作である。ヌクレアーゼによってゲノム内の所望の場所に特異的二本鎖切断（DSB）を作製し、細胞の内在性機構を利用して、誘導された切断を相同的組換え（HR）および非相同性末端結合（NHEJ）の天然プロセスによって修復させる。

【０２０２】

非限定的な操作ヌクレアーゼとしては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、CRISPR/Cas9システム、および

操作されているメガヌクレアーゼ、再操作ホーミングエンドヌクレアーゼが挙げられる。当技術分野において公知の任意の操作ヌクレアーゼが本方法および組成物において使用され得る。

【０２０３】

遺伝子の機能またはタンパク質の機能を理解するためにこれを配列特異的様式で妨害し、生物体に対するその効果をモニタリングすることは遺伝子解析において一般的に行なわれる。しかしながら、一部の生物体では、部位特異的変異導入を行なうことが困難または不可能であり、したがって、より間接的な方法、例えば低分子RNA干渉（siRNA）による関心対象の遺伝子のサイレンシングを使用しなければならない。だがsiRNAによる遺伝子破壊はばらつきがあり、不完全であり得る。ZFNなどのヌクレアーゼを用いるゲノム編集はsiRNAと、操作ヌクレアーゼではDNA結合特異性を修飾することができ、したがって原理的にはゲノム内の任意の目的位置での切断が可能であり、慣用的なRNAiによって特異的に標的とすることが不可能な遺伝子に対して内在性配列の修飾を導入することができるという点で異なる。さらに、一部分が標的を認識するのに2つのZFNが必要とされ、続いて隣接配列に指向されるため、ZFNおよびTALENの特異性が向上する。

【０２０４】

微生物種に一般的にみられるメガヌクレアーゼは、非常に長い認識配列（＞14bp）を有するというユニークな特性を有し、そのためこれは天然状態で非常に特異的となっている。これは、ゲノム編集において部位特異的DSBを行なうために利用され得る;しかしながら、考えられ得るすべての標的配列をカバーするためには十分なメガヌクレアーゼが公知でないか、またはこれまでに公知になっていないかもしれないことが課題である。この課題を解決するため、変異導入およびハイスループットスクリーニング法を使用し、ユニーク配列を認識するメガヌクレアーゼバリアントが作製されている。他には、種々のメガヌクレアーゼを融合させ、新しい配列を認識するハイブリッド酵素を作製することが可能になっている。また他には、合理的設計メガヌクレアーゼと命名された方法において、メガヌクレアーゼのDNA相互作用アミノ酸を改変して配列特異的メガヌクレアーゼを設計することが試みられている（米国特許第8,021,867号、参照により本明細書に組み入れられる）。

【０２０５】

メガヌクレアーゼは、おそらくよりストリンジェントなDNA配列認識のため、細胞に引き起こされる毒性がZFNなどの方法と比べて低いという有益性を有する;しかしながら、考えられ得るすべての配列に対する配列特異的酵素の構築は、ZFNおよびTALENなどの方法が使用される可能性の組み合わせのうち有益性がないものもあるため費用と時間がかかる。そのため、利点と不都合点の両方が存在する。

【０２０６】

メガヌクレアーゼに対して、ZFNおよびTALENの背後にある考え方は、後に特異的DNA配列認識ペプチド、例えばジンクフィンガーおよび転写活性因子様エフェクター（TALE）に連結され得るであろう非特異的DNA切断酵素に、より基づいている。方法の一例は、DNAの認識部位と切断部位が互いに離れているという、制限酵素では一般的でない状況のエンドヌクレアーゼを見出すことであった。この酵素が見出されたら、認識能力を有しないため非常に非特異的であろうその切断部分は分離され得た。次いで、この部分は、非常に高い特異性をもたらし得るペプチドを認識する配列に連結され得た。かかる特性を有する制限酵素の一例はFokIである。さらに、FokIは、ヌクレアーゼ活性を有するために二量化を必要とするという利点を有し、これは、各ヌクレアーゼパートナーがユニークDNA配列を認識するであろうことから特異性が劇的に増大することを意味する。この効果を向上させるため、FokIヌクレアーゼは、ヘテロ二量体としてのみ機能することができ、高い触媒活性を有し得るように操作されている。ヘテロ二量体機能発揮ヌクレアーゼでは不要なホモ二量体活性の可能性が回避され、したがってDSBの特異性が増大され得よう。

【０２０７】

ZFNおよびTALENのどちらのヌクレアーゼ部分も同様の特性を有するが、これらの操作ヌクレアーゼの違いはこれらのDNA認識ペプチドにある。ZFNはCys2-His2ジンクフィンガーに、TALENはTALEに依存しする。これらのDNA認識ペプチドドメインはどちらも、そのタンパク質内において天然で組み合わせの状態でみられるという特徴を有する。Cys2-His2ジンクフィンガーは典型的には、3bp離れている反復構造で存在し、さまざまな核酸相互作用タンパク質、例えば転写因子において多様な組み合わせでみられる。他方、TALEは、アミノ酸と認識されるヌクレオチドペアとの認識比が1対1である反復構造でみられる。ジンクフィンガーおよびTALEはどちらも反復パターンで存在するため、さまざまな配列特異性を作製するためにいろいろな組み合わせを試すことができる。ジンクフィンガーの方が、モジュラーアセンブリ（この場合、必要とされる配列をカバーするためにトリプレット配列と相関しているジンクフィンガーが一列に結合される）、OPEN（細菌系におけるペプチドドメイン対トリプレットヌクレオチドの低ストリンジェンシー選択の後、ペプチドの組み合わせ対最終標的の高ストリンジェンシー選択）などのこれらの用語およびアプローチにおいて確立されており、数ある方法の中でも、ジンクフィンガーライブラリーの細菌ワンハイブリッドスクリーニングが、部位特異的ヌクレアーゼを作製するために使用されている。

【０２０８】

B. 導入遺伝子送達

成熟細胞に分化するように誘導される本明細書において使用される任意の細胞、特に出発細胞、例えば幹細胞または前駆細胞の遺伝子修飾のためのベクターは、導入遺伝子の核酸配列を含むように構築され得る。このようなベクターの構成要素および送達方法の詳細を以下に開示する。

【０２０９】

細胞は、該細胞の遺伝子操作により分化前または分化後のいずれかで1つまたは複数の遺伝子改変を含有するようにされ得る（US2002/0168766）。細胞は、外来性の核酸またはポリヌクレオチドが細胞内に任意の適当な人為的操作手段によって移入されている場合、あるいは細胞が、該ポリヌクレオチドが受け継がれている起源的改変細胞の子孫である場合、「遺伝子改変されている」、「遺伝子修飾されている」または「トランスジェニックである」といえる。例えば、細胞は、該細胞をテロメラーゼ逆転写酵素を発現するように遺伝子改変することにより、拘束された発生系統細胞または最終分化細胞に進む前と後のいずれかでの複製潜在能を高めるために加工され得る（US2003/0022367）。

【０２１０】

C. ベクター

当業者であれば、標準的な組換え手法によってベクターを構築するための十分な知識が備わっていよう（例えば、Maniatis et al.,1988 and Ausubel et al.,1994を参照のこと、ともに参照により本明細書に組み入れられる）。

【０２１１】

また、ベクターは、遺伝子送達および/または遺伝子発現をさらに調節するか、あるいは目的の細胞に対して有益な特性をもたらす他の構成要素または機能性部分も含んでいてもよい。かかる他の構成要素としては、例えば、細胞への結合またはターゲティングに影響を及ぼす構成要素（例えば、細胞型特異的または組織特異的結合を媒介する構成要素）;細胞によるベクター核酸の取込みに影響を及ぼす構成要素;取込み後の細胞内におけるポリヌクレオチドの局在化に影響を及ぼす構成要素（例えば、核局在化を媒介する因子）;およびポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼす構成要素が挙げられる。

【０２１２】

また、かかる構成要素は、ベクターによって送達された核酸が取り込まれて発現されている細胞を検出または選択するために使用され得るマーカー、例えば検出可能マーカーおよび/または選択マーカーを含むものであることもあり得よう。かかる構成要素は、ベクターの天然構造部として提供され得るものであってもよく（例えば、結合および取込みを媒介する構成要素または機能性部分を有する特定のウイルスベクターの使用）、あるいは

ベクターは、かかる機能性部分が提供されるように修飾されてもよい。多種類のかかるベクターが当技術分野において公知であり、一般的に利用可能である。ベクターが宿主細胞内に維持されると、ベクターは、有糸分裂中、自律的構造部として細胞によって安定的に複製されるか、宿主細胞のゲノム内に組み込まれるか、または宿主細胞の核もしくは細胞質内に維持されるかのいずれかであり得る。

【０２１３】

D. 調節エレメント

ベクターに含められる真核生物系の発現カセットは、特に、（5'から3'の方向に）タンパク質コード配列に機能的に連結された真核生物系の転写プロモーター、介在配列を含むスプライシングシグナル、および転写終結/ポリアデニル化配列を含有している。

【０２１４】

1. プロモーター/エンハンサー

「プロモーター」は、転写の開始と速度を制御する、核酸配列の一領域である制御配列である。プロモーターまたはエンハンサーとしては、表1の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーが挙げられ得る。これは、調節タンパク質および調節分子、例えばRNAポリメラーゼおよび他の転写因子が結合して核酸配列の特異的転写を開始させ得る遺伝要素を含有していてもよい。語句「機能的に位置する」、「機能的に連結される」、「制御下」および「転写制御下」は、プロモーターが核酸配列に対して正しい機能性の場所および/または向きに存在し、該配列の転写開始および/または発現を制御することを意味する。

【０２１５】

本開示のプロモーター領域は内在性プロモーター領域であってもよい。内在性プロモーター領域とは、該プロモーター領域がその内在性ゲノム環境に存在し、そのため該プロモーターの上流の配列（すなわち、5'領域）が野生型細胞のものと実質的に同じであるという状況を示す。実質的に同じとは、ある領域が野生型の上流領域に対して少なくとも80、85、90、95、96、97、98または99%同一であること、と示すことができよう。また、内在性プロモーター領域とは、該プロモーターが野生型プロモーターと同じゲノム上の場所に存在するという状況も示す。内在性プロモーターは、非修飾型である細胞または野生型プロモーターに対して70、75、80、85、90、95、96、97、98もしくは99%同一であるか、または少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98もしくは99%同一である細胞におけるプロモーターを示す場合もあり得る。

【０２１６】

プロモーターは一般的に、RNA合成の開始部位を位置決めする機能を果たす配列を含む。これの最も知られた例はTATAボックスであるが、TATAボックスがないいくつかのプロモーター、例えば、哺乳動物のターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターおよびSV40後期遺伝子のプロモーターなどでは、開始部位自体と重なる別個のエレメントが開始の場所を定めるのを補助する。さらなるプロモーターエレメントは、転写開始の頻度を調節するものである。典型的には、このようなものは開始部位の30～110bp上流の領域に位置しているが、いくつかのプロモーターは、機能性エレメントを開始部位の下流に同様に含有していることが示されている。コード配列をプロモーター「の制御下」にするためには、転写リーディングフレームの転写開始部位の5'末端は、選択されたプロモーターの「下流」（すなわち、3'側）に位置決めされる。「上流」のプロモーターはDNAの転写を促し、コードされたRNAの発現を促進させる。

【０２１７】

プロモーターエレメント間のスペーシングは多くの場合、柔軟性であり、そのため、プロモーター機能は、エレメントが互いに逆位であるか、または相対的に移動する場合も維持される。tkプロモーターでは、プロモーターエレメント間のスペーシングは50bp離れるまで増大させることができ、その後は活性が低下し始める。プロモーターにもよるが、個々のエレメントは協調的または独立的のいずれかで転写を活性化させる機能を果たすようである。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示す「エンハンサー」とともに使用してもしなくてもよい。

【０２１８】
2．プロテアーゼ切断部位/自己切断ペプチドおよび内部リボソーム結合部位
好適なプロテアーゼ切断部位および自己切断ペプチドは当業者に公知である（例えば、Ryan et al.,1997;Scymczak et al.,2004を参照のこと）。プロテアーゼ切断部位の例は、ポティウイルスNIaプロテアーゼ（例えば、タバコエッチウイルスプロテアーゼ）、ポティウイルスHCプロテアーゼ、ポティウイルスP1（P35）プロテアーゼ、ビオウイルス（byovirus）Nlaプロテアーゼ、ビオウイルスRNA-2にコードされたプロテアーゼ、アフトウイルスLプロテアーゼ、エンテロウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス2Aプロテアーゼ、ピコルナ3Cプロテアーゼ、コモウイルス24Kプロテアーゼ、ネポウイルス24Kプロテアーゼ、RTSV（イネツングロ球状ウイルス）3C様プロテアーゼ、PY＼IF（パースニップ黄色斑ウイルス）3C様プロテアーゼ、トロンビン、第Xa因子およびエンテロキナーゼの切断部位である。高い切断ストリンジェンシーのため、TEV（タバコエッチウイルス）プロテアーゼ切断部位が使用され得る。
【０２１９】
例示的な自己切断ペプチド（「シス作用性加水分解性エレメント」、CHYSELとも称される;deFelipe（2002）参照、はポティウイルスおよびカルディオウイルス2Aペプチドに由来するものである。具体的な自己切断ペプチドは、FMDV（口蹄疫ウイルス）、ウマ鼻炎Aウイルス、トセア・アシグナ（Thosea asigna）ウイルスおよびブタテシオウイルスに由来する2Aペプチドから選択され得る。
【０２２０】
また、ポリシストロン型メッセンジャー内のコード配列の効率的な翻訳のための特異的開始シグナルも使用され得る。このようなシグナルとしてはATG開始コドンまたは隣接配列が挙げられる。外来性の翻訳制御シグナル、例えばATG開始コドンを備える必要がある場合もあり得る。当業者であれば、これを容易に判断し、必要なシグナルを備えることができよう。開始コドンは、挿入物全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームに対して「インフレーム」でなければならないことは周知である。外来性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは天然または合成のいずれであってもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含めることによって向上させ得る。
【０２２１】
内部リボソーム進入部位（IRES）エレメントの使用は、多重遺伝子またはポリシストロン型メッセンジャーを作製するために用いられ得る。IRESエレメントは、5'メチル化キャップ依存性翻訳のリボソームスキャニングモデルを迂回し、内部部位で翻訳を開始することができる（Pelletier and Sonenberg,1988）。ピコルナウイルス科の2つの構成員（ポリオおよび脳心筋炎）由来のIRESエレメント（Pelletier and Sonenberg,1988）、また、哺乳動物メッセンジャー由来のIRES（Macejak and Sarnow,1991）が報告されている。IRESエレメントは異種オープンリーディングフレームに連結されてもよい。各々がIRESによって離れている複数のオープンリーディングフレームが一緒に転写され、ポリシストロン型メッセンジャーが作製され得る。IRESエレメントのおかげで、各オープンリーディングフレームは効率的な翻訳のためのリボソーム到達が可能である。複数の遺伝子が単一のプロモーター/エンハンサーを用いて効率的に発現され、単一のメッセンジャーが転写され得る（米国特許第5,925,565号および同第5,935,819号を参照のこと、各々は参照により本明細書に組み入れられる）。
【０２２２】
3．マルチクローニングサイト
ベクターにマルチクローニングサイト（MCS）を含めてもよく、マルチクローニングサイト（MCS）は、いずれもベクターを消化させるための標準的な組換え技術とともに使用され得る複数の制限酵素部位を含む核酸領域である（例えば、Carbonelli et al.,1999、Levenson et al.,1998およびCocea,1997を参照のこと、参照により本明細書に組み入れられる）。「制限酵素消化」は、核酸分子内の特異的な場所でのみ機能を果たす酵素による核酸分子の触媒的切断を示す。このような制限酵素の多くは市販されてい

る。かかる酵素の使用は当業者に広く理解されている。多くの場合、ベクターは、MCS内で切断を行ない、外来性配列がベクターにライゲーションされることを可能にする制限酵素を用いて線状化または断片化される。「ライゲーション」は、互いに連続であってもそうでなくてもよい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示す。制限酵素およびライゲーション反応を伴う手法は組換え技術分野の当業者に周知である。

【０２２３】

4．スプライシング部位

転写されたほとんどの真核生物RNA分子はRNAスプライシングを受けて一次転写物からイントロンが除去される。真核生物のゲノム配列を含有しているベクターは、タンパク質発現のための転写物の適正なプロセッシングを確実にするためにドナースプライシング部位および/またはアクセプタースプライシング部位を必要とし得る（例えば、Chandler et al.,1997を参照のこと、参照により本明細書に組み入れられる）。

【０２２４】

5．終結シグナル

ベクターまたは構築物は少なくとも1つの終結シグナルを含み得る。「終結シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写物の特異的終結に関与するDNA配列で構成される。したがって、RNA転写物の生成を終わらせる終結シグナルが想定される。ターミネーターは、インビボで望ましいメッセンジャーレベルを得るために必要であり得る。

【０２２５】

真核生物の系では、ターミネーター領域は、ポリアデニル化部位に曝露されるように新たな転写物の部位特異的切断を可能にする特異的DNA配列もまた含み得る。これは、約200個のA残基（ポリA）鎖を転写物の3'末端に付加するよう、特化された内在性ポリメラーゼにシグナルを送る。このポリAテールにより修飾されたRNA分子の方が、より安定であり、より効率的に翻訳されるようである。したがって、ターミネーターはRNAの切断のためのシグナルを含み得、ターミネーターシグナルはメッセンジャーのポリアデニル化を促進させる。ターミネーターおよび/またはポリアデニル化部位エレメントは、メッセンジャーレベルを高めるため、およびカセットから他の配列へのリードスルーを最小限にするための機能を果たし得る。

【０２２６】

想定されるターミネーターとしては、本明細書に記載の、または当業者に公知の任意の公知の転写ターミネーター、例えば限定するわけではないが、例えば、遺伝子の終結配列、例えばウシ成長ホルモンターミネーターなど、またはウイルス系の終結配列、例えばSV40ターミネーターなどが挙げられる。終結シグナルは、例えば配列短縮型のため転写可能配列または翻訳可能配列がないものであってもよい。

【０２２７】

6．ポリアデニル化シグナル

発現、特に真核生物での発現では、典型的には、転写物の適正なポリアデニル化が行なわれるようにポリアデニル化シグナルが含められる。ポリアデニル化シグナルの性質は成功裡の遂行に極めて重要であるとは考えられておらず、任意のかかる配列が使用され得る。例としては、簡便であり種々の標的細胞において良好に機能することが公知であるSV40ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルが挙げられる。ポリアデニル化により転写物の安定性が高まり得るか、または細胞質への輸送が助長され得る。

【０２２８】

E．ベクター送達

本開示の遺伝子修飾または細胞内への導入遺伝子核酸の導入では、本明細書に記載のような、または当業者であれば知っているであろう細胞の形質転換のための核酸送達のための任意の適当な方法が使用され得る。細胞内に遺伝子を導入して発現させる方法は当技術

分野において公知である。発現ベクターとの関連において、ベクターは宿主細胞内、例えば哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母または昆虫細胞内に、当技術分野における任意の方法によって容易に導入され得る。例えば、発現ベクターは宿主細胞内に物理的、化学的または生物学的手段によって移入され得る。

【０２２９】

かかる方法としては、限定するわけではないが、例えば、エクスビボトランスフェクション（Wilson et al.,1989、Nabel et al,1989）による、インジェクション（米国特許第5,994,624号、同第5,981,274号、同第5,945,100号、同第5,780,448号、同第5,736,524号、同第5,702,932号、同第5,656,610号、同第5,589,466号および同第5,580,859号、各々は参照により本明細書に組み入れられる）、例えばマイクロインジェクション（Harland and Weintraub,1985;米国特許第5,789,215号、参照により本明細書に組み入れられる）による;エレクトロポレーション（米国特許第5,384,253号、参照により本明細書に組み入れられる;Tur-Kaspa et al.,1986;Potter et al.,1984）による;リン酸カルシウム沈殿（Graham and Van Der Eb,1973;Chen and Okayama,1987;Rippe et al.,1990）による;DEAE-デキストラン、続いてポリエチレングリコールの使用（Gopal,1985）による;超音波直接負荷（Fechheimer et al.,1987）による;リポソーム媒介性トランスフェクション（Nicolau and Sene,1982;Fraley et al.,1979;Nicolau et al.,1987;Wong et al.,1980;Kaneda et al.,1989;Kato et al.,1991）および受容体媒介性トランスフェクション（Wu and Wu,1987;Wu and Wu,1988）による;微粒子銃（PCT出願番号WO94/09699および95/06128;米国特許第5,610,042号;同第5,322,783号　同第5,563,055号、同第5,550,318号、同第5,538,877号および同第5,538,880号、各々は参照により本明細書に組み入れられる）による;炭化ケイ素繊維を用いたアジテーション（Kaeppler et al.,1990;米国特許第5,302,523号および同第5,464,765号、各々は参照により本明細書に組み入れられる）による;アグロバクテリウム属菌媒介性形質転換（米国特許第5,591,616号および同第5,563,055号、各々は参照により本明細書に組み入れられる）による;プロトプラストのPEG媒介性形質転換（Omirulleh et al.,1993;米国特許第4,684,611号および同第4,952,500号、各々は参照により本明細書に組み入れられる）による;乾燥/阻害媒介性DNA取込み（Potrykus et al.,1985）、ならびにかかる方法の任意の組み合わせによるDNAの直接送達が挙げられる。これらのものなどの手法の適用により、オルガネラ、細胞、組織または生物体は安定的または一過的に形質転換され得る。

【０２３０】

ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための物理的方法としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、パーティクルボンバードメント、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが挙げられる。ベクターおよび/または外来性核酸を含む細胞を生産するための方法は当技術分野において周知である（例えば、Sambrook et al.（2001）Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New Yorkを参照のこと）。宿主細胞内へのポリヌクレオチドの導入のための実例の1つであるが非限定的な方法はリン酸カルシウムトランスフェクションである。

【０２３１】

関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための生物学的方法としてはDNAベクターおよびRNAベクターの使用が挙げられ得る。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳動物細胞内、例えばヒト細胞内に挿入するための最も広く使用されている方法になっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI型、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来するものであるのがよい（例えば、米国特許第5,350,674号および同第5,585,362号などを参照のこと）。

【０２３２】

ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための化学的手段としては、コロイド分散系、例えば高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズならびに脂質ベースの

系、例えば水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームが挙げられる。インビトロおよびインビボでの送達媒体としての使用のための実例のコロイド系はリポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

【０２３３】

1.リポソーム媒介性トランスフェクション

非ウイルス送達系が使用される場合、実例の1つの送達媒体は脂質および/またはリポソームである。宿主細胞内への核酸の導入（インビトロ、エクスビボまたはインビボ）には脂質製剤の使用が想定される。核酸は脂質に付随され得る。脂質に付随させる核酸は、リポソームの水性内部に封入され得るか、リポソームの脂質二重層内に点在させ得るか、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方と関連している連結分子を介してリポソームに結合させ得るか、リポソーム内に封じ込められ得るか、リポソームと複合体形成され得るか、脂質を含有している溶液中に分散され得るか、脂質と混合され得るか、脂質と合わされ得るか、脂質中に懸濁物として含有され得るか、ミセルに含有もしくはミセルと複合体形成され得るか、または脂質に付随され得る。脂質、脂質/DNAまたは脂質/発現ベクターを伴う組成物はなんら特定の溶液状態の構造に限定されない。例えば、これは二重層構造内にミセルとして、または「崩壊した」構造で存在し得る。またこれは、おそらく大きさまたは形状が一様でない凝集塊を形成して単に溶液中に点在していてもよい。脂質は脂肪質の物質であり、天然に存在する脂質であっても合成脂質であってもよい。例えば、脂質としては、細胞質内に天然に存在する脂肪質の小滴ならびに長鎖脂肪族炭化水素およびその誘導体、例えば脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、およびアルデヒドを含有している化合物クラスが挙げられる。

【０２３４】

核酸は、例えばリポソームなどの脂質複合体内に封じ込められ得る。リポソームは、リン脂質二重層膜と水性内部媒体を特徴とする小胞構造体である。マルチラメラリポソームは、水性媒体によって隔てられた多重の脂質層を有する。これは、リン脂質を過剰の水性溶液中に懸濁させると自発的に形成される。脂質成分は閉鎖構造の形成前に自己再組織化を行ない、水と溶解している溶質を脂質二重層間に封じ込める（Ghosh and Bachhawat,1991）。また、Lipofectamine（Gibco BRL）またはSuperfect（Qiagen）と複合体形成させた核酸も想定される。リポソームの使用量は、使用されるリポソームならびに細胞の性質によって異なり得、例えば、100万～1000万個の細胞あたり約5～約20μgベクターDNAが想定され得る。

【０２３５】

インビトロでの外来DNAのリポソーム媒介性核酸送達および発現は非常に成功裡になっている（Nicolau and Sene,1982;Fraley et al.,1979;Nicolau et al.,1987）。また、培養ニワトリ胚、HeLa細胞およびヘパトーマ細胞での外来DNAのリポソーム媒介性送達および発現の実現可能性も実証されている（Wong et al.,1980）。

【０２３６】

リポソームはセンダイウイルス（hemagglutinating virus）（HVJ）と複合体形成され得る。これにより細胞膜との融合が助長され、リポソーム内封入DNAの細胞への進入が促進されることが示されている（Kaneda et al.,1989）。リポソームは核の非ヒストン染色体タンパク質（HMG-1）と複合体形成され得るか、またはこれとともに使用され得る（Kato et al.,1991）。リポソームはHVJおよびHMG-1の両方と複合体形成され得るか、またはこれらとともに使用され得る。送達媒体はリガンドおよびリポソームを含み得る。

【０２３７】

使用に適する脂質は市販の供給元から入手することができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）はSigma,St.Louis,Mo.から入手することができ、リン酸ジセチル（「DCP」）はK＆K Laboratories（Plainview,N.Y.）から入手することができ;コレステロール（「Choi」）はCalbiochem-Behringから入手することができ;ジミリスチルホスファチジルグリセロール（“DMPG”）および他の脂質はAvanti

Polar Lipids,Inc.（Birmingham,Ala.）から入手され得る。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質のストック溶液は約-20℃で保存され得る。クロロホルムは、メタノールより容易に蒸発するため唯一の溶媒として使用され得る。「リポソーム」は、閉鎖された閉鎖脂質二重層または凝集塊の生成によって形成されたさまざまなシングルおよびマルチラメラ脂質媒体を包含する総称である。リポソームは、リン脂質二重層膜と水性内部媒体を有する小胞構造を有すると特徴付けられ得る。マルチラメラリポソームは、水性媒体によって隔てられた多重の脂質層を有する。これは、リン脂質を過剰の水性溶液中に懸濁させると自発的に形成される。脂質成分は閉鎖構造の形成前に自己再組織化を行ない、水と溶解している溶質を脂質二重層間に封じ込める（Ghosh et al.（1991）Glycobiology 5:505-510）。しかしながら、通常の小胞構造と異なる溶液状態の構造を有する組成物もまた包含される。例えば、脂質はミセル構造の形態であってもよく、単に脂質分子の不均一な凝集塊として存在していてもよい。また、リポフェクタミン-核酸複合体も想定される。

【０２３８】

2. エレクトロポレーション

核酸は細胞内にエレクトロポレーションによって導入され得る。エレクトロポレーションは、細胞およびDNAの懸濁液を高電圧放電に曝露することを伴う。レシピエント細胞は機械的損傷により、より形質転換を受けやすくなり得る。また、ベクターの使用量は、使用される細胞の性質によって異なり得、例えば、100万～1000万個の細胞あたり約5～約20μgベクターDNAが想定され得る。

【０２３９】

エレクトロポレーションを用いた真核生物細胞のトランスフェクションは、かなり成功裡になっている。この様式で、マウス前Bリンパ球はヒトカッパ-免疫グロブリン遺伝子によりトランスフェクトされており（Potter et al.,1984）、ラット肝細胞はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子によりトランスフェクトされている（Tur-Kaspa et al.,1986）。

【０２４０】

3. リン酸カルシウム

核酸は細胞内に、リン酸カルシウム沈殿を用いて導入され得る。この手法を用いてヒトKB細胞がアデノウイルス5型のDNAによりトランスフェクトされている（Graham and Van Der Eb,1973）。また、この様式で、マウスL（A9）、マウスC127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3およびHeLa細胞がネオマイシンマーカー遺伝子によりトランスフェクトされ（Chen and Okayama,1987）、ラット肝細胞がさまざまなマーカー遺伝子によりトランスフェクトされた（Rippe et al.,1990）。

【０２４１】

4. DEAE-デキストラン

核酸は細胞内にDEAE-デキストラン、続いてポリエチレングリコールを用いて送達され得る。この様式で、レポータープラスミドがマウスの骨髄腫細胞および赤白血病細胞内に導入された（Gopal,1985）。

【０２４２】

VII. 選択可能またはスクリーニング可能なマーカー

導入遺伝子核酸を宿主細胞内に導入するため、あるいは細胞を本開示の阻害剤に曝露するために使用される方法に関係なく、宿主細胞内における組換えDNA配列の存在を確認するために、さまざまなアッセイが行なわれ得る。かかるアッセイとしては、例えば、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えばサザンブロッティングおよびノーザンブロッティング、RT-PCRならびにPCR;「生化学的」アッセイ、例えば、免疫学的手段（ELISAおよびウエスタンブロット）による、または本開示の範囲に含まれる因子を同定するための本明細書に記載のアッセイによる特定のペプチドの有無の検出などが挙げられる。

【０２４３】

外来性核酸を内包している細胞は、発現ベクターまたは外来性核酸内にマーカーを含めることによりインビトロまたはインビボで同定され得る。かかるマーカーは、細胞に対して同定可能な変化を付与し、発現ベクターを内包している細胞の容易な同定を可能にするであろうというものである。一般的に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものであり得る。正の選択マーカーは、マーカーの存在によって選択が可能であるものであり得、一方、負の選択マーカーは、その存在によって選択が妨げられるものである。正の選択マーカーの一例は薬物耐性マーカーである。

【０２４４】

通常、薬物選択マーカーを含めることによってクローニングおよび形質転換体の同定が補助され、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシンおよびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子が有用な選択マーカーである。条件を与えることに基づいて形質転換体の判別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、他の型のマーカー、例えば比色分析を根拠にするスクリーニング可能なマーカー、例えばGFPもまた想定される。あるいはまた、負の選択マーカーとしてスクリーニング可能な酵素、例えば単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（tk）またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）が使用され得る。当業者であれば、どのようにして免疫学的マーカーを、場合によってはFACS解析とともに使用するかもわかるであろう。使用されるマーカーは、遺伝子産物をコードしている核酸と同時に発現され得るものである限り、重要であるとは考えられていない。選択マーカーおよびスクリーニング可能マーカーのさらなる例は当業者に周知である。

【０２４５】

選択可能マーカーとしては、実験微生物学、分子生物学および遺伝子操作においてトランスフェクションまたは外来DNAを細胞内に導入することが意図される他の手順の成功裡を示すために使用されるタイプのレポーター遺伝子が挙げられ得る。選択可能マーカーは多くの場合、抗生物質耐性遺伝子であり;外来DNAを導入するための手順に供された細胞は、抗生物質を含有している培地で培養増殖され、培養増殖が可能な細胞は、導入された遺伝物質を成功裡に取り込んで発現している。選択可能マーカーの例としては:Tn5由来のAbicr遺伝子またはNeo遺伝子が挙げられ、これはジェネティシンに対する抗生物質耐性を付与する。

【０２４６】

スクリーニング可能マーカーは、研究者が欲しい細胞と不要な細胞とを区別することを可能にするレポーター遺伝子を含み得る。レポーター遺伝子は、特異的細胞系統を示すために使用され得る。例えば、レポーター遺伝子は、発現エレメント内に、通常、心室-または心房-選択的遺伝子のコード領域と関連している心室選択的または心房選択的な調節エレメントの制御下に、同時発現するように配置され得る。レポーターは、特異的系統の細胞が、薬物または他の選択圧あるいは細胞生存性のリスク下におかれることなく単離されることを可能にする。

【０２４７】

かかるレポーターの例としては、細胞表面タンパク質（例えば、CD4、HAエピトープ）、蛍光タンパク質、抗原決定基および酵素（例えば、β-ガラクトシダーゼ）をコードしている遺伝子が挙げられる。ベクターを含有している細胞は、例えばFACSにより、ベクターにコードされた酵素によって蛍光生成物に変換され得る細胞表面タンパク質または基質に対する蛍光タグ化抗体を用いて単離され得る。

【０２４８】

レポーター遺伝子は蛍光タンパク質であり得る。ほぼ全域にわたる可視光スペクトルの蛍光発光スペクトルプロファイルを特色とする広範な蛍光タンパク質遺伝子バリアントが開発されている。元のオワンクラゲ（Aequorea victoria）のクラゲ緑色蛍光タンパク質における変異導入の取り組みにより、青から黄色までの色の範囲の新たな蛍光プローブが得られており、いくつかのレポーター分子は、生物学的研究においてインビボ最も広く使用されている。橙色および赤色のスペクトル領域の発光を示す長波長の蛍光タンパク質

が、イソギンチャク（marine anemone）、ディスコソマ・ストリアタ（Discosoma striata）、および花虫（Anthozoa）綱に属する造礁サンゴから開発されている。さらに他の種が、シアン、緑色、黄色、橙色および深紅の蛍光発光を有する同様のタンパク質を作製するために検討されている。蛍光タンパク質の明度と安定性を改善し、したがってその全般的な有用性を改善するための開発研究の取り組みは現在進行中である。

【０２４９】

VIII. 細胞培養条件

本明細書に記載の3D細胞凝集塊の培養のため、および導入遺伝子を含む成熟細胞の生産のための細胞培養条件が提供され得る。選択された集団の出発細胞は、少なくとも10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}個、または約10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}個、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲の細胞を含み得る。出発細胞集団は、少なくとも10、10^1、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8細胞/ml、または約10、10^1、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8細胞/ml、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲の播種密度を有し得る。

【０２５０】

A. 培地

細胞は、特定の培地中で、導入遺伝子を発現する成熟細胞が生成する過程の任意のステージで培養され得る。細胞は、有害な効果を伴うことなくレシピエントへの送達に適するような様式で製剤化され得る。

【０２５１】

培地は、動物細胞を培養するために基礎培地として使用される培地、例えばAIM V、X-VIVO-15、NeuroBasal、EGM2、TeSR、BME、BGJb、CMRL 1066、Glasgow MEM、Improved MEM Zinc Option、IMDM、Medium 199、Eagle MEM、αMEM、DMEM、Ham、RPMI-1640およびFischer社の培地のうちの任意のもの、ならびに任意のそれらの組み合わせを用いて調製され得るが、培地は、動物細胞を培養するために使用できる限り、特にこれらに限定されなくてよい。特に、培地はゼノフリーまたは既知組成であり得る。

【０２５２】

培地は血清含有もしくは無血清の培地、またはゼノフリー培地であり得る。異種動物由来の成分の混入を防ぐ観点から、血清は幹細胞のものと同じ動物に由来するものであるのがよい。無血清培地は、未処理または未精製の血清を含んでいない培地を示し、したがって、精製された血液由来成分または動物組織由来成分（例えば、成長因子）を含む培地は包含され得る。

【０２５３】

培地は血清の任意の代替品を含有しているものであってもよく、含有していないものであってもよい。血清の代替品としては、アルブミン（例えば、脂質高配合アルブミン、ウシアルブミン、アルブミン置換液、例えば組換えアルブミンもしくはヒト化アルブミン、植物のデンプン、デキストランおよびタンパク質加水分解物）、トランスフェリン（もしくは他の鉄トランスポーター）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールジイセロールまたはその等価物を適切に含有している物質が挙げられ得る。血清の代替品は、例えば国際特許出願公開公報第98/30679号（その全体が本明細書に組み入れられる）に開示された方法によって調製され得る。あるいはまた、より便利にするために任意の市販品が使用され得る。市販品としては、knockout Serum Replacement（KSR）、Chemically-defined Lipid concentrated（Gibco）およびGlutamax（Gibco）が挙げられる。

【０２５４】

培地は、細胞の発生に適した無血清培地であってもよい。例えば、培地は、B-27（登録商標）サプリメント、ゼノフリーB-27（登録商標）サプリメント（thermofisher.com/us/en/home/technical-resources/media-formulation.250.htmlのワール

ドワイドウェブにて入手可能）、NS21サプリメント（Chen et al.,J Neurosci Methods,2008 Jun 30;171（2）:239-247、その全体が本明細書に組み入れられる）、GS21TMサプリメント（amsbio.com/B-27.aspxのワールドワイドウェブにて入手可能）、またはそれらの組み合わせを、3D細胞凝集塊からT細胞を生成させるのに有効な濃度で含むものであり得る。

【０２５５】

培地は、以下:ビタミン類、例えばビオチン;酢酸DLアルファトコフェロール;DLアルファ-トコフェロール;ビタミンA（アセテート）;タンパク質、例えばBSA（ウシ血清アルブミン）またはヒトアルブミン、脂肪酸不含フラクションV;カタラーゼ;ヒト組換えインスリン;ヒトトランスフェリン;スーパーオキシドジスムターゼ;他の成分、例えばコルチコステロン;D-ガラクトース;エタノールアミンHCl;グルタチオン（還元型）;L-カルニチンHCl;リノール酸;リノレン酸;プロゲステロン;プトレシン2HCl;亜セレン酸ナトリウム;および/またはT3（トリオド-I-チロニン）のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20種類またはそれより多くを含むものであり得る。

【０２５６】

培地はビタミン類をさらに含み得る。培地は、以下（およびこれらの中で導き出せる任意の範囲）:ビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファ-トコフェロール、ビタミンA、塩化コリン、パントテン酸カルシウム、パントテン酸、葉酸、ニコチンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、イノシトール、ビタミンB12のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12もしくは13種類を含むものであり得るか、または培地はそれらの組み合わせもしくはその塩を含む。培地はビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファ-トコフェロール、ビタミンA、塩化コリン、パントテン酸カルシウム、パントテン酸、葉酸、ニコチンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、イノシトールおよびビタミンB12を含むもの、または本質的にそれらからなるものであり得る。ビタミン類はビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファ-トコフェロール、ビタミンA、またはそれらの組み合わせもしくは塩を含むもの、または本質的にそれらからなるものであり得る。培地はタンパク質をさらに含み得る。タンパク質は、アルブミンもしくはウシ血清アルブミン、ヒトアルブミン分画物、カタラーゼ、インスリン、トランスフェリン、スーパーオキシドジスムターゼ、またはそれらの組み合わせを含み得る。培地は、以下:コルチコステロン、D-ガラクトース、エタノールアミン、グルタチオン、L-カルニチン、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、プトレシン、亜セレン酸ナトリウムもしくはトリオド-I-チロニンのうちの1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせをさらに含み得る。培地は、以下:B-27（登録商標）サプリメント、ゼノフリーB-27（登録商標）サプリメント、GS21TMサプリメントのうちの1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせを含むものであり得る。培地は、アミノ酸、単糖、無機イオンを含み得るか、あるいはさらに含み得る。アミノ酸はアルギニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、グルタミン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン、もしくはバリン、またはそれらの組み合わせを含み得る。無機イオンはナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素、もしくはリン、またはそれらの組み合わせもしくは塩を含み得る。培地は、以下:モリブデン、バナジウム、鉄、亜鉛、セレン、銅もしくはマンガンのうちの1つもしくは複数、またはそれらの組み合わせをさらに含み得る。培地は、本明細書において論考された1つもしくは複数のビタミンおよび/または本明細書において論考された1つもしくは複数のタンパク質、および/または以下:コルチコステロン、D-ガラクトース、エタノールアミン、グルタチオン、L-カルニチン、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、プトレシン、亜セレン酸ナトリウムもしくはトリオド-I-チロニン、B-27（登録商標）サプリメント、ゼノフリーB-27（登録商標）サプリメント、GS21TMサプリメント、アミノ酸（例えば、アルギニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、グルタミン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン

もしくはバリン）、単糖、無機イオン（例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素および/またはリン）あるいはその塩および/またはモリブデン、バナジウム、鉄、亜鉛、セレン、銅もしくはマンガンのうちの1つもしくは複数を含むもの、または本質的にそれらからなるものであり得る。

【０２５７】

培地は、外部から添加したアスコルビン酸を含むものであり得る。また、培地は、1つまたは複数の外部から添加したの脂肪酸または脂質、アミノ酸（例えば、非必須アミノ酸）、ビタミン（1種類もしくは複数種）、成長因子、サイトカイン、抗酸化物質、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤および/または無機塩類を含有していてもよい。

【０２５８】

培地成分のうちの1つまたは複数は、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/ml、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250μg/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250μg/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250μg/ml、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250mg/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250mg/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250mg/ml、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲の濃度で添加され得る。

【０２５９】

使用される培地には、少なくとも1種類の外部から添加したサイトカインが、約0.1ng/mL～約500ng/mL、より特別には1ng/mL～100ng/mL、または少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、

70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/ml、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250μg/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250μg/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250μg/ml、少なくとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250mg/ml、多くとも0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250mg/ml、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250mg/ml、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲の濃度で補給され得る。好適なサイトカインとしては、限定するわけではないが、FLT3リガンド（FLT3L）、インターロイキン7（IL-7）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-アルファ、TGF-ベータ、インターフェロン-ガンマ、インターフェロン-ラムダ、TSLP、チモペンチン、プレオトロフィンおよび/またはミッドカインが挙げられる。特に、培養培地にはFLT3LおよびIL-7のうちの少なくとも1つが含められ得る。より特別には、培養液にFLT3LとIL-7の両方が含められ得る。

【０２６０】

他の培養条件は適切に規定され得る。例えば、培養温度は約20～40℃、例えば、少なくとも20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40℃、高くとも20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40℃、または約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40℃（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）であり得るが、該温度はこれらの値より上であっても下であってもよい。CO_2濃度は約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10％（またはこれらの中で導き出せる任意の範囲）、例えば約2％～10％、例えば約2～5％、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲であり得る。酸素分圧は少なくとも1、5、8、10、20％または約1、5、8、10、20％、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲であり得る。

【０２６１】

B. 培養容器

細胞および/または3D細胞凝集塊あるいはその子孫細胞を培養するために使用される培養槽としては:フラスコ、組織培養用のフラスコ、皿、ペトリ皿、組織培養用の皿、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、マイクロスライド、チャンバースライド、チューブ、トレイ、CellSTACK（登録商標）チャンバー、培養用バッグおよびローラーボトルが挙げられ得るが、内部で幹細胞を培養することができる限り、これらに特に限定されない。幹細胞は、培養の必要事項に応じて、少なくとも0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50ml、100ml、150ml、200ml、250ml、300ml、350ml、400ml、450ml、500ml、550ml、600ml、800ml、1000ml、1500mlまたは約0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50ml、100ml、150ml、200ml、250ml、300ml、350ml、400ml、450ml、500ml、550ml、600ml、800ml、1000ml、1500ml、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲の容量で培養され得る。培養槽はバイオリアクターであってもよく、これは、生物学的に活性な環境を支持する任意のデバイスまたはシステムを示し得る。バイオリアクターは、少なくとも2、4、5、6、8、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500リットル、1、2、4、6、8、10、15立方メートル、または約2、4、5、6、8、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500リットル

、1、2、4、6、8、10、15立方メートル、またはこれらの中で導き出せる任意の範囲の容量を有し得る。

【０２６２】

培養槽は細胞接着性であっても非接着性であってもよく、目的に応じて選択され得る。細胞接着性の培養槽は、細胞に対する槽表面の接着性を改善するための任意の細胞接着用基材、例えば細胞外マトリックス（ＥＣＭ）でコートされ得る。細胞接着用基材は、幹細胞またはフィーダー細胞（使用される場合）を付着させることが意図される任意の物質であり得る。細胞接着用基材としては、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ラミニンおよびフィブロネクチンならびにその混合物、例えばMatrigel（商標）および溶解細胞膜調製物が挙げられる。

【０２６３】

C. マトリックス成分

種々の規定のマトリックス成分が培養方法または培養組成物において使用され得る。例えば、参照によりその全体が組み入れられるLudwig et al.（2006a;2006b）に記載のように、組換えIV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンおよびビトロネクチンの組み合わせが、多能性細胞の培養増殖のための固相支持体を提供する手段として培養表面をコートするために使用され得る。

【０２６４】

マトリックス組成物を、細胞の支持をもたらすために表面上に固定化してもよい。マトリックス組成物は1つまたは複数の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質と水性溶媒を含むものであり得る。用語「細胞外マトリックス」は当技術分野において認知されている。その成分としては、以下のタンパク質:フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、テネイシン、エンタクチン、トロンボスポンジン、エラスチン、ゼラチン、コラーゲン、フィブリリン、メロシン、アンコリン、コンドロネクチン、リンクプロテイン、骨シアロタンパク質、オステオカルシン、オステオポンチン、エピネクチン、ヒアルロネクチン、ウンデュリン、エピリグリンおよびカリニンのうちの1つまたは複数が挙げられる。他の細胞外マトリックスタンパク質はKleinman et al.,（1993）に記載されており、参照により本明細書に組み入れられる。細胞外マトリックスとしてのその特徴は当業者によって容易に判断可能であるため、用語「細胞外マトリックス」は、将来、見出されるかもしれない現在知られていない細胞外マトリックスも包含することを意図する。

【０２６５】

マトリックス組成物中の総タンパク質濃度は約1ng/mL～約1mg/mLであり得る。マトリックス組成物中の総タンパク質濃度は約1μg/mL～約300μg/mLであり得る。マトリックス組成物中の総タンパク質濃度は約5μg/mL～約200μg/mLであり得る。

【０２６６】

細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質は天然起源のものであってもよく、ヒト組織または動物組織から精製され得る。あるいはまた、ＥＣＭタンパク質は遺伝子操作されている組換えタンパク質または事実上、合成であってもよい。ＥＣＭタンパク質は完全なタンパク質であっても天然状態もしくは操作されているペプチド断片の形態であってもよい。細胞培養のためのマトリックスに有用であり得るＥＣＭタンパク質の例としては、ラミニン、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチンおよびビトロネクチンが挙げられる。マトリックス組成物は、フィブロネクチンの合成により作製したペプチド断片または組換えフィブロネクチンを含むものであり得る。

【０２６７】

マトリックス組成物は少なくともフィブロネクチンとビトロネクチンの混合物を含むものであってもよい。マトリックス組成物はラミニンを含むものであり得る。

【０２６８】

マトリックス組成物は好ましくは、単一の型の細胞外マトリックスタンパク質を含むものである。マトリックス組成物は、特に造血幹または前駆細胞の培養で使用するためのフィブロネクチンを含むものであり得る。例えば、好適なマトリックス組成物は、ヒトフィ

ブロネクチン、例えばFranklin Lakes,N.J.のBecton,Dickinson＆Co.（BD）によって販売されているヒトフィブロネクチン（Cat＃354008）をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）中に5μg/mL～約200μg/mLのタンパク質濃度まで希釈することによって調製され得る。特定の一例では、マトリックス組成物は、フィブロネクチン断片、例えばRetroNectin（登録商標）を含む。RetroNectin（登録商標）は、中央の細胞結合ドメイン（III型反復構造、8,9,10）、高親和性ヘパリン結合ドメインII（III型反復構造、12,13,14）、およびヒトフィブロネクチンの選択的スプライシングされたIIICS領域内にCS1部位を含む（574個のアミノ酸）の約63kDaのタンパク質である。

【０２６９】

マトリックス組成物はラミニンを含むものであり得る。例えば、好適なマトリックス組成物は、ラミニン（Sigma-Aldrich（St.Louis,Mo.）;Cat＃L6274およびL2020）をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）中に5μg/ml～約200μg/mlのタンパク質濃度まで希釈することによって調製され得る。

【０２７０】

マトリックス組成物は、マトリックスが、またはその成分タンパク質がヒト起源のものだけであるという点でゼノフリーであり得る。これは、特定の応用研究で所望され得る。例えば、ヒト細胞を培養するためのゼノフリーマトリックスでは、ヒト起源のマトリックス成分が使用され得、この場合、いずれの非ヒト動物性成分も排除され得る。Matrigel（商標）は、基材として培養組成物から除外され得る。Matrigel（商標）は、マウス腫瘍細胞から分泌されたゼラチン質タンパク質の混合物であり、BD Biosciences（New Jersey,USA）から市販されている。この混合物は、多くの組織にみられる複雑な細胞外環境と似ており、細胞生物学者らに細胞培養のための基材として高頻度で使用されるが、所望でない異物抗原または夾雑物が導入される場合があり得る。

【０２７１】

IX．細胞培養の組成物および方法

3D培養組成物、例えば人工胸腺オルガノイド（ATO）は、多能性の出発細胞供給源からの成熟細胞のインビトロ作製のための最適化され、高効率で、再現性の高いオフ・ザ・シェルフ溶液である。3D培養組成物は、無血清条件が使用され得、ヒト胸腺組織またはプロプライエタリな足場材の使用が回避され得、十分に機能性の、成熟したヒト細胞、例えば成熟したヒトT細胞およびNK細胞の正の選択およびその幹細胞からのロバストな生成が助長され得る。インビトロでの細胞発生のための潜在的商用プラットフォームとして、3D培養組成物は、競合技術と比べて効率、再現性、拡張性ならびにコストおよび労力の削減をもたらす。非限定的な商業的応用としては、ヒト細胞の発生のインビトロ実験モデル作製、ならびにさまざまな幹細胞供給源からの、がんおよび自己免疫性の病態を処置するための細胞療法、例えば免疫療法に有用な操作されている抗原ターゲティング細胞および/または導入遺伝子発現細胞のインビトロ生産が挙げられ得る。

【０２７２】

また、機能性の成熟細胞のインビトロ作製のための最適化された三次元（3D）培養システムも提供される。得られる細胞の3D構造物は人工胸腺オルガノイド（ATO）と称され得る。

【０２７３】

このシステムは、FLT3リガンド（FLT3L）、インターロイキン7（IL-7）、B27およびアスコルビン酸を含有している最適化培地の存在下での、PSCとNotchリガンドを発現している間質細胞との3D構造への凝集を含み得る。また、気液界面での培養を可能にする条件も存在し得る。

【０２７４】

また、3D培養組成物の方法（例えば、ATOの作製）も提供され、開発されているように、ヒトDLL4により形質導入されたMS-5マウス間質細胞株（以下、本明細書においてMS5-hDLL4）と、ヒト臍帯血、骨髄、全血試料または末梢血単核細胞（PBMC）から単離された幹細胞もしくは前駆細胞および/またはCD34^{+} PSCとの凝集を伴う。最大1

×10^6個の幹細胞もしくは前駆細胞および/またはCD34$^+$ PSCがMS5-hDLL4細胞と、最適化な比（典型的には間質細胞に対してHSPCが1:10）で混合される。

【０２７５】

例えば、凝集は、混合細胞懸濁液の遠心分離（「圧縮凝集」）、続いて無細胞上清みの吸引によって得られる。次いで、細胞ペレットは5～10μlの分化培地中のスラリーとして吸引されて、小滴として0.4umのナイロントランズウェル培養インサート上に移されてよく、該インサートは分化培地のウェル内に浮かべられ、それによりインサートの底面が培地と、かつ上面が空気と、接触することができる。

【０２７６】

例えば、分化培地は、RPMI-1640、5ng/mlのヒトFLT3L、5ng/mlのヒトIL-7、4％の無血清B27サプリメントおよび30μMのL-アスコルビン酸で構成されている。培地は、3～4日間ごとに培養インサート周囲から完全に交換され得る。プロトコルのバリエーションにより、有効性に対していろいろな影響を有する択一的な成分の使用が可能になり、具体的には:基礎培地RPMIは、いくつかの市販の代替品（例えば、IMDM）で置き換えられ得る。使用される間質細胞株は、既報のマウス骨髄細胞株であるMS-5（Itoh et al,1989）であるが、MS-5は、同様のマウス間質細胞株（例えば、OP9、S17）、ヒト間質細胞株（例えば、HS-5、HS-27a）、初代ヒト間質細胞またはヒト多能性幹細胞由来の間質細胞で置き換えられ得る。

【０２７７】

間質細胞株は、ヒトDLL4 cDNAをコードしているレンチウイルスにより形質導入される;しかしながら、遺伝子送達の方法ならびにNotchリガンド遺伝子を変更してもよい。択一的なNotchリガンド遺伝子としてはDLL1、JAG1、JAG2などが挙げられる。また、Notchリガンドとしては、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7795404号および同第8377886号に記載のものも挙げられる。Notchリガンドとしては、Delta 1、3および4ならびにJagged 1、2がさらに挙げられる。また、NotchリガンドとしてはNotchリガンドの機能性の断片も挙げられる。PSCの型および供給源としては、骨髄、全血、臍帯血、末梢血、末梢血単核細胞または胸腺が挙げられ得るか、あるいはPSCまたは造血幹もしくは前駆細胞は、胚性幹細胞（ESC）または人工多能性幹細胞（iPSC）からインビトロで分化させたものであり得る。一次組織またはESCまたはiPSC由来のPSCまたは造血幹もしくは前駆細胞は、起源がヒト由来であっても非ヒト動物（例えば、マウス）由来であってもよい。

【０２７８】

X．疾患の処置

本方法は、かかる障害について試験で陽性だった個体またはかかる病態もしくは関連する病態を発現するリスクがあると思われる個体に対して使用され得る。本明細書に記載の組成物および方法は、本明細書において列挙した障害および/または当技術分野において公知の障害炎症性または自己免疫性の構成要素を処置するために使用され得る。

【０２７９】

本開示は、がんの処置および/またはがん抗原の使用に関する。処置されるがんまたは抗原は、当技術分野において公知の任意のがん、または例えば、上皮がん、（例えば、乳房、消化管、肺）、前立腺がん、膀胱がん、肺（例えば、小細胞肺）がん、結腸がん、卵巣がん、脳腫瘍、胃がん、腎細胞癌、膵がん、肝臓がん、食道がん、頭頸部がん、もしくは結腸直腸がんと関連している抗原であり得る。処置されるがんまたは抗原は、以下のがん:副腎皮質癌、特発性骨髄化生、AIDS関連がん（例えば、AIDS関連リンパ腫）、肛門がん、虫垂がん、星細胞腫（例えば、小脳および大脳の）、基底細胞癌、胆管がん（例えば、肝外の）、膀胱がん、骨のがん、（骨肉腫および悪性線維性組織球腫）、脳腫瘍（例えば、神経膠腫、脳幹神経膠腫、小脳もしくは大脳の星細胞腫（例えば、毛様細胞性星細胞腫、びまん性星細胞腫、退形成性（悪性）星細胞腫）、悪性神経膠腫、上衣細胞腫、オリゴデングリオーマ（oligodenglioma）、髄膜腫、髄膜肉腫、頭蓋咽頭腫、血管芽腫、髄芽細胞腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、視神経視床下部神経膠腫および膠芽細胞

腫）、乳がん、気管支腺腫/カルチノイド、カルチノイド腫瘍（例えば、消化管カルチノイド腫瘍）、原発不明癌、中枢神経系リンパ腫、子宮頸がん、結腸がん、結腸直腸がん、慢性骨髄増殖性障害、子宮内膜がん（例えば、子宮がん）、上衣細胞腫、食道がん、ユーイングファミリー腫瘍、目のがん（例えば、眼内黒色腫および網膜芽細胞腫）、胆嚢がん、胃（gastric）（胃（stomach））がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、胚細胞腫瘍、（例えば、頭蓋外、性腺外、卵巣）、妊娠性絨毛性腫瘍、頭頸部がん、肝細胞（肝臓）がん（例えば、肝癌およびヘパトーマ）、下咽頭がん、島細胞癌（膵内分泌）、喉頭がん、喉頭がん、白血病、口唇および口腔のがん、口腔がん、肝臓がん、肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌）、リンパ球系の新生物（例えば、リンパ腫）、髄芽細胞腫、卵巣がん、中皮腫、転移性頭頸部扁平上皮がん、口のがん、多発性内分泌腫瘍症症候群、骨髄異形成症候群、骨髄異形成性/骨髄増殖性の疾患、鼻腔および副鼻腔のがん、鼻咽頭がん、神経芽細胞腫、神経内分泌がん、口腔咽頭がん、卵巣がん（例えば、卵巣上皮がん、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍）、膵がん、副甲状腺がん、陰茎がん、腹膜のがん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体芽細胞腫およびテント上原始神経外胚葉性腫瘍、下垂体腫瘍、胸膜肺芽腫、リンパ腫、原発性の中枢神経系リンパ腫（小膠細胞腫）、肺リンパ脈管筋腫症、直腸がん、腎がん、腎盂および尿管のがん（移行上皮がん）、横紋筋肉腫、唾液腺がん、皮膚がん（例えば、非黒色腫（例えば、扁平上皮癌）、黒色腫およびメルケル細胞癌）、小腸がん、扁平上皮がん、精巣がん、喉のがん、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺がん、結節性硬化症、尿道がん、膣がん、外陰がん、ウィルムス腫瘍、ならびに移植後リンパ球増殖性障害（PTLD）、母斑症と関連している異常な血管増殖、浮腫（例えば、脳腫瘍と関連しているもの）、またはメイグス症候群のうちの1つのものであり得る。

【０２８０】

本開示は、自己免疫性の病態の処置および/または自己免疫性の関連抗原の使用に関する。処置される自己免疫性疾患または抗原は、当技術分野において公知の任意の自己免疫性の病態あるいは例えば、糖尿病、移植片拒絶、GVHC、関節炎（関節リウマチ、例えば急性関節炎、慢性関節リウマチ、痛風または痛風性関節炎、急性痛風性関節炎、急性免疫性関節炎、慢性炎症性関節炎、変性性関節炎、II型コラーゲン誘発性関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、スチル病、脊椎関節炎および若年発症関節リウマチ、変形性関節症、慢性進行性関節炎、変形性関節炎、慢性一次性多発性関節炎、反応性関節炎および強直性脊椎炎）、炎症性過剰増殖性皮膚疾患、乾癬、例えば尋常性乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬および爪の乾癬、アトピー、例えばアトピー性疾患、例えば花粉症およびヨブ症候群、皮膚炎、例えば接触性皮膚炎、慢性接触性皮膚炎、剥脱性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触性皮膚炎、疱疹状皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異性皮膚炎、一時刺激性接触性皮膚炎およびアトピー性皮膚炎、x連鎖高IgM症候群、アレルギー性眼内炎症性疾患、蕁麻疹、例えば慢性アレルギー性蕁麻疹および慢性特発性蕁麻疹、例えば慢性自己免疫性蕁麻疹、筋炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性表皮壊死症、強皮症（例えば、全身性強皮症）、硬化症、例えば全身性硬化症、多発性硬化症（MS）、例えば視神経脊髄型MS、一次進行型MS（PPMS）および再発寛解型MS（RRMS）、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化、散在性硬化症、失調性硬化症、視神経脊髄炎（NMO）、炎症性腸疾患（IBD）（例えば、クローン病、自己免疫媒介性消化管疾患、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎（ulcerative colitis）、潰瘍性大腸炎（colitis ulcerosa）、顕微鏡的大腸炎、膠原線維性大腸炎、ポリープ状大腸炎、壊死性腸炎および全層性大腸炎、ならびに自己免疫性炎症性腸疾患）、腸の炎症、壊疽性膿皮症、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、呼吸窮迫症候群、例えば成人型または急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、髄膜炎、ブドウ膜の全部または一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫性の造血器障害、リウマチ様脊椎炎、リウマチ性滑膜炎、遺伝性血管浮腫、髄膜炎の場合のような脳神経損傷、妊娠性疱疹、妊娠性類天疱瘡、陰嚢掻痒、自己免疫性早発卵巣不全、自己免疫性の病態による突発性難聴、IgE媒介性疾患、例えばアナフィラキシーならびにアレルギー性およびアトピー性の鼻炎、脳炎

、例えばラスムッセン脳炎ならびに辺縁系および/または脳幹の脳炎、ブドウ膜炎、例えば前部ブドウ膜炎、急性前部ブドウ膜炎、肉芽腫性ブドウ膜炎、非肉芽腫性ブドウ膜炎、水晶体抗原性（phacoantigenic）ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎または自己免疫性ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群を伴う糸球体腎炎（GN）およびネフローゼ症候群を伴わない糸球体腎炎（GN）、例えば慢性または急性糸球体腎炎、例えば一次性GN、免疫媒介性GN、膜性GN（膜性腎症）、特発性膜性GNまたは特発性膜性腎症、膜性（membrano-またはmembranous）増殖性GN（MPGN）、例えばI型およびII型ならびに急速進行性GN、増殖性腎炎、自己免疫性多内分泌腺機能不全、亀頭炎、例えば限局性形質細胞性亀頭炎、亀頭包皮炎、遠心性環状紅斑、色素異常性固定性紅斑、多形紅斑、環状肉芽腫、光沢苔癬、硬化性萎縮性苔癬、慢性単純性苔癬、棘状苔癬、扁平苔癬、葉状魚鱗癬、表皮剥離性角質増殖症、前がん性角化症、壊疽性膿皮症、アレルギー性の病態および応答、アレルギー性反応、湿疹、例えばアレルギー性またはアトピー性の湿疹、皮脂欠乏性湿疹、異汗性湿疹および水疱性掌蹠湿疹、喘息、例えば気管支喘息（asthma bronchiale）、気管支喘息（bronchial asthma）および自己免疫性喘息、T細胞の浸潤が関与している病態および慢性炎症性応答、妊娠中の、外来抗原、例えば胎児のA-B-O式血液型に対する免疫反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫性心筋炎、白血球接着不全症、ループス、例えばループス腎炎、ループス脳炎、小児性ループス、非腎性ループス、腎外ループス、円板状ループスおよび円板状エリテマトーデス、ループス性脱毛、全身性エリテマトーデス（SLE）、例えば皮膚SLEまたは亜急性皮膚SLE、新生児ループス症候群（NLE）および全身性エリテマトーデス（lupus erythematosus disseminatus）、若年発症（I型）糖尿病、例えば小児性インスリン依存性糖尿病（IDDM）および成人発症糖尿病（II型糖尿病）ならびに自己免疫性糖尿病と関連している抗原であり得る。

また、サイトカインおよびT-リンパ球によって媒介される急性および遅延型過敏症と関連している免疫応答、サルコイドーシス、肉芽腫症、例えばリンパ腫様肉芽腫症、ヴェグナー肉芽腫症、無顆粒球症、脈管炎、例えば血管炎、大型血管炎（例えば、リウマチ性多発性筋痛および巨細胞性（高安）動脈炎）、中型血管炎（例えば、川崎病および結節性多発動脈炎/結節性動脈周囲炎）、顕微鏡的多発動脈炎、免疫性血管炎（immunovasculitis）、CNS血管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、壊死性血管炎、例えば全身性壊死性血管炎ならびにANCA関連血管炎、例えばチャーグ・ストラウス血管炎または症候群（CSS）およびANCA関連小型血管炎、側頭動脈炎、再生不良性貧血、自己免疫性再生不良性貧血、クームス陽性貧血、ダイアモンド・ブラックファン貧血、溶血性貧血または免疫介在性溶血性貧血、例えば自己免疫性溶血性貧血（AIHA）、アジソン病、自己免疫性好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球の血管外遊出が関与している疾患、CNS炎症性障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、多臓器障害症候群、例えば敗血症、傷害または大出血に副次的なもの、抗原-抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜病、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病/症候群、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーヴンス・ジョンソン症候群、類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡および皮膚類天疱瘡、粘膜類天疱瘡（例えば、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、粘膜類天疱瘡　粘膜類天疱瘡および紅斑性天疱瘡）、自己免疫性多内分泌腺症、ライター病または症候群、熱傷、子癇前症、免疫複合体性障害、例えば免疫複合体性腎炎、抗体媒介性腎炎、多発ニューロパチー、慢性ニューロパチー、例えばIgM多発ニューロパチーまたはIgM媒介性ニューロパチー、自己免疫性または免疫媒介性の血小板減少症、例えば特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、例えば慢性または急性ITP、強膜炎、例えば特発性角膜強膜炎（cerato-scleritis）、上強膜炎、精巣および卵巣の自己免疫性疾患、例えば自己免疫性の精巣炎および卵巣炎、原発性甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫性内分泌疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）または亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブス病、多内分泌腺症候群、例えば自己免疫性多内分泌腺症候群（または多内分泌腺内分泌障害症候群）、腫瘍随伴症候群、例えば神経系腫瘍随伴症候群、例えばランバート・イートン筋無力症候群またはイ

ートン・ランバート症候群、スティッフまたはスティッフパーソン症候群、脳脊髄炎、例えばアレルギー性脳脊髄炎またはアレルギー性脳脊髄炎および実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、実験的自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連重症筋無力症、小脳変性症、ニューロミオトニア、オプソクローヌスまたはオプソクローヌス・ミオクローヌス症候群（OMS）および感覚性ニューロパチー、多巣性運動ニューロパチー、シーハン症候群、自己免疫性肝炎、慢性肝炎、ルポイド肝炎、巨細胞性肝炎、慢性活動性肝炎または自己免疫性慢性活動性肝炎、リンパ球様間質性肺炎（LIP）、閉塞性細気管支炎（非移植）対NSIP、ギラン・バレー症候群、バージャー病（IgA腎症）、特発性IgA腎症、線状IgA皮膚症、急性熱性好中球性皮膚症、角層下膿疱症、一過性棘融解性皮膚症、肝硬変、例えば原発性胆汁性肝硬変および肺肝硬変（pneumonocirrhosis）、自己免疫性腸疾患症候群、セリアック（CeliacまたはCoeliac）病、セリアックスプルー（グルテン性腸症）、難治性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、筋萎縮性側索硬化症（ALS;ルー・ゲーリッグ病）、冠動脈疾患、自己免疫性の耳の疾患、例えば自己免疫性内耳疾患（AIED）、自己免疫性難聴、多発軟骨炎、例えば難治性または再発型または再発性の多発軟骨炎、肺胞蛋白症、コーガン症候群/非梅毒性間質性角膜炎、ベル麻痺、スウィート病/症候群、酒さ自己免疫性帯状疱疹関連痛、アミロイドーシス、非がん性リンパ球増加症、原発性リンパ球増加症、これはモノクローナルB細胞リンパ球増加症（例えば、良性単クローン性免疫グロブリン血症および意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症、MGUS）を含む、末梢性ニューロパチー、腫瘍随伴症候群、チャネロパチー、例えば癲癇、片頭痛、不整脈、筋肉障害、難聴、失明、周期性四肢麻痺およびCNSのチャネロパチー、自閉症、炎症性ミオパチー、巣状または分節性または巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）、内分泌眼症、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓学的障害、線維筋肉痛、多腺性内分泌不全症、シュミット症候群、副腎炎、胃の萎縮、初老期認知症、脱髄疾患、例えば自己免疫性脱髄疾患および慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー、ドレスラー症候群、アレアタ脱毛症（alopecia greata）、全頭脱毛症、CREST症候群（石灰沈着症、レイノー現象、食道運動障害、手指硬化症）および毛細血管拡張症）、例えば抗精子抗体による男性および女性の自己免疫性不妊症、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、反復流産、農夫肺症、多形性紅斑、心臓切開術後症候群、クッシング症候群、鳥飼病、アレルギー性肉芽腫性血管炎、良性リンパ球性血管炎、アルポート症候群、肺胞炎、例えばアレルギー性肺胞炎および線維化性肺胞炎、間質性肺疾患、輸血副作用、らい病、マラリア、寄生虫症、例えばリーシュマニア症、キパノソミアシス（kypanosomiasis）、住血吸虫症、蛔虫症、アスペルギルス症、サムター症候群、キャプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維症、びまん性間質性肺線維症、間質性肺線維症、肺線維症、特発性肺線維症、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎、シャルマン症候群、フェルティ症候群、フィラリア症、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、ヘテロ慢性毛様体炎、虹彩毛様体炎（急性もしくは慢性）またはフックス毛様体炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染、SCID、後天性免疫不全症候群（AIDS）、エコーウイルス感染、敗血症、内毒血症、膵臓炎、サイロキシコシス（thyroxicosis）、パルボウイルス感染、風疹ウイルス感染、予防接種後症候群、先天性風疹感染、エプスタイン-バーウイルス感染、耳下腺炎、エヴァン症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞踏病、溶連菌感染後腎炎、スロンボアンギティス・ユビテランス（thromboangitis ubiterans）、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発筋痛、慢性過敏性肺炎、乾性角結膜炎、流行性角結膜炎、特発性腎炎症候群、微小変化型腎症、良性家族性虚血再灌流障害、移植臓器再灌流、網膜自己免疫症、関節炎、気管支炎、慢性閉塞性気道/肺疾患、ケイ肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化性障害、アスペルニオジェネス（asperniogenese）、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、アレルギー性腸炎、癩性結節性紅斑、特発顔面神経麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱病、ハンマン・リッチ病、感覚神経性難聴、発作性ヘモグロビン尿症、性腺機能低下症、限局性回腸炎、白血球減少症、伝染性単核球症、横断性脊髄炎、原発性特発性粘液水腫、ネ

フローゼ、交感性眼炎、精巣炎肉芽腫性、膵炎、急性多発性神経根炎、壊疽性膿皮症、ケルバン甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、非悪性胸腺腫、白斑、毒素性ショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤が関与している病態、白血球接着不全症、サイトカインおよびT-リンパ球によって媒介される急性および遅延型過敏症と関連している免疫応答、白血球の血管外遊出が関与している疾患、多臓器障害症候群、抗原-抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、アレルギー性神経炎、自己免疫性多内分泌腺症、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫性萎縮性胃炎、交感性眼炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、膵島炎、多腺性内分泌不全症、自己免疫性多内分泌腺症候群I型、成人発症特発性副甲状腺機能低下症（AOIH）、心筋症、例えば拡張型心筋症、後天性表皮水疱症（EBA）、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性または非化膿性副鼻腔炎、急性または慢性副鼻腔炎、篩骨、前頭骨、上顎または蝶形骨洞炎、好酸球関連障害、例えば好酸球増加症、好酸球増多性肺浸潤、好酸球増加筋痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸球性肺炎、熱帯性肺好酸球増多症、気管支肺炎アスペルギルス症、アスペルギロームまたは好酸球を含む肉芽腫、アナフィラキシー、血清反応陰性脊椎関節炎、多腺性内分泌自己免疫性疾患、硬化性胆管炎、強膜、強膜上板、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ブラットン症候群、一過性乳児低ガンマグロブリン血症、ウィスコット・アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、血管拡張症、膠原病と関連している自己免疫性障害、リウマチ、神経系の疾患、リンパ節炎、血圧反応の低下、血管機能不全、組織損傷、心臓血管虚血、痛覚過敏、腎虚血、脳虚血、および血管新生を伴う疾患、アレルギー性過敏性障害、糸球体腎、再灌流障害、虚血性再灌流障害、心筋または他の組織の再灌流障害、リンパ腫性気管気管支炎、炎症性皮膚症、急性炎症性成分による皮膚症、多臓器不全、水疱性疾患、腎皮質壊死、急性化膿性髄膜炎または他の中枢神経系の炎症性障害、眼および眼窩の炎症性障害、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘発性毒性、ナルコレプシー、急性重篤炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、動脈内膜過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、移植片対宿主病、接触性過敏症、喘息性気道過敏症ならびに子宮内膜症も想定される。

【０２８１】

細胞は、有害な効果を伴うことなくレシピエントへの送達に適するような様式で製剤化され得る。細胞は細胞懸濁液として製剤化されてもそうでなくてもよい。具体的な場合では、細胞は単回用量形態に製剤化される。細胞は全身投与または局所投与のために製剤化され得る。いくつかの場合では、細胞は使用前に保存するために製剤化され、細胞製剤は、1つまたは複数の凍結保存剤、例えばDMSO（例えば、5%DMSO中）を含み得る。細胞製剤はアルブミン、例えばヒトアルブミンを含み得、具体的な一例の製剤は2.5%のヒトアルブミンを含む。細胞は、静脈内投与のために具体的に製剤化され得;例えば、細胞は、1時間未満での静脈内投与のために製剤化される。細胞は、解凍時から1、2、3もしくは4時間またはそれより長い間、室温で安定である製剤化された細胞懸濁液の状態であり得る。

【０２８２】

本明細書に開示の治療用組成物および処置薬は、治療用薬剤の組み合わせ、例えば第1の治療用もしくは薬学的組成物または処置薬と第2の治療用もしくは薬学的組成物または処置薬の投与を含み得る。複数の治療薬は、当技術分野において公知の任意の適当な様式で投与され得る。例えば、該治療用もしくは薬学的組成物または処置薬は逐次（異なる時点で）または並行して（同時に）投与され得る。該治療用もしくは薬学的組成物または処置薬は別々の組成物で投与され得る。該治療用もしくは薬学的組成物または処置薬は同じ組成物中に存在していてもよい。

【０２８３】

また、本開示において、治療用組成物を含む組成物および方法を記載する。該異なる治療用もしくは薬学的組成物または処置薬は、1つの組成物で、または1つより多くの組成物、例えば2つの組成物、3つの組成物もしくは4つの組成物で投与され得る。薬剤の種々の組み合わせが使用され得る。

【０２８４】

本明細書に開示の治療用または薬学的組成物および処置薬は別の処置薬または薬剤より前、併存的および/または後であり得、数分から数週間の範囲の間隔があけられる。薬剤が細胞、組織または生物体に別々に適用される場合、一般的に、各送達時点間においてかなりの期間が経過しないようにすることが確実にされ得、その結果、治療用または薬学的薬剤がまだ、該細胞、組織または生物体に対して好都合な複合効果を奏することができるようにされ得る。例えば、かかる場合では、該細胞、組織または生物体は2、3、4つまたはそれより多くの薬剤または処置薬と実質的に同時に（すなわち、約1分未満以内に）接触され得ることが想定される。1つまたは複数の治療用薬剤または処置薬は、別の治療用薬剤または処置薬の投与の前および/または後の1分、5分、10分、20分、30分、45分、60分、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、22時間、23時間、24時間、25時間、26時間、27時間、28時間、29時間、30時間、31時間、32時間、33時間、34時間、35時間、36時間、37時間、38時間、39時間、40時間、41時間、42時間、43時間、44時間、45時間、46時間、47時間、48時間、1日、2日、3日、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日、18日、19日、20日、21日、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間もしくは8週間以内、またはそれより長い期間以内、およびこれらの中で導き出せる任意の範囲以内に投与または提供され得る。

【０２８５】

処置薬は種々の「単位用量」を含み得る。単位用量は、所定の量の治療用組成物が含まれていることと定義する。投与すべき量ならびに具体的な経路および製剤は、臨床技術分野の当業者が決定する技量の範囲内である。単位用量は単回注射として投与される必要はなく、設定された期間にわたる連続輸注を含み得る。単位用量は単回で投与可能な用量を含み得る。

【０２８６】

ヒトに投与される治療用組成物または処置薬の治療上有効または十分な量は、1回の投与であれ複数回の投与であれ、約10^2から最大約10^{10}個の細胞/kg患者体重の範囲であり得る。使用される治療薬は、例えば、約10^2個の細胞～約10^9個の細胞/kg、約10^2個の細胞～約10^8個の細胞/kg、約10^2個の細胞～約10^7個の細胞/kg、約10^2個の細胞～約10^6個の細胞/kg、約10^2個の細胞～約10^5個の細胞/kg、約10^2個の細胞～約10^4個の細胞/kgまたは約10^2個の細胞～約10^3個の細胞/kgが毎日投与され得る。本明細書に記載の治療薬は対象に、約10^2個の細胞、約10^3個の細胞、約10^4個の細胞、約10^5個の細胞、約10^6個の細胞、約10^7個の細胞、約10^8個の細胞、約10^9個の細胞または約10^{10}個の細胞の用量で投与され得る。該用量は単回用量として投与されても反復用量（例えば、2回もしくは3回の用量）、例えば輸注として投与されてもよい。この治療の進行は慣用的な手法によって容易にモニタリングされる。

【０２８７】

「免疫学的に有効な量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻止有効量」または「治療量」と示されている場合、投与される本開示の組成物の厳密な量は、医師により年齢、体重、腫瘍の大きさ、感染または転移の程度および患者（対象）の体調の個々の違いを考慮して決定され得る。

【０２８８】

XI. キット

また本開示により、本開示の組成物または本開示の方法を実施するための組成物を含むキットを記載する。キットは、導入遺伝子の発現、導入遺伝子のゲノム内への組込み、または導入遺伝子を含む幹細胞または前駆細胞の成熟細胞への分化を評価するために使用され得る。キットには、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、4

9、50、100、500、1,000個もしくはそれより多く、もしくはこれらの中で導き出せる任意の値もしくは範囲および組み合わせのプローブ、プライマーもしくはプライマーセット、合成分子もしくは阻害剤を含んでもよく、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、100、500、1,000個もしくはそれより多く、もしくはこれらの中で導き出せる任意の値もしくは範囲および組み合わせのプローブ、プライマーもしくはプライマーセット、合成分子もしくは阻害剤を含んでもよく、または多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、100、500、1,000個もしくはそれより多く、もしくはこれらの中で導き出せる任意の値もしくは範囲および組み合わせのプローブ、プライマーもしくはプライマーセット、合成分子もしくは阻害剤を含んでもよい。

【０２８９】

キットは、容器内に個々にパッケージングまたは配置され得る構成要素、例えばチューブ、ビン、バイアル、シリンジまたは他の好適な容器手段を含み得る。キットは、本明細書に記載の細胞培養成分、組成物および培養槽を含み得る。

【実施例】

【０２９０】

XII. 実施例

以下の実施例は本発明の好ましい態様を示すために含めている。当業者には、以下の実施例に開示した手法は、本発明者が本発明の実施において十分に機能することを見出した手法を表し、したがって、その実施のための好ましい態様を構成するとみなされ得ることが認識されよう。しかしながら、当業者には、本開示に鑑みて、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく開示された具体的な態様において多くの変更がなされ得、それでもなお同様または類似の結果が得られ得ることが認識されるはずである。

【０２９１】

実施例1-成熟T細胞の分化の過程での遺伝子発現の調節

H1 hESCを、CAR19LHとレポーターeGFPを共発現するレンチウイルスベクターにより形質導入した。細胞を高eGFP発現に関して選別し、クローンを平均ベクターコピー数について評価した。H1 CAR19LH-eGFPクローン2（VCN:4.6）を野生型H1対照と並行してATOに分化させ、2～5週目に解析した。野生型と比べて、H1 CAR19LH-eGFPクローン2は、低頻度のCD3＋TCRab＋細胞を伴う、通常とは異なる分化を示した（図2A）。さらに、クローン2はまた、SP4およびSP8細胞の発生の進展の停止または大半がCD4-CD8-「ダブルネガティブ」細胞の集団も示した（図2B）。

【０２９２】

図3に示されるように、細胞は、GZMAの下流に挿入された導入遺伝子のステージ特異的発現を示した。CRISPR/Cas9媒介性相同組換え修復がH1 hESC細胞株において行なわれ、レポーターmCitrineが内在性GZMA遺伝子の3'UTR内に挿入された。ヘテロ接合性H1 GZMA-mCitrineレポーターを野生型H1対照と並行してクローニングし、ATOに分化させた。レポーター発現レベルを1、3および5週目の異なるT細胞発生ステージで評価した。H1 GZMA-mCitrine Hetクローン9の解析を示す。mCitrineは、23％のSP8および2％のSP4において発現されているが、前駆体ステージISP4でもDPでも発現されていない。

【０２９３】

内在性GZMAプロモーターの制御によるCAR19LHの発現は、CAR T細胞の正常な発生を可能にする。同様のノックインプロトコルを使用し、CAR19LH外来遺伝子を、T-iPSC株「n11:」の内在性GZMA遺伝子の3'UTR内に挿入した。このアプローチでは、先のレポーター実験によって明示されるように、CAR19LHの発現は、T細胞がSP8および

SP4の成熟ステージに達するまで遅延されるであろう。n11 GZMA-CAR19LHホモ接合型クローンはATOへの分化を行なった。図3aは、DP細胞（1週目）、SP8細胞（3週目）、およびSP4細胞（4週目）での高頻度のCD3＋TCRab＋細胞および通常の発生パターンを示す。図3bは、抗FMC63 scFv抗体を用いたCARの染色を示す。4週目では、67.8％のSP8および6.37％のSP4がCARを発現し、9週目では、76.9％のSP8および7.15％のSP4がCARを発現した。これを図4に示す。

【０２９４】

実施例2．同種異系iPSC由来キメラ抗原受容体療法に対する生物学的障壁を迂回する操作

キメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法は、他では処置不応性の造血器悪性腫瘍において注目すべき結果をもたらしている。現在、自己由来のCAR T細胞を製造するプロセスは、各個別治療のデノボ作製の必要性および患者間のT細胞生物学の固有の変動性のため難しく、臨床的奏効は予測不可能で一貫性がない。その結果、ヒト多能性幹細胞（hPSC）の無限再生性の同種異系の供給源からインビトロでCAR T細胞を生成させることに関心が高まっている。

【０２９５】

しかしながら、hPSCからCAR T細胞を生成させるためには、いくつかの生物学的障壁がある。第1に、T細胞分化の早期でのCAR導入遺伝子の発現では、発生が、典型的なT細胞系統ではなく自然リンパ球系の経路の方に逸脱する。第2に、アロ反応性を抑制するための内在性T細胞受容体（TCR）の除去により、成熟中のT細胞が正の選択を受けることができなくなるため、発生のブロックがもたらされる。本提案により、革新的なステージ特異的発現ストラテジーおよび典型的な成熟T細胞の分化、人工胸腺オルガノイド（ATO）システムを誘導するための新規なインビトロ方法を配置することによって、非アロ反応性の幹細胞由来のCAR T細胞を生成させることに対するこのような課題を解決することを追求する。

【０２９６】

ATOは、成熟したシングルポジティブ（SP）CD8＋およびCD4＋ T細胞をマルチ幹細胞供給源、例えばhPSCから効率的に生成させるためのファースト・イン・クラスのインビトロ方法である。以前に樹立された系を改善すると、ATOは正の選択およびSPステージへの成熟をロバストに支持することができる。自然な運命の逸脱は、成熟T細胞に限定されるCAR導入遺伝子のステージ特異的遅延発現を達成することにより克服できることが、本発明者らの予備試験により既に示されている。本提案において、本発明者らは、CARの遅延発現モデルを構築し、内在性TCRの破壊がATOにおけるCAR T細胞の発生にどのように影響するのかを評価する。次いで、本発明者らは、内在性TCRの非存在下での発生をレスキューするために外来の正の選択シグナルを送出する2つの異なる方法を評価する。これらの方法は、持続的にシグナル伝達するCARの発現または外来性TCRを生理学的に適切なDP T細胞ステージで一過的に発現させることを含む。本提案において開発したアプローチにより、hPSC由来非アロ反応性T細胞療法薬の作製が可能になり、その必要があるより多くの患者のための処置へのアクセスが増大する。

【０２９７】

図5に示されるように、ATOシステムにおいてCARの早期発現ではT細胞分化が自然リンパ球系の経路の方に逸脱している。本発明者らは、グランザイムA（GZMA）を抗CD19 CARノックインの潜在的候補遺伝子座と特定した（図6A～B）。GZMA遺伝子座におけるCAR19のステージ特異的発現により、典型的な成熟CAR T細胞の生成が可能になる（図7A～D）。CAR19発現を成熟SP T細胞のみに制限することにより、自然リンパ球系の経路への早期逸脱が抑制され、典型的な発生が可能になった（図7B）。5週目までに、大多数のATO由来T細胞がCD8αβ＋およびCAR19＋であった（図7C）。図7Dに示されるように、成熟SP8 CAR T細胞は、抗原CD19に応答して細胞傷害性サイトカインをロバストに放出し、活性化マーカーを上方調節した。

【０２９８】

ここに、本発明者らは、T-iPSC由来の非同種異系TCRを欠くCAR T細胞の生成を報告

する。本発明者らは、T細胞分化の過程での導入遺伝子発現のロバストで再現性のある時間的制御をもたらすステージ特異的発現システムを樹立した。このプラットフォームを構築し、本発明者らは典型的な成熟CAR T細胞を、抗原特異的死滅作用、活性化、および増殖を示すT-iPSCから作製した。

【０２９９】

実施例3-成熟T細胞の分化の過程での遺伝子発現の調節

本発明の目的は、特異的T細胞分化ステージに限定される、挿入された（トランスジェニック/外来性の）T細胞受容体（TCR）の遺伝子発現の調節を実現することである。胸腺において通常のT細胞が発生し、正の選択によって成熟T細胞が生産されることが可能になるにはTCRの発現が必要とされる。また、［アロ応答（移植片対宿主病）を予防するため］T細胞前駆体においてTCR発現を除去する方法は、成熟T細胞の正の選択も妨げる。TCR発現を特異的T細胞分化ステージに制限できることにより、「正の選択」およびT細胞前駆体の成熟の誘導が可能になるとともに、成熟T細胞における進行中のトランスジェニックTCRの発現の負の帰結が回避される。本発明の最も容易に適用可能な応用は、多能性幹細胞（PSC）を安定的に修飾することであろうが、このアプローチは潜在的に、早期T細胞発生時にインビトロまたはインビボで生産される任意の細胞型、例えばPSC、造血幹もしくは前駆細胞（HSPC）、または胸腺細胞前駆体を標的とするために使用することができよう。この技術の最優先の応用は、内在性TCR発現が除去されている同種異系PSCからの治療用T細胞のインビトロ作製を可能にすることであろう。TCR挿入のための内在性遺伝子座として特定した特異的遺伝子は、RAG1およびRAG2である。

【０３００】

養子T細胞療法、例えばFDA承認済CART療法は、現在、患者の血液から採取された自己由来T細胞の使用に依存している。このロジスティクス的に困難で費用がかかるプロセスは、自己由来（患者特異的）供給源のT細胞を使用する現在使用されているアプローチのオフ・ザ・シェルフ代替法となる潜在的可能性を提示する同種異系のT細胞供給源の使用の模索へと導かれつつある。

【０３０１】

同種異系T細胞も同様に、健常ドナーの血液から調達されてもよく、またはHSPCもしくはiPSCからインビトロで生成されてもよい。任意の同種異系T細胞生産物の臨床的使用では、ミスマッチのレシピエントの免疫系によるドナー細胞の拒絶を防ぐために、（1）移植片対宿主病（GvHD）を回避するための内在性TCR発現、ならびに（2）主要組織適合性複合体抗原（クラスIおよびクラスII）の発現を除去するための遺伝子修飾が、必要とされる。同種異系細胞療法の分野では、両方の型の機能修飾ための方法が開発されている。例えば、内在性TCR発現の除去は、TRAC遺伝子座の破壊またはRAG1 ＋/- RAG2遺伝子発現の欠失によって行なわれ得る。MHCクラスI発現の破壊は、特異的クラスI遺伝子または全MHCクラスI分子の構成要素であるベータ2ミクログロブリン（b2m）のいずれかの欠失によって行なわれ得る。クラスIIの欠失はCIITAの欠失によって行なわれ得る。

【０３０２】

しかしながら、同種異系の状況においてアロ反応性/拒絶の問題を引き起こす同じTCR-MHC間相互作用は、通常のT細胞の発生プロセスにも極めて重要である。いわゆるダブルポジティブ/DP T細胞前駆体（CD8とCD4の両方を共発現するためそう名付けられた）の表面上のTCRとMHC分子（胸腺の微小環境によって、また発生中のT細胞自体によっても提供される）との相互作用は、内在性胸腺において起こる通常の「正の選択」プロセスに極めて重要である。正の選択により、至適TCR-MHC親和性を有するDPが生き残り、いわゆるシングルポジティブ/SP T細胞系統細胞（CD4またはCD8のいずれかを発現し、両方は発現しないためそう名付けられた）に分化することが可能になる。正の選択は、Crooksの研究グループによって先に開発された、幹細胞のSP4およびSP8細胞への分化を誘導するための「人工胸腺オルガノイド」（ATO）技術においてインビトロで再現され得る。

【０３０３】
正の選択の前に内在性TCRの発現機構が除去されるという問題に対する解決策の1つは、外来性（トランスジェニック）のTCRを、ベータ選択時および正の選択時を含むT細胞分化全体を通して構成的に発現させることである。しかしながら、分化の過程で起こり、患者に移行される成熟T細胞における外来性TCRの持続的発現は、健常組織内でのアロ応答/GvHDまたは抗原発現のいずれかによる外来性TCRのオフターゲット効果の可能性があるという新たな問題が生じ得る。本発明により、ベータ選択および正の選択の前駆体ステージに制限される、すなわち、成熟T細胞では失われるTCR発現をもたらすための方法を提供する。本出願は、遺伝子の欠失および挿入が典型的には自己再生性PSCにおいて適用されるが、正の選択ステージ時またはその前での任意のTCR発現操作にも使用され得るPSCベースのT細胞療法の分野において非常に重要である。

【０３０４】
本発明者らは、RAG1およびRAG2遺伝子が、T細胞分化のベータ選択および正の選択ステージの際は高いが、成熟T細胞では低下するという、緊密に調節されるステージ特異的発現を有すると判断した。このアプローチは、トランスジェニックTCRを内在性のRAG1またはRAG2遺伝子調節領域内/または下流に挿入することである。このように、任意のトランスジェニックTCRが任意のT細胞分化システムにおいて正の選択を指令するために利用可能であるが、その後に生産される成熟T細胞において下方調節され、したがって潜在的GvHDが回避される。

【０３０５】
生物活性な導入遺伝子（すなわち、レポーター、キメラ抗原受容体）は内在性遺伝子の3'非翻訳領域に、CRISPR/Cas9媒介性相同組換え修復を用いてインフレームに挿入される。このプロセスにおいて、終止コドンは、セリン-アルギニンリンカーおよび自己切断ペプチド配列（P2A）と置き換えられる。このアプローチにより、挿入された導入遺伝子の内在性プロモーターによる発現調節が可能になり、内在性遺伝子の翻訳は未改変のままである。また、編集された多能性幹細胞の濃縮を補助するために、ピューロマイシン耐性遺伝子カセットが挿入され得る（図1A）。iPSCステージでのCRE-TAT処理後、ピューロマイシン耐性カセットは除去され得、loxp3配列だけになる（図1B）。

【０３０６】
図8A～Bは、7週間にわたるRAG1/2 KOヒト多能性幹細胞（hPSC）およびそのWT（未編集）親細胞株（H1、HLA-A＊0201＋;ESI017、HLA-A＊0201-）のT細胞分化速度論の代表的なフローサイトメトリー解析を示す。図8Aは、7週間にわたるRAG1/2 DKO hPSCおよびWT親細胞株由来のT細胞系統拘束性前駆体（CD45＋CD5＋CD7＋）のTCRabおよびCD3の表面染色を示す。図8Bは、CD8aおよびCD4の表面染色によって示される、T細胞系統拘束性前駆体の同じ集団からの7週間にわたるT細胞発生の進行を示す。前駆体は、以下の順:ダブルネガティブ（DN、CD4-CD8-）、未熟シングルポジティブ4（ISP4、CD4＋CD8-）、ダブルポジティブ（DP、CD4＋CD8＋）、シングルポジティブ（SP8、CD4-CD8＋;SP4、CD4＋CD8-）に、分化する。

【０３０７】
図9は、内在性TCR発現を欠失させることがhPSCからのT細胞分化の過程での正の選択に及ぼす影響を示す。RAG1/2 KO hPSCおよびWT（未編集）親細胞株（H1、HLA-A＊0201＋;ESI017、HLA-A＊0201-）は、HLA-A＊0201拘束性NYESO TCR（VB13.1抗体を用いて検出可能）を発現するレンチウイルスベクターにより安定的に形質導入された（図3）。図9Aは、7週間のT細胞分化における全造血細胞（CD45＋）でのVB13.1およびCD3表面発現の代表的なフローサイトメトリー解析を示す。図9Bは、NYESO TCR形質導入RAG1/2 DKOおよび親WT hPSC株でのSP8 T細胞の正の選択を示す。VB13.1およびCD3を発現している全造血細胞（CD45＋VB13.1＋CD3＋）は、7週間の分化において示されている。RAG1/2がノックアウトされている場合、SP8発生のレスキューはHLA-A＊0201＋細胞株、H1に排他的である。

【０３０８】

図10は、RAG1およびRAG2遺伝子の発現レベルが、DP集団における正の選択を含む種々のインビトロATO分化プロセス時点に限定されていることを示す。

【０３０９】

実施例4-成熟T細胞の分化の過程での遺伝子発現の調節

キメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法は、他では処置不応性の造血器悪性腫瘍において注目すべき結果をもたらしている[1～2]。現在、自己由来のCAR T細胞を製造するプロセスは、各個別治療のデノボ作製の必要性および患者間のT細胞生物学の固有の変動性のため難しく、臨床的奏効は予測不可能で一貫性がない[3～5]。その結果、ヒト多能性幹細胞（hPSC）の無限再生性の同種異系の供給源からインビトロでCAR T細胞を生成させることに関心が高まっている。このアプローチの利点の1つは、hPSCが非常に遺伝子編集を受けやすく、最終T細胞生産物の機能を操作する複数の道筋がもたらされることである。

【０３１０】

しかしながら、hPSCからCAR T細胞を生成させるには2つの極めて重要な生物学的障壁がある。

【０３１１】

（1）T細胞分化の早期でのCAR導入遺伝子の発現では、発生が自然リンパ球系の経路の方に逸脱する[6～10]。この結果は、PSCをT細胞に分化させるための人工胸腺オルガノイド（ATO）システムを用いた本発明者らの研究グループによっても、第2世代CD19 CARの構成的発現により典型的なシングルポジティブCD8＋（SP8）およびCD4（SP4）T細胞ではなく、2型自然リンパ球系細胞（ILC2）細胞の生産がもたらされたため、同様に報告された（図2A～B）[11]。この初期の運命の逸脱を解決するため、本アプローチでは、CRISPR/Cas9編集を用いて同じCD19 CARのステージ特異的遅延発現を実現させる。CAR導入遺伝子をグランザイムA（GZMA）遺伝子の3'非翻訳領域（UTR）内に挿入し、その発現を内在性GZMAプロモーターおよびその調節エレメントの制御下におく。GZMAは分化後期でのみ、シングルポジティブCD8（別名「SP8」）（CD3＋TCR＋CD8＋CD4-）およびシングルポジティブCD4＋（別名「SP4」）（CD3＋TCR＋CD8-CD4＋）T細胞に発現し、初期Tステージには非存在である。ステージ特異的発現は、操作されているGZMA-mCitrineレポーターATO実験を用いて検証した（図3）。その結果、ATOシステムを用いたGZMA-CAR19LH T-iPSCの分化では、従来の成熟SP8およびSP4 T細胞の効率的な発生が示され、ロバストなCAR発現を伴い（図4B）、自然細胞系統へのいかなる運命の逸脱の形跡もなかった（図4A）。本発明者らは、GZMAの代替物として使用され得る同様の発現パターンを有する他の内在性遺伝子を特定した：それらの遺伝子を表2Aに示す。

【０３１２】

（2）同種異系hPSC供給源から生産されるT細胞のアロ反応性に対処するためには、養子移入時のTCR/MHCミスマッチおよびその結果としての移植片対宿主病のリスクを予防するために、内在性T細胞受容体（TCR）がノックアウトされなければならない。しかしながら、TCR発現の除去（例えば、TRAC遺伝子座の破壊によって）により、成熟中のT細胞が正の選択を受けることができなくなるため、T細胞の発生の完全なブロックがもたらされる（図11A～D）。正の選択を復活させるための本発明者らの解決策は、外来性TCR（例えば、NYESO抗原を認識する1G4 TCR）を、正の選択ステージの（すなわち、ダブルポジティブ、別名DP、別名CD4＋CD8＋の）細胞において一過的に発現させる同様の3'UTRノックに依存する。本発明者ら自身のRNA-Seq試験に基づき、本発明者らは、RAG1遺伝子を正しい発現パターンを有する候補内在性遺伝子であると特定した;RAG1は、ダブルネガティブ（DN）中からダブルポジティブ（DP）までのT細胞に発現するが、正の選択を受けた後のSP8およびSP4 T細胞には存在しない。同じステージ特異的アプローチを用いてレポーター細胞株を作製し、RAG1調節レポーター発現が分化の過程でのRNA-Seqパターンに従うことを確認した（図12A～C）。また、レポーターは、活性化後であっても依然として成熟T細胞には検出不能であった（図12C）。次いで本発明者らは、同じストラテジーを使用してRAG1遺伝子座からの1G4 TCR発現を駆動し、

本発明者らが、TRAC破壊T-iPSC株から生成させた細胞において正の選択を復活させることができることを示した。したがって、トランスジェニックTCRの発現は極めて重要な正の選択期間（DPステージ）においてのみ起こり、SP8/SP4成熟後は存在せず（図13A～C）、最終的にTCRαβ-CD3- ナイーブ成熟SP8 T細胞の生成がもたらされた（図6D）。本発明者らは、RAG1の代替物として使用され得る同様の発現パターンを有する他の内在性遺伝子を特定した：それらの遺伝子を表2Bに示す。

【０３１３】

次いで、本発明者らはTRAC破壊PSC株において、（1）構成的発現に伴って起こる自然細胞系統のブロックおよびこれへの逸脱を回避するためのGZMAによるCD19 CAR発現（GZMA-CAR19LH）、ならびに（2）RAG1による外来性1G4（NYESO）TCRの一過性発現（RAG1-NYESO TCR）の2つの編集ストラテジーを併用した。データは、本発明者らにより、非アロ反応性TCRαβ-CD3-、ナイーブCAR T細胞を生成させるためのプラットフォームが開発されたことを示す（図14A～B）。得られたT細胞は、ロバストな抗原特異的活性化およびサイトカイン産生を示し（図14C）、このアプローチはいろいろなCARデザインに一般化可能であり得る（図14D）。

【０３１４】

（表２Ａ）

遺伝子	ES	EMP	CD34+ CD90+ CD43-	CD34+ CD90+ CD43+ CD45-	CD34+ CD90+ CD43+ CD45+	CD34med CD90med CD43+ CD45-	CD34med CD90med 43lo CD45+	DN (Thy1-Thy3)	ISP4	DP 初期	DP 後期	SP8	SP8 RA	SP4	SP4 RA
GZMA	0.04	0.00	0.01	0.06	0.06	0.29	0.38	1.31	0.06	0.02	0.37	373.68	11.08	205.48	18.03
GZMB	0.00	0.00	0.08	0.00	0.01	0.01	0.01	0.25	14.97	0.43	0.21	183.29	1.79	3.41	0.01
GZMH	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.07	1.33	0.21	0.00	16.36	0.77	2.16	0.00
GZMK	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.18	0.08	0.02	2.08	153.34	86.17	79.05	0.25
GZMM	0.23	0.12	0.25	0.00	0.00	0.09	0.11	0.13	0.11	0.05	0.50	122.84	18.46	33.89	15.45
XCL1	0.19	0.22	0.01	0.10	0.35	0.49	0.37	1.02	0.37	0.47	3.40	47.59	121.02	48.59	0.06
XCL2	0.00	0.04	0.08	0.68	0.97	0.95	0.80	1.82	0.47	0.00	4.33	88.20	133.01	15.71	0.14
TNFSF14	0.03	0.18	0.01	0.03	0.06	0.18	0.11	0.57	0.68	0.62	1.26	19.02	16.52	10.53	1.19
PTGDS	0.00	0.26	0.12	0.00	0.00	0.03	0.12	0.09	0.19	0.00	1.01	86.78	6.22	63.62	0.07
SAMD3	0.47	0.58	0.27	0.03	0.00	0.07	0.04	0.22	0.21	0.25	1.57	60.87	46.41	66.04	23.32
NCALD	0.75	0.64	1.54	0.10	0.18	0.37	0.96	1.56	0.27	0.16	0.44	16.19	11.05	12.24	1.54

【０３１５】
（表２Ｂ）

遺伝子	ES	EMP	CD34+CD90+CD43-	CD34+CD90+CD43+CD45-	CD34+CD90+CD43+CD45+	CD34medCD90medCD43+CD45-	CD34medCD90med43loCD45+	DN (Thy1-Thy3)	ISP4	DP初期	DP後期	SP8	SP8 RA	SP4	SP4 RA
RAG1	0.42	0.52	1.50	0.57	0.52	0.57	0.28	65.33	623.49	1326.27	1707.96	0.64	3.09	0.39	4.65
RAG2	0.00	0.00	0.28	0.07	0.11	0.03	0.02	40.91	245.41	243.57	449.94	0.00	0.93	0.05	2.14

【０３１６】

表2A～B：ATOシステムを用いたT細胞分化の過程での選択した遺伝子の発現プロファイル。（2A）選択した遺伝子は、DP T細胞ステージの多能性幹細胞では低度の発現から発現の非存在まで、成熟SP8およびSP4 T細胞では高発現を示す。（2B）選択した遺伝子は、CD34＋ 細胞ステージの多能性幹細胞では低度の発現から発現の非存在まで、DNからDP T細胞ステージまでは漸増的高発現を示す。正の選択を受けると、SP8およびSP4 T細胞において発現レベルは、低レベルから非存在レベルに戻る。

【０３１７】

発現プロファイルは、さまざまな細胞供給源（すなわち、PSC-ATO、臍帯血CD34＋

ＡＴＯ、胸腺）での発表済[1]および未発表のバルクＲＮＡシーケンシングデータの組み合わせから作製した。表の値はすべて、ＲＰＫＭの単位として示している。

【０３１８】

本明細書において開示し、請求項に記載した方法はすべて、必要以上に実験を行なうことなく本開示に鑑みて作製および実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様に関して記載したが、当業者には、本発明の思想、趣旨、および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法に対して、および本明細書に記載の方法の工程または工程の順序において、バリエーションが適用され得ることが明らかであろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連している特定の薬剤は、本明細書に記載の薬剤の代わりに使用してもよく、同じまたは同様の結果が得られるであろうということは明らかであろう。当業者に明らかな同様のかかる代用および改変はすべて、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の趣旨、範囲および思想に含まれているとみなす。

【０３１９】

本明細書において挙げた参考文献は、本明細書に示したことに対して補足的に例示的手順の詳細または他の詳細をもたらす程度まで、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

1. Gill S, Maus, Porter D. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making. *Blood Rev.* 2016 May;30(3):157-67. PMID: 26574053

2. Schultz L, Mackall C. Driving CAR T cell translation forward. *Sci. Transl. Med.* 2019 Feb 27;11(481):21-27. PMID: 30814337

3. Fraietta J, Lacey S, Orlando E, Pruteanu-Malinici L, Gohil M, Lundh S, Boesteanu A, Wang Y, O'Connor R, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* 2018 May;24(5):563-571. PMCID: PMC6117613

4. Papathanasiou M, Stamatis C, Lakelin M, Farid S, Titchener-Hooker N, Shah N. Autologous CAR T-cell therapies supply chain: challenges and opportunities? *Cancer Gene Ther.* 2020 Nov;27(10-11):799-809. PMID: 31932694

5. Cong L, Ran F, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P, Wu X, Jiang W, Marraffini L, Zhang F. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):819-23. PMCID: PMC3795411

6. Themeli M, Kloss C, Ciriello G, Fedorov V, Perna F, Gonen M, Sadelain M. Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat. Biotechnol.* 2013 Oct;31(10):928-33. PMCID: PMC5722218

7. Feucht J, Sun J, Eyquem J, Ho Y, Zhao Z, Leibold J, Dobrin A, Cabriolu A, Hamieh M, Sadelain M. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. *Nat. Med.* 2019 Jan;25(1):82-88. PMCID: PMC6532069

8. Maluski M, Ghosh A, Herbst J, Scholl V, Baumann R, Heuhn J, Geffers R, Meyer J, Maul H, Eiz-Vesper B, Krueger A, Schambach A, van den Brink M, Suer M. Chimeric antigen receptor-induced BCL11B suppression propagates NK-like cell development. *J Clin Invest.* 2019 Dec 2;129(12):5108-5122. PMCID: PMC6877334

9. Albert S, Koristka S, Gerbaulet A, Cartellieri M, Arndt C, Feldman A, Berndt N, Loureiro L, Bonin M, Ehninger G, Eugster A, Bonifacio E, Bornhauser M, Bachmann M, Ehninger A. Tonic Signaling and Its Effects on Lymphopoiesis of CAR-Armed Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *J. Immunol.* 2019 Mar 15;202(6):1735-1746. PMID: 30728213.

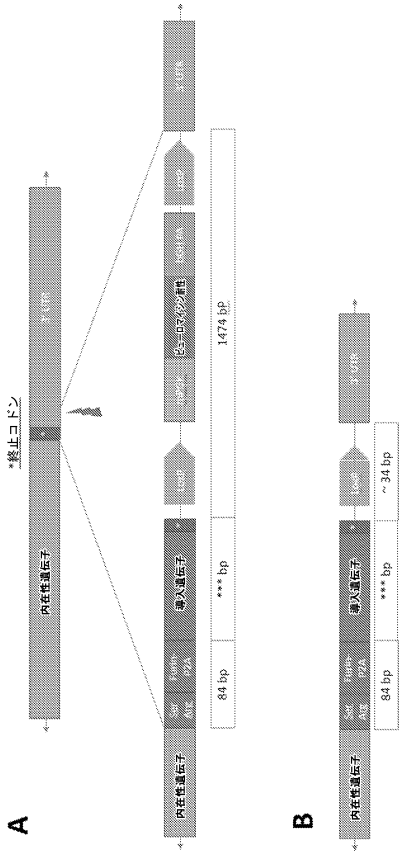
10. Ueda T, Shiina S, Iriguchi S, Terakura S, Kawai Y, Kabai R, Sakamoto S, Watanabe A, Ohara K, Wang B, Xu H, Minagawa A, Hotta A, Woltjen K, Uemura Y, Kodama Y, Seno H, Nakatsura T, Tamada K, Kaneko S. Optimization of the proliferation and persistency of CAR T cells derived from human induced pluripotent stem cells.

11. Li S, Wang CS, Montel-Hagen A, Casero D, Lopez S, Chen H-C, Zhou O, Botero C, Tsai SC, Wong C, Crooks GM, Seet CS. *J. Immunol.* 2022. 208(1_Supplement):107.11.

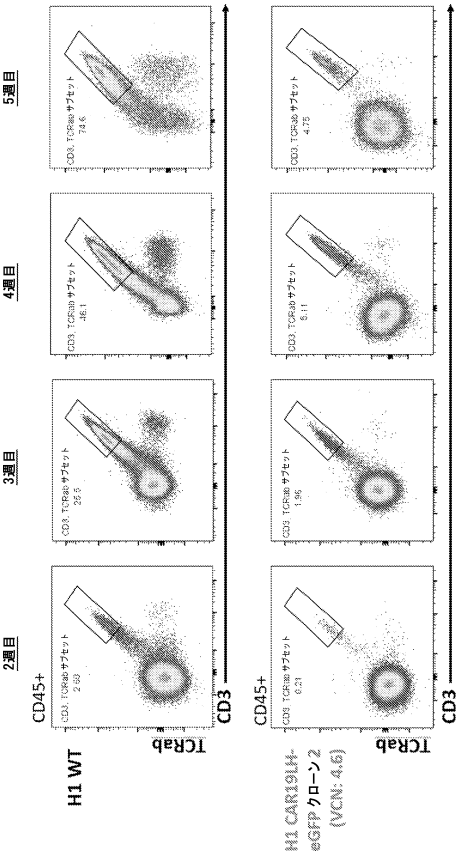
12. Montel-Hagen A, Seet S, Li S, Chick B, Zhu Y, Chang P, Tsai S, Sun V, Lopez S, Chen H, He C, Chin C, Casero D, Crooks G. Organoid-Induced Differentiation of Conventional T cells from Human Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell. 2019 Mar 7;24(3):376-389. PMCID: PMC6687310

【図面】

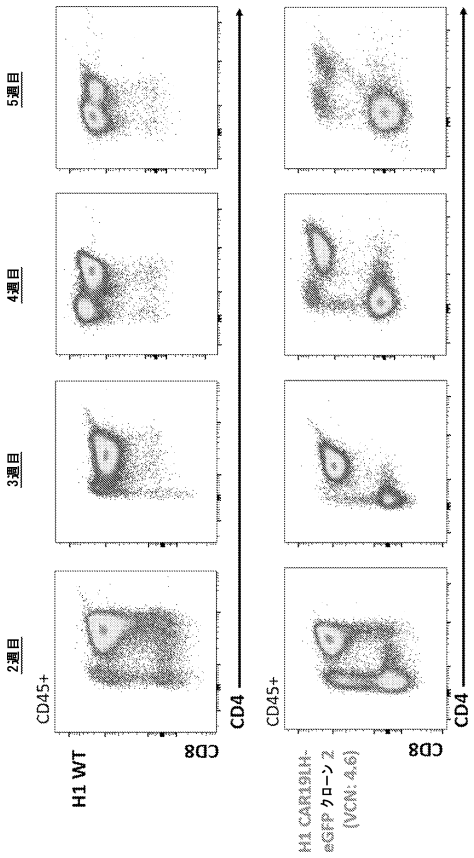
【図１】



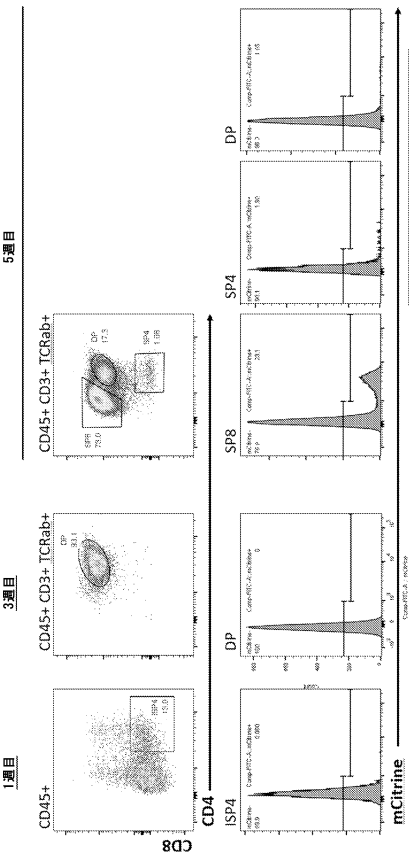
【図２Ａ】



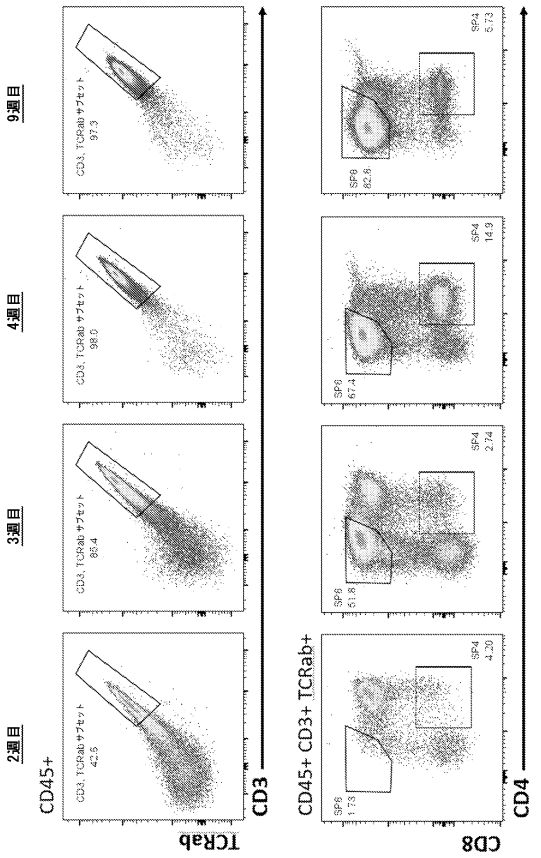
【図２Ｂ】



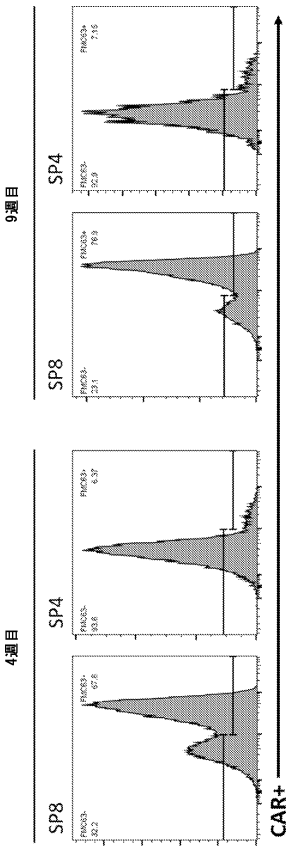
【図３】



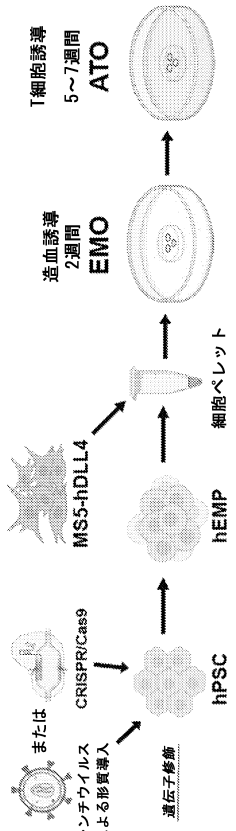
【図４Ａ】



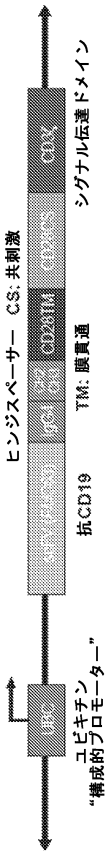
【図４Ｂ】



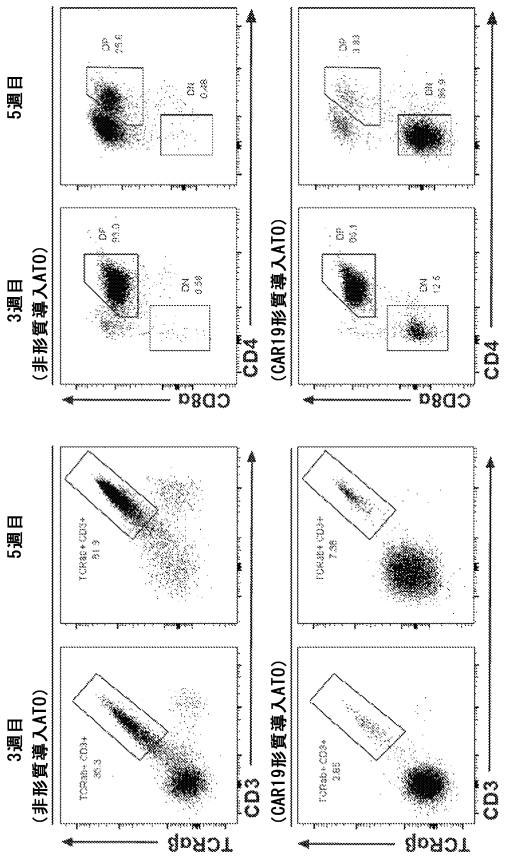
【図５Ａ】



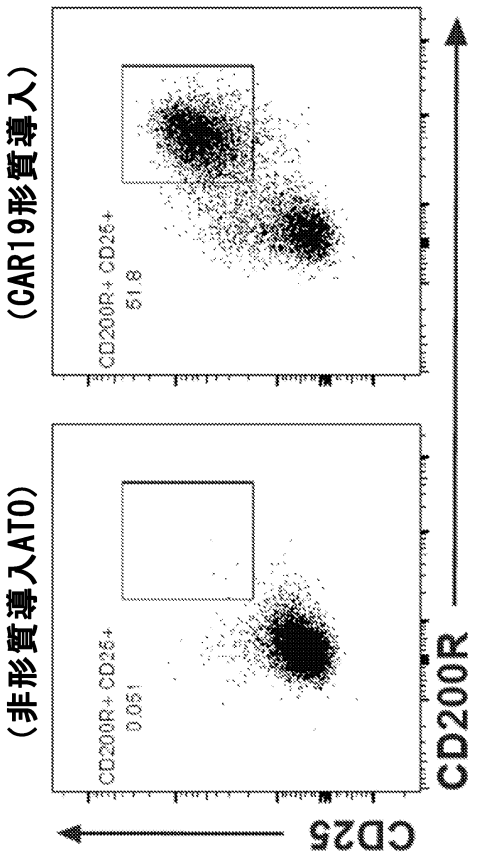
【図５Ｂ】



【図５Ｃ】



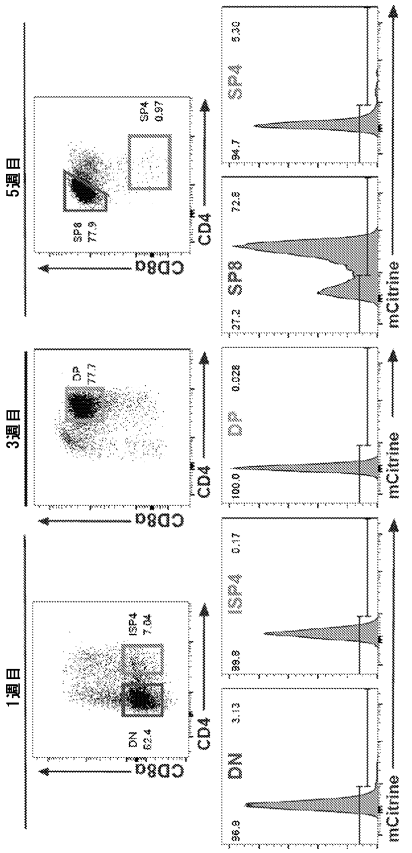
【図５Ｄ】



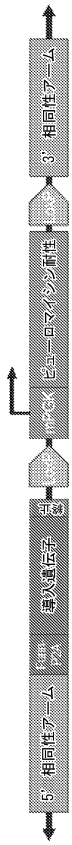
【図６Ａ】

供給源	CSC PSC	CSC PSC	CRM	CRM	CRM	CRM	CRM	CRM	CRM	CSC	CRM	CSC	CRM	CSC	CRM
型	ATO	ATO	PSC-ATO	PSC-ATO	PSC-ATO	PSC-ATO	PSC-ATO	CB-ATO	CB-ATO	PSC ATO	CB-ATO	PSC-ATO	CB-ATO	PSC ATO	胸腺
遺伝子	ES	EMP	CD34+ CD90+CD43- CD45-	CD34+ CD90+CD43- CD45+	CD34+ CD90+CD43 +CD45+	CD34med CD90med CD43+ CD45-	CD34med CD90med CD43+ CD45+	DN (Thy1- Thy1+)	ISP4	DP 初期	DP 後期	SP8	SP8 RA	SP4	SP4 RA
GZMA	0.04	0.00	0.01	0.06	0.06	0.29	0.38	1.31	0.06	0.02	0.37	373.68	11.08	205.48	18.03
GZMK	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.18	0.08	0.02	2.08	153.34	86.17	79.05	0.25
GZMM	0.23	0.12	0.25	0.00	0.00	0.09	0.11	0.13	0.11	0.05	0.50	122.84	18.46	33.89	15.45
XCL2	0.00	0.04	0.06	0.66	0.97	0.85	0.80	1.82	0.47	0.00	4.33	88.20	133.0	15.71	0.14
PTGDS	0.00	0.20	0.12	0.00	0.00	0.03	0.12	0.09	0.19	0.00	1.01	86.78	6.22	63.82	0.07
SAMD3	0.47	0.58	0.27	0.03	0.00	0.07	0.04	0.22	0.21	0.25	1.57	60.87	48.41	66.04	23.32
XCL1	0.19	0.22	0.01	0.10	0.35	0.49	0.37	1.02	0.37	0.47	3.40	47.59	121.0	48.59	0.06
TNFSF14	0.03	0.18	0.01	0.03	0.00	0.18	0.11	0.57	0.68	0.02	1.26	19.02	16.52	10.53	1.10
NCALD	0.75	0.64	1.54	0.10	0.18	0.37	0.06	1.56	0.27	0.16	0.44	16.19	11.05	12.24	1.54

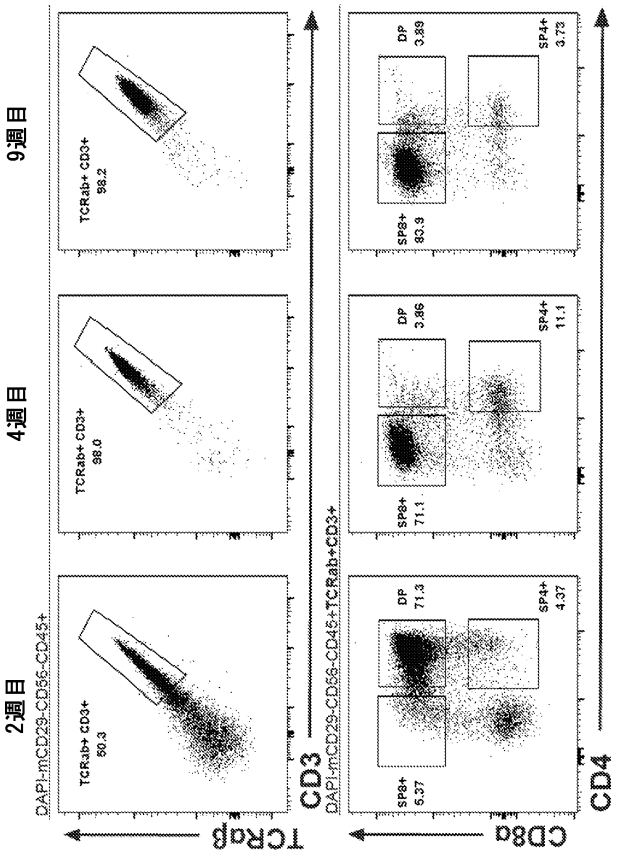
【図６Ｂ】



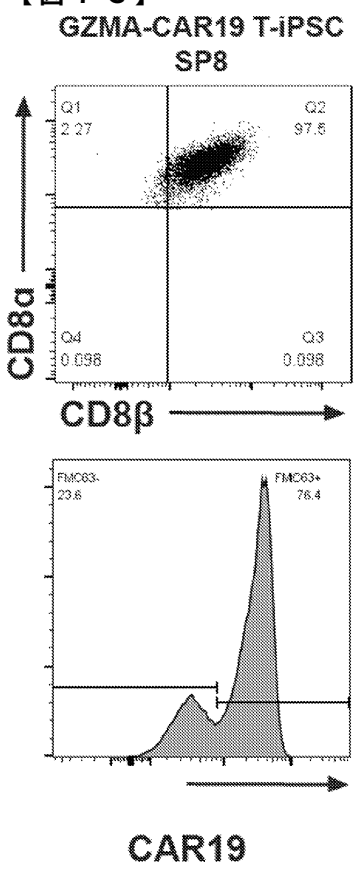
【図７Ａ】



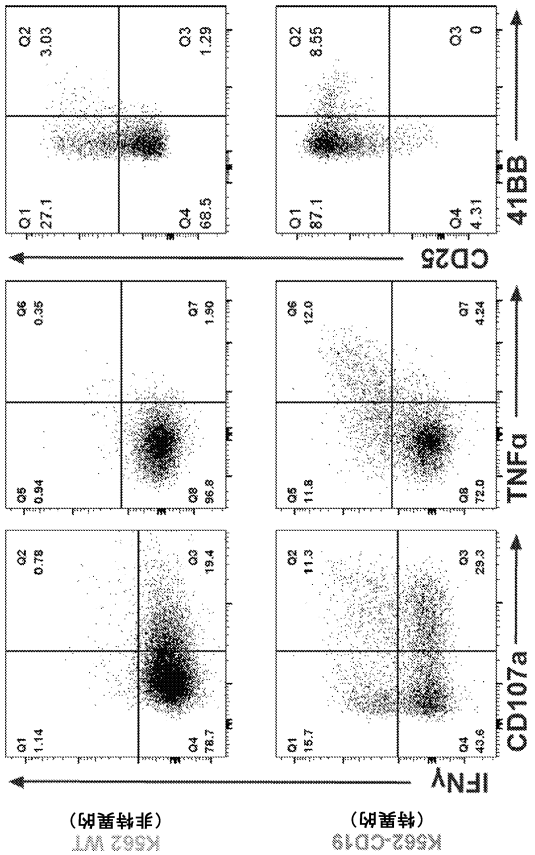
【図７Ｂ】



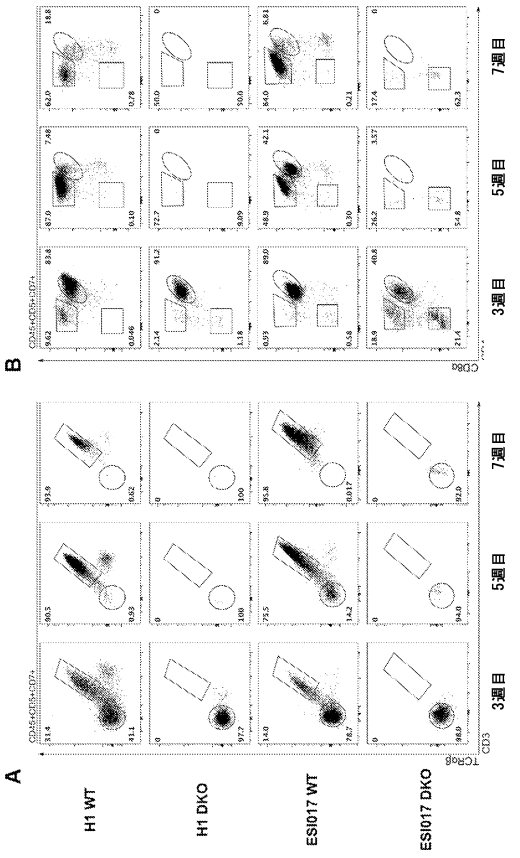
【図７Ｃ】



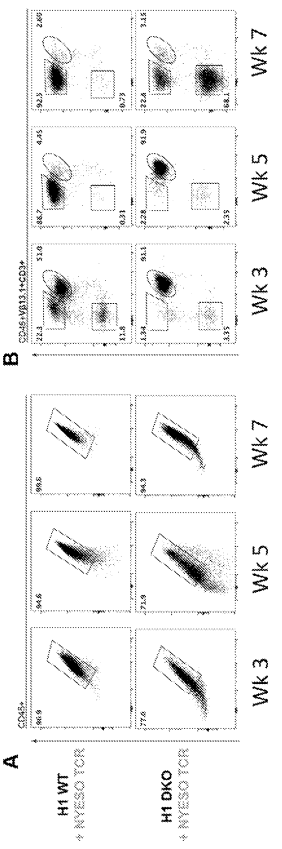
【図７Ｄ】



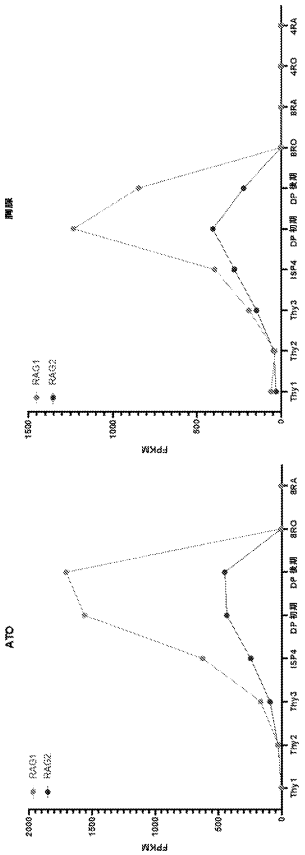
【図８】



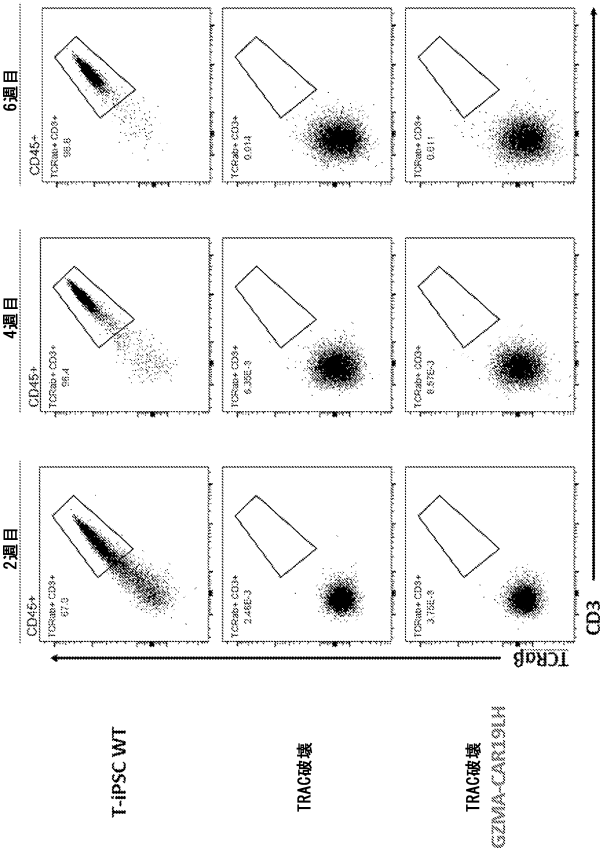
【図９】



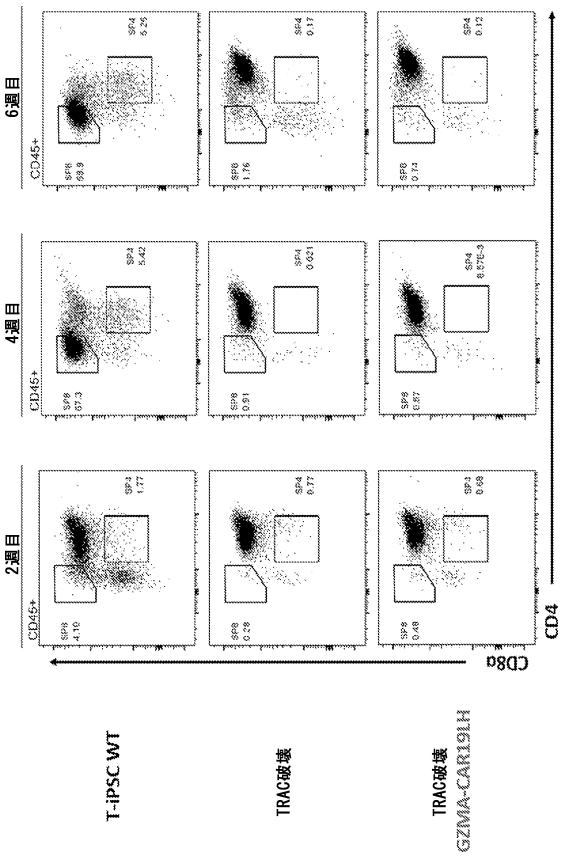
【図１０】



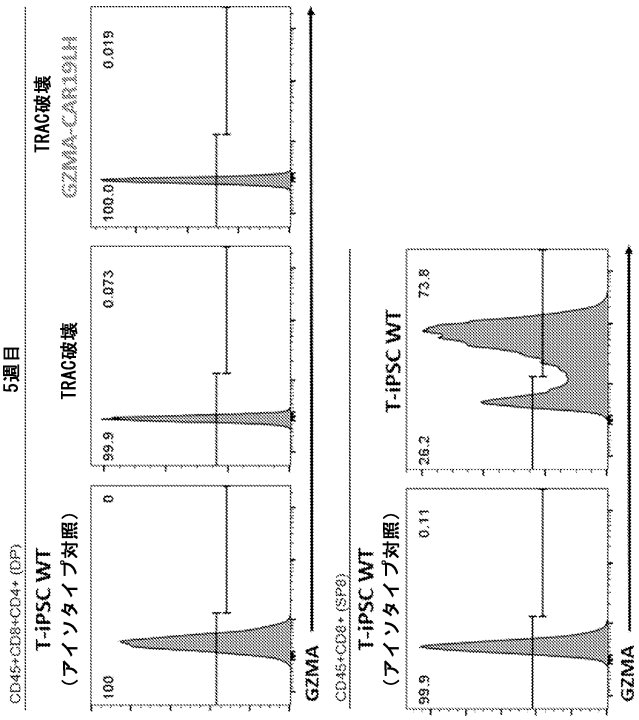
【図１１Ａ】



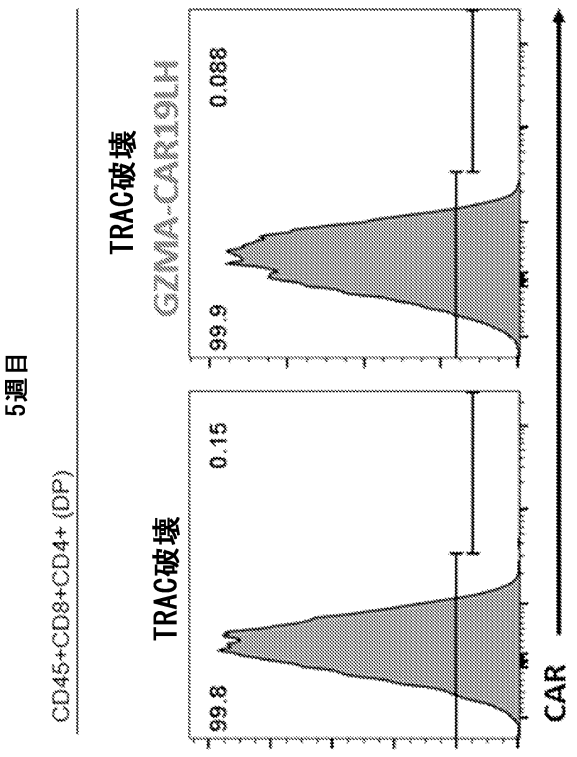
【図１１Ｂ】



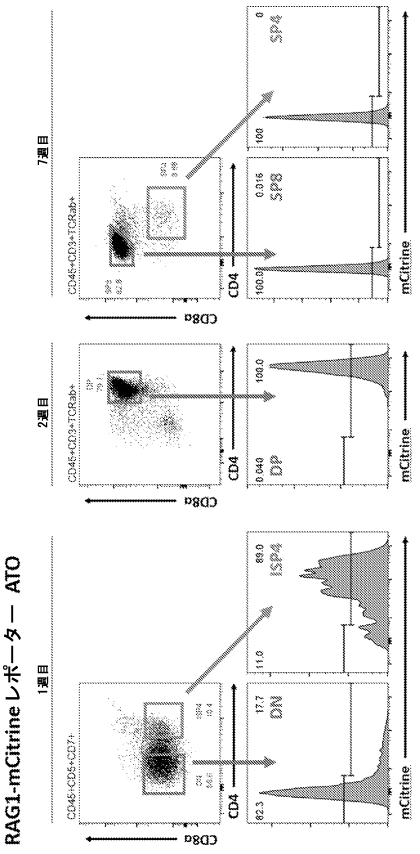
【図１１Ｃ】



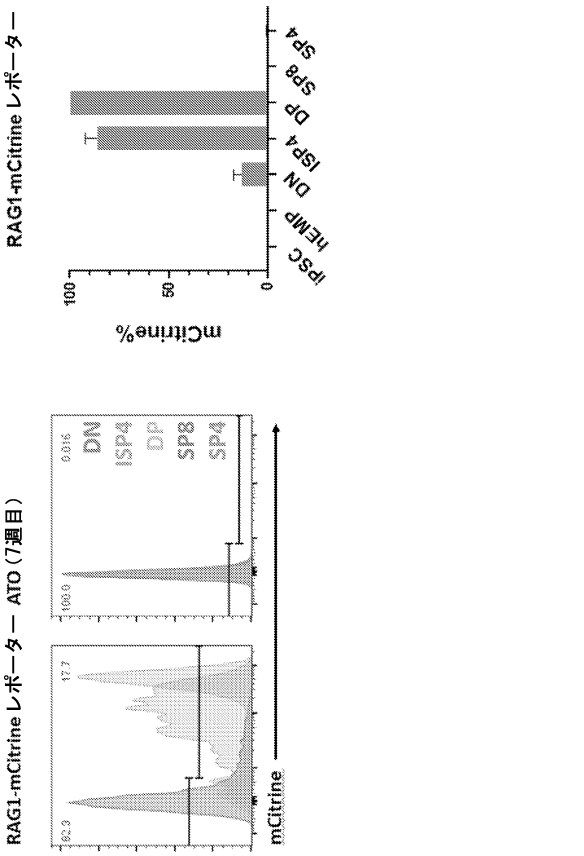
【図１１Ｄ】



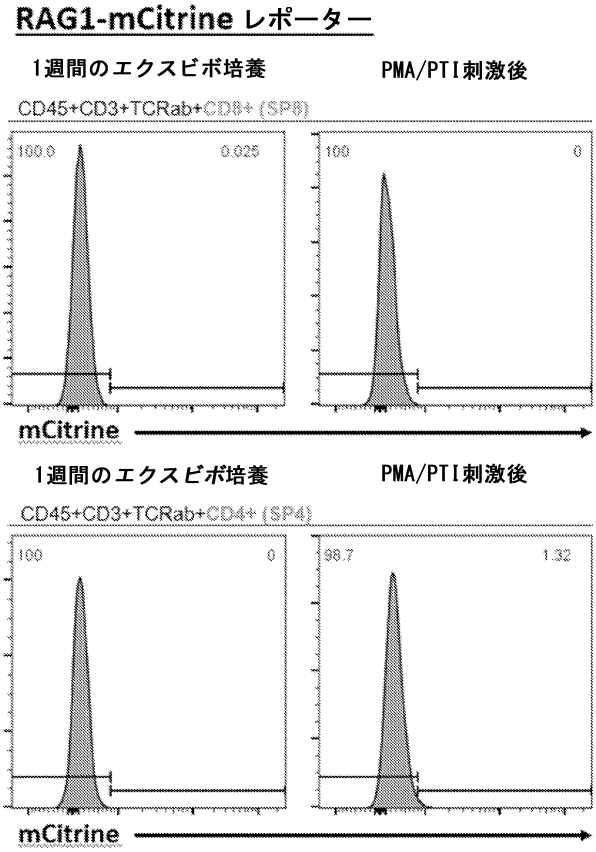
【図１２Ａ】



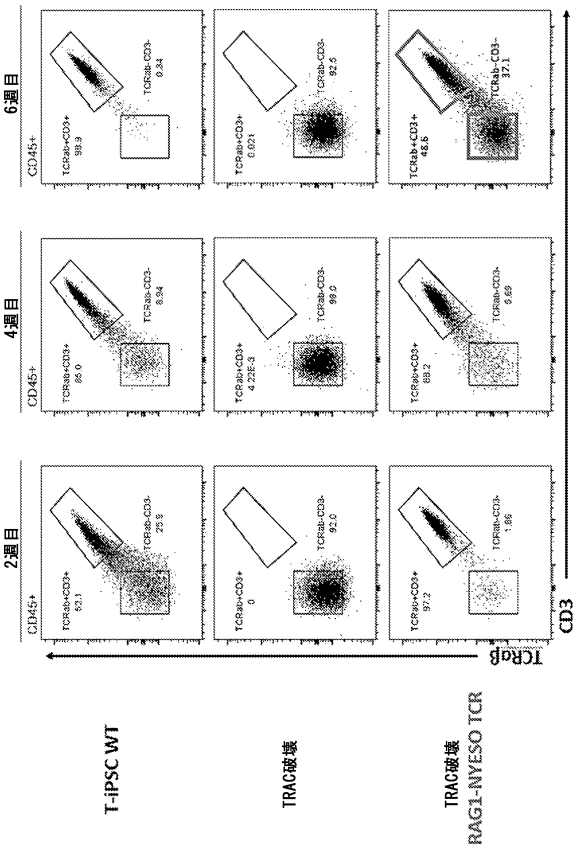
【図１２Ｂ】



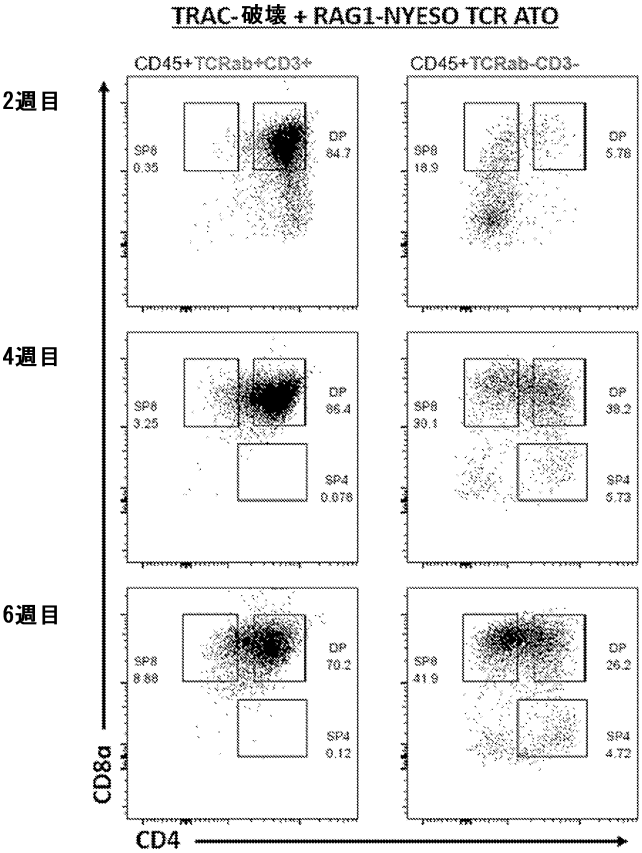
【図１２Ｃ】



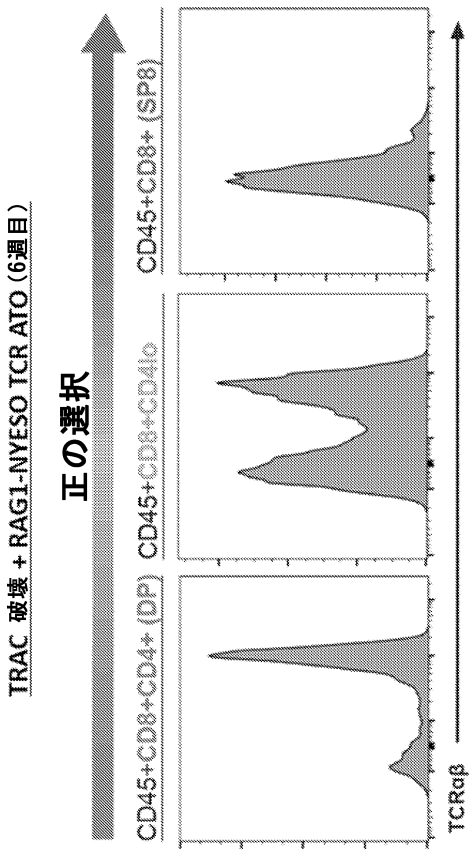
【図１３Ａ】



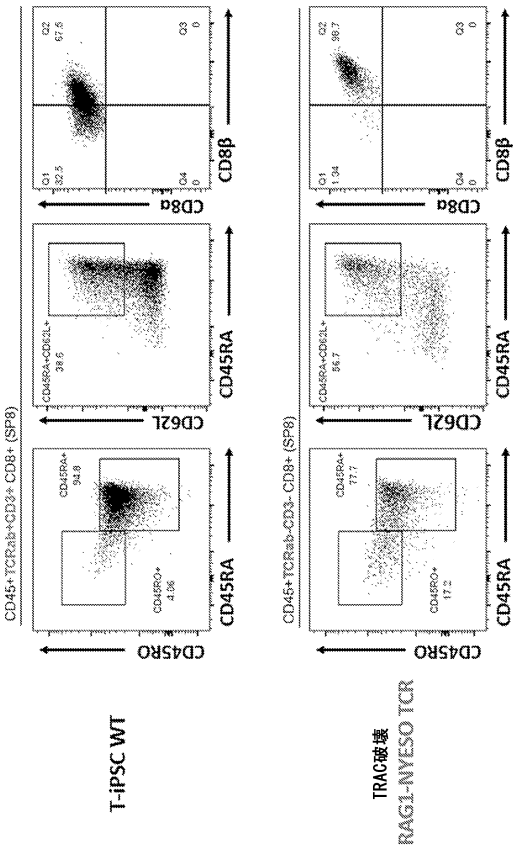
【図１３Ｂ】



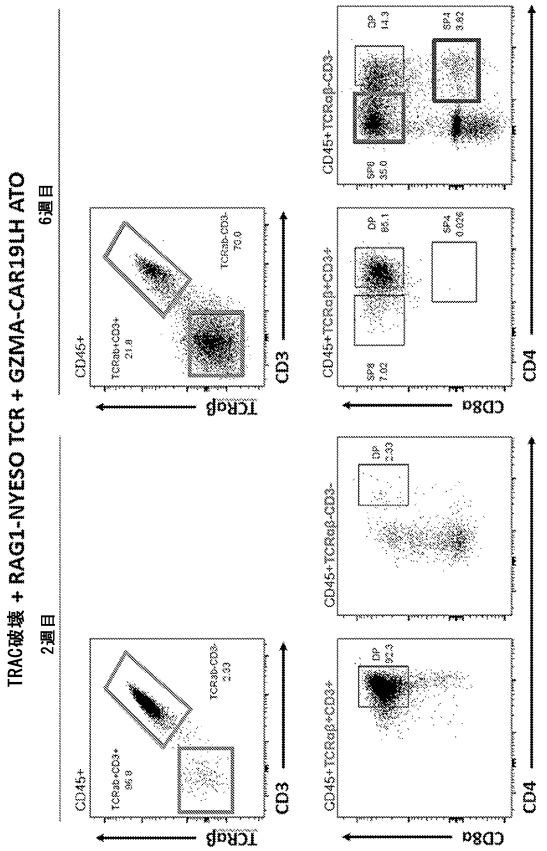
【図１３Ｃ】



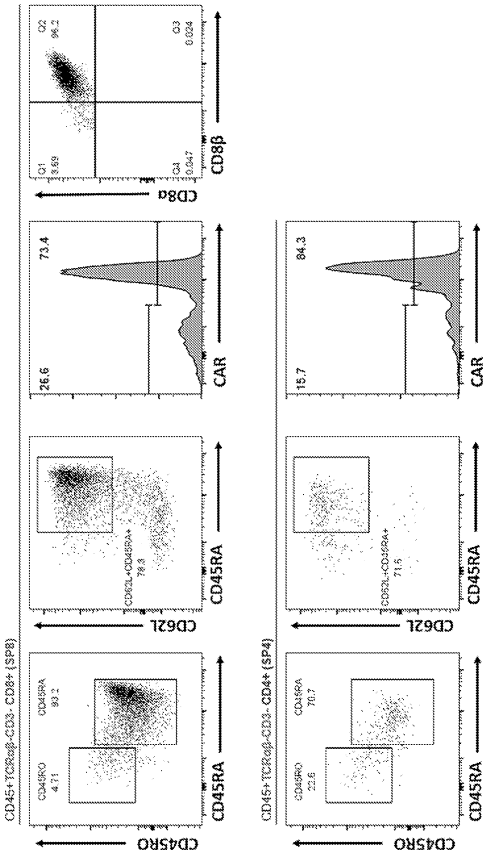
【図１３Ｄ】



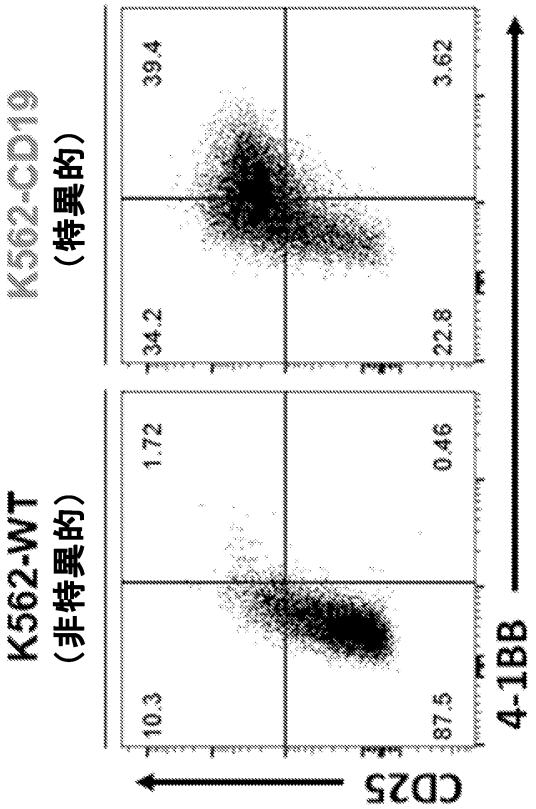
【図１４Ａ】



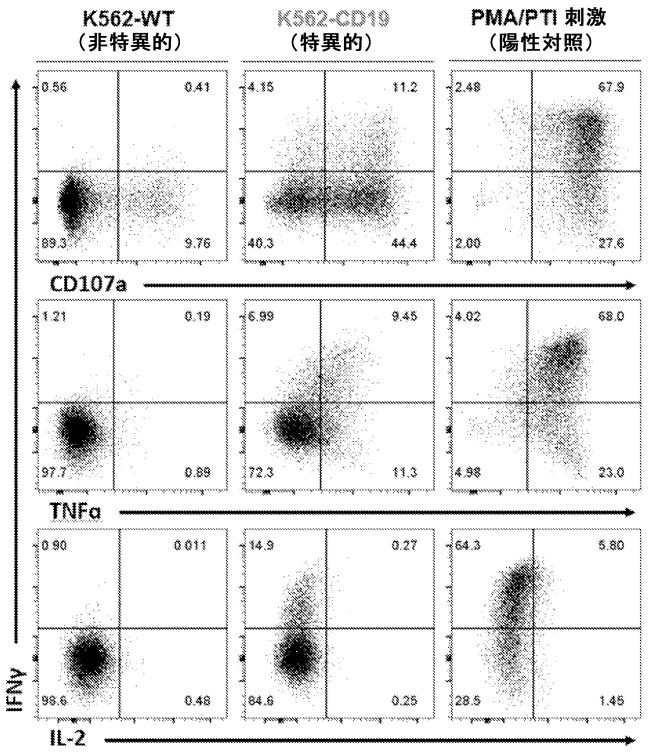
【図１４Ｂ】



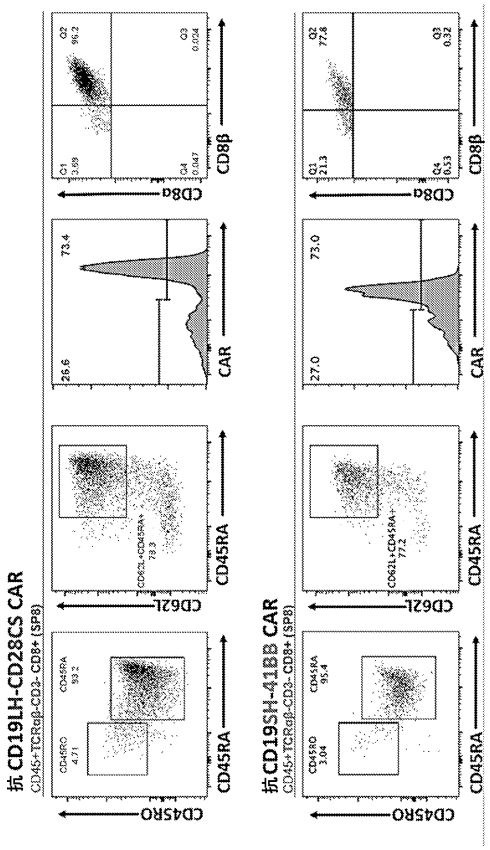
【図１４Ｃ】



【図１４Ｄ】



【図１４Ｅ】



【配列表】
20255078640000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/63587

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C12N 5/0783, A61K 35/17 (2023.01)
ADD. G01N 33/50, C12N 15/63 (2023.01)

CPC - INV. C12N 5/0636

ADD. G01N 33/5088, C12N 2510/00, C12N 2830/001

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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AGUILA et al., Transgenic mice carrying the diphtheria toxin A chain gene under the control of the granzyme A promoter: Expected depletion of cytotoxic cells and unexpected depletion of CD8 T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. October 1995, Vol. 92, pp. 10192-10196.	1-5
A	WO 2021/260186 A1 (JUNO THERAPEUTICS GMBH) 30 December 2021 (30.12.2021) Abstract	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
21 May 2023	JUL 05 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/63587

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as fi led.

   b. ☐ furnished subsequent to the international fi ling date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/63587

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-71
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2025.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02	
Ｃ１２Ｎ	*5/0735(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0735	
Ｃ１２Ｎ	*5/074(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/074	
Ｃ１２Ｎ	*5/078(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/078	
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783	

(32)優先日　令和5年2月2日(2023.2.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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,ME,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,NE,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,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　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100188433
弁理士　梅村 幸輔
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100214396
弁理士　塩田 真紀
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(72)発明者　クルックス ゲイ エム.
アメリカ合衆国 ９００９５－７１９１ カリフォルニア州 ロサンゼルス ウィルシャー ブールバード １０８８９ スイート ９２０ ユーシーエルエイ テクノロジー ディベロプメント グループ内
(72)発明者　コーン ドナルド ビー.
アメリカ合衆国 ９００２４ カリフォルニア州 ロサンゼルス ウィルシャー ブールバード １０８８９ スイート ９２０ ユーシーエルエイ テクノロジー ディベロプメント グループ内
(72)発明者　ヨ サン ピル
アメリカ合衆国 ９００２４ カリフォルニア州 ロサンゼルス ウィルシャー ブールバード １０８８９ スイート ９２０ ユーシーエルエイ テクノロジー ディベロプメント グループ内
(72)発明者　チャン パトリック

アメリカ合衆国 ９００２４ カリフォルニア州 ロサンゼルス ウィルシャー ブールバード １０８８９ スイート ９２０ ユーシーエルエイ テクノロジー ディベロプメント グループ内

Ｆターム（参考） 4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C087 AA01 AA02 BB37 BB64 BB65 CA04 NA14 ZB26 ZB27